

**Pankreatische *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen –
Welche Rolle spielen mikroRNAs und Glukose?**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Diana Oelschlägel

geb. am 14. April 1986 in Halle (Saale)

Gutachter:

Prof. Dr. Gary R. Sawers
Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer
PD Dr. Ortwin Naujok

Datum der Verteidigung: 15.08.2016

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	7
1.1 Diabetes mellitus	7
1.1.1 Epidemiologie	7
1.1.2 Pathogenese	8
1.1.3 Therapieoptionen	9
1.2 Das Pankreas	10
1.2.1 Embryonalentwicklung	10
1.2.2 Physiologie	12
1.3 Humane embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen	13
1.3.1 Therapieoptionen in Bezug auf Diabetes mellitus	13
1.3.2 Gewinnung	14
1.3.3 Charakterisierung	15
1.3.4 <i>In vitro</i> Differenzierung pankreatischer Insulin-produzierender Zellen	16
1.3.5 Potential und Herausforderungen der klinischen Anwendung	19
1.4 mikroRNAs	22
1.4.1 Biogenese und Funktion	23
1.4.2 Pankreas-assoziierte mikroRNAs	26
1.5 Glukose	29
1.5.1 Bedeutung für die Funktion von Beta-Zellen	29
1.5.2 Einfluss auf die pankreatische <i>in vitro</i> Differenzierung	30
1.6 Zielstellung der Arbeit	33
2. Material und Methoden	36
2.1 Zellkultur	36
2.1.1 Zelllinien	37
2.1.2 Zusammensetzung von Kultur- und Differenzierungsmedien	38
2.1.3 Kultur von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)	40
2.1.3.1 Passage und Inaktivierung der Zellen	42
2.1.3.2 Kryokonservierung	43
2.1.4 Kultur von humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen	43
2.1.4.1 Passage der Zellen	43
2.1.4.2 Kryokonservierung	45
2.1.4.3 Analyse der Pluripotenz	47
2.1.5 Pankreatische <i>in vitro</i> Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen	47
2.1.5.1 Transfektion von mikroRNA-375	49

2.1.5.2	Glukosestimulation	50
2.1.5.3	Kombination von mikroRNA-375-Transfektion und Glukosestimulation	51
2.1.5.4	Transfektion eines mikroRNA-375-Inhibitors	51
2.1.5.5	TALEs-Transfektion	52
2.2	Molekularbiologische Methoden	54
2.2.1	Isolation von RNA inklusive mikroRNAs	55
2.2.2	Synthese von cDNA	56
2.2.3	Semiquantitative PCR (RT-PCR)	57
2.2.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR	58
2.2.5	Gelelektrophorese	60
2.3	Proteinbiochemie	60
2.3.1	Immunfluoreszenzanalyse	60
2.3.2	Durchflusszytometrie	62
2.3.3	C-Peptid-ELISA (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)	62
2.4	Statistische Analysen	63
3.	Ergebnisse	64
3.1	Analyse des Stammzellcharakters humaner pluripotenter Stammzellen - Vergleich zwischen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen	64
3.2	Pankreatische <i>in vitro</i> Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen - Vergleich zwischen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen	67
3.2.1	Analyse Pankreas-assoziiierter Markergene auf mRNA- und Proteinebene	68
3.2.2	Analyse Pankreas-assoziiierter mikroRNAs	85
3.3	Etablierung einer Transfektionsmethode zur gezielten Modifikation der Expression von miR-375	90
3.4	Gezielte Modifikation der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung - Vergleich zwischen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen	92
3.4.1	Induktion von miR-375	92
3.4.2	Glukosestimulation	100
3.4.3	Kombination aus Induktion von miR-375 und Glukosestimulation	106
3.4.4	Vergleichende Analysen der Modifikationen des <i>in vitro</i> Protokolls am Endpunkt der pankreatischen Differenzierung	112
3.5	Bedeutung der miR-375 während der Differenzierung entodermaler Vorläuferzellen	126
3.5.1	Inhibitor-gesteuerte Repression von miR-375 während der Entstehung entoder- maler Vorläuferzellen	127
3.5.2	TALE-gesteuerte Induktion von miR-375 während der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen	130

4.	Diskussion	134
<hr/>		
4.1	Pankreatische <i>in vitro</i> Differenzierung - Vergleich des Potentials humaner embryonaler und induzierter pluripotenter Stammzellen	134
4.1.1	Pankreas-assoziierte mikroRNAs	140
4.2	Einfluss gezielter Modifikationen auf die Effizienz der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung - Vergleich zwischen humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen	143
4.2.1	Induktion von miR-375	143
4.2.2	Glukosestimulation	152
4.2.3	Kombination aus Induktion von miR-375 und Glukosestimulation	162
4.3	Bedeutung der miR-375 während der Differenzierung entodermaler Vorläuferzellen	173
4.3.1	Inhibitor-gesteuerte Repression der miR-375-Expression während der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen	173
4.3.2	TALE-gesteuerte Induktion der miR-375-Expression während der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen	181
<hr/>		
5.	Zusammenfassung	188
<hr/>		
6.	Anhang	I
<hr/>		
	Abkürzungsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	VI
	Tabellenverzeichnis	XI
	Literaturverzeichnis	XV
	Lebenslauf	XL
	Publikationsverzeichnis	XLII
	Danksagung	XLIV
	Eidesstattliche Erklärung	XLV

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die auf einen absoluten oder relativen Insulinmangel zurückzuführen ist und somit besonders den Metabolismus der Kohlenhydrate und Lipide beeinflusst. Es werden verschiedene Formen der Krankheit unterschieden, wobei ein Typ2-Diabetes (T2D) mit ca. 90 % aller Fälle die häufigste Variante darstellt. Neben dem Typ1-Diabetes (T1D), bei dem es zur autoimmun-vermittelten Zerstörung der Beta-Zellen kommt und dem Gestationsdiabetes sind noch weitere spezifische und seltener vorkommende Formen bekannt, die eine Folge anderer Erkrankungen, wie z.B. einer Pankreatitis oder genetischer Defekte darstellen (International Diabetes Federation 2013; Tao *et al.* 2015). Allen gemein ist die inadäquate Regulation des Blutglukosespiegels aufgrund einer fehlerhaften Insulinsekretion bzw. Insulinwirkung oder der Kombination beider Größen. Es kommt somit zu einer Hyperglykämie und damit langfristig verbundenen Schädigungen verschiedener Gewebe und Organe (Hien *et al.* 2014; diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe 2015).

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2014 waren weltweit schätzungsweise 387 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt bei einer Prävalenz von 8,3 %. Für das Jahr 2035 wird ein Anstieg um weitere 250 Millionen Patienten prognostiziert (International Diabetes Federation 2013).

Mit 7,9 Millionen Diabetikern zählt Deutschland zu den zehn Ländern mit der höchsten absoluten Zahl an Patienten. Bei ca. 95 % der Betroffenen liegt dabei ein Typ2-Diabetes vor, welcher eher im höheren Lebensalter auftritt und eine Korrelation mit Übergewicht und Bewegungsmangel aufweist. Bei der Suche nach Ursachen müssen Faktoren wie Veränderungen im Lebensstil (Ernährung, sportliche Aktivität), aber auch soziale Aspekte (Freizeitmöglichkeiten, Arbeitsplatzsituation) und allgemein präsente Lebensbedingungen wie z.B. vorhandene Umweltschadstoffe berücksichtigt werden. Erschreckend klingt die Tatsache, dass an Diabetes und den assoziierten Folgeerkrankungen aktuell immer noch stündlich drei Menschen in Deutschland sterben. Zu den Folgen eines nicht adäquat eingestellten Blutzuckerspiegels zählen jährlich 40.000 Amputationen, 2.000 Neuerblindungen und 2.300 neue dialysepflichtige Patienten (diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe 2015). Die Behandlung der Grunderkrankung inklusive der auftretenden Folgeschäden belastet das Gesundheitssystem in hohem Maße. Ein Diabetespatient verursacht ca. das 1,8-fache der Kosten im Vergleich zu einem Nicht-Diabetiker, was einem geschätzten Wert von zusätzlichen 2.600-2.900 Euro pro Patient entspricht. Insgesamt ergeben sich direkte Kosten für das Gesundheitswesen von jährlich ca. 42 Milliarden Euro nur für die Behandlung des Diabetes mellitus. Angesichts der weltweit steigenden Diabetes-Prävalenz und dem gleichzeitig limitierten Therapieangebot, welches nicht frei von Nebenwirkungen ist und aktuell keinen kurativen Ansatz beinhaltet, ergibt sich die Notwendigkeit eines umfassenden Konzeptes, bei dem neben der Einbeziehung der Patienten im Zuge von Aufklärungskampagnen über typische Risikofaktoren auch Forschungsansätze gefördert werden sollten, die zu einem tieferen Verständnis der Pathologie und daraus abgeleitet zur Entwicklung neuer Therapieoptionen beitragen. Die Generierung Insulin-produ-

zierender Zellen aus humanen pluripotenten Stammzellen zur Bereitstellung von *in vitro* Testsystemen zur Identifizierung neuartiger medikamentöser Wirkstoffe und perspektivisch zum Einsatz im Rahmen einer Zellersatztherapie stellt dabei einen sehr interessanten und innovativen Forschungsansatz dar.

1.1.2 Pathogenese

In Bezug auf Diabetes mellitus lassen sich eine ganze Reihe an klinisch und genetisch unterscheidbaren Formen beschreiben, wobei im Rahmen der vorliegenden Arbeit besonders auf den Typ2-Diabetes als Hauptform näher eingegangen wird. An der Ausbildung eines Typ2-Diabetes sind mehrere Faktoren beteiligt, die im Zusammenspiel zur Manifestation der Erkrankung führen. Die Reaktion eines gesunden Stoffwechsels auf einen Glukosereiz besteht in einer zweiphasigen Insulinantwort, wobei auf eine schnelle kurze Sekretionsphase nachgeschaltet eine längere Sekretion zur Feinabstimmung folgt. Die erste Antwort fehlt beim Typ2-Diabetes und kann langfristig nicht ausreichend mit der zweiten Antwortphase ausgeglichen werden. Über einen begrenzten Zeitraum von mehreren Jahren bis Jahrzehnten kann zwar einer Erhöhung des Blutzuckergehaltes durch die kompensatorisch wirkende, verstärkte Sekretion im Rahmen der zweiten Insulinantwort entgegen gewirkt werden, aber eine zunehmende Insulinresistenz der Glukose-aufnehmenden Gewebe wie Muskel, Leber und Fettzellen und die damit notwendigerweise stetig ansteigende Insulinproduktion führt letztlich zur Überlastung und Apoptose der Beta-Zellen. Reicht die Synthese von Insulin nicht mehr aus um den Blutzuckerspiegel effektiv zu senken, kommt es zur Manifestation des Diabetes. Da dieser Vorgang sehr schleichend verläuft, wird die Krankheit häufig zufällig im Rahmen anderer klinischer Untersuchungen oder erst durch das Auftreten von Folgeerkrankungen diagnostiziert.

Die Mehrheit der an Typ2-Diabetes leidenden Patienten ist übergewichtig, was entscheidend zur Entwicklung des Krankheitsbildes beiträgt. So kann eine auftretende Fettleber durch erhöhte Glukoneogenese die morgendliche Nüchtern-Hyperglykämie und postprandiale Hyperglykämie begünstigen (Hien und Böhm 2007; Hien *et al.* 2014). Eine genetische Komponente ist ebenfalls von Bedeutung, denn eine Vielzahl von Genen sind mit der Entstehung des T2D assoziiert, wobei allerdings jedes einzelne nur einen relativ geringen Beitrag zum Krankheitsrisiko beisteuert (Dingermann und Zündorf 2013). Zu den mit Diabetes mellitus assoziierten Folgeerkrankungen gehören u.a. Makro- und Mikroangiopathien, die z.B. zu Schädigungen des Herz-Kreislaufsystems führen können (Ali *et al.* 2010; Pfeiffer und Klein 2014). Ebenso liegt ein erhöhtes Risiko für Infektionskrankheiten und sogar malignen Erkrankungen vor (Müssig *et al.* 2011; Mannucci 2012; Shah und Hux 2003). Der Anteil an Typ1-Diabetikern ist mit ca. 5 % aller Diabetespatienten zwar insgesamt gering, aber es ist die häufigste Autoimmunerkrankung bei Kindern und Jugendlichen mit einer jährlich steigenden Inzidenz von 4,5 % bei gleichzeitiger Abnahme des Lebensalters zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation (Hummel und Achenbach 2015). Der Typ1-Diabetes ist durch eine autoimmun-vermittelte Zerstörung der Beta-Zellen gekennzeichnet, wobei es zur entzündlichen Infiltration der Inselzellen kommt und Inselzellantigene über Autoantikörper erkannt werden. Bei einem Anteil von 80 % abgestorbener Beta-Zellen kann die endogene Blutzuckerregulation nicht mehr erhalten werden, was eine regelmäßige Zufuhr von Insulin als Therapie bedingt. Bei diesem Diabetes-Typ spielen genetische Faktoren eine prädisponierende Rolle, was mit einer positiven Familienanamnese bei 20 % der Betroffenen korreliert (Herold 2015; Hien und Böhm 2007).

Diabetesform	Regelrechte Glukosetoleranz	Hyperglykämie	
		Prädiabetes	Diabetes mellitus
		Abnorme Nüchternglukose oder gestörte Glukosetoleranz	Nicht insulinbedürftig Insulinbedürftig zum Erreichen einer guten Einstellung Insulinbedürftig zum Überleben
Typ 1			
Typ 2			
Weitere spezifische Diabetesformen			
Gestationsdiabetes			
Zeit (Jahre)			
Nüchtern-Plasmaglukose	< 100 mg/dl (< 5,6 mmol/l)	100–125 mg/dl (5,6–6,9 mmol/l)	≥ 126 mg/dl (≥ 7,0 mmol/l)
2-h-Plasmaglukose	< 140 mg/dl (< 7,8 mmol/l)	140–199 mg/dl (7,8–11,1 mmol/l)	≥ 200 mg/dl (≥ 11,1 mmol/l)
HbA1c	< 5,6 %	5,7–6,4 %	> 6,5%

Abb. 1: Übersicht zur zeitabhängigen Entwicklung verschiedener Formen des Diabetes mellitus ausgehend von einer regelrechten Glukosetoleranz bis zum manifesten Diabetes. Die Pfeilspitzen weisen auf die mögliche Reversibilität der einzelnen Etappen hin. T2D-Patienten können dies z.B. durch Maßnahmen zur Gewichtsreduktion erreichen und ebenso Patientinnen mit Gestationsdiabetes nach erfolgter Entbindung. Die angegebenen Richtwerte zur Plasmaglukosekonzentration und die HbA1c - Werte richten sich nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Der HbA1c - Wert wird zur Einschätzung von Langzeit-Blutzuckerwerten genutzt, da es sich hierbei um ein glykosyliertes Hämoglobin handelt. Der Anteil an HbA1c am Gesamthämoglobin wird bestimmt und als Prozentwert angegeben (Longo *et al.* 2012).

1.1.3 Therapieoptionen

Die Behandlung eines diagnostizierten Typ1-Diabetes besteht in der Substitution von Insulin, wobei der Patient die Insulin-Zugabe an seine Nahrungsaufnahme und Lebensgewohnheiten wie z.B. körperliche Aktivität anpassen muss. Mit Hilfe von Schulungen sollte dafür ein geeigneter Plan erarbeitet werden, um u.a. das Risiko für eine Unterzuckerung und den damit verbundenen schwerwiegenden Folgen wie ein hypoglykämischer Schock zu minimieren. Neben der manuellen und bedarfsgerechten subkutanen Insulininjektion ist auch eine automatisierte Injektion mittels Insulinpumpe möglich. Auch wenn mit Hilfe der Substitution von Insulin den Betroffenen kurzfristig gut geholfen werden kann und eine Steigerung der Lebensqualität erreicht wird, ist eine vollständige und langfristig exakte Nachahmung der endogen regulierten Insulinsekretion nicht immer möglich, was das Risiko für zahlreiche Folgeerkrankungen erhöht. Da aktuell noch keine Heilungsoption für Diabetes mellitus existiert, müssen die

Patienten die Notwendigkeit einer lebenslangen, stetig individuell abgestimmten Therapie realisieren und akzeptieren. Da bei einem T2D zumeist hohe Energiezufuhr bei gleichzeitig mangelnder Bewegung vorliegt, besteht die Basis einer erfolgreichen Therapie auch aus einer konsequenten Änderung des Lebensstils, wobei der HbA_{1c} - Wert (= Anteil glykosyliert vorliegendes Hämoglobin im Blut) als Indikator gilt. Sollte unter ärztlicher Überwachung nach ca. drei Monaten der Zielkorridor von 6,5-7,5 % HbA_{1c} nicht erreicht werden, wird meist zusätzlich mit einer medikamentösen Therapie begonnen. Die patientenspezifische Wirksamkeit und Verträglichkeit gängiger Medikamente bilden gemeinsam mit der Lebens- und Arbeitssituation und der Schwere des Krankheitsverlaufs die Grundlage für die Behandlung mit nur einem Wirkstoff oder einer Kombination aus Präparaten mit verschiedenen Wirkmechanismen. Die eingesetzten anti-hyperglykämischen Medikamente unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Strategie zur gewünschten Verbesserung der Insulinversorgung. So sinkt bei Nutzung von Substanzen wie DDP-4-Inhibitoren, Inkretinmimetika und Metformin mit fallendem Blutzuckerspiegel auch die Insulinsekretion. Diese Substanzen wirken somit fördernd auf eine noch gering vorhandene, endogene Sekretion und bergen nicht das Risiko einer Hypoglykämie. Im Gegensatz dazu besteht bei Medikamenten, die den Insulinspiegel Glukose-unabhängig steigern die Gefahr einer Hypoglykämie und ausblickend einer Gewichtszunahme, was dem grundlegenden Therapieentwurf entgegenwirken kann. Zu diesen Substanzen zählen u.a. Sulfonylharnstoffe und natürlich Insulin (Pfeiffer und Klein 2014; Longo *et al.* 2012). Um einen positiven Therapieerfolg erzielen zu können, der die Verbesserung der Lebensqualität und weitgehende Vermeidung von mikro- und makroangiopatischen Folgeschäden beinhaltet, ist eine umfassende Aufklärung, Begleitung und Schulung der Patienten notwendig. Auswirkungen körperlicher Aktivität und Ernährungsverhalten auf die Insulinwirksamkeit und der Umgang mit Komplikationen wie Hypoglykämien müssen vermittelt werden.

1.2 Das Pankreas

Im Jahr 1856 beschrieb der Arzt Claude Bernard (1813-1878) erstmalig die Bedeutung des Pankreas für die Fettverdauung und verwies zudem auf die universale Verdauungsfunktion dieses Organs, da sein Sekret auf alle drei Nahrungskomponenten, nämlich Fette, Kohlenhydrate und Eiweiße einwirkt. Neben der Aufschließung der Nahrungsbestandteile spielt die Bauchspeicheldrüse jedoch auch die zentrale Rolle in der Regulation des Blutzuckerspiegels, weshalb sie gleichermaßen als exokrines und endokrines Organ bezeichnet wird (Witt 2013).

1.2.1 Embryonalentwicklung

Während der vierten Gestationswoche entwickelt sich das Pankreas aus zunächst zwei Knospen des primitiven Vorderdarms. Diese werden als ventrale und dorsale Pankreasanlagen bezeichnet. Die ventrale Anlage ist unterhalb der Leberanlage im ventralen Mesenterium lokalisiert, während die dorsale Anlage leicht oberhalb und gegenüber der Leberanlage gebildet wird. In den folgenden zwei Wochen der Embryonalentwicklung kommt es zur Wanderung der ventralen Anlage gemeinsam mit der Einmündung des *Ductus choledochus* um die Rückseite des Vorderdarms letztlich hinter und unterhalb der dorsalen Anlage. An diese Rotationsbewegung schließt sich die Fusion sowohl des Parenchyms

als auch der Ausführungsgänge beider Anlagen an, wobei die dorsale Anlage den Körper und Schwanzabschnitt und die ventrale den Kopfbereich und *Processus uncinatus* bilden. Der Hauptausführungsgang des Pankreas, der *Ductus pancreaticus* (Wirsung), entsteht durch die Verschmelzung des Ganges der ventralen Anlage mit dem distalen Ganganteil der dorsalen Anlage. Es kommt außerdem entweder zur vollständigen Rückbildung des proximalen Ganganteils der dorsalen Anlage oder zur Erhaltung als akzessorischer Gang, dem *Ductus Santorini*. Parallel beginnt die Ausdifferenzierung der epithelialen Zellen der Bauchspeicheldrüse zu azinären, dukталen und endokrinen Zellen. Ab der zwölften Gestationswoche sind endokrine Inselzellen und ab der 14. bis 16. Woche auch azinäre Strukturen nachweisbar. Mit dem fünften Entwicklungsmonat beginnt die Bildung von Zymogengranula in den Azinuszellen und die Sekretion von Insulin (Slack 1995; Gittes *et al.* 2010; Witt 2013).

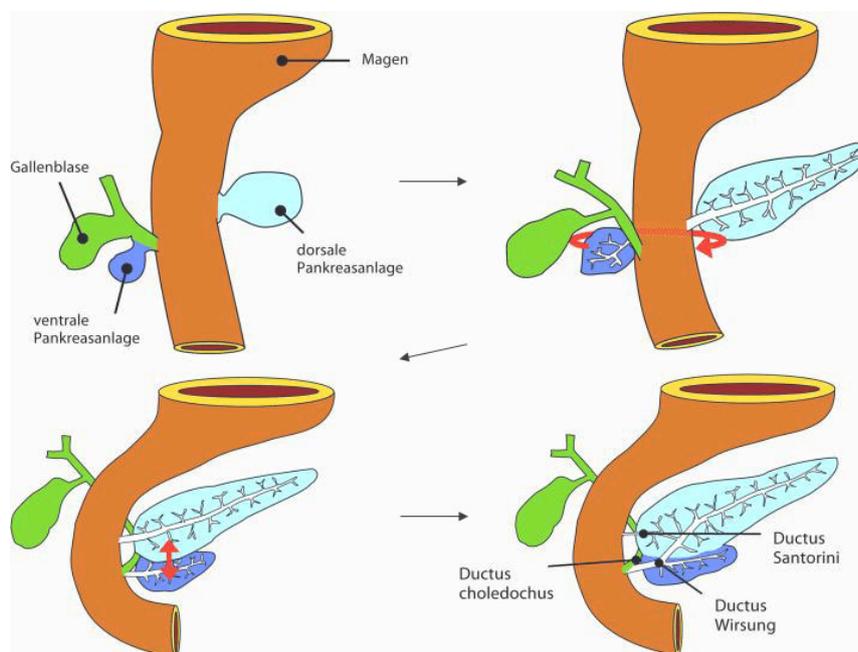


Abb. 2: Übersicht über die Rotations- und Fusionsereignisse während der Pankreasorgano-genese ausgehend von der ventralen und dorsalen Ausstülpung des Vorderdarms (Witt 2013, modifiziert).

Die Entwicklung des Pankreas wird stark vom umgebenden Gewebe beeinflusst. Nach der Ausbildung des Darmrohres wird die Entstehung der dorsalen Pankreasknospe maßgeblich durch Signale der benachbart liegenden *Chorda dorsalis* und später der dorsalen Aorta bestimmt. Die ventrale Pankreasanlage befindet sich dagegen im engen Kontakt mit dem umliegenden kardialen Mesenchym (Gittes *et al.* 2010). Diese mesodermalen Strukturen sind für die frühe Musterbildung der Pankreasanlagen essentiell, denn Kim *et al.* konnten zeigen, dass die Entfernung der *Chorda* in frühen Hühnerembryonen eine adäquate Ausbildung des dorsalen Pankreasanteils verhindert (Kim *et al.* 1997). Während die Expression von *SONIC HEDGEHOG* (*SHH*) im gesamten entodermalen Darmrohr nachzuweisen ist, wird sie im Bereich des zukünftigen pankreatischen Entoderms aktiv durch sekretierte Morphogene der (TGF β)-Familie (*Transforming Growth Factor β*), wie der *FGF2* (*Fibroblast Growth Factor 2*) und Activin B aus den benachbarten Strukturen reprimiert. Die Aufrechterhaltung der *SHH*-Expression im umliegenden Entoderm ist für eine korrekte Regulation der Pankreasgröße essentiell. Zusätzlich wird die Ausdehnung des Pankreas durch die Aktivität von *INDIAN HEDGEHOG* (*IHH*), einem weiteren Mitglied der hedgehog-Familie reguliert (Hebrok *et al.* 2000). Die Sekretion von Wachstumsfaktoren der

FGF-Familie (FGF1, FGF7 und FGF10) im entstehenden pankreatischen Mesenchym und die Lokalisation des entsprechenden Rezeptors für diese Liganden, dem FGF-Rezeptor 2B (FGFR2B), im pankreatischen Epithel fördert dessen Proliferation (Ye *et al.* 2005). Zusätzlich ist die Wirkung von Retinsäure für eine korrekte Ausbildung des Pankreas essentiell, denn die vom umgebenden Mesoderm vermittelten Signale fördern die Expression von *PDX1*, dem zentralen Transkriptionsfaktor sich bildender pankreatischer Vorläuferzellen (Micallef *et al.* 2005). Außerdem ist Retinsäure an der regelgerechten Festlegung der Pankreasgröße über eine negative Rückkopplungsschleife zur Regulation von *CYP26* beteiligt (Kinkel *et al.* 2009).

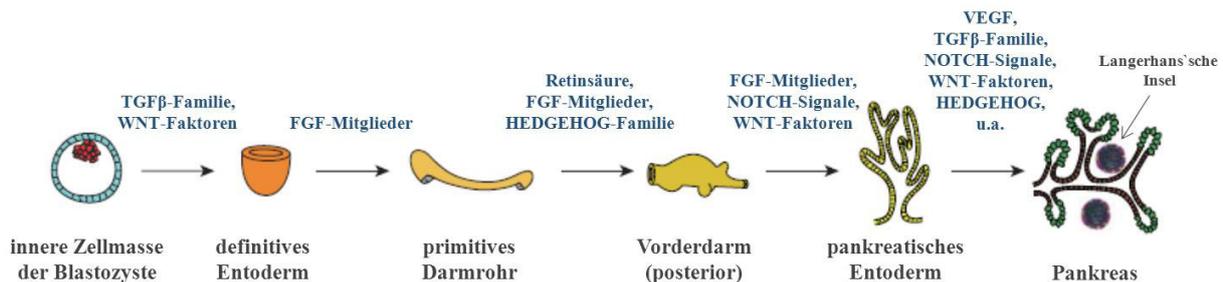


Abb. 3: Die sequenzielle Abfolge der einzelnen Entwicklungsetappen während der Pankreasformation wird von zahlreichen Faktoren reguliert, die sowohl in ihrer Konzentration als auch in ihrem zeitlichen Wirkungsfenster aufeinander abgestimmt zur Bildung eines zellulären Signalnetzwerkes führen. Bei der *in vitro* Differenzierung von Insulin-produzierenden Zellen werden diese Signale mittels Substitution entsprechend forcierender Mediumzusätze z.B. in Form von Wachstumsfaktoren imitiert (Hebrok 2012, modifiziert).

1.2.2 Physiologie

Der duale Charakter des Pankreas als exokrines und endokrines Organ wird in seiner Rolle sowohl beim Aufschluss von Nahrungsmittelbestandteilen als auch in der Regulation des Blutglukosespiegels verdeutlicht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf der endokrinen Funktion der Bauchspeicheldrüse, die über hormonproduzierende Zellen des Inselapparates (Langerhans'sche Inseln) gewährleistet wird und die insgesamt nur ca. 2 % des gesamten Organs einnehmen. Die 0,5 bis 2 Millionen polymorphen Inseln besitzen einen Durchmesser von ca. 80 bis 500 μm und bestehen aus einem Netzwerk an Zellen, das sich zwischen den zahlreich vorkommenden Blutkapillaren lückenlos einfügt (Bucher und Wartenberg 1997). Innerhalb der Langerhans'schen Inseln stellen die Insulin-produzierenden Beta-Zellen mit 60 - 80 % die größte Population dar. Daneben sind Glucagon-produzierende Alpha-Zellen mit ca. 20 %, Somatostatin-produzierende Delta-Zellen zu 5 - 10 % und Pankreatisches Polypeptid-produzierende Zellen (PP-Zellen) mit ca. 2 % vertreten (Edlund 2002; Witt 2013). Im Gegensatz zu anderen Säugetieren zeigen die Inseln des humanen Pankreas ein weniger striktes Verteilungsmuster der einzelnen Zelltypen. Die Beta-Zellen sind nicht nur, umringt von den übrigen endokrinen Zellarten, im Kern lokalisiert, sondern ebenso über die Langerhans'sche Insel verstreut und sogar auch außerhalb dieser Strukturen zu finden (Van Hoof *et al.* 2009). In den Beta-Zellen wird Insulin zunächst als inaktives Proenzym gebildet. Es folgt die Konvertase-vermittelte Abspaltung des

C-Peptids (*Connecting Peptide*) im Golgi-Apparat und in den zellulären Granula zur Synthese der biologisch aktiven Form. Die Sekretion von Insulin erfolgt nach Einwirkung verschiedener physiologischer Stimuli, wobei der wichtigste eine Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration darstellt. Zusätzlich können Enteroenzyme, wie GIP (*Gastric Inhibitory Polypeptide*) und GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide 1*) die Sekretion stimulieren, während Somatostatin, Leptin und Katecholamine die Sekretion hemmen. Die Hauptaufgabe des Insulins besteht in der Absenkung des Blutzuckerspiegels, was durch eine gesteigerte Aufnahme der Glukose vornehmlich in Muskulatur, Fettgewebe und die Leber realisiert wird. In Folge der Aktivierung von Glykogensynthese und Phosphodiesterase kommt es zur verstärkten Glykogensynthese und verminderter Glykogenolyse in der Leber und den Muskelzellen. Gleichzeitig wird auch die Zuckersynthese aus Vorstufen (Glukoneogenese) in der Leber gehemmt. Zusätzlich begünstigt Insulin die Proteinsynthese aufgrund verstärkter zellulärer Aufnahme von Aminosäuren, während es im Fettgewebe hemmend auf die Lipolyse wirkt und die Triglyceridsynthese steigert (Witt 2013). Die Wirkung des innerhalb der Alpha-Zellen ebenfalls aus einem Vorläufermolekül, dem Präproglucagon und mittels Proprotein-Konvertasen gespaltenen und aktivierten Glucagons setzt schon vor Absinken des Blutglukosegehaltes unter den Sollwert ein. Glucagon wirkt antagonistisch zum Insulin, indem es die Freisetzung von Glukose in den Blutkreislauf durch Förderung der Glykogenolyse anregt. Für eine adäquate Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase ist die gegensätzliche Wirkung von Insulin und Glucagon essentiell, da somit sowohl die Energiespeicherung als auch der Energieverbrauch durch die Körperzellen reguliert wird (Campbell *et al.* 2012).

1.3 Humane pluripotente Stammzellen - embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen

1.3.1 Therapieoptionen in Bezug auf Diabetes mellitus

Alle verfügbaren medikamentösen Therapieoptionen zur Behandlung des Diabetes mellitus sind rein symptomatisch. Da sich aktuell auch mit einer optimalen Behandlung die physiologische Blutzuckerregulation nicht exakt nachbilden lässt, sind langfristige Folgeschäden bis hin zu einer verkürzten Lebenserwartung noch immer mit einem Diabetes assoziiert (Heidemann *et al.* 2009). Potentiell kurative Ansätze, wie die Transplantation einer vollständigen Bauchspeicheldrüse bzw. von Langerhans'schen Inseln sind aufgrund des Missverhältnisses zwischen vorhandenem und geeignetem Spendermaterial und der Vielzahl der Diabetespatienten in ihrer Anwendung stark limitiert. Studien zur *in vitro* Expansion isolierter Inselzellen ergaben zudem eine partielle De-Differenzierung der Beta-Zellen, was mit einem Aktivitätsverlust von Genen einherging, die für den Erhalt des Phänotyps und der adäquaten Funktion dieser Zellen essentiell sind (Ouziel-Yahalom *et al.* 2006; Russ *et al.* 2009).

Zellbasierte Therapieansätze stellen daher eine interessante Option dar, da sich mit Hilfe von *in vitro* differenzierten Insulin-produzierenden Zellen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten ergeben. Humane pluripotente Stammzellen bieten für die Produktion von Insulin-produzierenden Zellen ein geeignetes und theoretisch unerschöpfliches Material, da sie eine unbegrenzte Reproduzierbarkeit aufweisen und zur Differenzierung in alle Zelltypen des menschlichen Körpers fähig sind. Zu ihnen zählen die aus humanen Blastozysten gewonnenen embryonalen Stammzellen (hESZ) und die durch Reprogrammierung von differenzierten somatischen Zellen eines Spenders erzeugten induzierten pluripotenten Stammzellen.

len (hiPSZ) (Thomson 1998; Wernig *et al.* 2007). Neben der Suche nach potentiellen neuen medikamentösen Wirkstoffen, eignen sich die planbaren zellbasierten *in vitro* Testsysteme auch zur direkten und patientenspezifischen Überprüfung der individuellen Wirksamkeit bzw. Toxizität einzelner Substanzen (Wobus *et al.* 2015; Kobold *et al.* 2015). Da im Rahmen des *in vitro* Differenzierungsprozesses die Etappen der Beta-Zell-Entwicklung *in vivo* nachempfunden werden, sind vor allem unter Verwendung von hiPSZ eines diabetischen Spenders ebenso Analysen zu Mechanismen der Pathogenese möglich. Die Implantation der *in vitro* generierten Zellen im Zuge einer Zellersatztherapie stellt sicherlich die interessanteste Therapieoption dar, für deren Verwirklichung allerdings noch zahlreiche Herausforderungen bewältigt werden müssen. So besteht die Notwendigkeit zur weiteren Erforschung grundlegender Marker bzw. differenzierungsrelevanter Größen zur umfassenden Charakterisierung der einzelnen Differenzierungsabschnitte. Ein Vergleich mit bereits bekannten Erkenntnissen aus *in vivo* Studien zur Embryonalentwicklung des Pankreas bzw. der Beta-Zellen anhand fetalen Gewebes verschiedener Entwicklungsstufen kann Hinweise auf potentielle Fehlregulationen innerhalb der vorherrschenden *in vitro* Kulturbedingungen geben. Die Detektion solcher potentiellen Missverhältnisse von einflussreichen Größen wie mikroRNAs und Glukose als essentieller Nährstoff sowie daraus folgend die gezielte Modulation dieser Faktoren zur Annäherung an die *in vivo* bestehenden Entwicklungsbedingungen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit realisiert.

1.3.2 Gewinnung

Die ersten humanen embryonalen Stammzelllinien wurden im Jahr 1998 aus der inneren Zellmasse von überzähligen Blastozysten gewonnen, welche im Rahmen von *in vitro* Fertilisationen (IVF) erzeugt wurden (Thomson 1998). Bis zum Jahr 2009 existierten bereits weltweit über 1.000 Linien aus humanen embryonalen Stammzellen und die Zahlen steigen weiter, denn stetige Optimierungen während der Gewinnung bzw. Etablierung erlauben zunehmend vereinfachte, standardisierte Kulturbedingungen, frei von *Xeno*-Kontaminationen, was für potentielle klinische Anwendungen essentiell ist.

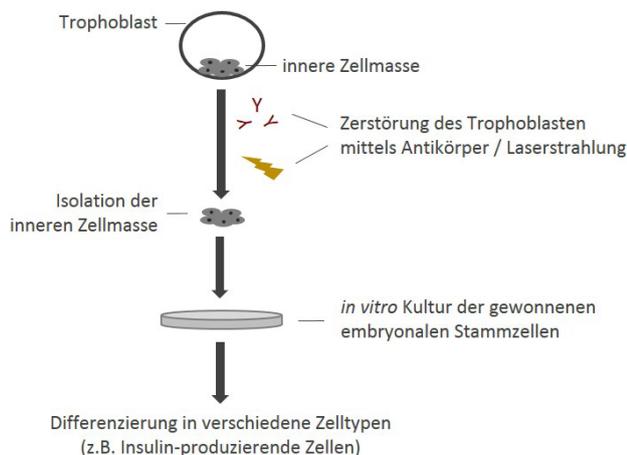


Abb. 4: Zur Gewinnung embryonaler Stammzellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste erfolgt zuerst die Entfernung der umhüllenden Schicht aus Trophoblastzellen mittels spezifischer Antikörper oder Laserstrahlen. Die isolierten Zellen können *in vitro* kultiviert und unter Nutzung diverser Wachstumsfaktoren in Derivate aller drei Keimblätter differenziert werden.

Zusätzlich stellen Linien mit einem spezifischen, genetisch determinierten Krankheitshintergrund interessante Forschungsansätze für die Untersuchung und Aufklärung pathogener Mechanismen dar. Die Gewinnung von humanen ESZ (hESZ) ist ethisch durchaus umstritten, was zu einer individuellen

Gesetzgebung in den über 35 Ländern, die mit diesen Zellen arbeiten, geführt hat (Löser *et al.* 2011). Deutschland besitzt zur Regelung des Umgangs mit hESZ seit dem Jahr 2002 ein Stammzellgesetz (StZG), aus dem hervorgeht, dass eine Gewinnung der Zellen grundsätzlich verboten, die Forschung allerdings in begründeten Fällen erlaubt ist. Das beinhaltet die Realisierung hochrangiger Forschungsziele z.B. im Bereich der regenerativen Medizin, die nicht durch Untersuchungen an tierischen Modellsystemen verwirklicht werden können, sondern ausschließlich unter Verwendung von humanen ESZ erreicht werden können.

Der Ursprung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSZ) liegt in differenzierten somatischen Zelltypen, die mittels Reprogrammierungsprozess wieder in einen pluripotenten, den hESZ vergleichbaren Ausgangszustand zurück versetzt werden. Im Jahr 2006 konnten erstmalig murine Fibroblasten erfolgreich mittels viraler Transfektion der Pluripotenz-assoziierten Faktoren OCT4, SOX2, KLF4 und C-MYC reprogrammiert werden. Ein Jahr später gelang die Übertragung auf menschliche Zellen (Takahashi und Yamanaka 2006; Takahashi *et al.* 2007). Für diese Entdeckung der Umkehrbarkeit scheinbar festgelegter Zellidentitäten wurde 2012 der Japaner Shin'ya Yamanaka gemeinsam mit dem Briten Sir John Bertrand Gurdon mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie geehrt. Da bei diesem Umwandlungsprozess das Ausgangsmaterial mit Einvernehmen von einem potentiellen Spender unter relativ schmerzarmen und unkomplizierten Bedingungen z.B. über eine Hautbiopsie oder das Entreißen einiger Kopfhare gewonnen werden kann, entfallen hier weitgehend ethische Bedenken. Herausforderungen gibt es allerdings noch reichlich in Bezug auf die Effektivität der Generierung bzw. den damit verbundenen Risiken für potenzielle klinische Anwendungen. Mit der im Jahr 2006 etablierten Reprogrammierungsmethode werden integrative Viren zum Gentransfer genutzt. Dieser Eingriff in das Genom der Rezipientenzelle kann allerdings im schlimmsten Fall auch zur Entartung führen, z.B. durch die Aktivierung von Protoonkogenen (Lee *et al.* 2013; Liebau *et al.* 2014). Seitdem wurden zusätzliche Techniken zur Reprogrammierung entwickelt, die, wenn sie auf dem Einsatz von nicht-integrativen Viren wie z.B. Adeno- und Sendaiviren oder der Einschleußung von Plasmid-DNA beruhen, nicht direkt mit dem Genom der Empfängerzellen interagieren (Okita *et al.* 2011; Churko *et al.* 2013). Die Einbringung von rekombinanten Proteinen, wie z.B. dem Pluripotenz-assoziierten Faktor OCT4, oder die Nutzung von *small molecules*, die eine heterogene Gruppe kleiner Moleküle unter 800 g/mol darstellen, zum Ersatz einzelner Pluripotenz-assoziiierter Faktoren bzw. zur Erhöhung der Reprogrammierungseffizienz insgesamt, stellen Möglichkeiten dar, bei denen ein Gentransfer reduziert bzw. vermieden werden soll (Huangfu *et al.* 2008; Kim *et al.* 2009). Die aktuellen Angaben zur Effizienz aller etablierten Techniken von ca. 0,1 bis 4 %, zeigen die Notwendigkeit zur weiteren Optimierung für eine zukünftig sichere und umfassende Verfügbarkeit von reprogrammiertem Zellmaterial für eine maßstabsgerechte potentielle klinische Nutzung (Fusaki *et al.* 2009; Takahashi und Yamanaka 2006; Warren *et al.* 2010).

1.3.3 Charakterisierung

Das bedeutende Potenzial pluripotenter humaner Stammzellen begründet sich u.a. in ihrer Fähigkeit zur stetigen Selbsterneuerung. Bei idealen *in vitro* Kulturbedingungen ist eine theoretisch unbegrenzte Vermehrung möglich, wobei aus jeder Zellteilung wieder Stammzellen hervorgehen. Daraus ergibt sich ein nahezu unerschöpfliches Ausgangsmaterial für diverse Differenzierungsansätze zur Generierung

von zellbasierten *in vitro* Testsystemen oder klinischen Anwendungen im Rahmen von Zellersatztherapien (Groebner *et al.* 2006). Zusätzlich besitzen pluripotente Stammzellen das Potential, sich sowohl in alle somatischen Zelltypen des Körpers als auch in Keimzellen zu differenzieren. Im Gegensatz zur totipotenten Zygote bzw. zu Blastomeren bis zum 4-Zellstadium sind die Zellen allerdings nicht in der Lage, einen gesamten Organismus auszubilden (Löser *et al.* 2011). Zu den weiteren charakteristischen Merkmalen zählen neben der Expression von Pluripotenz-assoziierten Genen wie z.B. *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *C-MYC*, *LIN28* und *KLF4* auch der Nachweis diverser Oberflächenantigenen wie SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 und TRA-1-81. Außerdem weisen die Zellen eine hohe Telomeraseaktivität, eine verkürzte G1-Phase des Zellzyklus und ein hohes Kern-zu-Zytoplasma-Verhältnis auf. Charakteristisch ist für pluripotente Stammzellen ebenfalls die Aktivität der alkalischen Phosphatase. Das große Differenzierungspotenzial dieser Zellen bestätigt sich zudem in der Fähigkeit zur Ausbildung von Teratomen mit Derivaten aller drei Keimblätter nach einer Transplantation in immundefiziente Mäuse (Thomson 1998; Reubinoff *et al.* 2000; Wobus und Boheler 2005).

1.3.4 *In vitro* Differenzierung pankreatischer Insulin-produzierender Zellen

Für eine erfolgreiche *in vitro* Generation Insulin-produzierender Zellen werden bereits vorhandene Erkenntnisse über entwicklungsrelevante Regulationsmechanismen innerhalb der Zellen und im Zusammenspiel mit benachbarten Geweben aus der *in vivo* Pankreasontogenese genutzt, um diese möglichst in der korrekten sequenziellen Folge und Ausprägung im Rahmen des *in vitro* Differenzierungsvorgangs nachzuahmen. Auf dieser Grundidee beruhen letztlich alle bisher etablierten *in vitro* Protokolle, wobei stetige Ergänzungen und Anpassungen durch neue Erfahrungen über die Wirkoptionen verschiedener Wachstumsfaktoren und *small molecules* vorgenommen werden. Zahlreiche Erfahrungen zur Entwicklung pankreatischer Vorläuferzellen leiten sich auch aus Differenzierungsexperimenten an murinen embryonalen Stammzellen ab, die bereits seit 1981 erfolgreich kultiviert werden können (Evans und Kaufman 1981). Allerdings ist die Übertragung auf humane pluripotente Stammzellen limitiert, da es zwar im Zuge der grundlegenden Musterbildung während der Pankreasentwicklung der Säugetiere große Übereinstimmungen, aber gleichzeitig auch deutliche Unterschiede zwischen den Spezies in Bezug auf räumliche und vor allem zeitlich auftretende Signale und damit verbundene Kommunikationsmechanismen zwischen den sich entwickelnden Zellen gibt (Steiner *et al.* 2010). So verläuft die Bildung pankreatischer Vorläuferzellen bei Mäusen biphasisch. Es entstehen während der ersten Phase polyhormonale Vorläuferzellen, die allerdings nicht zum späteren Pool der reifen Beta-Zellen beitragen, während terminal gereifte Zellen erst aus der zweiten Entwicklungswelle hervorgehen. Begleitet sind diese Vorgänge mit einer zweigipfeligen Expressionswelle von *PDX1*, dem essentiellen Markergen pankreatischer Progenitorzellen und *NGN3*, dem Marker für frühe endokrine Zellen. Dieses Muster ist im Verlauf der Differenzierung humaner Stammzellen nicht zu beobachten, denn mit dem Auftreten *PDX1*-exprimierender pankreatischer Vorläuferzellen bleibt die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors auf hohem Niveau bis zur ausgereiften Beta-Zelle erhalten. Ebenso zeigt die Expression von *NGN3* keinen zweiphasigen Verlauf (Jennings *et al.* 2013). Unterschiede zeigen sich auch in der abschließenden Verteilung der endokrinen Zelltypen innerhalb der Langerhans'schen Inseln. Während murine Beta-Zellen kompakt in der Inselmitte lokalisiert sind, liegen sie beim Menschen weniger dicht gepackt und

durchaus verstreut über die gesamte Insel verteilt vor (Cano *et al.* 2014). Für die Generierung klinisch nutzbarer Insulin-produzierender Zellen sind daher grundlegende Forschungen zur Optimierung der *in vitro* Protokolle an humanen pluripotenten Stammzellen, wie es im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, essentiell. Die limitierte Verfügbarkeit von geeignetem humanen fetalen Pankreasgewebe verschiedener Entwicklungsstufen zur vergleichenden Analyse der *in vivo* Bedingungen stellt allerdings eine wesentliche Herausforderung dar, was sich auch in der aktuell eingeschränkten Effizienz etablierter *in vitro* Differenzierungsprotokolle widerspiegelt (Nair und Hebrok 2015).

Während der *in vitro* Differenzierung von Insulin-produzierenden Zellen ausgehend von humanen pluripotenten Stammzellen werden die unter Kapitel 1.2.1 beschriebenen Signalwege durch eine gezielte und zeitlich abgestimmte bzw. kombinierte Zugabe differenzierungsrelevanter Substanzen imitiert, wodurch die Etappen der *in vivo* Pankreasorganogenese näherungsweise nachvollzogen werden sollen. Die etablierten Differenzierungsprotokolle weisen demnach in der Auswahl und Reihenfolge der eingesetzten Medienzusätze große Übereinstimmungen auf, da hierbei für die gezielte sukzessive Einnengung des zellulären Entwicklungspotenzials hin zur Beta-Zell-Identität grundlegende Regulationsmechanismen und signalübertragende Netzwerke aktiviert bzw. gehemmt werden müssen (D'Amour *et al.* 2006; Kroon *et al.* 2008; Rezania *et al.* 2012; Bruin *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2009; Jiang J. *et al.* 2007; Jiang W. *et al.* 2007; Pellegrini *et al.* 2015). Der erste essentielle Differenzierungsschritt liegt, dem entodermalen Ursprung des Pankreas folgend, in der Generierung definitiv entodermaler Zellen und kann effektiv durch die Inkubation der Zellen mit Activin A, einem Mitglied der TGF β -Familie bei gleichzeitig sehr geringem Serumanteil im Kulturmedium erreicht werden. Weitere Entoderm-induzierende Faktoren konnten identifiziert werden, die in Kombination mit Activin A eine Steigerung der Effizienz bewirken können. Dazu zählt neben WNT3a zur Aktivierung des WNT-Signalweges u.a. auch Wortmannin, ein Inhibitor des PI3K-Signalweges. Die Modulation verschiedener Signalwege führt somit letztlich zu einer rezeptorvermittelten Phosphorylierung und damit Aktivierung von SMAD-Proteinen, die als Aktivatoren früher entodermaler Gene dienen. Allerdings verweist die effiziente Ausbildung entodermaler Zellen unter alleiniger Nutzung von Activin A auf die herausragende Stellung des TGF β -Signalweges. Eine potentiell optimierende Wirkung weiterer Substanzen ist zudem auch von der verwendeten Zelllinie und den Kulturbedingungen während der Differenzierung abhängig. Insgesamt kann die erste Entwicklungsstufe mit den aktuellen Protokollen sehr effizient erreicht werden, was sich in Ausbeuten von ca. 60 bis 95 % an Zellen zeigt, in denen typische entodermale Markergene, wie *SOX17*, *FOXA2* und *CXCR4* aktiviert wurden (D'Amour *et al.* 2006; Sumi *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2009; Xu *et al.* 2011).

Im weiteren Verlauf der Pankreasorganogenese kommt es nach der Formierung des Darmrohres zur Ausbildung zweier pankreatischer Knospen. Diese Anlagen fusionieren und aus dem wachsenden und sich verzweigenden Verband epithelialer Zellen lösen sich einige heraus, dringen in das umgebende Mesenchym ein und bilden den endokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse unter Formierung der Langerhans'schen Inseln. Die zweite wichtige *in vitro* Differenzierungsstufe umfasst daraus abgeleitet die Entwicklung *PDX1*-exprimierender, pankreatischer Vorläuferzellen. Diese Zellen stellen das Ausgangsmaterial aller pankreatischen Zelltypen dar, was auch bedeutet, dass nur Zellen, in denen dieser wichtige TKF aktiviert wurde, das Potenzial zur Bildung Insulin-produzierender Zellen besitzen. Die große Bedeutung von *PDX1* zeigt sich auch in der fehlenden Ausreifung der Pankreasknospen bei Mäusen, deren *PDX1*-Expression ausgeschaltet wurde. Beim Menschen ist ein vergleichbarer Phäno-

typ bei einer homozygoten Mutation im *PDX1*-Gen zu beobachten (Ahlgren *et al.* 1996; Stoffers *et al.* 1997). Forciert wird die *in vitro* Generierung der pankreatischen Progenitorzellen durch die Inkubation der entodermalen Zellen u.a. mit Mitgliedern der FGF-Familie, wie FGF7 und FGF10, wodurch die Proliferation der gebildeten epithelialen Zellen angeregt wird (Ye *et al.* 2005). Ebenso wirkt Retinsäure positiv auf die Ausbildung pankreatischer Vorläuferzellen, wobei die Wirkung partiell über FGF-Signale vermittelt wird (Micallef *et al.* 2005; Johannesson *et al.* 2009).

Durch die Zugabe von KAAD-Cyclopamin ins Differenzierungsmedium kommt es zur Hemmung von SSH-Signalen, was die Entwicklung von Leberzellen inhibiert (Kim und Melton 1998). Ergänzend kann die Entgleitung des Zellschicksals in Richtung Leberzellen durch die Inhibierung von BMP-Signalen (*Bone Morphogenic Protein*) über die Zugabe von Noggin zum Medium erreicht werden. Da aber in späteren Entwicklungsstadien BMP-vermittelte Signale u.a. bedeutend für den Erhalt einer starken *PDX1*-Aktivität sind, ist der Einsatz von Noggin auf das gewünschte sensitive Zeitfenster der *in vitro* Differenzierung zu begrenzen (Wandzioch und Zaret 2009). Die Inkubation mit Indolactam V kann durch Aktivierung von Proteinkinase C (PKC)-vermittelten Signalwegen die Bildung *PDX1*-exprimierender Zellen verstärken (Chen *et al.* 2009). Die letzte Etappe des Differenzierungsprozesses umfasst die Formierung endokriner Zellen, wobei die Ausbildung von Insulin-produzierenden Zellen forciert wird. Eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren fördert die Entstehung und Reifung der pankreatischen endokrinen Vorläuferzellen. In den etablierten *in vitro* Differenzierungsprotokollen werden u.a. HGF zur Aktivierung von RAS-, PI3K- und Notch-vermittelten Signalwegen sowie IGF-1 zur Induktion der Proliferation und Apoptosehemmung eingesetzt. Die Zugabe von Forskolin zum Differenzierungsmedium führt über die Aktivierung der Adenylat-Cyclase zur verstärkten cAMP-Bildung, was sich positiv auf die Insulinfreisetzung auswirkt (Heisler 1983; Ammälä *et al.* 1994). Ebenso positiv auf die Ausbildung endokriner Zellen und die Produktion von Insulin wirkt Nicotinamid (Otonkoski *et al.* 1993). Der Einsatz eines ALK5-Inhibitors kann über die Regulation von TGF β -Signalen zur Steigerung der Expression essentieller endokrin-assoziierten Gene wie *NGN3* und *NEUROD1* beitragen (Rezania *et al.* 2011). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *NGN3* legt die Zellen auf ein endokrines Schicksal fest. Mäuse, deren *NGN3*-Gen inaktiviert wird, entwickeln keine pankreatischen endokrinen Zelltypen, zeigen diabetische Eigenschaften und sterben ein bis drei Tage nach der Geburt (Gradwohl *et al.* 2000). Pro-endokrin festgelegte Vorläuferzellen lösen sich aus dem epithelialen Zellverband der Pankreasanlagen und migrieren unter sequenzieller bzw. wechselseitiger Aktivierung weiterer endokrin-assoziierten Gene wie z.B. *NKX6-1*, *NEUROD1*, *PDX1*, *NGN3*, *PAX4*, *ARX* und *PAX6* ins Mesenchym. Die exakte Abstimmung in Konzentration und Dauer der Wechselwirkungen einzelner TKF bestimmt die Festlegung auf einen der endokrinen Zelltypen des Pankreas. So wird die Expression von *NKX6-1* mit fortschreitender Differenzierung exklusiv auf Beta-Zellen festgelegt und die Inaktivierung dieses Faktors führt zur Reduktion dieses Zelltyps im Mausmodell (Sander *et al.* 2000; Henseleit *et al.* 2005). Die Expression von *MAFA* und *MAFB*, zwei Mitgliedern der *MAF Family of Leucine Zipper*-Transkriptionsfaktoren, wird zuerst generell in endokrinen Progenitorzellen aktiviert. Es folgt eine Festlegung von *MAFA* auf generierte Beta-Zell-Vorläufer bzw. von *MAFB* auf entstandene Alpha-Zell-Vorläufer (Nishimura *et al.* 2006; Kaneto *et al.* 2008). Die Faktoren *PAX4* und *ARX* wirken als Gegenspieler. In Beta-Zellen liegt das *ARX*-Gen aufgrund der Wirkung der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) methyliert und somit reprimiert vor, in Alpha-Zellen ist das Gegenteil der Fall. Eine Deletion von *DNMT1* führt im Mausmodell zur

Derepression von *ARX* und zur Ausbildung eines Alpha-Zell-artigen Phänotyps, was die Fragilität und das Potential zur Umwandlung dieser Zelltypen unterstreicht (Dhawan *et al.* 2011).

Über die Inkubation generierter endokriner Zellen mit DAPT, einem γ -Sekretase-Inhibitor, kommt es zur Regulation von NOTCH-vermittelten Signalen (Ninov *et al.* 2012), während die Kultur formierter Beta-Zell-Vorläufer mit GLP-1 bzw. dem GLP-1-Rezeptor Agonisten Exendin-4 deren Insulinsekretion positiv beeinflussen kann. Durch eine rezeptorvermittelte Aktivierung des Enzyms Adenylatcyclase wird die Bildung von cAMP erhöht, was zur Aktivierung der Proteinkinase A und damit verbunden zum Verschluss von Kalium-Kanälen führt. Die einsetzende Depolarisation der Zellmembran induziert die Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle und ins Zellinnere strömende Calcium-Ionen wirken verstärkend auf die Mobilisierung Insulin-speichernder Vesikel (Ding *et al.* 2006; Hien *et al.* 2014).

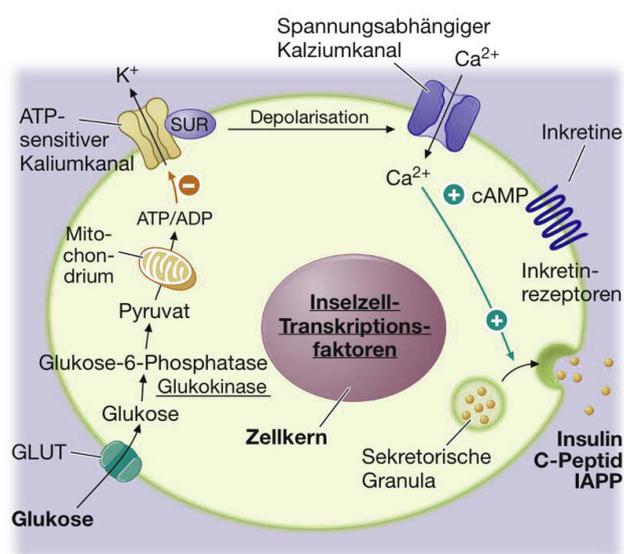


Abb. 5: Als wichtigstes Signal zur Ausschüttung von Insulin aus den Beta-Zellen gilt der Anstieg des Blutzuckergehaltes. Nach der zellulären Aufnahme über Glukosetransporter (GLUT) erfolgt die Metabolisierung der Glukose, wobei es zur Bildung von ATP (Adenosintriphosphat) kommt. Durch die Wirkung des ATP schließen sich auswärtsorientierte Kalium-Kanäle in der Zellmembran, was deren Depolarisation auslöst. Es kommt nachgeschaltet zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle und der Einstrom von Ca²⁺-Ionen führt letztlich zur Exozytose der Insulin-gefüllten Vesikel (Longo *et al.* 2012).

1.3.5 Potential und Herausforderungen der klinischen Anwendung

Zwei einzigartige Eigenschaften eröffnen großartige Perspektiven für den Einsatz humaner pluripotenter Stammzellen sowohl in der Grundlagenforschung als auch für klinische Anwendungen. Unter Erhalt ihrer zellulären Identität sind unbegrenzte Teilungen möglich und die Fähigkeit zur Differenzierung in alle somatischen Zellen sowie Keimzellen erlaubt vielfältige Einsatzmöglichkeiten. Im Bereich der medizinischen Forschung stellen sie zudem eine echte Alternative zu bisherigen etablierten Tiermodellen dar, da mit diesen zwar näherungsweise grundlegende Prozesse in Entwicklung und Stoffwechsel erforscht werden können, eine direkte Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf den Menschen aber meist nicht möglich ist, da zelluläre physiologische und genetische Aspekte spezieller Regulationsmechanismen nicht vollständig abgebildet werden können (Senatskommission für tierexperimentelle Forschung, Deutsche Forschungsgemeinschaft 2004). Bereits etablierte zellbasierte *in vitro* Testsysteme basieren zudem auf immortalisierten Zellen, deren langfristige Kultur somit ermöglicht ist, die sich aber in bedeutenden Aspekten des Metabolismus von primären Zellen unterscheiden, was die Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse auf potentielle Patienten limitiert. Der Einsatz primärer Zellen wird durch die zeitlich sehr

begrenzte Möglichkeit zur *in vitro* Kultur und der gleichzeitig stark eingeschränkten Verfügbarkeit vieler Zelltypen reduziert (Ebert und Svendsen 2010). Im Jahr 2013 wurde in bereits 38 Ländern mit humanen embryonalen Stammzellen gearbeitet und abgeleitet aus der späteren Verfügbarkeit, immerhin in 27 Ländern an induzierten pluripotenten Stammzellen geforscht mit stetig steigender Tendenz (Kobold *et al.* 2015). Während humane ESZ aufgrund ihrer Gewinnung aus Blastozysten eine natürliche Pluripotenz besitzen, werden hiPSZ erst durch einen Reprogrammierungsprozess, ausgehend von somatischen Zellen eines Spenders, in einen pluripotenten Zustand rückversetzt. Humane ESZ besitzen damit aber auch zwangsläufig einen genetisch fremden Hintergrund. Für patientenspezifische Anwendungen erscheinen iPSZ damit zunächst besser geeignet. Das anwendungsorientierte Potenzial beider Zelltypen besteht neben der Arzneimittelentwicklung und toxikologischen Forschung auch auf dem Gebiet der regenerativen Medizin. Denkbar sind u.a. Hochdurchsatz-*Screening*-Methoden zur Entdeckung und Etablierung neuer medizinischer Wirkstoffe (Ebert und Svendsen 2010; Scott *et al.* 2013). Unter Ausnutzung der Differenzierungseigenschaften lassen sich aus pluripotenten Stammzellen verschiedene Derivate ableiten, die im Rahmen von *in vivo* Entnahmen nicht in ausreichender Menge und / oder Qualität verfügbar wären. So können z.B. erzeugte Insulin-produzierende Zellen als *in vitro* Testsystem genutzt werden, um die Wirksamkeit aber auch mögliche Toxizität bzw. Nebenwirkungen von Substanzen zu untersuchen, die sich u.a. positiv auf die Insulinfreisetzung auswirken oder aber die Apoptose rate der Beta-Zellen senken können. Der Einsatz von patientenspezifischen iPSZ erlaubt hierbei eine besonders hohe Aussagekraft (Ebert und Svendsen 2010). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Differenzierungsstudien schlossen auch eine hiPSZ-Linie mit ein, was vergleichende Aussagen zum Differenzierungsverhalten und Potenzial dieses Zelltyps erlaubte.

Ein häufiges Problem bei der Entwicklung neuer pharmazeutischer Produkte stellen schädigende Nebenwirkungen u.a. auf das Herz-Kreislaufsystem dar. Mittels *in vitro* Testsystemen basierend auf differenzierten funktionalen Kardiomyozyten aus hESZ können in präklinischen Studien toxikologische Untersuchungen neuer Wirkstoffkandidaten schnell und effizient durchgeführt werden (Jahnke *et al.* 2013; Mathur *et al.* 2015). Standardisierte, stammzellbasierte *in vitro* Testsysteme könnten somit auch zu einer Kostenreduktion im Rahmen des aufwendigen Entwicklungsprozesses neuer Arzneimittel beitragen. Die steigende Zahl an hESZ mit krankheitsspezifischem genetischen Hintergrund und die Gewinnung von hiPSZ aus somatischen Zellen eines kranken Spenders erlauben die Erforschung der Pathogenese auf zellulärer Ebene. Ergänzend kann bei erneuter *in vitro* Differenzierung patientenspezifischer hiPSZ die Auswirkung des individuellen (genetischen) Hintergrundes im Vergleich zu parallel genutzten hESZ bzw. hiPSZ gesunder Spender untersucht werden, wobei vor allem das vorhandene Differenzierungspotenzial, aber auch die inter- bzw. intrazelluläre Kommunikationsfähigkeit und damit verbunden die morphologische Wandlung der Zellen von großem Interesse ist. Zur Aufklärung des Pathomechanismus von Erkrankungen, deren Manifestation zu einem Zeitpunkt erfolgt, wenn die betroffenen Zellen bereits schwer geschädigt bzw. abgestorben sind, bietet die *in vitro* Differenzierung dieses Zelltyps basierend auf hiPSZ bisher nicht zugängliche Einblicke. So gibt es für zahlreiche, meist neurodegenerative Erkrankungen spezifische hiPSZ-Linien und es waren zusätzlich bereits im Jahr 2011 insgesamt 179 hESZ-Linien mit erblich bedingten Erkrankungen registriert (Kobold *et al.* 2015). In Bezug auf einen Diabetes mellitus ist die Nutzung *in vitro* generierter Insulin-produzierender Zellen im Rahmen von Studien zur Induktion der Erkrankung denkbar, wobei die Auswirkung verschiedener

Kultur- bzw. Nährstoffbedingungen zur Simulation des vorherrschenden Umfelds beim metabolischen Syndrom untersucht werden können. Es ist außerdem bereits gelungen, hiPSZ aus Fibroblasten eines Typ1 Diabetikers mit einer Mutation im *IDDM1*-Gen zu gewinnen (Jang *et al.* 2012).

Im Bereich der regenerativen Medizin, d.h. dem Ersatz beschädigter Zellen und Gewebe durch *in vitro* generierte Zellen stellt sich die Verwendung von hiPSZ zunächst als Vorteil dar, da bei einer Übereinstimmung von Spender und Empfänger die Transplantation der *in vitro* neu ausdifferenzierten Zellen keine nennenswerte immunologische Abstoßungsreaktion auslösen sollte (Araki *et al.* 2013; Wertheim und Leventhal 2015). Studien an Mäusen verweisen jedoch auf eine mögliche T-Zell-vermittelte Immunantwort, die durch eventuell veränderte Antigenexpression im Rahmen eines Virus-basierten Reprogrammierungsprozesses sowie des anschließenden *in vitro* Differenzierungsvorganges ausgelöst werden können (Zhao *et al.* 2011). Bekannterweise kann die unzureichende Kompatibilität der HLA-Moleküle (*Human Leukocyte Antigen*) ein zentrales Problem bei Organtransplantationen darstellen, was eine kontinuierliche immunsuppressive Therapie des Empfängers bedingt (Sheldon und Poulton 2006). Da perspektivisch erzeugte transplantable Zellerivate aus hESZ grundsätzlich einen allogenen Charakter besitzen und die Generierung und Validierung von individuellen hiPSZ-Linien für theoretisch jeden potenziellen Patienten aus wirtschaftlichen Aspekten kaum realisierbar ist, bietet die Etablierung von nationalen und internationalen Banken HLA-typisierter Zelllinien eine Möglichkeit, die zellbasierte Technologie im großen Umfang therapeutisch zu nutzen (Yamanaka 2012; Taylor *et al.* 2012).

Aktuell gibt es weltweit elf klinische Studien zur Transplantation von Derivaten aus hESZ und eine Studie, in der *in vitro* generierte Zellen aus hiPSZ eingesetzt werden (Kobold *et al.* 2015; Lee *et al.* 2013; Löser *et al.* 2011). Neben der Implantation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nach akuter Rückenmarksverletzung (Strauss 2010), steht die Therapieentwicklung gegen verschiedene Formen der Makuladegeneration mittels Transplantation von retinalen Pigmentepithelzellen aus hESZ bzw. hiPSZ hierbei im Vordergrund der Studien (Schwartz *et al.* 2012; Cyranoski 2013). Im Jahr 2014 wurde dem Antrag der amerikanischen Firma ViaCyte stattgegeben, eingekapselte Beta-Zell-Vorläufer aus hESZ zur Senkung des Glukosespiegels bei Typ1 Diabetikern im Rahmen einer klinischen Studie zu transplantieren (Hering und Bellin 2015; Weinryb und Bubela 2015). Die mit Spannung erwarteten abschließenden Ergebnisse dieser ersten Studien können einen Beitrag zur weiteren Entwicklung von sicheren, standardisiert und effektiv reproduzierbaren stammzellbasierten Transplantaten leisten, denn es steht bei den aktuellen klinischen Studien weniger ein heilender Aspekt im Vordergrund, sondern vielmehr ein Erkenntnisgewinn über die Sicherheit des Transplantates, d.h. Aussagen über eventuelle Immunreaktionen und über das Verhalten der implantierten Zellen innerhalb der *in vivo* Umgebung. Besonders ist hierbei auf Herauslösungen einzelner Zellen aus dem Verband und potentielle Entartungen zu achten. Zusätzlich erhofft man sich Aussagen zur Integration und dem damit verbundenen Anschluss an neurale bzw. vaskuläre Versorgungsnetzwerke. Das herausragende Potenzial humaner pluripotenter Stammzellen für diverse klinische Anwendungen bedingt somit gleichzeitig auch eine Reihe von Herausforderungen, die es für eine sichere Anwendung noch zu bewältigen gilt. Die Eigenschaft der Pluripotenz erlaubt vielfältige Differenzierungsoptionen, rückt diese Zellen in Bezug auf Zellzyklus-Regulation bzw. Teilungsverhalten aber auch in die Nähe von Krebszellen. Das tumorigene Potenzial der Stammzellen, d.h. die Fähigkeit zur Ausbildung benignen Teratome mit Anteilen aller drei Keimblätter sowie die Bildung malignen Tumore aus, im potenziellen Transplantat enthaltenen, nicht vollständig aus-

differenzierten Zellen, kann nur durch die Entwicklung effizienterer *in vitro* Differenzierungsprotokolle mit kombinierten Selektions- bzw. Aufreinigungsschritten reduziert werden (Choo *et al.* 2008; Dubois *et al.* 2011; Herszfeld *et al.* 2006; Segev *et al.* 2012). Weitere Optimierungen sind ebenso bei der Langzeitkultur pluripotenter Stammzellen notwendig, da die künstliche Verlängerung des pluripotenten Zustandes, der *in vivo* nur eine kurze Etappe der Embryonalentwicklung darstellt, selbst eine große Gefahr für Chromosomeninstabilität und letztlich erhöhte Tumorigenität beinhaltet. Zudem können Unterschiede in den Kulturbedingungen langfristig zu laborspezifischen Genexpressionsprofilen identischer Zelllinien führen (Newman und Cooper 2010; Mayshar *et al.* 2010; Hyka-Nouspikel *et al.* 2012). Bei der Verwendung von hiPSZ müssen zusätzlich potenzielle Einflüsse in Bezug auf das gewählte Ausgangsmaterial bedacht werden. Zum einen existieren Unterschiede in der Sensitivität differenzierter somatischer Zellen auf den Reprogrammierungsprozess, was die Effektivität beeinflussen kann und zum anderen kann ein sogenanntes „epigenetisches Gedächtnis“ an die ursprüngliche Zellidentität erhalten bleiben, was die Entwicklungspotenz bei erneuter Differenzierung, ausgehend vom erzeugten pluripotenten Zustand, einschränken kann (Polo *et al.* 2010; Kim, K. *et al.* 2011). Außerdem birgt die Nutzung differenzierter somatischer Zellen auch das Risiko von potentiellen bereits in den Zellen enthaltenen Mutationen, die zu unerwünschten bzw. nicht abzusehenden Folgen führen könnten (Gore *et al.* 2011). Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Notwendigkeit zur Etablierung klarer allgemeingültiger Vorgaben und Standards für die Generierung und *in vitro* Kultur pluripotenter, klinisch relevanter Stammzelllinien. Um die Sicherheit von Zellerivaten aus hiPSZ zu erhöhen, ist die Optimierung effizienter nicht-integrativer Reprogrammierungstechniken zur Minimierung des Risikos ungewollter Mutationen notwendig. Zusätzlich ist ein tieferes Verständnis für die zellulären Abläufe während der Reprogrammierung nötig, um unvollständige Ansätze und damit verbundene Heterogenität der erhaltenen iPSZ zu vermeiden (Lee *et al.* 2013).

1.4 mikroRNAs

MikroRNAs (miRs) sind kleine, einzelsträngige und nicht-proteincodierende RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 21 bis 23 Nukleotiden, die eine bedeutende Rolle bei der post-transkriptionalen Regulation der Genexpression spielen. Nach der ersten Beschreibung einer Wechselwirkung von kleinen RNA-Molekülen mit doppelsträngiger DNA in Pflanzen im Jahr 1990, folgte die Prägung des Begriffs der mikroRNAs durch Lee *et al.* mit der Entdeckung der regulatorischen Funktion dieser Moleküle bei der larvalen Entwicklung des Fadenwurms *C. elegans* im Jahr 1993 (Krol *et al.* 1990; Lee *et al.* 1993). In den folgenden Jahren wurden zahlreiche mikroRNAs sowohl in Pflanzen, Tieren und auch im Menschen entdeckt, so dass *miRBase*, eine amerikanische Datenbank für mikroRNA-Sequenzen aktuell 35.828 Einträge für reife, prozessierte miR-Produkte in insgesamt 223 Spezies verzeichnet, wobei im humanen Genom bisher die Informationen für 2.585 reife mikroRNAs identifiziert wurden (University of Manchester 2015). Die hohe Konservierung der RNA-Moleküle zwischen den verschiedenen Arten verweist dabei auf die bedeutende regulatorische Funktion in grundlegenden zellulären Mechanismen. Bis zu 60 % aller Protein-codierenden Gene des Menschen können durch mikroRNAs reguliert werden, was ihren essentiellen Einfluss auf zahlreiche Prozesse wie Proliferation, Metabolismus und Apoptose sowie ihre wichtigen Funktionen während der embryonalen Entwicklung und der Differenzierung pluripotenter Stammzellen verdeutlicht (Bartel 2004; Friedman *et al.* 2009).

1.4.1 Biogenese und Funktion

Die Transkription von mikroRNA-Genen in primäre miR-Transkripte (*pri*-miRNA) erfolgt im Zellkern meist über die RNA-Polymerase II, vereinzelt auch durch RNA-Polymerase III. Es folgt die Ausbildung einer sogenannten *hairpin* Sekundärstruktur und die Stabilisierung mittels Polyadenylierung am 3'-Ende und einer 5'-*Cap*-Struktur. MikroRNA-Gene können zwischen anderen Genen liegen, weisen dann eine eigene Promotorregion auf und unterliegen demnach der Expressionsregulation durch *Enhancer*- und *Silencing*-Elemente, Transkriptionsfaktoren und Chromatinmodifikationen (Ozsolak *et al.* 2008). Außerdem können miRs aber auch als Teil langer nicht-codierender RNAs, welche oft in Clustern im Genom arrangiert sind, transkribiert werden. Es folgt dann die Aufspaltung in einzelne funktionale miRs im Rahmen sukzessiver Prozessierungsschritte (Rodriguez *et al.* 2004).

Die gebildeten *pri*-miRNAs dienen nun als Substrat für den Drosha-DGCR8-Komplex. DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*), ein dsRNA-bindendes Protein, richtet die *pri*-miR so aus, dass die gewünschten Schnittstellen dem RNase III-ähnlichen Enzym Drosha zugänglich sind. Der Aufbau der *pri*-miRNA Moleküle umfasst die zentrale *hairpin* Struktur von ca. 33 Basenpaaren mit zwei flankierenden einzelstängigen Strukturen *upstream* und *downstream* der Haarnadelformation sowie eine terminale *Loop*-Struktur. Sowohl der doppelsträngige zentrale Bereich, als auch die ungepaarten flankierenden Regionen sind für die Bindung von DGCR8 und die Prozessierung mittels Drosha essentiell. Die Mehrheit der *pri*-miRNAs wird durch einen Mikroprozessorkomplex, nur bestehend aus DGCR8 und Drosha bearbeitet. Zur Prozessierung einiger *pri*-miRNAs ist allerdings die Formierung eines umfassenderen Komplexes aus zusätzlichen RNA-Helikasen, dsRNA-Bindeproteinen und Ribonukleoproteinen erforderlich (Gregory *et al.* 2004). Es folgt die Freisetzung der *pre*-miRNA, einer doppelsträngigen shRNA mit einer Länge von ca. 70 Nukleotiden. Zusätzlich zur RNA-bindenden Funktion weist das Protein DGCR8 eine stabilisierende und regulierende Wirkung auf (Krol *et al.* 2010b). Einen alternativen Prozessierungsverlauf stellen sogenannte Mirtrons dar. Hier liegt die mikroRNA innerhalb des Intronbereichs eines anderen Genes und wird gemeinsam mit diesem transkribiert. Im Zuge von *Splicing*-Prozessen kommt es zur Freisetzung eines *pre*-miR-Moleküles (*precursor*-miRNA) und Ausbildung einer *hairpin* Struktur, wobei der Drosha-DGCR8-Komplex umgangen wird (Ruby *et al.* 2007). Im nächsten Schritt der mikroRNA-Biogenese erfolgt nun der Transport ins Zytoplasma mit Hilfe des Transportproteins Exportin5, welches in der Kernmembran lokalisiert ist. Im Anschluss werden die *pre*-miRNAs durch den RLC (*RISC Loading Complex*), bestehend aus der RNase Dicer, dem dsRNA-bindenden Protein TRBP (*Tar RNA Binding Protein*), PACT (*Protein Activator of PKR*) und dem Argonaut-Protein AGO2 mit endonukleolytischer Aktivität, weiter prozessiert. TRPB und PACT sind nicht essentiell für die Dicer-vermittelte Spaltung der *pre*-miRNA, aber besitzen eine unterstützende Funktion und TRPB stabilisiert Dicer zusätzlich (Bartel 2004). *Pre*-miRNAs, die einen hohen Grad an Komplementarität innerhalb der zentralen *hairpin* Struktur aufweisen, durchlaufen einen zusätzlichen endonukleolytischen Spaltungsschritt, vermittelt über AGO2. Die entstandene *ac-pre*-miRNA (*AGO2-cleaved precursor* miRNA) wird ebenso wie konventionelle *pre*-miRNAs mittels Dicer in ein ca. 22 Nukleotide umfassendes miRNA-Duplex-Molekül mit jeweils 2 Nukleotiden Überhang am 3'-Ende gespalten (Diederichs und Haber 2007). Die Bedeutung des Enzyms Dicer für die erfolgreiche miR-Produktion wird an einer Studie am Mausmodell von Bernstein *et al.* deutlich, da hier eine Deletion dieser evolutionär hochkonservierten

Endonuklease zur Lethalität bereits während der frühen Embryonalentwicklung führte (Bernstein *et al.* 2003). Nach dem Spaltungsschritt dissoziieren Dicer sowie die interagierenden Proteine TRPB und PACT vom miRNA-Doppelstrang, damit dieser in einen funktionalen *guide*-Strang (miR), der zur potentiellen Ziel-mRNA komplementär ist und in einen meist zu degradierenden *passenger*-Strang (miR*) separiert werden kann. Dieser Schritt kann über unterschiedliche Helikasen vermittelt werden (Meister *et al.* 2005; Chu und Rana 2006; Robb und Rana 2007).

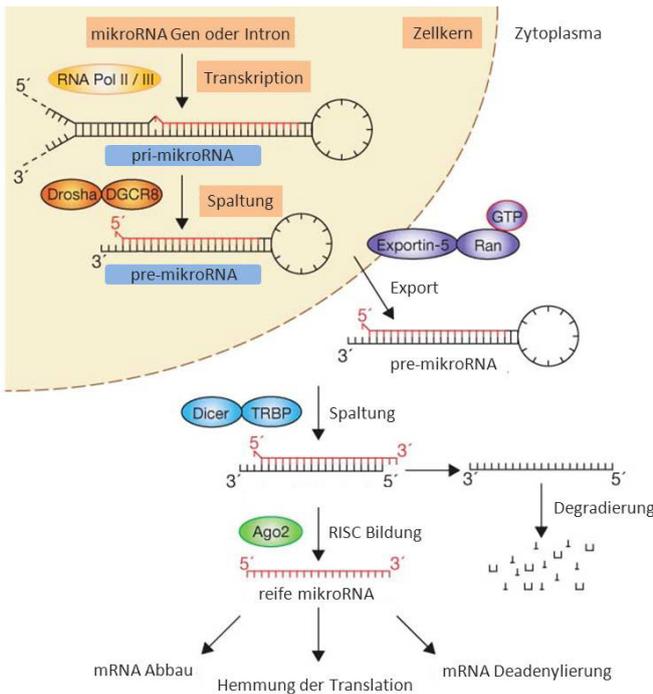


Abb. 6: Die Synthese von miRNAs ist ein mehrstufiger Prozess. Nach Transkription und erster Prozessierung entsteht die intermediäre *pre*-miRNA, welche ins Zytoplasma transportiert wird. In Folge weiterer Prozessierungsschritte wird die reife, einzelsträngige miRNA (miR) freigesetzt. Der zweite Strang (miR*) wird in der Regel degradiert. Das Ausmaß der Komplementarität zwischen miR und entsprechender Ziel-mRNA entscheidet dann über deren Schicksal. Eine vollständig komplementäre Paarung führt zum direkten Abbau der mRNA, unvollständige Bindungen hemmen deren Translation bzw. führen zur Deadenylierung und damit verbunden zur Markierung für folgende Abbauprozesse (Winter *et al.* 2009, modifiziert).

Welcher Strang letztlich in den RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) geladen wird und somit die Heranführung an die Ziel-mRNA steuert, ist von der thermodynamischen Stabilität der Basenpaare an den Enden des Moleküls abhängig. Der miRNA-Strang mit dem weniger stabilen Basenpaar am 5'-Ende wird in den RISC integriert (Khvorova *et al.* 2003). Zu den wichtigsten Komponenten des RISC gehören das AGO2-Protein und das GW182-Protein (Glycin-Tryptophan-Protein), deren Proteinniveau durch Stabilisierungen wie Phosphorylierung und Hydroxylierung an Aminosäureresten sowie dem Anfügen von Abbausignalen im Rahmen von Ubiquitylierungen beeinflusst werden kann. Zudem können sich die Komponenten des RISC frei zwischen Zytoplasma und Zellkern bewegen (Krol *et al.* 2010b; Bartel 2004). Mit der Bindung zwischen AGO2 und der reifen miRNA kommt es zur Ausrichtung deren *seed*-Sequenz, dem ca. sechs bis sieben Nukleotide umfassenden Abschnitt, über den nun innerhalb der 3'-UTR (untranslatierte Region am 3'-Ende) der Ziel-mRNA eine effektive komplementäre Bildung vermittelt werden kann. Eine anschließende Konformationsänderung des Proteins lockert die Bindung zur miR und erlaubt nun zusätzliche Basenpaarungen zur Ziel-mRNA an weiteren Abschnitten. Ist die am 5'-Ende der miRNA liegende komplementäre *seed*-Sequenz verkürzt, kann die Paarung zur Ziel-mRNA durch zusätzliche Bindungen im 3'-Bereich der miR ausgeglichen werden. In Folge unvollständig komplementärer Paarungen und durch mögliche zusätzliche Ausbildung von *hairpin*-Bin-

dungen bzw. *wobble*-Paarungen kann die Spezifität und Effektivität von mikroRNAs beeinflusst werden, was zum einen die große Zahl an potenziellen Ziel-mRNA-Sequenzen einer einzelnen miR erklärt und zum anderen ihre Wirkung verdeutlicht, die vielmehr regulatorisch zur Feinabstimmung der Genaktivität und nicht zur vollständigen Abschaltung beiträgt (Doench und Sharp 2004; Bartel 2009).

Nach der erfolgreichen Anlagerung von mikroRNA und Ziel-mRNA, entscheidet somit das Ausmaß der Komplementarität über die entsprechende Auswirkung. Bei partieller Paarung kommt es zunächst zur Hemmung der mRNA-Translation auf Ebene der Initiation oder Elongation. MikroRNAs können zudem zum ko-translationalen Abbau entstehender Proteine beitragen (Filipowicz *et al.* 2008; Huntzinger und Izaurralde 2011). Eine vollständig komplementäre Bindung führt hingegen zur Degradation der mRNA. Dabei kommt es zunächst zur Deadenylierung über den CAF1-CCR4-NOT-Deadenylierungs-Komplex. Das GW182 Protein ist hierbei beteiligt, da es mit PARP (Poly(A)-binding Protein) interagiert und die Deadenylasen CCR4 und CAF1 rekrutiert. Es folgt die Entfernung der 5'-Cap-Struktur durch das Enzym DCP2 und der Abbau der mRNA in 5' - 3'-Orientierung durch die Exonuklease XRN1. Nach dem Abbau der mRNA kann die weiterhin intakte mikroRNA erneut innerhalb eines RISC zusätzliche Ziel-mRNAs erkennen und reprimieren (Braun *et al.* 2011). Die Synthese und damit verbundene Ziel-mRNA-Spezifität von mikroRNAs unterliegt zahlreichen regulatorischen Mechanismen. Neben den bereits erwähnten Einflüssen auf die miR-Promotorregion durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren können auch Effektormoleküle, welche durch Stimulation verschiedener zellulärer Signalwege aktiviert wurden, die miR-Synthese modulieren. So können nach Induktion des TGF β -Signalweges aktivierte SMAD-Proteine die Rekrutierung von *pri*-miRNAs zum Mikroprozessorkomplex fördern und damit eine effektivere Bildung reifer miR-Moleküle unterstützen (Davis *et al.* 2008). Durch sogenannte mikroRNA-Editierung kann posttranskriptional die miR-Sequenz durch Desaminierung von Adenin zu Inosin, vermittelt durch ADAR1/ADAR2-Enzyme (*Adenosine Deaminases Acting on RNA*) verändert werden. Diese Veränderung kann die Effizienz der weiteren Prozessierung des *pri*-miRNA-Moleküls beeinflussen und führt, wenn sie innerhalb der *seed*-Sequenz stattgefunden hat, zur Veränderung der Ziel-mRNA-Spezifität. MikroRNA-Editierung trägt somit zur Diversität des zellulären miR-Pools bei (Luciano *et al.* 2004; Yang *et al.* 2006). Neben der Synthese kann auch die Aktivität von mikroRNAs beeinflusst werden. Innerhalb des humanen Genoms existieren eine Reihe von Pseudogenen, von denen einige konservierte miR-Bindestellen in ihrer 3'-UTR aufweisen. Die daraus abgeleiteten RNAs werden als *ceRNAs* (*competing endogenous RNAs*) bezeichnet, da sie wie ein Schwamm reife mikroRNA-Moleküle abfangen und diese so an der Bindung ihrer eigentlichen Ziel-mRNAs hindern (Ebert und Sharp 2010). Die Nutzung dieser natürlichen Inhibitoren kann zur Regulation der individuell benötigten zellulären miR-Wirkung dienen. Da mikroRNA-Moleküle allgemein eine hohe Stabilität und damit verbundene Halbwertszeit von mehreren Stunden bis Tagen aufweisen, muss neben der Synthese und Aktivität auch ihr Abbau für eine situationsabhängige Konzentration in der Zelle beeinflusst werden (Baccarini *et al.* 2011; Gantier *et al.* 2011). So ist das zeitlich kurze Auftreten einiger mikroRNAs mit ihrer Funktion in der Zellzyklusregulation verbunden (Rissland *et al.* 2011), während Krol *et al.* zeigen konnten, dass retinale mikroRNAs einer sehr schnellen Regulation durch Lichteinfall unterliegen (Krol *et al.* 2010a). Der Abbau von neuronal-assoziierten mikroRNAs kann von der neuronalen Aktivität der Zellen beeinflusst werden (Sim *et al.* 2014). Die Halbwertszeit einer mikroRNA kann auch bereits in ihrer Sequenz codiert sein und sie für den exosomalen Abbau markieren (Bail *et al.* 2010). Relativ wenig ist jedoch

über die exakten Mechanismen des miR-Abbaus bekannt. Es wurden bisher einige Exoribonukleasen identifiziert, die an der Spaltung verschiedener mikroRNAs in unterschiedlichen Organismen beteiligt sind. Dazu gehören in humanen Zellen die in 3' - 5'-Richtung wirkenden Enzyme PNPase^{old-35} (*Polynucleotide Phosphorylase*) und RRP41 (*Ribosomal RNA Processing Protein 41*) sowie das in 5' - 3'-Orientierung spaltende Enzym XRN1 (Rüegger und Großhans 2012).

1.4.2 Pankreas-assoziierte mikroRNAs

MikroRNAs spielen in zahlreichen Prozessen der frühen Embryonalentwicklung, d.h. der Bildung verschiedener Zelltypen aber auch beim Erhalt und der Ausübung spezifischer Funktionen der ausdifferenzierten Zellen und Gewebe eine entscheidende Rolle. Ausgehend von humanen pluripotenten Stammzellen muss für einen erfolgreichen Differenzierungsprozess zunächst die Expression von mikroRNAs reprimiert werden, die im Rahmen eines Netzwerkes mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren zum Erhalt der pluripotenten Zellidentität beitragen, die sich vor allem durch eine starke Proliferation und einen schnellen Zellzyklusdurchgang auszeichnet. Zu diesen, meist in Clustern lokalisierten miRs gehören u.a. das miR-290/371-, das miR-302- und das miR-520-Cluster, deren Mitglieder zum Erhalt der schnellen Zellproliferation beitragen, indem Zellzyklusinhibitoren reprimiert werden und eine kurze G1-Phase realisiert wird. Die miRs können selbst wiederum durch Pluripotenz-assoziierte TKF, wie OCT4, SOX2 und NANOG aktiviert werden (Suh *et al.* 2004; Marson *et al.* 2008; Stadler *et al.* 2010).

Am Prozess der Keimblattspezialisierung, im Folgenden am Beispiel des Entoderms erläutert, sind ebenfalls zahlreiche mikroRNAs beteiligt, welche die zeitlich abgestimmte Expression differenzierungsrelevanter Markergene wie *BRACHYURY* für mesentodermale Vorläuferzellen und folgend *MIXL1*, *SOX17* und *FOXA2* zur endgültigen Festlegung auf ein definitiv entodermales Zellschicksal beeinflussen. Zu den beteiligten mikroRNAs zählen miR-10a, miR-24, miR-122, miR-192 und die miR-375 (Tzur *et al.* 2008; Hinton *et al.* 2010). Neben der herausragenden Rolle der mikroRNA-375 während der späten Etappen der pankreatischen Differenzierung gibt es zahlreiche Studien, die zusätzlich auf eine große Bedeutung während der Ausbildung entodermaler Zellen und damit dem ersten essentiellen Schritt der Pankreasformierung hindeuten. Bisher konnten für diese zelluläre Entwicklungsphase außer *TIMM8A* (*Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 8 Homolog A*), dessen Bedeutung innerhalb entodermaler Signalwege unklar bleibt, keine funktional relevanten Ziele validiert werden (Hinton *et al.* 2010; Kim, N. *et al.* 2011). Studien an murinen embryonalen Stammzellen innerhalb unserer Arbeitsgruppe zeigten eine starke Korrelation zwischen einer effizienten Bildung entodermaler Zellen und einer hohen miR-375-Expression in dieser Entwicklungsstufe (Kuhn 2011). Diese Beobachtung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit an humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen mittels transfektionsbasierter Inhibierungs- bzw. Stimulationsexperimente bestätigt werden, was die miR-375 als einen wichtigen Teil des entodermal-assoziierten Signalnetzwerkes präsentiert. Als Aktivatoren der Expression kommen hierbei z.B. Veränderungen im Methylierungsstatus an den im Promotor vorhanden CpG-Inseln, aber auch zahlreiche, entodermal-assoziierte TKF in Frage. Im weiteren Differenzierungsverlauf übt die mikroRNA-375 wichtige regulatorische Funktionen aus und ist damit für die regelgerechte Ausbildung pankreatischer, endokriner Vorläuferzellen unverzichtbar, was sich in einer Ko-Lokalisation mit dem TKF PDX1 bereits im sich formierenden pankreatischen Epithel

äußert (Lynn *et al.* 2007). Sie ist die meist transkribierte miR in Beta-Zellen, kommt daneben auch in geringerem Umfang in anderen Organen wie Hypophyse, Haut und Darm vor (Latreille *et al.* 2015). In den pankreatischen Beta-Zellen reguliert sie die Sekretion von Insulin, d.h. sie schützt vor einer unkontrollierten kontinuierlichen Freisetzung und ist für den Erhalt einer adäquaten Beta-Zell-Masse und damit einer korrekten Balance zwischen dem Verhältnis von Beta- zu Alpha-Zellen essentiell. Es kommt dafür zur Regulation von PDK-1 (*3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*), einem Mediator der Insulin-Signaltransduktion, der Proteinkinasen aktiviert, die eine Balance im Zellwachstum, Proliferation und Überleben der Beta-Zellen einstellen (Toker und Newton 2000; Ouaamari *et al.* 2008). Die Wirkung auf die Sekretion von Insulin wird über die Regulation des Zielgens *MTPN* (*Myotrophin*) realisiert, welches am Transport und der Freisetzung von Insulin-gefüllten Vesikeln beteiligt ist (Poy *et al.* 2004; Poy *et al.* 2009; Latreille *et al.* 2015). Studien mit *Knockout* Mäusen zeigten, dass eine Entfernung von miR-375 in Beta-Zellen zu einer anhaltenden Hyperglykämie mit verringerter Beta-Zell-Masse, einer vermehrten Alpha-Zell-Masse und entsprechend erhöhter Glucagonfreisetzung führt (Poy *et al.* 2009). Weitere mikroRNAs beeinflussen die Entwicklung und Funktion reifer Beta-Zellen. Zu ihnen gehören u.a. die Glukose-induzierbaren miR-124a und miR-30d. Während die miR-124a zum Zeitpunkt der Formierung entodermaler Zellen nur gering exprimiert ist, was mit der reprimierenden Wirkung auf *FOXA2* korreliert, steigt ihre Expression mit fortschreitender Differenzierung moderat, da sie an der Seite der miR-375 über die Wirkung auf *MTPN* und durch die ergänzende Beeinflussung Exozytose-assoziiierter Proteine wie *SNAP25* (*Synaptosomal-Associated Protein*) und *RAB3A* (*Member RAS Oncogene Family*) an der Regulation der Freisetzung von Insulin aus Beta-Zellen beteiligt ist. Eine ungestörte Aktivität des TKF *FOXA2* ist in entodermalen Zellen wichtig, denn er aktiviert neben *PDX1*, dem essentiellen Gen pankreatischer Vorläuferzellen, auch die Untereinheiten des ATP-abhängigen Kaliumkanals *KIR6.2* und *SUR1* (Baroukh *et al.* 2007; Lovis *et al.* 2008; Baroukh und van Obberghen 2009; Hinton *et al.* 2010). Die mikroRNA-30d wird in Beta-Zellen stark exprimiert, da sie die Transkription von *INSULIN* indirekt positiv beeinflusst durch Inhibierung von *MAP4K4* (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 4*), dessen Genprodukt als Repressor des TKF *MAFA* (*v-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog A*) auftritt, welcher aktivierend auf den Promotor von *INSULIN* wirkt. Gleichzeitig bietet die miR-30d somit Schutz vor Kinase-vermittelten inflammatorischen Prozessen (Zhao *et al.* 2012). Zusätzlich spielt sie eine bedeutende Rolle in der Ausbildung und dem Erhalt des epithelialen Charakters reifer Beta-Zellen, indem sie reprimierend auf *EMT*-(*Epithelial-to-Mesenchymal Transition*) assoziierte Faktoren, wie *VIMENTIN* und *SNAIL1* (*Snail Family Zinc Finger 1*) wirkt (Joglekar *et al.* 2009). Dieser Effekt wird auch ergänzend über die miR-375 vermittelt. Studien an isolierten humanen Langerhans'schen Inseln, deren Zellen sich *in vitro* durch einen raschen Verlust des epithelialen Charakters auszeichnen, zeigten eine Repression typischer mesenchymal-assoziiierter Gene wie *VIMENTIN* und *N-CADHERIN* nach Erhöhung der miR-375-Expression mittels Transfektion (Nathan *et al.* 2015). Einige Beta-Zell-assoziierte mikroRNAs wie die miR-182 und miR-200c sind essentiell für den Funktionserhalt dieser hochspezialisierten Zellen, da sie die Expression sogenannter *disallowed genes* reprimieren. Zu diesen Genen, die den Erhalt des Zellcharakters negativ beeinflussen, gehören u.a. *SOX6* und *BHLHE22*, deren Aktivität eine hemmende Wirkung auf die Expression von *INSULIN* hat und die mittels der oben genannten mikroRNAs reguliert werden (Kaspi *et al.* 2014). Zusätzlich inhibieren miR-200c, miR-182, miR-125b und miR-148 die Expression typischer Alpha-Zell-assoziiierter

Gene wie *MAFC* und *ZFPM2* (Klein *et al.* 2013). Zwei weitere mikroRNAs, die während der fetalen Pankreasentwicklung stark exprimiert werden sind miR-7 und miR-9. Während die mikroRNA-7 u.a. durch die Feinabstimmung der *PAX6*-Expression bedeutend für die Ausbildung endokriner pankreatischer Zellen ist und in die Insulinsekretion durch Regulation von Komponenten für den Vesikeltransport eingreift (Kredo-Russo *et al.* 2012; Latreille *et al.* 2014), wirkt sich die mikroRNA-9 koordinierend auf die GSIS über ihre Zielgene *ONECUT2* und *SIRT1* aus (Plaisance *et al.* 2006; Ramachandran *et al.* 2011). Die Expression der innerhalb des mesodermal-assoziierten Genes *MEST* lokalisierte mikroRNA-335 steigt zunächst gemeinsam mit diesem während der Differenzierung mesentodermaler Vorläuferzellen aus ESZ an, wird dann aber auf mesodermale Zellen festgelegt. Die miR-Expression in entodermalen Zellen wird reprimiert, was für eine stabile Expression typischer Markergene wie *SOX17* und *FOXA2* essentiell ist, denn sie gehören zu den Zielgenen der miR-335 (Yang *et al.* 2014). Eine interessante Studie am Modell der Goto-Kakizaki Ratte zeigte, dass miR-335 über die Regulation von *STXBP1* auch in die Kontrolle der Insulinexozytose involviert ist (Esguerra *et al.* 2011).

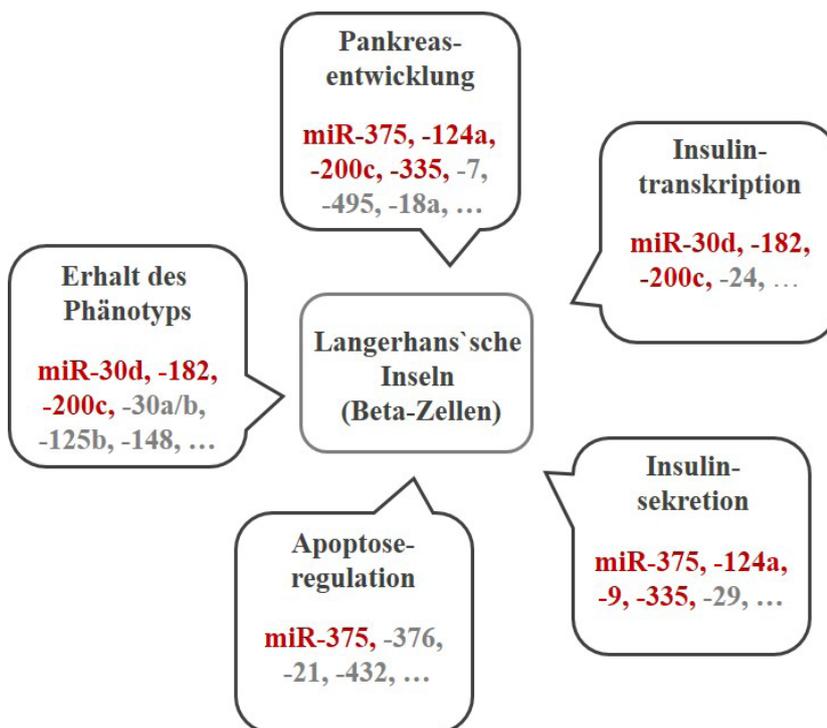


Abb. 7: Zahlreiche mikroRNAs sind an der Organogenese des Pankreas und speziell der Beta-Zellen beteiligt. Sie wirken regulatorisch auf Gene, die sowohl in den Erhalt als auch in Prozesse für die korrekte Funktion dieses hochspezialisierten Zelltyps involviert sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster der rot markierten mikroRNAs während der pankreatischen *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen bestimmt. (Joglekar *et al.* 2011; Eliasson und Esguerra 2014; Kaspi *et al.* 2014; Özcan 2014, modifiziert).

Die Entwicklung und der Erhalt reifer Beta-Zellen werden durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst, zu denen auch zahlreiche mikroRNAs gehören. Sie ergänzen sich in ihren Funktionen, regulieren sich gegenseitig und bewirken damit eine Feinabstimmung der Signalnetzwerke, die eine adäquate Funktion der hochspezialisierten Beta-Zelle gewährleisten. Ein umfassendes Verständnis für die exakten Zeitfenster, in denen Pankreas-assoziierte mikroRNAs ihre Wirkung entfalten und das nötige Maß ihrer Expression kann eine wertvolle Möglichkeit zur Optimierung der aktuell noch sehr ineffizienten Pro-

tolle zur *in vitro* Differenzierung Insulin-produzierender Zellen darstellen, da mittels Modulation der mikroRNA-Expression während des Differenzierungsverlaufs die *in vivo* Gegebenheiten der Pankreasbildung gezielt nachgeahmt werden können. Abbildung 7 bietet einen Überblick, welche mikroRNAs im Rahmen der vorliegenden Dissertation im Hinblick auf ihren Expressionsverlauf während der *in vitro* Differenzierung pluripotenter Stammzellen analysiert wurden und an welchem Aspekt der Pankreasentwicklung und speziell der Beta-Zell-Funktion sie beteiligt sind.

1.5 Glukose

Die Insulinsekretion der pankreatischen Beta-Zellen dient der zentralen Regulation des Blutzuckergehaltes im Körper und wird über intrazelluläre Signale stimuliert, die aus dem Metabolismus verschiedener Nährstoffe entstehen, von denen Glukose die bedeutendste Rolle spielt. Zusätzlich beeinflussen weitere Glukose-induzierte Signalwege die Expression von Genen, die Stabilität von Proteinen und das Zellwachstum bzw. die Proliferation der Zellen.

1.5.1 Bedeutung für die Funktion von Beta-Zellen

Eine Erhöhung des Blutzuckerwertes über den Normbereich führt zur erhöhten Transkription, Synthese sowie Sekretion von Insulin. Der Promotor des *INSULIN*-Gens beinhaltet Bindestellen für zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie PDX1, NEUROD1 und MAFA, die kooperativ und synergistisch zur Verstärkung der Transkription beitragen. Die genannten TKF werden wiederum in ihrer Funktion durch Glukose auf verschiedenen Wegen reguliert (Ohneda *et al.* 2000; Matsuoka *et al.* 2007). Der während der Entwicklung pankreatischer Vorläuferzellen bereits essentielle Transkriptionsfaktor PDX1 aktiviert die Expression Beta-Zell-spezifischer Gene wie *INSULIN*, *GLUT2*, *MAFA*, *GLUKOKINASE* sowie die eigene in einer positiven Rückkopplungsschleife (Waeber *et al.* 1996; Watada *et al.* 1996; Raum *et al.* 2006). Gleichzeitig wirkt PDX1 auch als Repressor auf die Aktivität von Genen wie *GLUCAGON*, *C-MYC* und *CYTOKERATIN K19*, womit dieser TKF zum Erhalt der Beta-Zell-Identität beiträgt (Ahlgren *et al.* 1998; Deramaudt *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007). PDX1 kann seine aktivierende Wirkung auch durch die Assoziation mit anderen Faktoren wie NEUROD1 oder p300 realisieren (Qiu *et al.* 2002). Eine Studie unter Verwendung der murinen Insulinom-Zelllinie MIN6 zeigte, dass Glukose die Aktivität von PDX1 reguliert. Unter physiologischer Glukosekonzentration liegt PDX1 hauptsächlich mit HDAC1 bzw. HDAC2 assoziiert in der Peripherie des Zellkerns vor, während bei einer deutlichen Erhöhung der Glukosekonzentration auf 10 bis 30 mM die Interaktion mit HDACs gelöst wird, eine über verschiedene Kinasen gesteuerte Phosphorylierung von PDX1 und die Bindung mit p300 erfolgt. Dies führt zur verteilten Lokalisation im gesamten Zellkern und die Histonacetyltransferase p300 bewirkt eine Hyperacetylierung des Histons 4, was mit einer Induktion der Transkription des *INSULIN*-Gens einhergeht (Khoo *et al.* 2003; Mosley und Özcan 2004; Mosley *et al.* 2004). Untersuchungen an humanen isolierten Langerhans'schen Inseln zeigten zudem, dass bei einer Kultur unter hohen Glukosebedingungen von 16,7 mM für insgesamt 24 Stunden das zelluläre Niveau von GPR40 (*G-Protein Coupled Free Fatty Acid Receptor-1*), der eine Rolle in der Glukose-stimulierten Insulinsekretion spielt, deutlich erhöht ist. Der Promotor von GPR40 weist Bindestellen für TKF wie PDX1, SP1 und NEUROD1 auf. In Folge der

erhöhten Glukosekonzentration kommt es bei deren Metabolisierung über u.a. den Hexosamin-Syntheseweg durch das entstehende Intermediat N-acetyl-Glukosamin (GlcNAc) zur O-GlcN-Acylierung von PDX1, was dessen DNA-Bindeaktivität und somit Assoziation an den GPR40-Promotor fördert (Kebede *et al.* 2012). Der Transkriptionsfaktor NEUROD1 ist Glukose-induziert an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt durch die positive Modulation der Expression von *SUR1*, einer Untereinheit des ATP-abhängigen Kaliumkanals der Beta-Zelle, sowie von *SEC24D* und *SNAP25*, die wichtige Funktionen bei Transport und Exozytose von Insulinvesikeln ausüben (Kim *et al.* 2002; Ishizuka *et al.* 2007). Die Wirkung von NEUROD1 wird über die vorherrschende Glukosekonzentration vermittelt, denn unter niedriger Zuckerkonzentration ist NEUROD1 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Eine hohe Glukosekonzentration führt dagegen zur Translokation in den Zellkern und zur Steigerung der Aktivierungskapazität durch posttranskriptionale Modifikationen. Dazu gehören Phosphorylierungen durch Glukose-induzierte erhöhte Aktivität der Kinasen ERK1 und ERK2 und wie bei PDX1, eine O-GlcN-Acylierung (Khoo *et al.* 2003). Ein weiterer bedeutender, durch Glukose induzierbarer TKF ist MAFA, der aktivierend auf die Expression von *INSULIN*, *GLUT2*, *NKX6-1*, *PDX1* und die Insulin-prozessierende *PROPROTEIN-CONVERTASE 1/3* wirkt (Matsuoka *et al.* 2007; Kataoka *et al.* 2002; Wang *et al.* 2007). Durch Assoziation mit den Faktoren PDX1 und NEUROD1 wird eine synergistische Wirkung entfaltet. Die Transkription von *MAFA* wird wiederum durch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie FOXA2, PDX1 und NEUROD1 erhöht, was das enge Zusammenspiel dieser entscheidenden Größen zeigt, dass sowohl für eine effiziente Ausbildung, als auch spätere Funktion endokrin aktiver Beta-Zellen essentiell ist (Zhao *et al.* 2005; Raum *et al.* 2006).

Studien von Vanderford *et al.* (2007) zeigten, dass die Kultur von murinen MIN6-Zellen unter einer hohen Glukosekonzentration von 25 mM zur Induktion von *MAFA* führt, wobei von einem aktivierenden Signal über im Rahmen des Glukosemetabolismus ermöglichte O-GlcN-Acylierung ausgegangen wird (Vanderford *et al.* 2007). Die beschriebenen Transkriptionsfaktoren PDX1, NEUROD1 und MAFA, die in ihrer kooperativen und synergistischen Wirkung die Expression weiterer bedeutende Beta-Zell-Marker regulieren und so die regelgerechte Insulinsekretion ermöglichen, sind daher in der Ausprägung ihrer Aktivität abhängig vom Glukosestoffwechsel. Hohe Blutzuckerkonzentrationen führen zur verstärkten Wirkung der Faktoren, was eine schnelle und adäquate Einstellung der Glukosewerte im Rahmen einer induzierten Insulinfreisetzung erlaubt. Wie im Kapitel 1.3.4 beschrieben, sind die TKF auch bereits während der Ontogenese des Pankreas und speziell der Beta-Zellen in zahlreiche zelluläre Signalwege eingebunden. Eine gezielte Induktion dieser Marker durch Modulation der Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium kann somit eine Option zur verbesserten *in vitro* Formation Insulin-produzierender Zellen darstellen.

1.5.2 Einfluss auf die pankreatische *in vitro* Differenzierung

Die beschriebenen positiven Einflüsse der Glukose auf die Beta-Zell-Funktion führen zu der Frage, ob eine ebenso induzierende Wirkung bereits bei der Generierung dieses Zelltyps besteht. Zahlreiche Studien, meist an tierischen Modellorganismen, deuten auf eine positive Wirkung der Glukose auf Entwicklung und Proliferation von pankreatischen endokrinen Vorläuferzellen hin, jedoch ist die Wahl des Stimulationszeitfensters und der eingesetzten Konzentration von großer Bedeutung, da eine anhaltend

hohe Zuckerkonzentration zellschädigende Effekte auslösen kann, was u.a. als Glukotoxizität beim T2D bekannt ist (Kaiser *et al.* 2003). Die Glukose-abhängigen Effekte in der sich entwickelnden Beta-Zelle können nur durch deren Metabolisierung nach erfolgreicher zellulärer Aufnahme über Glukosetransporter ausgelöst werden, was durch die Bildung verschiedener Intermediate zur Induktion intrazellulärer Signalwege führt, die eine transkriptionelle Regulation zahlreicher Zielgene anstoßen. Den ersten wichtigen Schritt stellt hierbei die Startreaktion der Glykolyse, die Bildung von Glukose-6-Phosphat dar. Nur dessen Produktion korreliert mit der folgenden Induktion Glukose-regulierter Gene. Anschließend erfolgt der weitere Zuckerstoffwechsel über drei mögliche Wege, die Weiterführung der Glykolyse, den Hexosamin-Weg und den Pentose-Phosphat-Weg (Vaulont *et al.* 2000). Im Rahmen einer Studie an isolierten embryonalen pankreatischen *PDX1*-exprimierenden Vorläuferzellen der Ratte wurde die Bildung acinärer und endokriner Zellen *in vitro* unter erhöhter Glukosekonzentration von 10 mM nachverfolgt und festgestellt, dass nur die Ausbildung endokriner Strukturen direkt Glukose-abhängig verläuft. Es kam zu einer verstärkten Aktivierung von *NEUROD1* und einem Anstieg des *INSULIN* und *GLUCAGON* mRNA-Niveaus (Guillemain *et al.* 2007). Als Vermittler dieser Signale ist der über Glukose induzierbare Transkriptionsfaktor CHREBP (*Carbohydrate Response Element-Binding Protein*) anzusehen, der an ChoRE-Motive (*Carbohydrate Response Element*) im Promotor spezifischer Zielgene binden kann. CHREBP wird neben Beta-Zellen auch in Hepatozyten und Fettgewebe exprimiert und greift regulierend in Vorgänge des Glukose- und Lipidmetabolismus ein (Metukuri *et al.* 2012).

Die Aktivierung von CHREBP kann über verschiedene Zweige des Glukosemetabolismus erfolgen, so ist eine O-GlcNAcylierung im Rahmen des Hexosamin-Wegs möglich und das im Zuge des Pentose-Phosphat-Wegs über synthetisiertes Xylulose-5-Phosphat aktivierte Enzym PPA2A (Protein-Phosphatase 2A) aktiviert CHREBP durch Phosphorylierung. Da *NEUROD1* als direktes Zielgen von NGN3, dem essentiellen TKF endokriner pankreatischer Vorläuferzellen, aktiviert wird, kann zusätzlich eine Glukose-vermittelte Stabilisierung und Aktivitätssteigerung dieses Faktors vermutet werden (Guillemain *et al.* 2007; Soggia *et al.* 2012). CHREBP gilt zudem als ein typischer TKF in *NGN3*-exprimierenden endokrinen Vorläuferzellen (Metukuri *et al.* 2012). Vor der Bildung endokriner Zellen steht die Formation *PDX1*-exprimierender Progenitorzellen, die das Ausgangsmaterial aller pankreatischer Zelltypen darstellen. Die unter Kapitel 1.5.1 geschilderten stimulierenden Einflüsse von Glukose auf *PDX1* deuten auf eine Glukose-induzierte Aktivierungskaskade vom Faktor *PDX1* über *NGN3* zu *NEUROD1* und damit letztlich auf einen positiven Einfluss auf die Insulinsynthese hin. CHREBP wird selbst aktiviert über den Transkriptionsfaktor *FOXA2*, der im Verlauf der pankreatischen Differenzierung ab dem Stadium des definitiven Entoderms stark exprimiert vorliegt und auch stimulierend auf das *PDX1*-Gen wirkt, was das dicht vernetzte Transkriptionsfaktor-basierte System, welches der Beta-Zell-Entstehung zu Grunde liegt, verdeutlicht. Zusätzlich ist CHREBP auch an der Glukose-induzierten Proliferation von Beta-Zellen über die Aktivierung von Genen wie *CYCLINA/E* und *CDK4/6* (*Cyclin-Dependent Kinase 4/6*) beteiligt, die den Zellzyklusfortgang forcieren (Metukuri *et al.* 2012).

Den beschriebenen positiven Effekten, die CHREBP im Rahmen einer vorliegenden erhöhten Glukosekonzentration auf die Bildung und Reifung von Beta-Zellen ausübt, stehen allerdings auch negative Einflüsse gegenüber, die eine kontrollierte Regulation dieses Faktors in terminal differenzierten Beta-Zellen erfordern. Studien an *INS1*-Zellen der Ratte und humanen *in vitro* kultivierten Langerhans'schen Inseln verdeutlichen, dass eine chronisch erhöhte Glukosekonzentration, wie sie bei Diabetespatienten auftritt,

eine glukotoxische Wirkung auf Beta-Zellen hat. Verbunden mit der verstärkten Aktivität von CHREBP kommt es zur Stimulation von TXNIP (*Thioredoxin Interacting Protein*), welches inflammatorische Prozesse, oxidativen Stress und apoptotische Vorgänge durch Aktivierung der Caspasen 3 und 7 fördert (Cha-Molstad *et al.* 2009; Pongvarin *et al.* 2012; Osowski *et al.* 2012). In isolierten adulten murinen Langerhans'schen Inseln führt eine Transfektions-basierte Überexpression von *CHREBP* zur Abnahme des mRNA-Niveaus von essentiellen Genen wie *PDX1* und *MAFA* (Da Silva Xavier *et al.* 2010).

Für eine selektive Nutzung der positiven differenzierungsfördernden Effekte von CHREBP im Rahmen einer *in vitro* Generierung Insulin-produzierender Zellen erscheint daher die Wahl des korrekten und begrenzten sensitiven Zeitfensters und die Konzentration der Glukosezugabe zum Medium der Zellen essentiell. Die positive Wirkung von Glukose während ablaufender Differenzierungsvorgänge wird durch eine Studie an Hepatozyten der Ratte deutlich. Ziel der Experimente war die Transdifferenzierung von Hepatozyten in Insulin-produzierende Zellen mittels künstlich forcierter *PDX1*-Expression. Es kam *in vitro* zur ineffektiven Ausbildung von unreifen Vorläuferzellen, die zwar essentielle Marker wie *MAFA* nicht exprimierten, aber nach Transplantation in diabetische Tiere zur korrekten Einstellung des Blutzuckers führten. Wurde die *in vitro* Differenzierung allerdings unter erhöhter Glukosekonzentration von 20 mM durchgeführt, kam es zur verbesserten Reifung der Zellen, was sich in der Aktivierung von *MAFA*, *PAX4* und *INSULIN* zeigte (Cao *et al.* 2004). Diese vielversprechenden Untersuchungen, die den potenziellen Nutzen der Glukosewirkung für die Erhöhung der Effizienz pankreatischer *in vitro* Differenzierungsprotokolle andeuten, sind allerdings zum Großteil an tierischen Modellen wie Maus und Ratte, z.T. sogar an immortalisierten Zelllinien durchgeführt worden. Das limitiert die Übertragbarkeit der Daten für Differenzierungsansätze humaner pluripotenter Stammzellen, da wie in Kapitel 1.3.4 beschrieben, die Entwicklung des Pankreas bzw. der endokrinen Zellen sowohl im zeitlichen Ablauf als auch im Zusammenspiel wichtiger TKF trotz evolutionär konservierter Grundmuster auch deutliche Unterschiede aufweist. Die Nutzung von immortalisierten tierischen Zelllinien ist zusätzlich besonders bei der Untersuchung nach Glukose-vermittelten Signalen kritisch zu hinterfragen, da es zu grundlegenden Veränderungen im Metabolismus dieser Zellen kommen kann.

Daher sind die Ergebnisse einer Studie zur pankreatischen Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen, bei der verschiedene Glukosekonzentrationen von 15 bis 30 mM im Differenzierungsmedium auf eine potentiell positive Wirkung getestet wurden, besonders interessant. Die Zugabe der Glukose erfolgte hier zunächst nach der Entstehung definitiv entodermaler Zellen bis zur Formierung pankreatischer Vorläuferzellen und ergab eine erhöhte Expression von *NKX6-1*, *INSULIN* und *GLUCAGON*. Unter Einsatz von 25 mM Glukose vom Stadium des definitiven Entoderms bis zum Ende des Protokolls konnte allerdings in den entstandenen Insulin-produzierenden Zellen keine GSIS ausgelöst werden (Bruin *et al.* 2014). Das lässt auf eine Desensibilisierung der Zellen schließen und verdeutlicht noch einmal die Notwendigkeit der Einhaltung einer Balance zwischen Nutzen und Last der Glukosestimulation. Eine zeitlich stark fokussierte Erhöhung der Glukosekonzentration während eines sensitiven Differenzierungsabschnittes könnte zur Steigerung der Differenzierungseffizienz beitragen, ohne langfristig unerwünschte Adaptationseffekte zu induzieren. Vorangegangene Studien innerhalb unserer Arbeitsgruppe an murinen embryonalen Stammzellen verweisen auf die effizienzsteigernde Wirkung einer Glukosekonzentration von 50 mM im Differenzierungsmedium im Zeitraum zwischen Entodermformation und Entwicklung pankreatischer Vorläuferzellen durch verstärkte Expression von

PDX1 (Schweyen 2014). Im Gegensatz zu den stimulierenden Glukosekonzentrationen im Bereich von ca. 10 bis 30 mM in den bekannten Untersuchungen an tierischen Zellmodellen oder tierischen bzw. humanen isolierten Langerhans'schen Inseln erscheint die eingestellte Erhöhung des Zuckergehaltes auf 50 mM bei Verwendung embryonaler Stammzellen als deutlich stärkere Induktion. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass die etablierte und standardisierte *in vitro* Kultur pluripotenter Stammzellen nicht bei einem physiologischen Glukosegehalt, sondern bei Konzentrationen von ca. 17,5 bis 25 mM erfolgt. Eine geringere basale Zuckerkonzentration im Kulturmedium würde zur Apoptose der Zellen führen, da sie im Rahmen des verkürzten Zellzyklus einen sehr raschen Metabolismus aufweisen. Das Ausgangsniveau der Glukosekonzentration im Medium pluripotenter Stammzellen ist somit zwingend deutlich über der physiologischen Konzentration anzusetzen.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Die weltweit steigende Zahl von Menschen, die an Diabetes mellitus und den damit verbundenen Folgeerkrankungen leiden, führt gemeinsam mit der Tatsache, dass aktuell keine kurativen, sondern nur symptomatische Therapieoptionen verfügbar sind, zur dringend notwendigen Erforschung neuartiger Behandlungsstrategien. Dabei stellen humane embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung und dem Potential zur Differenzierung in jeden Zelltyp des menschlichen Körpers ein ideales Ausgangsmaterial dar. Neben dem Einsatz *in vitro* differenzierter Insulin-produzierender Zellen als Testsystem für die Suche neuer anti-diabetischer Wirkstoffe und damit verbundener Toxizitätsüberprüfungen, können im Rahmen der *in vitro* Differenzierung von Patienten-spezifischen hiPSZ bzw. hESZ mit entsprechendem genetischen Hintergrund auch Erkenntnisse über die Pathogene des Diabetes gewonnen werden. Eine weitere interessante Anwendung stellt die Transplantation von *in vitro* generierten Beta-Zellen dar, womit ein regenerativer und somit potenziell heilender Therapieansatz verwirklicht werden soll.

Zur Realisierung dieser ambitionierten Idee müssen allerdings noch einige Hürden überwunden werden. Allen etablierten Protokollen zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung gemein ist neben einer äußerst geringen Effizienz auch die limitierte Vollendung des Reifungsprozesses der Zellen. Die formierten Beta-Zell-Vorläufer produzieren zwar Insulin in geringer Menge, allerdings kann *in vitro* keine adäquate GSIS ausgelöst werden. Zusätzlich stellen die Zellen meist weitere Hormone wie Glucagon und Somatostatin her, was ihren eher unreifen Charakter, ähnlich fetalen Progenitorzellen, widerspiegelt. Das großartige Potential der differenzierten Zellen lässt sich allerdings mittels Transplantation in immundefiziente diabetische Mäuse aufzeigen, denn *in vivo* erfolgt unter dem Einfluss bisher unbekannter Signalwege eine Weiterentwicklung in reife funktionale Beta-Zellen, was durch eine zumindest zeitweise korrekte Regulation des Blutglukosespiegels bestätigt werden konnte. Es stellt sich für die Entwicklung einer Zellersatztherapie gegen Diabetes mellitus somit die Frage, ob eine terminale *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen zwingend notwendig ist, oder eher eine Fokussierung auf die Möglichkeit zur sicheren, hocheffizienten und selektiven Anreicherung Insulin-produzierender Vorläuferzellen sinnvoller erscheint. Damit verbunden muss die Entwicklung von Trägermaterialien, in denen die generierten Progenitorzellen transplantiert werden können, vorangetrieben werden. Den eingekapselten Zellen darf zum einen keine Option zur Herauslösung und Migration gegeben werden,

zum anderen muss die Versorgung mit Nährstoffen über die Ausbildung bzw. den Anschluss an vasculäre Strukturen gewährleistet sein, denn nur so können potentielle diffusible Signalstoffe zur Reifung der Zellen beitragen und diese schließlich ihre endokrine Funktion ausüben. Neben der Etablierung geeigneter Gerüststrukturen muss allerdings weiterhin die zelluläre Grundlagenforschung im Mittelpunkt stehen. Erkenntnisse zur Pankreasentwicklung basierend auf Studien an Tiermodellen bzw. tierischen pluripotenten Stammzellen, erlauben bei Übertragung ins humane System zwar die *in vitro* Formation Insulin-produzierender Zellen in geringem Umfang, aber die sinkende Effizienz bei der schrittweisen Differenzierung der Zellen verweist auf noch fehlende Informationen zur gezielten Steuerung grundlegender Signalwege bzw. regulatorischer Größen. In den letzten Jahren rückten hierbei mit steigendem Wissen um Pankreas-assoziierte mikroRNAs und Glukose als wichtiger zellulärer Nährstoff zwei potenziell bedeutsame Einflussfaktoren in den Fokus der Forschung.

Aktuell beschreiben zahlreiche Studien die wichtige Rolle von mikroRNAs sowohl während der Entwicklung des Pankreas, als auch beim Erhalt der Zellidentität und Funktion reifer Beta-Zellen. Zudem existieren Hinweise aus Tierstudien und zellbasierten Experimenten, dass Glukose nicht nur für die funktionale Beta-Zelle ein bedeutendes Molekül ist, sondern dass es bereits während der Differenzierung dieser spezialisierten Zellen ein Glukose-sensitives Intervall gibt. Daraus ergab sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage, ob die aufgezeigten Wirkungen dieser Größen auch auf die pankreatische *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen übertragbar sind. Die experimentell erhaltenen Erkenntnisse dienen anschließend als Grundlage zur gezielten Modulation der Faktoren im Sinne einer potentiellen Verbesserung der Differenzierungseffizienz.

Um die Allgemeingültigkeit der zu Grunde liegenden stimulierten zellulären Signalwege zu untersuchen, erfolgten die Differenzierungsexperimente parallel an humanen induzierten pluripotenten Stammzellen und zwei verschiedenen humanen embryonalen Stammzelllinien, welche zugleich als „Goldstandard“ für die Beurteilung der Qualität und des Differenzierungspotenzials der hiPSZ dienen.

Zusammengefasst ergaben sich für die vorliegende Dissertation folgende Ziele:

1. Etablierung eines gemeinsamen Protokolls zur vergleichenden pankreatischen *in vitro* Differenzierung von humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen
2. Analyse des Expressionsverlaufs Pankreas-assoziiierter mikroRNAs während der *in vitro* Differenzierung
3. Etablierung einer Methode zur Transfektion von miR-Molekülen, miR-Inhibitoren und Plasmiden zur gezielten Modulation der mikroRNA-Expression im Differenzierungsverlauf
4. Analyse der Effekte einer gezielten Modulation der miR-375-Expression während der *in vitro* Differenzierung auf die Differenzierungseffizienz

5. Analyse der Effekte einer gezielten Modulation der Glukosesubstitution während der *in vitro* Differenzierung auf die Differenzierungseffizienz
6. Analyse der Effekte einer gezielten kombinierten Modulation der miR-375-Expression und der Glukosesubstitution während der *in vitro* Differenzierung auf die Differenzierungseffizienz

2 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die benötigten Geräte, Materialien und Chemikalien für die Kultur der verwendeten primären Zellen bzw. Zelllinien beschrieben.

2.1 Zellkultur

Geräte / Verbrauchsmaterialien:

- Deckgläser 15 mm x 15 mm und 18 mm x 18 mm (Heinemann Labortechnik, Duderstadt)
- Einmal-Pipette 50 ml, steril, (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
- Einmal-Skalpelle, steril, Größe 15 und 21 (Schubert Laborfachhandel, Leipzig)
- Einmal-Spritzen mit Luer-Ansatz 2 ml, 20 ml, steril (Heinemann Labortechnik, Duderstadt)
- Einmal-Zellschaber, steril (Biochrom, Berlin)
- Glaspipetten 2 ml, 10 ml, und 20 ml (Heinemann Labortechnik, Duderstadt)
- Greiner PP-Röhrchen 15 und 50 ml (Heinemann Labortechnik, Duderstadt)
- Inkubatoren: HERAcell 150 (Heraeus-Instruments, Hanau); c200 (Labotect, Göttingen)
- Kleinschüttler (= "Vortexer") MS 3 digital (IKA®, Staufen)
- *Low Binding SafeSeal-Tips Professional* 10 µl, 100 µl und 1.000 µl (Biozym, Oldenburg), sterile Pipettenspitzen für die Zellkultur
- Mikroskope: Nikon *Eclipse* TS 100 mit Kamera Nikon *Digital sight* und Bildaufnahmeprogramm *NIS-Elements D 3.0* (Nikon GmbH, Düsseldorf); *SZH 10 Research Stereo* (Olympus, Hamburg)
- Neubauer-Zählkammer (BRAND, Wertheim)
- Nunc Kryoröhrchen 1,8 ml (Heinemann Labortechnik, Duderstadt)
- Nunc Zellkulturschalen Ø 58 mm und 10 cm sowie 6-Well-, 12-Well- und 24-Well-Platten (Heinemann Labortechnik, Duderstadt).
- Petrischalen Ø 10 cm (Greiner Bio-One, Frickenhausen). Für die Passage von MEF verwendet.
- Spitzenfilter Ø 0,22 µm, 26 mm, CA - Membran (Heinemann Labortechnik, Duderstadt). Genutzt für die Filtration von konditioniertem Medium und Pufferlösungen.
- Sterilbänke: HERAsafe (Heraeus-Instruments, Hanau); *Lamin Air* (Heraeus-Instruments, Hanau)
- Zentrifuge: Biofuge stratus (Heraeus - Instruments, Hanau)

Chemikalien:

- DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen b. München)
- EDTA (Ethyldiamin-Tetraessigsäure, Carl Roth, Karlsruhe). Gelöst in 1x PBS für eine Stocklösung von 0,3 M. Für die Dissoziation von Zellen in 1x PBS verdünnt auf eine 0,02 %-ige Lösung.
- *ESC / iPSC Characterization Kit (Green Stain)* (Peptrotech, Hamburg). Gebrauchsfertige primäre

und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzanalyse der Pluripotenz-assoziierten Genprodukte OCT4, SOX2 und SSEA-4 sowie eine gebrauchsfertige Lösung zum Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität.

- *Flow Cytometry Staining Buffer Solution* (eBioscience, Frankfurt a. M.). Nach Lösung von der Kulturschale wurden die Zellen in diesem Puffer für die durchflusszytometrische Analyse aufgenommen.
- *Gelatine from porcine skin* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen b. München). Das Pulver wurde in sterilem Wasser gelöst und autoklaviert. Verdünnungen erfolgten mit sterilem Wasser. Die Zellkulturschalen wurden mit 1%-iger Gelatine-Lösung befüllt und mindestens 1h vor Gebrauch inkubiert.
- HA-100 Dihydrochlorid (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg). Der Kinase-Inhibitor (ROCK-Inhibitor) wurde in sterilem Wasser gelöst (10 mg/ml). Die Zugabe zum Kulturmedium (3,5 µl/ml) der hiPSZ erfolgte am Tag des Auftauens zur Verminderung Stress-induzierter Apoptose.
- Kollagenase Typ IV (Life Technologies, Darmstadt). Das Pulver wurde abgewogen und in *Knockout* DMEM für eine Endkonzentration von 1 mg/ml gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert und vor der Anwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.
- Matrigel® Matrix, *growth factor reduced* (Corning, Kaiserslautern).
- Mitomycin C (Serva, Heidelberg). Es wurden 2 mg in 10 ml 1x PBS gelöst und zur Inaktivierung der murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) eingesetzt.
- 1x PBS (*Phosphate Buffered Saline*): 10 g/l NaCl; 1,44 g/l Na₂HPO₄; 0,25 g/l KCl; 0,25 g/l KH₂PO₄ x 2H₂O; in 1 l Reinst-Wasser gelöst, steril filtriert (Ø 0,22 µm) und autoklaviert.
- 1x PBS mit 0,1 % BSA (*Bovine Serum Albumin*) steril filtriert (Ø 0,22 µm) zum Lösen von Mediumzusätzen.
- ReLeSR™ (Stemcell Technologies, Köln). Dissoziationsreagenz zur Passage der hiPSZ.
- ROCK-Inhibitor Y-27632 (BioCat GmbH, Heidelberg), 25 mM. Die Zugabe zum Kulturmedium der humanen embryonalen Stammzellen (10 µM) erfolgte am Tag des Auftauens zur Verminderung Stress-induzierter Apoptose.
- Trypsin 2,5 % in PBS, steril filtriert (PAN Biotech GmbH, Aidenbach). Für die Zelldissoziation in 1x PBS auf 0,1 % verdünnt.
- Versene 1:5.000 (1X) (Life Technologies, Darmstadt).

2.1.1 Zelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei humane embryonale Stammzelllinien sowie eine humane induzierte pluripotente Stammzelllinie kultiviert und für die Differenzierungsversuche eingesetzt.

hESZ-Linie WA09 (abgekürzt: H9): Die Zelllinie wurde 1998 als eine der ersten humanen embryonalen Stammzelllinien etabliert (Thomson 1998; University of Wisconsin, Madison, USA). Die Kultur erfolgte auf murinen embryonalen Fibroblasten (*Feeder-Zellen*), die zum Erhalt der Pluripotenz beitragen. Bei der diploiden Linie H9 liegt der Karyotyp XX vor.

hESZ-Linie HUES-8: Die Etablierung der Zelllinie erfolgte 2004 (Cowan *et al.* 2004; hES Cell Facility/ Melton Laboratory Harvard University, Madison, USA). Die diploide Linie HUES-8 weist den Karyotyp XY auf und wurde unter Nutzung von *Feeder*-Zellen (siehe Abschnitt 2.1.3) kultiviert.

hiPSZ-Linie IMR90-4: Die Zelllinie wurde mittels lentiviraler Reprogrammierung aus der humanen weiblichen fetalen Lungenfibroblastenzelllinie IMR90 generiert (Nichols *et al.* 1977; Yu *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde der Klon 4 verwendet.

Alle Zelllinien sind kommerziell erhältlich und wurden für die Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen importiert. Die Linien H9 und IMR90-4 sind erhältlich über die Stammzellbank WiCell (*WiCell Research Institute*, Wisconsin, USA), die Linie HUES-8 kann über die Stammzellbank der Harvard Universität erworben werden (*hES Cell Facility Harvard University*, Madison, USA). Die Einfuhr und Verwendung der hESZ-Linien erfolgte gemäß einer Genehmigung nach Paragraph 6 des Stammzellgesetzes (StZG), Aktenzeichen: 1710-79-1-4-50.

2.1.2 Zusammensetzung von Kultur- und Differenzierungsmedien

Die Herstellung von Stammlösungen lyophilisierter Substanzen erfolgte nach Herstellerangaben.

- **Aktivin A** (Peprotech, Hamburg)
- **B27** (Life Technologies, Darmstadt)
- **bFGF** (*basic Fibroblast Growth Factor*, Synonym: FGF2; Peprotech, Hamburg)
- **β -Mercaptoethanol** (Serva, Heidelberg)
- **BSA**, Bovines Serum-Albumin, (GE Healthcare, Freiburg)
- **D-(+)-Glukose** (Sigma-Aldrich, Taufkirchen b. München)
- **DMEM high Glucose 4,5 g/l**, ohne L-Glutamin, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, (GE Healthcare, Freiburg). Basalmedium für die pankreatische Differenzierung der hESZ und hiPSZ.
- **DMEM high Glucose 4,5 g/l**, mit L-Glutamin, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Life Technologies, Darmstadt). Basalmedium für die Kultur der murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) zur Nutzung als *Feeder*-Zellen.
- **DMEM/F12**, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Life Technologies, Darmstadt). Basalmedium für die Kultur der Zelllinie HUES-8 und die pankreatische Differenzierung der hESZ und hiPSZ.
- **FKS**, Fetales Kälber-Serum (Lonza, Schweiz). Die Inaktivierung erfolgte bei 56°C im Wasserbad für 30 min und die Lagerung bei 4°C.
- **Gentamycin-Lösung** 10 mg/ml (Biochrom, Berlin)
- **GLP-1** (*Glucagon-Like Peptid 1*, Peprotech, Hamburg)
- **GlutaMAX™-I** (Life Technologies, Darmstadt)
- **HGF** (*Hepatozyte Growth Factor*, Peprotech, Hamburg)
- **IGF-1** (*Insulin Growth Factor 1*, Peprotech, Hamburg)
- **KAAD-Cyclopamin** (Merck, Darmstadt)
- **KGF** (*Keratinocyte Growth Factor*, Synonym: *Fibroblast Growth Factor 7*, Peprotech, Hamburg)

- **Knockout DMEM** (Life Technologies, Darmstadt). Basalmedium für die Kultivierung der Linie H9.
- **Knockout Serum Replacer** (Life Technologies, Darmstadt). Dieser Ersatz des FKS enthält eine definierte und chargenunabhängige Zusammensetzung aller Komponenten und wurde bei der Kultivierung der humanen embryonalen Stammzellen verwendet.
- **MEM NEAA** (100X), *Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids* (Life Technologies, Darmstadt)
- **mTeSR™1** Basalmedium (Stemcell Technologies, Köln). Für die Kultivierung der Zelllinie IMR90-4 verwendet.
- **mTeSR™1 5x Supplement** (Stemcell Technologies, Köln)
- **Penicillin/Streptomycin-Lösung** (Life Technologies, Darmstadt). Enthält 0,03 mg/ml Penicillin und 5 mg/ml Streptomycin. Penicillin wird gegen gram-negative, Streptomycin gegen gram-positive Bakterien eingesetzt.
- **RA** (*Retinoic Acid*, Sigma-Aldrich, Taufkirchen b. München)
- **RPMI 1640 + Glutamax**, *Roswell Park Memorial Institute* (Life Technologies, Darmstadt). Basalmedium für die pankreatische Differenzierung der hESZ und hiPSZ.

In den folgenden Tabellen (1 - 4) ist die Zusammensetzung der eingesetzten Medien für die Kultur und Differenzierung der verwendeten Zellen zusammengestellt.

Tabelle 1: Kulturmedium der humanen embryonalen Stammzelllinien H9 und HUES-8.*

Mediumkomponenten	Zelllinie H9		Zelllinie HUES-8	
	Summe: 100 ml	Konzentration	Summe: 100 ml	Konzentration
Knockout DMEM	76,5 ml	-	---	---
DMEM/F12	---	---	76 ml	-
Knockout Serum Replacer	20 ml	20 %	20 ml	20 %
GlutaMAX™-I	0,5 ml	1 mM	1 ml	2 mM
NEAA	1 ml	1 %	1 ml	1 %
b-Mercaptoethanol	1 ml	100 µM	1 ml	100 µM
Penicillin/Streptomycin Lösung	1 ml	1 %	1 ml	1 %

* Die Zugabe von bFGF erfolgte direkt zur benötigten Menge an Kulturmedium beim täglichen Mediumwechsel.

Tabelle 2: Kulturmedium der humanen induzierten Stammzelllinie IMR90-4.

Mediumkomponenten	Zelllinie IMR90-4	
	Summe: 100 ml	Konzentration
mTeSR™1 Basal Medium	79 ml	-
mTeSR™1 5x Supplement	20 ml	20 %
Gentamycin-Lösung	1 ml	1 %

Tabelle 3: Medium für die Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

Mediumkomponenten	Feeder-Zellen: murine embryonale Fibroblasten	
	Summe: 100 ml	Konzentration
DMEM <i>high Glucose</i> (4,5 g/l)	81 ml	-
FKS	15 ml	15 %
GlutaMAX™-I	1 ml	1 %
NEAA	1 ml	1 %
b-Mercaptoethanol	1 ml	1 %
Penicillin/Streptomycin-Lösung	1 ml	1 %

Tabelle 4: Medium für die pankreatische *in vitro* Differenzierung der hESZ und hiPSZ. Die Zusammensetzung des Mediums variiert über die Dauer des Differenzierungsprozesses. Die Tabelle verdeutlicht die zeitliche Begrenzung in der Zugabe einzelner Komponenten während des Differenzierungsverlaufs. Die Mengenangaben der Basalmédien (DMEM *high glucose*, DMEM/F12, RPMI) beziehen sich auf ein beispielhaftes Gesamtvolumen von 10 ml. d = Tag

	0 d	1-3 d	4-6 d	7-9 d	10-12 d	13-15 d	16-18d
Aktivin A	100 ng/ml	100 ng/ml					
KGF (=FGF7)			50 ng/ml				
Noggin				50 ng/ml			
Cyclopamin				0,25 µM			
RA				2 µM			
GLP-1					50 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml
HGF						50 ng/ml	50 ng/ml
IGF-1						50 ng/ml	50 ng/ml
GlutaMax-I				1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
FKS		0,2 %	2 %				
B27				1 %	1 %	1 %	1 %
Penicilin/ Streptomycin- Lösung	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
DMEM <i>high glucose</i> (4,5 g/l)	-	-	-	9,75 ml	9,75 ml	9,75 ml	9,75 ml
DMEM/F12	3,3 ml	3,29 ml	3,23 ml	-	-	-	-
RPMI	6,6 ml	6,58 ml	6,46 ml	-	-	-	-

2.1.3 Kultur von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

Die Kultur der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen embryonalen Stammzelllinien erfolgte in Abhängigkeit von murinen *Feeder*-Zellen. Die Zellen wurden aus Mäusen des Auszuchtstammes

CF-1 (Charles River Laboratories, USA) gewonnen. Sie unterstützen den Erhalt des Stammzellcharakters durch die Aktivierung eines von den Faktoren Aktivin-Nodal-Smad2,3-vermittelten Signalweges, der von mehreren Mitgliedern der TGF-beta-Familie koordiniert wird. Diese üben u.a. Einfluss auf die menschliche Embryonalentwicklung aus. Auch bFGF ist in die Aktivierung Pluripotenz-assoziiierter Gene über die sequenzielle Induktion von Kinasen des RAS-MEK-ERK-Signalweges involviert (Vallier *et al.* 2009; Huang *et al.* 2015). Durch die Zugabe von bFGF zum Kulturmedium der hESZ wurden außerdem die *Feeder*-Zellen zur verstärkten Synthese und Freisetzung von Aktivin bzw. Nodal stimuliert (Greber *et al.* 2007; Greber *et al.* 2010).

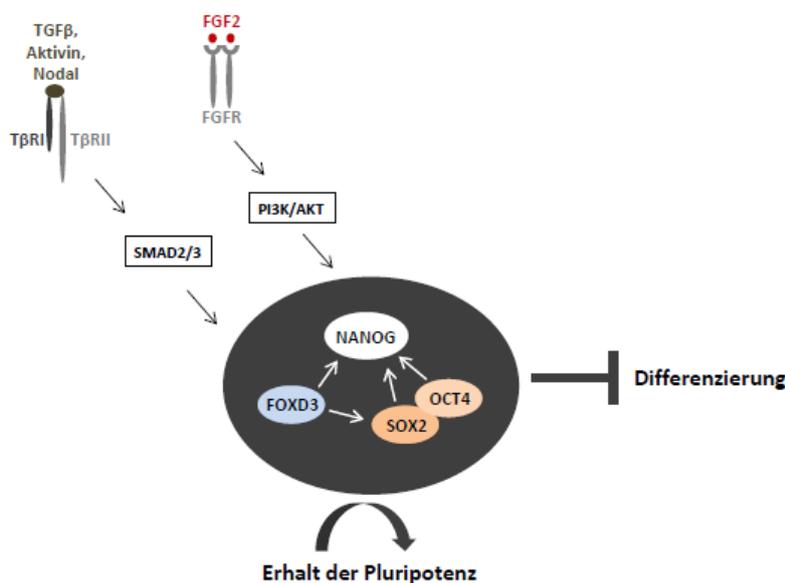


Abb. 8: Schematische Darstellung der Signalwege, die zum Pluripotenz-erhalt humaner embryonaler Stammzellen beitragen. Es kommt zur Stimulierung der Pluripotenz-Kernfaktoren NANOG, OCT4 und SOX2, welche durch wechselseitige Aktivierung die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters steuern (Ohtsuka und Dalton 2008; Arabadzjev *et al.* 2012; Huang *et al.* 2015; modifiziert).

Die murinen Fibroblasten wurden aus Embryonen am Tag 14 der Embryonalentwicklung unter sterilen Bedingungen isoliert. Im ersten Schritt erfolgte die Entnahme der Embryonen und die Überführung in eine, mit 10 ml Trypsinlösung (0,2 % Trypsin, 1:250 in 1x PBS) befüllte, Petrischale (Ø 10 cm). Die Plazenta und fetalen Membranen wurden entfernt und anhaftende Blutreste abgespült. Abgestorbene Embryonen wurden verworfen. Nach Überführung der Embryonen in eine zweite Petrischale mit Trypsinlösung erfolgte dort die Entfernung von Kopf und Leber zur Entfernung störender bzw. nicht benötigter Zelltypen. Anschließend wurde der Rumpf der Embryonen nach Transfer in eine weitere mit Trypsinlösung befüllte Schale mittels Skalpell zerkleinert. Die erhaltenen Gewebestücke wurden zusammen mit der Trypsinlösung in einen Erlenmeyerkolben überführt, welcher Glaskügelchen und ein Magnetührstäbchen enthielt. Auf einem Magnetrührer erfolgte für 20 min eine Durchmischung bei RT. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein Sieb in ein Falconröhrchen filtriert und mit 15 ml MEF-Kulturmedium aufgefüllt. Es folgte die Zentrifugation bei 1300 rpm für 5 min. Danach wurde der flüssige Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in MEF-Kulturmedium resuspendiert. Auf vier Petrischalen, welche je 5 ml MEF-Kulturmedium enthielten, wurden dann je 5 ml Zellsuspension verteilt. Durch vorsichtiges Kreisen der Schalen wurden die Zellen homogen verteilt. Am Tag nach der Isolation erfolgte ein Mediumwechsel.

2.1.3.1 Passage und Inaktivierung der Zellen

Für die Dissoziation der Zellen wurde ein Gemisch aus Trypsin- und EDTA-Lösung im Verhältnis 1:1 hergestellt und wie das Kulturmedium im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Nach Absaugen des Mediums aus der Kulturschale erfolgte zweimal nacheinander die Zugabe von 2 ml des Trypsin-EDTA-Gemisches, wobei dieses jeweils sofort wieder abgesaugt wurde. Der zurückbleibende Flüssigkeitsfilm war für die erwünschte Ablösung der Zellen ausreichend. Für zwei bis drei Minuten wurden die Zellen im Inkubator aufbewahrt. Danach ließen sich die embryonalen Fibroblasten durch leichtes Klopfen der Kulturschale bereits teilweise lösen. Zum Abstoppen des enzymatischen Verdauens wurden die Zellen in 2 ml FKS-haltigem Kulturmedium resuspendiert. Je 0,6 bis 1,0 ml der Zellsuspension wurden auf neue vorbereitete Petrischalen (Ø 10 cm) mit je 10 ml MEF-Kulturmedium gegeben. Für die Nutzung der Fibroblasten als *Feeder*-Zellen erfolgte deren Inaktivierung mittels Mitomycin C. Die Wirkung der Substanz beruht auf der Arretierung des Zellzyklus. Die inaktivierten Fibroblasten verblieben vital unter Aufrechterhaltung ihrer Pluripotenz-fördernden Wirkung, aber eine Teilung der Zellen über die gezielt eingestellte Dichte hinaus wurde verhindert. Das Medium in der Kulturschale wurde abgesaugt und 6 ml frisches MEF-Medium, das 300 µl Mitomycin-Lösung enthielt, zugegeben. In diesem Medium wurden die Zellen anschließend für zwei bis drei Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und es folgten drei Waschschriffe mit 1x PBS. Darauf folgte die Behandlung der Zellen mit dem Trypsin-EDTA-Gemisch entsprechend dem Ablauf während der Passage. Zu den somit resuspendierten Zellen wurden ca. 10 ml Kulturmedium gegeben. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Gezählt wurden die Zellen, die sich in den vier außen gelegenen Großquadranten befanden (in Abb. 9 mit „L“ gekennzeichnet). Die Zellzahl pro 1 ml ergab sich wie folgt: $\text{Zellzahl / ml} = \text{Gesamtzellzahl in allen 4 Quadranten} / 4 \times 10.000$.

Die humanen embryonalen Stammzellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 6 cm) und in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Um die optimale Dichte der *Feeder*-Zellen zu gewährleisten, wurden in die Kulturschalen je 430.000 inaktivierte MEF ausgesät und in jedes Well einer 6-Well-Platte 190.000 Zellen. Zuvor erfolgte die Beschichtung der Kulturschalen bzw. -platten mit Gelatine (0,1 %), um eine adhärente Kultur der inaktivierten Fibroblasten zu gewährleisten. Die Gelatine-Lösung wurde vor dem Aussäen der Zellen abgesaugt und MEF-Kulturmedium vorgelegt. Die vorbereiteten Kulturplatten bzw. -schalen wurden ÜN im Inkubator gelagert und im Anschluss für die Passage der hESZ eingesetzt. Aufgrund der Vitalitätsreduktion der primären Zellen mit fortschreitender *in vitro* Kultur sollten zur Nutzung als *Feeder*-Zellen keine MEF verwendet werden, die länger als vier Passagen kultiviert wurden.

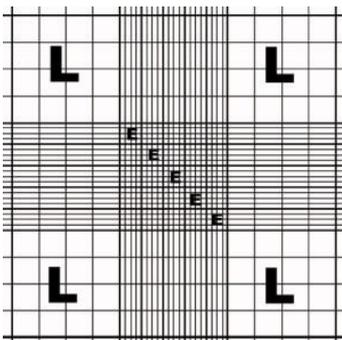


Abb. 9: Neubauer-Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahl (Carl Roth 2015).

2.1.3.2 Kryokonservierung

Die Bestandteile des Kryomedium sind FKS, MEF-Kulturmedium und DMSO im Verhältnis 6:3:1. Die ersten Arbeitsschritte entsprechen denen, die im Kapitel 2.1.4.1 beschriebenen Passage. Nach der Zugabe von 2 ml Kulturmedium, welches zur Neutralisation der Wirkung des EDTA-Trypsin-Gemisches führt, folgte die Übertragung der Zellsuspension in ein Greiner-Röhrchen und die Zentrifugation für 5 min bei 1.000 rpm. Nach Entfernung des Mediumüberstandes wurde das gebildete Zellpellet in 1 ml Kryomedium gelöst und die Suspension in ein Kryoröhrchen überführt. Für 24h folgte die Lagerung in einer Einfrierbox bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff.

2.1.4 Kultur von humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Die Kultur der beiden verwendeten hESZ-Linien H9 und HUES-8 erfolgte bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Das Kulturmedium wurde täglich erneuert unter Einhaltung eines annähernd 24-stündigen Rhythmus. Beide Zelllinien benötigten für den Erhalt ihrer Pluripotenz die Anwesenheit einer nährenden Zellschicht (*Feeder*-Zellen), welche entsprechende Wachstumsfaktoren produzierte und darüber hinaus als Adhäsionsmatrix diente (Thomson 1998). Zusätzlich wurde dem Kulturmedium bFGF als pluripotenzerhaltender Faktor hinzugefügt (Greber *et al.* 2007). Um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden, erfolgte die Zugabe von bFGF täglich frisch zum Mediumwechsel.

2.1.4.1 Passage der Zellen

Die Passage der embryonalen Stammzellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80 - 90 %, welche nach etwa sechs bis sieben Kulturtagen erreicht war. Einen Tag vor der Passage wurden inaktivierte MEF in die neuen Kulturschalen (z.B. 6-Well-Platten) eingebracht. Die Passage wurde entweder enzymatisch mit Kollagenase IV (Linie H9) bzw. Versene (Linie HUES-8) oder manuell durch Zerteilen und Picken der gewachsenen Kolonien und Umsetzung auf neue vorbereitete Kulturplatten mit *Feeder*-Zellen durchgeführt.

Enzymatische Passage der Linie H9:

Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde steril filtrierte Kollagenaselösung zu den Zellen gegeben (ca. 1 ml pro Well einer 6-Well-Platte). Es folgte eine Inkubation bei 37°C für ca. fünf Minuten und die anschließende Entfernung der Kollagenaselösung. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml frischem Kulturmedium mit bFGF pro Well. Mit einer Eppendorfpipette (1.000 µl) wurden die Kolonien vom Boden des Wells abgeschabt und durch wiederholtes Pipettieren zerkleinert. Im Anschluss wurde das Well mit weiteren 5 ml Kulturmedium mit bFGF aufgefüllt. Eine neue 6-Well-Zellkulturplatte mit inaktivierten *Feeder*-Zellen wurde am Vortag der Passage vorbereitet. Es folgte das Absaugen des MEF-Kulturmediums und das Spülen der Wells mit 1x PBS. Danach wurden pro Well 1,5 ml H9-Kulturmedium (+ bFGF) vorgelegt. Je 1 ml der resuspendierten Stammzellen wurden im Anschluss zugegeben, so dass sich pro Well ein Endvolumen von 2,5 ml Medium ergab. Die Zellen wurden durch vorsichtiges 8-förmiges

Schwenken der Platte homogen verteilt. Die weitere Kultur erfolgte bei 37°C.

Enzymatische Passage der Linie HUES-8:

Auf das Absaugen des Kulturmediums folgte die Zugabe von ca. 1 ml Versenelösung pro Well einer 6-Well-Platte und die Inkubation für ein bis zwei Minuten bei 37°C auf einer Heizplatte. Anschließend wurde die Versenelösung abgesaugt und 1 ml frisches Kulturmedium mit bFGF pro Well zugegeben. Das weitere Verfahren glich dem beschriebenen Ablauf für die Linie H9. Die enzymatische Passage war grundsätzlich für die zügige Expansion der Zellen geeignet. Aufgrund der beschriebenen Zellvermehrung im Verhältnis 1:6 war die Generierung großer Mengen an Ausgangsmaterial für Differenzierungsversuche möglich. Bei mehrfach wiederholter enzymatischer Passage kann bei einigen Kolonien eine zunehmende Differenzierung der Zellen im Randbereich beobachtet werden, welche sich im Verlust der typischen Stammzellmorphologie zeigt. Eine übermäßige Vereinzelung der Zellen während der Passage kann deren erneute Anheftung auf den *Feeder*-Zellen der neuen Kulturschale erschweren. Es kann somit in Folge mangelhafter Zell-Zell-Kontakte, wie sie in der typischen Kolonie-Morphologie der embryonalen Stammzellen stark ausgeprägt sind, zu einsetzender Differenzierung einzelner Zellen kommen. Für die langfristige Erhaltung qualitativ hochwertiger pluripotenter Zellen ist daher eine manuelle Passage ohne Einsatz enzymatisch wirksamer Lösungen zu bevorzugen. Der Erhalt kompakter Zellaggregate konnte hierbei präziser erfolgen, wodurch spontane Differenzierungsereignisse minimiert werden. Die manuell passagierten Zellen konnten dann wiederholt als Ausgangsmaterial für kurzfristige Phasen starker Expansion mittels enzymatischer Passage dienen.

Manuelle Passage der Zelllinien H9 und HUES-8:

Die manuelle Passage verlief für beide Linien identisch. Zuerst erfolgte die Vorbereitung der neuen Kulturschalen (Ø 58 mm) mit *Feeder*-Zellen vergleichbar zum Vorgehen während der enzymatischen Passage, jedoch wurden nach dem Waschschrift 3 ml Kulturmedium mit bFGF zugegeben. Mit Hilfe eines Skalpellens wurden die Stammzellkolonien von den *Feeder*-Zellen abgetrennt und mittels Eppendorfpipette (100 µl) in die vorbereiteten neuen Kulturschalen übertragen. Bei der Ablösung der Zellen wurden die Kolonien in kleinere Stücke von ca. 500 - 1.000 Zellen geteilt. Zeigten die Randzellen einer Kolonie morphologisch keinen klaren Stammzellcharakter, wurden nur Zellen aus dem Zentrum der Kolonie ausgeschnitten.

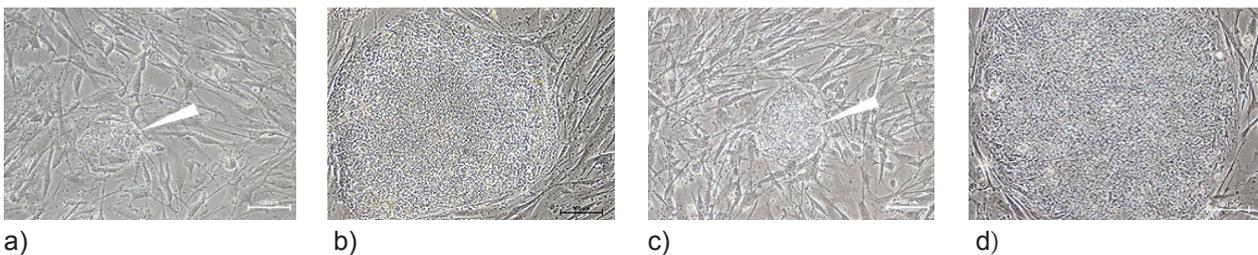


Abb. 10: Kolonien der hESZ-Linien H9 (a, b) und HUES-8 (c, d). An Tag eins nach der Passage hatten sich die zerkleinerten Zellverbände (Pfeile) an der *Feeder*-Zellschicht angeheftet (a, c). Die charakteristische Kolonie-Morphologie war nach sechs bis sieben Tagen Wachstum wieder deutlich zu erkennen (b, d). Maßstab: 100 µm.

Passage der humanen induzierten pluripotenten Stammzellen:

Vergleichbar zu den hESZ erfolgte die Passage der hiPSZ (Linie IMR90-4) ebenfalls bei einer Konfluenz von ca. 80 - 90 %, welche nach etwa sechs bis sieben Kulturtagen erreicht war. Allerdings wurden die hiPSZ nicht auf *Feeder*-Zellen, sondern auf Matrigel-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Dafür wurden die Schalen vor der Passage mit einer Matrigellösung (100 µl Matrigel auf 10 ml DMEM/F12 Basalmedium) beschichtet und für mindestens 1 h bei 37°C im Inkubator aufbewahrt. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt, so dass nur ein dünner Film zurück blieb. Auch die Passage der hiPSZ wurde entweder enzymatisch mittels ReLeSR™-Dissoziationslösung oder manuell durch Zerteilen und Picken der gewachsenen Kolonien und Umsetzung auf neue vorbereitete Kulturschalen durchgeführt.

Enzymatische Passage der Linie IMR90-4:

Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde die ReLeSR™-Dissoziationslösung auf die bewachsene Kulturschale gegeben und sofort bis auf einen dünnen Film wieder abgesaugt. Es folgte die Inkubation der Kulturschale für zwei bis fünf Minuten bei 37°C im Inkubator. Sobald bei den regelmäßigen Kontrollen unter dem Mikroskop zu erkennen war, dass die Ränder der Kolonien mit der Ablösung begannen, wurde frisches, mit HA-100 supplementiertes, Kulturmedium zugegeben (3 ml Medium pro Schale mit 6 cm Durchmesser). Durch mehrmaliges Spülen mittels Pipette erfolgte die Ablösung und Zerkleinerung der Kolonien sowie die anschließende Überführung auf vorbereitete Matrigel-beschichtete Kulturschalen.

Manuelle Passage der Linie IMR90-4:

Für die manuelle Passage wurde auf vorbereitete Matrigel-beschichtete Zellkulturschalen vorgewärmtes und mit HA-100 angereichertes hiPSZ-Kulturmedium gegeben (3 ml Medium pro Schale mit 6 cm Durchmesser). Unter dem Mikroskop wurden geeignete Kolonien ausgewählt, mittels Skalpell in Teilstücke geschnitten und mit einer Eppendorfpipette (100 µl) in die vorbereiteten neuen Kulturschalen übertragen.

2.1.4.2 Kryokonservierung

Die Kryomedien der verwendeten hESZ und hiPSZ unterschieden sich wie folgt in der Zusammensetzung:

Kryomedium der Zelllinie H9:

70 % KO-DMEM, 20 % FKS, 10 % DMSO

Die Zellen wurden, wie bei der enzymatischen Passage beschrieben, von der Kulturschale abgelöst und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Es folgte die Zentrifugation für fünf Minuten bei 1.000 rpm. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und

die Zelllösung in ein Kryoröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde für 24h in einer Einfrierbox bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff gelagert. Da DMSO, welches im Kryomedium enthalten war, bei Raumtemperatur eine toxische Wirkung auf die Zellen hat, wurden alle Arbeitsschritte sehr zügig durchgeführt und die Lagerung des Kryoröhrchen erfolgte bis zum Einfrieren auf Eis. Zum Auftauen der konservierten Zellen wurde der Inhalt des Kryoröhrchens kurz im 37°C warmen Wasserbad angetaut, dann in ein 15 ml Greiner-Röhrchen gegeben und langsam 9 ml Kulturmedium zugetropft. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Zum Zellpellet wurden 3 ml Kulturmedium mit bFGF zur Resuspension zugegeben. Die Zellen wurden dann, wie in Abschnitt 2.1.3.1 beschrieben, in eine vorbereitete Kulturschale mit *Feeder*-Zellen ausgesät und durch vorsichtiges Kreisen der Kulturschale homogen verteilt.

Kryomedium der Zelllinie HUES-8:

2x konzentriert: 60 % FKS, 20 % Kulturmedium, 20 % DMSO

Wie für die enzymatische Passage beschrieben, wurden die Zellen von der Kulturschale gelöst, in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 200 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurden zuerst 0,5 ml Kulturmedium zur Resuspension zugegeben und anschließend 0,5 ml des zunächst 2x konzentriert hergestellten Kryomediums. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt, für 24h bei -80°C in einer Einfrierbox und im Anschluss in flüssigem Stickstoff gelagert. Da das Kryomedium für die Zellen der Linie HUES-8 ebenfalls DMSO enthielt, erfolgten wiederum alle Arbeitsschritte sehr zügig und die Kryoröhrchen wurden auf Eis gelagert. Der Auftauprozess war identisch zum oben beschriebenen Vorgehen für die Zellen der Linie H9. Die Zentrifugation erfolgte bei 200 x g für fünf Minuten. Zur verbesserten Adhäsion erfolgte bei beiden Zelllinien zusätzlich zum bFGF die Zugabe des ROCK-Inhibitors (p160-*Rho-associated Coiled-Coil Kinase*) Y-27632 (10 μM) zur Inhibierung apoptotischer Prozesse während der ersten 24h nach dem Auftauvorgang (Watanabe *et al.* 2007).

Kryomedium der Zelllinie IMR90-4:

70 % mTESR™ Basalmedium, 20 % FKS, 10 % DMSO

Die Ablösung der Zellen geschah wie für die enzymatische Passage beschrieben. Es folgte die Überführung in ein 15 ml Greiner-Röhrchen und die Zentrifugation für fünf Minuten bei 1000 rpm. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml Kryomedium resuspendiert und die Zelllösung in ein Kryoröhrchen überführt. Es schloss sich die Lagerung für 24h in einer Einfrierbox bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff an. Aufgrund der zelltoxischen Wirkung des im Kryomedium enthaltenen DMSO bei RT, wurden alle Arbeitsschritte sehr zügig durchgeführt und die Lagerung des Kryoröhrchen erfolgte bis zum Einfrieren auf Eis. Zum Auftauen der konservierten Zellen wurde der Inhalt des Kryoröhrchens kurz im 37°C warmen Wasserbad angetaut, anschließend in ein 15 ml Greiner-Röhrchen gegeben und langsam 9 ml Kulturmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und der gebildete Überstand abgesaugt. Zum Zellpellet wurden 3 ml des mit HA-100 supplementierten Kulturmediums zur Resuspension zugegeben. Die Zellsuspension

wurde im Anschluss auf eine Matrigel-beschichtete Kulturschale von 6 cm Durchmesser überführt und durch vorsichtiges Kreisen der Schale homogen verteilt.

2.1.4.3 Analyse der Pluripotenz

Während der Kultur der hESZ und hiPSZ bzw. vor der Durchführung von Differenzierungsversuchen erfolgte eine umfassende Überprüfung des Stammzellcharakters. Die Expression von Pluripotenz-assoziierten Genen wurde sowohl auf Transkriptionsebene mittels PCR-Analyse, als auch auf Proteinebene mit Hilfe der Immunfluoreszenz analysiert. Zusätzlich diente der Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität zur Beurteilung der Pluripotenz. Alkalische Phosphatasen sind Enzyme, die Phosphorsäureester zu Phosphat und Alkoholen hydrolysieren können. Alkalische Phosphatase-Aktivität stellt ein charakteristisches Merkmal embryonaler Stammzellen dar, d.h. das Fehlen dieser Aktivität würde auf den Verlust der Pluripotenz hindeuten (O'Connor *et al.* 2008). Unter Verwendung einer gebrauchsfertigen Lösung wurde die Aktivität des Enzyms in den im Rahmen dieser Arbeit kultivierten hESZ und hiPSZ untersucht. Bei einer positiven Analyse sollten die Stammzellkolonien violett erscheinen, da die aktive Phosphatase zur Entstehung eines entsprechenden Farbstoffes führt.

Im ersten Schritt wurde das Kulturmedium abgesaugt, drei Mal mit 1x PBS gewaschen und die Zellen anschließend mit gebrauchsfertiger Fixierlösung bedeckt und für ca. 1h fixiert. Danach wurde mit 1x PBS gespült. Es schloss sich die Inkubation der Zellen in der laut Herstellerangaben zusammengesetzten Färbelösung für 0,5 bis 1h bei RT an. Nach Entfernung der Färbereagenz und Spülen der Kulturschale mit 1x PBS wurden die Zellen durch erneute Zugabe von 1x PBS vor dem Austrocknen geschützt. Die Analyse der durch die alkalische Phosphatase-Aktivität violett angefärbten Stammzellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

2.1.5 Pankreatische *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen

Für die Generierung endokriner Vorläuferzellen bildete ein von D'Amour *et al.* etabliertes und im Rahmen zahlreicher *in vitro* Differenzierungsstudien an verschiedenen hESZ-Linien reproduziertes Protokoll die Grundlage (D'Amour *et al.* 2006). Es erfolgten jedoch zahlreiche Modifikationen zur Optimierung bei paralleler Nutzung der in dieser Dissertation verwendeten humanen embryonalen Stammzelllinien H9 und HUES-8 sowie der humanen induzierten pluripotenten Stammzelllinie IMR90-4. Bei allen durchgeführten Experimenten wurden zusätzlich zu den Zellen, die mittels Medienzusätze bzw. Wachstumsfaktoren gerichtet in die pankreatische Entwicklungslinie differenziert wurden, jeweils entsprechende Kontrollgruppen mitgeführt. Das Medium, in dem die Zellen dieser Gruppe inkubiert wurden, entsprach stets in der Grundzusammensetzung dem der gerichtet differenzierten Gruppe, es fehlten jedoch die forcierenden Wachstumsfaktoren. Differenzierungsvorgänge innerhalb der Kontrollgruppe geschahen somit spontan und ungerichtet.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst der grundlegende Differenzierungsverlauf beschrieben, welcher die Voraussetzung für die reproduzierbare Generierung endokriner Progenitorzellen darstellt. Die unter Nutzung dieses Protokolls erhaltenen Daten zum Expressionsverlauf zahlreicher Pankreas-assoziiierter Markergene und mikroRNAs bildeten die Basis für die anschließend dargestellten Modifikationen des

Ausgangsprotokolls. Die Analysen auf Transkriptions- und Translationsebene erfolgten jeweils durch Probennahmen an den im Differenzierungsschema verzeichneten Tagen im Differenzierungsverlauf. Um Hinweise auf essentielle, grundlegende und vor allem zelllinienunspezifische Signalwege und Regulationsmechanismen während der *in vitro* Differenzierung zu erhalten, wurden parallel die hESZ-Linien H9 und HUES-8 sowie die hiPSZ-Linie IMR90-4 mit Hilfe des optimierten Protokolls differenziert, was eine gute Vergleichbarkeit der Daten erlaubte. Die in Bezug zur Differenzierung Insulin-produzierender Zellen präsentierten Daten unter Nutzung der Linie IMR90-4 ergaben sich im Rahmen kooperativ durchgeführter Experimente der begleiteten Promotion (Dr. med.) von Herrn Konrad R. Knittel, welche sich in Vorbereitung zur Einreichung am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle (Saale) befindet (Knittel 2016).

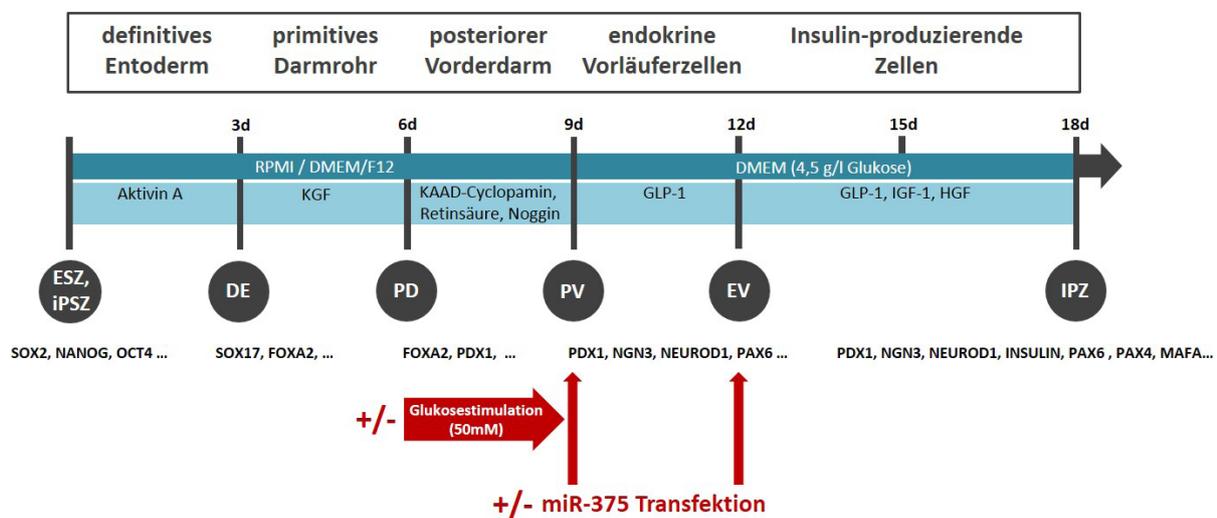


Abb. 11: Basisprotokoll zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen. Abgebildet sind die eingesetzten Wachstumsfaktoren, die Tage der Probennahmen und eine Auswahl der analysierten stadientypischen Markergene. Die rot markierten Komponenten zeigen die in den folgenden Kapiteln 2.1.5.1, 2.1.5.2 und 2.1.5.3 vorgestellten Modifikationen des Differenzierungsprotokolls. d = Tag.

Zum Beginn der Differenzierungsversuche erfolgte die Passage der hESZ auf Matrigel-beschichtete Zellkulturschalen zur Entfernung der *Feeder*-Zellen aus der Kultur. Die hiPSZ wurden ebenfalls zum Differenzierungsbeginn auf neu vorbereitete Matrigel-beschichtete Schalen passagiert. Das eingesetzte Matrigel wurde aus murinen Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom-Zellen gewonnen und diente als Adhäsionsmatrix. Es enthielt verschiedene extrazelluläre Matrixkomponenten wie Kollagen Typ IV, Laminin, Heparan Sulfate, Proteoglycan und Entactin (Lu *et al.* 2006). Zur Beschichtung der Zellkulturschalen wurde das Matrigel aufgetaut und mit Kulturmedium der hESZ bzw. hiPSZ im Verhältnis 1:30 verdünnt. Mit dieser Suspension wurden die Zellkulturschalen beschichtet und für mindestens 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung bis auf einen dünnen Film am Boden der Kulturschale abgesaugt. Die nachfolgende Passage der Stammzellen auf die vorbereiteten Schalen entsprach dem, in Kapitel 2.1.4.1 beschriebenen Ablauf. Für 24h nach der Passage wurden die embryonalen Stammzellen in konditioniertem Kulturmedium und die hiPSZ in mTeSR™-Kulturmedium inkubiert. Zur Gewinnung von konditioniertem Medium erfolgte ÜN die Inkubation inaktiver MEF mit dem jeweiligen Kulturmedium der

embryonalen Stammzellen, was zur Abgabe von Wachstumsfaktoren aus den murinen embryonalen Fibroblasten in das Medium führte. Die Kultur der hESZ in diesem konditionierten Medium für 24h direkt nach der Passage auf Matrigel-beschichtete Schalen förderte die Adhäsion der Zellen auf dieser neuen Matrix. Es schloss sich dann die Inkubation der hESZ und hiPSZ mit dem ersten Differenzierungsmedium des Protokolls an. Nach Beendigung der Differenzierungsversuche erfolgte die Probenaufarbeitung und Auswertung, wobei die Analyse der Expressionsmuster Pankreas-assoziiierter mikroRNAs und die Auswertung spezifischer Pankreas- bzw. Betazell-assoziiierter Marker auf Transkriptions- und Translationsebene im Fokus lag. Für Immunfluoreszenzanalysen wurden die Stammzellen während des Differenzierungsprozesses auf Deckgläsern in der Kulturschale inkubiert.

2.1.5.1 Transfektion von mikroRNA-375

Wie im Kapitel 1.4.2 beschrieben, spielt die mikroRNA-375 eine bedeutende Rolle in der Ausbildung, dem Erhalt und der korrekten Funktion von Beta-Zellen. Um die während der Differenzierung Insulin-produzierender Zellen auftretenden miR-gesteuerten Prozesse gezielt zu stimulieren und somit eine Annäherung an die *in vivo* Situation zu erreichen, erfolgte die Transfektion von miR-375-Molekülen vergleichend in hESZ (Linien H9 und HUES-8) und hiPSZ der Linie IMR90-4 im Zeitfenster der Entstehung pankreatischer bzw. endokriner Progenitorzellen. Der grundlegende Differenzierungsverlauf, d.h. die verwendeten Medienzusammensetzungen und Tage der Probennahme entsprach dem in Abbildung 11 gezeigten Basisprotokoll. Von besonderem Interesse waren im Rahmen der Auswertung die Effekte der gezielten miR-375 Induktion in Bezug auf potentielle Veränderungen in der Expression der unter Verwendung des Basisprotokolls bereits analysierten mikroRNAs und Pankreas-assoziierten Marker.

Für die Transfektion wurden folgende Materialien verwendet:

- DMEM/F12 (Life Technologies, Darmstadt)
- INTERFERin® (VWR, Darmstadt); Transfektionsreagenz
- *Knockout* DMEM (Life Technologies, Darmstadt)
- *Pre-miR™ miRNA Precursor Molecule* hsa-miR-375; 5 nmol (Life Technologies, Darmstadt) Für eine Stocklösung in RNase-freiem Wasser auf 6,25 µM verdünnt. Im Reaktionsansatz mit entsprechendem Basismedium (H9: KO-DMEM, HUES-8 und IMR90-4: DMEM/F12) verdünnt.
- *Pre-miR™ miRNA Precursor Negative Control #1* (Life Technologies, Darmstadt), In RNase-freiem Wasser auf 6,25 µM verdünnt für die Herstellung einer Stocklösung. Im Reaktionsansatz mit entsprechendem Basismedium (H9: KO-DMEM, HUES-8 und IMR90-4: DMEM/F12) verdünnt.
- *AllStars Neg. siRNA AF 488* (5 nmol) (Qiagen, Hilden) mit Fluochrom Alexa 488 modifiziert. Zur Herstellung einer Stocklösung erfolgte zunächst die Verdünnung in RNase-freiem Wasser auf 20 µM. Im Reaktionsansatz wurde eine weitere Verdünnung mit entsprechendem Basismedium (H9: KO-DMEM, HUES-8 und IMR90-4: DMEM/F12) durchgeführt.

Bei den Zellen, die gerichtet in die pankreatische Entwicklungslinie differenziert wurden, erfolgte am

neunten und zwölften Tag die Transfektion der mikroRNA-375 bzw. wurden parallel Zellen mit einer Negativ-mikroRNA transfiziert, welche als Transfektionskontrolle dienten. Zusätzlich wurde mittels „Leer-Transfektion“, d.h. nur Zugabe der Transfektionsreagenz ohne mikroRNA-Moleküle eine Kontrolle zum Einfluss der Reagenz auf die Zellen durchgeführt. Da die Analyse dieser Kontrollgruppe zeigte, dass die Transfektionsreagenz keinerlei messbaren Effekt hatte, wurde auf ihre Darstellung in den Diagrammen des Ergebnisteils verzichtet. Die verwendeten *Pre-miRTM miRNA Precursor Molecules* sind hierbei trotz des irritierenden Namens nicht mit *pre-miRs* gleichzusetzen, da sie keine *hairpin* Struktur enthalten und in ihrer Funktion reifen miRs entsprechen. Für die eingesetzte *Pre-miRTM miRNA Precursor Negative Control #1* ist laut Herstellerangaben aktuell keine spezifische Ziel-mRNA in humanen Zellen bekannt. Ihr Einsatz diene somit zur Kontrolle, ob auftretende Effekte spezifisch auf die miR-375-Transfektion zurückzuführen waren und nicht auf die generelle Einschleusung exogener Moleküle. Für die Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde vergleichend, wie nach Herstellerangaben empfohlen, eine Fluochrom-gekoppelte Negativ-siRNA eingesetzt. Diese strukturell vergleichbare siRNA wurde nach dem gleichen Protokoll wie die miR-375-Moleküle transfiziert. Der detaillierte Versuchsablauf hierfür ist im Abschnitt 2.3.2 nachzulesen. Die gewählte Konzentration der transfizierten miR-375 von 20 nM ergab sich aus den Empfehlungen der Hersteller der gewählten Transfektionsreagenz bzw. miR-Moleküle. Zusätzlich wiesen Erkenntnisse verschiedener Studien zu mikroRNA- bzw. siRNA-basierter Transfektion auf ein optimales Niveau zwischen 10 und 50 nM hin (Kuhn 2011; Hansen *et al.* 2013; Teplyuk *et al.* 2015). Unterhalb dieser Konzentration sind spezifische Effekte nur unzureichend detektierbar, während eine sehr hohe Konzentration die Gefahr unspezifischer miR-mRNA-Paarungen erhöht, was zu unerwünschten Veränderungen im Zellmetabolismus bzw. -verhalten führen kann. Die Aufnahme der mikroRNA in die Zelle erfolgte über den Vorgang der Lipofektion. Die eingesetzte Transfektionsreagenz war Lipid-basierend und ermöglichte den Einschluss der miR-Moleküle. Dank der lipophilen Eigenschaften konnten die gebildeten Komplexe (Liposomen) über die Zellmembran in die Zellen gelangen und die mikroRNA freisetzen (Blow 2009). Der Transfektionsansatz wurde laut Herstellerangaben vorbereitet, indem zunächst die Mischung aus mikroRNA und entsprechendem Basismedium hergestellt wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe der Transfektionsreagenz. Nach sorgfältigem Mischen mittels Vortexer wurden alle Komponenten für 15 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden je 200 µl des Reaktionsgemisches zu den Zellen eines Wells gegeben und diese bis zum nächsten regulären Mediumwechsel im Inkubator bei 37°C aufbewahrt. Die Probennahme und Auswertung nach erfolgter Transfektion geschah jeweils nach 72h.

2.1.5.2 Glukosestimulation

Um den Einfluss einer zeitlich begrenzten Glukosestimulation im pankreatischen *in vitro* Differenzierungsverlauf humaner pluripotenter Stammzellen zu bestimmen, wurde die Glukosekonzentration im Medium vom sechsten bis neunten Tag der Differenzierung auf 50 mM eingestellt. Innerhalb dieses Zeitfensters kam es zur Formierung der pankreatischen Progenitorzellen. Die Glukosekonzentration vor und nach dieser Supplementierung entsprach der des normalen Basisprotokolls, d.h. vom Differenzierungsstart bis zum sechsten Tag waren 13,2 mM und nach dem neunten Tag bis zum Ende des Differenzierungsprozesses 25 mM Glukose im Medium enthalten. Bei der Analyse der Versuche war hier

von besonderem Interesse, ob eine gezielte kurzfristige hohe Glukosekonzentration direkt die Bildung pankreatischer Vorläuferzellen fördert und ein solcher Effekt einen effizienzsteigernden Impuls für die anschließende weitere Spezialisierung der differenzierenden Zellen geben kann.

2.1.5.3 Kombination von mikroRNA-375-Transfektion und Glukosestimulation

Mit der gezielten Modifikation der Glukosekonzentration vom sechsten bis neunten Differenzierungstag und der sich anschließenden Modulation der miR-375-Expression wurde der kombinierte Einfluss zweier Protokollerweiterungen untersucht, die an verschiedenen Punkten im Differenzierungsverlauf ansetzen. Analysiert wurde hierbei das Zusammenspiel beider Modifikationen in Bezug auf die Differenzierungseffizienz, d.h. es stellte sich die Frage nach potenziellen additiven bzw. synergistischen Effekten. Dafür erfolgte die Untersuchung potenzieller Expressionsveränderungen der Pankreas-assoziierten Marker und mikroRNAs, welche für die Charakterisierung der Differenzierungsetappen dienten. Analysen auf Proteinebene wurden wie bei allen Varianten des Differenzierungsprotokolls mittels Immunfluoreszenz und ELISA durchgeführt. Der Ablauf der mikroRNA-Transfektion erfolgte wie im Abschnitt 2.1.5.1 beschrieben.

2.1.5.4 Transfektion eines mikroRNA-375-Inhibitors

Um den Einfluss der mikroRNA-375 auf die Ausbildung entodermaler Zellen zu untersuchen, erfolgte die Transfektion eines miR-375-Inhibitors zum Beginn des Differenzierungsprozesses. Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte miRNA-Inhibitor (hsa-miR-375 Anti-miR™ miRNA-Inhibitor, Lifetechnologies, Darmstadt) ist ein einzelsträngiges RNA-Molekül, das spezifisch an die endogene Ziel-miR binden und diese inaktivieren kann. Wie bei den im Abschnitt 2.1.5.1 beschriebenen transfizierten miR-Molekülen, unterliegt auch der Inhibitor stabilisierenden Modifikationen. Die exakte Art der Modifikation ist durch das Firmengeheimnis des jeweiligen Herstellers geschützt, aber es handelt sich zumeist um Schutzmaßnahmen gegen den Angriff von Exonukleasen (Anlagerung von Phosphothioat) und Endonukleasen (Methylierungen). Die Inhibierung der Ziel-miR erfolgt entweder durch direkte Bindung und somit verhinderte Integration in den RISC-Komplex, oder die Interaktion erfolgt mit Komponenten der miR-Prozessierung. Auch die Translokation der *pre*-miR aus dem Zellkern ins Cytosol kann verhindert werden. Die übrigen Komponenten der Transfektion entsprachen den im Abschnitt 2.1.5.1 beschriebenen Konditionen.

Das Transfektionsgemisch wurde einen Tag vor Anwendung des Differenzierungsprotokolls (-1d) zu den Zellen gegeben, d.h. während des Adhäsionsvorgangs nach erfolgter Passage auf Matrigel-beschichtete Zellkulturschalen. Die Gabe des Transfektionsgemisches geschah in den dünnen Matrigelfilm hinein. Es folgte eine Inkubation für ca. 30 Minuten damit sich die Transfektionspartikel im Gel absetzen konnten. Danach folgte die Zugabe der Zellen wie im Kapitel 2.1.5.1 erläutert. Das Absenken und die Anheftung der adhären wachsenden Zellen erlaubte so ein hohes Maß an Partikel-Zell-Kontakten, was zu einer effektiven Transfektionsrate beitragen sollte, denn nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel wie im Differenzierungsprotokoll vorgeschrieben und damit die Entfernung des Transfektionsgemisches. Die finale Probennahme geschah an Tag drei des Differenzierungsprozesses, dem Zeitpunkt der Ent-

stehung entodermaler Vorläuferzellen. Die beschriebenen Versuche zur miR-375-Inhibitor Transfektion wurden vergleichend an den hESZ-Linien H9 und HUES-8 durchgeführt.

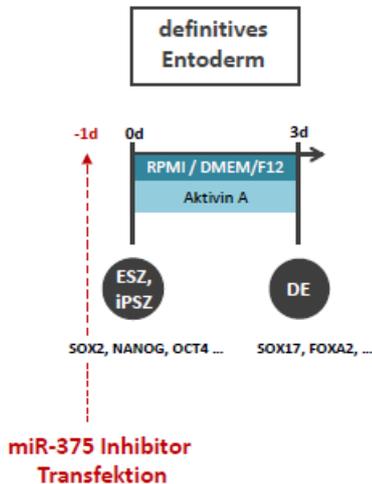


Abb. 12: Modifiziertes Protokoll zur *in vitro* Differenzierung entodermaler Vorläuferzellen aus humanen embryonalen Stammzellen (Linien: H9 und HUES-8). Die Transfektion des miR-375 Inhibitors erfolgte einen Tag vor Beginn des Differenzierungsprozesses. d = Tag.

2.1.5.5 TALEs-Transfektion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden angefertigte TALEs zur spezifischen Aktivierung der mikroRNA-375 verwendet. TALEs (*Transcription Activator-Like Effector*) sind bakterielle Proteine, die bei der Infektion von Pflanzenarten sekretiert werden. Sie können durch Bindung an definierte Zielsequenzen zur Aktivierung von Wirtsgenen führen, was zur Verbreitung des Bakteriums in der befallenen Pflanze führt (Büttner und Bonas 2010). Im zentralen Bereich der Aktivatoren gibt es eine variable Anzahl von Wiederholungen eines 33 bis 35 Aminosäuren überspannenden Motivs. Die Wiederholungen unterscheiden sich hauptsächlich an den Positionen 12 und 13, welche auch als RVDs (*Repeat Variable Di-residue*) bezeichnet werden. Ein Vergleich der Nukleotide der Erkennungssequenz mit den RVDs des entsprechenden TALE führte zur Entschlüsselung des Bindungscodes. Ein RVD des TALE interagiert mit einem Nukleotid der Erkennungssequenz (Boch *et al.* 2009; Moscou und Bogdanove 2009). Es assoziieren NI mit Adenin, HD mit Cytosin, NG mit Thymin und NN / NK mit Guanin (Thakore und Gersbach 2015). Unter Nutzung des Codes ist sowohl die Vorhersage von Zielgenen bekannter TALEs möglich, als auch die Generierung von TALEs mit nutzerdefinierter Erkennungsspezifität zur gezielten Induktion von Zielgenen (Morbiter *et al.* 2010). Um die Bedeutung von miR-375 während der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden somit ergänzend zu der in Kapitel 2.1.5.4 beschriebenen Inhibitor-induzierten Repression auch Studien zur gezielten Induktion dieser mikroRNA durchgeführt. Die verwendeten TALEs wurden im Rahmen einer Kooperation von Frau Annekatrin Richter aus dem Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale) designt und hergestellt. Insgesamt wurden fünf TALEs erstellt, die an verschiedenen Bereichen des miR-375-Promotors binden und zur Aktivierung des miR-Genes beitragen sollen. Studien verwiesen auf eine Wirkungssteigerung bei kombinierter Nutzung der TALEs (Richter und Boch 2013). Dem folgend, wurden die fünf hergestellten TALEs im Rahmen der durchgeführten Transfektionsexperimente

in Kombination eingesetzt. Zur Kontrolle potentieller unspezifischer Effekte diente ein Vektor, der einen TALE ohne Aktivierungsfähigkeit in Säugerzellen, enthielt. Zusätzlich wurde eine Gruppe von Zellen parallel nur mit der eingesetzten Transfektionsreagenz inkubiert („Leer-Transfektion“). Die Analyse dieser Kontrollgruppe ergab, dass die verwendete Transfektionsreagenz keinerlei unspezifische Nebeneffekte in den Zellen ausübte, weswegen auf die Darstellung dieser Behandlungsgruppe in den Diagrammen des Ergebnisteils verzichtet wurde. Neben der potentiell aktivierenden Wirkung der TALEs auf die miR-375 lag der Fokus bei den durchgeführten Experimenten vor allem auf der grundsätzlichen Anwendbarkeit der Konstrukte. Die designten Vektoren besitzen jeweils eine Gesamtgröße von ca. 9 bis 10 kb, was eine effiziente Transfektion allgemein und speziell in sensible Zellmodelle wie hESZ / hiPSZ erheblich erschweren kann. Da es aktuell noch keine veröffentlichten Daten zur Transfektion von TALEs im Verlauf von pankreatischen *in vitro* Differenzierungsprozessen humaner pluripotenter Stammzellen gibt, stellen Erkenntnisgewinne zur generellen Nutzbarkeit dieser Effektoren zur gezielten Modulationen von Differenzierungsvorgängen ein Ziel der vorliegenden Arbeit dar.

Für die Transfektion wurden folgende Materialien verwendet:

- DMEM/F12 (Life Technologies, Darmstadt)
- *GeneIN* (amsbio, Frankfurt a.M.); Transfektionsreagenz
- *Knockout* DMEM (Life Technologies, Darmstadt)
- 5 TALEs zur spezifischen Induktion von miR-375, 1 Kontrollvektor (ohne Aktivierungsfähigkeit)

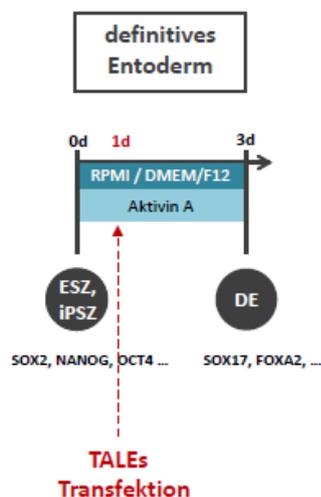


Abb. 13: Modifiziertes Protokoll zur *in vitro* Differenzierung entodermaler Vorläuferzellen aus humanen embryonalen (Linie HUES-8) und induzierten (Linie IMR90-4) pluripotenten Stammzellen. Die Transfektion der TALEs zur Induktion von miR-375 erfolgte an Tag eins des Differenzierungsprozesses. d = Tag.

Die Transfektionsversuche wurden vergleichend an der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 durchgeführt. Die Herstellung des Reaktionsgemisches und die Durchführung der Transfektion geschah nach Herstellerangaben. Die Probennahme und Auswertung erfolgte nach 48h, was Tag drei des Differenzierungsprozesses entsprach, dem Zeitpunkt der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die folgende Auflistung bietet einen Überblick über die Geräte, Materialien und Chemikalien, welche im Rahmen der mRNA-Analyse benötigt wurden.

Geräte / Verbrauchsmaterialien:

- Brand® Pipette Tips 10 µl, 100 µl und 1.000 µl (Brand, Wertheim). Pipettenspitzen für RNA-Isolation, cDNA Synthese und PCR.
- BZO *Adhesive Optical Seal Film* (Biozym, Oldenburg). Zum Versiegeln der 96-Well Platte für qPCR-Analysen.
- *EasyPhor* Gelelektrophoresekammer und Kämme (Biozym Scientific, Oldendorf)
- Geldokumentationsgerät mit Analysesoftware *BioCapture* (LTF Labortechnik, Wasserburg/B.)
- NanoVue Spektrophotometer (GE Healthcare, Freiburg)
- 96-Well PCR-Platten, weiß (Biozym, Oldenburg)
- *SafeSeal Tips Premium* 2.5 µl (Biozym, Oldenburg). Pipettenspitzen für die *Real-Time*-PCR.
- *StepOnePlus™ Real-Time* PCR System (Applied Biosystems, Waltham Massachusetts, USA). Mit dem Analyseprogramm *StepOne™ Software* v2.1 zum Auswerten der Daten.
- *Thermocycler* T3000 (Biometra, Göttingen)
- Trio Thermoblock (Biometra, Göttingen)
- Zentrifuge Heraeus Fresco 17 (Thermo Fisher Scientific, Sankt Leon-Rot)

Chemikalien:

- Agarose (Biozym Scientific, Oldendorf)
- Chloroform, > 99,8 % (Roth, Karlsruhe)
- DEPC-H₂O - Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser zur Inaktivierung von Ribonukleasen.
- DNA Ladepuffer (10x): 10 mM Tris-HCL (pH 7,6), 0,03 % Bromphenol-Blau, 0,03 % Xylen Cyanol FF, 60 % Glycerol und 60 mM EDTA.
- 10 mM dNTP-Mix (dGTP, dATP, dCTP, dTTP)
- 2,5 mM dNTP-Mix (dGTP, dATP, dCTP, dTTP)
- Ethanol absolut, > 99,8 % (Sigma-Aldrich, Taufkirchen b. München)
- Ethidiumbromid 10 mg/ml (Carl Roth, Karlsruhe)
- *GeneRuler* 100 bp *Plus DNA Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot)
- *HOTFIREpol* DNA Polymerase (Solis BioDyne, Estonia): Lösung 5 U/µl
- *5x HOT FIREPo® EvaGreen® qPCR Mix Plus ROX* (Solis BioDyne, Tartu)
- 25 mM MgCl₂ (Solis BioDyne, Estonia)

- *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden)
- *miScript Primer Assays* (Qiagen, Hilden). Zur Amplifikation von miRs mittels qPCR.
- *miScript II RT Kit* (Qiagen, Hilden)
- *miScript SYBR[®] Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden)
- Oligo(dT)18 (Fermentas, St. Leon-Rot): Lösung 50 μ M in 10 mM Tris-HCl, pH 8,3
- 1x PBS (Dulbecco's PBS) (Biochrom, Berlin)
- *Primer sense* (s) und *antisense* (as) für RT-PCR und qRT-PCR (biomers.net, Ulm). Die Lösung erfolgte in TE-Puffer für eine Stammlösung von 100 pM. Vor Gebrauch wurde zusätzlich 1:10 mit TE-Puffer verdünnt. Die *Primer*-Sequenzen sind einsehbar im Anhang, Tabellen 5 und 6.
- QIAzol[®] Lysepuffer (Qiagen, Hilden)
- 10 x Reaktionspuffer BD (Solis BioDyne, Estonia)
- 10 x Reaktionspuffer B2 (Solis BioDyne, Estonia)
- Reaktionspuffer (5x) für die cDNA-Synthese (Fermentas, St. Leon-Rot): 250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT
- Reinst-Wasser, Milli-Q UFplus Aufbereitungsanlage (Millipore, Schwalbach)
- RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot): Lösung 40 U/ μ l
- RNase free DNase Set (Qiagen, Hilden)
- RNase freies Wasser (Qiagen, Hilden)
- RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (Life Technologies, Darmstadt): 200 U/ μ l
- Taq DNA Polymerase (firepol), (Life Technologies, Darmstadt): Lösung 5 U/ μ l

2.2.1 Isolation von RNA inklusive mikroRNAs

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des *miRNeasy Mini Kits* nach dem Protokoll des Herstellers. Die Verwendung dieses Kits erlaubte die sensitive Aufreinigung von mRNAs und kleinerer mikroRNA-Moleküle. Zur Probennahme wurde das Medium aus der Zellkulturschale abgesaugt und ein Waschschrift mit 1x PBS durchgeführt. Um die anhaftenden Zellen zu lösen, wurden 700 μ l QIAzol-Lysepuffer zugegeben und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt. Bei dem Lysepuffer handelt es sich um eine monophasische Lösung, die Phenol und Guanidinthiocyanat enthält und RNasen inhibiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Proben homogenisiert und im Anschluss für fünf Minuten bei RT inkubiert. Danach schloss sich entweder die direkte Weiterverarbeitung an, oder die Proben wurden bei -80°C gelagert. Am Ende der Isolation wurde die aufgereinigte RNA in 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert und eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 260 nm (A₂₆₀), wobei hier eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 40 μ g/ml RNA entsprach. Durch gleichzeitige Messung der 260/280 Ratio konnten potenzielle Proteinverunreinigungen detektiert werden. Lag der Quotient der optischen Dichte bei $\lambda = 260$ nm und 280 nm zwischen 1.7 bis 2.0, wurde davon ausgegangen, dass keine Verunreinigung vorlag.

2.2.2 Synthese von cDNA

Die gewonnene RNA konnte im Anschluss zur Herstellung von cDNA (komplementäre DNA) eingesetzt werden, wobei zwei verschiedene Methoden zur Anwendung kamen. Für die Analyse von mikroRNAs wurde das *miScript II* RT Kit genutzt, während für die Analyse differenzierungsrelevanter Gene die RevertAid™ M-MuLVReverse Transkriptase verwendet wurde.

miScript II RT Kit:

Den Angaben im Herstellerprotokoll entsprechend, wurde 1 µg RNA eingesetzt. Zur RNA wurde zuerst RNase-freies Wasser gegeben für ein Endvolumen von 11,5 µl. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der weiteren Bestandteile und die Inkubation im Thermocycler. Ein 20 µl Reaktionsgemisch setzte sich insgesamt wie folgt zusammen:

- 11,5 µl (Mischung aus RNA + RNase-freiem Wasser)
 - 4 µl *HiFlex* Puffer
 - 2 µl *Nucleics Mix*
 - 2 µl *Reverse Transcriptase Mix*
 - 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor
- } Bestandteile des
miScript II RT Kits

Programm: 37°C, 60 min / 95°C, 5 min / 4°C, Pause

Das verwendete Kit ermöglichte eine effiziente reverse Transkription kleiner RNAs, wie miRs und anderen nicht-kodierenden RNAs in einem Reaktionsschritt. Da mikroRNAs aber nicht genauso polyadenyliert sind wie mRNAs, enthielt das Kit zusätzlich eine Poly(A)-Polymerase, wodurch die reverse Transkription und Polyadenylierung parallel stattfinden konnten. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels Oligo-dT- und random *Primer*, wobei die Oligo-dT-*Primer* an ihrem 5' Ende eine universelle *tag*-Sequenz besaßen, was eine Amplifizierung während der anschließenden quantitativen *Real-Time* PCR-Analyse erlaubte.

RevertAid™ M-MuLVReverse Transkriptase:

Hierbei erfolgte die cDNA-Synthese in zwei Reaktionsschritten. Für den ersten Schritt zur Anlagerung der *Primer* an die RNA wurde zunächst die RNA mit DEPC-H₂O gemischt, wobei für die cDNA-Synthese 1µg RNA eingesetzt wurde. Es folgte die Zugabe von 1 µl Oligo(dT)18 *Primer*, so dass der Reaktionsansatz insgesamt 12,5 µl umfasste. Der Ansatz wurde für fünf Minuten bei 65°C im *Thermocycler* inkubiert. Im Anschluss erfolgte im zweiten Schritt die Zugabe der übrigen Komponenten, wobei jeder Probe 7,5 µl des folgenden Gemisches zugesetzt wurde, um insgesamt ein Reaktionsvolumen von 20 µl zu erhalten: 12,5 µl Reaktionsansatz (aus Schritt 1) +

- 4 µl 5 x Reaktionspuffer
- 2 µl dNTP-Mix (dGTP, dCTP, dATP, dTTP), 10 mM
- 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase, 200 U/µl
- 0,5 µl RiboLock™ RNase Inhibitor

25 µl *HOTFIREpol*-PCR-Ansatz:

- 16,25 µl Reinst-H₂O
- 2,5 µl 10x Reaktionspuffer B2
- 2,0 µl 25 mM MgCl₂
- 2,0 µl 2,5 mM dNTP-Mix
- 0,5 µl 10 pM *Primer* (je *sense/antisense*)
- 0,25 µl *HOTFIREpol* DNA Polymerase
- 1,0 µl cDNA

Programm: 95°C, 10 min / 95°C, 45 s / 57-59°C, 45 s / 72°C, 45 s / 72°C, 10 min / 4°C, Pause

2.2.4 Quantitative *Real-Time* PCR

Im Vergleich zur RT-PCR bietet die Methode der *Real-Time* PCR zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Die Datengenerierung erfolgt während der laufenden Messung und es ist möglich, in jedem Zyklus die synthetisierte Menge des PCR-Produktes zu untersuchen, denn bei jedem durchgeführten Zyklus erfolgt eine Fluoreszenzmessung. Dem Reaktionsansatz wurde ein zur Interkalierung in doppelsträngige DNA fähiger Fluoreszenzfarbstoff beigemischt, so dass die Messung der gewonnenen Amplifikate und damit die Bestimmung der *Template*-Menge (Ausgangsmaterial) möglich war.

Zur Normalisierung und Quantifizierung der relativen Menge des zu untersuchenden PCR-Produktes wurde 18S-rRNA als Referenzgen für die Analyse differenzierungsrelevanter Markergene eingesetzt. Die Amplifikation von Ziel- und Referenzgen erfolgte jeweils in derselben cDNA-Probe. Eine Verrechnung der gemessenen Werte des *housekeeping*-Gens und des zu untersuchenden Zielgens hat somit eine Varianzreduktion der Expressionsergebnisse zum Vorteil, da Unterschiede z.B. in der RNA-Menge der einzelnen Proben oder auch potentielle Fehler bei der cDNA Synthese innerhalb einer Probe jeweils sowohl Zielgen als auch Referenzgen betreffen. Die Auswertung der Daten als relative Quantifizierung erfolgte gemäß den Vorgaben der Standard-Kurven-Methode (*User Bulletin #2* Applied Biosystems, Waltham Massachusetts, USA). Die Erstellung der benötigten *Primer* erfolgte mit Hilfe der *Software* PrimerExpress v.3.0 (Applied Biosystems, Waltham Massachusetts, USA), wobei die spezifischen miRNA-Sequenzen der zu analysierenden Gene mittels *online* verfügbarer Datenbank NCBI recherchiert und die abschließende Überprüfung der Spezifität aller generierten *Primer* durch die Anwendung der NCBI Datenbankrubrik BLAST durchgeführt wurden (National Center for Biotechnology Information 2015). Die Synthese der erstellten *Primer* wurde von der Firma biomers.net durchgeführt (biomers.net, Ulm).

Analyse Pankreas-assoziiierter Markergene:

Für einen Reaktionsansatz von 20 µl wurden folgende Komponenten benötigt:

- 14 µl Reinst-H₂O
- 4 µl 5 x *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus ROX*

- 0,5 µl 10 pM *Primer* (je *sense* / *antisense*)
- 1 µl cDNA

Zwei-Stufen-Protokoll:

- Initiale Denaturierung: 95°C, 10 min
- Denaturierung : 95°C, 15 s
- *Primer*-Anlagerung + Elongation: 60°C, 1 min

Insgesamt umfasste das Protokoll 45 Zyklen, wobei jeweils mindestens Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Zum Ende erfolgte die Erstellung der Schmelzkurven zur Überprüfung der selektiven Amplifikation des spezifischen PCR-Produktes.

Analyse Pankreas-assoziiertes mikroRNAs:

Hierfür wurde, wie bereits bei der cDNA-Synthese, das *miScript*-System verwendet. Die zu untersuchenden miRs wurden mittels *miScript Universal Primer* amplifiziert, welcher spezifisch an die, während der cDNA-Synthese eingefügte, universelle *tag*-Sequenz bindet. Bei den eingesetzten *miScript Primer Assays* handelte es sich jeweils um miR-spezifische *Primer*. Folgende *Primer Assays* (Qiagen, Hilden) wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

- Hs_SNORD25_11 *miScript Primer Assay*, Hs_miR_375_2 *miScript Primer Assay*, Hs_miR_335_1 *miScript Primer Assay*, Hs_miR_200c_1 *miScript Primer Assay*, Hs_miR_182_2 *miScript Primer Assay*, Hs_miR_9_1 *miScript Primer Assay*, Hs_miR_375_1_PR *miScript Primer Assay (Pre-miR-Assay)*
- Mm_miR_124_1 *miScript Primer Assay*, Mm_miR_30d_2 *miScript Primer Assay*

Im Rahmen früherer Studien innerhalb unserer Arbeitsgruppe an murinen ESZ wurden bereits einige der aufgeführten Assays etabliert und für die vorliegende Arbeit weiterhin genutzt. Diese Möglichkeit beruht auf der starken Konservierung (100 % Homologie) der entsprechenden reifen miR-Sequenzen zwischen den Spezies Maus und Mensch. Eine Übersicht der detektierten miR-Sequenzen ist im Anhang (Tabelle 7) einsehbar.

Für einen 20 µl Ansatz wurden folgende Komponenten benötigt:

- 10 µl *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2x)*
- 7 µl Reinst-H₂O
- 1 µl *miScript Universal Primer*, 10x (*antisense*)
- 1 µl *miScript Primer Assay*, 10x (*sense*)
- 1 µl cDNA

Als Referenz für die Untersuchung der mikroRNAs wurde SNORD25, eine kleine nukleoläre RNA ein-

gesetzt, die in einer Vielzahl von Zellen und Geweben regulationsunabhängig exprimiert wird.

Drei-Stufen-Protokoll:

- Denaturierung: 94°C, 15 s
- Anlagerung der *Primer*: 55°C, 30 s
- Elongation: 70°C, 30 s

Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt und jeweils mindestens in Doppelbestimmungen bzw. Dreifachbestimmungen gemessen. Zum Abschluss des Protokolls erfolgte die Analyse der Schmelzkurven.

2.2.5 Gelelektrophorese

Für ein 2 %-iges Gel wurden 2 g Agarose abgewogen, in 1x TAE-Puffer gelöst, auf 100 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle erhitzt, bis keine Trübung mehr zu erkennen war. Nach kurzem Abkühlen erfolgte die Zugabe von ca. 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) und das Einfüllen in einen mit einem Kamm präparierten Schlitten. Nach 15 - 20 min Aushärtung wurde der Kamm aus dem Gel gezogen, so dass die entstanden Taschen zur Befüllung mit den PCR-Produkten genutzt werden konnten. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte im Anschluss in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer bei 110 Volt / 0,1 Ampere für ca. 25 Minuten. Zur Herstellung von 1 l des 1x TAE-Puffers wurden 48,44 g Tris Base (0,4 M) und 3,8 g Na₄EDTA (0,01 M) gemischt und in 800 ml Reinst-Wasser gelöst. Der gewünschte pH-Wert von 8,4 wurde mittels Zugabe von konzentrierter Essigsäure (Eisessig) eingestellt und das Volumen mit Reinst-Wasser auf 1 l vervollständigt. Zu 10 µl DNA-Probe wurden 3 µl des 10x Ladepuffers hinzugeben und das Gemisch in die Tasche des Gels pipettiert. Vom mitgeführten Standard (DNA-Leiter) wurden 5 µl eingesetzt. Die nach Beendigung der Elektrophorese aufgrund der negativen Ladung der DNA zur Katode gewanderten und der Größe nach aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mittels Geldokumentationsgerät (LTF Labortechnik, Wasserburg/B.) und der zugehörigen Analyse-Software BioCapture dokumentiert.

2.3 Proteinbiochemie

Die Untersuchung Pankreas-assoziiierter Gene während des *in vitro* Differenzierungsprozesses erfolgte neben der Analyse auf Transkriptionsebene auch mittels Proteinnachweis im Rahmen von Fluoreszenzanalysen und eines C-Peptid-ELISAs.

2.3.1 Immunfluoreszenzanalyse

Angaben zu den eingesetzten Antikörpern sind im Anhang (Tabelle 8 und 9) einsehbar. Die Verwendung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben oder es wurde bei der Generierung von Verdünnungen die optimale Konzentration mittels Positivkontrollen bestimmt. Zur Verdünnung der primären Antikörper wurde 1x PBS verwendet, für die sekundären Antikörper ein Gemisch aus 1x PBS und spezifischem Serum im Verhältnis 1:1.

Verwendete Materialien:

- Dako Mounting Medium (Dako, Hamburg). Für die Konservierung der inkubierten Präparate.
- Hoechst 33342 (Life Technologies, Darmstadt). Für die Stammlösung (50 µg/ml) wurde 1 mg in 20 ml Reinst-H₂O gelöst. Für die Arbeitslösung (5 µg/ml) folgte die weitere Verdünnung im Verhältnis 1:10.
- PFA (Paraformaldehyd, Sigma-Aldrich, Taufkirchen b. München). Für eine 4 %-ige Lösung wurden 0,4 g in 10 ml 1x PBS auf einem Heiz- und Magnetrührer (80°C) gelöst und danach auf Eis gekühlt. Die Arbeiten erfolgten unter einem Abzug. Die Lösung kann für ca. zwei Tage bei 4°C aufbewahrt werden.
- Pferdeserum (Life Technologies, Darmstadt). 300 µl Pferdeserum wurden zu 10 ml 1x PBS gegeben, um eine Endkonzentration von 3 % zu erreichen.
- Objektträger Starfrost adhäsiv, 76 mm x 26 mm (Heinemann Labortechnik, Duderstadt).
- Triton® X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen b. München). Zur Permeabilisierung der Zellkernmembran.
- Ziegenserum (Life Technologies, Darmstadt). Für eine Endkonzentration von 3 % wurden 300 µl Serum in 10 ml 1x PBS verdünnt.

Herstellung der Präparate:

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die zu untersuchenden Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Im ersten Schritt wurde das Medium aus der Kulturschale abgesaugt und die Zellen zur Fixierung für 20 Minuten mit 4 %-iger PFA-Lösung inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit 1x PBS und ein erneutes Befüllen der Kulturschale mit 1x PBS um ein Austrocknen der Zellen bis zur Färbung zu verhindern. Die Zellen konnten so fixiert für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

Die Präparateherstellung erfolgte in einer Feuchtkammer. Zunächst wurden die bewachsenen Deckgläser zur Blockade unspezifischer Epitope für eine halbe Stunde mit entsprechendem Serum bedeckt. Für die Detektion von nukleären Proteinen wurde dem Serum Triton X (0,01 %) zugegeben, was zur Permeabilisierung der Kernmembran führte. Nach der Entfernung des Serums folgte ein Waschschrte mit 1x PBS und anschließend die Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei 37°C im Wärmeschrank. Danach wurden die Deckgläser drei Mal mit 1x PBS gewaschen und im Anschluss für eine weitere Stunde bei 37°C mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen der Deckgläser in 1x PBS folgte darauf zur Kernfärbung die Inkubation mit Hoechst 33342 für fünf Minuten im Dunkeln bei RT. Es schloss sich ein letzter Waschschrte mit Reinst-Wasser an, um die im PBS enthaltenen Salze zu entfernen, da diese zur Störung der gewünschten spezifischen Signale führen können. Die Deckgläser wurden dann mit der bewachsenen Seite nach unten auf Objektträger mittels Dako Mountain Medium eingebettet. Nach einer Trockenzeit von 24h im Dunkeln wurden die Präparate mit farblosem Nagellack versiegelt. Die langfristige Lagerung der fertigen Präparate erfolgte lichtgeschützt bei RT.

Mikroskopische Untersuchung:

Die Analyse der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Biozero BZ-8100E, Keyence, Neu-Isenburg) und der angeschlossenen *Software* BZ-Analyser. Einige der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper waren mit den Fluochromen Alexa 488 bzw. FITC gekoppelt. Bei Bestrahlung mit Licht im Wellenlängenbereich um 488 nm wurde grünes Licht von ca. 510 nm emittiert. Das ebenfalls verwendete Fluochrom CyTM5 emittierte hingegen rotes Licht von ca. 670 nm nach einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von ca. 650 nm.

2.3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine hochsensitive und schnelle Methode zur Auftrennung und Analyse von Einzelzellen in Suspension dar. Die Trennung erfolgt hierbei auf Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Fluorochrome (Alexa488, GFP) emittierten nach Anregung grünes Licht mit einer Wellenlänge von ca. 510 nm. Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden unter Anleitung von Frau Dr. Dagmar Riemann im Institut für Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Gerät FACS CaliburTM (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt. Die Messungen dienten zur Überprüfung der Transfektionseffizienz. Im Rahmen der Modifikation des etablierten Differenzierungsprotokolls wurden generierte pankreatische Vorläuferzellen mit einer Fluoreszenz-markierten (Alexa488) Negativ-siRNA transfiziert. Das Transfektionsprotokoll entsprach dem unter Abschnitt 2.1.5.1 beschriebenen. Die Struktur der Negativ-siRNA entspricht dem der übrigen eingesetzten mikroRNA-Molekülen, wodurch eine Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse aus den Messungen auf die Experimente zur Modulation der miR-375 möglich war. Für die Analyse wurde zuerst das Medium aus den Kulturschalen abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend für ca. 15 bis 20 Minuten in einer 4 %-igen PFA-Lösung fixiert. Daran schloss sich ein erneuter Waschschrift an. Zu den Zellen wurden anschließend 300 µl FACS-Puffer pipettiert. Es folgte die Ablösung vom Boden der Kulturschale mit Hilfe eines Zellschabers bzw. durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mittels Eppendorf-Pipette, die Überführung in ein Rundbodenröhrchen (BD Biosciences Europe, Heidelberg) und die Analyse mittels Durchflusszytometer. Zur Überprüfung der Effizienz der in Kapitel 2.1.5.5 beschriebenen Transfektion von TALE-Vektoren zur Induktion der mikroRNA-375 wurden die Zellen nicht fixiert. Nach dem Absaugen des Kulturmediums und einem Waschschrift mit 1x PBS wurde 300 µl FACS-Puffer in die Kulturschale gegeben, die Zellen vorsichtig mittels Zellschaber vom Boden gelöst und für die Analyse in ein Rundbodenröhrchen überführt.

2.3.3 C-Peptid-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

- *Human C-Peptide* ELISA (Merck Millipore, Schwalbach)
- Kleinschüttler MS 3 digital (IKA®, Staufen)
- Multi-Detektions-Reader SYNERGY Mx (BioTek, Bad Friedrichshall) mit entsprechendem Auswertungsprogramm Gen5

Die Insulinproduktion der differenzierten endokrinen Vorläuferzellen wurde mit Hilfe eines C-Peptid-ELISAs analysiert. Für die Messung wurde Mediumüberstand eingesetzt. Da die für den *in vitro* Differenzierungsprozess benötigten Medien in geringen Mengen auch Insulin enthielten, welches von Zellen aufgenommen werden kann (Rajagopal *et al.* 2003; Hansson *et al.* 2004), wurde für eine spezifische Analyse in der vorliegenden Arbeit das bei der endogenen Insulinproduktion gebildete und ins Medium sezernierte C-Peptid (*Connecting Peptide*) detektiert.

Die Abkürzung ELISA bedeutet „*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*“ und beschreibt ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren. Das eingesetzte Kit funktionierte nach dem sogenannten „*Sandwich-ELISA*“-Prinzip, wofür zwei Antikörper benötigt werden, die beide an verschiedene Epitope des nachzuweisenden Proteins binden. Der erste Antikörper war an der im Kit enthaltenen 96-Well-Mikrotiterplatte fest gebunden. Bei Zugabe der Proben erfolgte während einer Inkubationszeit die spezifische Bindung. Es schlossen sich Waschschrte zur Entfernung aller ungebundenen Bestandteile an und anschließend folgte die Zugabe des zweiten Antikörpers, an den ein Reporterenzym gekoppelt war. Es entstand damit die namensgebende Antikörper-Antigen-Antikörper-Struktur. Nach erneuten Waschschrten zur Entfernung überschüssiger Antikörper erfolgte die Detektion und Quantifizierung durch Zugabe eines chromogenen Substrats, welches vom vorhandenen Enzym zu einem detektierbaren Reaktionsprodukt umgewandelt wurde. Zur Quantifizierung wurden Standards mit bekannter Proteinkonzentration mitgeführt.

2.4 Statistische Analysen

Für die statistische Analyse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit experimentell ermittelten Messergebnisse erfolgte zuerst eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung. Hierzu wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet, da er sich besonders bei der Überprüfung von eher kleinen Stichprobenmengen (< 50) durch eine sehr hohe Teststärke auszeichnet. Bei vorliegender Normalverteilung schloss sich zur Signifikanzanalyse die Durchführung eines T-Tests (Differenzentest) an. Da bei einigen Messungen keine Normalverteilung angenommen werden konnte, erfolgte hier als Alternative zum T-Test die Signifikanzprüfung mit Hilfe des verteilungsfreien Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Die ermittelten Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet: Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 5\%$ als $*p \leq 0,05$, bei $p \leq 1\%$ als $**p \leq 0,01$ und bei $p \leq 0,1\%$ als $***p \leq 0,001$. Die Ergebnisse aller ausgewerteten Experimente ergaben sich aus je mindestens drei unabhängigen Wiederholungen. In den erstellten Diagrammen wurden jeweils die errechneten Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung abgebildet ($MW \pm SD$) und die Angabe N kennzeichnet die Zahl der unabhängigen Versuchswiederholungen.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse des Stammzellcharakters humaner pluripotenter Stammzellen – Vergleich zwischen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Die vergleichende Überprüfung des Stammzellstatus aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten pluripotenten Zelllinien erfolgte durch die Analyse von Zellmorphologie, Expression und Translation Pluripotenz-assoziiierter Gene sowie mittels Nachweis von alkalischer Phosphatase-Aktivität.

Morphologie:

Humane pluripotente Stammzellen lassen sich sehr gut anhand ihrer typischen Morphologie charakterisieren. Die Zellen wachsen in kompakten Kolonien, die sich im Fall der beiden verwendeten hESZ-Linien deutlich von der darunter liegenden Schicht aus *Feeder*-Zellen abgrenzen. Neben der geringen Größe der einzelnen Zellen ist auch das hohe Kern-zu-Zytoplasma-Verhältnis auffällig.

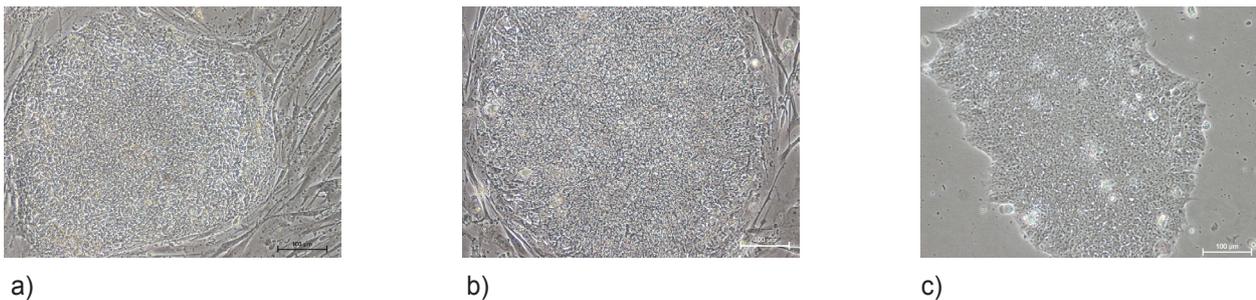


Abb. 14: Kolonien der humanen embryonalen Stammzelllinien H9 (a) und HUES-8 (b), die auf einer Schicht muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) als *Feeder*-Zellen kultiviert wurden sowie der induzierten pluripotenten Stammzelllinie IMR90-4 (c), deren Kultur auf Matrigel-beschichteten Kulturschalen erfolgte. Maßstab: 100 µm.

Transkription Pluripotenz-assoziiierter Gene:

Wie bereits in den Kapiteln 1.4.2 und 2.1.3 beschrieben, ist ein Netzwerk aus zahlreichen Transkriptionsfaktoren und mikroRNAs durch gegenseitige und autoregulatorische Aktivierungsschleifen sowie damit verbundener Repression von differenzierungsrelevanten Genen an der Aufrechterhaltung von Pluripotenz und uneingeschränkter Teilungskompetenz der Stammzellen beteiligt. In den drei kultivierten Zelllinien wurde die Aktivität von insgesamt sechs bedeutenden Pluripotenz-assoziierten Genen mittels RT-PCR analysiert und per Gelelektrophorese erfolgreich detektiert.

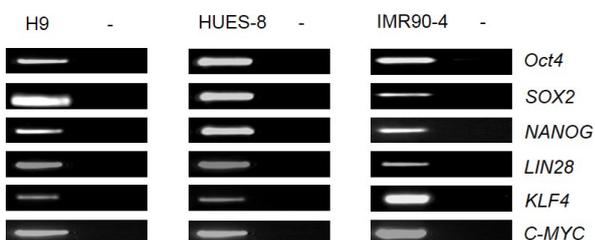
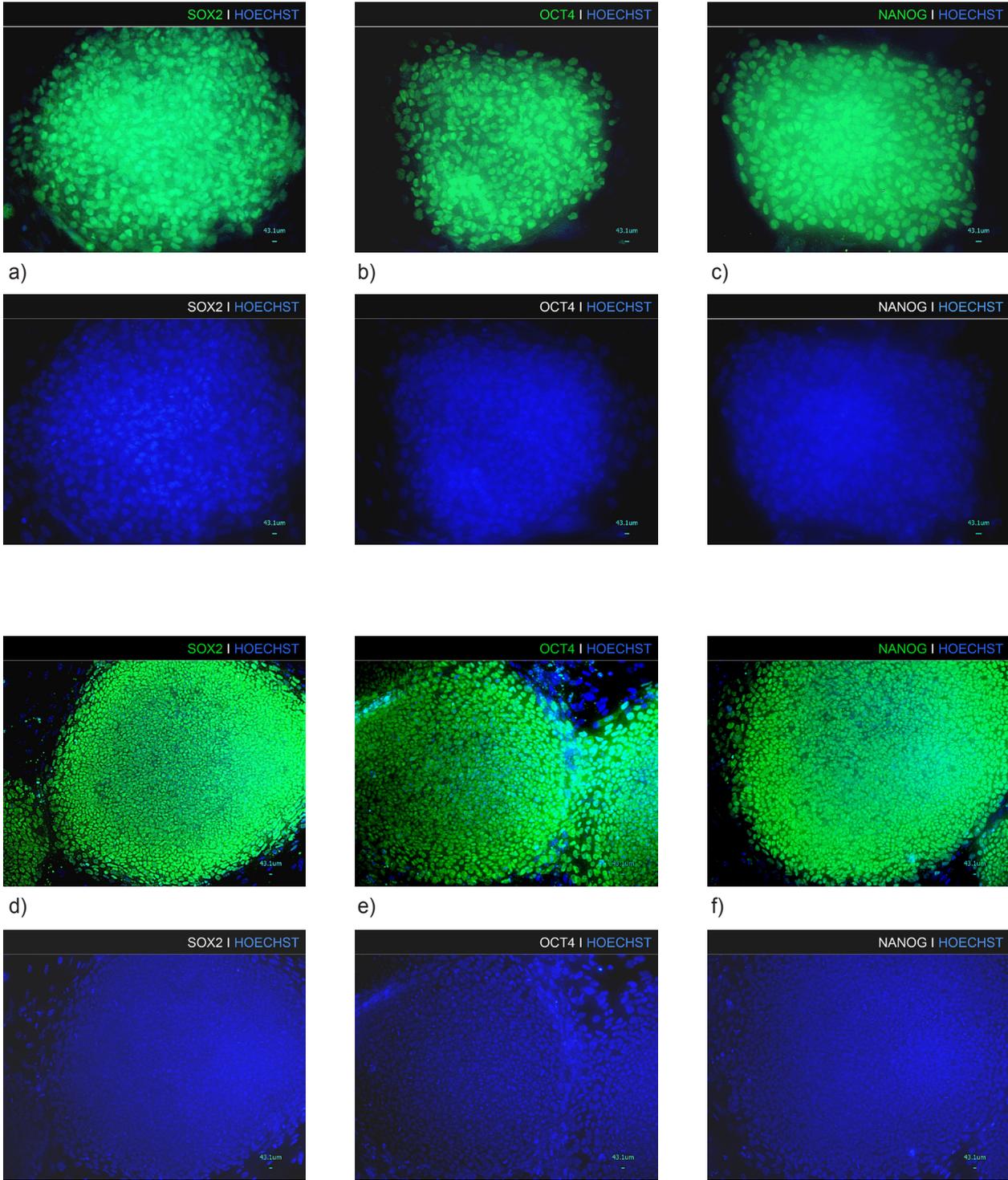


Abb. 15: Gelelektrophoresebild zum Nachweis der Aktivität Pluripotenz-assoziiierter Gene in den hESZ-Linien H9 und HUES-8 sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4. (-) = Negativkontrolle (Reinst-Wasser).

Analyse Pluripotenz-assoziiierter Genprodukte:

Die Funktionalität Pluripotenz-erhaltender Markergene wurde mittels Proteinnachweis im Rahmen von Immunfluoreszenzanalysen überprüft. Insgesamt erfolgte die Detektion der drei Kern-Pluripotenzfaktoren OCT4, SOX2 und NANOG sowie des für hESZ / hiPSZ spezifischen Oberflächenantigens SSEA-4.



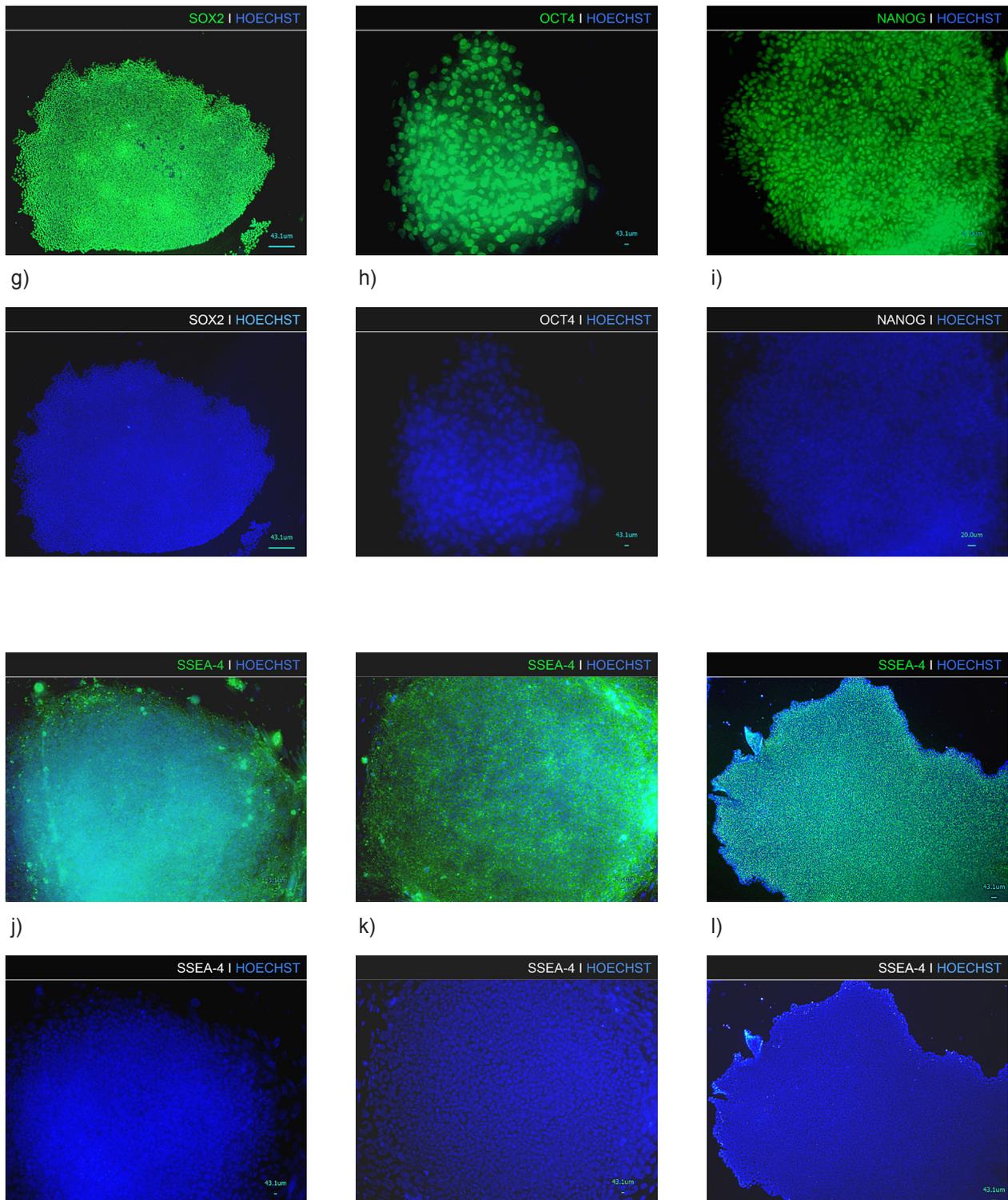


Abb. 16 (S. 65 - 66): Proteinnachweis der Pluripotenz-assoziierten Marker **SOX2**, **OCT4**, **NANOG** und **SSEA-4** in den hESZ-Linien H9 (a-c, j) und HUES-8 (d-f, k) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (g-i, l). Jeweils paarweise sind die Detektionen des entsprechenden Proteins durch ein grünes Fluoreszenzsignal (alexa488) und die blaue Kernfärbung mittels Hoechst untereinander dargestellt. Aufgrund der Kernlokalisierung der Transkriptionsfaktoren SOX2, OCT4 und NANOG kommt es hier zur Überlagerung der Kernfärbung. Maßstab: a - h, j - l = 43,1 µm; i = 20 µm.

Alkalische Phosphatase-Aktivität:

Die starke Aktivität dieses Enzyms ist ein typisches Merkmal pluripotenter Stammzellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der Aktivität mit Hilfe eines Detektions-Kits in den kultivierten Zelllinien H9, HUES-8 und IMR90-4.

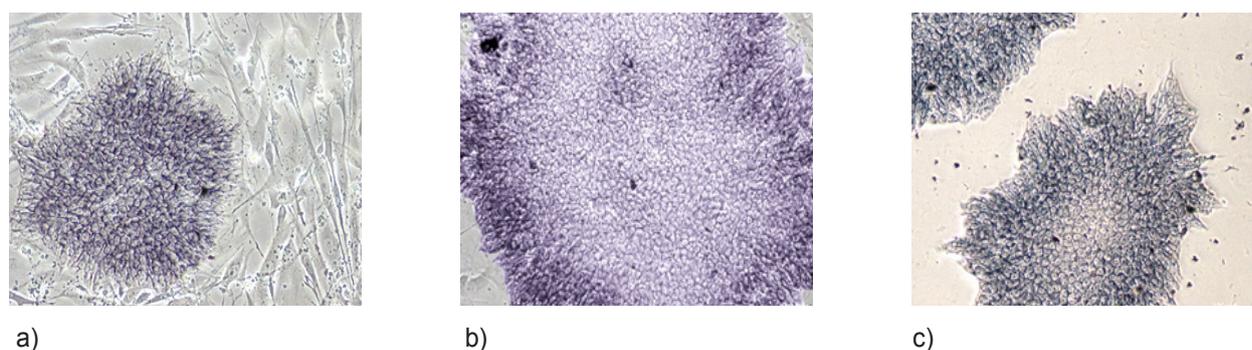


Abb. 17: Der erfolgreiche Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase konnte durch die starke violette Färbung der Stammzellen der Linien H9 (a), HUES-8 (b) und IMR90-4 (c) verdeutlicht werden. Die Feeder-Zellen, auf denen die hESZ der Linien H9 und HUES-8 kultiviert wurden, erschienen aufgrund ihres differenzierten Zustandes nicht gefärbt. Maßstab: 100 µm.

3.2 Pankreatische *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen - Vergleich zwischen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Alle durchgeführten Versuche zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung umfassten maximal 18 Tage. Während des Differenzierungsverlaufs konnte ein kontinuierliches Absterben einzelner Zellen beobachtet werden, was zwar zur Reduktion des Probenmaterials führte, aber auch zur Selektion von Zellen beitrug, die sich aufgrund der forcierenden Wachstumsfaktoren im Differenzierungsmedium gezielt in die pankreatische Linie entwickelten. Unter den in Kapitel 2.1.2 bzw. 2.1.5 beschriebenen Kulturbedingungen und unter Anwendung eines modifizierten Differenzierungsprotokolls nach D`Amour *et al.* (2006) war eine Differenzierung der humanen pluripotenten Stammzellen in Insulin-produzierende Zellen möglich. Dieses optimierte und auf alle drei verwendeten pluripotenten Stammzelllinien abgestimmte Protokoll erlaubte die reproduzierbare Generierung der endokrinen Vorläuferzellen und bildete damit die Basis aller experimentell durchgeführten Modifizierungen. In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Ergebnisse zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung unter Einsatz des Basisprotokolls beschrieben, gefolgt von den Resultaten zur gezielten Modulation des Protokolls durch Transfektion der mikroRNA-375 und einer zeitlich begrenzten Erhöhung der Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium, welche eine Steigerung der Differenzierungseffizienz zum Ziel hatten. Anschließend werden die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der mikroRNA-375 im Verlauf der Entstehung endokriner Vorläuferzellen präsentiert, welche die experimentelle Inhibierung bzw. Induktion der mikroRNA umfassten. Bei den vergleichend dargestellten Ergebnissen zwischen den hESZ-Linien und der hiPSZ-Linie IMR90-4 entstammten die Daten der hiPSZ aus kooperativ geplanten und durchgeführten Experimenten im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Herrn Konrad Knittel (Knittel, 2016). Die

Etablierung des Differenzierungsprotokolls bis zum Zeitpunkt der Entstehung endokriner Vorläuferzellen (Tag 12) erfolgte zunächst an der bereits innerhalb der Arbeitsgruppe kultivierten hESZ-Linie H9. Aufgrund der beobachteten geringeren Effizienz dieser Linie zur Differenzierung in die pankreatische Richtung im Vergleich zu den im Verlauf der vorliegenden Dissertation zusätzlich erworbenen hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4, wurden die Analysen zur Expression Pankreas-assoziiierter Gene und mikroRNAs bzw. zur Modulation von mikroRNA-375 nur bis zum 12. Differenzierungstag durchgeführt. Alle weiterführenden Experimente zur miR-375 Induktion, Glukosemodulation und Kombination beider Varianten bis zum 18. Tag der Differenzierung erfolgten vergleichend zwischen den Linien HUES-8 und IMR90-4.

3.2.1 Analyse Pankreas-assoziiierter Markergene auf mRNA- und Proteinebene

Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse aus der Beobachtung des Morphologiewandels der Zellen im Verlauf der *in vitro* Differenzierung gezeigt. Es schließt sich die Präsentation von ermittelten Daten zur Expressionsanalyse von Genen und mikroRNAs an, welche mit der pankreatischen *in vitro* Differenzierung assoziiert sind sowie von Ergebnissen der Immunfluoreszenzanalysen.

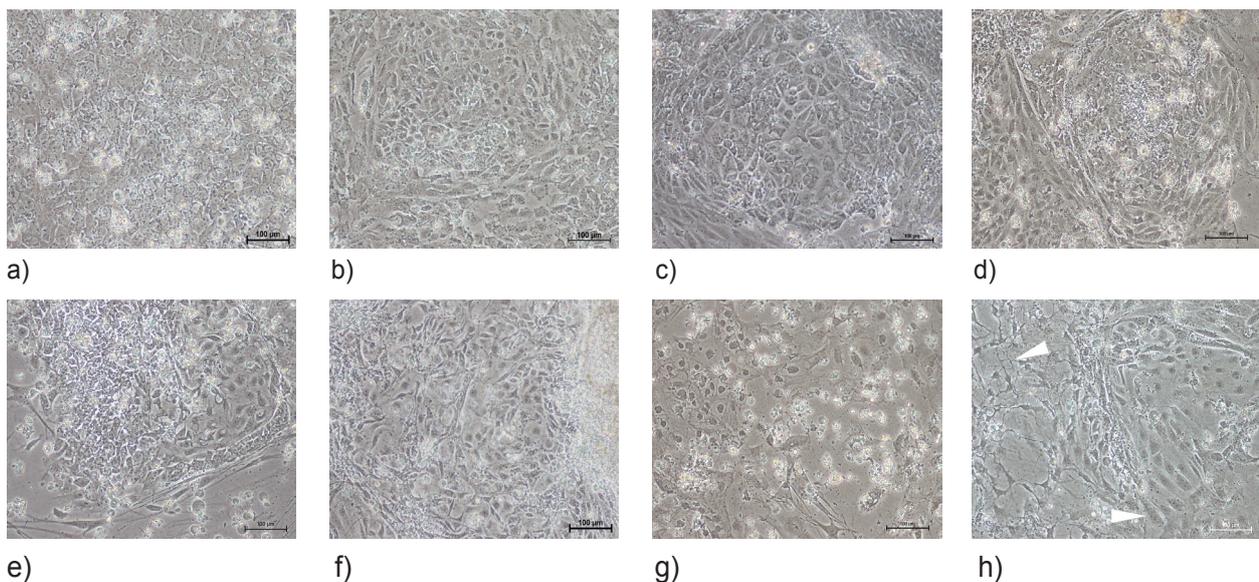


Abb. 18: Morphologieveränderung der hESZ-Linie H9 während des Differenzierungsverlaufs. Die obere Bildreihe zeigt Zellen, die gezielt in die pankreatische Richtung differenziert wurden, während in der unteren Reihe Zellen der spontan differenzierten Kontrollgruppe abgebildet sind. Gerichtet differenzierte Zellen wiesen am dritten Tag (a) eine deutliche Vergrößerung mit höherem Zytoplasmagehalt im Vergleich zur Stammzellmorphologie auf. Die dichte Koloniestruktur war nicht mehr sichtbar, sondern die Zellen wuchsen nun als flächiger *Monolayer*. Im weiteren Entwicklungsverlauf von Tag sechs (b) über Tag neun (c) bis zum zwölften Tag (d) kam es zur Ausbildung von abgegrenzten inselförmigen Zellaggregaten mit deutlich epithelialer Morphologie. Im Vergleich dazu erschienen die Zellen der spontan differenzierten Kontrollgruppe als sehr heterogene Gruppe. Es kam im Differenzierungsprozess (e-h) nicht zur forcierten Bildung eines spezifischen Zelltyps, sondern unterschiedlicher Progenitorstrukturen wie fibroblastenartige und neuronale Vorläuferzellen (mit Pfeil markiert). Maßstab: 100 µm.

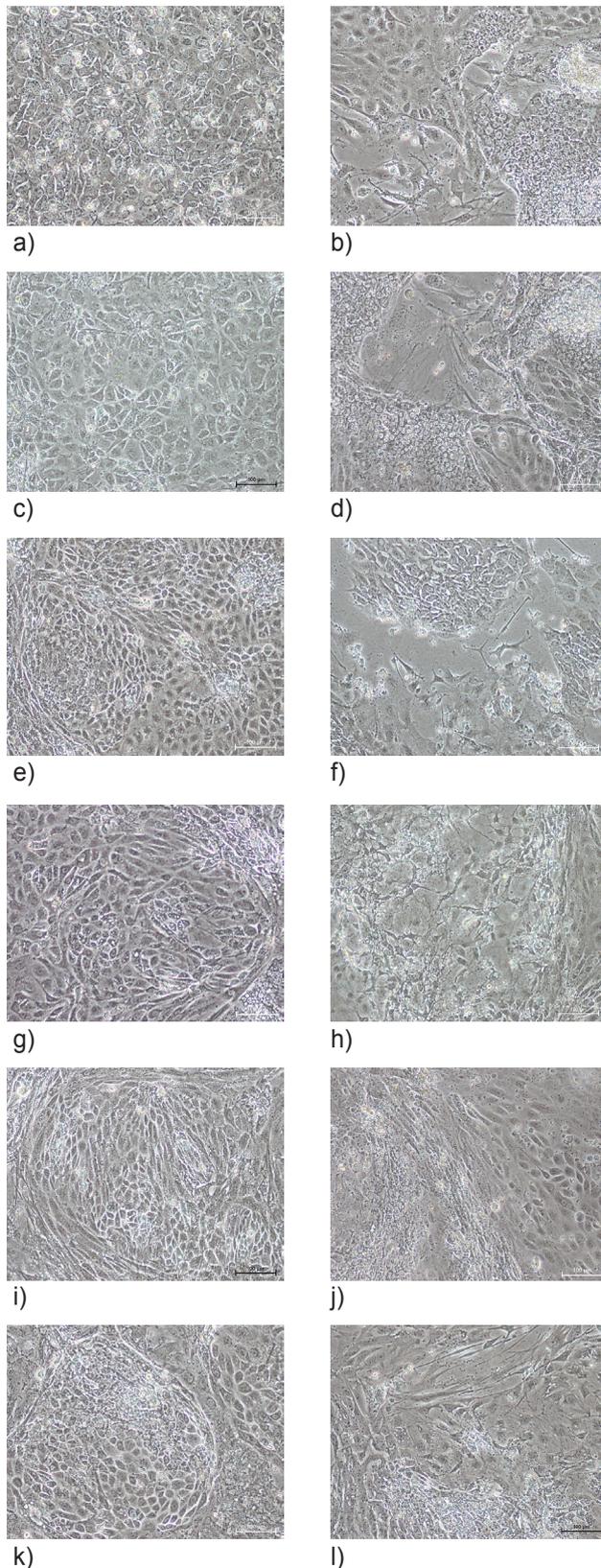


Abb. 19: Morphologieveränderung der hESZ-Linie HUES-8 während des Differenzierungsverlaufs. Die linke Bildreihe zeigt die gerichtet differenzierten Zellen, während die rechten Bilder spontan differenzierte Zellen beinhalten. Der Differenzierungsverlauf umfasste insgesamt 18 Tage, wobei eine Morphologiedokumentation aller drei Tage entsprechend den Probenentnahmen zur Expressionsanalyse von Genen und mikroRNAs dargestellt ist (3d = a, b; 6d = c, d; 9d = e, f; 12d = g, h; 15d = i, j; 18d = k, l). In der Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen kam es zunächst zur Auflösung der Stammzellkolonie-Struktur, verbunden mit einem flächigen Wachstum mit epithelialer Morphologie. Es folgte die Ausbildung kompakter Zellaggregate, die zum Ende der Differenzierung als *islet-like* Cluster bezeichnet werden konnten. Die Zellen der spontan differenzierten Kontrollgruppe wiesen ein heterogenes Bild diverser ausgebildeter Vorläuferzellen auf, die z.B. neuronal und Fibroblasten-assoziiert erscheinen, wobei aber kein forciertes Auftreten eines bestimmter Zelltyps erkennbar war. Maßstab: 100 μm .

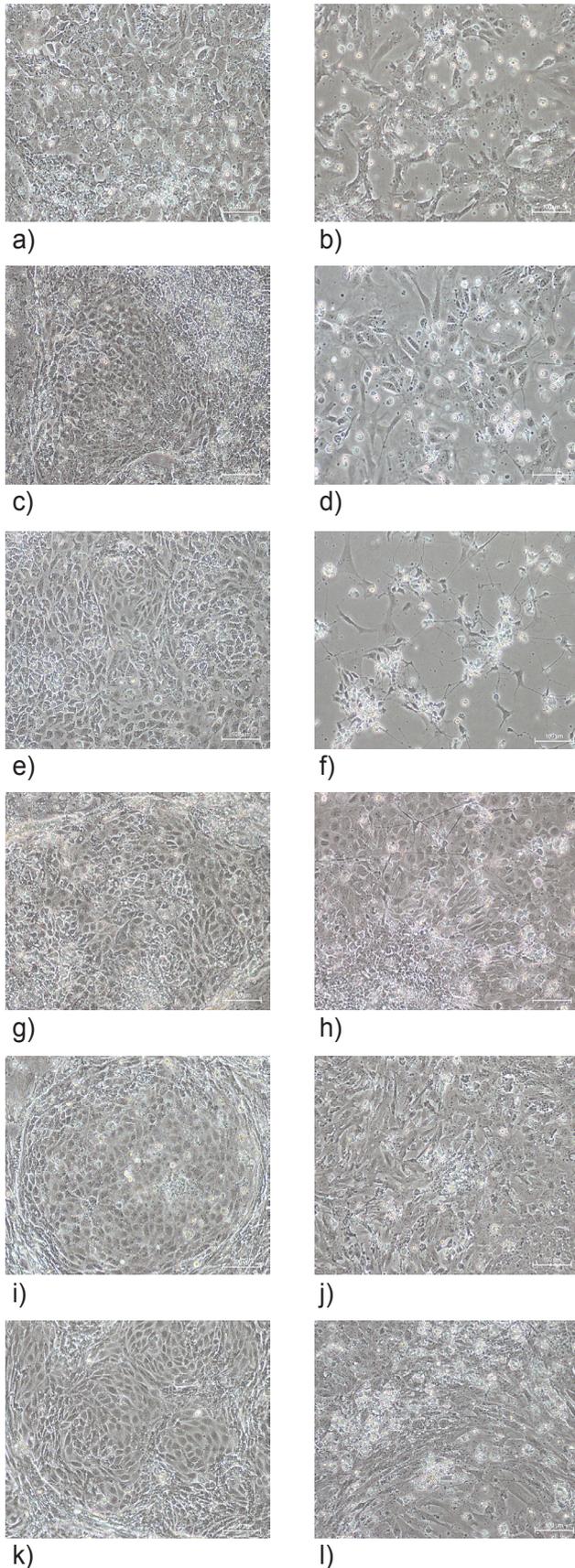


Abb. 20: Morphologieveränderung der hiPSZ-Linie IMR90-4 während des Differenzierungsverlaufs. Die linke Bildreihe zeigt wiederum gerichtet differenzierte und die rechte Reihe spontan differenzierte Zellen. Der Differenzierungsverlauf umfasste wie bei den Versuchen unter Nutzung der hESZ-Linie HUES-8 insgesamt 18 Tage, wobei übereinstimmend zu den hESZ ebenfalls eine Morphologiedokumentation aller drei Tage abgebildet ist (3d = a, b; 6d = c, d; 9d = e, f; 12d = g, h; 15d = i, j; 18d = k, l). In der gerichtet differenzierten Gruppe löste sich die kompakte Koloniemorphologie der pluripotenten Stammzellen zügig auf, so dass schon am dritten Tag der Differenzierung ein flächiges Wachstum der Zellen als *Monolayer* zu erkennen war. Es kam mit fortschreitender Entwicklung wie bei den hESZ-Linien zur Ausbildung kompakter Zellaggregate mit epithelialer Morphologie, die als *islet-like* Cluster bezeichnet werden. Die Zellen der spontan differenzierten Kontrollgruppe präsentierten sich als sehr heterogenes Gemisch verschiedener differenzierter Vorläuferzellen, wie z.B. fibroblastenartige und neuronal-assoziierte Progenitorzellen. Maßstab: 100 μm .

Der beobachtete Wandel der Zellmorphologie, welcher zwischen den drei verwendeten Zelllinien große Übereinstimmungen zeigte, ließ auf die erfolgreiche schrittweise Generierung entodermaler Zellen und daraus folgend endokriner pankreatischer Vorläuferzellen schließen. Die Ausbildung von inselförmigen Zell-Clustern mit epitheliale Charakter zum Ende des *in vitro* Differenzierungsprozesses verdeutlichte die Festlegung auf ein pankreatisches Zellschicksal.

Die große Ähnlichkeit der Ergebnisse zwischen den beiden hESZ-Linien und der hiPSZ-Linie bestätigte die überzeugende Vergleichbarkeit des Differenzierungsprozesses unter Anwendung des im Rahmen der vorliegenden Arbeit modifizierten und etablierten Differenzierungsprotokolls zur reproduzierbaren, parallelen pankreatischen *in vitro* Differenzierung aller drei Zelllinien.

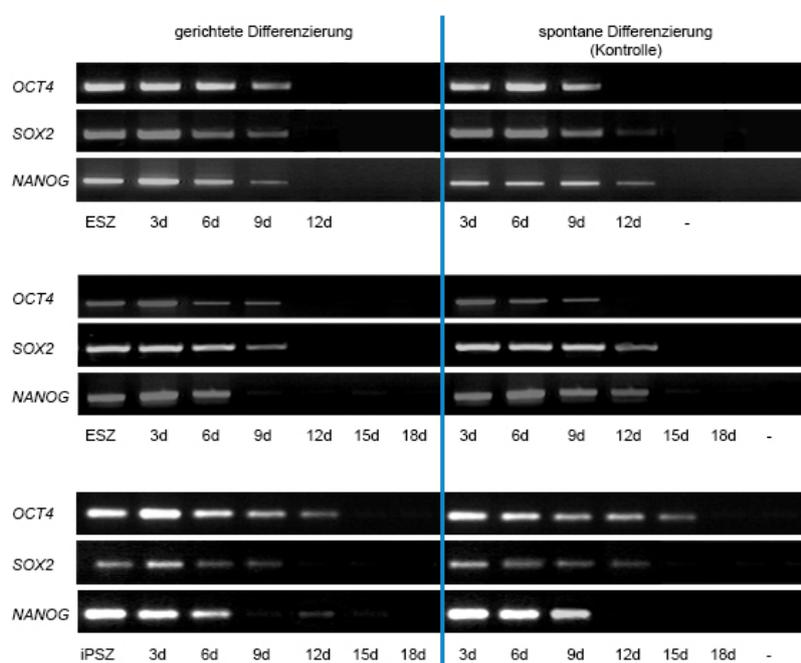


Abb. 21: Vergleichende Darstellung der Expression der Pluripotenz-assoziierten Gene **OCT4**, **SOX2** und **NANOG** während der pankreatischen *in vitro* Differenzierung humaner ESZ (Linien H9 und HUES-8) und der humanen iPSZ-Linie IMR90-4. Gegenübergestellt ist jeweils der Expressionsverlauf in den Zellen, die gerichtet in endokrine pankreatische Vorläuferzellen differenziert wurden und in den entsprechenden spontan differenzierenden Zellen der Kontrollgruppe. (-) = Negativkontrolle (Reinst-Wasser), d = Tag.

Im Zuge der fortschreitenden Differenzierung pluripotenter Stammzellen kommt es zur sukzessiven Repression von Pluripotenz-assoziierten Genen, deren Aktivität zum Erhalt des Stammzellstatus beitragen. Die Abbildung 21 zeigt die erfolgreiche Herabregulierung der Kern-Pluripotenzgene **OCT4**, **SOX2** und **NANOG** übereinstimmend in allen drei verwendeten pluripotenten Stammzelllinien, was als Voraussetzung für eine effektive Differenzierung gilt.

Im Gegensatz zur Repression der Pluripotenz-assoziierten Gene, ist die schrittweise pankreatische Differenzierung durch die sequenzielle Aktivierung einer Vielzahl von Genen geprägt, die meist als TKF wirken und zum Teil in gegenseitigen Aktivierungsschleifen letztlich zur definitiven Festlegung auf pankreatische hormonproduzierende Zellen führen. Die folgende Abbildung stellt die Ergebnisse aus RT-PCR Analysen der drei eingesetzten pluripotenten Zelllinien zum Expressionsverlauf wichtiger Markergene dar, die mit der pankreatischen *in vitro* Differenzierung in Verbindung gebracht werden.

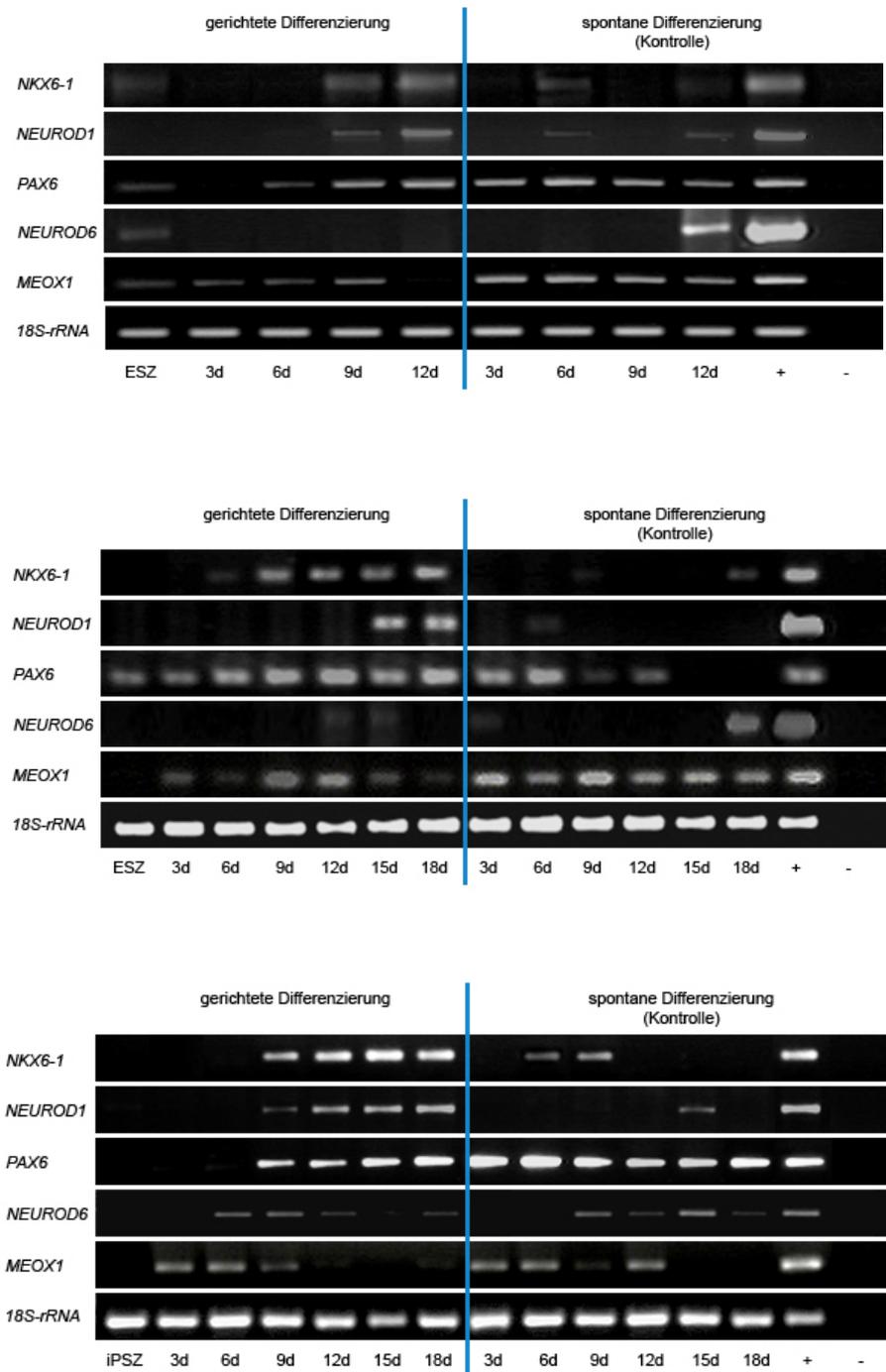


Abb. 22: Vergleichende Darstellung des Expressionsverlaufs von Genen, die mit der pankreatischen *in vitro* Differenzierung assoziiert sind. Abgebildet sind die gewonnenen Ergebnisse aus Experimenten unter Nutzung der hESZ-Linien H9 (wie im Text beschrieben nur bis Tag zwölf analysiert) und HUES-8 sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4. Die markierten Tage entsprechen den Zeitpunkten der Probenahme während des Differenzierungsprozesses. Als *housekeeping*-Gen wurde die Expression von *18S-rRNA* detektiert. Zur Positivkontrolle (+) wurde cDNA von humanem Pankreasgewebe bzw. einer Lungenkarzinomzelllinie genutzt und als Negativkontrolle (-) diente Reinst-Wasser. d = Tag.

Die vereinzelt auftretende schwache Expression einiger differenzierungsrelevanter Gene in den Proben der hESZ bzw. hiPSZ ist vereinbar mit der Tatsache, dass pluripotente Zellen durch eine allgemein starke transkriptionale Aktivität gekennzeichnet sind. Immunfluoreszenzanalysen konnten allerdings belegen, dass keine Translation erfolgte.

Die Ausbildung pankreatischer und speziell endokriner Vorläuferzellen ist mit der Aktivierung typischer Markergene wie z.B. *NKX6-1* und *NEUROD1* verknüpft. Übereinstimmend kann aus der Abbildung 22 entnommen werden, dass es mit fortschreitender gerichteter *in vitro* Differenzierung der hESZ und hiPSZ zur verstärkten Expression dieser Gene kam. In Proben aller analysierter Zelllinien konnte ab dem 9. Tag im Differenzierungsverlauf eine deutliche Aktivierung von *NKX6-1* beobachtet werden, die bis zum Ende des Entwicklungsprozesses erhalten blieb. Eine detektierbare Expression von *NEUROD1* erschien in den hiPSZ und den hESZ der Linie H9 ebenfalls ab dem 9. Tag, in den Zellen der hESZ-Linie HUES-8 etwas verzögert ab dem 15. Differenzierungstag. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Zellen der spontan differenzierten Kontrollgruppe keine deutliche Expression dieser Gene bzw. war sie lediglich zu Beginn des Differenzierungsvorgangs detektierbar. Das weist auf eine nicht selektive Differenzierung dieser Zellen hin. Es kam nicht zum schrittweisen Durchtritt der Entwicklungsstufen, die zur Bildung pankreatischer Progenitorzellen führen, sondern zur Ausbildung eines heterogenen Gemisches an Vorläuferzellen, wie es bereits anhand der Morphologiebilder aus den Abbildungen 18, 19 und 20 sichtbar war. Zusätzlich wurde die Expression von *PAX6* als ein pankreatisch- und neuronal-assoziiertes Gen untersucht. Übereinstimmend konnte in der Gruppe der gerichteten Differenzierung aller analysierten Zelllinien eine Steigerung der *PAX6*-Expression mit fortschreitender Entwicklung beobachtet werden, was gemeinsam mit dem detektierten Expressionsmuster der Marker *NKX6-1* und *NEUROD1* einen deutlichen Hinweis auf die protokollgetreue etappenweise Generierung pankreatischer Vorläufer aus pluripotenten Zellen über den Zwischenschritt der entodermalen Spezialisierung darstellte. Ergänzend zu den in Abbildung 18, 19 und 20 sichtbaren neuronal-assoziierten Progenitorzellen innerhalb der spontan differenzierten Kontrollgruppe zeigte sich bei der Analyse des Gens *PAX6* eine anhaltend stabile Expression in den Linien H9 und IMR90-4 sowie eine leichte Reduktion der Aktivität im Differenzierungsverlauf in Zellen der Linie HUES-8. Da die Effizienz der gerichteten pankreatischen Differenzierung auch gemessen wird an Art und Umfang der Entwicklung von Zellen in Derivate anderer Keimblätter, diente die Untersuchung des neuronal-assoziierten Gens *NEUROD6* und des mesodermal-assoziierten Markergens *MEOX1* der Überprüfung von Effektivität und Selektivität des angewandten *in vitro* Differenzierungsprotokolls. Die Analyse zeigte, dass in den gerichtet differenzierten Zellen aller drei Linien insgesamt eine geringere Expression der beiden Gene vorlag, während in der spontan differenzierten Kontrollgruppe eine deutliche Expression von *NEUROD6* vor allem zum Ende des Entwicklungsprozesses detektierbar war.

Da ausschließlich Zellen des definitiven Entoderms als Ursprung pankreatischer Strukturen dienen, ist eine selektivere Föderung speziell entodermaler Vorläuferzellen wünschenswert. Die potentielle Entwicklung von Anreicherungsschritten z.B. im Rahmen einer Selektion der Zellen unter Nutzung entodermal-assoziierten Oberflächenmarker wie CXCR4 könnte eine Möglichkeit zur Optimierung des Differenzierungsvorganges an dieser ersten entscheidenden Entwicklungsetappe darstellen. Festzuhalten ist, dass mit dem etablierten Protokoll zur parallelen *in vitro* Differenzierung von hESZ und hiPSZ eine erfolgreiche und reproduzierbare Induktion bedeutender Pankreas-assoziiierter Marker in allen verwen-

deten Zelllinien gelang, was die Grundlage aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zur Modulation des Differenzierungsprotokolls für die Untersuchung einer potenziellen Effizienzsteigerung bildete. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Expressionsanalysen der bedeutendsten Pankreas-assoziierten Gene vorgestellt, deren Aktivität die einzelnen Etappen der pankreatischen Entwicklung definieren.

Zur Analyse der Gene *SOX17*, *FOXA2*, *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* wurde dafür die Methode der quantitativen *Real-Time* PCR genutzt. Aus den Ergebnissen ließ sich die schrittweise Entwicklung ausgehend von pluripotenten Stammzellen bis zu Insulin-exprimierenden endokrinen pankreatischen Zellen verfolgen. Wie bereits im Abschnitt 3.2 erläutert, erfolgte die Differenzierung der hESZ-Linie H9 nur über zwölf Tage, wodurch eine Quantifizierung der Expression von *INSULIN* entfiel.

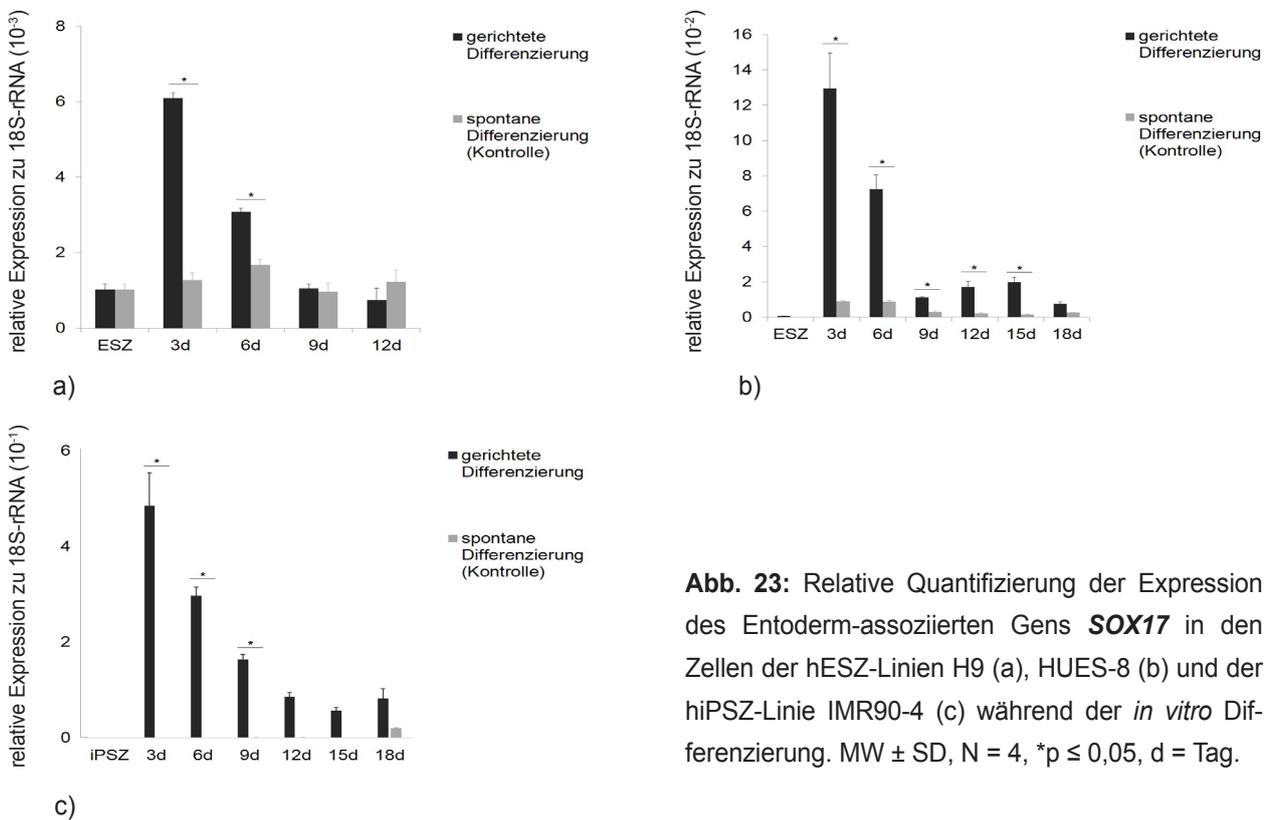


Abb. 23: Relative Quantifizierung der Expression des Entoderm-assoziierten Gens *SOX17* in den Zellen der hESZ-Linien H9 (a), HUES-8 (b) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der *in vitro* Differenzierung. MW ± SD, N = 4, *p ≤ 0,05, d = Tag.

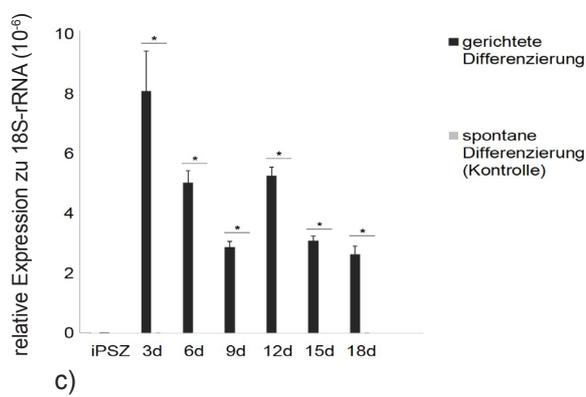
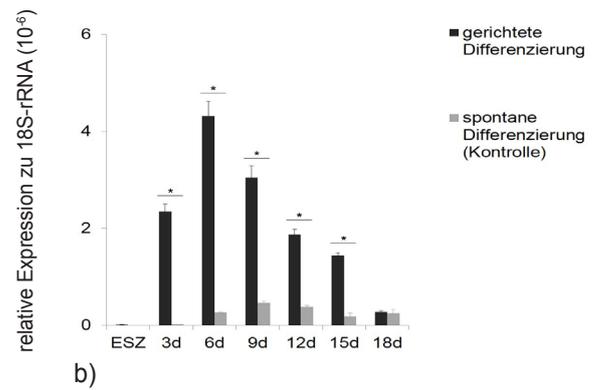
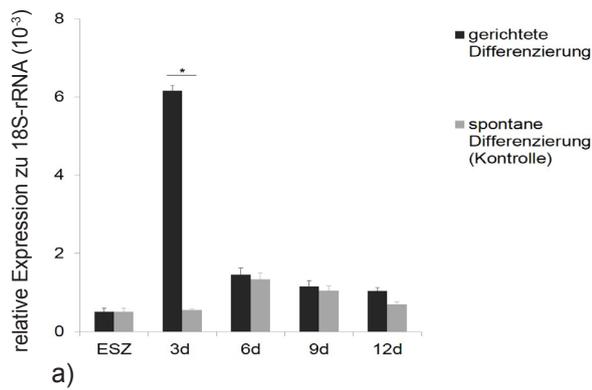


Abb. 24: Relative Quantifizierung der Expression des Entoderm-assoziierten Gens **FOXA2** in den Zellen der hESZ-Linien H9 (a), HUES-8 (b) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der *in vitro* Differenzierung. MW \pm SD, N = 3 (H9) / 4 (HUES + IMR90-4), * $p \leq 0,05$, d = Tag.

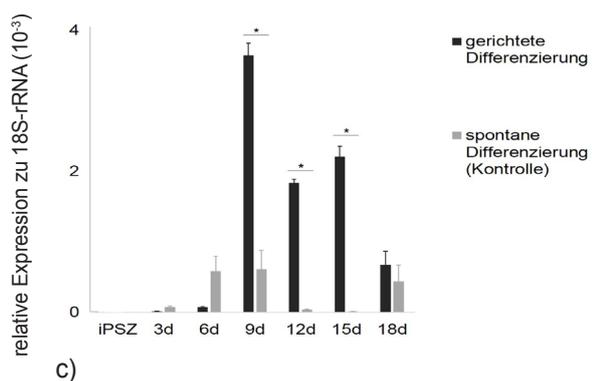
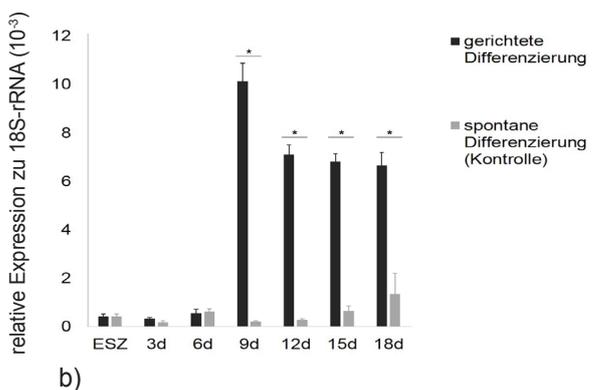
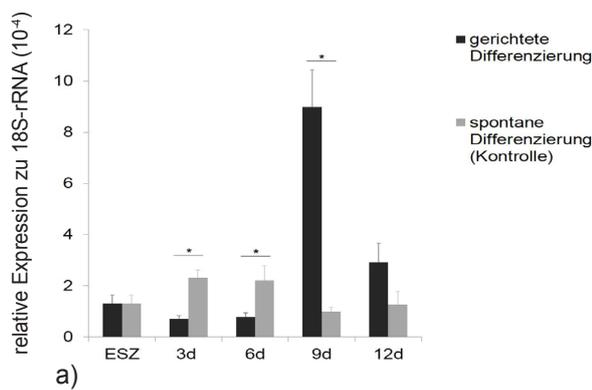


Abb. 25: Relative Quantifizierung der Expression von **PDX1** als essentiellm Marker pankreatischer Vorläuferzellen in den hESZ-Linien H9 (a), HUES-8 (b) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der *in vitro* Differenzierung. MW \pm SD, N = 3 (H9) / 4 (HUES) / 7 (IMR90-4), * $p \leq 0,05$, d = Tag.

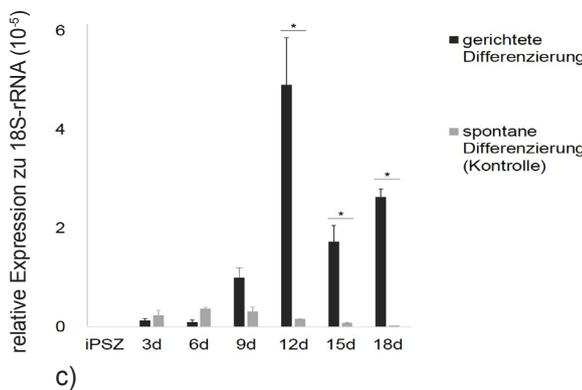
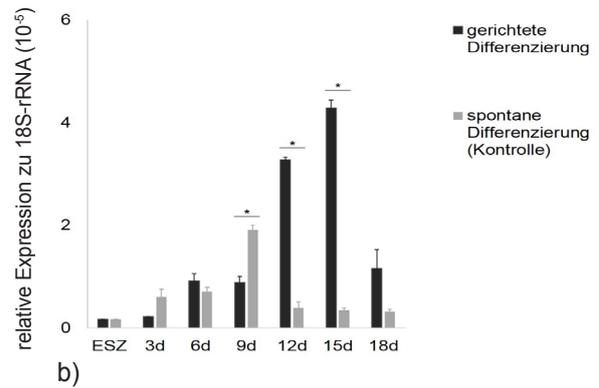
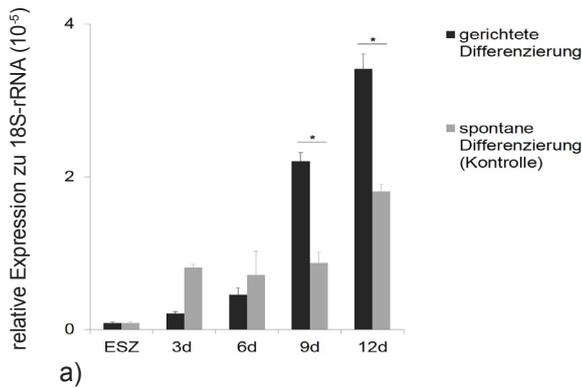


Abb. 26: Relative Quantifizierung der Expression des Gens **NGN3**, einem Marker für endokrine Vorläuferzellen. Analysiert wurde die Expression in den Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der *in vitro* Differenzierung. MW ± SD, N = 4, *p ≤ 0,05, d = Tag.

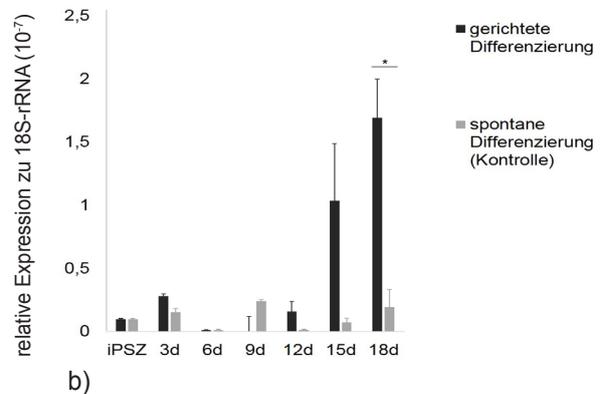
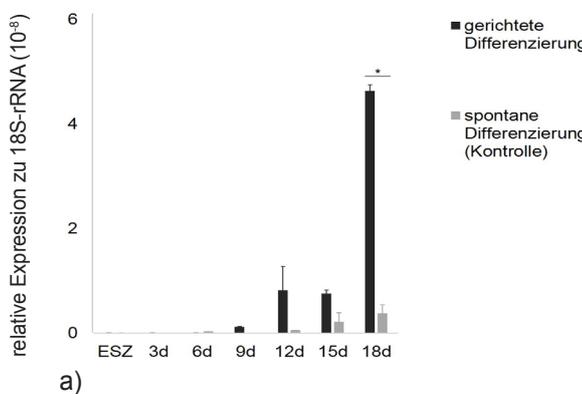


Abb. 27: Relative Quantifizierung der Expression des Gens **INSULIN** als Marker für endokrine Beta-Zell-Vorläufer. Analysiert wurde die Expression in den Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b) während der *in vitro* Differenzierung. MW ± SD, N = 4 (HUES-8) / 3 (IMR90-4), *p ≤ 0,05, d = Tag.

Der Vergleich des Expressionsmusters bedeutender Gene, die in ihrer sequenziellen Expression und gegenseitigen Beeinflussung als TKF die pankreatische *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen ermöglichen, zeigte, dass zwischen den untersuchten Zelllinien große Übereinstimmungen im Expressionsverlauf in den gerichtet differenzierten Zellen auftraten. Diese Beobachtung stellte gemeinsam mit den bereits beschriebenen Analysen zur Morphologieänderung und Expressions- bzw. Translationsuntersuchungen weiterer differenzierungsrelevanter Gene eine Bestätigung für die grund-

sätzliche Nutzbarkeit des im Rahmen der vorliegenden Arbeit für alle drei Zelllinien etablierten Protokolls dar. Bei der Betrachtung des Expressionsverlaufs des Gens *SOX17* fiel deutlich die große Übereinstimmung zwischen den hESZ-Linien und der hiPSZ-Linie auf, was auf die gute Reproduzierbarkeit des Differenzierungsprotokolls und damit verbunden, auf die Aktivierung der differenzierungsbestimmenden Signalwege hindeutete. Entoderm-assoziierte Regulationsmechanismen wurden im Rahmen des verwendeten Protokolls damit zelllinienunabhängig angeregt, was die erfolgreiche Generierung des entodermalen Ausgangsmaterials für weitere Spezialisierungsschritte bestätigte. Gleichzeitig wurden erneut auch Unterschiede im individuellen Differenzierungspotential deutlich, denn die übereinstimmende Aktivierung der *SOX17*-Expression zum Zeitpunkt der Entstehung entodermaler Zellen mit einem Peak am dritten Differenzierungstag erfolgte auf unterschiedlich hohem Expressionsniveau, wobei in den Zellen der hESZ-Linie H9 das geringste Expressionslevel detektiert wurde. Niveauunterschiede deuten neben dem zelllinien-spezifischen Potenzial zur Differenzierung in Zellderivate eines bestimmten Keimblattes auch auf eine unvollständige Selektivität des *in vitro* Entwicklungsprozesses in Bezug auf die gewünschte Ausbildung möglichst ausschließlich entodermaler Zellen hin.

Zeitlich übereinstimmend zur starken Aktivität von *SOX17* konnte auch für das essentielle Entoderm-induzierende Gen *FOXA2* eine starke Expression um den dritten bis sechsten Tag der Differenzierung in allen drei Zelllinien gemessen werden. Neben der regulatorischen Funktion des TKF *FOXA2* im Zuge der Etablierung eines entodermalen Zellschicksals, ist er außerdem, wie in Abschnitt 1.4.2 erläutert, an der Aktivierung des Gens *PDX1* und damit an der Weichenstellung zur erfolgreichen Weiterentwicklung der Zellen in die pankreatische Richtung beteiligt. Die Expression von *FOXA2* bleibt damit erwartungsgemäß im Gegensatz zu der von *SOX17* auch noch über den Zeitraum der Bildung entodermaler Zellen hinaus auf einem hohen Level bestehen.

Die stärkste Expression des Gens *PDX1*, dem essentiellen Marker pankreatischer Vorläuferzellen, konnte übereinstimmend in den gerichtet differenzierten Zellen aller drei Linien am neunten Tag des Differenzierungsvorgangs ermittelt werden. Wiederum zeigte sich dabei das schwächste Expressionsniveau in den Zellen der Linie H9, gefolgt von einer starken Repression bis zum 12. Differenzierungstag. Im Vergleich dazu sank in den Zellen der beiden anderen Linien die Expression von *PDX1* zwar auch im weiteren Differenzierungsverlauf ab, blieb aber insgesamt bis zum Endpunkt des Protokolls auf reduziertem Niveau erhalten.

Die Expression von *NGN3*, einem endokrin-assoziierten Gen, erreichte zeitlich leicht versetzt zu *PDX1* die maximale Ausprägung am zwölften bzw. 15. Tag der Differenzierung in den gerichtet differenzierten Zellen der drei eingesetzten Zelllinien, woraus sich die erfolgreiche Generierung endokriner Progenitorzellen schließen ließ. Dennoch blieb das Expressionsniveau mit fortschreitender Differenzierung nicht erhalten, was eine effiziente über den TKF *NGN3* vermittelte Aktivierung weiterer Gene zur Ausprägung Insulin-produzierender Zellen einschränkte. Während bei den übrigen mittels qPCR analysierten Genen die Zellen der spontan differenzierten Kontrollgruppe das entsprechende Expressionsmuster der gerichtet differenzierten Zellen entweder gar nicht oder nur auf äußerst geringem Level widerspiegeln, war in den Zellen der Kontrollgruppe eine deutliche Expression von *NGN3*, wenn auch hauptsächlich in den frühen Differenzierungsetappen, messbar. Wie mittels dargestellter RT-PCR Untersuchungen aufgezeigt, kam es unter den spontan differenzierten Zellen zur Ausbildung eines heterogenen Gemisches von Derivaten aller drei Keimblätter, wobei vor allem in den morphologischen Analysen die Ausbildung

neuronaler Strukturen detektiert wurde. Diese Annahme konnte durch die beobachtete starke Expression von sowohl Pankreas- als auch neuronal-assoziierten Genen wie *PAX6* und *NEUROD1* bestätigt werden. Die mittels qPCR gemessene Expression des ebenso neuronal- bzw. Pankreas-assoziierten Gens *NGN3* im Differenzierungsverlauf der spontan differenzierten Zellen verdeutlichte hierbei ergänzend die Ausbildung neuronaler Strukturen. Da die pankreatische und neuronale Entwicklungsrichtung in Bezug auf grundlegende Signalwege und damit regulierend wirkender Markergene etappenweise große Ähnlichkeiten aufweist, ist eine umfassende und vergleichende Analyse zahlreicher Gene notwendig, um klare Aussagen zur beobachteten Differenzierungsrichtung treffen zu können. Da nur in den gerichtet differenzierten Zellen eine sequenzielle Aktivierung von *SOX17* bzw. *FOXA2*, gefolgt von einer Aktivierung des Gens *PDX1* und daraufhin auch *NGN3* zu detektieren war, konnte die schrittweise eindeutige Festlegung der Zellen auf ein endokrines pankreatisches Zellschicksal angenommen werden. Die Studien zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung an humanen pluripotenten Stammzellen erfolgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zuerst an den etablierten Zellen der hESZ-Linie H9. Aufgrund der zahlreichen Analysen in Bezug auf die Expression differenzierungsrelevanter Gene und mikro-RNAs, konnte in den Zellen dieser Linie ein geringeres Potenzial zur Ausbildung pankreatischer Zellen im Vergleich zu der nachfolgend parallel analysierten hESZ-Linie HUES-8 und hiPSZ-Linie IMR90-4 festgestellt werden. Daraus ergab sich die Entscheidung, die zuerst durchgeführten Differenzierungsversuche unter Nutzung der Linie H9 nicht über den Zeitpunkt der Entstehung endokriner Vorläuferzellen zu erweitern, sondern den Fokus für weiterführende Experimente zur Untersuchung potentiell fördernder Effekte auf die Effizienz der Ausbildung Insulin-produzierender Zellen, die in den nächsten Kapiteln erläutert werden, auf einen Vergleich der Linien HUES-8 und IMR90-4 zu legen. Die parallele Analyse von hESZ und hiPSZ war dabei von besonderem Interesse, da einer gewünschten potenzielle Anwendung von hiPSZ im Rahmen der regenerativen Medizin grundsätzlich zuerst weitreichende Untersuchungen in der Grundlagenforschung vorausgehen müssen, die auf einen Vergleich mit den als pluripotenten „Goldstandard“ angesehenen hESZ ausgerichtet sind und sowohl der Charakterisierung als auch der Beurteilung von Sicherheit, Effizienz und damit möglicher klinischer Nutzbarkeit des künstlich erzeugten Zelltyps der hiPSZ dienen.

Für die zukünftige Entwicklung zellbasierter Modelle zum Gewinn neuer Erkenntnisse zur Pathogenese des Diabetes mellitus bzw. zur Testung neuartiger Medikamente oder perspektivisch als Grundlage für transplantationsbasierte Behandlungsoptionen sind vergleichende Aussagen über die Effizienz der pankreatischen *in vitro* Differenzierung der zwei Zelltypen überaus wertvoll. Die Analyse der Expression von *INSULIN* erfolgte den vorangegangenen Erläuterungen folgend, nur zwischen den Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4. Grundsätzlich war ein deutlicher Anstieg der Expression erst im fortgeschrittenen Differenzierungsverlauf (15 - 18d), also mit Ausbildung endokriner Zellen zu detektieren, wobei das Expressionsniveau in den Zellen beider Linien insgesamt sehr niedrig war.

Der ergänzende Nachweis der Translation und damit physiologischer Aktivität bedeutender Marker stellvertretend für die einzelnen Etappen der pankreatischen *in vitro* Differenzierung geschah mittels Immunfluoreszenzanalyse. Diese umfasste die Proteine SOX17, FOXA2, PDX1, NGN3, INSULIN, C-PEPTID, GLUCAGON und SOMATOSTATIN. Zur Analyse der endogenen Insulinproduktion erfolgte eine Doppelfärbung von INSULIN und C-PEPTID. Die Detektion polyhormonaler Zellen wurde anhand von Doppelfärbungen der Proteine INSULIN / GLUCAGON bzw. INSULIN / SOMATOSTATIN durch-

geführt. Die Untersuchungen erfolgten in allen drei verwendeten Zelllinien, wobei wie im Abschnitt 3.2 erläutert, die Differenzierung der hESZ-Linie H9 nur über zwölf Tage geschah und keine Detektion der Proteine INSULIN, C-PEPTID, GLUCAGON und SOMATOSTATIN erfolgte.

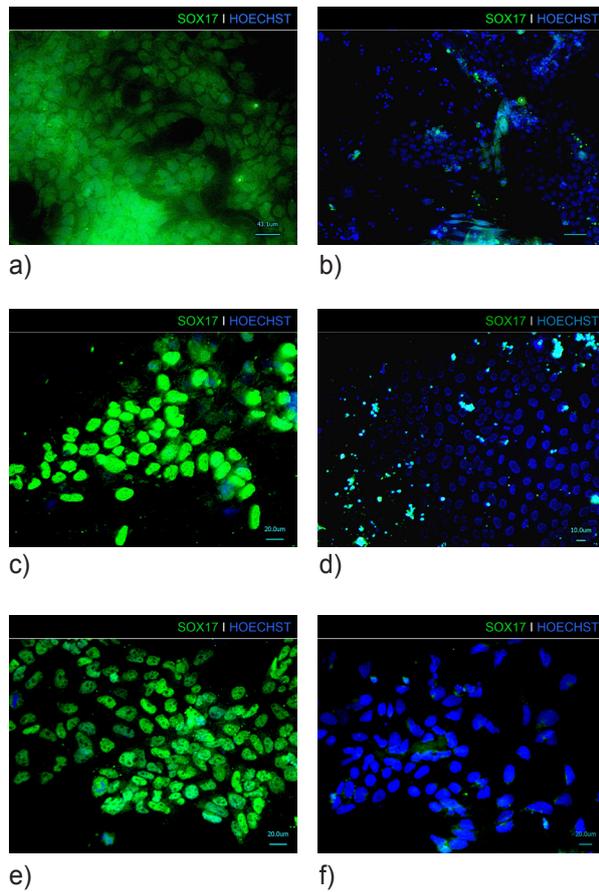


Abb. 28: Immunfluoreszenzanalyse des Proteins **SOX17** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a, b) und HUES-8 (c, d) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (e, f) am dritten Tag des *in vitro* Differenzierungsprozesses. In der linken Spalte sind jeweils Zellen der gerichtet differenzierten Gruppe abgebildet, während in der rechten Spalte die spontan differenzierte Zellen der Kontrollgruppe zu sehen sind. Die Nuklei erscheinen durch Einwirkung des Farbstoffes Hoechst blau, während der untersuchte Transkriptionsfaktor durch das verwendete Fluochrom Alexa488 mit einem grünen Fluoreszenzsignal gekennzeichnet ist. Die Aktivität von SOX17 bedingte die Kernlokalisierung, wodurch es zur Überlagerung der blau gefärbten Zellkerne kam. Maßstab: a, b = 43,1 μm; d = 10 μm; c, e, f = 20 μm.

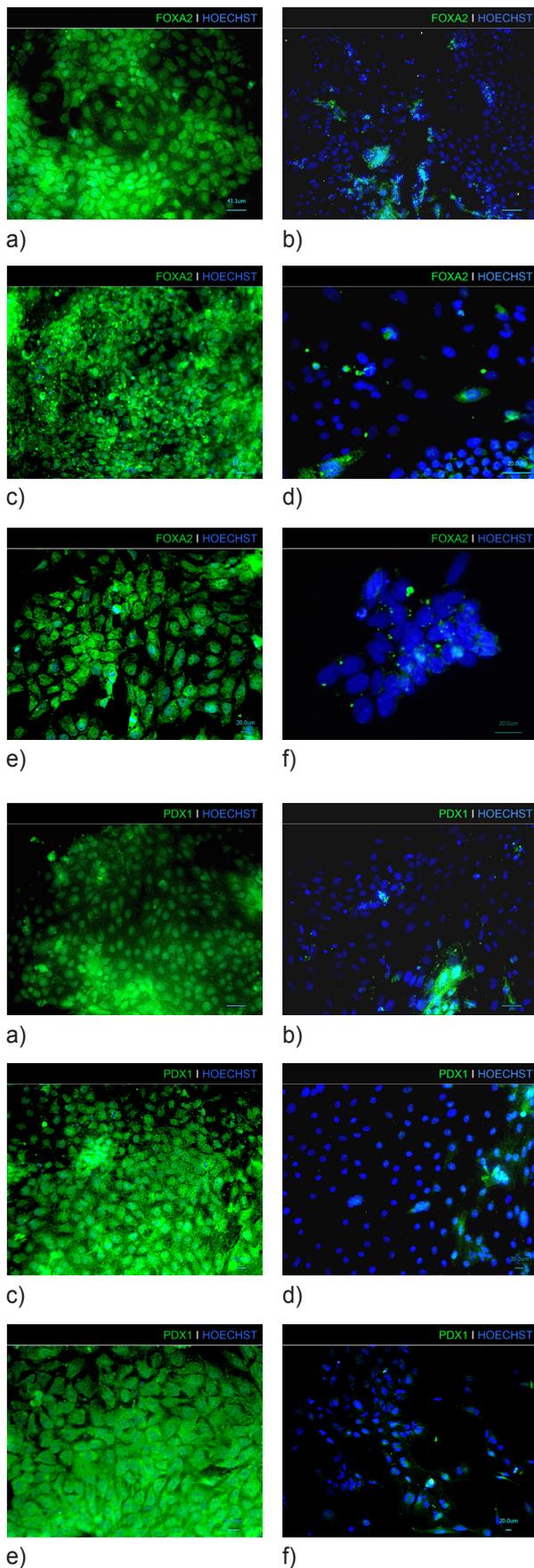


Abb. 29: Immunfluoreszenzanalyse des Proteins **FOXA2** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a, b) und HUES-8 (c, d) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (e, f) am dritten Tag der *in vitro* Differenzierung. In der linken Spalte sind jeweils Zellen der gerichtet differenzierten Gruppe abgebildet, während auf der rechten Spalte die spontan differenzierten Zellen der Kontrollgruppe zu sehen sind. Die Nuklei wurden mittels Hoechst blau angefärbt, während der untersuchte Transkriptionsfaktor durch das verwendete Fluochrom Alexa488 mit einem grünen Fluoreszenzsignal gekennzeichnet vorlag. Die Aktivität von FOXA2 führte zur Kernlokalisierung, wodurch es zur Überlagerung der blau gefärbten Zellkerne kam. Maßstab: a = 43,1 µm; b, d, e, f = 20 µm; c = 10 µm.

Abb. 30: Nachweis des Proteins **PDX1** mittels Immunfluoreszenz in Zellen der hESZ-Linien H9 (a, b) und HUES-8 (c, d) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (e, f) am neunten Tag des *in vitro* Differenzierungsprozesses. Die linke Spalte beinhaltet jeweils Zellpräparate der gerichtet differenzierten Gruppe, während auf der rechten Spalte die spontan differenzierten Zellen der Kontrollgruppe abgebildet sind. Zur blauen Färbung der Nuklei wurde der Farbstoff Hoechst eingesetzt, während der untersuchte Transkriptionsfaktor durch das verwendete Fluochrom Alexa488 mit einem grünen Fluoreszenzsignal gekennzeichnet wurde. Der aktive TKF PDX1 ist im Nukleus lokalisiert, wodurch es zur Überlagerung der gefärbten Zellkerne kam. Maßstab: a, b = 43,1 µm; c - f = 20 µm.

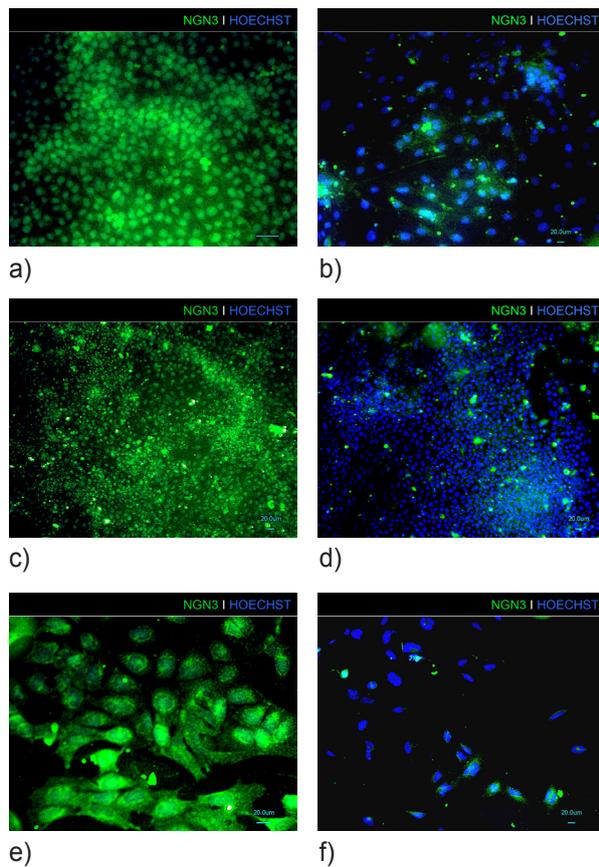


Abb. 31: Immunfluoreszenzanalyse des Proteins **NGN3** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a, b) und HUES-8 (c, d) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (e, f) am zwölften Tag der *in vitro* Differenzierung. Innerhalb der linken Spalte sind jeweils Bilder von Zellpräparaten der gerichtet differenzierten Gruppe angeordnet, während in der rechten Spalte die spontan differenzierten Zellen der Kontrollgruppe zu sehen sind. Die Nuklei wurden mittels Hoechst blau angefärbt, während der untersuchte Transkriptionsfaktor durch das verwendete Fluochrom Alexa488 mit einem grünen Fluoreszenzsignal gekoppelt wurde. Aufgrund der Kernlokalisierung des aktiven TKF NGN3 kam es zur farblichen Überlagerung der blau gefärbten Zellkerne. Maßstab: a = 43,1 µm; b - f = 20 µm.

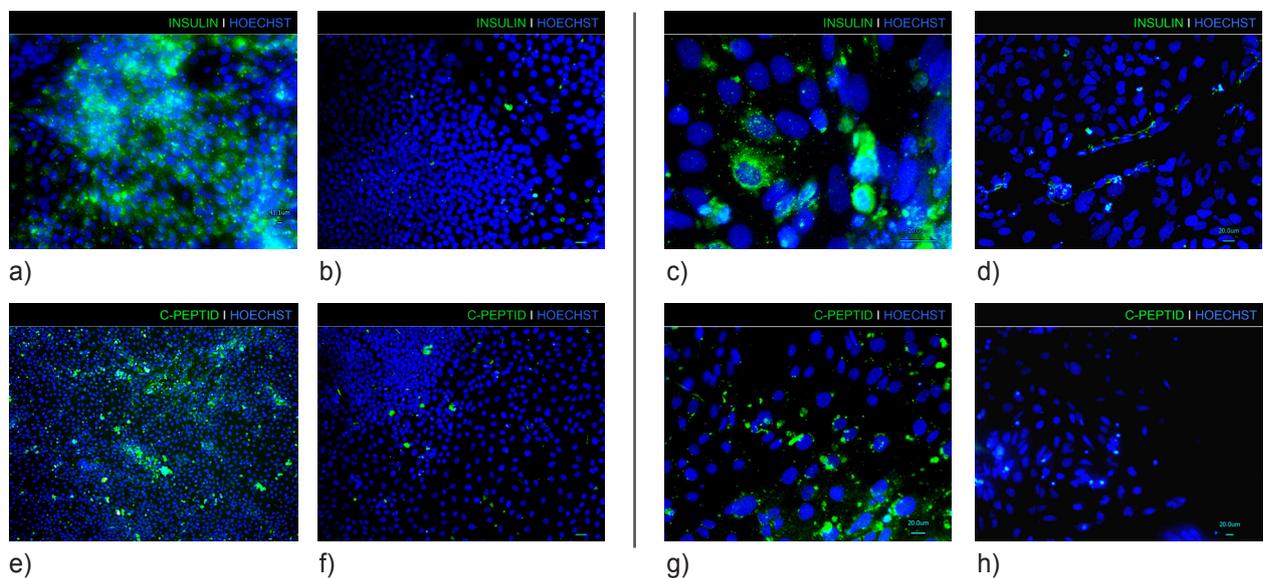


Abb. 32: Immunfluoreszenzanalyse von **INSULIN** (a - d) und **C-PEPTID** (e - f) in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a + b, e + f) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c + d, g + h) am 18. Tag der Differenzierung. Auf der linken Seite jedes waagerechten Bilderpaares sind Zellen der gerichtet differenzierten Gruppe zu sehen und auf der rechten Seite die spontan differenzierten Zellen der Kontrollgruppe. Zur blauen Färbung der Nuklei wurde der Farbstoff Hoechst eingesetzt, während die untersuchten zytosolischen Proteine durch das verwendete Fluochrom Alexa488 mit einem grünen Fluoreszenzsignal gekennzeichnet wurden. Maßstab: a, b, e, f = 43,1 µm; c, d, g, h = 20 µm.

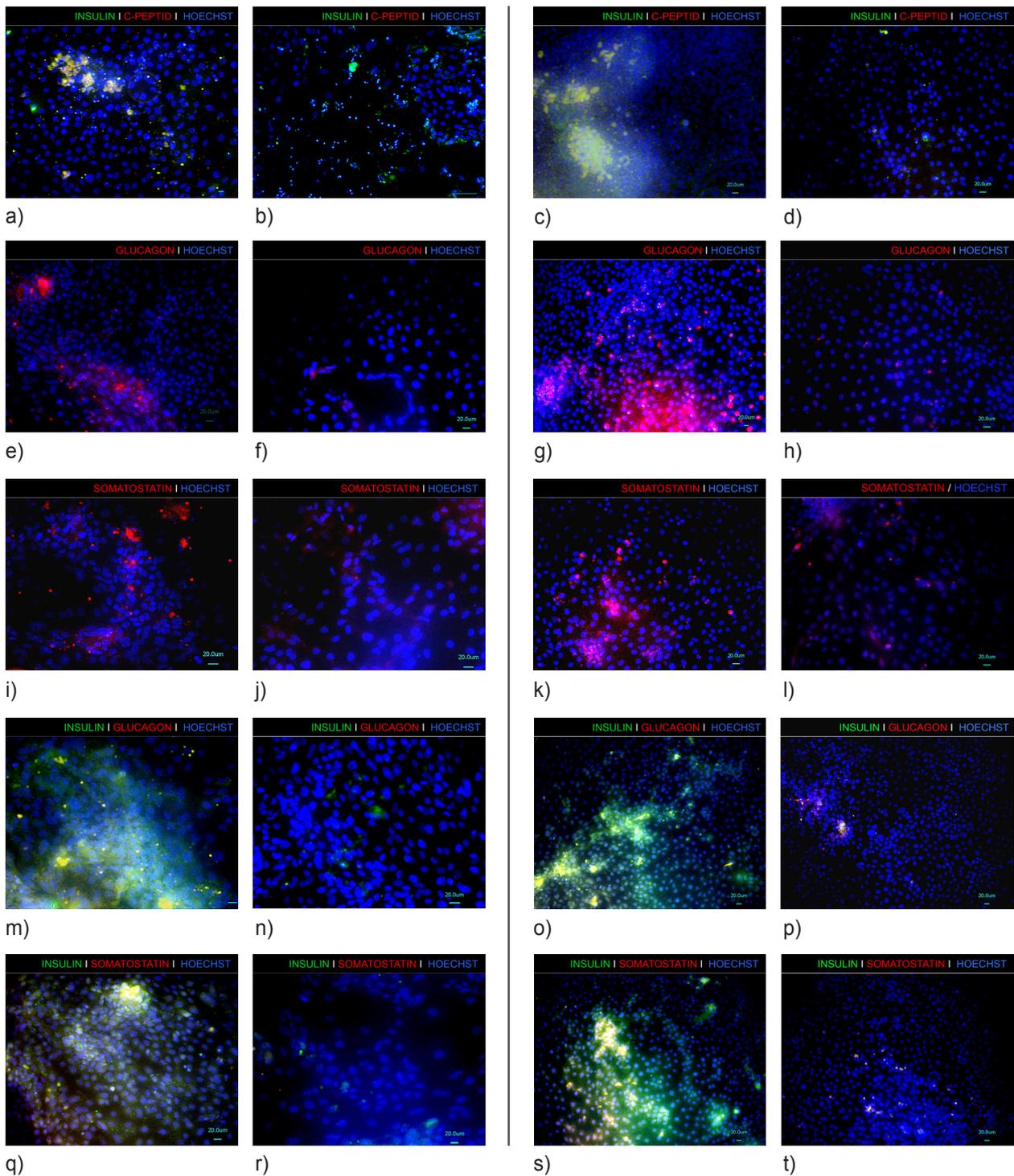


Abb. 33: Immunfluoreszenzanalyse der kombinierten Färbung von **INSULIN + C-PEPTID** (a - d) sowie Ergebnisse der Färbungen von **GLUCAGON** (e - h), **SOMATOSTATIN** (i - l), der kombinierten Färbung von **INSULIN + GLUCAGON** (m - p) und **INSULIN + SOMATOSTATIN** (q - t) in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a + b, e + f, i + j, m + n, q + r) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c + d, g + h, k + l, o + p, s + t) am 18. Tag der *in vitro* Differenzierung. Auf der linken Seite jedes Bilderpaares sind Zellen der gerichtet differenzierten Gruppe zu sehen, während auf der rechten Seite die spontan differenzierten Zellen der Kontrollgruppe abgebildet sind. Zur blauen Färbung

der Nuklei wurde der Farbstoff Hoechst eingesetzt. Zur Detektion der zytosolischen Proteine wurde neben dem Fluochrom Alexa488, welche ein grünes Fluoreszenzsignal erzeugte, auch der Farbstoff CyTM5 eingesetzt, welcher rotes Licht emittierte. Maßstab: a = 10 µm; b = 43,1 µm; c - t = 20 µm.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen aller drei untersuchten pluripotenten Stammzelllinien zeigten insgesamt große Übereinstimmungen. In allen Zelllinien konnten in der Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen nach dem dritten Differenzierungstag die Proteine SOX17 und FOXA2 im Zellkern und damit dem Ort ihrer Aktivität als TKF nachgewiesen werden. Damit konnte die Bildung definitiv entodermaler Zellen bestätigt werden, die folgend als Ausgangsmaterial für die Formierung pankreatischer Zelltypen zur Verfügung standen. Die Detektion der Proteine PDX1 und NGN3 in den gerichtet differenzierten Zellen aller drei Linien am neunten bzw. zwölften Tag des Differenzierungsprozesses belegte die erfolgreiche sukzessive Generierung pankreatischer und speziell endokriner Vorläuferzellen. Nur Zellen, die PDX1 produzierten, bildeten die Basis für alle späteren spezialisierten pankreatischen Zelltypen. Die starke Produktion und Kernlokalisierung des Markers NGN3 verdeutlichte die durch entsprechende Wachstumsfaktoren im Differenzierungsmedium gezielt forcierte Ausbildung endokriner Progenitorzellen. Zum Endpunkt des Differenzierungsprozesses (= 18d) konnte in den gerichtet differenzierten Zellen die Produktion der Hormone INSULIN, GLUCAGON und SOMATOSTATIN in einigen Bereichen der formierten inselartigen Cluster detektiert werden. Zusätzlich erfolgte die Analyse von endogen produziertem C-PEPTID in kombinierter Färbung mit INSULIN, um potenziell aus dem Medium in die Zellen aufgenommenes INSULIN diskriminieren zu können. Die sichtbare Überlagerung des mittels grüner Fluoreszenz wahrnehmbaren INSULIN und des rot erscheinenden C-PEPTID als gelber Gesamtfarbeindruck verdeutlichte die endogene Hormonproduktion in den gebildeten endokrinen Zellen. Entsprechende Überlagerungen waren allerdings auch bei kombinierten Färbungen der Hormone INSULIN + GLUCAGON und INSULIN + SOMATOSTATIN in einem Teil der Zellen zu beobachten.

Im Gegensatz zu den Resultaten der gerichtet differenzierten Zellen war in den jeweiligen Zellproben der spontan differenzierten Kontrollgruppe nur vereinzelt eine geringe Synthese der detektierten Proteine nachweisbar. Die fehlende zeitlich aufeinander aufbauende starke Produktion der differenzierungssteuernden TKF SOX17, FOXA2, PDX1 und NGN3 verdeutlichte, dass keine gezielte Entwicklung in die pankreatische Richtung stattfand, sondern es zur Ausbildung eines heterogenen Zellgemisches kam. Die schwach ausgeprägte Detektion des Proteins NGN3 konnte hierbei vielmehr als Hinweis für formierte neuronal-assoziierte Zellen gedeutet werden. Dazu passte die Detektion von INSULIN in einigen wenigen differenzierten Zellen der Kontrollgruppe, da INSULIN auch neuronalen Zellen als Wachstumsfaktor dient (Duarte *et al.* 2012). Aus dem Gesamtbild der Untersuchungen zur parallelen Differenzierung zweier hESZ-Linien und einer hiPSZ-Linie unter Betrachtung der Daten zum Morphologiewandel, dem Expressionsmuster Pluripotenz-assoziiierter und differenzierungsrelevanter Markergene sowie dem Aktivitätsnachweis dieser bedeutenden TKF bzw. der Produktion pankreatischer Hormone konnte abgeleitet werden, dass das etablierte Protokoll zur reproduzierbaren Formierung Insulin-produzierender Zellen grundsätzlich geeignet ist. Weiterführende vergleichende Analysen, wie die Bestimmung von Expressionsprofilen Pankreas-assoziiierter mikroRNAs zur ergänzenden und detaillierteren Charakterisierung des Differenzierungsprozesses konnten somit durchgeführt werden. Als besonders erfreuliches Ergebnis stellte sich das überzeugende

Differenzierungspotenzial der Zelllinien HUES-8 und IMR90-4 sowie deren große Übereinstimmungen in den analysierten differenzierungsrelevanten Größen dar, denn es ergab sich daraus die Möglichkeit zur parallelen Durchführung gezielter Modifikationen des Basis-Differenzierungsprotokolls im direkten Vergleich zwischen humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen. Die sinkende Effizienz, welche die schrittweise Entwicklung der pankreatischen Vorläuferzellen begleitete, zeigte allerdings auch die aktuellen Limitierungen bestehender Protokolle zur *in vitro* Differenzierung auf. Für eine Verbesserung der Selektivität und damit Effizienz der aufeinander aufbauenden Differenzierungsetappen ist zunächst ein tieferes Verständnis der grundlegenden molekularen Regulationsmechanismen und Signalwege erforderlich. Die gewonnenen Erkenntnisse können dann zur Entwicklung von Methoden für gezielte Modulationen dieser Mechanismen genutzt werden. Die somit verfolgte Annäherung an die Entwicklungsvorgänge, wie sie im Rahmen der *in vivo* Pankreasorganogenese stattfinden, kann schließlich zur Verbesserung aktueller *in vitro* Differenzierungsprotokolle beitragen. Das Erreichen einer derartigen Optimierung des Differenzierungsprozesses bildete das Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Die hierbei erhaltenen Resultate werden in den folgenden Abschnitten präsentiert.

3.2.2 Analyse Pankreas-assoziiierter mikroRNAs

Ergänzend zur Analyse Pankeas-assoziiierter Gene auf Transkriptions- und Translationsebene erfolgte die Charakterisierung der einzelnen *in vitro* Differenzierungsetappen über die Analyse von mikroRNA-Expressionsprofilen. Die untersuchten mikroRNAs sind an der Regulation zahlreicher Prozesse beteiligt, die sowohl für die Ausbildung von pankreatischen Beta-Zellen entscheidend sind, aber auch beim Erhalt der adulten Beta-Zell-Masse und ihrer Funktion essentielle Bedeutung haben. Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, sind die Informationen zur Rolle der im Rahmen dieser Arbeit analysierten mikroRNAs zumeist aus *in vivo* Studien am Tiermodell der Maus bzw. aus Untersuchungen an humanem fetalen Pankreasgewebe verschiedener Entwicklungsstufen gewonnen worden. Mit Hilfe der Erstellung von Expressionsprofilen Pankreas-assoziiierter miRs in zwei hESZ-Linien und einer hiPSZ-Linie während des *in vitro* Differenzierungsvorgangs ließen sich Vergleiche zu den bereits bekannten Daten der *in vivo* basierten Studien ziehen. Zudem erlaubte der Vergleich verschiedener Linien auch Aussagen über grundlegende, potenziell zelllinienunabhängige Regulationsmechanismen zu treffen. Damit sollte die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit betrachtet werden, nämlich ob es zwischen der *in vivo* Pankreasentwicklung und der nachgeahmten *in vitro* Differenzierung Unterschiede im Expressionsverlauf entwicklungssteuernder mikroRNAs gibt und ob diese Unterschiede eine Ursache für die bisherige geringe Effizienz von *in vitro* Protokollen darstellen können. Diese Analyse eröffnete im Folgenden auch die Möglichkeit einer gezielten Optimierung der Expression einzelner mikroRNAs zur Annäherung an die *in vivo* Situation.

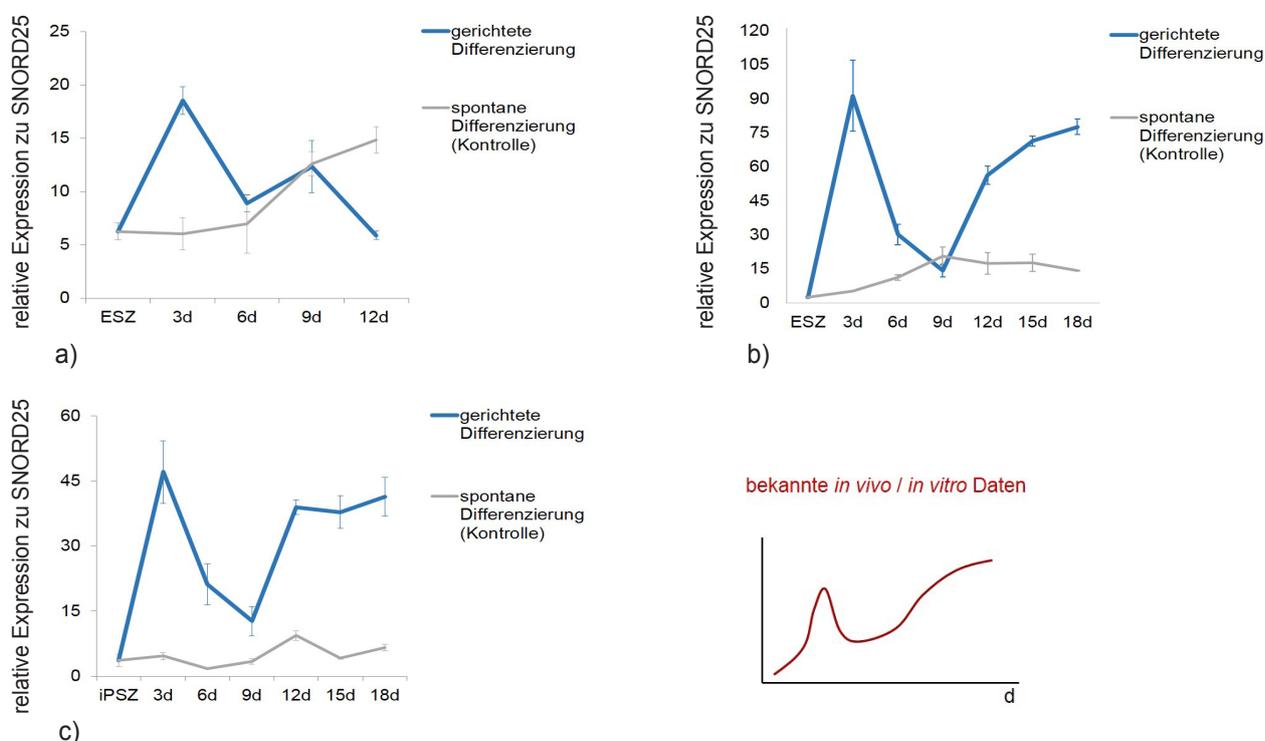


Abb. 34: Relative Quantifizierung des Expressionsmusters von **miR-375** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der *in vitro* Differenzierung. Der idealisierte Verlauf, ermittelt aus bekannten *in vivo* / *in vitro* Studien, ist vergleichend dargestellt. MW \pm SD, N = 3, d = Tag.

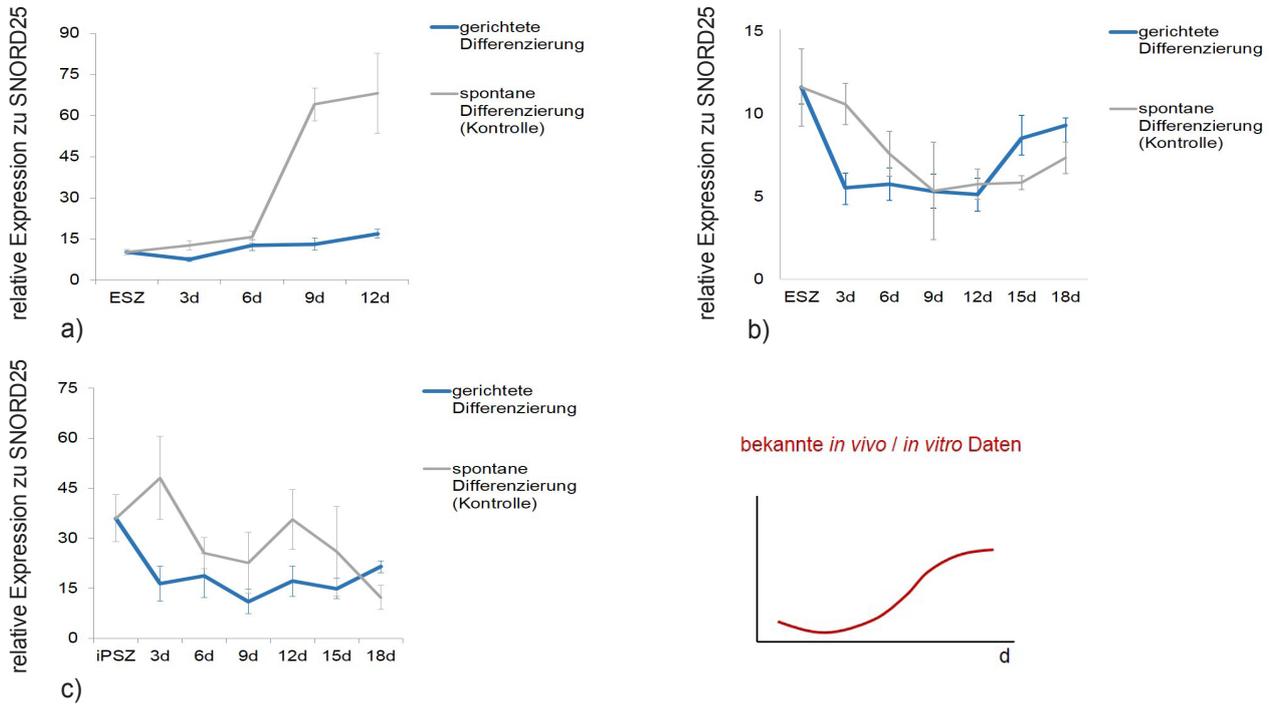


Abb. 35: Relative Quantifizierung des Expressionsverlaufs von **miR-124a** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der pankreatischen *in vitro* Differenzierung. Vergleichend dargestellt ist das idealisierte Expressionsmuster, bekannt aus *in vivo* / *in vitro* Studien. MW ± SD, N = 3, d = Tag.

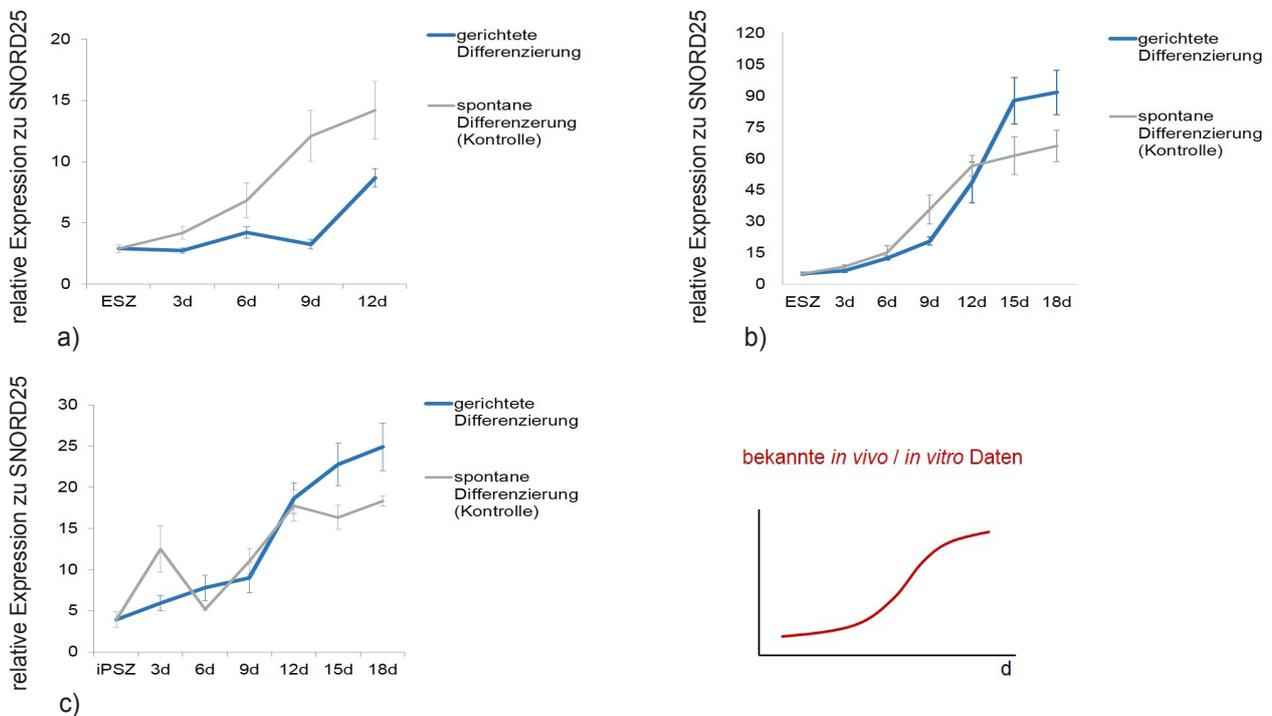


Abb. 36: Relative Quantifizierung des Expressionsmusters von **miR-30d** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) im Verlauf der *in vitro* Differenzierung. Vergleichend ist der aus publizierten *in vivo* / *in vitro* Studien erstellte idealisierte Verlauf dargestellt. MW ± SD, N = 3, d = Tag.

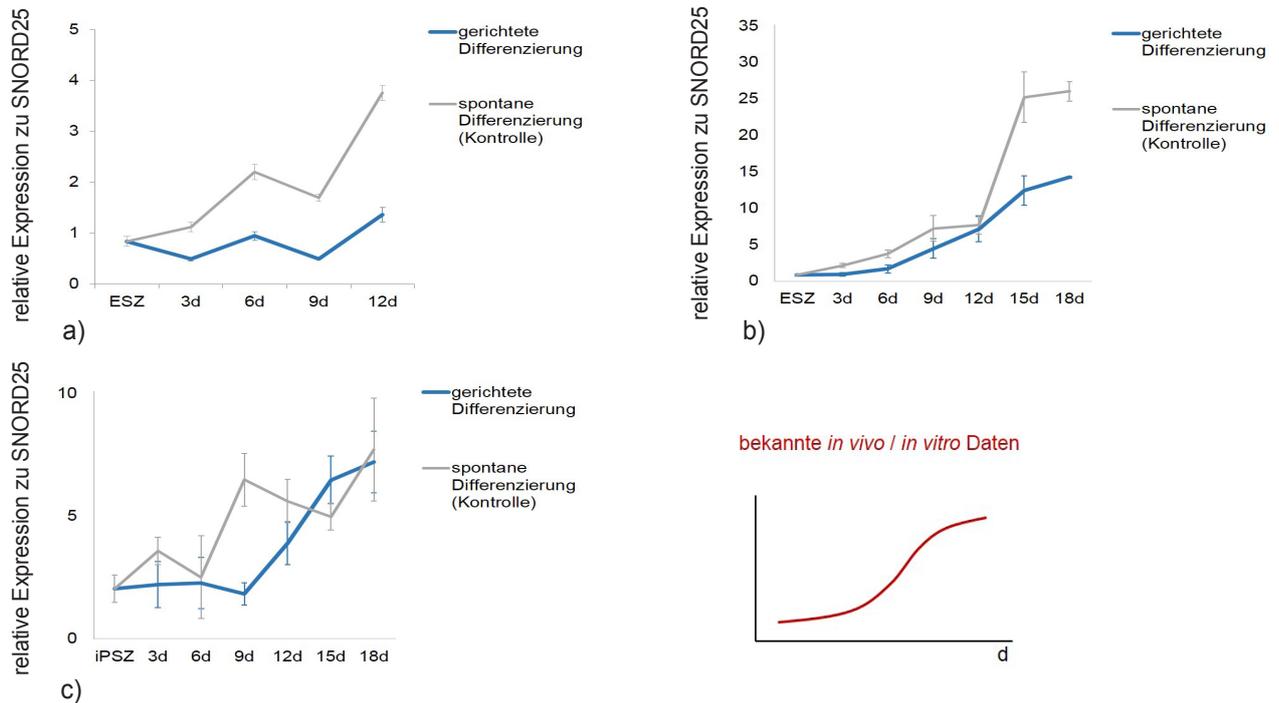


Abb. 37: Relative Quantifizierung des Expressionsverlaufs von **miR-335** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der *in vitro* Differenzierung. Ergänzend ist der idealisierte Verlauf, erstellt aus Daten von *in vivo* / *in vitro* Studien, abgebildet. MW ± SD, N = 3, d = Tag.

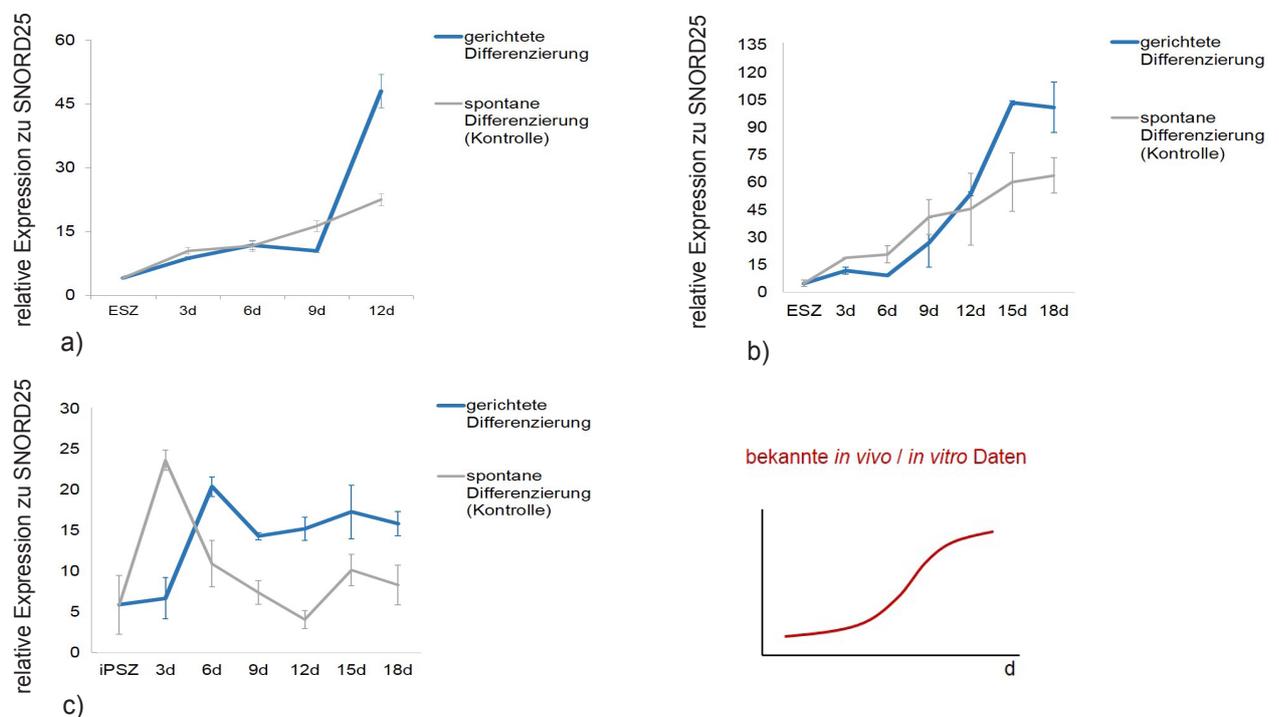


Abb. 38: Relative Quantifizierung des Expressionsmusters von **miR-200c** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der *in vitro* Differenzierung. Zusätzlich ist der idealisierte Verlauf, zusammengestellt aus Daten bekannter *in vivo* / *in vitro* Studien, gezeigt. MW ± SD, N = 3, d = Tag.

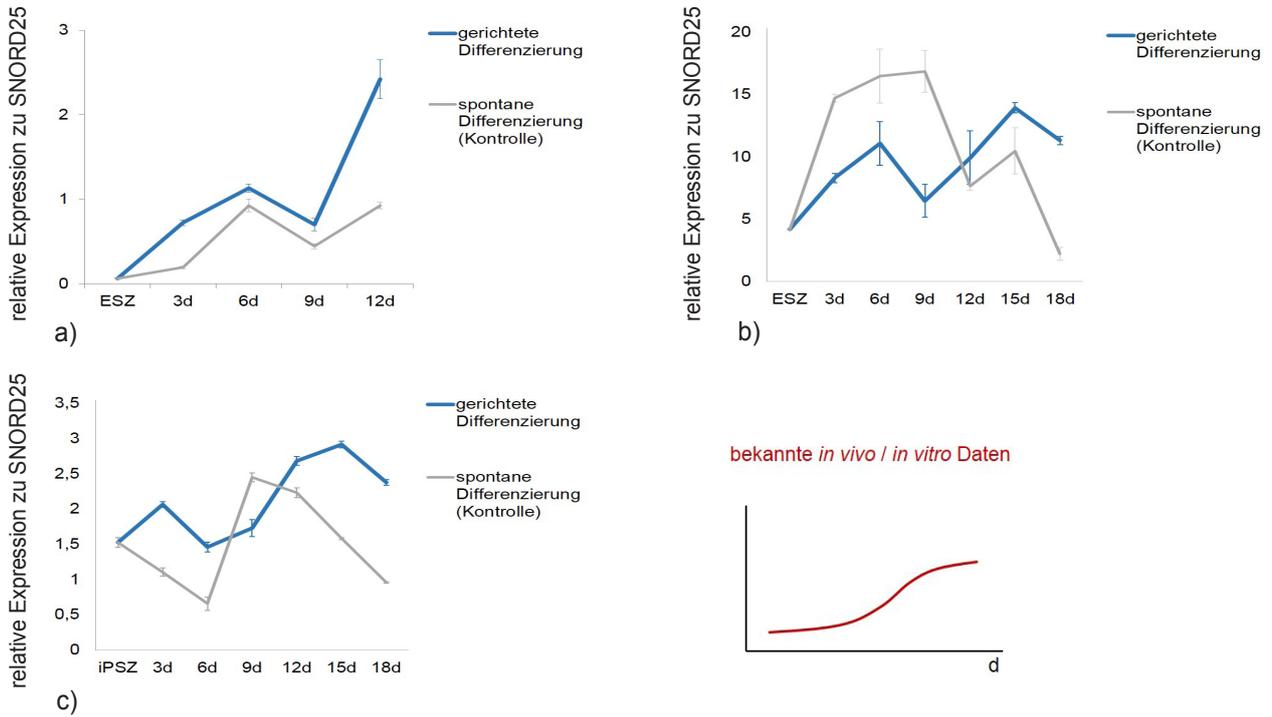


Abb. 39: Relative Quantifizierung des Expressionsverlaufs von **miR-9** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der *in vitro* Differenzierung. Vergleichend ist das idealisierte Expressionsmuster, erstellt aus Daten bekannter *in vivo* / *in vitro* Studien, dargestellt. MW \pm SD, N = 3, d = Tag.

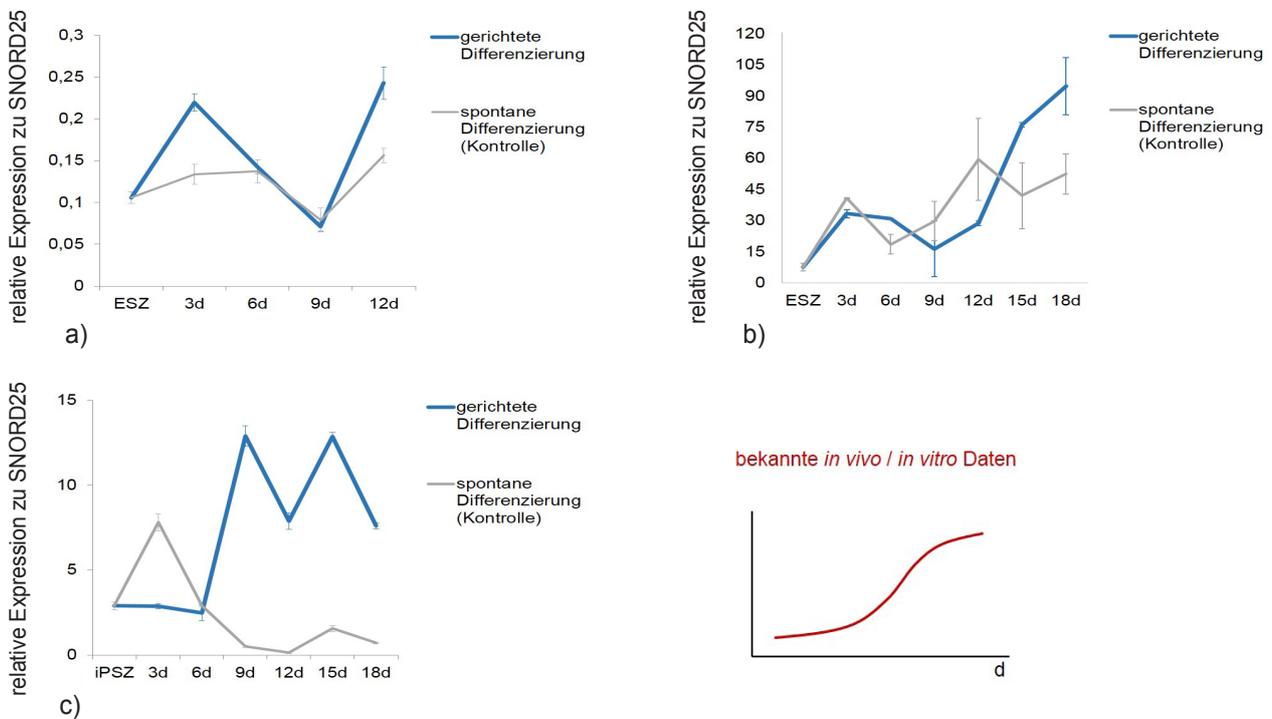


Abb. 40: Relative Quantifizierung des Expressionsmusters von **miR-182** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c) während der *in vitro* Differenzierung. Zusätzlich ist der idealisierte Verlauf, zusammengestellt aus Daten bekannter *in vivo* / *in vitro* Studien, gezeigt. MW \pm SD, N = 3, d = Tag.

Bei der mittels qPCR durchgeführten relativen Quantifizierung des Expressionsverlaufs Pankreas-assoziiierter mikroRNAs während des *in vitro* Differenzierungsprozesses konnten zwischen den analysierten Zelllinien insgesamt deutliche Übereinstimmungen detektiert werden. Im Vergleich der miR-375-Expression fällt eine zeitlich begrenzte starke Aktivität um den dritten Differenzierungstag, dem Zeitfenster der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen, auf. Es schließt sich ab dem neunten Tag ein zweiter Anstieg der Expression an, welcher bis zum Endpunkt des Protokolls erhalten bleibt. Diese zunehmende Expression im Rahmen der Entstehung pankreatischer bzw. endokriner Vorläuferzellen konnte allerdings nur in den hESZ der Linie HUES-8 und den hiPSZ beobachtet werden. Die Differenzierung der im Zuge der vorliegenden Arbeit zuerst etablierte Zelllinie H9 erfolgte nur bis zum zwölften Entwicklungstag. Zur Analyse zelllinienunabhängiger Regulationsmechanismen bis zur Differenzierung pankreatischer Vorläuferzellen wurden Zellen der Linie H9 jedoch noch parallel zu den übrigen beiden Linien differenziert. Der Fokus der weiterführenden Experimente im Rahmen von Modifikationen des Basis-Differenzierungsprotokolls zur Untersuchung von potentiell positiven Effekten auf die Differenzierungseffizienz lag dann allerdings auf der vergleichenden Analyse der Zelllinien HUES-8 und IMR90-4. Die Expression von miR-124a blieb während der ersten Differenzierungsetappe in allen analysierten Zelllinien auf einem sehr geringen Niveau, was für eine effiziente Ausbildung definitiv entodermaler Zellen essentiell ist, da zu den reprimierten Zielgenen dieser mikroRNA der Entoderm-assoziierte Marker *FOXA2* gehört. Im weiteren Differenzierungsverlauf war ein moderater Anstieg der Expression zu erwarten, da wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, die miR-124a in Beta-Zellen regulatorische Funktionen im Rahmen der Insulinsekretion ausübt. Es war jedoch nur in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 ein Anstieg der Expression zu beobachten.

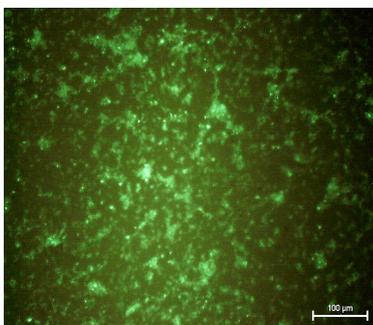
Die Expressionsmuster der übrigen untersuchten mikroRNAs (miR-30d, miR-335, miR-200c, miR-9 und miR-182) zeigten, wenn auch mit zelllinienbedingten Niveauunterschieden große Ähnlichkeiten untereinander und im Vergleich zu Daten, die wie in Kapitel 1.4.2 erläutert, bereits aus bekannten *in vivo* und *in vitro* Studien stammten. Das analysierte Muster der miR-Aktivitäten verdeutlichte insgesamt die erfolgreiche schrittweise Entwicklung pankreatischer und endokriner Vorläuferzellen, da die mikroRNAs zahlreiche bedeutende Funktionen in sich entwickelnden und reifen Beta-Zellen ausüben. Damit stellen die miR-Profile eine sinnvolle Ergänzung zur Charakterisierung einzelner Differenzierungsetappen zusätzlich zur Analyse differenzierungsrelevanter Gene auf Transkriptions- und Translationsebene dar. Beim Vergleich zwischen den gerichtet differenzierten Zellen und den Zellen der spontan differenzierten Kontrollgruppe fielen bei einigen der analysierten mikroRNA-Profilen Ähnlichkeiten auf. Da die Expression der mikroRNAs allerdings im Kontext mit der von differenzierungsrelevanten Genen und dem Morphologiewandel der Zellen über den Entwicklungsprozess hinweg bewertet werden muss, ist bei der beobachteten miR-Expression in Zellen der Kontrollgruppe nicht auf eine forcierte Entwicklung in die pankreatische Richtung zu schließen. Vielmehr muss beachtet werden, dass mikroRNAs aufgrund ihrer Bindungseigenschaften mehrere hundert Ziel-mRNAs regulieren können und somit auch Funktionen in Zellen ausüben können, die eine ekto- oder mesodermale Entwicklungsrichtung eingeschlagen haben. Da die mikroRNA-375 eine der am stärksten exprimierten miRs in Beta-Zellen darstellt und ihre Funktionen essentiell für die Entwicklung, den Erhalt und die korrekte Funktion dieses Zelltyps sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit diese mikroRNA ausgewählt, um potentielle Effekte auf die *in vitro* Differenzierungseffizienz durch gezielte Modulation der miR-Expression zu untersuchen. Als Ansatzpunkt

galt hierbei der detektierte sukzessive Expressionsanstieg in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4, welcher mit der Generierung pankreatischer Vorläuferzellen einherging und damit dem zu erwartenden Muster entsprechend der bedeutenden Rolle der miR folgte, allerdings auf geringem Niveau.

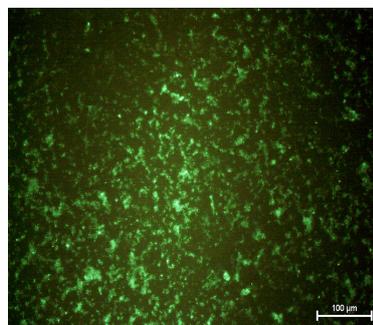
3.3 Etablierung einer Transfektionsmethode zur gezielten Modifikation der Expression von miR-375

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit umfasste die gezielte Modulation der Expression von miR-375 in den *in vitro* generierten pankreatischen bzw. endokrinen Vorläuferzellen. Durch Transfektion reifer miR-375-Moleküle sollte die Konzentration der mikroRNA innerhalb der Zellen künstlich erhöht und damit den Gegebenheiten der *in vivo* Pankreasentwicklung angenähert werden. Aufgrund ihrer zahlreichen Funktionen in sich entwickelnden und reifen Beta-Zellen, zählt die miR-375 zu den am stärksten konzentrierten mikroRNAs in diesem hochspezialisierten Zelltyp.

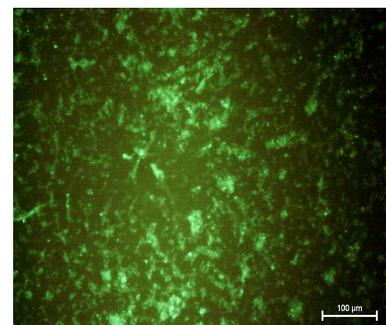
Neben dem potenzierten induktiven Effekt der Transfektion von miR-375 auf die miR-regulierten Signalwege, die eine effektive pankreatische Differenzierung begünstigen können, wurde auch untersucht, ob ein potentiell einsetzender Rückkopplungseffekt auftritt. Eine mittels Transfektion von miR-375 forcierte Festlegung der Zellen auf ein endokrines Zellschicksal mit den entsprechend aktivierten zellulären Regulationsmechanismen kann nachfolgend potentiell zur verstärkten Aktivierung der endogenen miR-375-Produktion führen. Aufgrund der fehlenden kommerziellen Verfügbarkeit von Fluoreszenz-gekoppelten miR-375-Molekülen zum Start der durchgeführten Transfektionsexperimente erfolgte die Auswahl eines strukturell und damit auch funktionell gleichwertigen Produktes. Die verwendete Fluoreszenz-gekoppelte Negativ-siRNA weist laut Herstellerangaben keine Ziel-mRNA in humanen Zellen auf. Die vergleichbare Größe zur miR-375 und die Verwendung des identischen Transfektionsprotokolls, wie in Abschnitt 2.1.5.1 beschrieben, erlaubte den Einsatz der siRNA zur Kontrolle der Effizienz einer Liposom-basierten Transfektion kleiner einzelsträngiger RNA-Moleküle in pankreatische Vorläuferzellen. Die mittels Immunfluoreszenz- und durchflusszytometrischer Analyse erhaltenen Ergebnisse, die vergleichend in allen drei verwendeten Zelllinien erstellt wurden, konnten somit auf die Effektivität der Transfektion von miR-375 übertragen werden. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit der Transfektionsreagenz behandelt (= „Leer-Transfektion“) und analysiert.



a)



b)



c)



Abb. 41 (S. 90 - 91): Immunfluoreszenzanalyse der mittels Fluoreszenz-markierter Negativ-siRNA transfizierten Zellen der hESZ-Linien H9 (a, d) und HUES-8 (b, e) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c, f). Die obere Reihe zeigt jeweils die Ergebnisse der Negativ-siRNA Transfektion, während in der unteren Reihe die Ergebnisse der Kontrollgruppe („Leer-Transfektion“) dargestellt sind. Die Detektion erfolgte 72h nach der Transfektion. Aufgrund der Kopplung des Fluorochroms Alexa488 an die transfizierten Moleküle kam es zur Emission von grünem Licht. Maßstab: 100 µm.

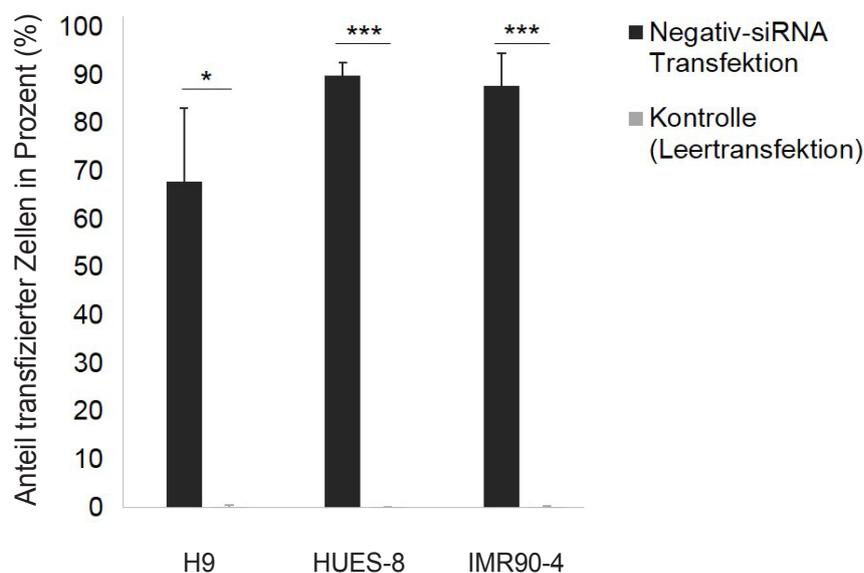


Abb. 42: Durchflusszytometrische Analyse zur Ermittlung des Anteils transfizierter Zellen der hESZ-Linien H9 und HUES-8 sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 unter Verwendung der Fluorochrom-gekoppelten Negativ-siRNA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus unabhängigen Wiederholungen. MW \pm SD, N = 3 (H9) / 4 (HUES-8, IMR90-4), * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

Die Ergebnisse zur Liposomen-basierten Transfektion der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zelllinien zeigten übereinstimmend eine hohe Effizienz des etablierten Transfektionsprotokolls. Insgesamt war die Effizienz mit einem Anteil von 68 % transfizierter Zellen in den Zellen der hESZ-Linie H9 etwas geringer als in der hESZ-Linie HUES-8 mit 90 % und der hiPSZ-Linie IMR90-4 mit

88 %. In der Kontrollgruppe, deren Zellen lediglich mit der Transfektionsreagenz inkubiert wurden, konnte in allen Zelllinien ein Anteil von unter 1 % fluoreszierender Zellen detektiert werden, was eine spezifische Messung ausschließt und auf potentielle minimale Autofluoreszenzeffekte von Strukturen im Zellinneren hindeutet. Die Resultate der abgebildeten Immunfluoreszenzaufnahmen und die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse erlauben somit eine parallele Anwendung des etablierten Transfektionsprotokolls zur Einschleußung von mikroRNA-Molekülen in pluripotente Stammzellen während des *in vitro* Differenzierungsprozesses zur gezielten Modulation der Expression.

3.4 Gezielte Modifikation der pankreatischen *in vitro* Differenzierung - Vergleich zwischen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen

In den folgenden Abschnitten werden nacheinander die Ergebnisse der Modifikationen des Basis-Differenzierungsprotokolls vorgestellt. Nach der Präsentation der ermittelten Daten zur Transfektion der mikroRNA-375 in pankreatische bzw. endokrine Vorläuferzellen folgt die Vorstellung der Ergebnisse zur zeitlich begrenzten Erhöhung der Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium im Zeitrahmen der Entstehung pankreatischer Progenitorzellen. Abschließend werden die Daten zur kombinierten Anwendung der beiden Protokollvarianten dargestellt.

3.4.1 Induktion von miR-375

Die in Kapitel 3.2.2 vorgestellten Ergebnisse zur Bestimmung des Expressionsmusters von mikroRNA-375 im Verlauf der pankreatischen *in vitro* Differenzierung wiesen auf eine potenzielle Verbindung zwischen der allgemein geringen Effizienz aktuell bekannter Protokolle zur *in vitro* Produktion Insulin-produzierender Zellen und der Aktivität dieser bedeutenden mikroRNA hin, welche sich von der Situation der *in vivo* Pankreasentwicklung teilweise in Verlauf und vor allem Niveau unterschied. Da eine anhaltend starke Expression von miR-375 zur adäquaten Entwicklung und zum Erhalt von Beta-Zellen unabdingbar ist, ergab sich für die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass eine gezielte, mittels Transfektion künstlich erhöhte miR-375 Konzentration positive Effekte auf die späten Etappen der pankreatischen *in vitro* Differenzierung und damit letztlich auf die Generierung Insulin-produzierender Zellen haben kann.

Damit verbunden war die Ausbildung einer positiven Rückkopplungsschleife denkbar, in der durch forcierte Aktivierung entwicklungsrelevanter Signalwege auch die endogene miR-375-Produktion gesteigert wird, was zur Ausbildung eines stabilen und hohen Expressionsniveaus beitragen kann. Nachfolgend werden die Effekte der Transfektion von mikroRNA-375 in pankreatische und endokrine Vorläuferzellen am neunten und zwölften Tag des Differenzierungsprozesses vorgestellt, wobei neben Auswirkungen auf die Morphologie auch die Expression der miR-375 selbst sowie wichtiger Gene als Marker der erfolgreichen schrittweisen Entwicklung der Zellen auf Transkriptionsebene betrachtet werden.

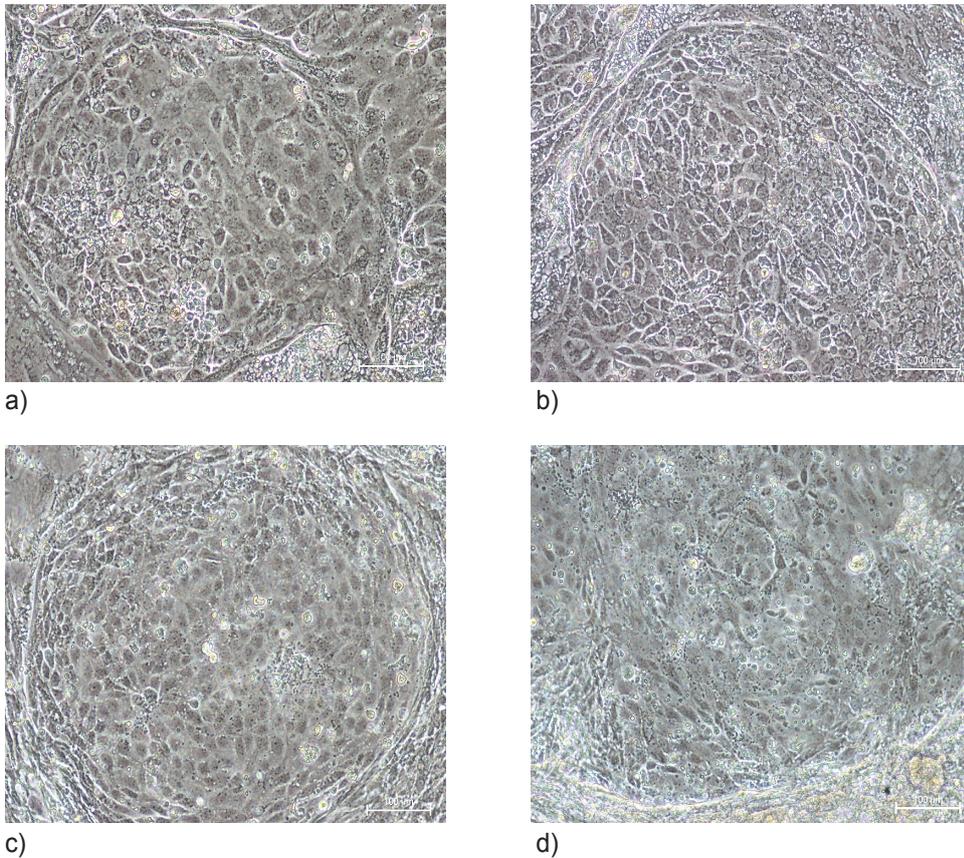
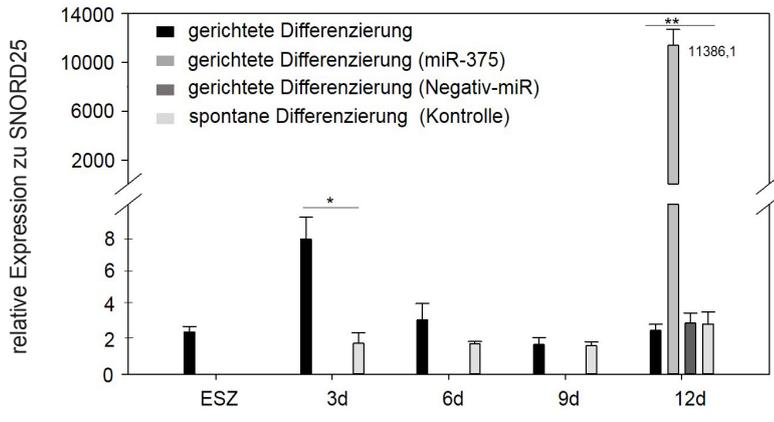
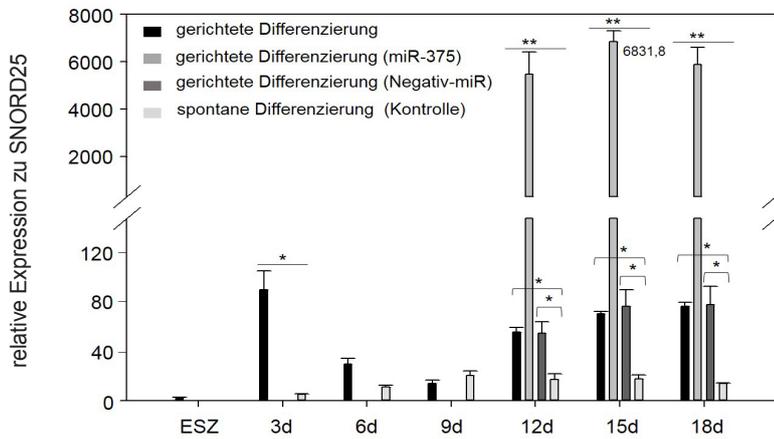


Abb. 43: Morphologiewandel differenzierender Zellen der Linien HUES-8 (a, b) und IMR90-4 (c, d), welche bis zum Endpunkt des Protokolls (= 18d) kultiviert wurden. Auf der linken Seite sind differenzierte Zellen am 18. Tag des Differenzierungsverlaufs zu sehen, die am neunten und zwölften Tag mit Molekülen der miR-375 transfiziert wurden. Auf der rechten Seite sind jeweils Bilder von gerichtet differenzierten Zellen zu sehen, die als Kontrollgruppe mit einer Negativ-miR ohne spezifische Ziel-mRNA in humanen Zellen transfiziert wurden. Ihre Entwicklung entspricht damit der nach dem Basisprotokoll. Maßstab: 100 µm.

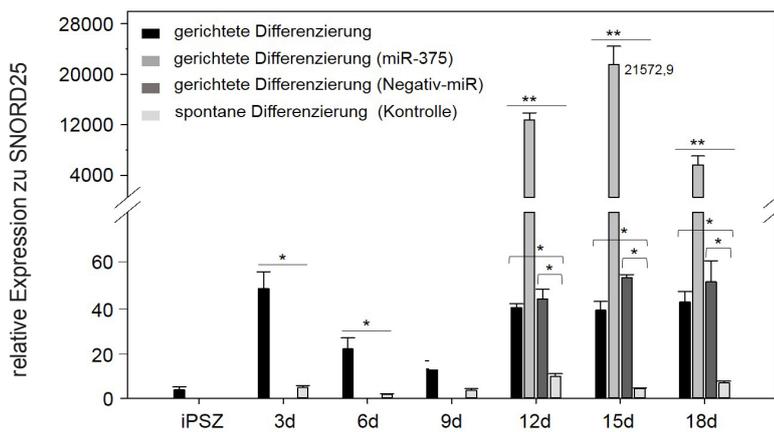
Im Vergleich zu den morphologischen Veränderungen im Rahmen der Differenzierung nach dem Basisprotokoll wie sie in Kapitel 3.2.1, Abbildungen 21 - 23 zu sehen waren und zu den Zellen der Differenzierungsgruppe, die mit einer funktionslosen Negativ-mikroRNA transfiziert wurden und damit funktional der Differenzierung nach dem Basisprotokoll entsprachen, zeigten die mit mikroRNA-375 transfizierten Zellen bis zum Endpunkt der Differenzierung (= 18d) beider verwendeter Zelllinien deutlich stärker definiert ausgeformte und abgegrenzte Zellaggregate, die sogenannten *islet-like* Cluster.



a)

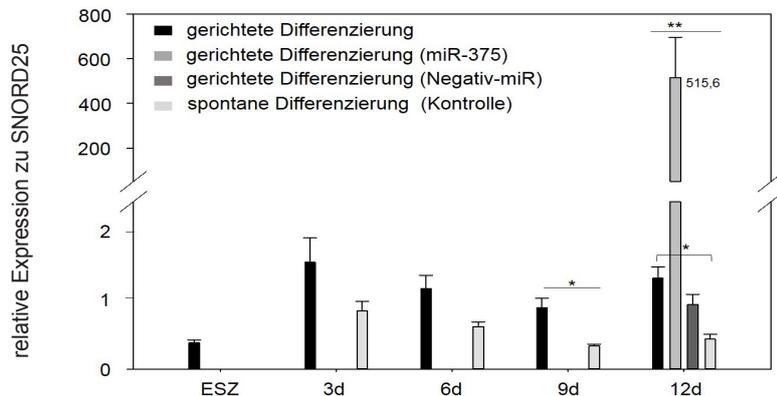


b)

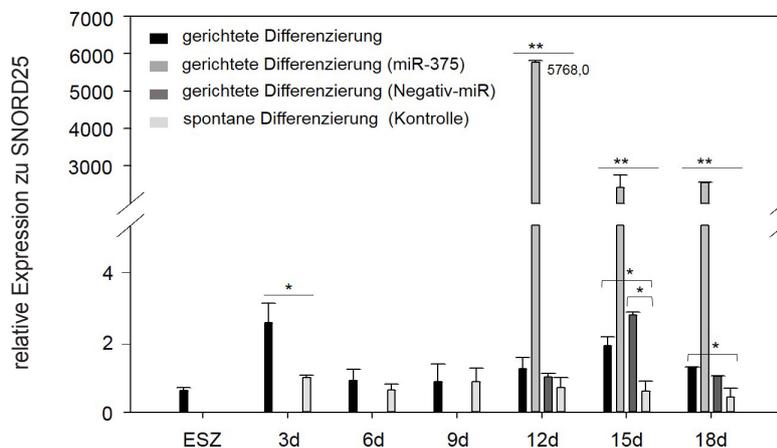


c)

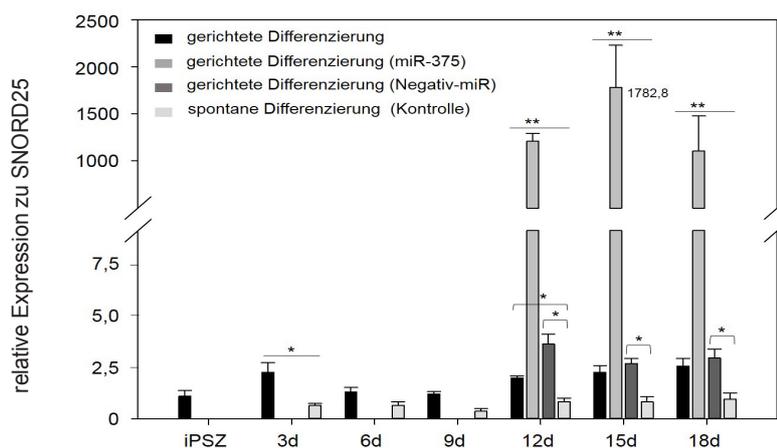
Abb. 44: Relative Quantifizierung der Auswirkung einer Transfektion von reifen miR-375-Molekülen am neunten (alle Zelllinien) und zwölften (Linien HUES-8 und IMR90-4) Tag des *in vitro* Differenzierungsprozesses auf die Expression von **miR-375** im weiteren Differenzierungsverlauf bis zum Endpunkt des Protokolls (= 18d, Linien HUES-8 und IMR90-4). Gegenübergestellt sind die Ergebnisse der Messungen aus differenzierenden Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, d = Tag.



a)



b)



c)

Abb. 45: Relative Quantifizierung der Auswirkung einer Transfektion von reifen miR-375-Molekülen am neunten (alle Zelllinien) und zwölften (Linien HUES-8 und IMR90-4) Tag der *in vitro* Differenzierung auf die Expression der **pre-miR-375** im weiteren Differenzierungsverlauf bis zum Endpunkt des Protokolls (= 18d, Linien HUES-8 und IMR90-4). Aus der Detektion der unreifen *pre*-miR lassen sich Rückschlüsse auf eine potenzielle Induktion der endogenen miR-375-Produktion schließen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Messungen aus differenzierenden Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, d = Tag.

Der detektierte Expressionsverlauf von miR-375 in den gerichtet differenzierten Zellen zeigte, wie bereits in Kapitel 3.2.2 dargestellt, einen zweipfeligen Verlauf (Zelllinien HUES-8 und IMR90-4) mit einer erstmalig starken Expression zum Zeitraum der Entstehung entodermaler Zellen. Der zweite Expres-

sionsanstieg konnte zusammentreffend mit der Generierung *PDX1*-exprimierender pankreatischer Vorläuferzellen ab dem neunten Tag der Differenzierung beobachtet werden. Das Expressionsniveau der miR-375 blieb anschließend bis zum Ende des Differenzierungsverlaufs in den gerichtet differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4, welche insgesamt 18 Tage inkubiert wurden, relativ konstant. In den spontan differenzierten Zellen der Kontrollgruppe war vergleichend in allen eingesetzten Zelllinien kein entsprechendes Expressionsmuster zu erkennen. Die Transkription verblieb im gesamten Differenzierungsprozess auf einem gleichbleibend niedrigen Niveau. In der Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen, die zusätzlich am neunten Tag der *in vitro* Differenzierung (alle Zelllinien) und am zwölften Tag (hESZ-Linie HUES-8 und hiPSZ-Linie IMR90-4) mit reifen miR-375-Molekülen transfiziert wurden, konnte übereinstimmend in allen drei verwendeten pluripotenten Zelllinien eine sehr starke Erhöhung der Expression von miR-375 gemessen werden. In den Zellen der Linie H9 ergab sich eine ca. 5500-fache Steigerung, in den Zellen der Linie HUES-8 eine ca. 100-fache Erhöhung und in den Zellen der Linie IMR90-4 stieg die Expression ca. um das 550-Fache im Vergleich zum Niveau der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen an. Für die bis zum Endpunkt des Protokolls (= 18d) differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 konnte gezeigt werden, dass diese deutliche Expressionssteigerung auch im weiteren Entwicklungsverlauf erhalten blieb. Vergleichend dazu konnte in der Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen, die mit einer Negativ-miR an Tag neun (alle Zelllinien) und Tag zwölf (Zelllinien HUES-8 und IMR90-4) transfiziert wurden, keine Steigerung der miR-375-Expression gemessen werden. Für die eingesetzte Negativ-miR ist aktuell laut Herstellerangaben keine spezifische Ziel-mRNA in humanen Zellen bekannt, so dass sie zur Kontrolle bzw. Bestätigung potenzieller Effekte im Rahmen der miR-375-Transfektion eingesetzt werden konnte. Zusätzlich diente sie im Vergleich zur Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen als Anzeiger, dass der Transfektionsvorgang selbst keine messbaren potenziell störenden Effekte in den Zellen auslöste, denn es waren zwischen diesen beiden Gruppen übereinstimmend in allen eingesetzten Zelllinien keine signifikanten Expressionsunterschiede erkennbar.

Sollte es aufgrund der impulsgebenden Wirkung der Transfektion reifer miR-375-Moleküle zur Verbesserung der Bildung pankreatischer und speziell hormonproduzierender Zellen kommen, dann müsste folglich nach bekannter Datenlage zur herausragenden Rolle von miR-375 in diesem Zelltyp eine Steigerung der Expression zu erwarten sein. Um zu überprüfen, ob die in Abbildung 44 gezeigte anhaltende Erhöhung der miR-375-Expression in Folge der Transfektion nicht ausschließlich auf der Messung der in die Zellen eingebrachten Moleküle beruhte, sondern es im Zuge potenziell positiver Effekte auf den Differenzierungsverlauf zur Steigerung der endogenen miR-375-Produktion kam, wurde selektiv die Expression einer im zellulären mikroRNA-Prozessierungsverlauf erzeugten Vorstufe, die *pre*-miR-375 gemessen. Entsprechend dem beobachteten Expressionsmuster von miR-375 in den Zellen der gerichtet differenzierten Gruppe, zeigte die Expression der *pre*-miR-375 einen übereinstimmenden Verlauf mit einem kurzzeitigen Peak zum Zeitfenster der Bildung entodermaler Zellen und einem zweiten, anhaltenden Expressionsanstieg ab dem neunten Tag der Differenzierung. In den Zellen der spontan differenzierten Kontrollgruppe war nur eine sehr geringe Expression ohne Schwankungen im gesamten Differenzierungsverlauf detektierbar. Erfreulicherweise konnte in den Zellen der gerichtet differenzierten Gruppe, die mit reifen miR-375-Molekülen transfiziert wurden, übereinstimmend in allen drei eingesetzten Zelllinien eine deutliche Steigerung der *pre*-miR-375-Expression ab dem zwölften Tag und damit

drei Tage nach der ersten Transfektion beobachtet werden. Dieser Effekt hielt bei den Linien HUES-8 und IMR90-4, die insgesamt 18 Tage differenziert wurden, bis zum Ende des Entwicklungsprozesses an. Insgesamt war bei den Zellen der hESZ-Linie H9 eine maximale Steigerung der Expression um das ca. 350-Fache, bei der hESZ-Linie HUES-8 sogar um das 2.800-Fache und bei der hiPSZ-Linie IMR90-4 um das 700-Fache messbar. Die Niveauunterschiede zwischen den Zelllinien in Bezug auf die Expression von miR-375 und *pre*-miR-375 verdeutlichten die individuell verschiedenen Ausgangslevel in der Produktion der mikroRNA. Aus den qPCR Analysen der *pre*-miR-375-Expression wurde insgesamt ersichtlich, dass sich die anhaltend stark erhöhte Expression von miR-375 in allen verwendeten Zelllinien zu einem großen Anteil aus einer gesteigerten endogenen miR-375-Produktion ergab. Diese Beobachtung zeigte, dass eine gezielte Induktion der miR-375 in pankreatischen bzw. endokrinen Vorläuferzellen positive Effekte auf die Effizienz der Ausbildung dieser spezialisierten Zelltypen ausübt. Die Annäherung an die *in vivo* Bedingungen der Pankreasorganogenese, die sich durch eine starke Expression der miR-375 auszeichnet, führte zur Aktivierung differenzierungsrelevanter Signalwege und Regulationsmechanismen zu denen auch in Form einer positiven Rückkopplungsschleife die Steigerung der endogenen miR-375-Produktion gehört, welche eine effektive Entwicklung Insulin-produzierender Zellen unabdingbar begleitet.

Zur weiteren Charakterisierung der über die miR-375-Transfektion beeinflussten Faktoren innerhalb der sich formierenden pankreatischen Zellen erfolgte die relative Quantifizierung der Expression essenzieller, differenzierungsbestimmender Gene, die wie bereits in Kapitel 1.3.3 beschrieben, durch ihre Aktivität für die schrittweise *in vitro* Reifung der Zellen unverzichtbar sind. Zu diesen Genen gehören *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN*.

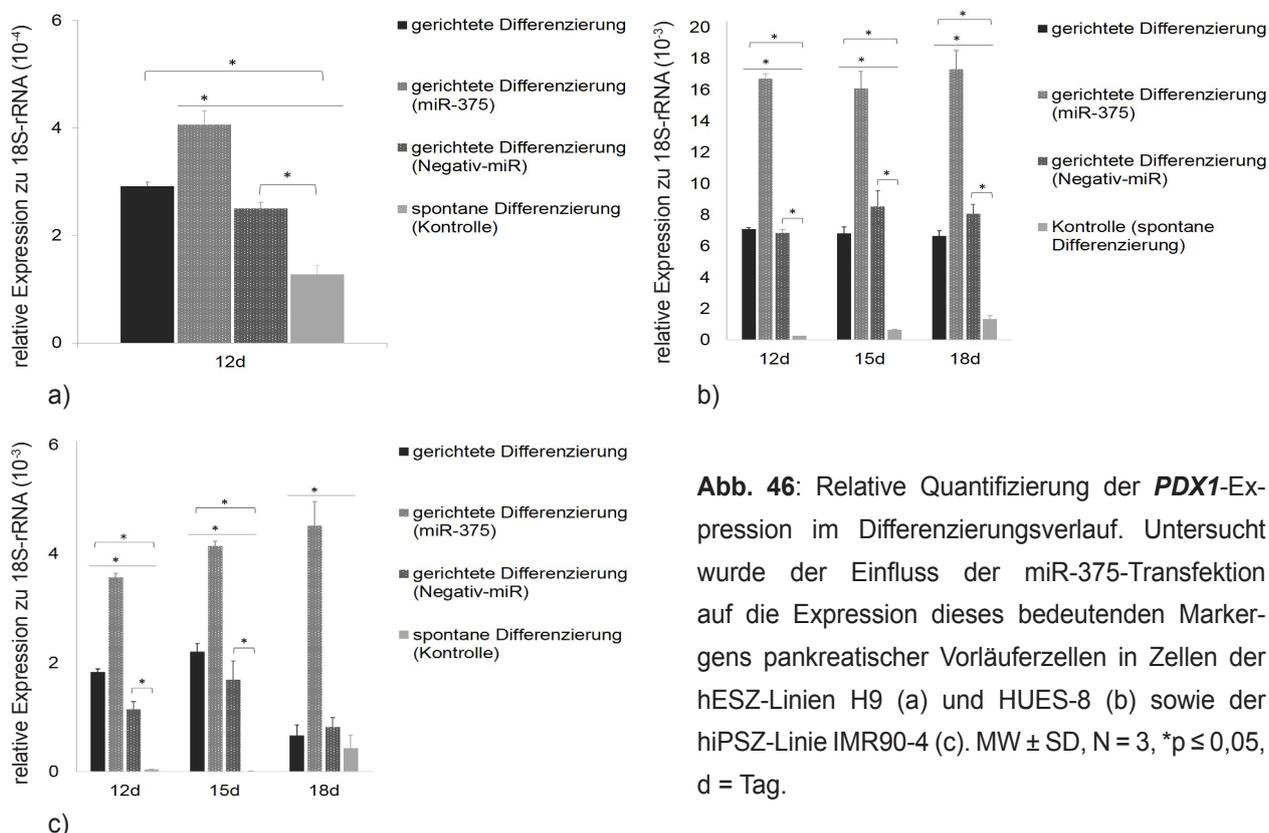


Abb. 46: Relative Quantifizierung der *PDX1*-Expression im Differenzierungsverlauf. Untersucht wurde der Einfluss der miR-375-Transfektion auf die Expression dieses bedeutenden Markergens pankreatischer Vorläuferzellen in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

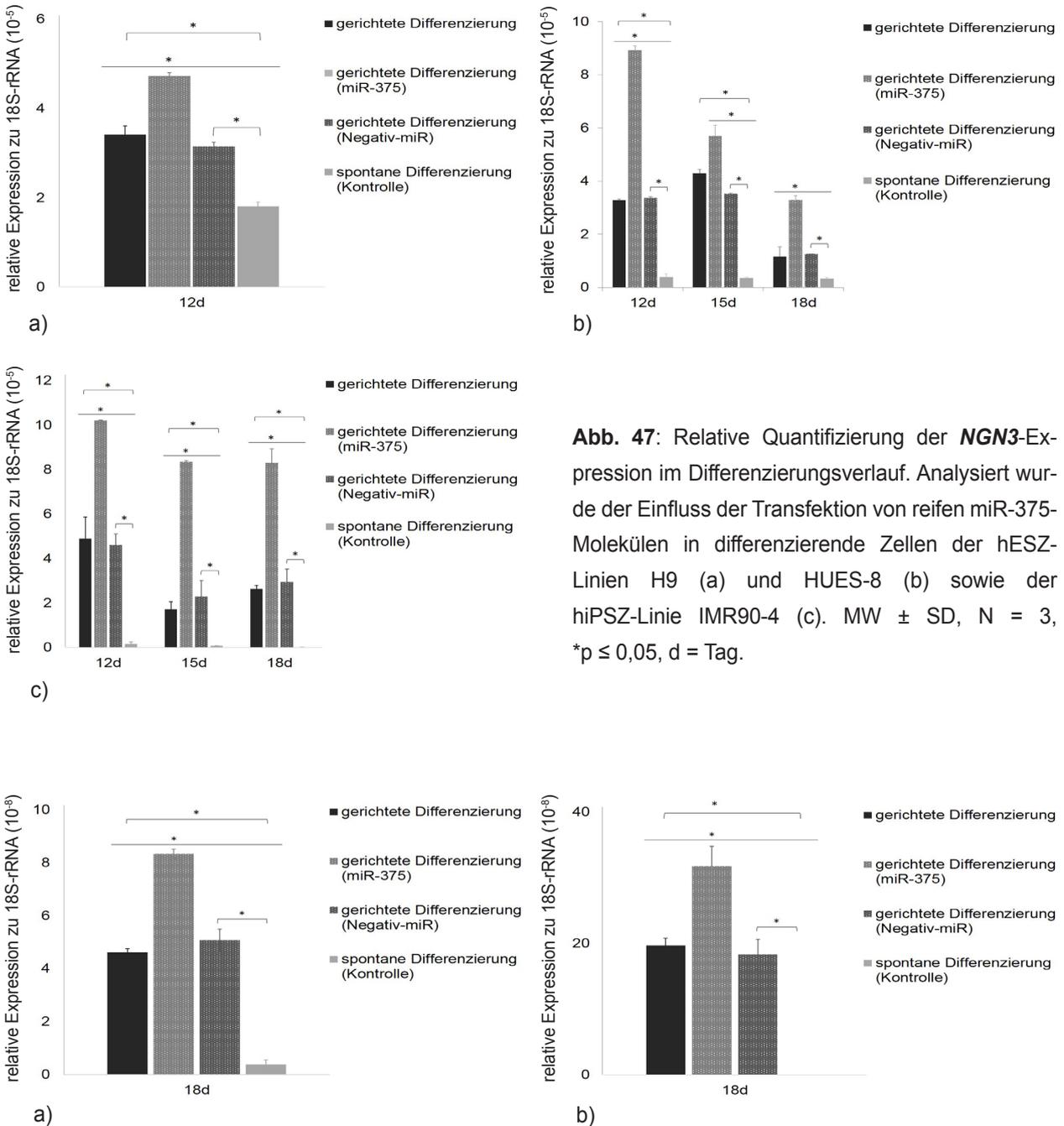


Abb. 47: Relative Quantifizierung der *NGN3*-Expression im Differenzierungsverlauf. Analysiert wurde der Einfluss der Transfektion von reifen miR-375-Molekülen in differenzierende Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

Abb. 48: Relative Quantifizierung der *INSULIN*-Expression am Endpunkt der *in vitro* Differenzierung. Untersucht wurde der Einfluss der Transfektion von reifen miR-375-Molekülen auf die Expression von *INSULIN* in den insgesamt 18 Tage lang differenzierten Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

Die relative Quantifizierung der Expression von *PDX1* als wichtigstem Marker pankreatischer Vorläuferzellen zeigte, dass eine Transfektion reifer miR-375-Moleküle am neunten Tag (alle Zelllinien) und zwölften Tag (Zelllinien HUES-8 und IMR90-4) mit einer signifikanten Erhöhung der *PDX1*-Expression ab dem zwölften Differenzierungstag korrelierte. In der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-

4, welche insgesamt 18 Tage lang differenziert wurden, konnte diese Expressionssteigerung anhaltend bis zum Endpunkt der Differenzierung detektiert werden. In den bis zum zwölften Tag des *in vitro* Differenzierungsprotokolls inkubierten Zellen der hESZ-Linie H9 konnte ebenfalls ein deutlicher Anstieg der *PDX1*-Expression beobachtet werden, allerdings zeigte sich in den drei unabhängig durchgeführten Versuchswiederholungen insgesamt kein signifikanter Unterschied zur Gruppe der Zellen, die gerichtet unter Nutzung des Basis-Protokolls differenziert wurden. Dies konnte mit Niveauschwankungen in der *PDX1*-Expression und damit verbundener Standardabweichung in Zellen der mit miR-375 transfizierten Gruppe in den einzelnen Versuchsrepliken begründet werden, denn im Vergleich zur Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen, die mit Molekülen der Negativ-miR transfiziert wurden, als Transfektionskontrolle dienten und so der Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen entsprachen, war eine signifikante Erhöhung der *PDX1*-Expression detektierbar. Insgesamt verdeutlichten die erhobenen Daten das unterschiedliche Potenzial der eingesetzten Zelllinien zur Differenzierung in die pankreatische Entwicklungsrichtung. Das Niveau der *PDX1*-Expression lag bei den Zellen der hESZ-Linie H9 deutlich unter dem der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4.

Der übereinstimmende Effekt einer starken Steigerung der *PDX1*-Expression in Zellen aller verwendeten Linien, in denen mittels Transfektion die Konzentration von miR-375 und nachweislich auch die endogene Produktion erhöht wurde, wies allerdings auf grundlegende durch die miR-375 induzierbare und zelllinienunabhängige Regulationsmechanismen hin. Ein übereinstimmendes Bild zwischen allen eingesetzten Zelllinien ergab sich auch bei der Analyse der Expression des bedeutenden endokrin-assoziierten Gens *NGN3*. Auch hier korrelierte die an Tag neun (alle Zelllinien) und an Tag zwölf (Zelllinien HUES-8 und IMR90-4) des Differenzierungsprozesses durchgeführte Transfektion von miR-375-Molekülen mit einer signifikant gesteigerten *NGN3*-Expression, die in den über 18 Tage differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 auch bis zum Ende des Differenzierungsvorganges auf einem deutlich erhöhten Niveau erhalten blieb im Vergleich zur Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen. Keine messbaren Expressionsunterschiede ergaben sich in der Gruppe gerichtet differenzierter und mit Negativ-miR Molekülen transfizierter Zellen.

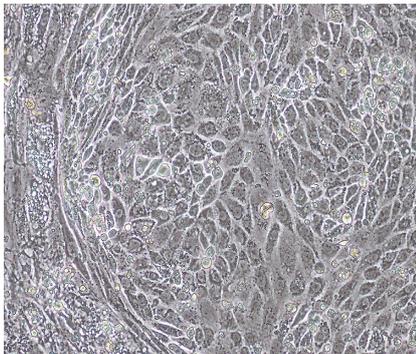
Die relative Quantifizierung der Expression von *INSULIN* geschah nur in differenzierten Zellen der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4, da nur diese für insgesamt 18 Tage inkubiert wurden. Wie bereits aus der in Kapitel 3.2.1 dargestellten Charakterisierung des zu Grunde liegenden Basisprotokolls ersichtlich, kommt es erst nach 18 Tagen *in vitro* Differenzierungsprozess zu einer deutlichen Aktivierung der *INSULIN*-Expression. Erneut konnte eine Korrelation zwischen miR-375-Transfektion am neunten und zwölften Tag der Differenzierung und einer signifikant erhöhten *INSULIN*-Expression in den Zellen beider Linien beobachtet werden.

In Folge der gezielten Modulation des Basis-Differenzierungsprotokolls durch Transfektion von miR-375-Molekülen in den verwendeten hESZ und hiPSZ konnte übereinstimmend eine starke und anhaltende Erhöhung der Expression der differenzierungsrelevanten Gene *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* nachgewiesen werden. Ergänzend zur Analyse von Effekten auf die Transkription der untersuchten Gene im Zuge der miR-375-Transfektion, wurden auch potenzielle Auswirkungen auf die Translation dieser und weiterer bedeutender Pankreas-assoziiierter Marker im Rahmen von Immunfluoreszenz-Analysen untersucht. Die Präsentation dieser Ergebnisse erfolgt in den Abbildungen 67 und 68 im Kapitel 3.4.4.

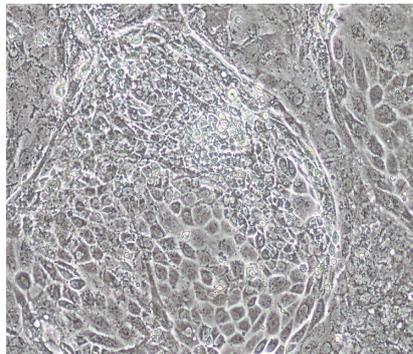
3.4.2 Glukosestimulation

Als ein Ziel der vorliegenden Arbeit erfolgte die Etablierung eines, auf den Einsatz relativ weniger chemischer Induktoren beschränkten, Protokolls zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung mit dem die vergleichende Entwicklung Insulin-produzierender Zellen aus verschiedenen pluripotenten Zelltypen wie hESZ und hiPSZ möglich war. Nachdem in Kapitel 3.2.1 die erfolgreiche, reproduzierbare Anwendbarkeit dieses Protokoll, aber auch dessen Limitierungen in Bezug auf die Differenzierungseffizienz aufgezeigt werden konnten, stand eine gezielte Verbesserung des Differenzierungsvorganges im Fokus der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente.

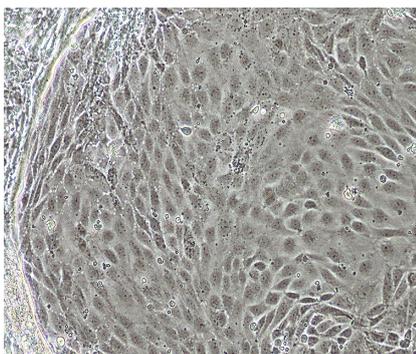
Als bedeutende Einflussgröße der pankreatischen Differenzierung kann, wie in der Einleitung unter Abschnitt 1.5.2 beschrieben, der Nährstoff Glukose angesehen werden. Die folgend dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen von Differenzierungsexperimenten erstellt, bei denen die differenzierenden Zellen über einen kurzen definierten Zeitraum von drei Tagen nach der entodermalen Festlegung und somit während der Ausbildung *PDX1*-exprimierender pankreatischer Vorläuferzellen in einer, im Vergleich zum normalen Zuckergehalt im Verlauf des Basisprotokolls, stark erhöhten Glukosekonzentration von 50 mM inkubiert wurden. Die Untersuchungen zum Einfluss der Glukose auf die Differenzierungseffizienz wurden vergleichend an Zellen der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 durchgeführt. Aufgrund der, im Rahmen der allgemeinen Charakterisierung zur Ermittlung des pankreatischen Differenzierungspotenzials aller zur Verfügung stehenden Zelllinien ermittelten Daten, wurde die hESZ-Linie H9 in den weiterführenden Studien zur Modifikation des Basisprotokolls durch eine kurzfristige Steigerung der Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium nicht berücksichtigt.



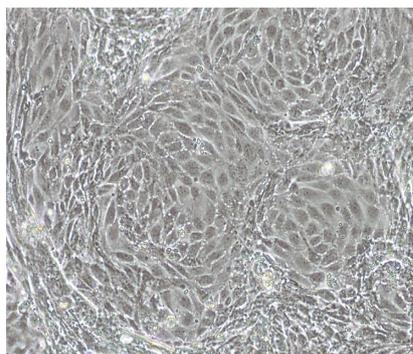
a)



b)



c)



d)

Abb. 49: Morphologiewandel der differenzierten Zellen der Linien HUES-8 (a, b) und IMR90-4 (c, d) an Tag 18 des *in vitro* Differenzierungsverlaufs. Auf der linken Seite sind jeweils Zellen zu sehen, die vom sechsten bis neunten Tag mit 50 mM Glukose im Medium inkubiert wurden. Auf der rechten Seite sind Bilder von gerichtet differenzierten Zellen zu sehen, die nach dem Basisprotokoll ohne Modifikationen differenziert wurden. Maßstab: 100 µm.

Die Morphologie der unter hoher Glukosekonzentration gerichtet differenzierten Zellen zeigte große Übereinstimmung zu der nach dem Basisprotokoll differenzierter Zellen. Es bildeten sich kompakte und deutlich abgegrenzte Insel-artige Strukturen mit epitheliale Charakter, die in der mittels Glukose stimulierten Gruppe in Umfang und Struktur reifer erschienen.

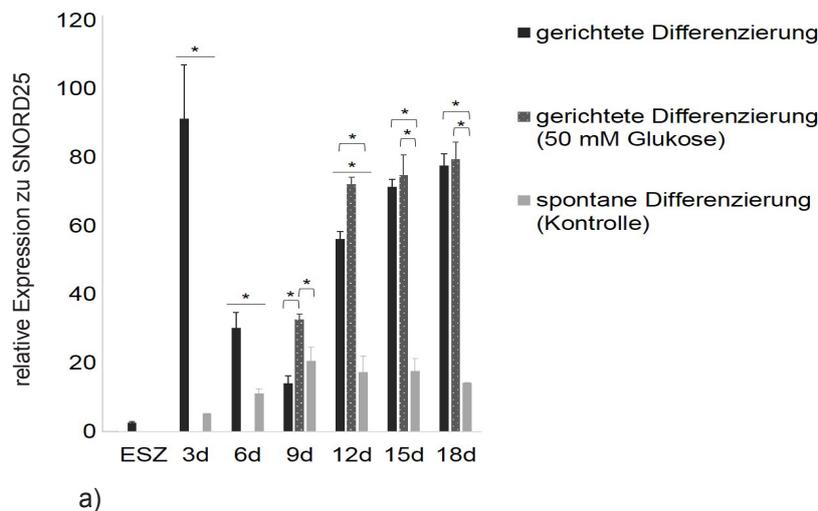
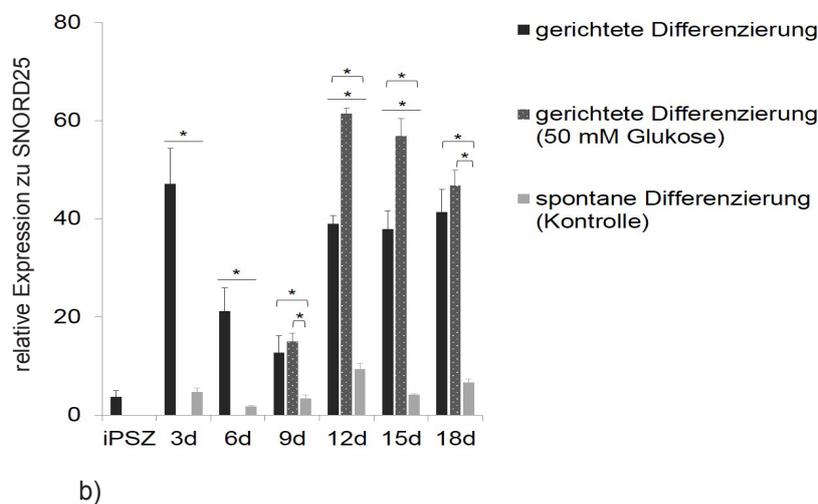


Abb. 50: Relative Quantifizierung der Expression von **miR-375** in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b) im Differenzierungsverlauf nach zeitlich begrenzter Erhöhung der Glukosekonzentration vom sechsten bis neunten Tag. MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.



Bei der Betrachtung der Ergebnisse zur relativen Quantifizierung des Expressionsmusters von miR-375 im Differenzierungsprozess, fiel erneut der, wie bereits in Kapitel 3.2.2 vorgestellte Verlauf in der Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen auf, der sich durch eine kurzzeitig starke Expression zum Stadium der Ausbildung entodermaler Zellen und einen erneuten und beständigen Anstieg in den späteren Differenzierungsstadien ab der Formierung pankreatischer Vorläuferzellen auszeichnete. Diese deutliche Expression im Zuge der späten Differenzierungsabschnitte war erhöht in der Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen, die vom sechsten bis neunten Tag im Differenzierungsverlauf unter einer erhöhten Glukosekonzentration von 50 mM im Medium inkubiert wurden. Insgesamt fiel die Steigerung

der Expression allerdings schwächer aus, als nach der in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Modulation mittels miR-375-Transfektion. So konnte nach der kurzzeitigen Erhöhung der Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium in den Zellen der hESZ-Linie HUES-8 nur an den Tagen neun und zwölf eine signifikante Steigerung der miR-375-Expression detektiert werden. Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die mittels Glukose stimulierten Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4. Hier war an den Tagen zwölf und 15 eine signifikante Erhöhung der Expression von miR-375 im Vergleich zur Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen nachweisbar. Allerdings war auch in diesen Zellen der Effekt nicht bis zum 18. Tag der *in vitro* Entwicklung erhalten geblieben. Im direkten Vergleich konnte mit der Modifikation des Differenzierungsprotokolls im Rahmen der miR-375-Transfektion eine maximal über 80-fach erhöhte miR-375-Expression in Zellen der Linie HUES bzw. über 500-fach in den Zellen der Linie IMR90-4 gemessen werden. Nach der Stimulation der Zellen mit Glukose konnte in den Zellen der Linie HUES-8 maximal eine ca. 1,3-fache und in den Zellen der Linie IMR90-4 eine ca. 1,6-fache Steigerung der miR-375-Expression beobachtet werden. Damit war eine positive Korrelation zwischen einer begrenzt erhöhten Glukosekonzentration auf der einen Seite und der miR-375-Expression auf der anderen Seite feststellbar, aber diese fiel im Vergleich zur Induktion mittels Transfektion reifer miR-375-Moleküle im Differenzierungsprozess deutlich geringer aus. Da Glukose, wie im Rahmen der Einleitung erläutert, eine Vielzahl zellulärer Signalwege beeinflusst und damit auch zu indirekten Effekten beitragen kann, die sich nicht auf Ebene der Transkription nachweisen lassen, wurden weiterführende Untersuchungen auf Proteinebene im Rahmen von Immunfluoreszenzanalysen und eines C-Peptid ELISA durchgeführt, deren Ergebnisse in den sich anschließenden Kapiteln präsentiert werden. Die folgenden Diagramme zeigen zunächst die Ergebnisse zur relativen Quantifizierung der Expression differenzierungssteuernder Gene wie *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* unter dem Einfluss der Glukosestimulation. Zusätzlich dienten die erhobenen Daten zur Expression von *CHREBP* und *NEUROD1* zur Einordnung der, im Rahmen der hohen Glukosekonzentration, ausgelösten zellulären Regulationsmechanismen, wie sie im Abschnitt 1.5.2 vorgestellt wurden.

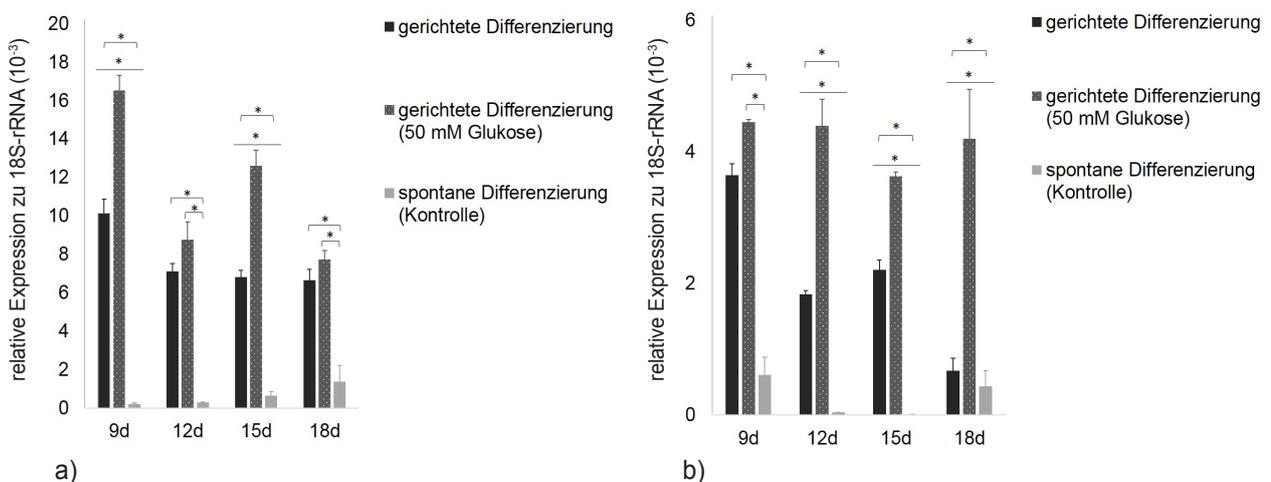


Abb. 51: Relative Quantifizierung der Expression von *PDX1* im *in vitro* Differenzierungsverlauf nach erhöhter Glukosekonzentration von 50 mM im Differenzierungsmedium vom sechsten bis neunten Tag. Analysiert wurden Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

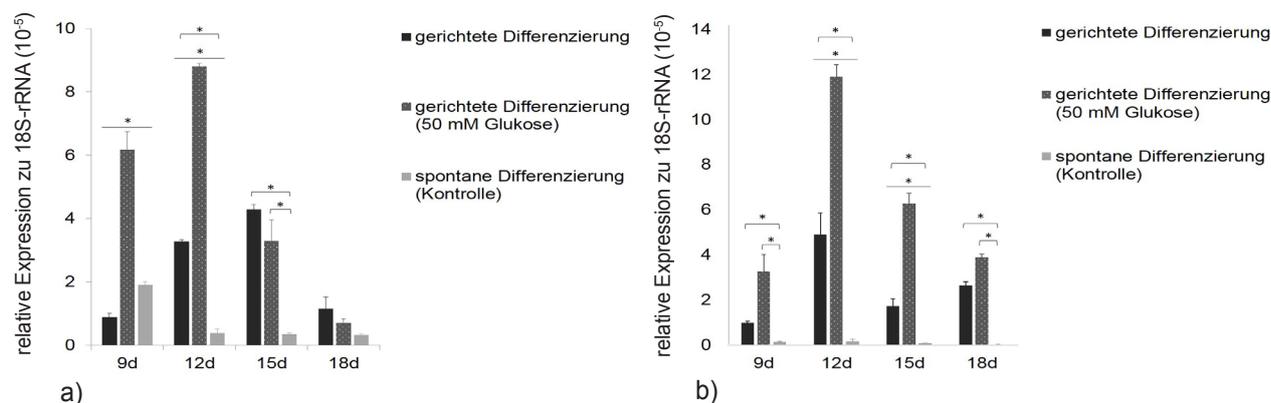


Abb. 52: Relative Quantifizierung der Expression von **NGN3** während der *in vitro* Differenzierung, nachdem vom sechsten bis neunten Tag des Protokolls eine Gruppe gerichtet differenzierter Zellen mit einer Glukosekonzentration von 50 mM im Medium inkubiert wurde. Analysiert wurden vergleichend Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). MW ± SD, *p ≤ 0,05, N = 3, d = Tag.

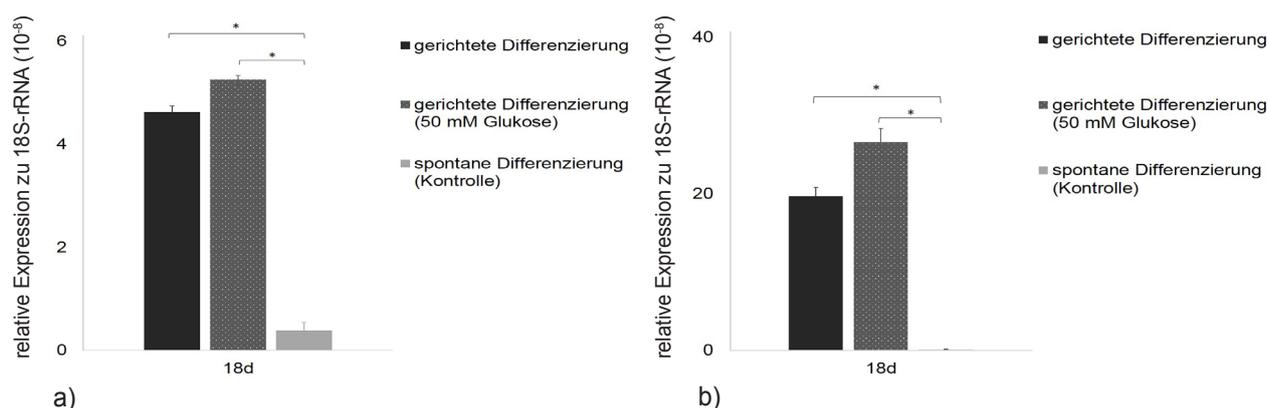


Abb. 53: Relative Quantifizierung der Expression von **INSULIN** am 18. Tag, dem Endpunkt des *in vitro* Differenzierungsprotokolls, wobei der potenzielle Einfluss einer erhöhten Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium vom sechsten bis neunten Tag des Protokolls bei einer Gruppe gerichtet differenzierter Zellen im Fokus stand. Analysiert wurden Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

Sowohl in den mit Glukose stimulierten gerichtet differenzierten Zellen der Linie HUES-8, als auch der Linie IMR90-4, korrelierte die Einwirkung des stark erhöhten Glukosegehalts von 50 mM im Differenzierungsmedium vom sechsten bis neunten Tag der Differenzierung mit einer erhöhten Expression von **PDX1** bis zum Endpunkt des Entwicklungsprozesses. Allerdings konnte dieser Trend in den Zellen der Linie HUES-8 nur am neunten und 15. Tag der Differenzierung als statistisch signifikant abgesichert werden, wohingegen in den Zellen der Linie IMR90-4 vom zwölften bis 18. Tag eine signifikante Steigerung der **PDX1**-Expression im Vergleich zur Gruppe gerichtet differenzierter Zellen, die ohne weitere Modifikationen nach dem Basisprotokoll inkubiert wurden, nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zur Modulation des Basis-Differenzierungsprotokolls im Rahmen der miR-375-Transfektion, fiel die korrelierte Erhöhung der **PDX1**-Expression nach erfolgter Glukosestimulation in beiden analysierten Zell-

linien allerdings wie schon bei der miR-375-Expression beobachtet, geringer aus. Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der gemessenen Expression von *NGN3*. Die Glukosestimulation korrelierte mit einer gesteigerten Expression von *NGN3* im Vergleich zu gerichtet differenzierten Zellen, die ohne weitere Modifikationen nach dem Basis-Differenzierungsprotokoll inkubiert wurden. In den Zellen der Linie HUES-8 konnten dabei am neunten und zwölften Tag und in den Zellen der Linie IMR90-4 am zwölften und 15. Tag signifikante Effekte ermittelt werden. Dabei wiederholte sich das zeitlich leicht versetzte Muster zwischen den beiden Zelllinien, welches schon bei der Korrelation zwischen Glukosestimulation und Expression von *PDX1* zu beobachten war. Sowohl in den gerichtet differenzierten, als auch in den zusätzlich mit Glukose stimulierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 war insgesamt ein Trend absinkender *NGN3*-Expression zum Ende des Differenzierungsverlaufs zu beobachten, wobei die Expression in der Gruppe der Glukose-stimulierten Zellen zwar ebenfalls leicht absank, aber insgesamt auf einem höheren Niveau erhalten blieb. Insgesamt muss auch in Bezug auf die Korrelation zwischen Glukosestimulation und *NGN3*-Expression im Vergleich zur Modifikation des Differenzierungsprotokolls mittels miR-375-Transfektion festgehalten werden, dass sich die detektierten Auswirkungen auf die Expression von *NGN3* während der späten Differenzierungsabschnitte in geringerem Ausmaß darstellen. Diese Beobachtung setzte sich auch bei der Analyse der Expression von *INSULIN* fort. Nach erfolgter Glukosestimulation vom sechsten bis neunten Tag im Differenzierungsverlauf konnte am Endpunkt der Entwicklung, anders als bei erfolgter Transfektion von miR-375, keine signifikante Steigerung der *INSULIN*-Expression detektiert werden. Insgesamt stellte die Modifikation der Glukosekonzentration neben der Transfektion von miR-375-Molekülen eine erfolgreiche Möglichkeit zur Verbesserung der Differenzierungseffizienz dar. Die korrelierende Steigerung der Expression bedeutender Marker wie *PDX1* und *NGN3* waren bereits ab dem neunten Tag des zellulären Entwicklungsprozesses messbar und damit in einer der entscheidenden Phasen der *in vitro* Differenzierung. Nur die hier entstehenden *PDX1*-exprimierenden Vorläuferzellen bildeten das Ausgangsmaterial für alle spezialisierten pankreatischen Zelltypen. Die Steigerung der *PDX1*-Expression in diesem Stadium erlaubte demnach die effektivere Generierung einer größeren Anzahl von Vorläuferzellen mit weiterem Entwicklungspotenzial.

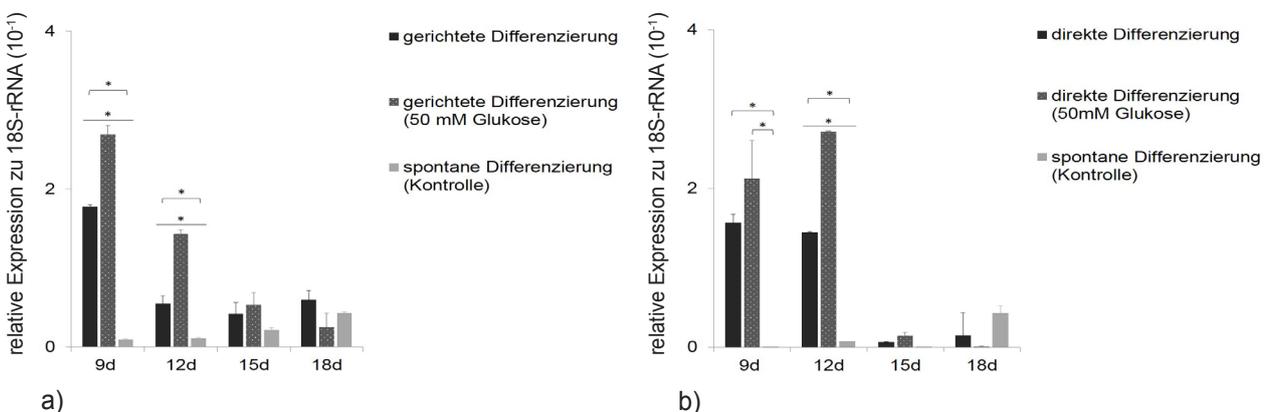


Abb. 54: Relative Quantifizierung der *CHREBP*-Expression im Verlauf der späten Differenzierungsetappen nachdem eine Gruppe gerichtet differenzierter Zellen unter einer erhöhten Glukosekonzentration von 50 mM im Differenzierungsmedium vom sechsten bis neunten Tag des Protokolls inkubiert wurde. Vergleichend erfolgte die Analyse von Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). MW \pm SD, N = 3, *p \leq 0,05, d = Tag.

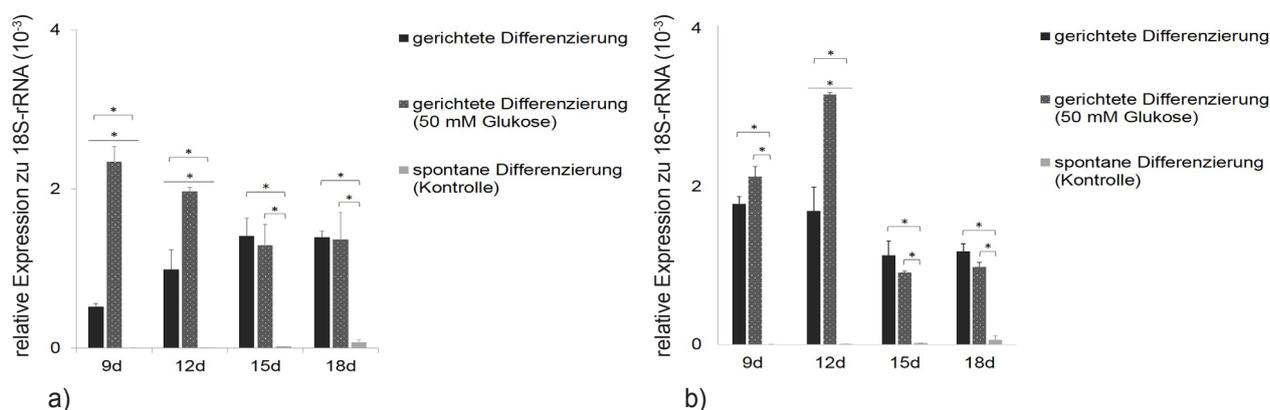


Abb. 55: Relative Quantifizierung der Expression von **NEUROD1** im Differenzierungsverlauf nachdem eine Gruppe gerichtet differenzierter Zellen mit einer Glukosekonzentration von 50 mM im Differenzierungsmedium vom sechsten bis neunten Tag des Protokolls stimuliert wurden. Die Analyse von Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b) ist vergleichend dargestellt. MW \pm SD, N = 3, *p \leq 0,05, d = Tag.

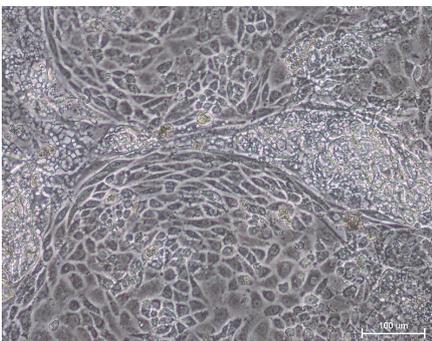
Das grundlegende Muster der Expression von **CHREBP** wies sowohl in den beiden analysierten Zelllinien als auch in den Gruppen der gerichtet differenzierten Zellen und der zusätzlich mit Glukose stimulierten Zellen große Ähnlichkeiten auf. Im Stadium der Ausbildung pankreatischer bzw. endokriner Vorläuferzellen (neunter bis zwölfter Tag) konnte eine deutliche Expression von **CHREBP** nachgewiesen werden, wobei die Glukosestimulation mit einer signifikanten Steigerung am neunten und zwölften Tag in den Zellen der Linie HUES-8 bzw. am zwölften Tag in Zellen der Linie IMR90-4 korrelierte. Mit fortschreitender Differenzierung sank die **CHREBP**-Expression sowohl in den gerichtet differenzierten Zellen, als auch in den zusätzlich mit Glukose stimulierten Zellen deutlich. Die Expression von **NEUROD1** war ab dem neunten Tag der Differenzierung deutlich messbar und blieb in den gerichtet differenzierten Zellen bis zum Ende des Protokolls auf annähernd konstantem Niveau erhalten. Die Glukosestimulation korrelierte mit einer deutlichen Erhöhung der Transkriptmenge von **NEUROD1** im gleichen Zeitfenster, in dem auch die Steigerung der Expressionsrate von **CHREBP** detektierbar war. Ab dem 15. Tag des Differenzierungsverlaufs war allerdings eine Anpassung des Expressionsniveaus auf das der nach dem Basisprotokoll gerichtet differenzierten Zellen messbar.

3.4.3 Kombination aus Induktion von miR-375 und Glukosestimulation

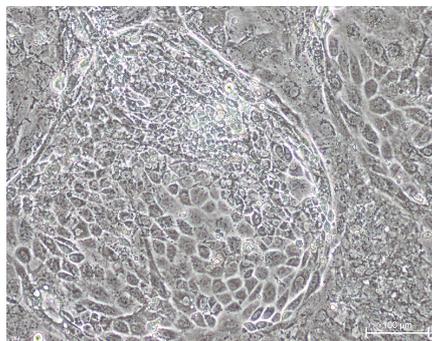
Die beobachtete positive Korrelation zwischen den durchgeführten Modifikationen des Basisprotokolls, wie der zeitlich begrenzten Stimulation der sich formierenden pankreatischen Vorläuferzellen mit einer hohen Glukosekonzentration von 50 mM im Differenzierungsmedium bzw. der gezielten Induktion der miR-375-Produktion in Folge einer zweimaligen Transfektion reifer miR-375-Moleküle in ausgebildete pankreatische bzw. endokrine Progenitorzellen und der Expression sowie Translation wichtiger differenzierungssteuernder Gene, führte zur Aufstellung der Hypothese, dass ein kombinierter Einsatz beider zeitlich aufeinander aufbauender Protokollmodulationen potentiell additive bzw. synergistische Effekte auf die *in vitro* Differenzierungseffizienz ausüben kann.

Wie im Kapitel 2.1.5.3 erläutert, wurden dafür gerichtet differenzierte Zellen vom sechsten bis neunten Tag des Differenzierungsprozesses in Medium mit einer stark erhöhten Glukosekonzentration von 50 mM inkubiert. Es schloss sich die Transfektion der generierten pankreatischen Vorläuferzellen mit reifen miR-375-Molekülen an Tag neun an, welche an Tag zwölf in den gebildeten endokrinen Progenitorzellen noch einmal wiederholt wurde. Die Glukosestimulation der sich entwickelnden Zellen führte, wie im Abschnitt 3.4.2 dargestellt, zur Steigerung der Aktivität bedeutender Gene, die eine effektive weitere Differenzierung in Richtung Beta-Zellen ermöglichten. In diesen vermehrt produzierten *PDX1*-exprimierenden Vorläuferzellen wurde anschließend über die Transfektion von miR-375 deren endogene Produktion gesteigert, was wiederum im Sinne einer positiven Rückkopplung die weitere Spezialisierung eines endokrinen Zelltyps vorantreiben kann.

Die herbeigeführte starke Expression von *PDX1*, *NGN3* und *NEUROD1* kann ebenfalls zur Aktivierung von miR-375 beitragen, da im Promotorbereich des miR-Gens entsprechende Bindungsstellen nachweisbar sind. Damit ist die Ausbildung und Aktivierung eines verzweigten Netzwerkes aus TKF und mikroRNAs denkbar, in dem die induzierten Faktoren sich wechselseitig positiv beeinflussen und damit im Sinne einer Steigerung der *in vitro* Differenzierungseffizienz agieren.



a)



b)

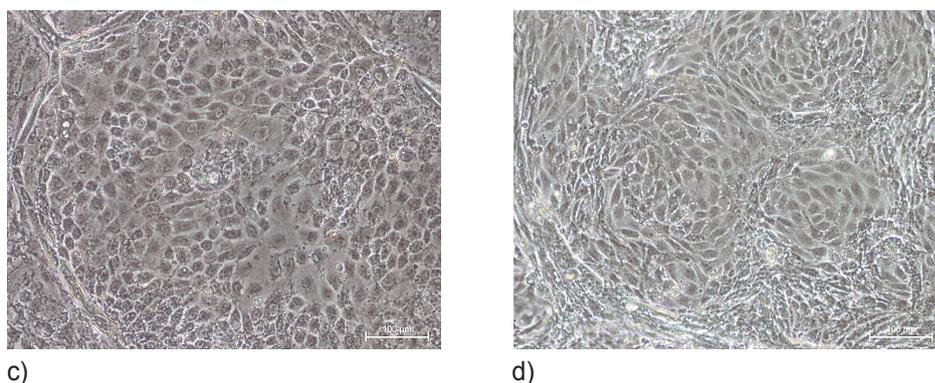


Abb. 56 (S. 106 - 107): Morphologieveränderung der differenzierten Zellen am 18. Tag des Entwicklungsprozesses. Gegenübergestellt sind Bilder der hESZ-Linie HUES-8 (a, b) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (c, d). Vergleichend zeigen die Bilder a und c jeweils gerichtet differenzierte Zellen, die im Rahmen der kombinierten Modifikation einer Glukosestimulation und der anschließenden miR-375-Transfektion ausgesetzt waren. Auf den Bildern b und d sind zum Vergleich die Aufnahmen von gerichtet differenzierten Zellen unter Verwendung des Basisprotokolls ohne weitere Modifikationen zu sehen. Maßstab: 100 µm.

Beim Vergleich der Abbildungen zur Zellmorphologie am Endpunkt des Differenzierungsprozesses (= 18d) fiel insgesamt eine große Ähnlichkeit zwischen den beiden zur Differenzierung eingesetzten Zelllinien auf. Die Variante der kombinierten Modulation des Differenzierungsprotokolls führte zur Ausbildung klar zur Umgebung abgegrenzter *islet-like* Cluster aus Zellen mit epithelialem Charakter, wobei die Abgrenzung und der Aufbau bzw. die strukturelle Anordnung der Zellen im Vergleich zur Gruppe direkt differenzierter Zellen unter Verwendung des Basisprotokolls ausgeprägter erschien. Die mikroskopischen Aufnahmen können nur einen kleinen repräsentativen Ausschnitt aus der bewachsenen Zellkulturschale abbilden, auf der sich eine sehr homogene Population der ausgeformten Zellaggregate im Differenzierungsverlauf bildete, die über die gesamte Kulturschale verteilt anwuchsen und trotz teilweise direkt benachbarter Lage nicht ihre klare Abgrenzung untereinander verloren.

In den folgenden Diagrammen werden erneut die Effekte der diesmal kombiniert durchgeführten Modifikationen des Differenzierungsprotokolls auf die Expression der differenzierungssteuernden mikroRNA-375 und die relevanten Gene *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* präsentiert. Neben der Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen, die mit 50 mM Glukose vom sechsten bis neunten Tag des Protokolls inkubiert und anschließend am neunten und zwölften Tag mit miR-375-Molekülen transfiziert wurden, werden vergleichend die ermittelten Werte aus einer entsprechenden Kontrollgruppe dargestellt. In dieser Gruppe wurden direkt differenzierte Zellen ebenfalls mit Glukose stimuliert, aber anschließend mit einer Negativ-miR transfiziert, für die in humanen Zellen keine spezifische Ziel-mRNA bekannt ist. Da im Rahmen der kombinierten Modifikation des Differenzierungsprotokolls potenziell additive bzw. synergistische Effekte im Fokus der Analyse standen, diente die gewählte Kontrollgruppe zur spezifischen Diskriminierung und Bewertung des Ausmaßes von Glukose-induzierten bzw. miR-375-induzierten Veränderungen.

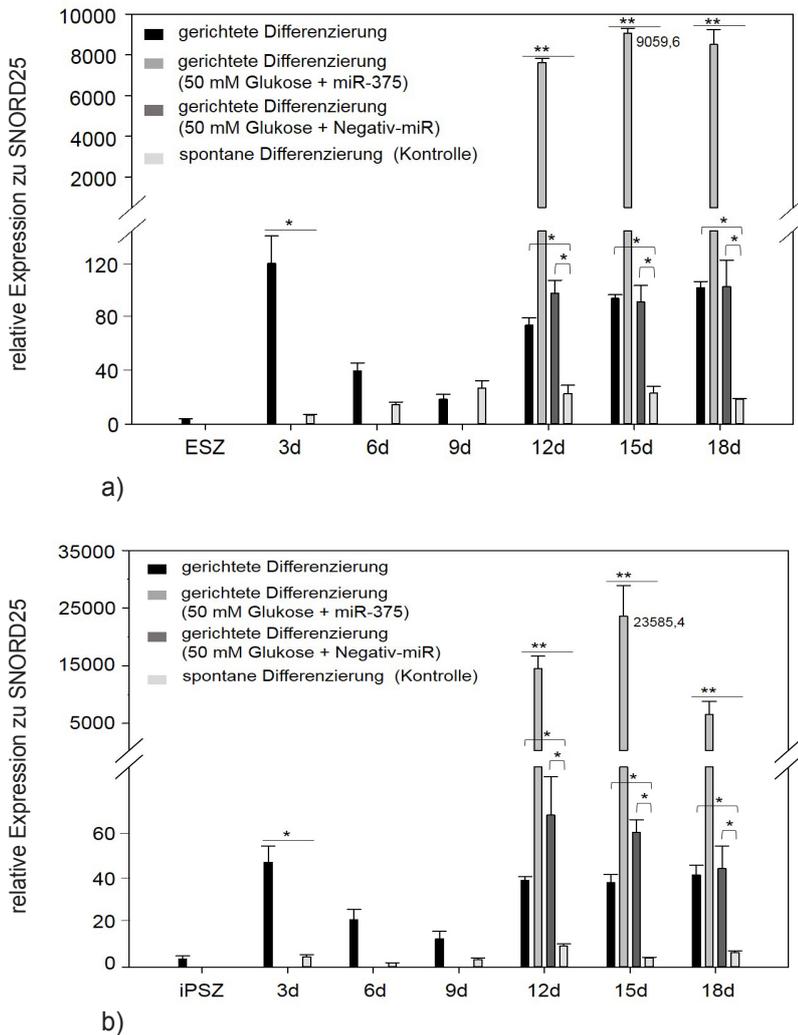


Abb. 57: Relative Quantifizierung des Expressionsmusters von **miR-375** in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b) im Differenzierungsverlauf. Analysiert wurde der Einfluss einer kombinierten Modifikation des Basisprotokolls, bestehend aus der zeitlich begrenzten Erhöhung der Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium und der Transfektion von miR-375-Molekülen am neunten und zwölften Differenzierungstag. MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, d = Tag.

Die Analyse des Expressionsmusters von miR-375 im Differenzierungsverlauf zeigte, dass es in den gerichtet differenzierten Zellen, die zusätzlich kombiniert eine Glukosestimulation vom sechsten bis neunten Tag und eine zweimalige miR-375-Transfektion an Tag neun und zwölf erfahren hatten, zu einer starken Steigerung der miR-375-Expression kam, die bis zum Ende des Differenzierungsprotokolls erhalten blieb. Insgesamt konnte beim Einsatz der kombinierten Modifikationen des Basisdifferenzierungsprotokolls in beiden eingesetzten Zelllinien synergistische Effekte in Bezug auf die miR-375-Expressionssteigerung detektiert werden. In der folgenden Tabelle 5 sind die Ergebnisse aller durchgeführten Protokollvarianten zur Übersicht vergleichend dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass sowohl eine gezielte Erhöhung der miR-375 Konzentration in sich formierenden pankreatischen Vorläuferzellen, als auch eine kurzzeitige Stimulation der Zellen mit einem sehr hohen Glukosegehalt während der Ausbildung PDX1-exprimierender Progenitorzellen positive Effekte auf den weiteren in vitro Differenzierungsprozess hatte. Es kam zur Steigerung der endogenen miR-375-Produktion, was sich positiv auf differenzierungsrelevante, miR-375 regulierte Signalwege zur sukzessiven Spezialisierung der Zellen hin zu einem endokrinen Schicksal auswirkte. Bei der Wichtung der beobachteten Effekte auf der Ebene der Transkription stellte sich die über miR-375-Transfektion vermittelte Protokollmodifikation als weitaus effektiver dar, als die durchgeführte Glukosestimulation.

Expressions- steigerung von miR-375	Kombination: Glukosestimulation + Induktion von miR-375		Induktion von miR-375		Glukosestimulation	
	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4
	~ 100 -fach	~ 585 -fach	~ 91 -fach	~ 538 -fach	~ 1,3 -fach	~ 1,6 -fach

Tabelle 5: Darstellung der jeweils gemessenen maximalen, signifikanten Expressionssteigerung von **miR-375** im Zeitraum vom zwölften bis 18. Tag des *in vitro* Differenzierungsverlaufs im Vergleich zur ermittelten Expression nach dem Basisprotokoll. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse aus den einzeln durchgeführten Protokollmodifikationen und der Kombination.

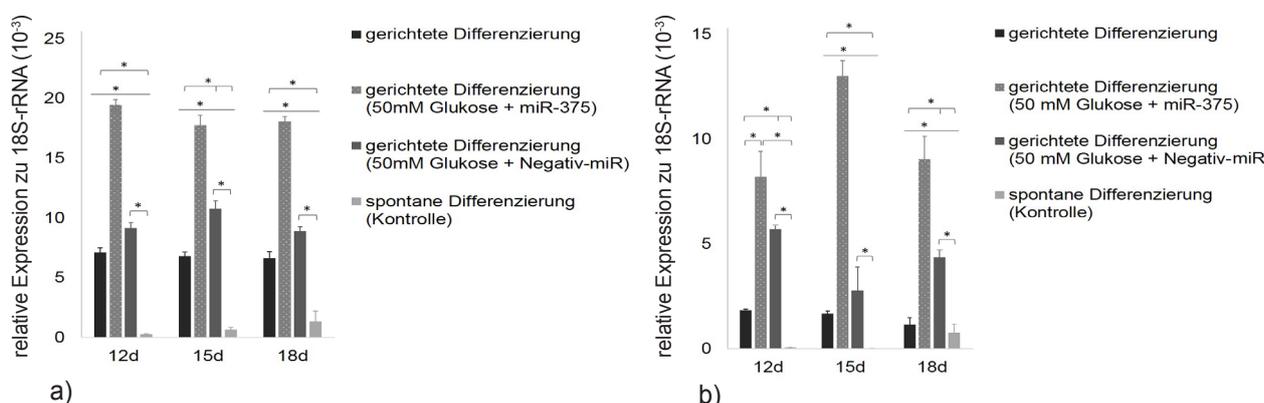


Abb. 58: Relative Quantifizierung der Expression von **PDX1** während der späten *in vitro* Differenzierungsetappen. Analysiert wurde der Einfluss des kombinierten Einsatzes aus erhöhter Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium vom sechsten bis neunten Tag des Protokolls und miR-375-Transfektion am neunten und zwölften Tag in gerichtet differenzierten Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

Die Analyse des Expressionsmusters von **PDX1** in den späten Differenzierungsetappen ergab nach erfolgter kombinierter Anwendung beider Protokollmodifikationen eine starke und anhaltende Steigerung der Expression übereinstimmend in beiden eingesetzten Zelllinien. Die detektierte Erhöhung war zumindest an einigen Tagen der Probenahmen deutlich stärker ausgeprägt, als bei den einzeln durchgeführten Modifikationen, weshalb auf die Ausbildung von additiven Effekten geschlossen werden konnte. Eine vergleichende Gegenüberstellung der ermittelten Ergebnisse aus den verschiedenen Protokollvarianten bietet die folgende Tabelle 6. Die gemessenen Auswirkung stellten sich in beiden genutzten Linien identisch dar, aber das Niveau war in den Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4 etwas höher. Die beobachteten kombinatorischen Effekte in Bezug auf die Expressionssteigerung waren in den Proben beider Zelllinien allerdings nicht an allen untersuchten Tagen übereinstimmend, d.h. nicht durchgehend vom zwölften bis 18. Tag stabil sichtbar.

Expressions- steigerung von <i>PDX1</i>	Kombination: Glukosestimulation + Induktion von miR-375		Induktion von miR-375		Glukosestimulation	
	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4
	~ 2,7 -fach	~ 6,2 -fach	~ 2,4 -fach	~ 4,5 -fach	~ 1,7 -fach	~ 4,0 -fach

Tabelle 6: Gegenüberstellung der jeweils gemessenen maximalen, signifikanten Expressionssteigerung von *PDX1* im Zeitraum vom zwölften bis 18. Tag des *in vitro* Differenzierungsverlaufs im Vergleich zur ermittelten Expression nach dem Basisprotokoll. Vergleichend dargestellt sind die Ergebnisse aus den einzeln durchgeführten Protokollmodifikationen und der Kombination.

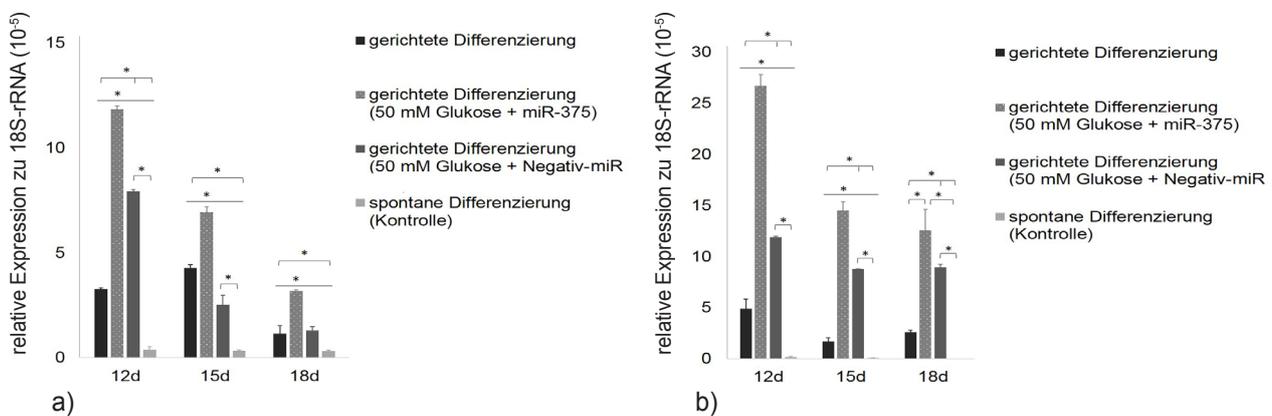


Abb. 59: Relative Quantifizierung der *NGN3*-Expression während der späten *in vitro* Differenzierungsetappen. Untersucht wurde der Einfluss des kombinierten Einsatzes aus erhöhter Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium vom sechsten bis neunten Tag des Protokolls und miR-375-Transfektion am neunten und zwölften Tag in gerichtet differenzierte Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

Die kombiniert angewendete Modifikation der gerichteten Differenzierung über miR-375-Transfektion und Glukosestimulation korrelierte neben dem beobachteten Effekt auf die Expression von *PDX1* auch mit einer deutlichen Erhöhung der Expression von *NGN3*, einem bedeutenden TKF endokriner Vorläuferzellen, dessen Aktivität die sich entwickelnden Zellen sicher auf ein endokrines Schicksal festlegt und damit entscheidend zur forcierten sukzessiven Einengung des Differenzierungspotenzials der Zellen in Richtung Insulin-produzierende Vorläufer beiträgt. Insgesamt wiesen die ermittelten Ergebnisse aus den parallel mit Zellen der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 durchgeführten Experimente große Ähnlichkeiten auf. Die maximale Antwort der Zellen konnte übereinstimmend am zwölften Tag beobachtet werden. Im Vergleich zu den einzeln durchgeführten Protokollmodulationen waren bei der Steigerung der *NGN3*-Expression in beiden Zelllinien kombinatorische Effekte messbar. Die Stärke der gemessenen Erhöhung variiert zwischen den einzelnen untersuchten Tagen im späten Differenzierungsverlauf, wobei in beiden Zelllinien übereinstimmend eine leichte Reduktion bis zum Ende des

Entwicklungsprozesses zu beobachten war. Insgesamt bleibt die Expression von *NGN3* allerdings stabil auf einem höheren Niveau als in direkt differenzierten Zellen ohne weitere Protokollmodifikationen. In der folgenden Tabelle 7 sind die detektierten Ergebnisse aller durchgeführten Protokollmodulationen noch einmal kompakt gegenübergestellt.

Expressions- steigerung von <i>NGN3</i>	Kombination: Glukosestimulation + Induktion von miR-375		Induktion von miR-375		Glukosestimulation	
	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4
	~ 3,5 -fach	~ 5,2 -fach	~ 2,6 -fach	~ 4,7 -fach	~ 2,8 -fach	~ 3,5 -fach

Tabelle 7: Darstellung der jeweils gemessenen maximalen, signifikanten Expressionssteigerung von *NGN3* im Zeitraum vom zwölften bis 18. Tag des *in vitro* Differenzierungsverlaufs im Vergleich zur ermittelten Expression nach dem Basisprotokoll. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse aus den einzeln durchgeführten Protokollmodifikationen und der Kombination.

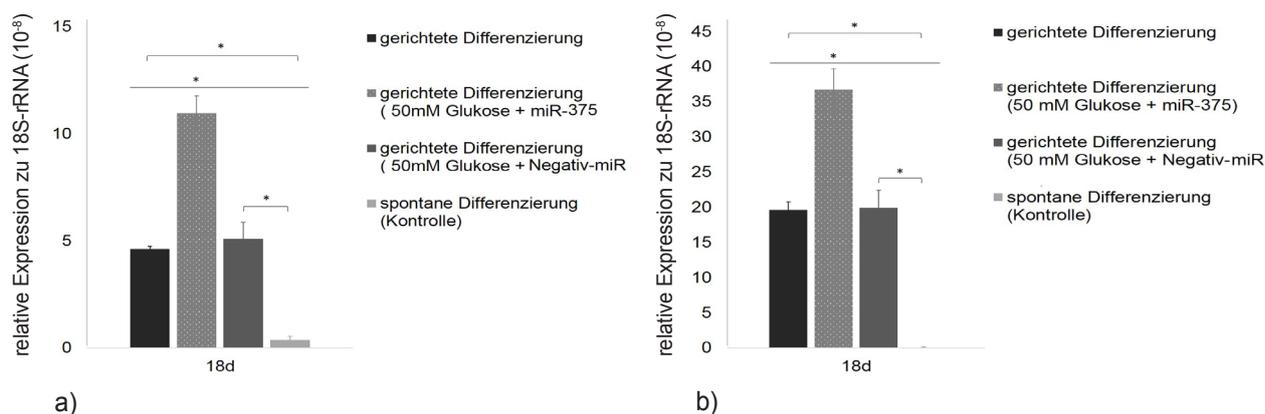


Abb. 60: Relative Quantifizierung der *INSULIN*-Expression am 18. Tag des Differenzierungsprozesses. Untersucht wurden potenzielle Effekte des kombinierten Einsatzes aus erhöhter Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium vom sechsten bis neunten Tag des Protokolls und miR-375-Transfektion am neunten und zwölften Tag in differenzierten Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

In Bezug auf die Expression von *INSULIN* korrelierte übereinstimmend in den differenzierten Zellen beider eingesetzter Linien die kombiniert durchgeführte Protokollmodulation mit einer deutlichen Steigerung am 18. Tag des Differenzierungsprozesses. Beim Vergleich mit den einzeln durchgeführten Protokollmodifikationen konnten hierbei additive Effekte detektiert werden. Damit war nicht nur die grundlegende Antwort der Zellen beider Linien übereinstimmend, sondern auch das Niveau der beobachteten Effekte zeigte große Ähnlichkeiten. In der folgenden Tabelle 8 sind die Ergebnisse zur Steigerung der *INSULIN*-Expression, die sich nach den durchgeführten Modifikationen des Basis-Differenzierungsprotokolls ergaben, noch einmal vergleichend dargestellt.

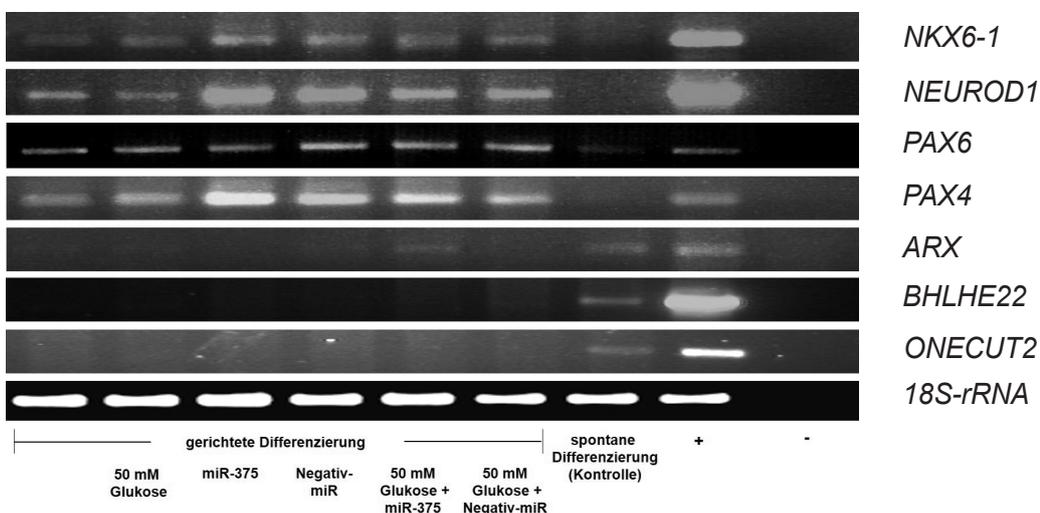
Expressions- steigerung von <i>INSULIN</i>	Kombination: Glukosestimulation + Induktion von miR-375		Induktion von miR-375		Glukosestimulation	
	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4
	~ 2,3 -fach	~ 1,9 -fach	~ 1,8 -fach	~ 1,6 -fach	-	-

Tabelle 8: Gegenüberstellung der jeweils gemessenen signifikanten Expressionssteigerung von *INSULIN* am 18. Tag des *in vitro* Differenzierungsverlaufs im Vergleich zur ermittelten Expression nach dem Basisprotokoll. Vergleichend dargestellt sind die Ergebnisse aus den einzeln durchgeführten Protokollmodifikationen und der Kombination.

Die Ergebnisse zur Korrelation zwischen den kombiniert eingesetzten Modulationen im *in vitro* Differenzierungsprozess und der gesteigerten Expression von wichtigen differenzierungssteuernden Genen wie *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN*, deren Produkte sich in ihrer Funktion gegenseitig positiv beeinflussen, wiesen auf die sehr gute Vergleichbarkeit der eingesetzten humanen pluripotenten Zelllinien hin.

3.4.4 Vergleichende Analysen der Modifikationen des *in vitro* Protokolls am Endpunkt der pankreatischen Differenzierung

Neben der umfassenden Untersuchung von Effekten der zwei durchgeführten Modulationen des etablierten Basisprotokolls zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung jeweils einzeln und in Kombination auf die Expression der bedeutensten Marker, deren Aktivität die effektive Abfolge der einzelnen Differenzierungsetappen markiert, wurden die letztlich entstandenen hormonproduzierenden Zellen am Endpunkt des Entwicklungsprozesses (= 18d) durch die Bestimmung der Expression weiterer endokrin-assoziierten Gene charakterisiert. Im Fokus stand dabei die Einordnung des erreichten Reifegrades der formierten Zellen, wobei die Analysen abermals vergleichend an den differenzierten Zellen der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 durchgeführt wurden.



a)

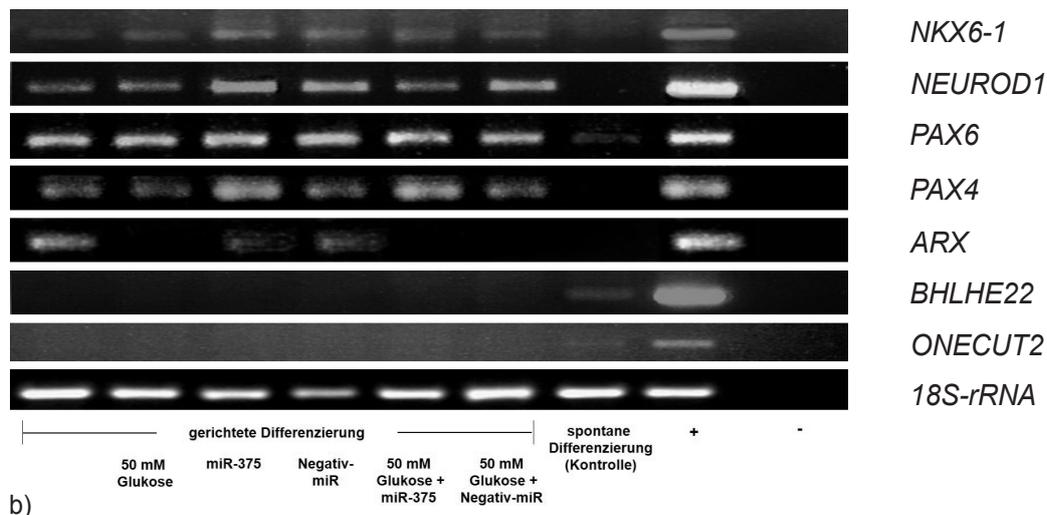


Abb. 61 (S. 112 - 113): Gelelektrophoresebilder zur Expressionsanalyse differenzierungsrelevanter Gene. Die Untersuchungen erfolgten vergleichend in den beiden eingesetzten Zelllinien HUES-8 (a) und IMR90-4 (b) am Endpunkt des *in vitro* Differenzierungsprozesses (= 18d). Die Analyse von *18S-rRNA* diente als Referenz. (+) = Positivkontrolle (humanes Pankreasgewebe bzw. Lungenkarzinomzelllinie) (-) = Negativkontrolle (Reinst-Wasser).

Bei der Betrachtung der Expression von *NKX6-1* und *NEUROD1*, deren Genprodukte als TKF eine bedeutende Rolle bei der Festlegung der differenzierenden Zellen auf ein endokrines Schicksal spielen, fiel die deutlich sichtbare Aktivität in den gerichtet differenzierten Zellen beider eingesetzter Linien zum Endpunkt des Differenzierungsprozesses auf. Sowohl unter Verwendung des Basisprotokolls, als auch im Rahmen der erfolgten Modifikationen kam es demnach nachweislich zur Ausbildung endokriner, hormonproduzierender Zellen, während in der sehr heterogenen Gruppe der spontanen Differenzierung keine Aktivität der beiden Gene nachgewiesen werden konnte. Das bestätigte die bereits durch Expressionsanalysen anderer pankreatischer Markergene wie *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* gezeigte fehlende forcierte Formierung pankreatischer Zellen, was im Rahmen der ermöglichten ungerichteten Differenzierungsvorgänge innerhalb dieser Kontrollgruppe zu erwarten war. Für die Expression von *PAX6* zeigte sich ein vergleichbares Bild, denn in allen Gruppen der gerichteten Differenzierung konnte sowohl in der hESZ- als auch in den hiPSZ-Linie am 18. Tag eine deutliche Expression nachgewiesen werden. Da die Aktivität von *PAX6* auch mit der Entwicklung neuronal-assoziiierter Vorläuferzellen korreliert und in den morphologischen Untersuchungen der spontan differenzierten Kontrollgruppe eindeutig neuronale Strukturen beobachtet wurden, konnte die in dieser Gruppe detektierte leichte Expression der Formierung neuronaler Progenitorzellen zugeordnet werden. Insgesamt bestätigte die klare Aktivität von *NKX6-1*, *NEUROD1* und *PAX6* in den gerichtet differenzierten Zellen beider eingesetzter Linien eine erfolgreiche Generierung pankreatischer, hormonproduzierender Zellen, wobei im Vergleich der durchgeführten Protokollmodulationen keine deutlichen Unterschiede erkennbar waren. Die Bestimmung der Expression von *PAX4* und *ARX* diente zur spezifischen Charakterisierung der formierten endokrinen Zelltypen. Während eine starke *ARX*-Expression mit der Ausbildung von Alpha-Zellen assoziiert ist, wird dieses Gen in Beta-Zellen reprimiert. Im Gegensatz dazu gilt *PAX4* als typischer Marker pankreatischer Beta-Zellen. Übereinstimmend konnte in beiden Zelllinien eine starke Expression von *PAX4* in

allen Gruppen der gerichteten Differenzierung nachgewiesen werden, wobei eine leichte Verstärkung im Rahmen der Protokollmodulierung durch miR-375- Transfektion bzw. der Kombination aus Glukosestimulation und miR-375-Transfektion erkennbar war. Daraus war eine positive Wirkung ersichtlich, die maßgeblich über die Induktion von miR-375 gesteuert erschien. Im Vergleich dazu konnte insgesamt in beiden eingesetzten Zelllinien nur eine sehr geringe Aktivität von *ARX* in einzelnen Gruppen detektiert werden, was auf eine grundlegende Spezialisierung der generierten endokrinen Zellen in Richtung Beta-Zell-Schicksal hindeutet. Allerdings erfolgte diese Reifung nicht völlig umfassend, was die im Vergleich deutlich geringere aber dennoch bestehende Expression von *ARX* zeigt. Die effektive Festlegung auf eine pankreatische, endokrine und hauptsächlich Beta-Zell-assoziierte Entwicklungsrichtung konnte erfolgreich mit Hilfe der Ergebnisse zur Expression von *BHLHE22* und *ONECUT2* in den gerichtet differenzierten Zellen der hESZ- und hiPSZ-Linie bestätigt werden. Während *BHLHE22* zu den sogenannten *disallowed genes* gehört, deren Aktivität für eine adäquate Funktion von Beta-Zellen reprimiert werden muss und was vor allem durch die Aktivität von Pankreas-assoziierten mikroRNAs realisiert wird, ist eine strikte miR-basierte Regulation von *ONECUT2* in Beta-Zellen für eine ausbalancierte GSIS erforderlich. Die in Kapitel 3.2.2 dargestellte gesteigerte Expression der mikroRNAs miR-9 und miR-182 zum Ende der *in vitro* Differenzierung korrelierte hierbei mit der kaum messbaren Expression der beiden Gene in allen Gruppen der gerichtet differenzierten Zellen. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur quantitativen Expressionsanalyse von *MAFA*, *GLUCAGON* und *SOMATOSTATIN* mittels qPCR vorgestellt, die eine umfassende Beurteilung des Reifegrades bzw. Differenzierungszustandes der generierten endokrinen Zellen erlauben. Im Anschluss folgt die Präsentation der Ergebnisse zur relativen Quantifizierung der Expression von miR-124a und miR-30d ebenfalls am Endpunkt des *in vitro* Differenzierungsvorganges. Die Aktivität beider mikroRNAs ist im Rahmen vielfältiger Studien als Glukose-induzierbar beschrieben wurden, was ihre Analyse im Rahmen der durchgeführten Protokollvarianten besonders interessant machte.

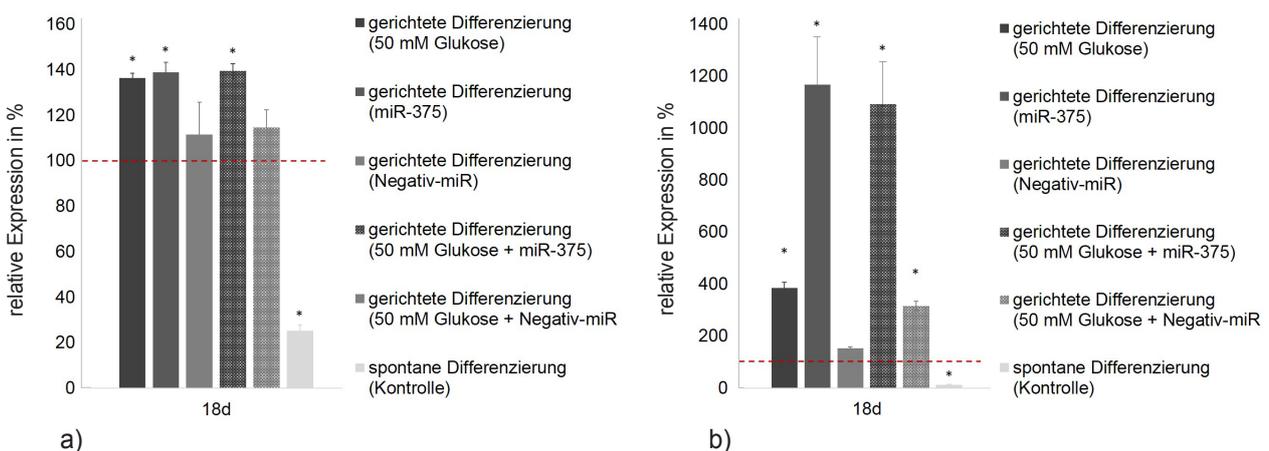


Abb. 62: Relative Quantifizierung der Expression von *MAFA* am 18. Tag des *in vitro* Differenzierungsprozesses in den Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). Gegenübergestellt sind die prozentualen Veränderungen der Expression im Rahmen der verschiedenen durchgeführten Variationen des Differenzierungsprotokolls. Die Werte beziehen sich dabei auf die Ergebnisse aus der gerichteten Differenzierung ohne zusätzliche Modifikationen (= 100%, rot gestrichelte Linie). MW \pm SD, N = 5 (HUES-8) / 6 (IMR90-4), * $p \leq 0,05$, d = Tag.

Die nachgewiesene Aktivität des bedeutenden Beta-Zell-assoziierten Gens *MAFA* korrelierte mit der in Kapitel 3.2.2 dargestellten starken Expression von miR-30d mit fortschreitender *in vitro* Differenzierung. Aufgrund der reprimierenden Wirkung von miR-30d auf einen Repressor von *MAFA*, kommt es indirekt zur Aktivierung. *MAFA* wirkt als TKF wiederum induktiv auf die Expression von *INSULIN* und bestärkt damit die Ausbildung von Beta-Zellen. Die relative Quantifizierung der *MAFA*-Expression am 18. Tag des Differenzierungsvorganges zeigte übereinstimmend in den gerichtet differenzierten Zellen beider verwendeter Linien eine Steigerung im Rahmen der durchgeführten Protokollmodulationen, welche insgesamt in den Zellen der hiPSZ-Linie auf einem höheren Niveau erfolgte. In den Zellen der Linie HUES-8 konnte sowohl nach erfolgter Glukosestimulation, miR-375-Transfektion oder Kombination beider Modulationen eine vergleichbare Erhöhung der Expression bezogen auf das basale Niveau der gerichtet differenzierten Zellen beobachtet werden. Obwohl sie funktional der Glukose-Stimulationsgruppe entsprach, konnte allerdings in der Gruppe die neben der Glukosestimulation noch zu Kontrollzwecken mit einer Negativ-miR transfiziert wurde, kein signifikanter Unterschied der Expression detektiert werden. Sowohl individuelle Schwankungen im spezifischen Differenzierungsverhalten bzw. des Potenzials zur Antwort der Zellen auf die forcierenden Differenzierungsreize zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen, die zu einer erhöhten Varianz der Messwerte beitragen, als auch unspezifische Nebeneffekte der Negativ-miR können dafür als Gründe angesehen werden. In den gerichtet differenzierten Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4 fiel auf, dass die Protokollvariante der Glukosestimulation im Vergleich zur Variante der miR-375-Transfektion eine geringere Expressionssteigerung zeigte. Die Kombination beider Modifikationen lieferte vergleichbare Ergebnisse zur alleinigen miR-375-Transfektion. Es wurden keine kombinatorischen Effekte detektiert. In der folgenden Tabelle 9 sind die ermittelten Ergebnisse aus den verschiedenen Protokollmodifikationen noch einmal zusammengefasst dargestellt.

Expressions- steigerung von <i>MAFA</i>	Kombination: Glukosestimulation + Induktion von miR-375		Induktion von miR-375		Glukosestimulation	
	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4
	~ 1,4 -fach	~ 11,4 -fach	~ 1,4 -fach	~ 12 -fach	~ 1,4 -fach	~ 3,7 -fach

Tabelle 9: Darstellung der jeweils ermittelten signifikanten Expressionssteigerung von *MAFA* am 18. Tag des *in vitro* Differenzierungsverlaufs im Vergleich zur detektierten Expression nach dem Basisprotokoll. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse aus den einzeln durchgeführten Protokollmodifikationen und der Kombination.

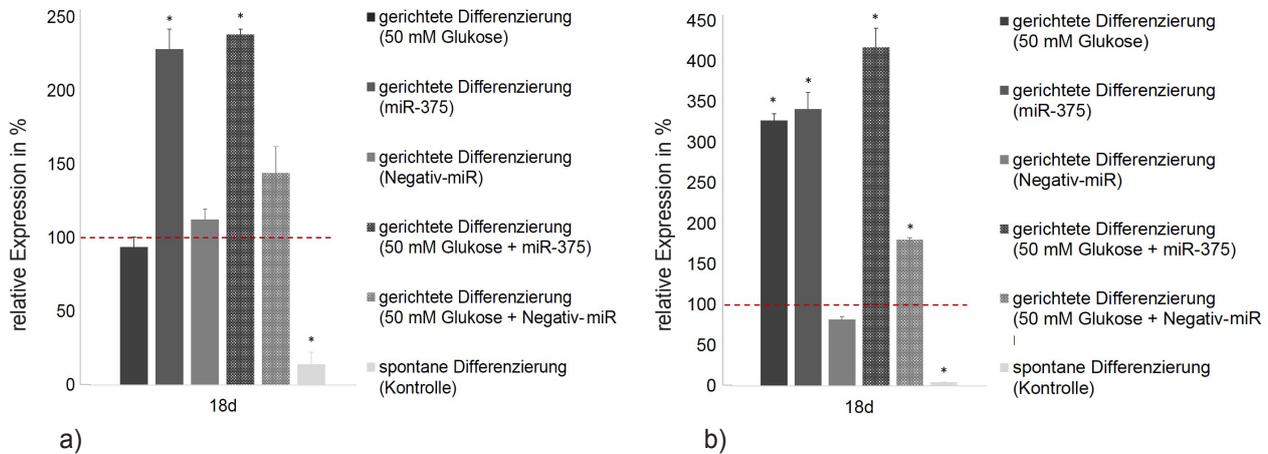


Abb. 63: Relative Quantifizierung der **GLUCAGON**-Expression in den differenzierten Zellen der Linien HUES-8 (a) und IMR90-4 (b) am Endpunkt des Differenzierungsverlaufs (= 18d). Die dargestellten Ergebnisse aus den Differenzierungsexperimenten im Rahmen der verschiedenen durchgeführten Protokollmodulationen wurden auf die ermittelten Expressionswerte aus der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen bezogen, welche keinen zusätzlichen Modifikationen ausgesetzt wurden (= 100%, rot gestrichelte Linie). MW ± SD, N = 7 (HUES-8) / 6 (IMR90-4), *p ≤ 0,05, d = Tag.

Im Vergleich zur Expression in Zellen der gerichteten Differenzierung (im Diagramm markiert als rote Linie), die keine weitere Protokollmodifikation erfahren hatten, korrelierte eine deutlich erhöhte Expression von **GLUCAGON** mit der Protokollvariante der Glukosestimulation. Allerdings konnte dieser Effekt nur in den Zellen der Linie IMR90-4 beobachtet werden. Eine vergleichbar signifikante Verstärkung der Expression konnte in den Zellen beider eingesetzter Linien detektiert werden, welche im Differenzierungsverlauf mit der miR-375 transfiziert wurden, wobei der Effekt in Zellen der Linie IMR90-4 etwas stärker ausfiel. Damit konnte der detektierte Effekt auf Zellen der Linie HUES-8 in Form einer Expressionserhöhung nach kombiniertem Einsatz beider Protokollmodulationen auf eine durch die miR-375-Transfektion vermittelte Wirkung zurückgeführt werden. Bei der Betrachtung dieser Behandlungsgruppe der Linie IMR90-4 zeigte sich ebenfalls eine signifikant erhöhte **GLUCAGON**-Expression, deren Ursache in aktivierten zellulären Signalwegen zu suchen ist, welche sowohl über die Glukosestimulation als auch über die Transfektion der miR-375 im Differenzierungsprozess gesteuert werden könnten. In der folgenden Tabelle 10 sind die Ergebnisse zur Expressionsveränderung von **GLUCAGON** aus den einzelnen oder in Kombination durchgeführten Protokollmodulationen vergleichend für beide Zelllinien kompakt gegenübergestellt.

Expressions- steigerung von GLUCAGON	Kombination: Glukosestimulation + Induktion von miR-375		Induktion von miR-375		Glukosestimulation	
	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4
	~ 2,4 -fach	~ 4,2 -fach	~ 2,3 -fach	~ 3,4 -fach	-	~ 3,3 -fach

Tabelle 10: Darstellung der jeweils ermittelten signifikanten Expressionssteigerung von **GLUCAGON** am 18. Tag

des *in vitro* Differenzierungsverlaufs im Vergleich zur detektierten Expression nach dem Basisprotokoll. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse aus den einzeln durchgeführten Protokollmodifikationen und der Kombination.

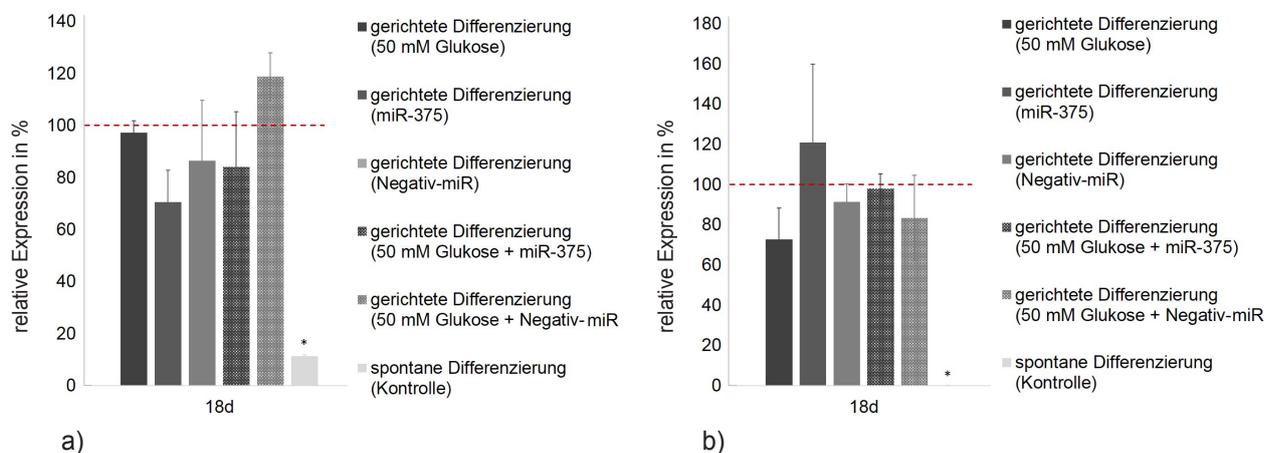


Abb. 64: Relative Quantifizierung der **SOMATOSTATIN**-Expression an Tag 18, dem Endpunkt des *in vitro* Differenzierungsprozesses. Gegenübergestellt sind die vergleichenden Analysen in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). Die gezeigten Ergebnisse aus den Differenzierungsexperimenten im Rahmen der verschiedenen durchgeführten Protokollmodifikationen wurden auf die ermittelten Expressionswerte aus der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen bezogen, welche keine zusätzlichen Modifikationen erfuhren (= 100%, rot gestrichelte Linie). MW ± SD, N = 7 (HUES-8) / 5 (IMR90-4), *p ≤ 0,05, d = Tag.

Die ermittelten Daten zur Expression des Delta-Zell-assoziierten Gens **SOMATOSTATIN** am Endpunkt der *in vitro* Differenzierung (= 18d) zeigten übereinstimmend in den formierten Zellerivaten beider eingesetzter Zelllinien, dass zwar eine basale Expression in allen gerichtet differenzierten Zellen vorhanden war, aber die durchgeführten Protokollmodulationen nicht zu einer Steigerung führten. Mit Hilfe der nachfolgend präsentierten Ergebnisse zur Immunfluoreszenzanalyse konnten diese Beobachtungen bekräftigt werden.

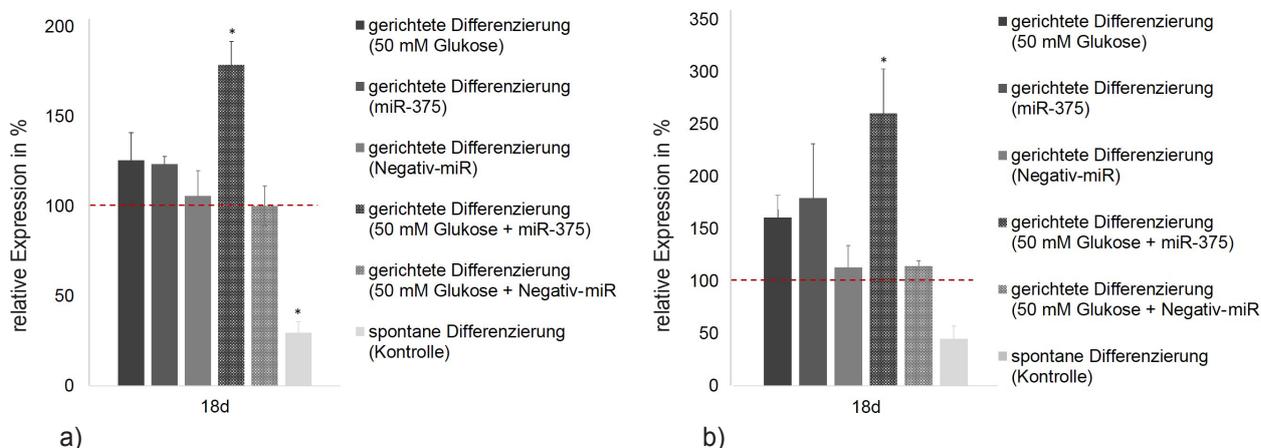


Abb. 65: Relative Quantifizierung der Expression von **miR-124a** an Tag 18, dem Endpunkt des *in vitro* Differenzierungsprozesses. Gegenübergestellt sind die vergleichenden Analysen in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). Die gezeigten Daten aus den Differenzierungsexperimenten im Rahmen

der verschiedenen durchgeführten Protokollmodifikationen wurden auf die ermittelten Expressionswerte aus der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen bezogen, welche keine zusätzlichen Modifikationen erfuhren (= 100%, rot gestrichelte Linie). MW ± SD, N = 6 (HUES-8) / 3 (IMR90-4), *p ≤ 0,05, d = Tag.

Wie bereits in Kapitel 3.2.2 präsentiert, zeigten die gerichtet differenzierten Zellen beider verwendeter Linien nur eine leichte Steigerung der Expression von miR-124a zum Endpunkt des Differenzierungsverlaufs. Bedingt durch ihre regulatorischen Funktionen in Bezug auf die Insulinsekretion reifer Beta-Zellen, ist eine moderat ausgeprägte Expression *in vivo* zu beobachten, wodurch die notwendige Balance einer gezielten bzw. kurzzeitig notwendigen Insulinantwort der Zelle gewahrt werden kann. Übereinstimmend konnten in den differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 keine signifikanten induzierenden Effekte auf die Expression von miR-124a nach den jeweils einzeln durchgeführten Protokollmodulationen gemessen werden. Damit konnte die allein durch Glukose induzierte Stimulierbarkeit dieser mikroRNA im vorliegenden Differenzierungsmodell, dessen Endpunkt nicht terminal ausgereifte endokrine Vorläuferzellen darstellen, nicht bestätigt werden. In den formierten Zellen beider Linien konnte allerdings eine deutliche, signifikante Erhöhung der Expression festgestellt werden, wenn die Zellen im Differenzierungsverlauf der Kombination beider Protokollvarianten ausgesetzt waren.

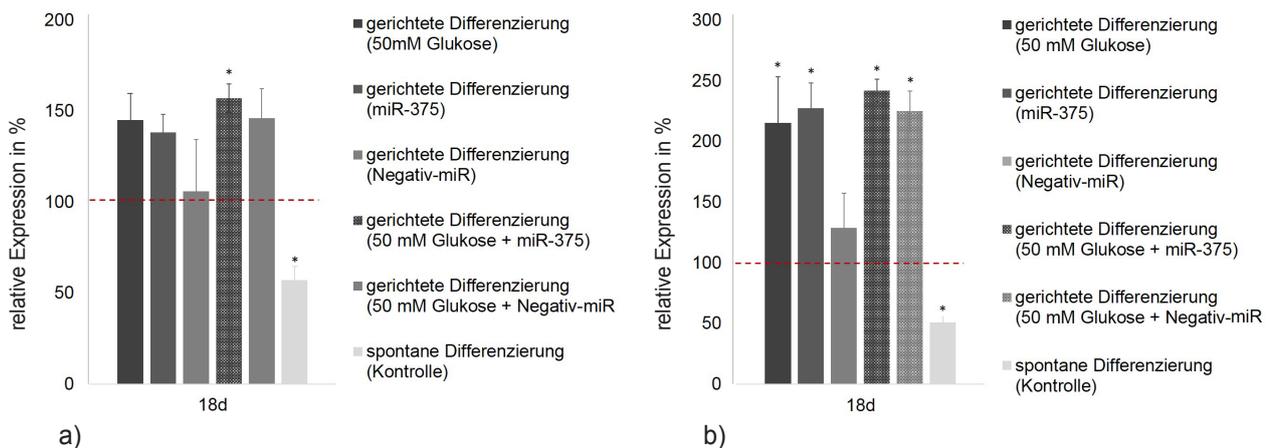
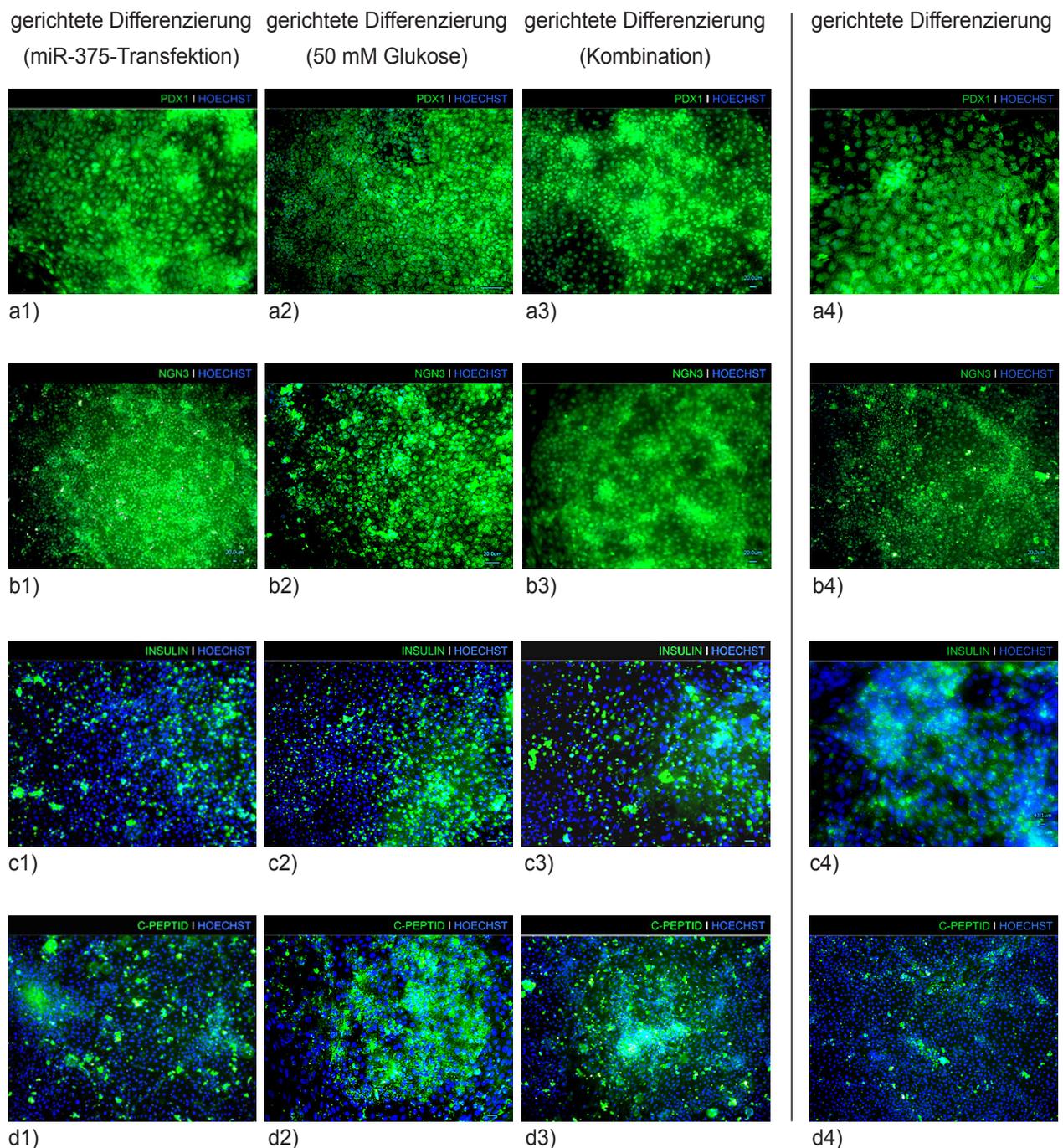


Abb. 66: Relative Quantifizierung der Expression von **miR-30d** am Endpunkt des *in vitro* Differenzierungsprozesses (= 18d). Dargestellt sind die vergleichenden Analysen in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b). Die Daten aus den Differenzierungsexperimenten im Rahmen der verschiedenen durchgeführten Protokollmodifikationen wurden auf die ermittelten Expressionswerte aus der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen bezogen, welche keine zusätzlichen Modifikationen erfuhren (= 100%, rot gestrichelte Linie). MW ± SD, N = 6 (HUES-8) / 3 (IMR90-4), *p ≤ 0,05, d = Tag.

Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, konnte in gerichtet differenzierten Zellen der eingesetzten Linien eine deutliche Expressionserhöhung von miR-30d zum Ende des *in vitro* Differenzierungsprozesses beobachtet werden. Im Rahmen der durchgeführten Protokollmodifikationen konnte in beiden Zelllinien ein Trend zur Steigerung der Expression sowohl nach Glukosestimulation, als auch nach Transfektion von miR-375-Molekülen im Differenzierungsverlauf beobachtet werden. Allerdings konnte hier nur bei der hiPSZ-Linie IMR90-4 eine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden. Bei der Kombination beider Protokollmodulationen war in den Zellen beider Linien eine signifikante Steigerung zu ermitteln.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Immunfluoreszanzanalysen zur Produktion differenzierungs-assoziiierter Proteine dargestellt. Dabei werden jeweils die Präparate der generierten Zellerivate verglichen, die entweder nur nach dem Basisprotokoll differenziert wurden, oder den Protokollmodifikationen aus Glukosestimulation, miR-375-Transfektion bzw. der Kombination beider im Differenzierungsverlauf unterlagen. Während die Translation der TKF PDX1 und NGN3 am zwölften Tag analysiert wurde, erfolgte die Untersuchung von INSULIN, C-PEPTID, GLUCAGON und SOMATOSTATIN jeweils am 18. Tag, was dem Endpunkt des etablierten *in vitro* Differenzierungsprotokolls entsprach.



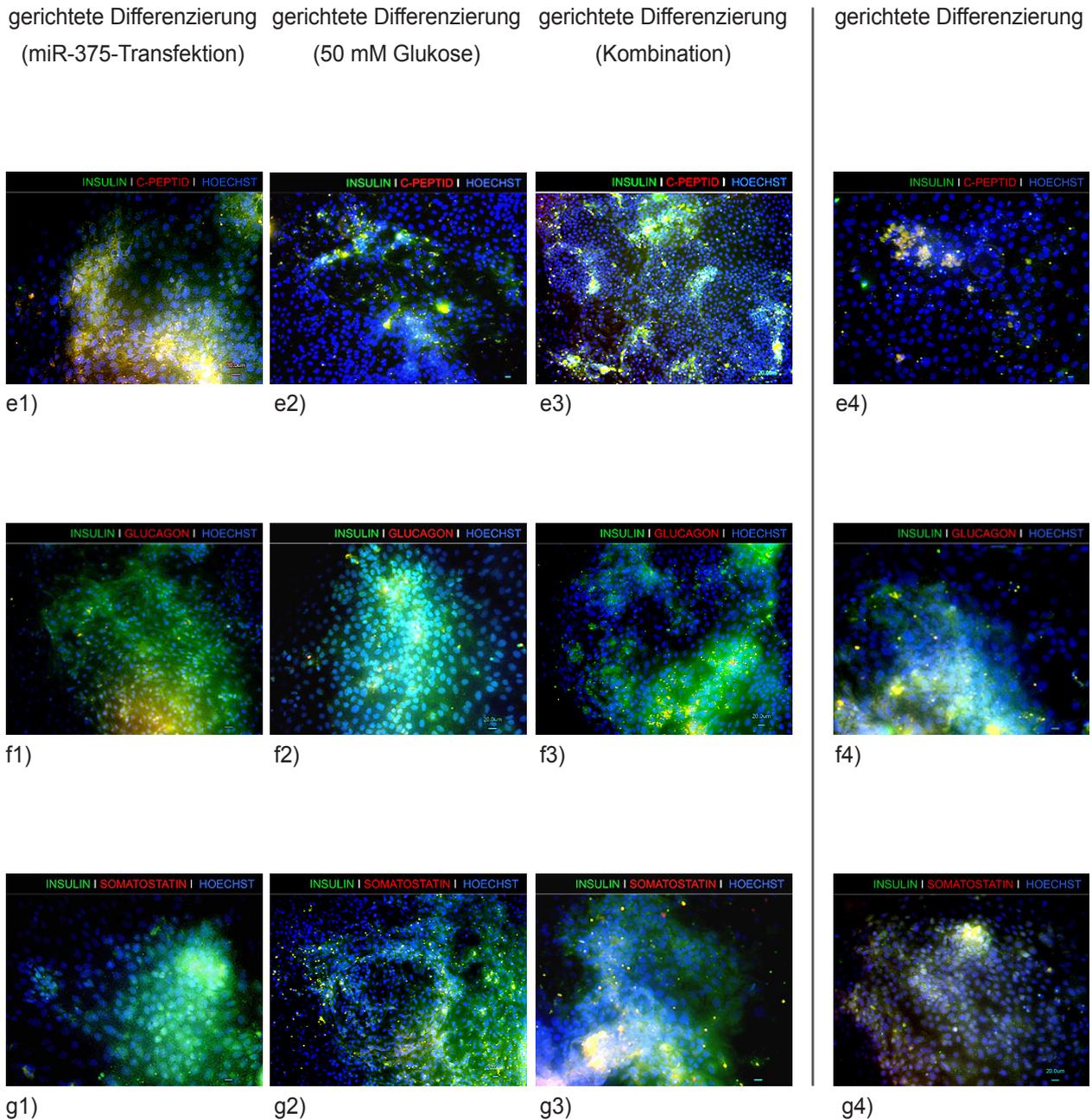


Abb. 67 (S.119 - 120): Immunfluoreszenzanalyse der Proteine **PDX1** (a1 - a4), **NGN3** (b1 - b4), **INSULIN** (c1 - c4) und **C-PEPTID** (d1 - d4) sowie Ko-Färbungen von **INSULIN + C-PEPTID** (e1 - e4), **INSULIN + GLUCAGON** (f1 - f4) und **INSULIN + SOMATOSTATIN** (g1 - g4) in differenzierten Zellen der hESZ-Linie HUES-8. Die Detektion der TKF **PDX1** und **NGN3** erfolgte am zwölften Tag, während die Translation der übrigen Proteine am 18. Tag überprüft wurde. Gegenübergestellt sind die Präparate von gerichtet differenzierten Zellen, die entweder mit miR-375-Molekülen transfiziert, mit Glukose stimuliert, oder der Kombination beider Modulationen im Differenzierungsverlauf ausgesetzt waren. Zum Vergleich zeigen die Bilder der äußeren rechten Spalte jeweils Proben direkt differenzierter Zellen ohne weitere Protokollmodulation. Aufgrund der Kernlokalisierung der aktiven TKF **PDX1** und **NGN3**, die mittels Fluorochrom-Markierung grün gefärbt sind, kam es zur Überlagerung der durch den Farbstoff

Hoechst blau angefärbten Zellkerne. Dieser Effekt trat bei den übrigen zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen nicht auf. Im Rahmen der Ko-Färbungen wurde neben dem Fluochrom Alexa488, welche ein grünes Fluoreszenzsignal erzeugt auch der Farbstoff CyTM5 eingesetzt, welcher rotes Licht emittiert. Bei einer Detektion beider markierter Proteine in der selben Zelle kam es somit zu Überlagerung, was sich in einem gelben Gesamteindruck darstellte. Maßstab: a1, a3, a4, b1 - b4, c1 - c3, d2, e1 - e4, f1 - f4, g2, g4 = 20 µm; a2, c4 = 43,1 µm; d1, d3, d4, g1, g3 = 10 µm.

Bei der Betrachtung der Abbildungen zum Nachweis der Transkriptionsfaktoren PDX1 und NGN3 fiel neben der erhöht erscheinenden Intensität der Fluoreszenz vor allem in den gerichtet differenzierten Zellen, welche mit miR-375-Molekülen transfiziert bzw. in Kombination mit der Glukosestimulation inkubiert wurden, auch die dichtere Anordnung der positiv markierten Zellen im Vergleich zur Gruppe gerichtet differenzierter Zellen auf. Diese Effekte konnten mit der Ausbildung von kompakteren und deutlich abgegrenzten Zellaggregate, den sogenannten *islet-like* Cluster, assoziiert werden. Die positiven Auswirkungen der durchgeführten Modulationen des Basis-Differenzierungsprotokolls auf die Anordnung der differenzierenden Zellen stimmten mit den bereits in den Kapiteln 3.4.1, 3.4.2 und 3.4.3 präsentierten lichtmikroskopischen Aufnahmen und den Daten zur Expressionsanalyse der Gene *PDX1* und *NGN3* überein. Noch ausgeprägter zeigte sich die Korrelation zwischen den eingesetzten Protokollmodulationen und einer verstärkten Detektion von INSULIN und C-PEPTID. Im Vergleich zu gerichtet differenzierten Zellen, die keine weiteren Modifikationen des Basis-Differenzierungsverlaufs erfahren hatten, konnte in den sich formierenden *islet-like* Clustern, die im Differenzierungsverlauf mit miR-375 transfiziert, Glukose stimuliert oder der Kombination aus beiden Varianten inkubiert wurden, eine Steigerung des Anteils Insulin-produzierender Zellen detektiert werden. Mit Hilfe der durchgeführten Ko-Färbung von INSULIN mit C-PEPTID war diese Verstärkung insbesondere in Zellen, die im Zuge der kombinierten Protokollmodulation behandelt wurden, deutlich nachweisbar, was dem beobachteten additiven Effekt entsprach, der im Rahmen der *INSULIN*-Expressionsanalyse ermittelt wurde.

Die Analyse der Ko-Färbungen von INSULIN mit GLUCAGON bzw. SOMATOSTATIN zeigte, dass im Zuge der eingesetzten Faktoren zur Erweiterung des Basis-Protokolls, nämlich sowohl der Transfektion der sich differenzierenden Zellen mit miR-375-Molekülen, der kurzzeitigen Inkubation unter stark erhöhtem Medium-Glukosegehalt, als auch der Kombination beider Varianten keine Verstärkung der Produktion Alpha- bzw. Delta-Zell-assoziiierter Hormone auftrat. Im Vergleich zur Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen, konnte eine Reduktion des Anteils ko-gefärbter und damit polyhormonaler Zellen (gelbes Farbsignal) beobachtet werden, wobei gleichzeitig der Anteil Insulin-produzierender Zellen (grünes Farbsignal) erhöht erschien. Diese Entwicklung bekräftigte ergänzend die Ergebnisse aus den Einzelfärbungen von INSULIN und C-PEPTID. Insgesamt konnten die ermittelten Daten aus den Expressionsanalysen der bedeutenden Beta-Zell-assoziierten bzw. differenzierungssteuernden Markergene *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* im Rahmen der durchgeführten Varianten des Differenzierungsprotokolls mittels Immunfluoreszenzanalyse auf Proteinebene bestätigt werden. Auch die Ergebnisse aus der relativen Quantifizierung der *SOMATOSTATIN*-Expression zeigten übereinstimmend mit den entsprechenden Daten der Immunfluoreszenzanalyse, dass die eingesetzten Protokollmodifikationen zur Verbesserung der pankreatischen *in vitro* Differenzierungseffizienz, aber nicht zur verstärkten Somatostatinproduktion führen und damit die Bildung von Delta-Zell-Vorläufern bzw. polyhormonalen Zellen nicht

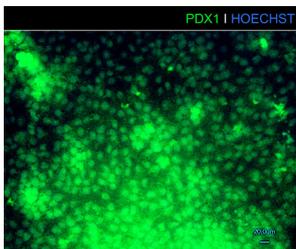
gefördert wird. Die Ergebnisse aus der Analyse der *GLUCAGON*-Expression zeigten übereinstimmend in beiden eingesetzten Zelllinien den Trend einer Erhöhung in Korrelation mit durchgeführter Transfektion von miR-375-Molekülen, Glukosestimulation und der kombinierten Protokollvariante. Diese Effekte spiegeln sich jedoch nicht auf Ebene der Translation wider. Vergleichbar zu den Ergebnissen der Somatostatinproduktion konnte ebenso eine leichte Reduktion der Glucagonproduktion bzw. des Anteils polyhormonaler Vorläuferzellen festgestellt werden. Zusammenfassend konnten durch die Immunfluoreszenzanalysen die positiven Effekte der durchgeführten Protokollmodulationen auf die Effizienz der Abfolge einzelner pankreatischer *in vitro* Entwicklungsetappen, als auch letztlich auf die Ausbildung Insulin-produzierender Zellen als Endpunkt des Differenzierungsprotokolls bekräftigt werden. Ebenso zeigten die Ergebnisse zur Translation von *GLUCAGON* und *SOMATOSTATIN*, dass im Rahmen der protokollbedingten Verbesserung des endokrinen Differenzierungsvorgangs eine deutlichere Diskriminierung zwischen den einzelnen pankreatischen endokrinen Zelltypen ermöglicht wurde. Dies wurde in der Reduzierung der Glucagon- bzw. Somatostatinsynthese deutlich. Gestützt wurde die Beobachtung mit den Ko-Färbungen mit *INSULIN*, bei denen der Anteil der polyhormonalen Zellen verringert erschien.

gerichtete Differenzierung
(miR-375-Transfektion)

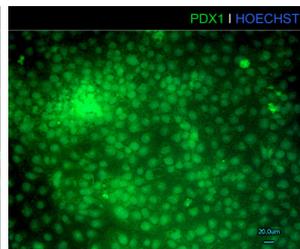
gerichtete Differenzierung
(50 mM Glukose)

gerichtete Differenzierung
(Kombination)

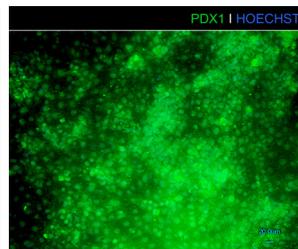
gerichtete Differenzierung



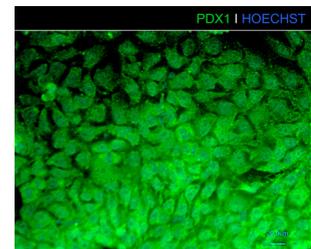
a1)



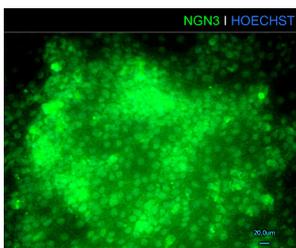
a2)



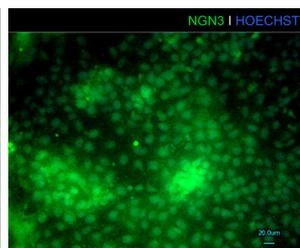
a3)



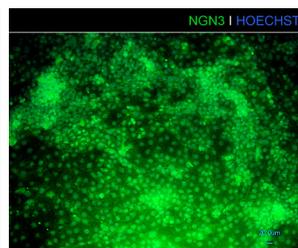
a4)



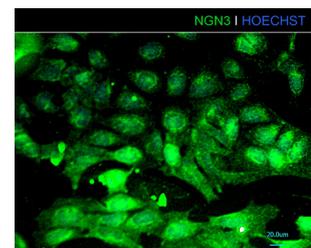
b1)



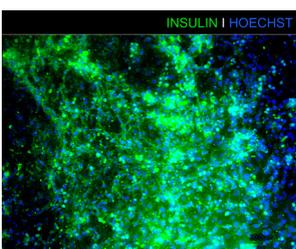
b2)



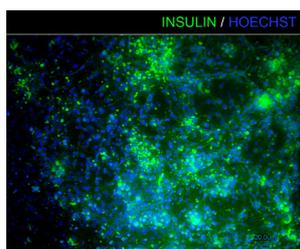
b3)



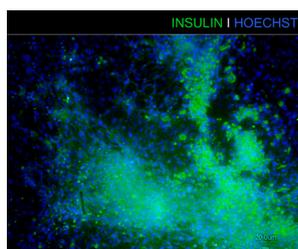
b4)



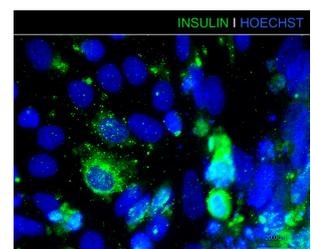
c1)



c2)



c3)



c4)

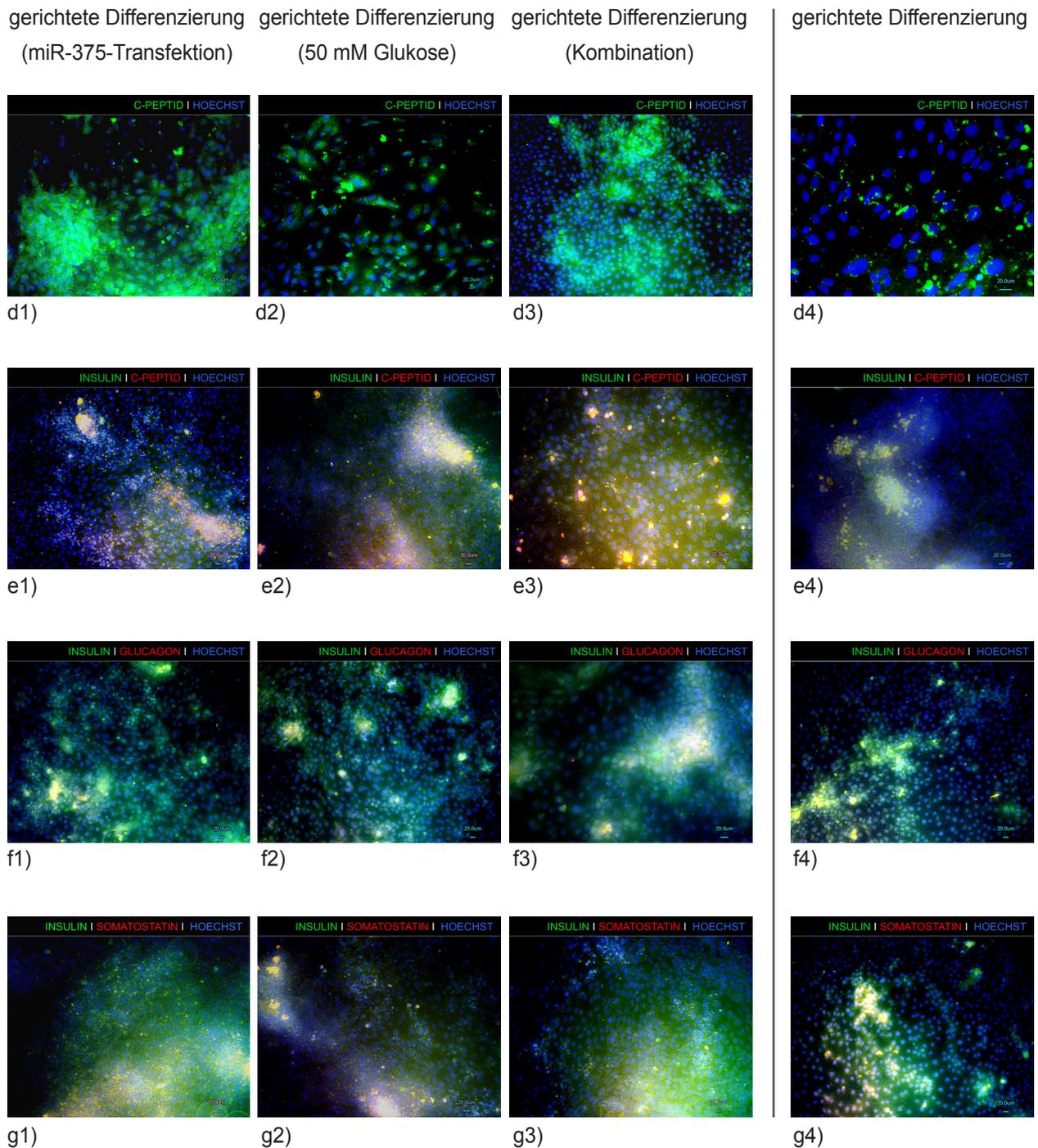


Abb. 68 (S. 122 - 123): Immunfluoreszenzanalyse der Proteine **PDX1** (a1 - a4), **NGN3** (b1 - b4), **INSULIN** (c1 - c4) und **C-PEPTID** (d1 - d4) sowie Ko-Färbungen von **INSULIN + C-PEPTID** (e1 - e4), **INSULIN + GLUCAGON** (f1 - f4) und **INSULIN + SOMATOSTATIN** (g1 - g4) in differenzierten Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4. Die Detektion der TKF **PDX1** und **NGN3** erfolgte am zwölften Tag der *in vitro* Differenzierung, während die Translation der übrigen Proteine am 18. Tag, dem Endpunkt der Differenzierung überprüft wurde. Gegenübergestellt sind die Präparate von gerichtet differenzierten Zellen, die entweder mit miR-375-Molekülen transfiziert, mit Glukose stimuliert oder der Kombination beider Modulationen im Differenzierungsverlauf ausgesetzt wurden. Zum Vergleich

zeigen die Bilder der äußeren rechten Spalte jeweils Proben direkt differenzierter Zellen ohne weitere Protokollvariationen. Aufgrund der Kernlokalisierung der aktiven TKF PDX1 und NGN3, die mittels Fluorochrom-Markierung grün gefärbt sind, kommt es zu Überlagerung der durch den Farbstoff Hoechst blau angefärbten Zellkerne. Dieser Effekt tritt bei den übrigen zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen nicht auf. Im Zuge der Ko-Färbungen wurde neben dem Fluochrom Alexa488, welche ein grünes Fluoreszenzsignal erzeugt auch der Farbstoff CyTM5 eingesetzt, welcher rotes Licht emittiert. Bei positiver Detektion beider markierter Proteine in der selben Zelle kam es zur Überlagerung, was sich in einem gelben Gesamteindruck darstellte. Maßstab: a1 - g4 = 20 µm.

Die Immunfluoreszenzanalysen differenzierter Zellderivate der hiPSZ-Linie IMR90-4 wiesen insgesamt große Ähnlichkeiten zu den Ergebnissen aus der hESZ-Linie HUES-8 auf. Im Rahmen der durchgeführten Modulationen des Basis-Differenzierungsprotokolls mittels miR-375-Transfektion, kurzzeitiger Glukosestimulation bzw. der Kombination beider Varianten, konnte eine Steigerung der Intensität und besonders des Anteils fluoreszierender Zellen beim Nachweis von PDX1, NGN3, INSULIN und C-PEPTID jeweils im Vergleich zu Zellpräparaten die ohne zusätzlich Modifikationen gerichtet differenziert wurden, beobachtet werden. Bei der Betrachtung der Analysen zur Produktion von GLUCAGON und SOMATOSTATIN konnte keine Zunahme der Translation in Folge der durchgeführten Protokollmodulationen detektiert werden. Vielmehr fiel auch hier die Zunahme singular grün fluoreszierender Zellen auf, was eine Steigerung der Insulinproduktion darstellte. Die erhobenen Daten wiesen damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Linie HUES-8 auf eine positive Korrelation zwischen den eingesetzten Protokollvarianten und einer gesteigerten Produktion von TKF auf, welche den sukzessiven Durchtritt der Zellen entlang des schrittweisen pankreatischen *in vitro* Differenzierungsprozesses ermöglichten und gezielt forcierten. Diese Beobachtung wurde zudem durch den erhöhten Anteil Insulin-produzierender Zellen zum Endpunkt der Differenzierung verdeutlicht. Das die generierten endokrinen Zellen allerdings nicht als terminal differenzierte Beta-Zellen zu bezeichnen waren, zeigten die Nachweise der Produktion von GLUCAGON und SOMATOSTATIN. Allerdings konnte im Rahmen der durchgeführten Modulationen im Differenzierungsprotokoll keine Steigerung der Translation detektiert werden, womit im Fall von GLUCAGON die verstärkenden Effekte auf Ebene der Transkription keine Übertragung auf die Proteinebene fanden. Gleichzeitig erschien in den durchgeführten Ko-Färbungen von INSULIN mit GLUCAGON bzw. SOMATOSTATIN der Anteil ausschließlich grün gefärbter Zellen erhöht, was allgemein auf die Zunahme Insulin-produzierender Zellen und speziell auf einen verminderten Anteil polyhormonaler Zellen hinwies.

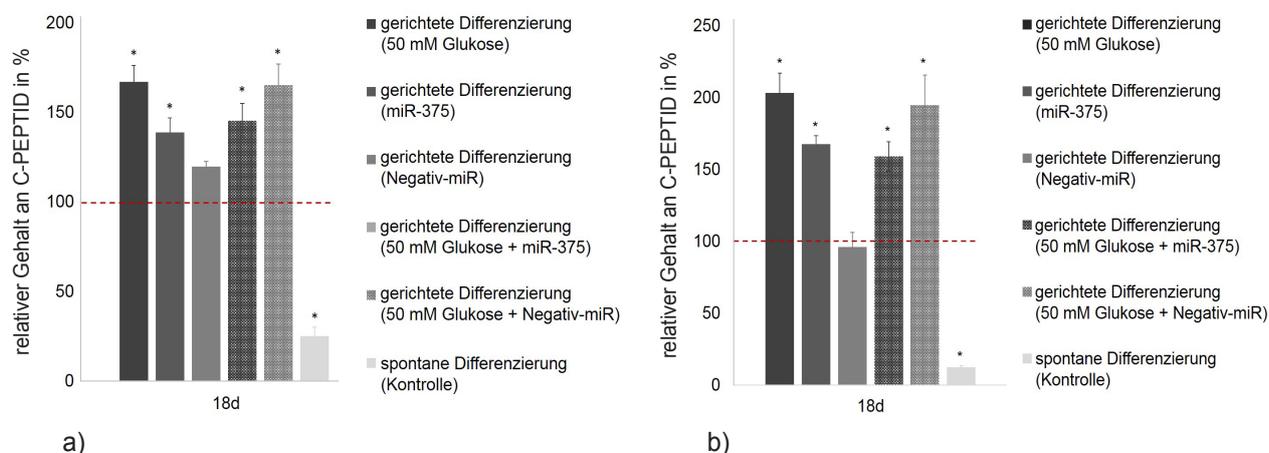


Abb. 69: Vergleichende Analyse zur Veränderung des **C-PEPTID**-Gehalts im Differenzierungsmedium am 18. Tag des *in vitro* Protokolls in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b) mittels C-PEPTID-ELISA. Dargestellt sind die Auswirkungen der durchgeführten Protokollmodulationen auf die Insulinbiosynthese und damit verbundenen Abgabe von C-PEPTID der differenzierten Zellen in das umgebende Kulturmedium im Vergleich zur Gruppe direkt differenzierter Zellen, die keinen weiteren Protokollmodulationen unterlagen (= 100 %, rote gestrichelte Linie). MW ± SD, N = 4, *p ≤ 0,05, d = Tag.

Die Analyse der Insulinproduktion in den 18 Tage lang differenzierten Zellen erfolgte mittels C-PEPTID-ELISA, da im Differenzierungsmedium eine geringe Menge INSULIN enthalten war und nur so eine zuverlässige Aussage über die endogene Insulinbiosynthese möglich war. Insgesamt konnte in den gerichtet differenzierten Zellen beider eingesetzter Linien, die jeweils nach dem Basisprotokoll inkubiert wurden, nur eine geringe basale Insulinproduktion nachgewiesen werden. Der im Mediumüberstand ermittelte Gehalt an C-PEPTID betrug in den generierten endokrinen Zellen der hESZ-Linie 0,24 ng/ml und in den Zellen der hiPSZ-Linie 0,25 ng/ml. Im gesunden Menschen liegt der Normalbereich der C-PEPTID-Konzentration im nüchternen Zustand hingegen zwischen ca. 0,8 - 4 µg/l Blut. Vergleichend korrelierte in den differenzierten Zellen beider verwendeter Linien eine signifikante Steigerung der Insulinproduktion mit allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Modulationen des *in vitro* Differenzierungsprotokolls im Vergleich zu Zellen, die nur nach dem Basisprotokoll differenziert wurden. Zwischen den einzelnen Protokollvarianten, also der Transfektion von miR-375-Molekülen, der Glukosestimulation und der Kombination waren dabei keine signifikanten Niveau-Unterschiede und damit auch keine synergistischen Effekte messbar. In der folgenden Tabelle 11 sind die Ergebnisse noch einmal kompakt gegenübergestellt.

Steigerung des Gehalts an C-PEPTID im Medium	Kombination: Glukosestimulation + Induktion von miR-375		Induktion von miR-375		Glukosestimulation	
	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4	HUES-8	IMR90-4
	~ 1,5 -fach	~ 1,7 -fach	~ 1,4 -fach	~ 1,7 -fach	~ 1,7 -fach	~ 2,1 -fach

Tabelle 11: Darstellung der ermittelten signifikanten Steigerung des Gehaltes an **C-PEPTID** im Differenzierungs-

medium am 18. Tag des *in vitro* Differenzierungsverlaufs im Vergleich zum Gehalt bei der Differenzierung nach dem Basisprotokoll. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse aus den einzeln durchgeführten Protokollmodifikationen und der Kombination.

Aus den ermittelten Ergebnissen lies sich ableiten, dass sowohl die kurzzeitige Inkubation der sich entwickelnden Zellen unter einer sehr hohen Glukosekonzentration von 50 mM im Differenzierungsmedium als auch die zweimalige Transfektion der formierten pankreatischen bzw. endokrinen Vorläuferzellen mit miR-375-Molekülen und die Kombination beider Varianten in den Zellen Mechanismen induzieren, die letztlich zur Verbesserung der Differenzierungseffizienz beitragen. Sichtbar wurde dies im Rahmen der erhöhten Insulinproduktion und bekräftigt durch die bereits präsentierten Daten zur Expression bzw. Translation und somit Aktivität essentieller differenzierungsrelevanter Marker und mikroRNAs.

Als Fazit konnten im Rahmen der eingesetzten Protokollmodifikationen aus miR-375-Transfektion, Glukosestimulation oder der Kombination beider Varianten positive Effekte auf die Effizienz der pankreatischen *in vitro* Differenzierung festgestellt werden. Diese Auswirkungen ergaben sich durch induktive Signale auf verschiedene zelluläre Regulationsmechanismen und Signalübertragungswege, die sich in einer gesteigerten Expression zahlreicher differenzierungssteuernder Gene sowie mikroRNAs und folgend auch in einer erhöhten Produktion essentieller TKF widerspiegeln. Es schlossen sich folglich zum gesetzten Endpunkt des Differenzierungsprozesses positive Effekte auf die Insulinbiosynthese an. Damit konnte überzeugend das Potenzial sowohl der eingesetzten hESZ als auch der hiPSZ zur Reaktion auf die gewählten Modifikationen im Differenzierungsprotokoll dargestellt werden.

3.5 Bedeutung der miR-375 während der Differenzierung entodermaler Vorläuferzellen

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, ist die starke Präsenz von miR-375 in pankreatischen Beta-Zellen, welche mit den zahlreichen essentiellen regulatorischen Mechanismen zum Erhalt und der adäquaten Funktion dieser hochspezialisierten Zellen begründet werden kann, durch zahlreiche *in vivo* Studien zur Pankreasentwicklung belegt. Deutlich weniger bekannt ist ihre Rolle im Rahmen der Differenzierung entodermaler Zellen, welche das Ausgangsmaterial zukünftiger Pankreas-assoziiierter Zelltypen darstellen. Im Zuge einiger Studien zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung konnten in verschiedenen murinen und humanen ESZ-Linien weitgehend übereinstimmende Daten zum Expressionsverlauf dieser mikroRNA während der entodermalen Entwicklung ermittelt werden (Kuhn 2011, Francis *et al.* 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen bestätigt werden, da im Differenzierungsprozess aller eingesetzten Zelllinien (H9, HUES-8 und IMR90-4) jeweils, wie in Kapitel 3.2.2 vorgestellt, ein zweigipfelter Verlauf der miR-Aktivität auftrat. Nach einem starken Expressionsspeak im Zeitfenster der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen kam es zum kurzzeitigen Absinken der Expression und einer erneuten, dauerhaften Steigerung ab dem Zeitpunkt der Formierung pankreatischer Vorläuferzellen (HUES-8- und IMR90-4). Bisher liegen keine Informationen zu experimentell validierten Zielgenen vor, aber die Unabhängigkeit des Expressionsmusters von der eingesetzten pluripotenten Zelllinie weist auf eine allgemein gültige Rolle der miR-375 während der Bildung entodermaler Zellen hin. Die im Abschnitt 3.2.2 präsentierten Ergebnisse zum Expressionsverlauf zahlreicher Pankreas-

assoziierter mikroRNAs zeigten, dass neben der bereits etablierten Charakterisierung einzelner *in vitro* Entwicklungsetappen durch die Aktivität spezifischer TKF auch miRs zur besseren Beurteilung des Differenzierungsstatus der sich formierenden Zellen genutzt werden können und sollten. Die Zelllinien- und sogar Spezies-unabhängigen Ergebnisse zum zeitlich stark begrenzten Expressionspeak von miR-375 im Zuge der Ausbildung entodermaler Vorläuferzellen ermöglicht ihre Nutzung als Entoderm-Marker.

3.5.1 Inhibitor-gesteuerte Repression von miR-375 während der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen

Um die Stärke des Einflusses von miR-375 bei der Festlegung der differenzierenden Zellen auf ein definitiv entodermales Schicksal zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem spezifischen Inhibitor, der gegen die mikroRNA-375 gerichtet ist, zum Start des *in vitro* Differenzierungsprozesses transfiziert. In den ausgebildeten entodermalen Progenitorzellen erfolgte die Analyse potentieller Effekte auf die Expression von miR-375 und typischer entodermaler Markergene wie *SOX17* und *FOXA2*, womit die Effektivität der entodermalen Differenzierung beurteilt werden konnte. In der folgenden Grafik wird zunächst das Ausmaß der spezifischen Wirkung des eingesetzten Inhibitors vergleichend in den noch undifferenzierten Zellen der eingesetzten hESZ-Linien H9 und HUES-8 dargestellt. Aus den ermittelten Daten konnte eine erste Einschätzung des potenziell zu erwartenden Grades der inhibitorischen Wirkung auf die miR-375-Expression im Zuge der entodermalen Differenzierung abgeleitet werden.

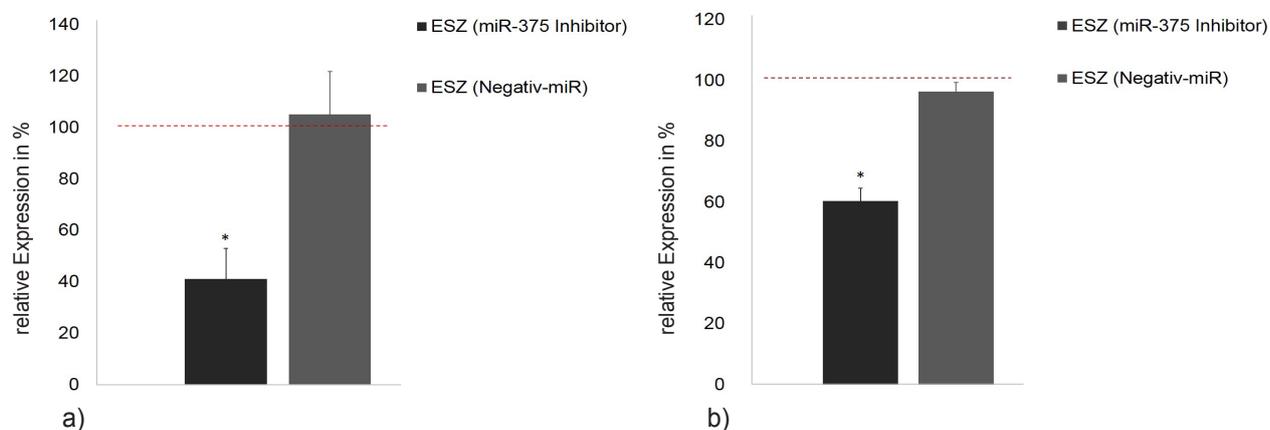


Abb. 70: Relative Quantifizierung der Expression von **miR-375** in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b) zur Beurteilung der Effizienz des eingesetzten spezifischen Inhibitors. Die Ergebnisse beziehen sich jeweils auf die Expressionswerte von miR-375 in undifferenzierten hESZ, die keinerlei Transfektion unterlagen (= 100%, rote gestrichelte Linie). MW \pm SD, N = 3, *p \leq 0,05.

Die Analyse zur Wirksamkeit des eingesetzten spezifischen miR-375-Inhibitors in undifferenzierten hESZ zeigte, dass eine deutliche Reduktion der Expression erfolgte. In den Zellen der Linie H9 betrug sie ca. 60 % und in den Zellen der Linie HUES-8 ca. 40 %. Die Wirkungsweise des eingesetzten chemisch basierten Transfektionsverfahrens und vor allem der miR-Inhibitormoleküle, die in Bezug auf andere Möglichkeiten zur Stilllegung von Genen wie z.B. im Zuge eines kompletten genetisch fixierten

Knock-Out, ein geringes Repressionspotenzial besitzen, spiegelte sich in dem beobachteten Effekt einer ungefähren Halbierung der Expression.

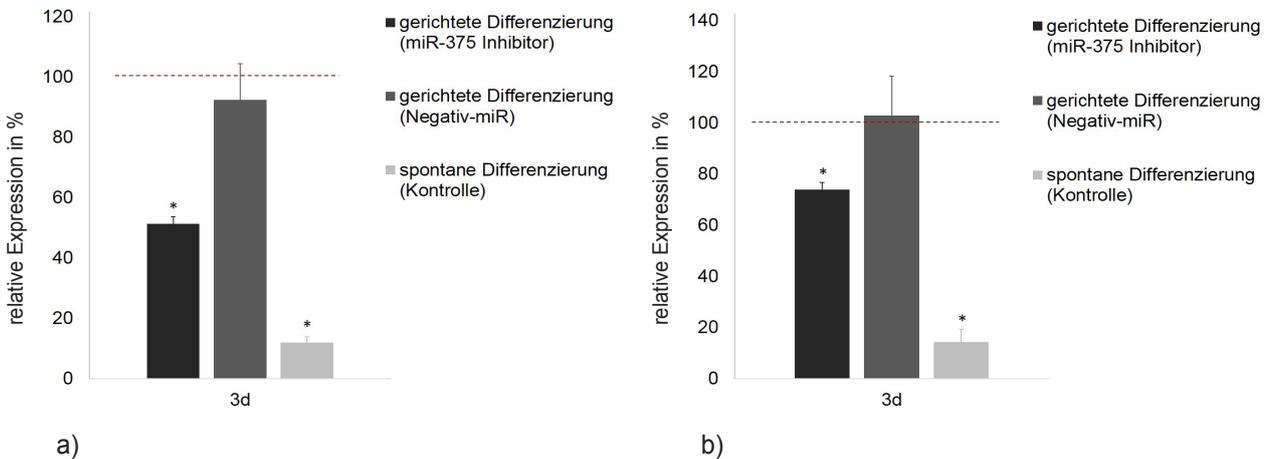


Abb. 71: Relative Quantifizierung der Expression von **miR-375** am dritten Tag des Differenzierungsverlaufs in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b), dem Zeitfenster der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Expressionswerte von miR-375 in gerichtet differenzierten Zellen, die keiner Protokollmodifikation unterlagen (= 100%, rote gestrichelte Linie). MW \pm SD, N = 5 (H9) / N = 3 (HUES-8), *p \leq 0,05, d = Tag.

Die Ergebnisse zum Einfluss des eingesetzten Inhibitors auf die Expression von miR-375 in entodermalen Vorläuferzellen folgten in der Ausprägung den Daten zum allgemeinen Wirkungsnachweis in den hESZ-Linien. Erneut war übereinstimmend ein deutlicher reduktiver Effekt messbar, der in den Zellen der Linie H9 mit ca. 50 % etwas stärker ausgeprägt war als in den Zellen der Linie HUES-8 mit knapp 30 %. Um die Bedeutung einer reduzierten Aktivität von miR-375 während der Spezialisierung entodermaler Zellen auf die Effektivität dieses Vorgangs zu analysieren, erfolgte ergänzend die Bestimmung der Expression von *SOX17* und *FOXA2* als Entoderm-assoziierte Gene.

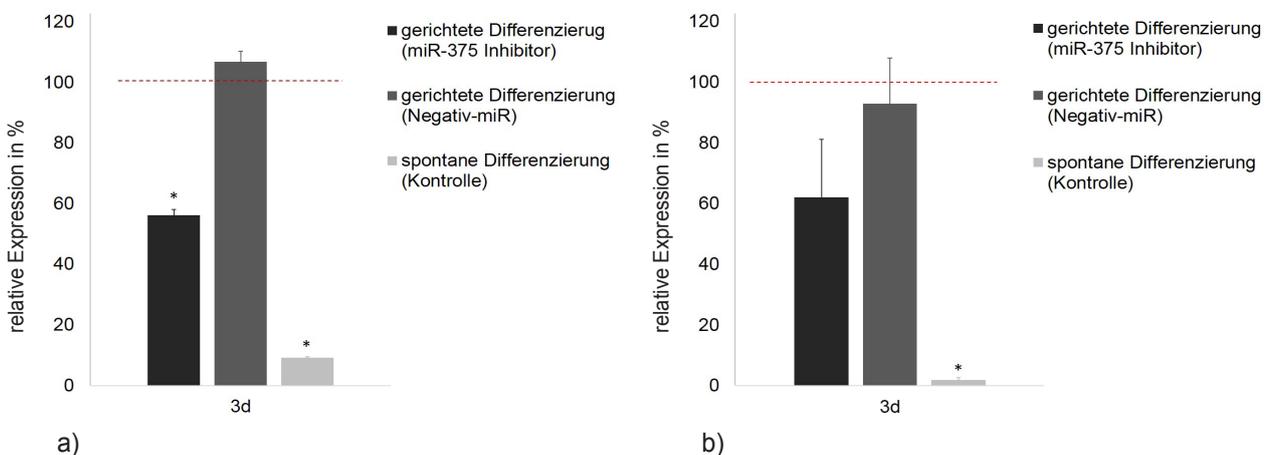


Abb. 72: Relative Quantifizierung der Expression von **SOX17** am dritten Tag des Differenzierungsverlaufs in Zel-

len der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b). Die Ergebnisse beziehen sich auf die Expressionswerte von *SOX17* in gerichtet differenzierten Zellen, die keiner Protokollmodifikation unterlagen (= 100%, rote gestrichete Linie). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

Die reduzierte Expression von miR-375 während der Formierung entodermaler Progenitorzellen, verursacht durch den Einsatz eines spezifischen miR-Inhibitors, korrelierte in beiden hESZ-Linien mit einer verminderten Expression des entodermalen Markers *SOX17*. Wiederholt konnte in den Zellen der Linie H9 ein stärkerer Effekt beobachtet werden, denn die Expression von *SOX17* sank hier um etwas mehr als 40 %, während in den Zellen der Linie HUES-8 ebenfalls ein deutlicher Trend zur Repression sichtbar war, aus dem aber aufgrund starker Schwankungen innerhalb der einzelnen Messwerte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

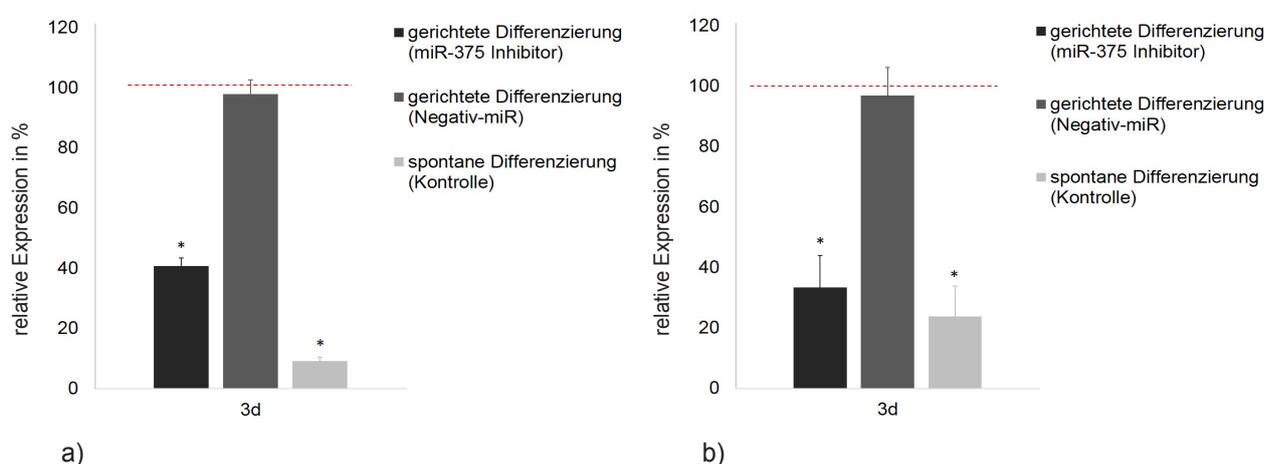


Abb. 73: Relative Quantifizierung der Expression von *FOXA2* am dritten Tag des Differenzierungsprozesses in Zellen der hESZ-Linien H9 (a) und HUES-8 (b). Die Ergebnisse beziehen sich auf die Expressionswerte von *FOXA2* in gerichtet differenzierten Zellen, die keiner Protokollmodifikation ausgesetzt waren (= 100%, rote gestrichete Linie). MW ± SD, N = 3, *p ≤ 0,05, d = Tag.

Die reprimierte Expression von miR-375 in differenzierten entodermalen Vorläuferzellen korrelierte in beiden analysierten Zelllinien jeweils mit einer reduzierten Expression von *FOXA2*, wobei in Bezug auf dieses Gen keine deutlichen Unterschiede in der Ausprägung des reprimierenden Effekts zwischen den hESZ-Linien festgestellt werden konnten. In den entodermalen Progenitorzellen der Linie H9 war die Expression von *FOXA2* ca. um 60 % vermindert und in den differenzierten Zellen der Linie HUES-8 betrug die Reduktion ca. 65 %. Damit ergab sich aus der verminderten Aktivität von miR-375 insgesamt eine deutlichere Korrelation zu einer verminderten Expression des entodermalen Markergens *FOXA2*. Insgesamt konnte anhand der ermittelten Daten ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von miR-375 zum Zeitpunkt der Formierung entodermaler Progenitorzellen und der Effektivität dieses Entwicklungsprozesses anhand der Expression zweier Stadien-spezifischer TKF aufgezeigt werden. Für eine effektive entodermale *in vitro* Differenzierung ist demnach die kurzzeitig starke Expression von mikroRNA-375 von großer Bedeutung. Dass allerdings die miR-375 gesteuerten zellulären Signale nur

einen Teil eines deutlich umfassenderen und komplexeren Netzwerkes aus zahlreichen Komponenten wie epigenetischen Modulationen und sequenziellen Aktivierungen vielzähliger TKF und weiterer mikroRNAs ausmachen, die gemeinsam das Potenzial pluripotenter Zellen forciert auf die entodermale Entwicklungsrichtung beschränken und festlegen, konnte durch die lediglich partielle Repression der Gene *SOX17* und *FOXA2* verdeutlicht werden. Der ungefähren Halbierung der Expression von miR-375 stand eine Reduktion der Expression von *SOX17* um ca. 40 % und von *FOXA2* um ca. 60 % gegenüber.

3.5.2 TALE-gesteuerte Induktion von miR-375 während der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen

Die in Kapitel 3.5.1 präsentierten Daten zur Korrelation zwischen miR-375-Expression und Effektivität der Ausbildung entodermaler, *SOX17* und *FOXA2* exprimierender Vorläuferzellen ließen die Frage entstehen, ob auch die entgegengesetzt wirkende, gezielte Modulation der miR-Aktivität, nämlich im Rahmen einer Induktion, Auswirkungen auf die Bildung entodermaler Zellen haben kann. Damit stellte die nur wenige Tage umfassende und sehr gut etablierte sowie reproduzierbare *in vitro* Differenzierung entodermaler Zellen aus pluripotenten Stammzellen ein ideales und zellulär anspruchsvolles Modell zur Testung der generellen Wirksamkeit von künstlichen Transkriptionsaktivatoren, sogenannten TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*) dar. Da aktuell keine publizierten Daten zum Einsatz von TALEs im Zuge einer gezielten Beeinflussung bzw. Optimierung des pankreatischen *in vitro* Differenzierungsprozesses vorliegen, war die Möglichkeit einer allgemeinen Funktionsanalyse der im Rahmen einer Kooperation im Institut für Genetik der Universität Halle-Wittenberg designten und zur Verfügung gestellten TALE-Vektoren vergleichend in humanen ESZ und iPSZ ein interessanter experimenteller Ansatz der vorliegenden Arbeit. Die erstellten Aktivatoren sollten dafür zur Bindung an verschiedene Stellen des Promotors des miR-375-Gens fähig sein, was einen induktiven Effekt auf die Transkription ausüben kann. Die folgenden Grafiken umfassen zunächst die ermittelten Ergebnisse zur Analyse der generellen Transfektionseffizienz der mit ca. neun bis zehn Kilobasen sehr großen Vektoren, die mittels kationisch-basierendem, chemischem Transfektionsverfahren in Zellen der hESZ-Linie HUES8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 eingebracht wurden. Anschließend folgt die Darstellung der Analysen zur potenziellen Beeinflussung der Expression von miR-375 und die Ergebnisse zu möglichen korrelierenden Effekten in Bezug auf die Expression der entodermal assoziierten Gene *SOX17* und *FOXA2*.

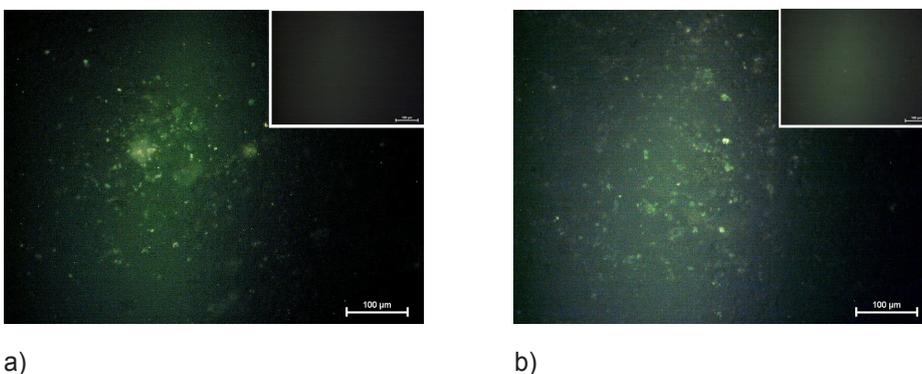


Abb. 74: Immunfluoreszenzanalyse zur Bewertung der Transfektionsfähigkeit des mittels enthaltender GFP-Markierung grün fluoreszierenden TALE-Vektors in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie

IMR90-4 (b). Die Untersuchung erfolgte 48h nach der Transfektion. Die kleinen Abbildungen repräsentieren Präparate, in denen die Zellen zur Kontrolle jeweils nur mit der Transfektionsreagenz (= Leertransfektion) inkubiert wurden. Maßstab: 100 µm.

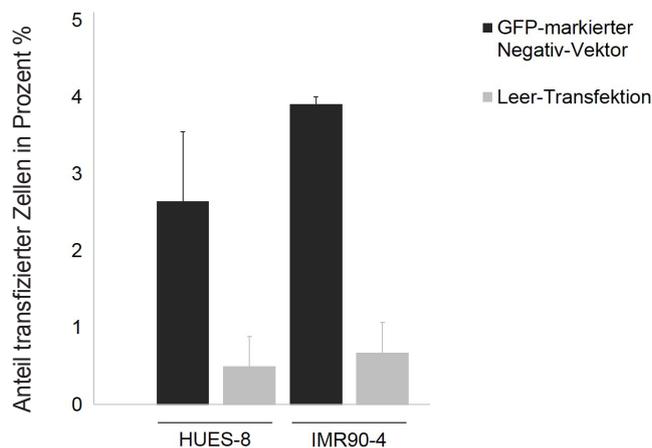


Abb. 75: Durchflusszytometrische Analyse des Anteils transfizierter Zellen der hESZ-Linien HUES-8 und IMR90-4 unter Nutzung eines GFP-markierten Negativ-TALE-Vektors 48h nach erfolgter Transfektion. MW ± SD, N = 2.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte gemeinsam mit den Immunfluoreszenzaufnahmen übereinstimmend, dass in beiden eingesetzten Linien eine erfolgreiche Transfektion nur bei einer Minderheit der Zellen geschah. Insgesamt konnte in den Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4 ein etwas höherer Wert erreicht werden, aber dennoch lag der Anteil transfizierter Zellen in beiden Linien bei unter 5 %. Die geringen unter 1 % liegenden analysierten Werte der parallel bestimmten Kontrollgruppe, die nur mit der Transfektionsreagenz behandelt wurden, können über unspezifische autofluoreszierende Eigenschaften der Zellen begründet werden. In den folgenden Diagrammen werden die potenziellen Auswirkungen der Aufnahme von TALEs in die entodermal differenzierenden Zellen in Bezug auf eine zusätzlich induktive Wirkung auf die Expression von miR-375 präsentiert.

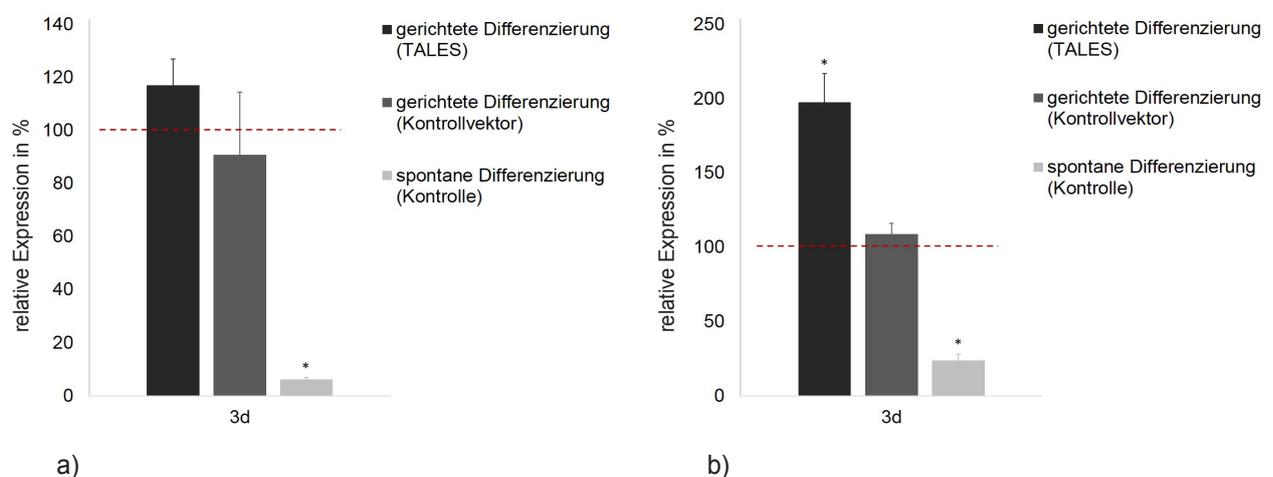


Abb. 76: Relative Quantifizierung der Expression von miR-375 am dritten Differenzierungstag, dem Zeitfenster der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen. Vergleichend erfolgte die Analyse des Einflusses einer Transfektion

von TALEs im Zuge des Entwicklungsverlaufs in Zellen der hESZ-Linie HUES-8 (a) und der hiPSZ-Linie IMR90-4 (b), wobei die Beziehung der präsentierten Daten auf die experimentelle Gruppe gerichtet differenzierter Zellen geschah, die keiner Transfektion unterlagen (= 100%, rote gestrichelte Linie). MW \pm SD, N = 3, *p \leq 0,05, d = Tag.

In Bezug auf den Einfluss der Transfektion von TALEs in sich entwickelnde entodermale Progenitorzellen ergab sich grundsätzlich ein übereinstimmender Trend in beiden eingesetzten Zelllinien im Sinne einer Steigerung der Expression von miR-375, aber im Umfang des Effektes konnten deutliche Unterschiede detektiert werden. Während in den Zellen der Linie HUES-8 nur eine leichte, nicht als signifikant bestimmbare Erhöhung festgestellt werden konnte, kam es in den Zellen der Linie IMR90-4 fast zur Verdopplung der Expression. Diese Ergebnisse wiesen auf eine bessere Aufnahme der Vektoren in die hiPSZ hin, was im Konsens mit den durchflusszytometrischen Messungen stand.

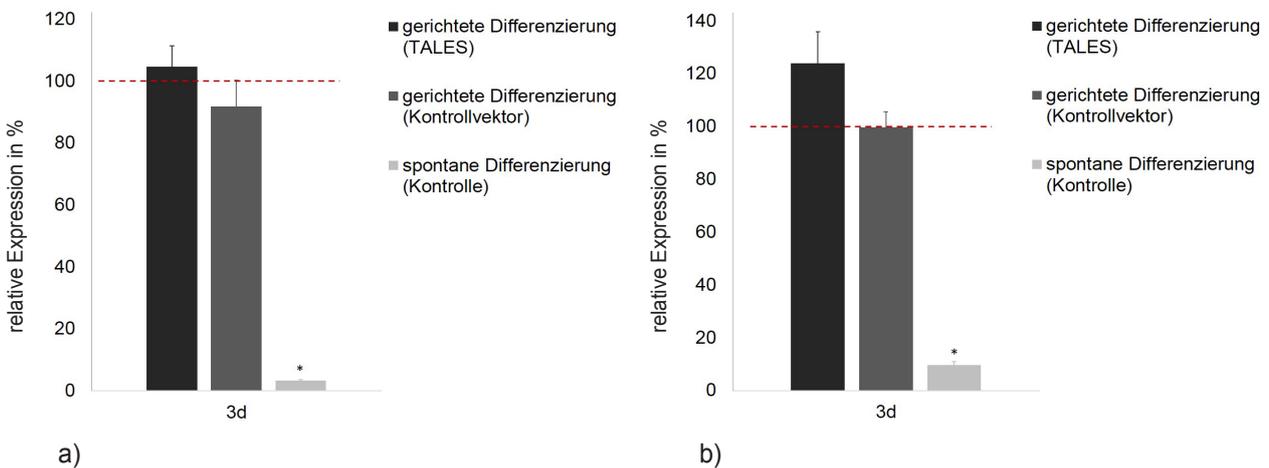


Abb. 77: Relative Quantifizierung der Expression von **SOX17** in entodermal differenzierten Zellen der Linien HUES-8 (a) und IMR90-4 (b) am dritten Tag des *in vitro* Differenzierungsverlaufs. Die dargestellten Ergebnisse wurden jeweils auf die ermittelten Daten aus der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen bezogen, die keiner Transfektion ausgesetzt waren (=100 %, rote gestrichelte Linie). MW \pm SD, N = 3, *p \leq 0,05, d = Tag.

Die vergleichende Analyse entodermaler Vorläuferzellen, die mit TALEs transfiziert wurden, ergab für die Zellen der Linie HUES-8 keine Veränderung in Bezug auf das Expressionsniveau von **SOX17**. In den Zellen der Linie IMR90-4 konnte ein Trend zur leichten Expressionssteigerung beobachtet werden, wobei der Unterschied zur Gruppe gerichtet differenzierter Zellen ohne Transfektion als nicht signifikant bewertet werden musste. Damit spiegelten die Ergebnisse zur Expressionsanalyse dieses typischen entodermalen Markergens die präsentierten Daten zur Untersuchung des Einflusses auf die Expression von miR-375 wider. Übereinstimmend zeigten in beiden Linien die Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden, welcher keine spezifische Bindung mit Promotorregionen in humanen Zellen eingehen kann, keine Veränderung der **SOX17**-Expression.

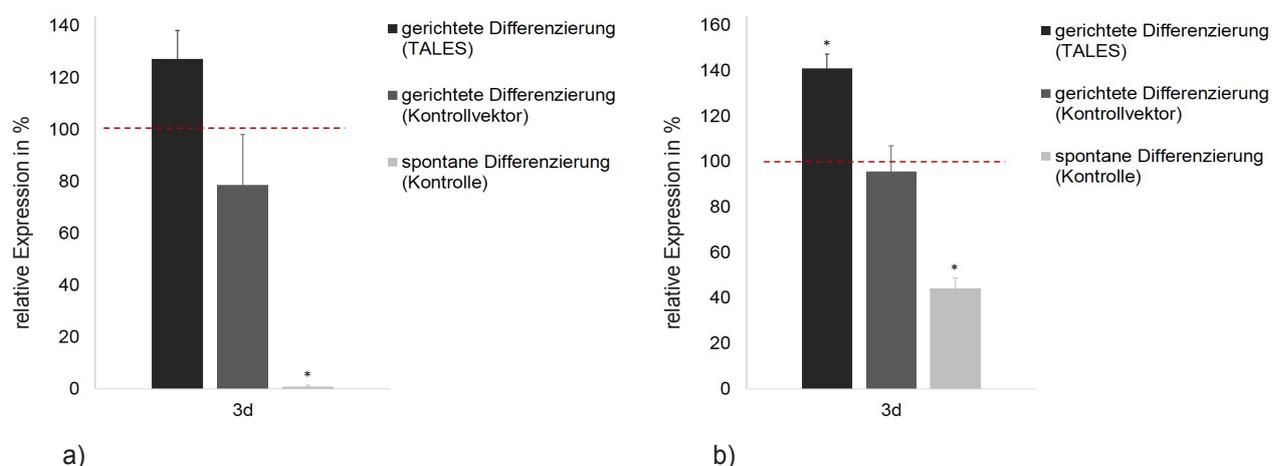


Abb. 78: Relative Quantifizierung der Expression von **FOXA2** in entodermal differenzierten Zellen der Linien HUES-8 (a) und IMR90-4 (b) am dritten Tag des *in vitro* Differenzierungsprozesses. Die dargestellten Ergebnisse wurden jeweils auf die ermittelten Daten aus der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen bezogen, die keiner Transfektion unterlagen (=100 %, rote gestrichelte Linie). MW \pm SD, N = 3, *p \leq 0,05, d = Tag.

Übereinstimmend konnte in der Gruppe der mit TALEs transfizierten entodermalen Progenitorzellen beider eingesetzter Zelllinien eine Steigerung der Expression von *FOXA2* beobachtet werden. Dieser Effekt war allerdings nur in den Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4 als statistisch signifikant zu bewerten. Die Gesamtheit der ermittelten Ergebnisse zeigte, dass die Transfektionsrate insgesamt gering war, aber in den Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4 etwas höher als in den Zellen der hESZ-Linie HUES-8. Dieser Unterschied zwischen den Zelltypen setzte sich bei der Analyse potenziell beeinflusster Faktoren fort, denn nur in den hiPSZ korrelierte die TALEs-Transfektion mit einer deutlichen Zunahme der Expression von miR-375 und auch in Bezug auf die *FOXA2*-Expression konnte ein eindeutig induktiver Effekt detektiert werden. Die insgesamt aber eher schwach ausgeprägten Effekte auf die untersuchten Marker als typische Vertreter von Regulatoren der entodermalen Entwicklung, wiesen auf die dringende Notwendigkeit zur Optimierung der Rahmenbedingungen der durchgeführten Transfektionsstudie hin. Dennoch konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die generelle Möglichkeit zur Einschleusung der großformatigen Vektorkonstrukte in sich differenzierende pluripotente Zellmodelle, wie hESZ und iPSZ, aufgezeigt werden, was als interessante Alternative zur gezielten Regulation von Genaktivitäten in Bezug auf Optimierungsstrategien von *in vitro* Differenzierungsvorgängen angesehen werden kann. Die Daten zur Korrelation zwischen einer gesteigerten Expression von miR-375 und der ebenso erhöhten Expression zumindest des einen untersuchten entodermal-assoziierten Gens *FOXA2* bestätigten in Ergänzung mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen des Einflusses eines spezifischen miR-375-Inhibitors auf die entodermale Entwicklung (Kapitel 3.5.1) die große regulatorische Bedeutung der mikroRNA-375 während dieser ersten wichtigen Etappe der pankreatischen *in vitro* Differenzierung.

4. Diskussion

Warum ist die Effektivität der *in vitro* Generation von funktionalen Insulin-produzierenden Zellen ausgehend von pluripotenten Stammzellen aktuell so gering? Was sind die potenziellen Einflussgrößen, die es gilt zu identifizieren und wenn möglich, zu optimieren? Diese Fragen beschreiben die zentrale Thematik der vorliegenden Dissertation. In den folgenden Abschnitten werden die experimentell erhaltenen Daten zur *in vitro* Differenzierung von humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen diskutiert, wobei der besondere Fokus auf der Vergleichbarkeit der Ergebnisse liegt. Damit verbunden ist die Formulierung möglichst allgemeingültiger, zelllinienunabhängiger Aussagen zur Charakterisierung einzelner Differenzierungsetappen und deren Einflussfaktoren. Die Einordnung des Entwicklungspotenzials von humanen ESZ und iPSZ ist von großem Interesse, da beide Modelle individuelle Vor- und Nachteile aufweisen, die wie in den Kapiteln 1.3.2 und 1.3.5 erläutert, potenzielle zukünftige klinische Verwendungsmöglichkeiten beeinflussen können. Voraussetzung für den Einsatz im Bereich der translationalen Medizin ist zunächst allerdings die Etablierung von sicheren und reproduzierbaren Methoden zur Formierung des gewünschten Zellderivates. Hierfür ist es unabdingbar, die grundsätzlichen molekularen Faktoren und deren vermittelte Signalwege zu entschlüsseln, die im Rahmen der Organogenese *in vivo* die Entwicklung eines bestimmten Zelltyps steuern, um die Erkenntnisse auf die schrittweise *in vitro* Differenzierung übertragen zu können. Die vorgestellten Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass sowohl mikroRNAs als auch Nährstoffe wie Glukose nicht nur für eine adäquate Funktion reifer Beta-Zellen bedeutend sind, sondern schon während der Ausbildung dieser hoch spezifischen Zellen eine wichtige Rolle spielen. Damit stellen mikroRNAs nicht nur eine sinnvolle Ergänzung zu den bereits etablierten Transkriptionsfaktoren dar, um gezielt einzelne Differenzierungsabschnitte zu charakterisieren und abzugrenzen, sondern bilden auch eine potenzielle Einflussgröße, deren Modifizierung zur Verbesserung der Differenzierungseffizienz beitragen kann. Die Analyse von Unterschieden im Expressionsprofil Pankreas-assoziiierter mikroRNAs zwischen der *in vivo* und *in vitro* Entwicklung war somit Gegenstand der vorliegenden Arbeit und führte zur Schlussfolgerung, dass eine gezielte Induktion von miR-375 die Reifung pankreatischer endokriner Vorläuferzellen begünstigt. Zusätzlich trägt eine auf den zellulären Entwicklungsprozess angepasste Glukosekonzentration im Differenzierungsmedium zur Verbesserung der Differenzierung bei und bei kombinierter Anwendung beider Modulationen treten additive und synergistische Effekte auf.

4.1 Pankreatische *in vitro* Differenzierung - Vergleich des Potenzials humaner embryonaler und induzierter pluripotenter Stammzellen

In Vorbereitung zur vergleichenden *in vitro* Differenzierung der humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen wurde die Qualität der verwendeten Zelllinien geprüft. Wie in Kapitel 3.1 präsentiert, konnte sowohl die Expression als auch Translation zahlreicher Pluripotenz-assoziiierter Gene in allen Linien erfolgreich nachgewiesen werden. Ergänzend gelang auch der Aktivitätsnachweis der alkalischen Phosphatase, woraus insgesamt auf eine hohe Qualität aller eingesetzter Zelllinien geschlossen werden konnte und damit ideale Bedingungen zur vergleichenden Differenzierung vorlagen.

Der *in vitro* Differenzierungsprozess erfolgte unter Verwendung des in Kapitel 2.1.5 erläuterten Basisprotokolls, wobei die schrittweise Generierung entodermaler, pankreatischer und letztlich endokriner, Insulin-produzierender Zellen gelang. Die Differenzierung der hESZ-Linie H9 erfolgte dabei nur über zwölf Tage, da in Bezug auf das Expressionsniveau bzw. -muster der differenzierungsrelevanten Gene und mikroRNAs ein geringeres Potenzial zur Ausbildung endokriner Vorläuferzellen im Vergleich zu den Zellen der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 erkennbar war. Aufgrund der frühen Generierung der Linie H9 im Jahr 1998 und damit verbundenen verbreiteten Anwendung in zahlreichen Forschungsprojekten stellt sie allerdings ein gut zu vergleichendes Modell dar und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur parallelen Analyse grundsätzlicher differenzierungsassoziierter Signalwege und Faktoren bis zur Bildung pankreatischer Vorläuferzellen eingesetzt (Thomson *et al.* 1998). Der Differenzierungsverlauf der beiden übrigen Zelllinien erstreckte sich hingegen über insgesamt 18 Tage. Die in Kapitel 3.2.1 vorgestellten Veränderungen der Zellmorphologie während des Entwicklungsprozesses wiesen große Übereinstimmungen in den eingesetzten Zelllinien auf, was sich zunächst im Verlust der typischen Stammzellmorphologie und nachfolgend in der deutlichen Formierung inselartiger Cluster in der Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen zeigte. Die PCR-Analyse der Expression Pluripotenz-assoziiierter Gene wie *OCT4*, *SOX2* und *NANOG* ergab übereinstimmend für alle verwendeten Zelllinien eine sukzessive Repression, die letztlich in der vollständigen Stilllegung dieser Marker sowohl in den Zellen der gerichtet als auch spontan differenzierten Gruppe mündete. Die leicht verzögerte Repression von *OCT4* in den hiPSZ kann einen Hinweis auf eine ausgeprägtere Wechselwirkung zwischen dem TKF *OCT4* und verschiedenen SOX-Proteinen in dieser Zelllinie darstellen. Studien zeigten, dass diese TKF-Kooperationen eine Rolle bei der entodermalen und / oder mesodermalen Differenzierung von pluripotenten Zellen spielen können (Stefanovic *et al.* 2009, Aksoy *et al.* 2013). Des Weiteren ist bei den reprogrammierten hiPSZ das Vorhandensein eines sogenannten epigenetischen Gedächtnisses zu bedenken, denn auch nach der Rückführung in einen pluripotenten Zustand können epigenetische Modifizierungen der somatischen Ausgangszelle erhalten bleiben, was das Potenzial einer anschließenden gerichteten *in vitro* Differenzierung beeinflussen kann (Polo *et al.* 2010; Kim, K. *et al.* 2011; Naujok und Lenzen 2012). Die eingesetzte hiPSZ-Linie IMR90-4 hat ihren Ursprung in fetalen Lungenfibroblasten und damit einem entodermal determinierten Zelltyp (Nichols *et al.* 1977). Entsprechende Entoderm-assoziierte Markierungen könnten demnach erhalten bleiben und sich grundsätzlich positiv auf das Potenzial zur erneuten Differenzierung in diese Entwicklungsrichtung auswirken. Die Hypothese stützend, konnte in Kapitel 3.2.1 gezeigt werden, dass die Expressionsrate des entodermalen Gens *SOX17* in den gebildeten Derivaten der hiPSZ-Linie IMR90-4 im Vergleich zu denen der hESZ-Linie HUES-8 leicht erhöht war. Eine in den hiPSZ stärker ausgeprägte Assoziation zwischen dem oben erwähnten TKF *OCT4* und dem Faktor *SOX17* ist demnach denkbar und bekräftigt die Ergebnisse zur verzögerten Repression von *OCT4* bei gleichzeitig effektiver Festlegung der Zellen auf ein entodermales Schicksal. Auch die TKF *SOX2* und *NANOG* können über die Aktivierung früher entodermal-assoziiierter Marker an der Ausprägung entsprechender Vorläuferzellen beteiligt sein, was ihre endgültige Repression erst nach dem Durchtritt der Zellen durch diese Entwicklungsstufe widerspiegelt (Teo *et al.* 2011). Insgesamt belegen die erzielten Ergebnisse, dass durch die Veränderung der Kulturbedingungen bzw. Mediumzusammensetzung das sensible Signalnetzwerk aus TKF, mikroRNAs und epigenetischen Modifikationen, welche gemeinsam zum Erhalt des Stammzellcharakters beitragen, mit Beginn des Dif-

ferenzierungsprotokolls gestört wurde und Entwicklungsprozesse in den Zellen aktiviert wurden (Marson *et al.* 2008). Zur Beurteilung welchen Differenzierungsweg die Zellen einschlugen, d.h. Derivate welches Keimblattes zunächst forciert generiert wurden, erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch zusätzliche PCR-basierte Untersuchungen zum Expressionsverhalten von Genen, die als typische Marker der verschiedenen Keimblattderivate erachtet werden können. Das beobachtete Expressionsmuster der Pankreas-assoziierten Gene *NKX6-1* und *NEUROD1* stimmte in allen verwendeten Linien in der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen mit den im Kapitel 1.3.3 beschriebenen Abläufen im Differenzierungsprozess überein, wonach die Entstehung pankreatischer Vorläuferzellen nach ca. neun Tagen und endokriner Zellen etwa ab dem zwölften Tag unter Nutzung des etablierten Differenzierungsprotokolls zu erwarten war. Die Aktivität des Gens *PAX6* ist nicht nur ein Merkmal pankreatischer endokriner Zellen, sondern spielt auch in der partiell ähnlichen Entwicklung neuronaler Zellen eine wichtige Rolle (Götz *et al.* 1998, Hou *et al.* 2013, Huettl *et al.* 2015). Der Verlauf der Expression muss demnach immer im Kontext mit der Aktivität weiterer Pankreas-assoziierten Gene bewertet werden, um Aussagen über eine erfolgreiche Festlegung der Zellen auf ein pankreatisches Entwicklungsschicksal treffen zu können. Während das Expressionsniveau von *PAX6* in den gerichtet differenzierten Zellen mit fortschreitender Differenzierung anstieg, konnte in den spontan differenzierenden Zellen der Kontrollgruppe schon in der frühen Entwicklungsphase eine deutliche Expression detektiert werden, die im fortlaufenden Differenzierungsprozess eher rückläufig war. Aus diesem Muster konnte gemeinsam mit dem ausbleibenden Expressionsanstieg der Gene *NKX6-1* und *NEUROD1* auf die unkoordinierte und früh determinierte Ausbildung von neuronal-assoziierten Vorläuferzellen geschlossen werden. Gestützt wurde diese Erkenntnis mit dem Muster der Expression von *NEUROD6*, einem weiteren neuronalen Gen. Während in den gerichtet differenzierten Zellen nur vereinzelt eine schwache Aktivität detektiert werden konnte, war in den Zellderivaten der Kontrollgruppe vor allem zum Ende des Differenzierungsprozesses übereinstimmend in den verwendeten Zelllinien eine deutliche Expression nachweisbar, was die Festlegung eines Teils der spontan differenzierten heterogenen Zellgruppe auf ein neuronales Schicksal bestätigte. Der, wenn auch im Vergleich zur Kontrollgruppe schwächer ausgeprägte, Nachweis der Expression des Mesoderm-assoziierten Gens *MEOX1* und des neuronalen Gens *NEUROD6* in gerichtet differenzierten Zellen verwies auf die potenzielle Ausbildung von Derivaten auch dieser Keimblätter neben der schrittweisen und durch die protokollgerechte Expression von *NKX6-1*, *NEUROD1* und *PAX6* bestätigten Formierung pankreatischer endokriner Vorläufer (D'Amour *et al.* 2005; Jang *et al.* 2008; Uittenbogaard *et al.* 2010). Damit wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit die unvollständige Selektivität und damit einhergehende limitierte Effektivität der aktuell gängigen *in vitro* Differenzierungsprotokolle vergleichend am Modell der hESZ und hiPSZ aufgezeigt (D'Amour *et al.* 2005; Kroon *et al.* 2008; Bruin *et al.* 2014; Hrvatin *et al.* 2014).

Die Aktivität der Gene *SOX17*, *FOXA2*, *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN*, welche zu den bedeutendsten Pankreas-assoziierten Markern gehören und die einzelnen Etappen der *in vitro* Differenzierung definieren, wurde in allen drei verwendeten Zelllinien mittels quantitativer *Real-Time* PCR untersucht. Erneut fiel die große Ähnlichkeit der erhobenen Daten in Bezug auf den Expressionsverlauf der analysierten Gene in den differenzierenden Zellen der hESZ-Linien und der hiPSZ-Linie auf, was die Aktivierung grundlegender und notwendiger Signalwege zur sukzessiven Festlegung der Zellen auf ein pankreatisches Schicksal bestätigte und damit die generelle Nutzbarkeit des im Rahmen der vorliegenden

Dissertation für die vergleichende Differenzierung aller eingesetzter Zelllinien etablierten Basis-Differenzierungsprotokolls aufzeigte.

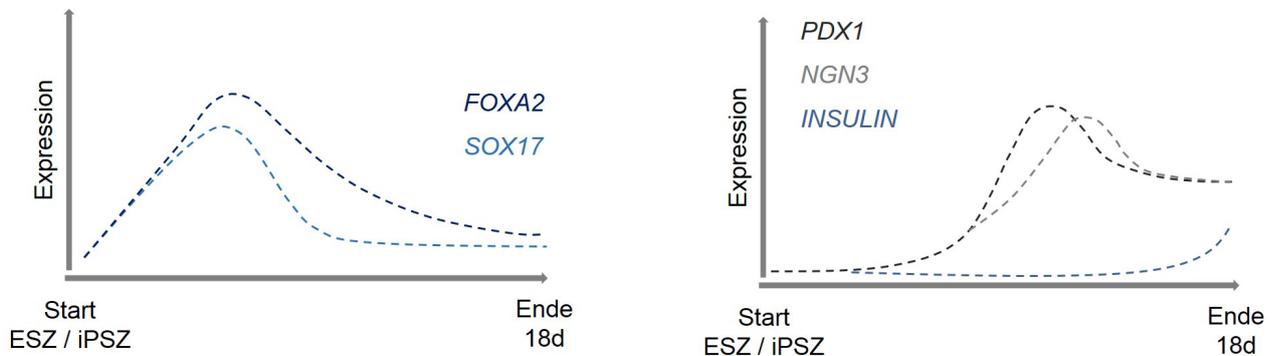


Abb. 79: Schematische Darstellung des analysierten Expressionsverlaufs bedeutender Gene, die mit ihrer Aktivität die einzelnen Etappen der pankreatischen *in vitro* Differenzierung charakterisieren. Die Genprodukte wirken bis auf INSULIN direkt als TKF und legen durch die zum Teil gegenseitige positive Beeinflussung und Aktivierung weiterer differenzierungsrelevanter Gene sukzessive die differenzierenden Zellen auf die pankreatische Entwicklungsrichtung fest. d = Tag.

Aus der Gesamtheit der Ergebnisse der mittels qPCR durchgeführten Bestimmung des Expressionsmusters bedeutender differenzierungssteuernder Gene gemeinsam mit den beobachteten Morphologieveränderungen und den durch PCR-Analysen ermittelten Expressionsdaten einer Reihe von Genen, welche für die umfassende Charakterisierung und Einordnung der Selektivität des Differenzierungsprozesses unabdingbar sind, zeigte sich, dass eine erfolgreiche gerichtete Differenzierung pankreatischer endokriner Vorläuferzellen vergleichend in hESZ und hiPSZ gelang. Die in Abbildung 79 schematisch dargestellten Expressionsprofile von *SOX17*, *FOXA2*, *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* während der *in vitro* Differenzierung spiegeln die nach anerkannten etablierten Protokollen zu erwartende Form wider (Kroon *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2009; Bruin *et al.* 2013; Pagliuca *et al.* 2014; Pellegrini *et al.* 2015). Damit konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählte Mediumzusammensetzung bzw. Substitution von Wachstumsfaktoren einen gerichteten Differenzierungsprozess ermöglichte, in dessen Folge die schrittweise Einengung des Entwicklungspotenzials der pluripotenten Ausgangszellen in bekannter Abfolge geschah und zur Ausbildung der endokrinen Vorläuferzellen führte. Diesem sichtbar zelllinienunabhängigen Prozess liegen grundlegende regulatorische Mechanismen zu Grunde, welche einer Nachahmung der in Kapiteln 1.2.1 und 1.3.4 beschriebenen Signalwege, die bei der *in vivo* Organogenese die Ausbildung der pankreatischen Zelltypen vermitteln, entsprechen. Trotz der großen generellen Übereinstimmung des Expressionsverlaufs zwischen den untersuchten Zelllinien waren doch individuelle Unterschiede im Niveau der Expression detektierbar, was auf ein individuelles Potenzial der Zelllinien zur Entwicklung in die pankreatische Richtung hindeutet. Einige Studien zu vergleichenden *in vitro* Differenzierungsprozessen verschiedener pluripotenter Stammzelllinien in Derivate der drei Keimblätter konnten deutliche Unterschiede im Differenzierungspotenzial feststellen,

die u.a. mit der genetischen Determination der Zellen bzw. der Wahl des somatischen Ausgangsmaterials bei iPSZ zu begründen sind (Bar-Nur *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2011; Liang und Zhang 2013). Diese Erkenntnisse können dazu beitragen, die für eine bestimmte Fragestellung potenteste Linie zu wählen, um eine möglichst effiziente und reproduzierbare Generierung der gewünschten Zellerivate sicher zu stellen. Aufgrund der in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse aus den Analysen des Expressionsmusters und -niveaus differenzierungsrelevanter Gene und mikroRNAs stellten sich die hESZ-Linie HUES-8 und die hiPSZ-Linie IMR90-4 als Zelllinien mit vergleichbar hohem Potenzial zur pankreatischen Differenzierung heraus, während die hESZ-Linie H9 eine schwächere Aktivierung einiger bedeutender Marker wie *SOX17* und *NGN3* aufwies. Zusätzlich konnte keine zunehmende Expression der für eine adäquate Differenzierung nötigen miR-375 mit der Ausbildung pankreatischer Vorläufer detektiert werden, weshalb die ESZ der Linie H9 zur allgemeinen vergleichenden Charakterisierung der Differenzierungsetappen zwar mitgeführt wurden, aber die durchgeführten Modulationen des Basis-Differenzierungsprotokolls zur Steigerung der Differenzierungseffizienz mit Hilfe der Linien HUES-8 und IMR90-4 erfolgten.

Interessanterweise konnte in den Zellen der Linie H9 allerdings in der ersten wichtigen Differenzierungsetappe, der Bildung entodermaler Zellen, ein höheres Expressionsniveau des typischen Marker-gens *FOXA2* im Vergleich zu den anderen Linien detektiert werden. Hierbei könnte es sich um einen teilweise kompensatorischen und zelllinienspezifischen Effekt zwischen den TKF *SOX17* und *FOXA2* bei der Regulation von Signalwegen zur Ausbildung entodermaler Zellen handeln. Denn die Gesamtheit der erhobenen Daten aus Morphologieveränderung sowie Transkriptions- und Translationsanalysen zwischen den drei eingesetzten Zelllinien verdeutlichte, dass auch die Zellen der Linie H9, beschränkt auf die erste Differenzierungsetappe, ein grundsätzlich gutes Entwicklungspotenzial besaßen, was sich in der Ähnlichkeit der generellen Expressionsmuster von *SOX17*, *FOXA2* und miR-375 zeigte. Bei der vergleichenden Betrachtung des Expressionsverlaufs von *PDX1* in den sich formierenden Zellerivaten zeigte sich eine erwartungsgemäß starke Aktivierung des Gens mit Festlegung der Zellen auf ein pankreatisches Schicksal, welche allerdings nicht auf hohem Niveau bis zum Ende des Differenzierungsvorganges erhalten blieb, sondern übereinstimmend in den untersuchten Linien eine sukzessive Reduktion aufwies. Aufgrund der zahlreichen aktivierenden Wirkungen des TKF *PDX1*, die ausführlich in Kapitel 1.3.4 beschreiben wurden, wäre aber eine anhaltend starke Expression dieses Gens bis zum Ende der zellulären Entwicklung und damit auch in entstehenden Insulin-produzierenden Zellen wünschenswert. Die beobachtete Repression im Differenzierungsverlauf wies daher auf die erfolgreiche aber nicht selektive und damit nur eingeschränkt effiziente schrittweise Entwicklung pankreatischer und folglich endokriner Vorläuferzellen unter Nutzung des etablierten Basis-Differenzierungsprotokolls hin, welches sich in seinen Grundzügen an denen bereits publizierter Protokolle und damit dem aktuellen Stand der Forschung orientierte (D'Amour *et al.* 2006; Kroon *et al.* 2008; Naujok *et al.* 2011; Bruin *et al.* 2014; Hrvatin *et al.* 2014).

Ein vergleichbares Bild stellte das detektierte Expressionsmuster des endokrin-assoziierten Gens *NGN3* dar. Die zeitlich leicht zu *PDX1* versetzte Aktivierung entsprach den Erwartungen, dass die gerichtete Differenzierung zur Festlegung der bereits formierten pankreatischen Progenitorzellen auf ein endokrines Zellschicksal führte. Dennoch waren auch in diesem Prozess Limitierungen zu erkennen, denn erneut verblieb die Expressionsrate von *NGN3* nicht bis zum Abschluss der Differenzierungsverlaufs

auf einem anhaltend hohen Niveau. Damit war die weitere Spezialisierung und Reifung der generierten endokrinen Vorläufer in Richtung Insulin-produzierende Zellen nur eingeschränkt mit geringer Effektivität möglich, denn die TKF PDX1 und NGN3 üben zahlreiche aktivierende Funktionen aus, die letztlich über eine Aktivierung weiterer Effektoren und der Ausbildung positiver Rückkopplungsmechanismen auch zur Expression der typischen Beta-Zell-Gene *INSULIN* und *MAFA* beitragen (Aramata *et al.* 2005; Vanhoose *et al.* 2008; Kaneto *et al.* 2008; Xu *et al.* 2013).

Eine ansteigende Expression von *INSULIN* konnte in den differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 erst im weit fortgeschrittenen Differenzierungsverlauf und damit erwartungsgemäß mit der Ausbildung spezifizierter endokriner Progenitorzellen gemessen werden, wobei das Expressionsniveau vergleichbar niedrig war. Dieses Ergebnis bestätigte die abnehmende Effizienz, welche die etappenweise pankreatische *in vitro* Differenzierung unter Verwendung der aktuell etablierten Protokolle begleitet. Es kommt somit zur Ausbildung von geringen Mengen an Produkten in Form von nicht terminal ausdifferenzierten Beta-Zell-Vorläufern. (Kroon *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2009; Bruin *et al.* 2014; Hrvatin *et al.* 2014). Ergänzt wurden die experimentell durchgeführten Studien zur Charakterisierung der vergleichenden pankreatischen *in vitro* Differenzierung an hESZ und hiPSZ durch Immunfluoreszenzanalysen. Wiederholt fiel die große Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen den verwendeten Zelllinien auf. Die starke, der sukzessiven Abfolge der Differenzierungsetappen entsprechenden, Synthese der TKF SOX17, FOXA2, PDX1 und NGN3 bekräftigte abermals die erfolgreich vergleichende und reproduzierbare *in vitro* Differenzierung in endokrine pankreatische Zellen unter Verwendung des im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusammengestellten Differenzierungsprotokolls. Gleichzeitig konnten die Grenzen und Makel der auf bisherigen Erkenntnissen beruhenden Protokolle aufgezeigt werden. Da die Limitierungen in den Derivaten beider über 18 Tage differenzierten Zelllinien auftraten, konnte auf zelllinienunabhängige ausbleibende Signale geschlossen werden, die einer effektiven und selektiven Bildung Insulin-produzierender Zellen aktuell im Wege stehen und die Notwendigkeit zur Optimierung bestehender Protokolle verdeutlicht. Der Produktionsnachweis von *INSULIN* gelang in einigen Bereichen der am Ende des Differenzierungsprozesses ausgebildeten inselförmigen Strukturen in der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen. Gemeinsam mit dem parallelen Nachweis von C-PEPTID konnte damit erfolgreich die endogene Hormonproduktion bestätigt werden. Allerdings konnte im Rahmen von Ko-Färbungen auch partiell der Nachweis von *INSULIN* und *GLUCAGON* bzw. *SOMATOSTATIN* erbracht werden, was auf die nicht terminale Differenzierung einiger *in vitro* generierten Zellen hindeutete. Die Bildung polyhormonaler Zellen als Endpunkt im Differenzierungsprozess, d.h. Insulin-produzierender Zellen, die zusätzlich in geringem Umfang auch andere Pankreashormone synthetisieren, stellt ein bisher ungelöstes Problem der aktuell etablierten Protokolle zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung aus pluripotenten Zellen dar (Chmielowiec und Borowiak 2014; Hrvatin *et al.* 2014).

Als Fazit kann aus den umfassenden Ergebnissen zur *in vitro* Differenzierung zweier hESZ-Linien und einer hiPSZ-Linie unter Berücksichtigung der Daten zum Morphologiewandel, dem Expressionsmuster Pluripotenz-assoziiertes und differenzierungsrelevanter Markergene sowie dem Aktivitätsnachweis bedeutender TKF bzw. der Produktion pankreatischer Hormone abgeleitet werden, dass unter Verwendung des im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Protokolls die reproduzierbare und zelllinienunabhängige Bildung Insulin-produzierender Zellen grundsätzlich möglich war. Das erlaubte weiterführende vergleichende Analysen von Expressionsprofilen Pankreas-assoziiertes mikroRNAs zur ergänzenden

Charakterisierung der Differenzierungsetappen und die daraus resultierenden Modifikationsansätze des Basis-Differenzierungsprotokolls. Die in den folgenden Abschnitten diskutierten Ergebnisse zur aktiven und gezielten Modulation des *in vitro* Differenzierungsprozesses, welche parallel an den zwei potenten Modellsystemen der hESZ und hiPSZ durchgeführt werden konnten, führten zur Identifikation von zwei bedeutenden Einflussfaktoren, mit deren Modifikation einer fortlaufend sinkenden Effizienz, welche aktuell die späten *in vitro* Differenzierungsetappen kennzeichnet, gezielt entgegengewirkt werden konnte. Als besonders wünschenswert gilt bei der Optimierung bestehender Protokolle der möglichst begrenzte Einsatz weiterer beeinflussender Chemikalien, die zu teilweise unabsehbaren Nebeneffekten führen und eine sichere, reproduzierbare Generierung der gewählten Zellderivate erschweren könnten. In Bezug darauf sei erwähnt, dass einige aktuelle Studien zur Optimierung der pankreatischen *in vitro* Differenzierung einen sehr umfassenden Einsatz verschiedenster Medienzusätze aufweisen (Pagliuca *et al.* 2014; Rezania *et al.* 2014), der eine Automatisierung des Verfahrens für klinische Zwecke nahezu unmöglich macht.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Modulation zweier Größen, nämlich dem Nährstoff Glukose und der Pankreas-assoziierten mikroRNA-375, die grundsätzlich bereits Teil der zellulären Signalwege im Zuge des pankreatischen Differenzierungsprozesses sind, stellte daher eine besonders interessante und sozusagen „minimal-invasive“ Möglichkeit zur Optimierung einzelner Etappen der *in vitro* Differenzierung dar, da eine Belastung der während des Differenzierungsverlaufs sensibel reagierenden Zellen mit einer Vielzahl an Chemikalien, deren exakte Wirkung und damit auch potenziell schädigende Funktionen oftmals nicht restlos aufgeklärt ist, vermieden werden konnte.

4.1.1 Pankreas-assoziierte mikroRNAs

Die Ergebnisse zur vergleichenden Analyse des Expressionsprofils Pankreas-assoziiierter mikroRNAs während des *in vitro* Differenzierungsprozesses bestätigten die Erkenntnisse zur Charakterisierung der einzelnen Entwicklungsabschnitte und zeigten dabei die allgemeine Gültigkeit der mikroRNA-vermittelten zellulären Regulationsmechanismen in Bezug auf eine erfolgreiche schrittweise Generierung pankreatischer Zellen auf, denn erneut konnten große Übereinstimmungen zwischen den differenzierenden Zellen der eingesetzten Linien festgestellt werden. Besonders deutlich war die bereits in Studien u.a. von Hinton *et al.*, Fogel *et al.* und Francis *et al.* beschriebene, aber funktional noch nicht aufgeklärte Bedeutung von miR-375 im Rahmen der Formierung entodermaler Vorläuferzellen zu erkennen, denn in allen drei verwendeten Zelllinien konnte ein zeitlich auf die entodermale Differenzierungsetappe beschränkte starke Aktivierung dieser mikroRNA gemessen werden (Hinton *et al.* 2014; Fogel *et al.* 2015; Francis *et al.* 2015). Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die miR-375 als ein klarer Marker *in vitro* generierter entodermaler Zellen angesehen und damit zur ergänzenden Charakterisierung und zur Beurteilung der Ausbildungseffizienz dieses Zelltyps eingesetzt werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte, wie in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben, eine nähere Überprüfung der Rolle von miR-375 bei der entodermalen Festlegung der Zellen, wobei einerseits die aktivierenden Ursachen der starken Expression von miR-375 und andererseits ihre potenziellen Wirkungen auf Faktoren innerhalb entodermal-assoziierten Signalwegen betrachtet wurden. Zur experimentellen Analyse dienten dabei Versuche zur gezielten Inhibierung bzw. Induktion der miR-Expression während

der Bildung entodermaler Zellen, verbunden mit der Untersuchung eines potenziellen Einflusses auf die Expression typischer Marker wie *SOX17* und *FOXA2*. Zusätzlich spiegelte das detektierte Expressionsprofil von miR-375 während den späteren *in vitro* Differenzierungsetappen, also der Ausbildung pankreatischer und letztlich endokriner Vorläuferzellen, die bedeutenden Funktionen der mikroRNA wider, die sie bereits in dieser Entwicklungsphase und auch in reifen Beta-Zellen zum Erhalt dieses hochspezialisierten Zelltyps ausübt (Avnit-Sagi *et al.* 2009; Poy *et al.* 2009; Latreille *et al.* 2015). Hierbei bestätigte sich jedoch auch das geringere Potenzial der entodermalen Derivate der hESZ-Linie H9 zur weiteren Festlegung auf ein pankreatisches Schicksal, denn im Gegensatz zu den differenzierenden Zellen der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 war kein erneuter starker Expressionsanstieg um den neunten Differenzierungstag messbar, welcher zeitlich mit der Formierung pankreatischer, PDX1-exprimierender Zellen korreliert. Während in den sich bildenden endokrinen, Insulin-produzierenden Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 eine anhaltend starke Expressionsrate von miR-375 detektiert werden konnte, blieb eine entsprechende Aktivität in den Derivaten der Linie H9 aus. Gemeinsam mit dem insgesamt deutlich niedrigerem Expressionsniveau von miR-30d, miR-335 und miR-182 konnte auf ein individuell geringeres Potential dieser Zelllinie zur Differenzierung in die pankreatische Entwicklungsrichtung geschlossen werden. Der Tatsache folgend, dass die mikroRNA-375 als die in pankreatischen Beta-Zellen am stärksten exprimierte miR gilt und wie in Kapitel 1.4.2 erläutert, für den Erhalt und der Regulation der adäquaten Funktion dieses Zelltyps essentiell ist, stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage, ob eine zusätzliche gezielte Induktion der miR-Expression in den späten zellulären *in vitro* Entwicklungsetappen zur Verbesserung der Differenzierungseffizienz beitragen kann. Die Expressionsprofile der ebenfalls analysierten mikroRNAs-124a, -30d, -335, -200c, -9 und -182 entsprachen in hohem Maße den in Kapitel 1.4.2 erläuterten Erkenntnissen, welche aus wenigen zellbasierten *in vitro* Experimenten und einigen *in vivo* Studien unter Verwendung von fetalem Pankreasmaterial verschiedener Entwicklungsstufen gewonnenen wurden und Hinweise zum optimalen Expressionsmuster für eine erfolgreiche Entwicklung des Pankreas bzw. der einzelnen enthaltenen spezialisierten Zelltypen lieferten (Joglekar *et al.* 2011; Eliasson und Esguerra 2014; Kaspi *et al.* 2014; Li *et al.* 2014; Özcan 2014; Singer *et al.* 2015). Die im Rahmen solcher Studien vereinzelt eingesetzten pluripotenten Zelllinien entsprachen allerdings nicht denen der vorliegenden Arbeit, so dass die hier durchgeführten Vergleiche zum Erkenntnisgewinn über zelllinienunabhängige Expressionsprofile und damit grundlegende miR-regulierter Signalwege beitragen konnten.

Wie bereits in Kapitel 1.4.2 umfassend beschrieben, ist die Ausbildung eines bestimmten Musters im Expressionsverlauf von miR-124a während der Differenzierung von großer Bedeutung für das Potenzial zur klaren Festlegung auf ein pankreatisches Schicksal. Übereinstimmend konnte in den Zellen aller eingesetzter Linien eine sehr geringe und im Vergleich zum Niveau im pluripotenten Ausgangsmaterial noch deutlich herabgesenkte Transkriptmenge detektiert werden, was aufgrund der miR-basierten negativen Regulation von *FOXA2* als wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche und effiziente Ausbildung entodermaler Zellen gilt und die zelllinienunabhängige Nutzbarkeit des etablierten Differenzierungsprotokolls somit bestätigte (Baroukh *et al.* 2007). Die Aufrechterhaltung des Potenzials zur Aktivierung von *FOXA2* in den entstehenden entodermalen Vorläufern ist auch für die weitere Spezifizierung der Zellen unabdingbar, denn als

TKF wirkt FOXA2 nicht nur wie in Abschnitt 1.4.2 erwähnt im sich gegenseitig beeinflussenden Netzwerk aus Faktoren mit, die zur sukzessiven Festlegung der Zellen auf die entodermale Entwicklungsrichtung beitragen, sondern aktiviert auch die Expression von *PDX1*, dessen Wirkung essentiell für die Ausbildung pankreatischer Progenitorzellen ist (Ahlgren *et al.* 1998; Ohneda *et al.* 2000; Raum *et al.* 2006; Wang *et al.* 2013). Der beobachtete moderate Anstieg der Expression von miR-124a zum Ende des *in vitro* Differenzierungsprozesses spiegelte den erfolgreichen und gerichteten Fortgang der zellulären Entwicklung wider, da die mikroRNA in Beta-Zellen über die Beeinflussung von Exozytose-assoziierten Proteinen regulatorisch in die Signalwege zur Insulin-freisetzung eingreift (Lovis *et al.* 2008). Die in den verwendeten Zelllinien gemessenen Expressionsmuster von miR-124a in den spontan differenzierten Zellen der Kontrollgruppe ergänzten den im Rahmen der Analyse von Morphologieveränderungen und Expression differenzierungsrelevanter Gene gewonnenen Eindruck, dass hier keine forcierte Entwicklung in eine bestimmte Richtung erfolgte, sondern vielmehr ein heterogenes Gemisch verschiedener Derivate entstand. Sichtbar wurde dies vor allem an der, im Vergleich zur Gruppe gerichtet differenzierter Zellen, deutlich stärkeren Expression von miR-124a in den ersten Differenzierungsstadien, was der Bildung entodermaler Zellen im Wege stand. Da die miR-124a auch in der neuronalen Entwicklung eine Rolle spielt und die Formierung entsprechender Vorläuferzellen in der Kontrollgruppe durch den Expressionsnachweis neuronal-assoziiierter Gene aufgezeigt werden konnte, erklärt das ihre Aktivität zu Beginn der zellulären Entwicklung (Baroukh und van Obberghen 2009; Akerblom und Jakobsson 2014).

Allgemein waren bei der vergleichenden Profilanalyse der untersuchten mikroRNAs partielle Ähnlichkeiten in den sich entwickelnden Zellen der gerichtet differenzierten und der spontan differenzierten Gruppen ersichtlich. Vor diesem Hintergrund gilt es zu bedenken, dass die erhaltenen miR-Expressionsmuster zur Beurteilung von Erfolg und Spezifität einer gezielten pankreatischen *in vitro* Differenzierung nicht isoliert betrachtet werden dürfen. Vielmehr muss die Schlussfolgerung im Kontext mit den Ergebnissen zur Expression und Translation differenzierungssteuernder Gene sowie den Beobachtungen zum Morphologiewandel der Zellen über den gesamten Differenzierungsprozess hinweg erfolgen. Bei dieser Betrachtung der Gesamtheit der erhobenen Daten kann in Zellen der Kontrollgruppe nicht auf eine forcierte Entwicklung in die pankreatische Richtung geschlossen werden. Vielmehr ist zu vermuten, dass die analysierten mikroRNAs, die aufgrund ihrer Bindungseigenschaften mehrere hundert Ziel-mRNAs regulieren können somit auch wichtige Funktionen in Zellen ausüben können, die eine ekto- oder mesodermale Entwicklungsrichtung eingeschlagen haben. Das spiegelte sich in der abschnittsweise starken Aktivität der analysierten miRs auch in Zellen der spontan differenzierten Kontrollgruppe wider.

Das detektierte Muster der Expression von miR-335 zeigte in der Zellen der gerichtet differenzierten Gruppe Übereinstimmungen zum Profil von miR-124a. Das bestätigte die Ergebnisse einiger Studien, die zeigten, dass zu den Zielgenen von miR-335 neben *SOX17* und *FOXA2* auch Regulatoren der Insulinexozytose gehören (Esguerra *et al.* 2011; Yang *et al.* 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit vergleichend in den eingesetzten Zelllinien beobachtete geringe Expressionsrate in der frühen Entwicklungsphase und der Anstieg der Aktivität zum Ende des Differenzierungsprozesses bekräftigen somit erneut die Schlussfolgerung, dass die Aktivierung grundlegender, zell-

linienunabhängiger Signalwege, die ausgelöst durch das verwendete Differenzierungsprotokoll, zur erfolgreichen sukzessiven Festlegung der pluripotenten Zellen auf die Formierung pankreatischer endokriner Zellen führt. Die detektierten Expressionsprofile der mikroRNAs-30d, -200c, -9 und -182 stützten diese These, da übereinstimmend in den verwendeten Zelllinien die gerichtet differenzierten Zellerivate eine zunehmende Steigerung des Expressionsniveaus zeigten. All diese mikroRNAs üben, wie in Kapitel 1.4.2 erläutert, vielzählige bedeutende regulatorische Funktionen in sich formierenden endokrinen pankreatischen Zellen und letztlich auch reifen Beta-Zellen aus. Die aufgrund der überragend starken Expression und der Fülle an essentiellen Funktionen in Bezug auf Ausbildung und Erhalt von Beta-Zellen als wichtigste pankreatische mikroRNA geltende miR-375 wurde folglich im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählt, um zu untersuchen, ob eine künstliche Induktion dieser einer mikroRNA in den sich *in vitro* formierenden endokrinen Vorläuferzellen zur Verbesserung der Differenzierungseffizienz beitragen kann.

4.2 Einfluss gezielter Modifikationen auf die Effizienz der pankreatischen *in vitro* Differenzierung - Vergleich zwischen humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Nachdem durch die Gesamtheit der ermittelten Daten zur vergleichenden Differenzierung humaner ESZ und iPSZ erfolgreich die grundsätzliche Nutzbarkeit des im Rahmen der vorliegenden Dissertation entsprechend etablierten Basis-Protokolls bestätigt werden konnte, waren gezielte Modifikationen an den als bedeutend identifizierten Einflussgrößen möglich. In den folgenden Abschnitten erfolgt schrittweise die Diskussion der Resultate zur Induktion von miR-375 in pankreatischen Vorläuferzellen, zur Glukosestimulation sowie zur Kombination beider Protokollvariationen, wobei auf die potenziell zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen, welche die detektierten positiven Effekte in Bezug auf die Effizienz der Differenzierungsetappen vermitteln, eingegangen wird.

4.2.1 Induktion von miR-375

Die in Kapitel 3.4.1 vorgestellten mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass nach Transfektion von miR-375-Molekülen in die sich formierenden pankreatischen Progenitorzellen eine insgesamt komplexere Ausbildung inselbförmiger Strukturen zum Ende des *in vitro* Differenzierungsprozesses im Vergleich zu den Zellen, die gerichtet nach dem Basisprotokoll differenziert wurden, erfolgte. Da dieser Effekt übereinstimmend in den Zellerivaten der eingesetzten hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 beobachtet werden konnte, war eine durch die Transfektion von miR-375 ausgelöste Beeinflussung allgemein gültiger und für die pankreatische Spezifizierung notwendiger Signalwege anzunehmen, was sich schließlich in einer sehr homogenen Zellmorphologie widerspiegelte. Bei der Betrachtung des Expressionsprofils von miR-375 im weiteren Differenzierungsverlauf nach erfolgter Transfektion reifer miR-375-Moleküle an Tag neun und zwölf fiel die übereinstimmend starke und bis zum Ende des Entwicklungsverlaufs an Tag 18 anhaltende Erhöhung der Expressionsrate in den analysierten Zelllinien auf. Sollte es in den sich formierenden Zellen aufgrund der transfektionsbedingten Erhöhung der miR-375-Verfügbarkeit zur Aktivierung differenzierungsfördernder Signalwege kommen,

dann könnten die beteiligten Faktoren zur Verbesserung der Festlegung der Zellen auf ein endokrines Schicksal beitragen. Da in spezifizierten endokrinen Vorläufern und in reifen Beta-Zellen die miR-375 aufgrund ihrer zahlreichen Funktionen zu den am stärksten exprimierten mikroRNAs gehört, war somit eine zusätzliche Induktion der endogenen miR-375 in den mittels Transfektion reifer miR-375-Moleküle effizienter differenzierten Zellen denkbar. Um diese Hypothese zu überprüfen, erfolgte die vergleichende spezifische Expressionsanalyse der *pre*-miR-375. Dieses Zwischenprodukt entsteht während der endogenen Prozessierung im Verlauf der mikroRNA-Synthese und unterschied sich deutlich von den exogen zugeführten reifen miR-375-Molekülen.

Die erneut detektierbaren übereinstimmenden Ergebnisse zwischen den analysierten Zelllinien im Sinne einer, mit der Expressionsrate der reifen miR-375 korrelierenden, starken Erhöhung des Expressionsniveaus der *pre*-miR bestätigten die Annahme, dass eine zweimalige exogene Transfektion von miR-375-Molekülen zur langfristigen Förderung differenzierungssteuernder Signalwege führt. Mit der damit verbundenen effektiveren Determinierung der generierten Zellen kam es zur Steigerung der endogenen Produktion von miR-375, was als Annäherung an die bei der *in vivo* Organogenese des Pankreas auftretenden Prozesse gewertet werden kann. Gestützt wird diese These durch die erhaltenen Ergebnisse unter Nutzung des gewählten experimentellen Versuchsaufbaus. Nur am neunten und zwölften Tag der *in vitro* Differenzierung erfolgte eine Transfektion von miR-375-Molekülen, wobei die laut Herstellerangaben und vorangegangenen Studien innerhalb der Arbeitsgruppe stärksten Effekte nach jeweils ca. 72 Stunden detektierbar sind. Die starke kurzfristige Wirkung der exogen applizierten miR-375-Moleküle blieb demnach nur ca. bis zum 15. Tag bestehen. Die nachweislich anhaltend starke induzierte intrazelluläre Synthese von miR-375 bis zum 18. Tag bestätigte somit die Aktivierung von Signalwegen und Regulationsmechanismen, die sich positiv auf die Differenzierung auswirkten und zur Aufrechterhaltung des hohen endogenen miR-375 Niveaus führten. Schlussfolgernd kann von der Ausbildung einer regulativen Aktivierungsschleife ausgegangen werden, in der die verbesserte Effektivität der Generierung endokriner Vorläuferzellen durch die damit verbundene Aktivität zahlreicher TKF und ablaufenden epigenetischen Modifikationen zur Induktion der zellulären Produktion von miR-375 beiträgt. Die vielschichtigen Wirkungen der mikroRNA führen zur effizienteren Festlegung der sich formierenden Zellen auf ein definitives endokrines Zellschicksal, was wiederum die anhaltende Aktivität charakterisierender TKF begünstigt. Die in Kapitel 3.4.1 vorgestellten Ergebnisse zum Expressionsmuster essentieller differenzierungsrelevanter Gene wie *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* stützen die formulierte Schlussfolgerung, da zelllinienunabhängig jeweils eine klare Korrelation zwischen der Induktion von miR-375 und der dauerhaft erhöhten Expressionsrate der Gene bis zum Ende des Differenzierungsprozesses aufgezeigt werden konnte. Damit kann von einer verbesserten Durchschreitung der sequenziell aufeinander folgenden Entwicklungsetappen im *in vitro* Differenzierungsprozess ausgegangen werden.

Resultierend folgte die Frage, welche zellulären Mechanismen zu den beobachteten Korrelationen führten. Das Potenzial der sich formierenden Zellen zur positiven Reaktion auf eine zusätzliche durch Transfektion von miR-375-Molekülen ausgelösten Erhöhung der zellulären Konzentration dieser miR konnte mit der überaus deutlichen Erhöhung der endogenen miR-375-Produktion aufgezeigt werden. Die folgende Grafik vermittelt einen Eindruck über potenzielle Ursachen und Wirkungen, die mit der Aktivität von miR-375 in pankreatischen endokrinen Zellen einhergehen.

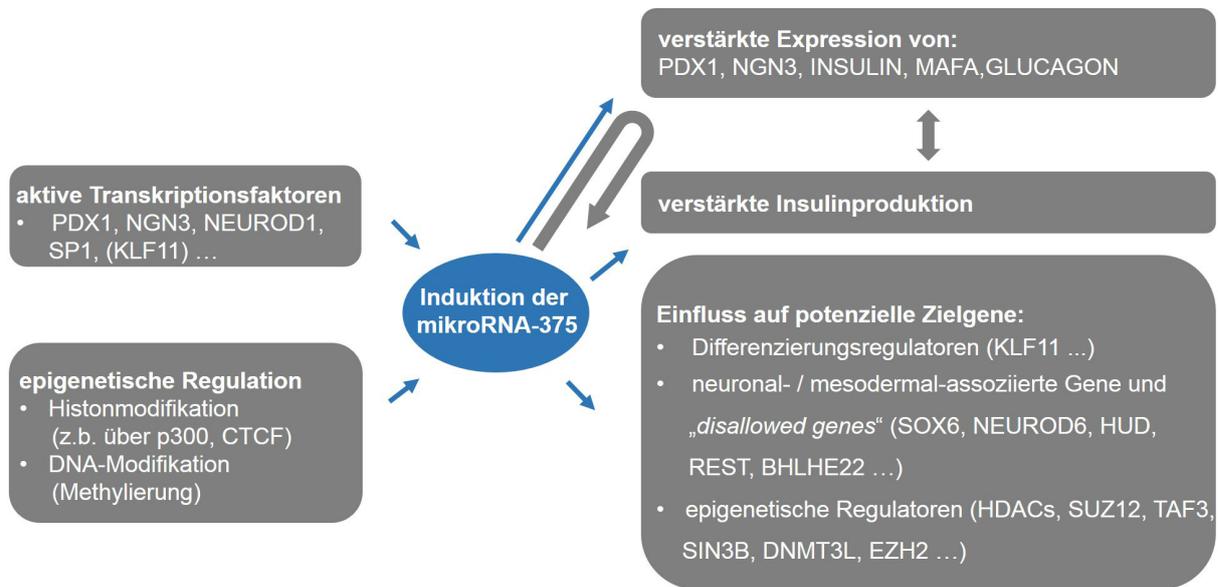


Abb. 80: Schematische Darstellung der Einflussfaktoren, die in Folge der Ausbildung pankreatischer Vorläuferzellen zur Aktivierung von miR-375 beitragen können. Daraus resultiert die miR-gesteuerte Regulation zahlreicher Effektoren und Signalwege mit positiven Folgen für die Differenzierungseffizienz im Sinne einer verbesserten Spezifizierung der sich formierenden Progenitorzellen.

Im Verlauf zellulärer Differenzierungsprozesse muss die Aktivität zahlreicher Gene koordiniert beeinflusst werden. Je nach Notwendigkeit für die zielgerichtete Ausbildung eines bestimmten Zelltyps kommt es somit zu Aktivierungs- und Repressionsereignissen, die u.a. über epigenetische Modifikationen festgelegt werden können. Pluripotente Stammzellen, welche über die Funktionalität eines Netzwerkes an TKF und mikroRNAs den Erhalt des undifferenzierten Zustandes regulieren, weisen einen sehr „offenen“ Chromatinstatus und damit ein sehr aktives Transkriptom auf, wodurch das umfassende Entwicklungspotenzial realisiert werden kann (Efroni *et al.* 2008; Kashyap *et al.* 2009; Gaspar-Maia *et al.* 2011; Laugesen und Helin 2014). Die Aktivität entwicklungsforcierender Gene kann über verschiedene epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung an CpG-Inseln oder Histonmodifizierungen wie z.B. Methylierung und Acetylierung in einem pausierten Zustand gehalten, aber bei Induktion von Differenzierungsvorgängen gezielt angeschaltet werden, was zur gerichteten Entwicklung in einen bestimmten spezialisierten Zelltyp beiträgt. Begleitend finden mit dem Einsetzen von Differenzierungsprozessen neue reprimierende Modifikationen statt, die zur Stilllegung Pluripotenz-assoziiierter Gene führen (Schuettengruber und Cavalli 2009; Kraushaar und Zhao 2013; Chen und Dent 2014). Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation mittels Einsatz forcierender Wachstumsfaktoren gerichtete erfolgreiche pankreatische *in vitro* Differenzierung führte in den sich formierenden Vorläuferzellen im Zuge der sukzessiven Abfolge einzelner Entwicklungsetappen zu umfassenden epigenetischen Modifizierungen (Wu und Sun 2006; Gan *et al.* 2007; Avrahami und Kaestner 2012). Da das miR-375-Gen über einen eigenen regulierbaren Promotor verfügt, in dessen Sequenz zwei CpG-Inseln nachgewiesen wurden, ist eine Regulation der Aktivität dieser differenzierungsrelevanten mikroRNA über den Methylierungs-

grad zu bedenken (Deaton und Bird 2011; Yan *et al.* 2014). Die in Studien aufgezeigte und mittels eigener Recherche über die *online*-Datenbank *Chipbase* bestätigte zusätzliche Bindungsmöglichkeit von CTCF, einem Modulator der Chromatinarchitektur, an den Promotor von miR-375, verdeutlicht die Vielschichtigkeit der Regulationsmechanismen (Filippova 2008; Simonini *et al.* 2010; Yang *et al.* 2013; Yan *et al.* 2014). So können auch Histonmodifikationen zur Regulation der Genexpression beitragen, indem durch Ausbildung einer bestimmten Chromatinstruktur die Zugänglichkeit von Effektormolekülen zur erfolgreichen Transkription erleichtert oder erschwert wird. Die durchgeführten Recherchen zu potenziellen Bindestellen epigenetischer Regulatoren am Promotor von miR-375 zeigten hierbei, dass die Histonacetyltransferase (HAT) p300, welche expressionsfördernde Histonmodifikationen vermittelt, erfolgreich assoziieren kann (Yang *et al.* 2013). Zusätzlich weist die Promotorregion des miR-375-Gens typische Elemente wie TATA-box und E-box auf, die eine Bindung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren vermitteln. Während an der TATA-box die Assoziation der Polymerase II und damit die Initiation der Gentranskription ermöglicht wird, können TKF, welche ein bHLH-Motiv beinhalten, an der E-box binden und eine aktivierende Wirkung ausüben. Zu diesen Faktoren gehört u.a. NEUROD1 (Yan *et al.* 2014). Wie in den Kapiteln 3.2.1 und 3.4.2 aufgezeigt, korrelierte die Aktivierung der Expression von *NEUROD1* mit der Ausbildung pankreatischer endokriner Progenitorzellen, was auf das Potenzial des TKF zur messbaren Induktion der miR-375 in den differenzierenden Zellen verweist. Die These, dass der erneute Anstieg der Expressionsrate von miR-375 korrelierend mit der Generation pankreatischer Vorläuferzellen durch die Einwirkung differenzierungsrelevanter TKF erfolgen kann, deren eigene Aktivität ebenfalls mit dem Erreichen dieser Entwicklungsstufe einsetzt, wird durch Studien von Avnit-Sagi *et al.* und Keller *et al.* gestützt, da demnach auch die Faktoren NGN3 und PDX1 an der Aktivierung von miR-375 beteiligt sind (Keller *et al.* 2007; Avnit-Sagi *et al.* 2009).

Da die Promotorregion des miR-375-Gens auch Bindungsstellen für den Faktor SP1 enthält, der während frühen zellulären Differenzierungsphasen sehr aktiv ist, kann auch hier eine induzierende Wirkung vermutet werden (Marin *et al.* 1997). Die Komplexität des Zusammenspiels der während der sukzessiven Festlegung der sich entwickelnden Zellen auf ein pankreatisches Zellschicksal wirkenden TKF und mikroRNAs wird auch am Beispiel des Faktors KLF11 deutlich. Wie SP1 zur Familie der Zink-Finger-Proteine gehörend, weist KLF11 eine hochkonservierte Domäne auf, über welche die DNA-Bindung vermittelt wird (Kaczynski *et al.* 2003). Aufgrund der großen Ähnlichkeit und teilweise überschneidenden Funktionen der nah verwandten Faktoren, ist eine Beeinflussung der Aktivität von miR-375 durch KLF11 neben SP1 denkbar. Eine interessante Studie von Fernandez-Zapico *et al.* verdeutlicht die Vernetzung und vielfältigen Wirkoptionen der aktiven differenzierungsrelevanten Faktoren, denn KLF11 ist in Kooperation mit p300 auch an der Induktion der *PDX1*-Expression beteiligt (Fernandez-Zapico *et al.* 2009). Damit ergibt sich eine potenzielle Aktivierungsschleife, denn wie oben erwähnt, induziert PDX1 als TKF nicht nur weitere Pankreas-assoziierte Gene, sondern auch die mikroRNA-375, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachweislich mit einer Verbesserung der *in vitro* Differenzierung durch gesteigerte Expression charakteristischer Gene wie u.a. *PDX1*, *NGN3*, *INSULIN* und *MAFA* korrelierte. Schlussfolgernd erscheint ein Vielzahl an Pankreas-assoziierten Faktoren, die im Rahmen der durchgeführten Experimente zur *in vitro* Generierung pankreatischer und speziell endokriner Progenitorzellen erfolgreich aktiviert werden konnten, an der Induktion von miR-375 in diesen zellulären Entwicklungsstadien beteiligt. Die Abbildung 80 bietet einen Überblick über die komplexe Wirkungsvielfalt von miR-

375 innerhalb der sich formierenden Vorläuferzellen, die zur Festlegung der Zellen auf ein endokrines Schicksal beiträgt. Bei der Betrachtung potenzieller molekularer Grundlagen der Funktionsweise von mikroRNA-375 gilt es zu bedenken, dass neben dem klassischen Weg der posttranskriptionalen Regulation auch eine direkte Wechselwirkung mit der Promotorregion verschiedener Gene möglich ist. Studien zeigten, dass sowohl miRs als auch die für eine effiziente Wirkung notwendigen Ko-Faktoren, wie sie auch im klassischen zytoplasmatisch lokalisierten RISC-Komplex enthalten sind, in den Zellkern transportiert werden können. Damit ist auch eine direkte Beeinflussung der Transkriptionsaktivität von Genen vermittelt durch mikroRNAs möglich. Die Promotor-Assoziation kann, je nach Rekrutierung weiterer Ko-Faktoren, sowohl zur Repression als auch zur Aktivierung des spezifischen Zielgens führen (Huang und Li 2012; Matsui *et al.* 2013; Salmanidis *et al.* 2014). Experimente zur intrazellulären Verteilung zahlreicher mikroRNAs in verschiedenen Zelllinien ergaben einen hohen Grad der Übereinstimmung zwischen der nukleären und zytosolischen Fraktion, was den Transport von miR-Molekülen zwischen den zellulären Kompartimenten als etablierten und regulären Mechanismus darstellt. Unter den analysierten mikroRNAs war auch miR-375, deren nukleäre Lokalisation im Vergleich zur zytosolischen in den untersuchten Zelllinien sogar höher ausfiel (Liao *et al.* 2010). Zwar ist anzunehmen, dass die individuell vorliegende subzelluläre Verteilung von miR-375 Schwankungen hinsichtlich der Linie bzw. des zellulären Entwicklungszustandes unterliegt, aber es lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass im Zuge der anhaltend deutlichen Expression von miR-375 während der *in vitro* Differenzierung pankreatischer Progenitorzellen ihre Wirkungen nicht nur über den klassischen im Zytosol verankerten Weg, sondern auch im Rahmen einer möglichen Kernlokalisierung durch die Regulation der Expression spezifischer Zielgene vermittelt werden. Unter Nutzung eines *online* verfügbaren Programms namens *microPIR2* waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit Vorhersagen über spezifische Bindungen von miR-375 an Promotorsequenzen, welche nicht nur auf die klassische Paarung über die *seed*-Sequenz begrenzt sind, sondern sich über die gesamte Länge der miR erstrecken können, möglich (Piriyaopongsa *et al.* 2014). Somit konnten potenzielle Zielgene erfasst werden, die in direkter Verbindung zu den zellulären Pankreas-assoziierten Signalwegen stehen.

Die gezielte Verstärkung der endogenen Produktion von miR-375 korrelierte in den gerichtet differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 übereinstimmend mit einer Steigerung der Expression differenzierungssteuernder Gene wie *PDX1*, *NGN3*, *INSULIN* und *MAFA*. Wie bereits beschrieben, tragen die TKF *PDX1*, *NGN3* und *NEUROD1* direkt durch Promotorassoziation zur Aktivierung von miR-375 ab der Ausbildung pankreatisch-endokriner Zellen bei, während die gesteigerte Expression der Markergene in Korrelation mit einer starken Aktivität von miR-375 eher auf indirekte Effekte zurückzuführen ist. Umfassende Analysen mittels bioinformatisch-basierter *online* verfügbarer Zielgen-Vorhersageprogrammen wie *DIANA-microT*, *microPIR2*, *miRWalk2.0* und *microcosm* ergaben, dass die genannten Gene wohl nicht zu den direkten Zielgenen von miR-375 gehören (Paraskevopoulou *et al.* 2013; Piriyaopongsa *et al.* 2014; Dweep und Gretz 2015; EMBL-EBI Enright Lab 2015). Die ausführliche Diskussion der regulatorischen Wirkung von miR-375 auf zahlreiche Gene, die als Repressoren der pankreatischen Richtung zusammengefasst werden können, erfolgt im weiteren Text. An dieser Stelle sei erwähnt, dass somit eine Einschränkung des Entwicklungspotenzials der sich bildenden Vorläuferzellen erreicht werden kann, was zur Festlegung auf ein endokrines pankreatisches Zellschicksal beiträgt und so indirekt die Aktivität differenzierungsrelevanter TKF wie *PDX1*, *NGN3* und *MAFA*

und damit auch die Expression von *INSULIN* fördert. Im Rahmen der durchgeführten Experimente zur transfektionsbasierten Induktion von mikroRNA-375 in den pankreatischen Progenitorzellen ist von einer Verstärkung der miR-regulierten Signalwege auszugehen, womit die Korrelation zu den erhöhten Expressionsraten der Pankreas-assoziierten Gene erklärt werden kann. Neben den für Beta-Zellen charakteristischen Genen konnte allerdings auch eine Erhöhung der Expression von *GLUCAGON* detektiert werden. Dieser Effekt verdeutlichte die nicht terminale Reifung der *in vitro* differenzierten Zellen, was dem allgemeinen aktuellen Stand der Forschung in Bezug auf die *in vitro* Generation Insulin-produzierender Zellen aus pluripotenten Stammzellen entspricht (Naujok *et al.* 2011; Bruin *et al.* 2014).

Dennoch lassen die im Rahmen der vorliegenden Dissertation erhobenen Daten den Schluss zu, dass aufgrund der Modulation des etablierten Basis-Protokolls im Sinne einer verstärkten Induktion von miR-375 die Ausbildung endokriner, Insulin-produzierender Zellen effektiver verlief. Sichtbar wurde dies anhand der mittels qPCR- und Immunfluoreszenzanalysen sowie C-PEPTID-ELISA ermittelten Ergebnisse, die am Endpunkt der Differenzierung eine Erhöhung der Transkription und Produktion von *INSULIN* in den modifizierten Zellen aufzeigten, während im Gegensatz dazu nur die Expressionsrate, aber nicht die Translation von *GLUCAGON* verstärkt war. Dass sich die erfolgte Protokollmodulation in erster Linie positiv auf das Potenzial zur Ausbildung Insulin-produzierender Beta-Zell-Vorläufer auswirkte, konnte zusätzlich noch mit den Ergebnissen zur Analyse der Expression und Translation von *SOMATOSTATIN* bekräftigt werden, denn es wurde dabei keine Stimulation detektiert.

Neben der, mit einer Induktion von miR-375 einhergehenden, verstärkten Expressionsrate von Genen wie *PDX1*, *NGN3*, *INSULIN* und *MAFA*, die einerseits zur Ausbildung einer regulatorischen Aktivierungsschleife im Sinne einer effektiveren endogenen Aktivierung der Expression von miR-375 führt, kommt es auch indirekt zur Steigerung der *INSULIN*-Transkriptmenge, was für eine effektivere Produktion des Hormons sorgen kann. Der TKF *MAFA* übt eine direkt aktivierende Funktion auf das *INSULIN*-Gen aus, wobei es auch zu synergistischen Wechselwirkungen mit *PDX1*, *NGN3* und *NEUROD1* kommt (Zhao *et al.* 2005; Wang *et al.* 2007; Xu *et al.* 2013). Recherchen unter Verwendung der *online*-Datenbank *microPIR2* ergaben zudem, dass eine Assoziation zwischen miR-375 und dem Promotor von *MAFA* erfolgen kann, was somit zusätzlich eine potenziell aktivierende Wirkung dieser mikroRNA direkt auf Ebene der Transkription ermöglicht (Neve *et al.* 2005; Fernandez-Zapico *et al.* 2009; Perakakis *et al.* 2012). Die Nutzung der *online*-Datenbank *MotifMap*, mit deren Hilfe TKF-Bindestellen in Promotorsequenzen ermittelt werden können, führte zusätzlich zur Erkenntnis, dass *MAFA* auf diesem Weg im Umkehrschluss auch die Expression von miR-375 aktivieren könnte (Daily *et al.* 2011). Damit ist auch zwischen dem Faktor *MAFA* und mikroRNA-375 die Ausbildung einer positiven Signalschleife zu vermuten, die zur Festlegung der differenzierenden Zellen auf einen spezialisierten endokrinen Zelltyp beiträgt.

Als weiteres bedeutendes Mitglied im komplexen Netzwerk aus Faktoren, die für eine korrekte Realisierung eines pankreatischen Zellschicksals notwendig erscheinen, ist der TKF *KLF11* zu nennen. Interessante Studien verweisen auf die grundsätzliche Aktivität von *KLF11* in humanen pankreatischen Beta-Zellen und der Möglichkeit zur Bindung an den Promotor des *INSULIN*-Gens, was zu dessen Aktivierung beiträgt. Dieser Effekt ist besonders stark unter einer erhöhten Glukosezufuhr zu beobachten (Neve *et al.* 2005). Zu beachten ist, dass in der erwähnten Studie von Neve *et al.* auch auf die Induzierbarkeit der Aktivität von *KLF11* durch den TGFbeta-Signalweg hingewiesen wird, woraus geschlossen werden kann, dass in den gerichtet differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4, welche

im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Substitution von hoch konzentriertem ActivinA als potenten Aktivator des TGFbeta-Signalwegs, gezielt in die zunächst entodermale und schließlich pankreatische Entwicklungsrichtung gelenkt wurden, eine Induktion von *KLF11* stattfand. Weiterführende PCR- und Immunfluoreszenzanalysen könnten hierbei zur Aufklärung des Aktivitätsprofils von *KLF11* zur ergänzenden Charakterisierung der einzelnen *in vitro* Differenzierungsstapen beitragen. Als TKF übt *KLF11* in Assoziation mit dem Ko-Faktor p300 zusätzlich eine aktivierende Wirkung auf die Expression von *PDX1* aus (Fernandez-Zapico *et al.* 2009). Als einer der bedeutendsten Effektoren in pankreatischen Vorläuferzellen, spielt der TKF *PDX1* eine wichtige Rolle bei der Induktion weiterer zur Reifung der Zellen beitragender Gene und der mikroRNA-375. Mit Hilfe des *online* verfügbaren Programms *microPIR2* konnte das Potenzial von miR-375 zur Assoziation mit dem Promotor des *KLF11*-Gens detektiert werden (Piriyapongsa *et al.* 2014). Diese Erkenntnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass im Rahmen der transfektionsbasierten Induktion von miR-375 in pankreatischen bzw. endokrinen Progenitorzellen die beobachtete Steigerung in der Effizienz der späten *in vitro* Differenzierungsstapen über ein überaus weitläufig verzweigtes Signalnetzwerk vermittelt wurde, zu dem auch eine gegenseitige Beeinflussung der Faktoren *KLF11*, *PDX1* und miR-375 gehörte.

Wie bereits beschrieben, können bei der Aktivierung von miR-375 im Zuge der pankreatischen Entwicklung auch epigenetische Modifikationen eine Rolle spielen. Umgekehrt ist bei der folglich stattfindenden Vermittlung positiver Wirkungen dieser mikroRNA auf die Ausbildung Insulin-produzierender Zellen auch eine miR-basierte Regulation von epigenetisch wirksamen Faktoren zu bedenken. Umfassende und vergleichende Recherchen mit Hilfe von *online* nutzbaren Programmen zur bioinformatisch-assoziierten Vorhersage spezifischer Zielgene von miR-375 stützen diese These, denn verschiedene Effektoren zur Modifizierung von DNA und Histonen, die je nach Kombination zur Aktivierung bzw. Repression von Genen beitragen, konnten identifiziert werden. Zu diesen gehörten u.a. verschiedene Histondeacetylasen (HDACs), *SUZ12*, *TAF3*, *SIN3B*, *DNMT3L* und *EZH2* (Ooi *et al.* 2007; Van Ingen *et al.* 2008; Margueron und Reinberg 2011; Vejnar und Zdobnov 2012; Paraskevopoulou *et al.* 2013; Laugesen und Helin 2014; Dweep und Gretz 2015). Hervorzuheben ist *EZH2*, ein Mitglied der Polycomb-Protein-Familie, die in Komplexen aus multiplen Faktoren zur epigenetischen Modifikation im Sinne einer Repression von Genaktivitäten beitragen (Schuettengruber und Cavalli 2009). Da die mikroRNA-375 laut Analyse mit Hilfe des Programms *microPIR* zur Identifizierung von miR-DNA-Wechselwirkungen, das Potenzial zur Assoziation an den Promotor des *EZH2*-Gens besitzt und wie bereits erwähnt, die Bindung weiterer Ko-Faktoren über eine Repression oder Aktivierung des entsprechenden Gens entscheidet, kann somit eine weitere Variante der vielzähligen Wirkungsarten von miR-375 bei der pankreatischen Differenzierung vermutet werden (Piriyapongsa *et al.* 2014). Denkbar ist eine Beteiligung an der, über die Regulation der Expression von *EZH2* gesteuerten, Induktion bzw. Repression von Pankreas-assoziierten Genen bzw. Repressoren der endokrinen Spezifizierung. Diese, über miR-375 vermittelten, Wirkungen können als verstärkt betrachtet werden nach der, im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten, Induktion der mikroRNA.

Die Spezifizierung des zellulären Entwicklungspotenzials, wie sie bei der sukzessiven *in vitro* Differenzierung Insulin-produzierender Zellen erfolgt, kann nur gelingen, wenn Faktoren, die der Ausbildung des gewünschten Zelltyps im Wege stehen, spezifisch in ihrer Wirkung gehemmt werden. Im Rahmen des etablierten Differenzierungsprotokolls wurde dies zum einen durch die in Dauer und Konzen-

tration sorgfältig abgestimmte Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren in das Differenzierungsmedium erreicht und zum anderen ist zu vermuten, dass es im Zuge der einsetzenden zellulären Signalwege, die aufgrund der externen Stimuli aktiviert wurden, zu einer endogen-basierten Regulation von potenziellen Repressoren kam. Die Teilnahme von mikroRNA-375 auch an diesen Regulationsmechanismen erscheint aufgrund ihrer nachweislich starken Expression in sich entwickelnden und reifen Beta-Zellen plausibel (Avnit-Sagi *et al.* 2009; Poy *et al.* 2009). Dieser Idee folgend, wurden ausführliche vergleichende Recherchen unter Verwendung von *online* verfügbaren Datenbanken bzw. Programmen zur Identifizierung potenzieller Zielgene von miR-375 durchgeführt, wobei neben der klassischen posttranskriptionalen Wirkung im Zuge einer Translationsrepression auch die Möglichkeit einer direkten Beeinflussung der Expression eventueller Zielgene durch Promotorassoziation berücksichtigt wurde (Hsu *et al.* 2012; Vejnar und Zdobnov 2012; Paraskevopoulou *et al.* 2013; Piriyaongsa *et al.* 2014). Eine Vielzahl potenzieller Zielgene, deren Aktivität sich negativ auf die Ausbildung pankreatischer endokriner Zellen auswirken kann, konnte dabei identifiziert werden. Dazu gehören sowohl neuronal- als auch mesodermal-assoziierte Gene, die zur Formierung von Derivaten dieser Keimblätter beitragen, als auch sogenannte „*disallowed genes*“, deren Aktivierung zum Verlust des spezifischen Charakters und der Funktion von Beta-Zellen führt (Kaspi *et al.* 2014). Als Beispiele für diese Gene, deren Expression in den sich formierenden pankreatischen Vorläuferzellen im Sinne einer Repression reguliert werden sollte, sind u.a. *NEUROD6*, *REST*, *HUD*, *SOX6* und *BHLHE22* zu nennen. Während *NEUROD6* als klassischer TKF bei der Festlegung eines neuronalen Zellschicksals gilt, muss die Expression von *SOX6* und *BHLHE22* reprimiert werden, da aufgrund der Produktion dieser als TKF wirkenden Effektoren sonst die Transkription von *INSULIN* negativ beeinflusst wird (Baxter *et al.* 2009; Melkman-Zehavi *et al.* 2011; Kaspi *et al.* 2014; Sagal *et al.* 2014). Neben der Assoziation von *SOX6* mit der Aktivierung neuronaler Signalwege, gilt dessen repressive Wirkung auf die Insulinsekretion als problematisch (Iguchi *et al.* 2007). Der als Repressor der Aktivität von diversen Zielgenen geltende Faktor *REST* ist assoziiert mit der in einigen Etappen sehr ähnlichen pankreatischen und neuronalen *in vitro* Differenzierung. Im Verlauf der pankreatischen Entwicklung ist die Aktivität von *REST* allerdings nur bis zur Generation *PDX1*-exprimierender Vorläuferzellen erwünscht. Danach muss eine konsequente Repression erfolgen, da sonst bedeutende pro-endokrine Effektoren wie *NGN3*, die wiederum an der Induktion weiterer Beta-Zell-Marker beteiligt sind, negativ beeinflusst werden (Martin *et al.* 2015). Zusätzlich reprimiert *REST* als TKF die Expression von Genen, die an der Regulation einer adäquaten Insulinsekretion beteiligt sind (Martin *et al.* 2008). Im Zuge der starken Expression von miR-375 parallel zur Formation pankreatischer und speziell endokriner Progenitorzellen kann von einer gezielten Inhibierung der *REST*-mRNA ausgegangen werden, was einen weiteren Wirkungsweig im komplexen Netzwerk der differenzierungsfördernden Funktionen von miR-375 darstellen kann. Im Rahmen weiterführender Studien wäre die Erfassung des Expressionsmusters von *REST* im Verlauf der pankreatischen *in vitro* Differenzierung in den hESZ und hiPSZ ein interessanter Ansatz, um den vorgestellten Regulationsmechanismus zwischen dem Repressor und miR-375 als potenziellen, zelllinienunabhängigen Weg zur miR-basierten Festlegung eines endokrinen Entwicklungsschicksals zu untersuchen. Der RNA-bindende Faktor *HUD* wurde ursprünglich als exklusiver Marker neuronaler Zellen erachtet, aber aktuelle Studien zeigen, dass *HUD* auch in pankreatischen Beta-Zellen aktiv ist und durch Bindung an *INSULIN*-mRNA deren Translation regulieren kann. Ein niedriges Niveau an zellulärem *HUD*-Protein begünstigt dabei die Insulinproduktion (Lee

et al. 2012). Daraus resultiert, dass eine anhaltend starke Aktivität von miR-375 in sich formierenden pankreatischen Zellen zur effektiven Repression von *HUD* beitragen kann, was sich positiv auf die Insulinsynthese auswirkt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte transfektionsbasierte Induktion von miR-375 in den späten *in vitro* Differenzierungsetappen kann somit die Inhibierung von HUD verstärken, was sich im Umkehrschluss in den erhaltenen Daten im Sinne einer effizienteren Formierung endokriner Zellen widerspiegelte. Auch in Bezug auf den Faktor HUD stellen weiterführende Untersuchungen zum Verlauf der Expression bzw. Produktion während des Differenzierungsprozesses einen geeigneten Ansatz dar, die vielfältigen Funktionen der miR-375 noch umfassender zu charakterisieren. Zusammenfassend resultierte die durchgeführte Modifikation des Basis-Differenzierungsprotokolls im Sinne einer transfektionsbasierten starken und anhaltend stabilen Induktion der endogenen Produktion von miR-375 in einer Verbesserung der Differenzierungseffizienz. Damit ist von der über miR-375 gesteuerten Aktivierung zahlreicher, teilweise noch nicht vollständig aufgeklärter Signalwege auszugehen, die grundsätzlich zur effizienteren Formierung Insulin-produzierender Zellen beitragen und demnach übereinstimmend in den eingesetzten Zellen der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 zur Ausprägung kamen. Die detektierten Ergebnisse in Form von morphologischen Beobachtungen sowie gesteigerter Expression und folgend Produktion essenzieller differenzierungsrelevanter Faktoren wie PDX1, NGN3 und MAFA wiesen zwar vereinzelt Niveauunterschiede zwischen den analysierten Derivaten der eingesetzten Zelllinien auf, was durch das individuelle Differenzierungspotenzial zu erklären ist, aber die grundlegende Reaktion der Zellen auf die gesetzten Stimuli war geprägt von einer sehr großen Übereinstimmung. Damit konnte sowohl die generelle Eignung der angewendeten Protokollvariation zur Steigerung der Differenzierungseffizienz, als auch die Nutzung des grundsätzlich etablierten Differenzierungsprotokolls zur reproduzierbaren, vergleichenden Entwicklung endokriner Progenitorzellen ausgehend von hESZ und hiPSZ bestätigt werden.

Die gezielte Modulation von miR-375 als einem Effektor, der während der Entwicklung und dem Funktionserhalt von Beta-Zellen generell eine bedeutende Rolle spielt, führte zur effektiveren *in vitro* Differenzierung. Diese Erkenntnis zeigt eine potente Möglichkeit zur Optimierung von *in vitro* Entwicklungsvorgängen auf, die ohne den übermäßigen Einsatz teilweise nur unvollständig charakterisierter Chemikalien zur Forcierung der gewünschten Differenzierungsrichtung auskommt.

4.2.2 Glukosestimulation

Die Auswertung aller ermittelten Daten zum Einfluss einer zeitlich begrenzten Stimulation der sich entwickelnden Zellen mit einer hohen Glukosekonzentration von 50 mM im Differenzierungsmedium führte zur Schlussfolgerung, dass mit dieser Modifikation des Basis-Differenzierungsprotokolls eine Steigerung der Formierungseffizienz pankreatischer und speziell endokriner Progenitorzellen erfolgreich erzielt werden konnte. Die in Kapitel 3.4.2 präsentierten Analysen zur Veränderung der Morphologie im Differenzierungsverlauf zeigen eine verstärkte und klarer strukturierte Generierung inselartiger Cluster im Vergleich zur Gruppe gerichtet entwickelter Zellen, die nur auf Grundlage des Basisprotokolls differenziert wurden. Die Glukosestimulation korrelierte mit einer Steigerung der Expressionsrate von miR-375 in den pankreatischen Vorläuferzellen. Allerdings fiel der Effekt deutlich schwächer aus, als nach der in Kapitel 3.4.1 dargestellten transfektionsbedingten Induktion der miR-375. Da die detektierten Expressionsdaten in den analysierten Zellerivaten der eingesetzter hESZ und hiPSZ große Übereinstimmungen aufwiesen, konnte von der Beeinflussung genereller, zelllinienunabhängiger Signalwege in Folge der Glukosestimulation ausgegangen werden. Diese aktivierten intrazellulären Regulationsmechanismen führten in beiden Zelllinien aber nicht zu einer anhaltend erhöhten Expressionsrate von miR-375, denn am Ende des Differenzierungsprozesses konnte kein signifikanter Unterschied zur Gruppe der gerichtet differenzierten Zellen detektiert werden, die auf Grundlage des Basisprotokolls ohne weitere Modifikationen differenziert wurden. Damit war die moderate Beeinflussung der miR-375 im Sinne einer stärkeren Synthese auf den Zeitraum der Formation pankreatisch-endokriner Zellen beschränkt. Die Untersuchung des Expressionsprofils von *PDX1* ergab eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge nach Glukosestimulation, die auch vergleichbar in den Derivaten der hESZ und hiPSZ bis zum Endpunkt des *in vitro* Entwicklungsprozesses detektierbar blieb, aber insgesamt ebenfalls ein geringeres Niveau aufwies, als es die Protokollmodulation der transfektionsbasierten miR-375 Induktion verursachte. Ein ähnliches Muster ergab die Expressionsanalyse von *NGN3* und *INSULIN*. Während der Festlegung der differenzierenden Zellen beider eingesetzter Linien auf ein endokrines Schicksal korrelierte die Glukosestimulation mit einer Steigerung des Expressionsniveaus von *NGN3*, aber dieser Effekt blieb nicht bis zum Ende des Differenzierungsvorgangs stabil erhalten. Es kam zum Absinken der Expressionsrate auf das Niveau der nach dem Basisprotokoll gerichtet differenzierten Zellen. In Bezug auf eine Beeinflussung der *INSULIN*-Expression konnte am Differenzierungsendpunkt (= 18d), bei Festlegung der Irrtumswahrscheinlichkeit des durchgeführten T-Tests auf 5 %, keine signifikante Erhöhung der Transkriptmenge detektiert werden. Da die ermittelten Werte jedoch tendenziell eine leichte Erhöhung andeuteten, ist hier zu vermuten, dass potenzielle Messungenauigkeiten verbunden mit der limitierten Zahl experimenteller Wiederholungen eine exakte Bewertung bei dem insgesamt sehr niedrigen Expressionsniveau von *INSULIN* erschweren. Ausblickend kann eine deutlich größere Zahl an Messdaten, gewonnen über weitere Versuchswiederholungen, zur Formulierung von statistisch gesicherten Aussagen beitragen.

Wie bereits in Kapitel 1.5.2 ausführlich erläutert, spielt der Faktor CHREBP bei der Vermittlung Glukose-induzierter Signale eine bedeutende Rolle. Damit verknüpft sind Auswirkungen auf Gene, deren Aktivität für eine adäquate pankreatische Differenzierung unabdingbar ist. Da *NEUROD1* zu diesen regulierten Genen zählt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch eine potenzielle Korrelation

zwischen Glukosestimulation und der Expressionsrate von *CHREBP* und *NEUROD1* analysiert. Die Ergebnisse zeigten erneut bei den differenzierten Zellen beider eingesetzter Zelllinien große Übereinstimmungen. Nach der dreitägigen Inkubation der Zellen bei einem Gehalt von 50 mM Glukose im Differenzierungsmedium konnte ein starker Anstieg im Expressionsniveau von *CHREBP* und auch *NEUROD1* detektiert werden. Nach der Festlegung der Zellen auf eine endokrine Entwicklungsrichtung erfolgte ein starker Abfall der Expressionsrate von *CHREBP* auf ein sehr niedriges Niveau, welches bis zum Ende der Differenzierung erhalten blieb. Die Transkriptmenge von *NEUROD1* reduzierte sich hingegen nur leicht und blieb vergleichend stabil auf dem Niveau der nach dem Basisprotokoll gerichtet differenzierten Zellen bis zum Ende des Differenzierungsprozesses. Dieses Expressionsmuster entsprach den Erwartungen, da *NEUROD1* als Transkriptionsfaktor an der Etablierung eines endokrinen Zellschicksals und letztlich der Generierung Insulin-produzierender Zellen beteiligt ist. Der Verlauf der *CHREBP*-Expression ließ den Schluss zu, dass eine durch Glukose induzierbare Aktivierung dieses TKF, wie in Kapitel 1.5.2 erläutert, zur Induktion von *NEUROD1* beiträgt. Der TKF *NEUROD1* reguliert wiederum u.a. Gene, die am Transport von Insulinvesikeln beteiligt sind und ist daher für eine adäquate Ausbildung Insulin-produzierender Zellen von großer Bedeutung (Chu und Tsai 2005).

Gemeinsam betrachtet, ergibt sich aus den ermittelten Expressionsdaten die Schlussfolgerung, dass die mittels kurzzeitiger Glukosestimulation induzierten Effekte zur Verbesserung der Effizienz bei der Generierung pankreatischer und speziell endokriner Zellen beitragen. Im Vergleich zur Modulation des Differenzierungsprotokolls mittels Transfektion reifer miR-375-Moleküle fallen die Auswirkungen auf die Expression der untersuchten Effektoren allerdings schwächer aus bzw. bleiben nicht bis zum Endpunkt des *in vitro* Differenzierungsprozesses stabil erhalten. Daraus ließen sich mehrere Fragen ableiten. Sind die mittels Glukosestimulation ausgelösten Effekte eher auf posttranskriptionaler Ebene zu suchen und wenn ja, was für Regulationswege werden beeinflusst und was sind mögliche vermittelnde Effektormoleküle? Ist die gewählte Glukosekonzentration, die Dauer und das Zeitfenster der Stimulation im Verlauf der *in vitro* Differenzierung ausreichend? Sollten diesbezüglich ausblickend weitere Optimierungen vorgenommen werden, da auch potenziell negative Einflüsse einer stark erhöhten Glukosezufuhr berücksichtigt werden müssen? Im Folgenden werden diese Fragen umfassend diskutiert, wobei zunächst grundsätzlich auf die Bedeutung der Glukose für die Vitalität der, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, verwendeten Zellmodelle der hESZ und hiPSZ eingegangen wird.

Humane ESZ und iPSZ weisen eine sehr charakteristische Eigenschaft auf, denn aufgrund ihrer schnellen Proliferation, welche mit einer stark verkürzten G1-Phase des Zellzyklus einhergeht, besteht ein erhöhter Bedarf an Energie in Form von ATP und diversen Makromolekülen. Die Nachfrage wird hauptsächlich über die Glykolyse reguliert, welche deutlich umfassender als die oxidative Phosphorylierung stattfindet (Zhang *et al.* 2011; Burgess *et al.* 2014). Dieser Effekt, dass trotz vorherrschenden normoxischen Bedingungen bevorzugt die Glykolyse zur Energiegewinnung eingesetzt wird, wurde bereits in den 1920er Jahren von Otto Warburg für schnell proliferierende Krebszellen beschrieben und schließlich als Warburg-Effekt definiert (Van der Heiden *et al.* 2009). Der Vorteil dieser Art des Glukosemetabolismus liegt in der Bereitstellung von ausreichend ATP und gleichzeitig mehr Makromolekülen, wie sie bei einer schnellen Zellteilungsrate benötigt werden. Zudem würden bei einer vergleichsweise hochaktiven oxidativen Phosphorylierung zu viele schädliche Sauerstoffspezies generiert werden, die zur Schädigung der Zellen bis hin zur Apoptose führen können. Zudem können viele Intermediate der

Glykolyse zusätzlich in andere Signalwege eingebunden werden, was die benötigte hohe Syntheserate von Aminosäuren, Lipiden, Nukleotiden und Phospholipiden unterstützt. Die aktiven metabolischen Strukturen innerhalb der Zellen erfahren in ihrer Bedeutung mit zunehmender Spezialisierung allerdings einen Wandel. Während in pluripotenten Stammzellen die Glykolyse für den Erhalt des Stammzellcharakters essentiell ist und Reprogrammierungsprozesse somatischer Zellen im Zuge der Generierung von iPSZ auch zwangsläufig mit einer Steigerung der Glykolyserate einhergehen, bevorzugen terminal ausdifferenzierte Zellen den Prozess der oxidativen Phosphorylierung, was auch mit der geringeren Teilungsaktivität in Verbindung steht (Folmes *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011; Burgess *et al.* 2014; Yu *et al.* 2015). In Übereinstimmung mit der Erkenntnis, dass pluripotente Stammzellen aufgrund ihrer starken Proliferation auf eine ausreichende Zufuhr an Glukose als Energielieferant angewiesen sind, steht die Tatsache, dass deren etablierte und standardisierte *in vitro* Kultur nicht unter physiologischen Glukosekonzentrationen, sondern bei einem Gehalt von ca. 17,5 - 25 mM Glukose im Medium erfolgt. Der hohe Energiebedarf in Kombination mit der zügigen Bereitstellung einer Vielzahl von Makromolekülen macht diese Kulturbedingungen nötig. Dass eine geringere basale Glukosekonzentration im Kulturmedium zur Apoptose der Zellen führt, konnte in vorangegangenen experimentellen Untersuchungen an murinen embryonalen Stammzellen innerhalb unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Schon die ein- bis dreitägige Kultur der Stammzellen unter physiologischen Bedingungen von 5 bis maximal 10 mM Glukose im Medium führte zur starken Induktion apoptotischer Prozesse (Schweyen 2014).

Wie in Kapitel 1.5.2 vorgestellt, konnte im Rahmen zahlreicher Studien die positive Rolle von Glukose in Bezug auf die Ausbildung pankreatischer Zellen bestätigt werden. Bei den bekannten Untersuchungen an tierischen Zellmodellen oder tierischen bzw. humanen isolierten Langerhans'schen Inseln lag der Bereich der zu Stimulationszwecken erhöhten Glukosekonzentration im Kulturmedium allerdings zwischen ca. 10 bis 30 mM, was auf die grundsätzliche Kultur der genutzten Modellsysteme unter einem physiologischen Glukosegehalt von ca. 5 mM zurückzuführen ist. Aktuell liegen keine publizierten Daten zur gezielten Beeinflussung der pankreatischen *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen mittels kurzzeitiger Glukosestimulation vor. Die Wahl dieses Zellmodells erscheint aber essentiell zur Charakterisierung und potenziellen Optimierung der *in vitro* Generation Insulin-produzierender Zellen, da die Übertragbarkeit von Aussagen aus tierischen Modellen, wie in Kapitel 1.3.4 erläutert, nur begrenzt möglich ist. Aufgrund der beschriebenen basalen Glukosekonzentration im Kulturmedium der hESZ und hiPSZ, entsprach die Wahl des zur Stimulation eingesetzten Glukosegehaltes von 50 mM ungefähr einer Verdopplung der Konzentration. Damit stimmte das Verhältnis mit den experimentellen Ansätzen in den erwähnten publizierten Studien überein. Ergänzend konnten *in vitro* Differenzierungsexperimente an murinen embryonalen Stammzellen innerhalb der Arbeitsgruppe belegen, dass eine Stimulation entodermaler Vorläufer bis zum Stadium der Formierung pankreatischer Progenitorzellen mit 50 mM Glukose zur verstärkten Expression von *PDX1* führte, wohingegen entsprechende Effekte bei Glukosekonzentrationen von 20 und 30 mM nicht detektierbar waren (Schweyen 2014). Aus der Gesamtheit der Studien ließ sich ableiten, dass eine Erhöhung des im Medium vorhandenen Glukosegehalts etwa um das doppelte in Bezug auf die basale Konzentration für die Induktion positiver Effekte auf die Differenzierungseffizienz notwendig erscheint. Schlussfolgernd wurde für die gezielte Stimulation im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Glukosekonzentration von 50 mM gewählt und der Expositionszeitraum auf den sechsten bis neunten Tag im Differenzierungsprozess beschränkt. Das

entsprach dem Zeitfenster der Entwicklung pankreatisch determinierter Progenitorzellen aus entodermalen Vorläuferzellen. Die Summe der in Kapitel 3.4.2 präsentierten Ergebnisse führte zur Annahme, dass verschiedene zelluläre Signalwege in Folge der Glukosestimulation induziert wurden, welche sich vermutlich partiell von denen unterschieden, die im Zuge der transfektionsbasierten Induktion von miR-375 aktiviert wurden. Zusätzlich ist allerdings auch eine potentielle Aktivierung von negativ wirkenden Regulationsmechanismen in Folge einer sehr hohen Glukosekonzentration im Medium zu bedenken, die zur Kompensation positiver Effekte beitragen könnte. Damit geht im Folgenden auch eine kritische Betrachtung der Dauer und des gewählten Zeitfensters der Exposition einher. Die folgende Grafik fasst potenzielle Mechanismen zusammen über welche die zellulären Reaktionen, ausgehend von einer Glukosestimulation, erklärt werden können.

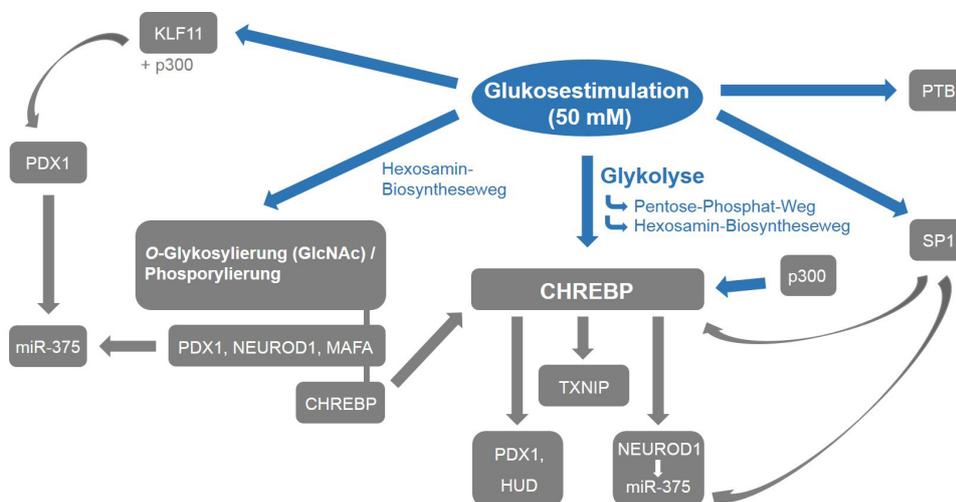


Abb. 81: Schematische Darstellung der Signalwege und Effektoren, die in Folge der Glukosestimulation die Ausbildung pankreatischer und speziell endokriner Vorläuferzellen beeinflussen können.

Wie in Abschnitt 1.5.2 erläutert, kann eine Erhöhung der intrazellulären Glukosekonzentration zur Aktivierung von CHREBP führen, wobei als Vermittler Intermediate des Glukosestoffwechsels, sowohl aus der bevorzugt genutzten Glykolyse aber auch weniger frequentierten Seitenzweigen wie dem Hexosamin-Biosyntheseweg und dem Pentose-Phosphat-Weg, dienen. So kommt es im Zuge einer möglichen O-GLcNAcylierung bzw. Phosphorylierungsereignissen zur Aktivierung und Stärkung der DNA-Bindfähigkeit von CHREBP an die Promotorregion von spezifischen Zielgenen, in der ein sogenanntes ChoRE-Motiv (*Carbohydrat Response Element*) enthalten ist (Uyeda *et al.* 2002; Postic *et al.* 2007; Sakiyama *et al.* 2008; Li *et al.* 2010; Metukuri *et al.* 2012; Filhoulaud *et al.* 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Recherche nach ChoRE-Motiven innerhalb der Promotorregion differenzierungsrelevanter Gene, welche über die *online* verfügbare Datenbank EPD erfassbar waren (Dreos *et al.* 2015). Die das Motiv umfassende Sequenz „CACGTGNNNGCC“, wobei „N“ für beliebige Basen steht, konnte dabei mit je nur einer nicht-komplementären Position im hinteren Abschnitt des Motivs im Promotor von *PDX1* und *HUD* detektiert werden, was eine mögliche direkte Beeinflussung dieser Gene in Form von Aktivierung oder Repression verdeutlicht. Der TKF PDX1 vermittelt die Aktivierung weiterer differenzierungsassoziierter Gene, inklusive der mikroRNA-375, was letztlich zur Festigung der endokrinen pankreatischen Entwicklungsrichtung im Zuge

des *in vitro* Differenzierungsprozesses beiträgt (Sander und German 1997; Andrali *et al.* 2008). Die detektierte Korrelation zwischen Glukosestimulation und Erhöhung der *PDX1*-Expression stützte hierbei die formulierte These. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel 4.2.1 erläutert, kann der Faktor HUD in pankreatischen Beta-Zellen durch Bindung an *INSULIN*-mRNA deren Translation hemmen, so dass für eine deutliche Insulinproduktion eine geringe Aktivität von HUD als Voraussetzung gilt (Lee *et al.* 2012). Die Erkenntnisse dieser Studie spiegeln sich in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zum Einfluss einer Glukosestimulation auf die Expression bzw. die nachfolgende Insulinproduktion wider. Während keine signifikante Steigerung der *INSULIN*-Expressionsrate detektiert werden konnte, zeigten sowohl die Immunfluoreszenzanalysen als auch die Ergebnisse des C-PEPTID-ELISAs eine Erhöhung der Biosynthese. Es ist damit zu vermuten, dass die über CHREBP vermittelten Effekte zumindest partiell auf posttranskriptionaler Ebene wirken. Eine potenziell hemmende Wirkung von CHREBP auf die Aktivität des *HUD*-Gens könnte zur Auflösung der Assoziation zwischen HUD-Proteinen und *INSULIN*-mRNAs beitragen und so nachfolgend die Hormonproduktion positiv beeinflussen. Interessanterweise zeigten Recherchen zur Beeinflussung von Zielgenen durch direkte Bindung von miR-375 an entsprechende Promotorregionen, dass auch über diesen Weg eine negative Regulation von HUD denkbar ist (Piriyaongsa *et al.* 2014). Somit können die beiden durchgeführten Protokollmodifikationen zwar über verschiedene Effektoren, aber in ihrer Wirkung übereinstimmend im Sinne einer Repression potentieller Faktoren agieren, die einer effektiven pankreatischen *in vitro* Differenzierung abträglich wären. Ein weiterer Effektor, der im Zuge einer Glukosestimulation aktiviert wird und so zur Erklärung der detektierten positiven Effekte auf die Insulinproduktion dienen kann, ist PTB (*Polypyrimidine Tract-binding Protein*). Dieses Protein bindet an eine Pyrimidin-reiche Sequenz innerhalb der 3'-UTR der *INSULIN*-mRNA und führt so zu dessen Stabilisierung, was das Potenzial zur Translation erhöht (Tillmar *et al.* 2002). Eine interessante Studie von Webb *et al.* zeigte zudem, dass eine kurzzeitige Inkubation von murinen Insulin-produzierenden Zellen (MIN6-Zellen) unter einer erhöhten Glukosekonzentration zum Anstieg der Transkriptmenge von *PTB* führt (Webb *et al.* 2000).

Die bereits in Kapitel 1.5.2 umfassend beschriebenen Studien von Guillemain *et al.* und Soggia *et al.* verdeutlichen eine direkte Korrelation zwischen dem durch Glukose aktivierten Faktor CHREBP und einer effektiven Entwicklung pankreatischer und speziell endokriner Zellen. Die exakten Mechanismen, welche dieser Assoziation zu Grunde liegen, sind aktuell nicht vollständig geklärt, doch es wird von positiven Wirkungen auf die Aktivität von endokrin-assoziierten Faktoren wie *NGN3* und *NEUROD1* ausgegangen. Dabei können sowohl indirekte Effekte, wie die negative Regulation von potenziellen Repressoren über CHREBP eine Rolle spielen, als auch stabilisierende Auswirkungen auf die mRNA der endokrinen Gene von Bedeutung sein (Guillemain *et al.* 2007; Soggia *et al.* 2012). Diese Erkenntnisse spiegeln sich in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Daten wider, denn im Zuge einer dreitägigen Glukosestimulation während der Formierung pankreatischer Progenitorzellen konnten erhöhte Expressionsraten von Genen wie *CHREBP*, *PDX1*, *NGN3* und *NEUROD1* detektiert werden. Mittels Immunfluoreszenzanalysen erfolgte ergänzend die Bestätigung einer gesteigerten Produktion der differenzierungsrelevanten TKF *PDX1* und *NGN3*. Die vermehrte Aktivierung der aufgeführten Gene schlägt einen Bogen zu den in Kapitel 4.2.1 erläuterten Signalwegen, die im Rahmen der Protokollmodifizierung mittels transfektionsbasierter Induktion von miR-375 zur Verbesserung der Differenzierungseffizienz beitragen. Wie beschrieben, können die Faktoren *PDX1*, *NGN3* und *NEUROD1* die Expres-

sion von miR-375 durch Promotorassoziation stimulieren, was die verstärkte Induktion der zahlreichen positiven Wirkungen dieser mikroRNA zur Festlegung der differenzierenden Zellen auf ein endokrines Schicksal hervorruft. Damit bestätigten die erhaltenen Resultate aus den zwei durchgeführten Varianten der Protokollmodifikation, dass bestimmte grundlegende und zelllinienunabhängige Mechanismen die Bildung Insulin-produzierender Zellen forcieren. Obwohl die initiale Veränderung des Protokolls jeweils verschieden war, da zum einen reife miR-375-Moleküle in pankreatische Vorläuferzellen transfiziert wurden und zum anderen die Zellen in dieser Entwicklungsphase einer stark erhöhten Glukosekonzentration im Medium ausgesetzt waren, was zur Induktion verschiedener primärer Effektoren führte, erfolgte letztlich die Aktivierung der gleichen essentiellen signalübertragenden Faktoren wie PDX1, NGN3, NEUROD1, INSULIN, MAFA und miR-375.

Neben den direkt über die Stimulation von CHREBP vermittelten Wirkungen kann eine erhöhte Glukosezufuhr auch zur Aktivierung der DNA-Bindfähigkeit des Transkriptionsfaktors SP1 beitragen (Vaulont *et al.* 2000). Da SP1 als Transkriptionsaktivator von miR-375 wirkt, trägt diese Studie zum Verständnis der Signalwege bei, welche an der detektierten Steigerung der Expressionsrate von miR-375 nach erfolgter Glukosestimulation beteiligt sein können. Ergänzend sind die Ergebnisse einer Studie von Satoh *et al.* zu erwähnen, mit denen bei der Analyse der Promotorregion des *CHREBP*-Gens in Ratten eine Bindestelle für den Faktor SP1 identifiziert werden konnte (Satoh *et al.* 2007). Eigene Recherchen zur Bindefähigkeit von SP1 an den Promotor des humanen *CHREBP*-Gens unter Nutzung der *online* verfügbaren Datenbank (EPD) bzw. der Analyse-Software (ALGGEN-PROMO) bestätigten diesen Befund (Farre *et al.* 2003; Dreos *et al.* 2015). Diese Ergebnisse verdeutlichen die vielseitige Verflechtung der Glukose-vermittelten Signalwege, denn wie bereits erläutert, wirkt sich eine Stimulation von CHREBP positiv auf die Aktivität differenzierungsfördernder Gene aus, was erneut auch zur weiteren Stimulation von miR-375 beitragen kann.

Zusätzlich zur Glukose-vermittelten Aktivierung von CHREBP, können weitere Faktoren wie z.B. p300 als Ko-Aktivator fungieren und zur Steigerung des Potenzials von CHREBP zur DNA-Bindung beitragen (Bricambert *et al.* 2010). Diese Studie bestätigte ergänzend die Erkenntnis, dass die zur Verbesserung der *in vitro* Differenzierungseffizienz erfolgten Protokollmodifikationen ihre als stimulierend zu bezeichnenden Wirkungen über die Aktivierung eines Netzwerkes an Faktoren und Signalwegen ausüben, die sich überschneiden und demnach in ihrer Bedeutung als essentiell angesehen werden können. So ergaben eigene Recherchen zu potenziellen Bindestellen des Transkriptionsaktivators p300 am Promotor von miR-375 mit Hilfe des online nutzbaren Programms *microPIR2*, dass eine Assoziation und die damit verbundene induktive Wirkung möglich ist (Piriyapongsa *et al.* 2014). Zusätzlich finden die vielzähligen Wirkungen von PDX1 während der Ausbildung und Spezialisierung pankreatischer Zellen u.a. im Rahmen einer Kooperation mit p300 statt (Qiu *et al.* 2002; Mosley und Özcan 2004). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte Glukosestimulation kann auch indirekt über eine Aktivierung vorgeschalteter Proteine, wie z.B. KLF11, letztlich zum Auftreten der gemessenen Effekte auf differenzierungsrelevante Faktoren wie PDX1 beitragen. Eine Studie von Neve *et al.* verweist auf die Steigerung der Aktivität von KLF11 sowohl nach Induktion des TGFbeta-Signalweges, als auch unter erhöhter zellulärer Glukosezufuhr (Neve *et al.* 2005). Daraus kann geschlossen werden, dass durch die im Differenzierungsprotokoll vorgesehene Substitution der pluripotenten Zellen mit einer hohen Konzentration des TGFbeta-Aktivators ActivinA, eine effiziente Entwicklung in Richtung entodermale Vorläuferzellen

ausgelöst wurde und eine Induktion des TKF KLF11 erfolgte. Die anschließende Glukosestimulation bis zum Zeitpunkt der Formierung pankreatischer Progenitorzellen kann demnach als verstärkende Aktivierung von KLF11 verstanden werden. Die Bedeutung dieses Effektes wird an den Ergebnissen einer Untersuchung von Fernandez-Zapico *et al.* deutlich, denn KLF11 ist in Kooperation mit p300 auch an der Induktion der *PDX1*-Expression beteiligt (Fernandez-Zapico *et al.* 2009). Damit ergibt sich eine weitere Erklärung für die detektierte gesteigerte Transkriptmenge von *PDX1* in den gerichtet differenzierten Zellen beider verwendeter Linien, die vom sechsten bis zum neunten Tag des Entwicklungsprozesses einer Glukosestimulation ausgesetzt waren. Die bereits erwähnte Wirkung von *PDX1* als Transkriptionsaktivator von weiteren Pankreas-assoziierten Genen wie z.B. *NGN3*, *MAFA* und *miR-375* kann somit als vermittelnder Schritt bei den beobachteten Glukose-induzierten positiven Effekten auf die Effizienz der Ausbildung pankreatischer und speziell endokriner Progenitorzellen angesehen werden.

Mit dem Eintritt der Glukose in die sich entwickelnden Zellerivate beginnt deren Metabolisierung. Nach der initialen Bildung von Glukose-6-Phosphat kann der weitere Abbau im Zuge der Glykolyse geschehen, oder es erfolgt, wenn auch in geringem Umfang, der Eintritt in den Hexosamin-Biosyntheseweg. Es kommt somit zur Entstehung von UDP-GlcNAc, was zur Möglichkeit von O-GlcNAc-Modifikationen von Proteinen führt. Eine derartige Modifizierung von TKF wie *PDX1*, *NEUROD1* und *MAFA* ist möglich und erhöht deren Fähigkeit zur DNA-Bindung, was folglich die Expression weiterer endokriner TKF und *miR-375* stimulieren kann (Andrali *et al.* 2007; Vanderford *et al.* 2007; Kebede *et al.* 2012; Vaidyanathan und Wells 2014). Somit stellt die durchgeführte dreitägige Glukosestimulation eine Option zur Verstärkung der Wirkung differenzierungsrelevanter Faktoren dar, was mit den sehr gut vergleichbaren experimentell erhaltenen Daten aus analysierten Proben der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 bestätigt werden konnte.

Die Metabolisierung der in hoher Konzentration zugeführten Glukose eröffnete auch über die verstärkte Option der O-GlcNAc-Modifizierung eine Stimulation der CHREBP-Aktivität, also dem Effektormolekül, welches ebenso im Zuge der durch Glukose-6-Phosphat vermittelten Signale induziert wird (Guinez *et al.* 2011; Iizuka 2013). Damit ist die Ausbildung eines in Abbildung 81 dargestellten Netzwerkes aus Signalwegen anzunehmen, die im Rahmen der Glukosestimulation in den sich formierenden pankreatischen Vorläuferzellen aktiviert werden. Verschiedene Intermediate, die im Zuge der Glukosemetabolisierung entstehen, tragen dabei in teilweise noch nicht vollständig aufgeklärter Weise zur Stimulation von vielfältig agierenden Effektoren bei. Letztlich erfolgt eine positive Beeinflussung von TKF und der mikroRNA-375, was zur effektiveren *in vitro* Generation endokriner Progenitorzellen beitragen kann. Dass die potenziellen Regulationsmechanismen grundsätzlich zur verbesserten Differenzierungseffizienz beitragen können, konnte mit der großen Übereinstimmung der in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Ergebnisse beim Vergleich der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 aufgezeigt werden. Die detektierten positiven Auswirkungen auf die Expressionsrate von Genen wie *PDX1*, *NGN3*, *MAFA*, *CHREBP* und *NEUROD1* waren in den beiden eingesetzten Linien sehr ähnlich. Leichte Unterschiede waren jedoch im Niveau, d.h. im Ausmaß der Expressionssteigerung zu erkennen. Die Erhöhung der Transkriptmenge von *PDX1* und *NGN3* fiel in den Derivaten der hiPSC-Linie IMR90-4 stabiler aus, d.h. eine deutlichere Steigerung über das Niveau der Gruppe gerichtet differenzierter Zellen, die ohne weitere Modifikation nur nach dem Basisprotokoll differenziert wurden war bis zum Ende des durchgeführten *in vitro* Entwicklungsprozesses erkennbar. Dieser Effekt kann zum einen mit der Erhaltung eines epige-

netischen Gedächtnisses in den aus differenzierten Zellen der Lunge gewonnenen iPSZ erklärt werden, da somit bahnende Markierungen zum hohen Potenzial der erneuten Bildung zunächst entodermaler Vorläuferzellen beitragen können. Damit stand umfassendes Ausgangsmaterial für eine anschließend gerichtete Differenzierung in die pankreatische Linie zur Verfügung, welche durch die erfolgte Glukosestimulation in der Festlegung des Zellschicksals zusätzlich positiv beeinflusst wurde. Zum anderen ist zu bedenken, dass auch die Kultur der pluripotenten Zellmodelle sich in Bezug auf die Glukosesubstitution leicht unterschied, was eine Adaptation der Zelllinien an verschiedene basale Glukosekonzentrationen vermuten lässt. Im Kulturmedium zur Expansion der hESZ-Linie HUES-8 unter Erhalt des Stammzellcharakters betrug der Glukosegehalt 17,5 mM, im entsprechenden Medium der hiPSZ-Linie IMR90-4 dagegen 25 mM. Mit Beginn des Differenzierungsvorganges war der Zuckergehalt aber aufgrund der parallelen Anwendung des etablierten Basisprotokolls und der vergleichenden Durchführung der Glukosestimulation für beide eingesetzte Linien stets identisch. Die während der Stammhaltung der pluripotenten Linien leicht abweichende Glukosesubstitution kann allerdings zu stabilen Modifikationen zellulärer Regulationsmechanismen im Sinne einer individuellen Adaptation beigetragen haben, deren Folgen sich letztlich noch in den leichten Niveauunterschieden der detektierten positiven Effekte einer Glukosestimulation während des *in vitro* Differenzierungsverlaufs ablesen lassen.

Insgesamt ergaben sich aus der Summe der Daten publizierter Studien zum Einfluss von Glukose auf die pankreatische Differenzierung und den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen zur Steigerung der Differenzierungseffizienz mittels gezielter kurzzeitiger Glukosestimulation mehrere Fragen. Gibt es einen „idealen“ Glukosegehalt im Differenzierungsmedium für die möglichst effiziente Bildung Insulin-produzierender Zellen bzw. unterscheidet sich der Zuckerbedarf in den einzelnen Etappen der *in vitro* Differenzierung? Existiert demnach ein optimales sensitives Zeitfenster, in dem das Reaktionspotenzial der Zellen auf eine gezielte Glukosestimulation effektiv genutzt werden kann? Ist eine Obergrenze der zur Stimulation eingesetzten Konzentration zu bedenken, um potenziell negative Effekte zu vermeiden, die im Sinne einer Störung des Differenzierungsprozesses den detektierten, nachweislich induktiven Effekten entgegen wirken könnten?

Die in der Abbildung 81 dargestellten Signalwege, die im Zuge der Glukosestimulation in den Zellen aktiviert werden können, verdeutlichen die zentrale und vermittelnde Rolle von CHREBP. Neben den bereits beschriebenen positiven Effekten auf die *in vitro* Differenzierung endokriner pankreatischer Zellen, kann eine langanhaltende starke Aktivität von CHREBP allerdings auch negative Folgen haben. Da CHREBP auch stimulierend auf Gene einwirkt, deren Aktivität bei der Aufrechterhaltung der Glykolyse und der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen, sollte eine Repression in fortschreitend differenzierten und somit spezialisierten Zellen erfolgen, da die starke Nutzung der Glykolyse zur Metabolisierung von Glukose wie bereits diskutiert eher auf stark proliferierende Zellen beschränkt ist, während sich differenzierte Zellen durch eine Verschiebung hin zum Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung auszeichnen (Tong *et al.* 2009; Metukuri *et al.* 2012; Burgess *et al.* 2014). Passend dazu belegen Studien, dass die stärkste Aktivität von CHREBP in pankreatischen bzw. speziell endokrinen Vorläuferzellen zu detektieren ist, was auf die positive Wirkung auf differenzierungsrelevante Gene innerhalb dieser Entwicklungsstufe zurückzuführen ist. Zusätzlich sind induktive Effekte auf Zellzyklusregulatoren im Sinne einer begünstigten Proliferation der Progenitorzellen nachweisbar (Guillemain *et al.* 2007; Metukuri *et al.* 2012; Soggia *et al.* 2012). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass mit zunehmender De-

terminierung des endgültigen Zellschicksals die Notwendigkeit zur Regulation des *CHREBP*-Gens im Sinne einer Repression besteht. Mit Studien an INS1-Zellen der Ratte und humanen *in vitro* kultivierten Langerhans'schen Inseln konnte aufgezeigt werden, dass eine langfristig erhöhte Glukosekonzentration glukotoxische Wirkungen in Beta-Zellen entfalten kann. Ausgelöst durch die verstärkte Aktivität von CHREBP kommt es zur Stimulation von TXNIP (*Thioredoxin Interacting Protein*), welches oxidativen Stress, inflammatorische Prozesse sowie apoptotische Vorgänge z.B. durch Aktivierung der Caspasen 3 und 7 fördert (Cha-Molstad *et al.* 2009; Pongvarin *et al.* 2012; Osowski *et al.* 2012). Ergänzend konnten Da Silva Xavier *et al.* eine Reduktion der mRNA-Menge von essentiellen Genen wie *PDX1* und *MAFA* in isolierten adulten murinen Langerhans'schen Inseln nach Überexpression von *CHREBP* belegen (Da Silva Xavier *et al.* 2010). Neben den über CHREBP vermittelten negativen Auswirkungen einer anhaltend hohen Glukosesubstitution können auch O-GlcNA-Modifizierungen an verschiedenen Proteinen zur Induktion apoptotischer Prozesse beitragen (Liu *et al.* 2000; Kang *et al.* 2008).

Diese Erkenntnisse führten zur Annahme, dass eine starke, aber zeitlich auf die Etappe der Formierung pankreatischer bzw. früher endokriner Vorläuferzellen beschränkte Aktivität von CHREBP sich positiv auf die effektive und umfassende Differenzierung dieser Derivate unter Stimulation ihrer Proliferation und zahlreichen differenzierungsrelevanten Genen auswirkt. Diese These konnte übereinstimmend im Rahmen der durchgeführten Differenzierungsexperimente für die hESZ-Linie HUES-8 und die hiPSZ-Linie IMR90-4 bekräftigt werden. Wie in Kapitel 3.4.2 präsentiert, konnte in den gerichtet differenzierten Zellen eine starke Expressionsrate von *CHREBP* am neunten und zwölften Tag des *in vitro* Entwicklungsprozesses detektiert werden, was dem Zeitfenster der Bildung pankreatischer bzw. endokriner Zellen entspricht und durch ein ebenfalls hohes Expressionsniveau von Genen wie *PDX1*, *NGN3* und *NEUROD1* gekennzeichnet ist. Da, wie erwähnt, diese Faktoren Ziele der über CHREBP vermittelten Regulationsmechanismen darstellen, konnten die experimentell ermittelten Ergebnisse als deutlicher Hinweis gewertet werden, dass die erwähnten positiven Interaktionen zwischen den Faktoren im Sinne einer sukzessiven Formation von endokrinen Progenitorzellen auftraten. Damit kann folglich das gewählte Zeitfenster zur Glukosestimulation in Bezug auf Konzentration und Dauer als sehr geeignet bewertet werden, um einerseits die Effektivität der *in vitro* Differenzierung endokriner Progenitorzellen zu erhöhen und andererseits aufgrund der beobachteten zügigen Repression von CHREBP zum Ende des Differenzierungsprozesses den Einfluss potenziell schädigender Effekte zu minimieren.

Ausblickend kann eine weitere Optimierung der Glukosestimulation, z.B. im Rahmen einer Verlängerung bzw. Verlagerung auf spätere Entwicklungsstadien untersucht werden. So könnte durch eine Stimulation zwischen dem sechsten und zwölften Tag weiterhin die Formierung der *PDX1*-exprimierenden pankreatischen Vorläufer und auch die anschließende endokrine Spezialisierung potenziell noch stärker forciert werden, was sich letztlich auch in einer signifikanten Steigerung der *INSULIN*-Expression widerspiegeln würde. Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte Glukosestimulation korrelierte nicht mit einer Erhöhung der Transkriptmenge von *INSULIN*, aber mit einer gesteigerten Synthese. Das lässt vermuten, dass die zwischen dem sechsten und neunten Differenzierungstag induzierten Glukose-vermittelten Signale in ihrer Stärke und Dauer nicht ausreichten, um auf die erst gegen Ende der *in vitro* Differenzierung einsetzende *INSULIN*-Transkription effektiv wirken zu können. Allerdings kann wie beschrieben, von einem zumeist auf posttranskriptionaler Ebene wirkenden Einfluss der Glukose-induzierten Effektoren ausgegangen werden, was nachfolgend eine Stabilisierung der *INSULIN*-mRNA und

damit effizientere Translation erlaubte. Ob dieser Effekt durch eine Verlängerung der Glukosestimulation noch zu verstärken ist, könnte durch umfassende zukünftige Experimente zur Ermittlung eines idealen Ausmaßes an Glukosesubstitution im Differenzierungsverlauf näher charakterisiert werden. Dabei sollte jedoch auf eine Balance geachtet werden, damit die ermittelten positiven Effekte auf die Differenzierungseffizienz nicht durch ein Auftreten der erwähnten negativen Auswirkungen, die eine anhaltend hohe Glukosekonzentration in sich formierenden Insulin-produzierenden Zellen verursachen kann, aufgehoben werden. Ergänzend ist zu bedenken, dass eine ausgedehnte Kultur der Zellen unter einer hohen Glukosekonzentration im umgebenden Medium Adaptationseffekte auslösen kann, was die gewünschte Funktion dieser generierten Derivate im Zuge zukünftiger Zellersatztherapien, nämlich die sensitive Wahrnehmung eines unphysiologisch erhöhten Glukosegehaltes gefolgt von einer adäquaten Insulinsekretion, einschränken könnte.

Als Fazit der innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführten Modifikation des etablierten Differenzierungsprotokolls durch eine gezielte, kurzfristige Stimulation der Zellen mit einer Glukosekonzentration von 50 mM, konnte eine positive Auswirkung auf die Effizienz der Ausbildung pankreatisch-endokriner Zellen in beiden eingesetzten Zellmodellen festgestellt werden. Damit bestätigte sich die Hypothese, dass durch Modulation eines Nährstoffes, der bekannterweise für die Reifung und Funktion von Beta-Zellen eine große Bedeutung hat, eine effizientere *in vitro* Differenzierung möglich ist, was durch die positiven Auswirkungen auf zahlreiche differenzierungsrelevante Gene verdeutlicht wurde. Die gezielte Modifikation des im zellulären Stoffwechsel aktiven Faktors Glukose bietet eine ideale Option zur Erweiterung aktuell bestehender Differenzierungsprotokolle und ist somit dem Einsatz von teilweise unzureichend charakterisierten Chemikalien klar vorzuziehen. Die großen Übereinstimmungen in den ermittelten Ergebnissen zum positiven Einfluss der Glukosestimulation zwischen den formierten Zellderivaten der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 zeigen eindrucksvoll, dass die induzierten Glukose-vermittelten Signale und Regulationsmechanismen zelllinienunabhängig wirken und damit grundsätzlich zur Verbesserung der Differenzierungseffizienz ausgehend von pluripotenten Stammzellen beitragen. Im Umkehrschluss vermittelt die gute Vergleichbarkeit der Reaktionen innerhalb der hESZ und hiPSZ auch eine positive Aussage über das gute Potenzial beider Zellmodelle zum Einsatz sowohl in der weiteren Grundlagenforschung zur stetigen Erweiterung von Erkenntnis zur *in vitro* Entwicklung pankreatischer Zellen als auch ausblickend im klinischen Einsatz.

4.2.3 Kombination aus Induktion von miR-375 und Glukosestimulation

Im Rahmen der durchgeführten kombinierten Modifikation des Basis-Differenzierungsprotokolls wurde eine Gruppe gerichtet differenzierter Zellen vom sechsten bis neunten Entwicklungstag unter einer stark erhöhten Glukosekonzentration von 50 mM im Medium inkubiert. Es folgten zwei Transfektionen mit miR-375-Molekülen am neunten und zwölften Tag. Dieser Versuchsansatz diente vor allem der Analyse von potenziell kombinatorischen Auswirkungen in Bezug auf die positiven Effekte auf differenzierungsrelevante Marker, wie sie im Zuge der einzeln durchgeführten Protokollmodifikationen detektierbar waren und in den Kapiteln 3.4.1 und 3.4.2 präsentiert wurden. Bei der deutlich messbaren Steigerung der Expressionsrate von miR-375, *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* konnten additive Effekte übereinstimmend in den Zellerivaten der eingesetzten hESZ- und hiPSZ-Linie nachgewiesen werden.

Leichte Schwankungen im Ausmaß der Reaktion zwischen den Linien verweisen dabei auf die hohe Sensibilität des *in vitro* Modells pluripotenter Stammzellen in Bezug auf die Ansprechbarkeit der Zellen bzw. die Effizienz der wiederholt durchgeführten Differenzierungsversuche. Für eine noch detailliertere Charakterisierung des Expressionsmusters der beeinflussten Gene wäre daher ausblickend eine tägliche Probennahme nach der durchgeführten Protokollvariation bis zum Ende des *in vitro* Entwicklungsprozesses denkbar. Damit könnten zufällige bzw. spezifische zeitliche Unterschiede der maximal steigenden Effekte auf die Expression zwischen den Zelllinien sicherer diskriminiert werden. Zusätzlich war aus der Gesamtheit der erhobenen Daten zu schlussfolgern, dass die beobachtete stabile Erhöhung der endogenen Produktion von miR-375 bis zum Ende des *in vitro* Differenzierungsprozesses nach erfolgter kombinierter Protokollmodifikation hauptsächlich über die induzierende Wirkung der Transfektion von reifen miR-375-Molekülen am neunten und zwölften Tag der zellulären Entwicklung hervorgerufen und aufrechterhalten wurde. Wie in den Kapiteln 3.4.1 und 3.4.2 gezeigt, stellte sich bei den einzeln durchgeführten Protokollvariationen die Transfektion von miR-375 als deutlich effizientere Methode zur anhaltenden Steigerung der zellulären Synthese von miR-375 bis zum 18. Tag der Differenzierung heraus, als die Variante der Glukosestimulation.

Da die erfolgte kombinierte Protokollmodifikation mit einer additiv erhöhten Expressionsrate der differenzierungsrelevanten Gene *PDX1*, *NGN3* und *INSULIN* korrelierte, konnte daraus geschlossen werden, dass die durchgeführten Modulationen zur Beeinflussung des Differenzierungsvorganges in grundlegende, regulierende Signalwege eingreifen. Dies erfolgte zelllinienunabhängig und offenbarte das große Potenzial der Modifikationen zur Optimierung der pankreatischen *in vitro* Differenzierung. Aufgrund der Effekte auf die Expression von gleich mehreren Genen, die für eine erfolgreiche schrittweise Entwicklung hin zu Insulin-produzierenden Zellen sukzessive aktiviert werden müssen, konnte eine Erhöhung der Effektivität der späten *in vitro* Entwicklungsetappen erreicht und damit dem Trend der aktuell bekannten etablierten Differenzierungsprotokolle gegengesteuert werden. Ergänzend stellten sich die Ergebnisse der Expressionsanalyse weiterer differenzierungsrelevanter Gene am Endpunkt des Differenzierungsverlaufs dar, die in Kapitel 3.4.4, Abbildung 61 präsentiert wurden. Vor allem in Folge der transfektionsbasierten verstärkten Induktion von miR-375 war dabei eine Steigerung der Expressionsrate des Beta-Zell-Gens *PAX4*, verbunden mit einer schwach detektierbaren Expression des Alpha-Zell-Gens *ARX*, zu beobachten. Diese Beobachtung deutet auf eine noch nicht völlig exklusive, aber grundsätzlich verbesserte Spezialisierung der formierten endokrinen Zellerivate in Richtung

Beta-Zell-Schicksal hin (Collombat *et al.* 2003; Dhawan *et al.* 2011). Die ebenfalls in Abbildung 61 vorgestellten Ergebnisse zur Expression von *BHLHE22* und *ONECUT2*, welche im Zuge der gerichteten Differenzierung und unter Anwendung aller Protokollvarianten durch eine deutliche Repression gekennzeichnet waren, bestätigen die erfolgreiche und effektive Festlegung der Zellerivate der eingesetzten hESZ und hiPSZ auf eine pankreatische, Beta-Zell-assoziierte Entwicklungsrichtung. Die Aktivität von *BHLHE22* muss in Beta-Zellen strikt reprimiert werden, da es zu den sogenannten „*disallowed genes*“ gehört, deren Wirkung die Vitalität und Funktion von Beta-Zellen beeinträchtigt. Die negative Regulation von *BHLHE22* erfolgt u.a. über die im Verlauf der pankreatischen Differenzierung induzierte mikroRNA-182 (Kaspi *et al.* 2014). Eine ausbalancierte, miR-basierte Regulation von *ONECUT2* in Beta-Zellen ist hingegen für eine bedarfsgerechte GSIS erforderlich (Plaisance *et al.* 2006). Die in Kapitel 3.2.2 dargestellte ansteigende Expressionsrate der mikroRNAs miR-9 und miR-182 zum Ende der *in vitro* Differenzierung korrelierte hierbei erwartungsgemäß mit der äußerst schwachen Expression dieser beiden Gene in allen Gruppen gerichtet differenzierter Zellen.

In Kapitel 3.4.4 wurden die Ergebnisse zur Expressionsanalyse des Beta-Zell-assoziierten Gens *MAFA*, aber auch der Alpha- bzw. Delta-Zell-assoziierten Gene *GLUCAGON* und *SOMATOSTATIN* am Endpunkt des *in vitro* Differenzierungsprozesses in den Gruppen der gerichtet differenzierten Zellen, die zum Teil zusätzlich den beschriebenen Protokollmodifikationen unterworfen waren, dargestellt.

In Bezug auf *MAFA* konnte übereinstimmend in den Zellproben der eingesetzten hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 eine Steigerung der Transkriptmenge bei Anwendung der Protokollvarianten am Endpunkt der *in vitro* Differenzierung, d.h. an Tag 18 detektiert werden, wobei der Effekt hauptsächlich durch die transfektionsbasierte Induktion von miR-375 getragen wurde und demnach keine additiven Auswirkungen bei kombinierter Anwendung von Glukosestimulation und miR-375-Transfektion zu erkennen waren. Das lässt vermuten, dass hier im Rahmen der verschiedenen Protokollmodifikationen entweder nicht die gleichen Signalwege angesprochen wurden, die letztlich zur verstärkten Expressionsrate von *MAFA* führen, oder zum anderen die Art der Glukosestimulation in Bezug auf Länge, Konzentration und Zeitfenster im Differenzierungsverlauf noch nicht optimal eingestellt war, um eine maximale Reaktion in den Zellen auszulösen. Das insgesamt leicht stärkere Ausmaß der positiven Beeinflussung der Transkriptmenge von *MAFA* in den Zellerivaten der hiPSZ-Linie verweist erneut auf die grundsätzlich wirkenden zellulären Regulationsmechanismen, die für das beobachtete vergleichbar gute Potenzial der verwendeten hESZ und hiPSZ zur pankreatischen Differenzierung und Antwort auf die durchgeführten Protokollmodulationen sorgen, zeigt aber auch feine linienspezifische Unterschiede im Reaktionsvermögen auf. Wie bereits beschrieben, können sowohl der genetische Hintergrund als auch speziell epigenetische Markierungen, die auch nach dem Reprogrammierungsprozess erhalten bleiben, zum individuellen Potenzial gewonnener iPSZ für die erneute Ausdifferenzierung in Derivate eines bestimmten Keimblattes beitragen (Polo *et al.* 2010; Kim, K. *et al.* 2011). Einen derartigen Vorteil zur Entwicklung in die pankreatische Richtung und damit verbunden eine gute Reaktion auf differenzierungsfördernde Protokollerweiterungen kann bei den eingesetzten hiPSZ angenommen werden, da sie aus fetalen Lungenzellen und damit einem ebenso entodermal determiniertem Zelltyp generiert wurden (Nichols *et al.* 1977; Yu *et al.* 2007).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse zur Expressionsrate von *GLUCAGON* fiel erneut die übereinstimmende Reaktion der Zellerivate im Sinne einer Steigerung in beiden eingesetzten Linien auf. In den

Zellen der hESZ-Linie HUES-8 wurde der Effekt über die transfektionsbasierte Induktion von miR-375 gesteuert, denn nach Glukosestimulation war keine signifikante Veränderung messbar. Die Erhöhung der Transkriptmenge nach erfolgter Kombination der Protokollvariationen zeigte entsprechend keinen kombinatorischen Effekt, sondern präsentierte sich auf dem Niveau der einzeln durchgeführten Induktion von miR-375. In den Zellerivaten der iPSZ-Linie IMR90-4 konnte hingegen auch nach erfolgter Glukosestimulation eine Zunahme der Expressionsrate von *GLUCAGON* gemessen werden, wobei auch hier bei kombiniertem Einsatz der Protokollvarianten kein synergistischer Effekt auftrat. Auch hier sei die Vermutung erwähnt, dass die hiPSZ-Linie ein individuell höheres Reaktionspotenzial auf induktive Reize im Sinne einer pankreatischen *in vitro* Differenzierung in Folge epigenetisch bahnender Markierungen aufgrund der entodermal determinierten Herkunft der somatischen Ausgangszellen aufweisen können.

Ergänzend ist zu bemerken, dass die pluripotenten Linien während ihrer Stammhaltung, d.h. langfristigen Kultur unter Erhalt des Stammzellcharakters entsprechend ihrer individuellen Adaptation in Medien inkubiert wurden, deren Glukosegehalt leicht verschieden war. Zwar war die Glukosekonzentration während der durchgeführten vergleichenden Differenzierung der Zelllinien während des gesamten *in vitro* Differenzierungsverlaufes identisch und die Glukosestimulation erfolgte übereinstimmend bei einem Gehalt von 50 mM im Medium, aber die leichten Unterschiede während der Kultur vor Beginn der Differenzierung könnten verschiedene unbekannte Signale bzw. in verschiedenem Ausmaß in den Linien vermittelt haben, deren langfristige Folgen sich noch im Sinne einer unterschiedlich ausgeprägten Reaktionsfähigkeit bei der durchgeführten Glukosestimulation im späteren Differenzierungsprozess widerspiegeln. Ausblickend wären zur Aufklärung dieser Hypothese experimentelle Ansätze denkbar, bei denen die Kultur der zu vergleichenden Zelllinien schon während der Stammhaltung für einige Zeit bis zum Beginn der *in vitro* Differenzierung in Medien erfolgt, deren Glukosekonzentration exakt übereinstimmend eingestellt wird.

Die ermittelten Ergebnisse zur Expression von *GLUCAGON* und vergleichend *INSULIN* deuteten auf eine effektivere Festlegung der differenzierten Zellen auf ein endokrines Schicksal unter der Verwendung der Protokollvariationen hin. Zwar konnte auf Ebene der Transkription keine verstärkte Diskriminierung zwischen Alpha- und Beta-Zellen beobachtet werden, was sich an der Steigerung der Expressionsrate beider Gene in den formierten Progenitorzellen zeigte. Allerdings verdeutlichten die Ergebnisse auf Proteinebene, welche mittels Immunfluoreszenzanalysen detektiert wurden, dass es im Rahmen der Protokollmodifikationen selektiv zur Steigerung der Insulinbiosynthese kam. Der Anteil an polyhormonalen Zellen, die im Zuge durchgeführter Ko-Färbungen von *INSULIN* mit *GLUCAGON* detektiert wurden, nahm nicht zu. Damit ist anzunehmen, dass die induktiven Effekte, die im Zuge der Protokollvariationen in den sich formierenden Zellen auftreten, zunächst allgemein positiv auf die Effizienz zur Ausbildung endokriner Progenitorzellen beitragen. Im Zuge des sich forcierter ausbildenden Netzwerkes aus sich gegenseitig aktivierenden TKF und mikroRNAs tragen die Modulationen vor allem in Kombination aber letztlich zur verstärkten und selektiveren Festlegung der Zellen auf das Entwicklungsschicksal Insulin-produzierender Zellen bei. Dieser Eindruck wurde ergänzt durch die ermittelten Ergebnisse zum Hormon SOMATOSTATIN, denn übereinstimmend in den Derivaten beider Zelllinien führten die eingesetzten Varianten des Basis-Differenzierungsprotokolls weder einzeln noch in Kombination zu einer Erhöhung auf Ebene der Transkription oder Translation. Den stimmigen Schlusspunkt dieser Betrachtung

setzten die Resultate des im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten C-PEPTID-ELISAs. Sowohl in den formierten endokrinen Zellen aus der hESZ-Linie HUES-8 als auch der hiPSZ-Linie IMR90-4 konnte am Ende des Differenzierungsprozesses eine Steigerung der endogenen Insulinproduktion in Folge der durchgeführten Protokollmodifikationen nachgewiesen werden.

Die gemessenen übereinstimmenden Effekte in den Zellen beider Linien verwiesen auf die stärkere differenzierungsfördernde Wirkung der transfektionsbasierten Induktion von miR-375 im Vergleich zur Glukosestimulation, was sich auch im Ausbleiben signifikanter synergistischer Effekte zeigte. Wie bereits in Kapitel 4.2.2 diskutiert, könnten sich hierbei im Rahmen zukünftiger Studien zur weiteren Verbesserung der Glukosestimulation in Form von Anpassungen in Bezug auf die Konzentration, die Dauer der Stimulation und dem gewählten Zeitfenster Chancen zur Optimierung dieser potenten Stellschraube während der pankreatischen *in vitro* Differenzierung bieten. Die folgende Grafik stellt die Signale, die im Zuge der Kombination aus Glukosestimulation und Induktion von miR-375 in den Zellen ausgelöst werden und sich in ihren vermittelten Reaktionsketten teilweise überschneiden bzw. gegenseitig beeinflussen, noch einmal im Überblick dar. Die Verflechtung der Regulationsmechanismen trägt dabei zu den beobachteten kombinatorisch wirkenden Effekten auf differenzierungsrelevante Gene bei.

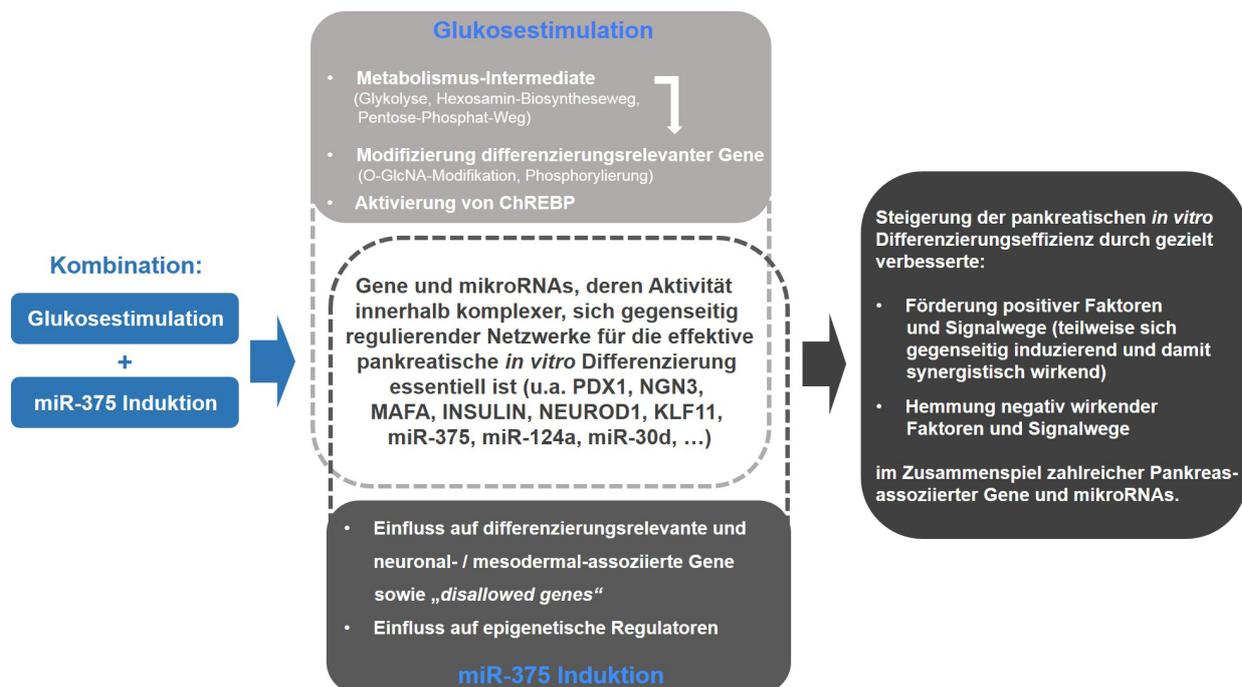


Abb. 82: Schematische Darstellung der mittels Glukosestimulation, Induktion von miR-375 und kombinierter Anwendung beider Protokollmodifikationen vermittelten zellulären Effekte, die zur Verbesserung der pankreatischen *in vitro* Differenzierung beitragen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden auch potenzielle Effekte der durchgeführten Modifikationen des Basis-Differenzierungsprotokolls auf die Expressionsrate zweier Pankreas-assoziiierter mikroRNAs untersucht. Diese Analyse der Aktivität von miR-124a und miR-30d zum Ende des *in vitro* Differenzierungsverlaufs war zum einen aufgrund ihrer bedeutenden Funktionen in Bezug auf Entwick-

lung und Funktionserhalt von Beta-Zellen und zum anderen aufgrund bekannter Studienergebnisse zu ihrer Induzierbarkeit mittels Glukose von großem Interesse (Baroukh *et al.* 2007; Lovis *et al.* 2008; Baroukh und van Obberghen 2009; Joglekar *et al.* 2009; Hinton *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2012).

Die Resultate zum Expressionsniveau von miR-124a am Ende des *in vitro* Differenzierungsverlaufs zeigten insgesamt große Übereinstimmungen in den formierten Derivaten beider eingesetzter Zelllinien. Jedoch konnte nach jeweils einzeln erfolgter Protokollmodifikation mittels Transfektion von miR-375 bzw. Glukosestimulation nur ein Trend zur Steigerung der Expressionsrate, aber keine signifikante Erhöhung detektiert werden. Als Ursache können individuelle Unterschiede der sich entwickelnden sensitiven Zellen in Bezug auf das exakte Potenzial zur Reaktion auf die durchgeführten Protokollvariationen zwischen den einzelnen unabhängigen Versuchswiederholungen und die daraus resultierende Varianz der Messwerte angesehen werden. Eine höhere Zahl an experimentellen Wiederholungen könnte hier ausblickend zu einer deutlicheren Aussage beitragen. Ergänzend sei jedoch erwähnt, dass in den formierten Zellen beider Linien eine klar signifikante Erhöhung der Transkriptmenge von miR-124a festgestellt werden konnte, wenn die Zellen im Differenzierungsverlauf der Kombination beider Protokollvarianten ausgesetzt waren. Dies ließ auf eine additive und damit verstärkende Wirkung beider Modifikationen schließen. Ähnlich stellten sich die Ergebnisse zur Beeinflussung der Transkription von miR-30d dar. Übereinstimmend war in den über 18 Tage hinweg differenzierten Zellen beider Linien, die der Kombination beider Protokollmodulationen während ihrer Entwicklung ausgesetzt waren, die Detektion einer signifikanten Expressionssteigerung möglich. Im Zuge der einzeln durchgeführten Protokollvariationen zeigten die Zellen der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4 ebenfalls große Ähnlichkeit in Bezug auf die beobachtete Erhöhung der Transkriptmenge von miR-30d. Dieser Effekt war jedoch nur in den Zellproben der Linie IMR90-4 als signifikant nachweisbar, während Schwankungen der Messwerte der einzelnen experimentellen Wiederholungen in den Proben der Linie HUES-8 möglicherweise dazu führten, dass der zu den iPSZ übereinstimmende Trend im Rahmen der gesetzten Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % nicht signifikant war.

Insgesamt kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass beide Protokollvariationen zur Aktivierung von Signalwegen führten, die letztlich zur Steigerung der miR-30d Expression beitrugen, wobei keine signifikant additive Wirkung beobachtet werden konnte. Die detektierten induzierenden Effekte auf die Expression der mikroRNAs miR-124a und miR-30d deuten auf eine effektivere Reifung der generierten endokrinen Vorläuferzellen hin. Aufgrund der vielfältigen essentiellen Funktionen dieser beiden mikroRNAs in Bezug auf den Erhalt und die adäquate Funktion speziell von Beta-Zellen kann von forcierten positiven Effekten der Protokollmodulationen auf die Ausbildung dieses Zelltyps im Zuge einer Annäherung an die *in vivo* typischen Verhältnisse gesprochen werden. Die in Kapitel 3.2.2 präsentierten Ergebnisse zur Analyse des Expressionsprofils weiterer Pankreas-assoziiierter mikroRNAs während des Verlaufs der gerichteten *in vitro* Differenzierung verdeutlichten, dass zum einen mit Hilfe des im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Basis-Protokolls eine erfolgreiche, vergleichende und reproduzierbare Formierung endokriner Progenitorzellen aus hESZ und hiPSZ möglich war. Zum anderen war aus den großen Übereinstimmungen im Expressionsprofil der untersuchten mikroRNAs zwischen den hESZ und hiPSZ zu schließen, dass die spezifische Aktivität dieser miRs notwendig für eine erfolgreiche Ausbildung pankreatischer Zellen ist und sie somit ergänzend zur Bestimmung der Aktivität etablierter TKF zur Charakterisierung der sukzessiven Etappen im *in vitro* Differenzierungsverlauf

genutzt werden können und sollten. Die folgende Grafik bietet einen Überblick über die Vielfalt potenzieller Zielgene und beeinflusster zellulärer Signalwege der im Rahmen der vorliegenden Dissertation analysierten mikroRNAs, die in kombinierter Wirkung zur erfolgreichen Entwicklung von Insulin-produzierenden Zellen beitragen. Wie in Kapitel 3.2.2 vorgestellt, wiesen die detektierten Expressionsprofile aller untersuchten mikroRNAs im Vergleich zu Daten aus zahlreichen *in vivo* Studien unter Nutzung von fetalem Pankreasmaterial und ergänzend einigen *in vitro* Studien an anderen pluripotenten Zelllinien große Ähnlichkeiten auf (Hinton *et al.* 2010; Joglekar *et al.* 2011; Eliasson und Esguerra 2014; Kaspi *et al.* 2014; Fogel *et al.* 2015). Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Ausbildung ihres spezifischen und anhand ihrer Funktion in Reifung und Erhalt von Beta-Zellen zu erwartenden Expressionsmusters im Rahmen der durchgeführten *in vitro* Differenzierungsexperimente als Bestätigung des Potenzials des etablierten Protokolls zur vergleichenden *in vitro* Differenzierung Insulin-produzierender Zellen ausgehend von hESZ und hiPSZ angesehen werden kann.

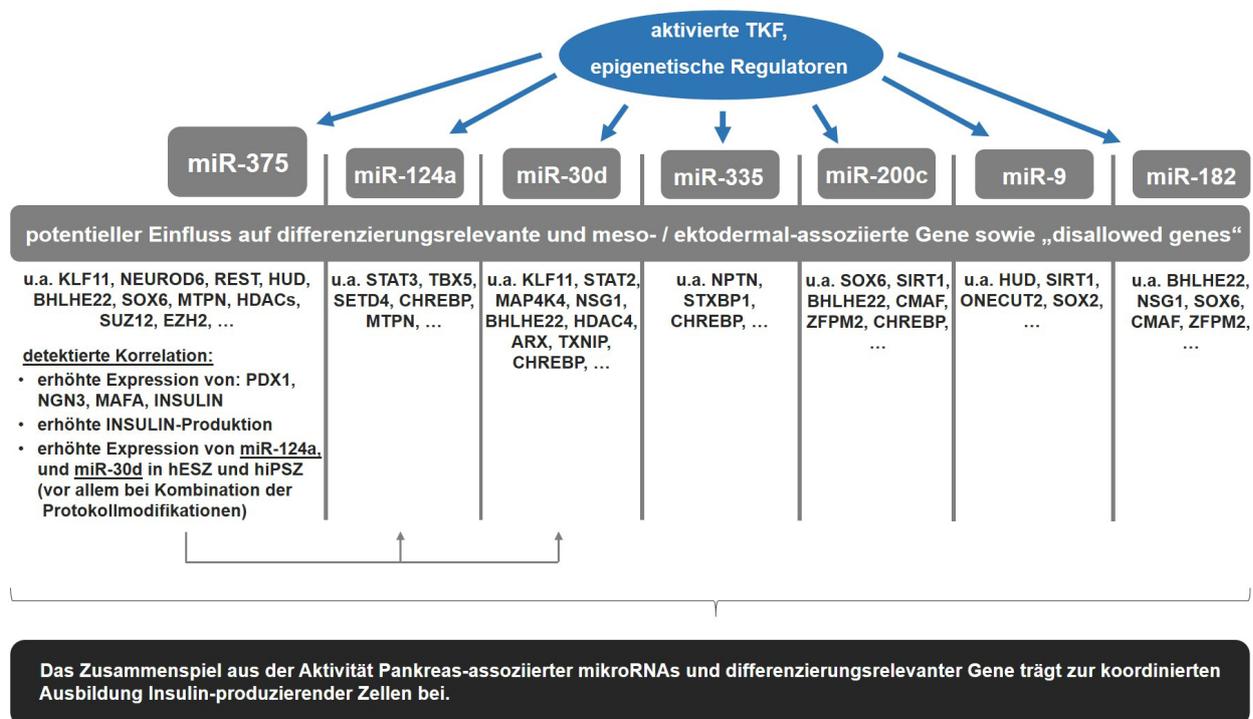


Abb. 83: Schematische Darstellung von Pankreas-assoziierten mikroRNAs, die während des *in vitro* Differenzierungsverlaufs aktiviert werden. Über die Regulation zahlreicher potenzieller Zielgene tragen diese miRs in Zusammenarbeit mit differenzierungsrelevanten Genen zur Formierung von Insulin-produzierenden Zellen bei.

Die Abbildung 83 stellt potenzielle Zielgene der untersuchten mikroRNAs dar, die auf eine erfolgreiche pankreatische *in vitro* Differenzierung Einfluss nehmen können. Zu diesen Zielen gehören neben direkt differenzierungsrelevanten Genen auch Marker, deren Aktivität zur Ausbildung von Derivaten anderer Keimblätter führen kann und die somit im Verlauf der pankreatischen Entwicklung reprimiert werden sollten (Lindsley *et al.* 2006; Dhara und Stice 2008; Guo und Hebrok 2009). Das gilt auch für sogenannte „disallowed genes“, deren Wirkung schädlich für die Vitalität und Funktion von Beta-Zellen ist (Melk-

man-Zehavi *et al.* 2011; Schuit *et al.* 2012; Kaspi *et al.* 2014; Martinez-Sanchez *et al.* 2015). Zusätzlich beeinflussen auch zahlreiche Effektoren, welche epigenetische Modifikationen mediieren, die Entwicklung von pankreatischen endokrinen Zellen in verschiedenen Zeitfenstern der Differenzierung, so dass ihre Aktivität strikt reguliert werden sollte, was durch einige Pankreas-assoziierte miRs realisiert werden kann (Iorio *et al.* 2010; Zhang und Ho 2010; Gilbert und Liu 2012). Die in der Abbildung 83 präsentierte Auswahl an potenziell relevanten Zielgenen, die im Zuge der pankreatischen *in vitro* Differenzierung der Regulation durch die analysierten miRs unterworfen sein können, ergab sich aus Literaturrecherchen sowie eigenen Untersuchungen unter Verwendung *online* verfügbarer Datenbanken und Programmen wie *miRTar*, *MiRmap*, *DIANA-microT*, *miRWalk 2.0* und *microcosm*, die mittels bioinformatisch-basierter Analyse die Vorhersage von spezifischen Zielgenen erlauben (Hsu *et al.* 2011; Vejnar und Zdobnov 2012; Paraskevopoulou *et al.* 2013; Dweep und Gretz 2015, EMBL-EBI Enright Lab 2015). Zusätzlich ist zu bedenken, dass mikroRNAs nicht nur posttranskriptionell durch Bindung an verschiedene mRNAs deren Translation inhibieren können, sondern auch zur Assoziation mit der Promotorregion von Zielgenen fähig sind. Hierbei sind weitere Ko-Faktoren beteiligt, deren Zusammensetzung zur Entscheidung über die Art der Beeinflussung des Gens beiträgt. Es kann sowohl zu einer reprimierenden als auch aktivierenden Wirkung auf die Expression kommen (Liao *et al.* 2010; Chen *et al.* 2012; Huang und Li 2012; Salmanidis *et al.* 2014). Passend dazu wurden einige der in Abbildung 83 aufgeführten potenziellen Zielgene im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des *online* nutzbaren Programmes *microPIR2* ermittelt, welches mögliche Assoziationen einer mikroRNA mit der Promotorregion von Genen ermittelt (Piriyaongsa *et al.* 2014). Zu den Genen, die für die Entwicklung von Zellderivaten des ekto- bzw. mesodermalen Keimblattes von Bedeutung sind oder negativ auf Ausbildung, Erhalt und Funktion sich formierender Insulin-produzierender Zellen wirken und demnach durch einige der analysierten Pankreas-assoziierten miRs im Sinne einer Reprimierung reguliert werden können, gehören u.a. *SOX2*, *HUD*, *NSG1*, *NEUROD6*, *NPTN*, *TBX5*, *STAT2 / 3*, *SOX6* und *BHLHE22* (Abdelmohsen *et al.* 2010; Paraskevopoulou *et al.* 2013; Kaspi *et al.* 2014; Piriyaongsa *et al.* 2014; Dweep und Gretz 2015; EMBL-EBI Enright Lab 2015). Desweiteren ist im Zuge der Zielgen-Analysen unter Nutzung der erwähnten Datenbanken und Programme eine Beeinflussung zahlreicher Proteine denkbar, die zur Ausbildung epigenetischer Modifikationen beitragen, was sowohl eine Aktivierung als auch Inhibierung einschließen kann. Im Zuge der schrittweisen Festlegung pluripotenter Zellen auf ein definitives und spezialisiertes pankreatisches Zellschicksal müssen zahlreiche Gene in ihrer Aktivität reguliert werden, was u.a. durch epigenetische Markierungen im Sinne von DNA-Methylierungen, aber auch Histonmodifikationen erreicht werden kann (Wu und Sun 2006; Zhang und Ho 2010; Avrahami und Kaestner 2012; Kraushaar und Zhao 2013). Zu den hierbei ermittelten potenziellen Zielgenen der analysierten mikroRNAs gehören *SUZ12*, *HDACs*, *EZH2*, *SETD4* und *SIRT1*. Ergänzend können auch Gene reguliert werden, die im späten Differenzierungsverlauf für die Ausbildung eines speziellen endokrinen Zelltyps von großer Bedeutung sind oder deren Aktivität für die Aufrechterhaltung der Funktion von Beta-Zellen im Sinne einer adäquaten und bedarfsgerechten Insulinfreisetzung in einer ausgewogenen Balance gehalten werden sollte. Zu diesen Genen gehören typische Alpha-Zell-Marker wie *ARX*, *CMAF* und *ZFPM2* sowie Gene, welche direkt oder indirekt die Expression von *INSULIN* oder letztlich dessen Produktion und Sekretion beeinflussen, wie z.B. *KLF11*, *CHREBP*, *TXNIP*, *MTPN* und *STXBP1* (Baroukh und van Obberghen 2009; Klein *et al.* 2013; Esguerra *et al.* 2011; Piriyaongsa *et al.* 2014). Die mikro-

RNA-375 gehört zu den am stärksten exprimierten miRs in pankreatischen Beta-Zellen, was sich in ihren vielfältigen Wirkungen auf Erhalt und Funktion dieses spezialisierten Zelltyps widerspiegelt (Poy *et al.* 2007; Poy *et al.* 2009; Latreille *et al.* 2015). Die Resultate zum Expressionsprofil dieser und weiterer Pankreas-assoziiertes mikroRNAs während der durchgeführten pankreatischen *in vitro* Differenzierung bestätigten deren wichtige Rolle, vor allem vor dem Hintergrund der Beeinflussung zahlreicher differenzierungsrelevanter Gene. Im Zuge der allerdings vermuteten Diskrepanz im Expressionsniveau zwischen den *in vivo* Gegebenheiten während der Beta-Zell-Entwicklung und der *in vitro* Situation, wurde zur Annäherung die transfektionsbasierte Induktion einer mikroRNA durchgeführt. Die Wahl von miR-375 erfolgte aufgrund ihrer herausragenden Bedeutung für die Beta-Zelle, wodurch die markantesten potenziellen Effekte erwartet wurden. Ergänzend mit einer weiteren Variation des Basis-Differenzierungsprotokolls, nämlich der zeitlich begrenzten Glukosestimulation der sich formierenden pankreatischen Vorläuferzellen, konnten auch positive Effekte auf die Transkriptmenge der mikroRNAs 30d und 124a ausgelöst werden, was auf die koordinativ vernetzte Regulation der einzelnen Effektoren hindeutet, welche die pankreatische Entwicklung forcieren.

Insgesamt kann aus den erhaltenen Resultaten geschlussfolgert werden, dass ein komplexes und aktuell noch nicht vollständig aufgeklärtes Netzwerk aus der Aktivität zahlreicher Pankreas-assoziiertes mikroRNAs und differenzierungsrelevanter Gene zur koordinierten *in vitro* Differenzierung Insulin-produzierender Zellen beiträgt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch die gezielte Modifikation zweier Einflussgrößen, nämlich mikroRNA-375 und dem Nährstoff Glukose, eine Verbesserung der Effizienz der einzelnen *in vitro* Differenzierungsetappen hin zu hormonproduzierenden endokrinen Zellen erzielt werden. Die großen Übereinstimmungen in den Resultaten der vergleichenden Differenzierung von hESZ und hiPSZ verdeutlichen das Potenzial der modifizierten Größen zur Beeinflussung grundlegender, zelllinienunabhängiger und differenzierungsrelevanter zellulärer Signalwege, die zu einer effektiveren und reproduzierbaren *in vitro* Formation Insulin-produzierender Zellen beitragen. Eine interessante Studie von Nathan *et al.* bestätigte zudem die herausragende Rolle von miR-375 in Bezug auf ihr Potenzial zur forcierten Ausbildung funktionaler Beta-Zellen. Längerfristig *in vitro* kultivierte humane Beta-Zellen verlieren zunehmend ihren charakteristischen Phänotyp sowie die Fähigkeit zur adäquaten Insulinsynthese und -freisetzung, was als Dedifferenzierung bezeichnet wird und mit einer Repression von miR-375 einhergeht. Die Resultate der erwähnten Studie zeigten, dass eine künstliche Induktion von nur einer mikroRNA, nämlich miR-375, in den Zellen zur erfolgreichen Redifferenzierung führte und so zum Erhalt des terminalen Differenzierungszustandes von Beta-Zellen beitragen kann (Nathan *et al.* 2015). Aus der Summe der durchgeführten Analysen folgte abschließend die Erkenntnis, dass die beobachteten positiven Effekte auf die Ausbildung Insulin-produzierender Zellen auf der Induktion von zellulären Signalwegen und Regulationsmechanismen beruhen, die mit den durchgeführten Protokollmodifikationen korrelierten und partiell synergistisch auf die Expression bedeutender Beta-Zell-assoziiertes Gene wirkten. Gleichzeitig zeigten sich auch induktive Effekte, die spezifisch nur je einer der Protokollmodulationen zuzuordnen waren und damit unabhängig über parallel verlaufende signalübertragende Mechanismen agierten. Daher ergaben sich nicht für alle der analysierten Faktoren additive bzw. synergistische Effekte bei kombinierter Anwendung der Variationen des Basis-Differenzierungsprotokolls. Für ein tieferes Verständnis der zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen ist die sichere Identifizierung von potenziellen Zielgenen der zahlreichen regulativ in den Differenzierungs-

verlauf eingreifenden mikroRNAs bedeutsam. Ausblickend sind daher eine Reihe weiterführender Studien denkbar. Für eine umfassende experimentelle Analyse potenzieller Zielgene zur Bestätigung der über bioinformatisch-basierte Programme getroffenen Vorhersagen, bieten sich umfassende Sequenzierstudien an. Dabei erscheint die Methode des HITS-CLIP (*cross-linking immunoprecipitation-high-throughput sequencing*) als geeignet. Mittels Immunpräzipitation können so unter Nutzung eines geeigneten Antikörpers gegen eine Komponente des funktionalen mikroRNA-Wirkkomplexes alle zu einem bestimmten Zeitpunkt bzw. zellulären Entwicklungszustand vorhandenen miR-mRNA-Komplexe ausgefällt und nachfolgend die Identität der Zielgene mittels Sequenzierungen bestimmt werden (Chi *et al.* 2009; Zhang und Darnell 2011). Zur Validierung der somit erzeugten großen Datenmenge könnten sich gezielte qPCR-basierte Untersuchungen einzelner, in Bezug auf die Relevanz während der *in vitro* Differenzierung als besonders interessant ermittelter, miR-mRNA-Assoziationen anschließen. Dabei sollte der Fokus auf potenziell messbaren Unterschieden zwischen den experimentellen Gruppen liegen, die zum Teil neben der gerichteten Differenzierung nach dem etablierten Basisprotokoll zusätzlich den beschriebenen Modifikationen unterworfen waren. Die weitere Anpassung der durchgeführten Protokollmodulationen, die neben der kurzfristigen Glukosestimulation und der transfektionsbasierten Induktion von miR-375 auch die Kombination beider Varianten umfassten, kann ausblickend zur Optimierung der Differenzierungseffizienz beitragen. Hierbei sollten vor allem Studien zur möglichst idealen Wahl von eingesetzter Konzentration, Dauer und dem Zeitfenster der Glukosestimulation und Transfektion von miR-375-Molekülen realisiert werden. Neben der großen Übereinstimmung der Resultate innerhalb der analysierten Proben der hESZ-Linie HUES-8 und der hiPSZ-Linie IMR90-4, was das grundsätzlich hohe Potenzial der modulierten Einflussfaktoren zur Verbesserung der Differenzierungseffizienz aufzeigte, waren individuelle Unterschiede in Reaktionsfähigkeit und dem idealen Reaktionszeitfenster zwischen den verschiedenen Zelllinien vorhanden, was zukünftig eine spezifische Abstimmung der Protokollvariationen zur Erzielung maximal positiver Effekte in Bezug auf das Differenzierungsvermögen in Richtung Insulin-produzierende Zellen als Optimierungsmaßnahme markiert. Ergänzend zum starken positiven Einfluss der Induktion von miR-375 in pankreatischen und endokrinen Vorläuferzellen wären additive transfektionsbasierte Induktionen weiterer Pankreas-assoziiierter mikroRNAs vorstellbar, um eventuell synergistisch steigernde Wirkungen auf die *in vitro* Differenzierungseffizienz zu untersuchen. Zusätzlich ist eine Erweiterung der Protokollmodifikationen im Sinne eines möglichst optimalen Angebotes an Nährstoffen im Differenzierungsverlauf denkbar. Neben der bedeutenden Rolle von Glukose im Entwicklungsprozess Insulin-produzierender Zellen, könnten positive Effekte im Rahmen einer Verbesserung der Verfügbarkeit von Aminosäuren und Fettsäuren analysiert werden. Auch diese Faktoren beeinflussen die Entstehung und Funktion von Beta-Zellen (Itoh *et al.* 2003; Newsholme *et al.* 2006; Oh 2015). Zur detaillierten Funktionsprüfung der, im Rahmen der durchgeführten Modifikationen erhaltenen, Insulin-produzierenden Zellen sollten ausblickend auch Analysen zur GSIS durchgeführt werden. Dabei kann ermittelt werden, ob die Zellderivate nur eine basal erhöhte Insulinproduktion aufweisen, oder ob nach Stimulation mit entsprechenden Agenzien eine induzierbare adäquate Insulinsekretion auslösbar ist (Baetge 2008; Shao *et al.* 2009). Die nach aktuellem Stand der Forschung *in vitro* formierbaren Insulin-produzierenden Zellen können allerdings noch nicht als terminal differenziert und vollumfassend funktional bezeichnet werden, was sich u.a. an der Synthese weiterer Hormone und der nicht den physiologischen Bedingungen entsprechenden Stärke der Insulinsekretion

zeigt (Hrvatin *et al.* 2014). *In vivo* Studien demonstrieren allerdings, dass die differenzierten Zellen durchaus das Potenzial zur Reifung in funktionale Beta-Zellen besitzen, denn nach Transplantation in immundefiziente, diabetische Mäuse konnte eine autonome und korrekte Regulation des Blutzuckerspiegels für einige Wochen durch Analyse des humanen C-PEPTID-Gehalts bestätigt werden (Kroon *et al.* 2008; Rezania *et al.* 2012; Bruin *et al.* 2013; Rezania *et al.* 2014; Pellegrini *et al.* 2015). Ein interessanter experimenteller Ansatz wäre vor diesem Hintergrund die Analyse von Unterschieden im Reifungspotenzial, die im Rahmen der durchgeführten Protokollmodifikationen zur verbesserten *in vitro* Differenzierung der Insulin-produzierenden Zellen bei einer anschließenden Transplantation in immundefiziente, diabetische Mäuse auftreten könnten. Die beschriebenen *in vivo* Experimente verweisen zudem auf noch bestehende Schwachstellen der aktuellen *in vitro* Differenzierungsansätze. Während ihrer *in vivo* Reifung innerhalb der dreidimensionalen Struktur der Langerhans'schen Insel sind die Beta-Zellen zahlreichen Wechselwirkungen mit benachbarten Zelltypen ausgesetzt. Diese umfassen einen Signalaustausch über direkte Zell-Zell-Kontakte und diffusible Moleküle, zu denen z.B. auch sekretierte mikroRNAs gehören können (Guay und Regazzi 2013; Nikolova *et al.* 2006; Chen *et al.* 2012). Zahlreiche Forschungsansätze beschäftigen sich daher mit einer Optimierung der *in vitro* Differenzierungsbedingungen mittels Ko-Kulturen innerhalb von dreidimensionalen Gerüststrukturen verschiedener Materialien, wie natürliche Kollagenmatrizes oder synthetisch erzeugte poröse Schwammstrukturen (Levenberg *et al.* 2003; Dawson *et al.* 2008, Mirmalek-Sani *et al.* 2013). Positive Effekte auf die *in vitro* Differenzierungseffizienz durch Ko-Kultur mit verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, konnten bereits bestätigt werden und erlauben die Hoffnung auf eine effizientere Reifung Insulin-produzierender Zellen innerhalb von Gerüststrukturen unter Anwesenheit von Endothelzellen und weiterer Zelltypen des Pankreas (Lammert *et al.* 2001; Nikolova *et al.* 2006; Talavera-Adame *et al.* 2011; Pagliuca und Melton 2013). Zusätzlich zur optimalen Nachbildung der physiologischen Umgebung ist allerdings auch ein tieferes Verständnis für die zugrunde liegenden differenzierungsrelevanten Signalwege und Regulationsmechanismen nötig, die den sukzessiven Durchtritt der sich entwickelnden Zellen durch die einzelnen *in vitro* Differenzierungsetappen steuern und so ebenfalls zur Nachahmung der *in vivo* Pankreasentwicklung beitragen. Mit der erfolgreichen Identifizierung von potenten Einflussgrößen wie miR-375 und dem Nährstoff Glukose auf den Erfolg der *in vitro* Differenzierung und der daraus resultierten gezielten Modulation dieser Faktoren zur Annäherung an die *in vivo* bestehenden Entwicklungsbedingungen, konnte mit der vorliegenden Arbeit ein wichtiger Beitrag zur Charakterisierung einzelner *in vitro* Differenzierungsetappen geleistet werden. Mit den erzielten Ergebnissen war es möglich zu demonstrieren, dass über die induzierten zellulären Signalwege, die sich in ihrer Wirkung ergänzten und teilweise synergistisch verstärkten, eine verbesserte Differenzierungseffizienz Insulin-produzierender Zellen erzielbar war. Die vergleichende Nutzung von hESZ und hIPSZ verdeutlichte dabei zum einen das gute Potenzial beider Zellmodelle zur pankreatischen Differenzierung, was in Bezug auf zukünftige klinische Anwendungen besonders interessant erscheint und zum anderen die Allgemeingültigkeit der zelllinienunabhängigen positiven Wirkungen von Glukosestimulation und transfektionsbasierter Induktion von miR-375. Damit ist eine Nutzung dieser Protokollerweiterungen als grundsätzliche Optimierungsmethode der verschiedenen aktuell etablierten *in vitro* Differenzierungsprotokolle denkbar. Dies könnte dem Trend publizierter Protokolle entgegen wirken, die aktuell noch durch ein deutliches Absinken der Effektivität während des sukzessiven Durchtritts aufeinander folgendender *in*

in vitro Differenzierungsetappe gekennzeichnet sind (D'Amour *et al.* 2006; Kroon *et al.* 2008; Basford *et al.* 2012; Hrvatin *et al.* 2014; Abdelalim und Emara 2015). Ausblickend erscheint eine Kombination aus umfassender Grundlagenforschung an den potenten Zellmodellen der hESZ und hiPSZ zur detaillierten Aufklärung entwicklungssteuernder, zellulärer Effektoren und Signalwege und der folgenden Imitation dieser Mechanismen im Rahmen der pankreatischen *in vitro* Differenzierung Insulin-produzierender Zellen gemeinsam mit der Weiterentwicklung organotypischer, dreidimensionaler und mit Ko-Kulturen assoziierter *in vitro* Inkubationssysteme während des Differenzierungsverlaufs als sinnvolle Arbeit auf dem Weg zur optimalen, sicheren und reproduzierbaren *in vitro* Erzeugung Insulin-produzierender Zellen. Ergänzend können Aufreinigungsverfahren die Anreicherung von differenzierten, zukünftig klinisch nutzbaren Progenitorzellen unterstützen. Interessante Studien verweisen dabei zudem auf die Möglichkeit zur Separation des gewünschten Zelltyps über neu charakterisierte spezifische Oberflächenmarker bzw. mikroRNAs (Dorrell *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2011; Kelly *et al.* 2011; Miki *et al.* 2015).

Die Forschung an biokompatiblen Hüllen zur Einbettung der so zu erhaltenden transplantablen Zellen stellt einen weiteren spannenden Aspekt auf dem Weg zu einer neuen Behandlungsmöglichkeit von Diabetes mellitus dar. Zum einen müssen die transplantierten Progenitorzellen vor eventuell schädigenden Wirkungen des Empfänger-Immunsystems geschützt und gleichzeitig der Anschluss an versorgende Gefäße und damit essentielle Nährstoffe ermöglicht werden. Zum anderen muss die sichere Integration der Zellen an eine gewählte Position sichergestellt werden, ohne dass Einzelzellen unkontrolliert migrieren können, was aufgrund der dann unkontrollierbaren Einwirkungen auf die Zellen über Signale aus umgebenden Geweben das Wohl des Patienten bedrohen kann. Die in Kürze zu erwartenden ersten Ergebnisse einer amerikanischen Studie zur Transplantation von *in vitro* generierten Vorläuferzellen innerhalb eines entwickelten Gerüstsystems in Probanden mit Diabetes Typ1 sollten daher mit Aufmerksamkeit verfolgt werden in Bezug auf den Forschungsaspekt zur Material-basierten Optimierung einer sicheren klinischen Anwendung. Bei der Einordnung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zur Verbesserung der pankreatischen *in vitro* Differenzierungseffizienz kann schlussfolgernd festgehalten werden, dass die ermittelten positiven Resultate in Folge der gezielten Modulation zweier Größen, die grundsätzlich für eine erfolgreiche Entwicklung von Beta-Zellen von großer Bedeutung sind, als Annäherung an die *in vivo* vorherrschenden Bedingungen gewertet werden können. Damit war unter Verzicht auf den Einsatz zahlreicher, meist unvollständig charakterisierter Chemikalien nur mittels Optimierung der Signalwege und Regulationsmechanismen, welche u.a. über Glukose und miR-375 gesteuert werden, eine effizientere *in vitro* Formation Insulin-produzierender Zellen möglich. Die beschriebenen Wirkungen sind dem Bereich der Grundlagenforschung zuzuordnen, was den ersten essentiellen Punkt der langen Reihe aus den oben beschriebenen Aspekten darstellt, die in Kombination zur Nutzung der generierten Zellerivate im Rahmen klinischer Therapieansätze beitragen können. Die umfassende Charakterisierung und das damit einhergehende tiefe Verständnis der zellulären Signalwege, die zur erfolgreichen, reproduzierbaren, zelllinienunabhängigen und vor allem sicheren *in vitro* Herstellung Insulin-produzierender Zellen beitragen, sind dabei als fundamentale Voraussetzung für alle weiterführenden Forschungsbereiche zur Etablierung geeigneter Transplantationsbedingungen anzusehen und verdeutlichen den Beitrag der vorliegenden Dissertation im Zuge der Identifikation und erfolgreichen Modifizierung differenzierungsrelevanter Größen.

4.3 Bedeutung der miR-375 während der Differenzierung entodermaler Vorläuferzellen

Die bedeutende Rolle von mikroRNA-375 bei der Formierung und dem funktionalen Erhalt reifer Beta-Zellen konnte, wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, durch *in vivo* Studien und mit Hilfe der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zur vergleichenden *in vitro* Differenzierung humaner ESZ und iPSZ in Insulin-produzierende Zellen erfolgreich belegt und bestätigt werden. Interessanterweise zeigen zahlreiche aktuelle Publikationen, die sich mit einer umfassenden Charakterisierung des mikroRNA-Profiles pluripotenter Stammzellen im Zuge früher Differenzierungsetappen in Richtung der drei Keimblattderivate beschäftigen bzw. speziell mit der forcierten pankreatischen oder hepatischen *in vitro* Differenzierung, dass es eine direkte und zelllinienunabhängige Korrelation zwischen der Bildung entodermaler Vorläuferzellen und einer auf diesen Entwicklungsprozess begrenzte starke Expression von miR-375 gibt (Chen und Verfaillie 2014; Hinton *et al.* 2014; Fogel *et al.* 2015; Francis *et al.* 2015). Diese Beobachtung konnte auch im Rahmen dieser Dissertation experimentell in humanen ESZ und iPSZ bestätigt werden, was die Schlussfolgerung erlaubt, dass die miR-375 als charakterisierender Marker für *in vitro* differenzierte entodermale Zellen ergänzend zur Analyse der Expression und Translation stadienspezifischer Gene einsetzbar ist.

Vorausgegangene Experimente an murinen ESZ innerhalb unserer Arbeitsgruppe ergaben eine weitere markante Korrelation, denn bei *in vitro* Differenzierungsversuchen mit geringer Effizienz in Bezug auf die Formierung entodermaler Vorläuferzellen, was mit einem deutlich schwächeren Expressionsanstieg der markierenden Gene *SOX17* und *FOXA2* einherging, fehlte ebenso die starke Induktion der miR-375 in dieser zellulären Entwicklungsphase (Kuhn 2011). Zusammenfassend lassen die erhobenen Daten somit auf eine wichtige Rolle der mikroRNA-375 auch zu einem sehr frühen Zeitpunkt der pankreatischen Differenzierung, nämlich der Festlegung der pluripotenten Zellen auf eine entodermale Entwicklungsrichtung, schließen. Da die entodermale Differenzierung in den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten humanen ESZ-Linien äußerst effektiv und reproduzierbar verlief, was sich in der stets korrelierenden starken Expression von miR-375 zeigte, musste zur Analyse der Bedeutung dieser miR für den *in vitro* Differenzierungsschritt ihre Expression künstlich modifiziert werden. Als aussagekräftige Option ergab sich dafür die gezielte Repression der Expression mittels spezifischem miR-375-Inhibitor verbunden mit der Untersuchung des Einflusses auf die Transkriptmenge der entodermal-assoziierten Gene *SOX17* und *FOXA2*.

4.3.1 Inhibitor-gesteuerte Repression der miR-375-Expression während der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen

Die Analyse der Effizienz zur Einschleusung kurzer RNA-Moleküle erfolgte, wie in Kapitel 3.5.1 vorgestellt, mittels durchflusszytometrischer Untersuchung. Die gewählte Methode bzw. Reagenz zur liposomalen Transfektion stellte sich schlussfolgernd als geeignet heraus, da insgesamt zwischen 70 - 90 % der verwendeten hESZ erfolgreich transfiziert werden konnten. Da die zur Repression der miR-375 eingesetzten Inhibitormoleküle in ihrer Struktur den im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse eingesetzten Fluorochrom-gekoppelten Negativ-siRNA-Molekülen entsprachen, konnte eine Übertragbarkeit der detektierten Effizienz angenommen werden. Nach der Transfektion der hESZ

mit dem spezifischen miR-375 Inhibitor ergab die relative Quantifizierung der Expression von miR-375 nach 72h ungefähr eine Halbierung, wobei der Effekt in den Zellen der Linie H9 mit ca. 60 % etwas stärker ausfiel als in den Zellen der Linie HUES-8 mit ca. 40 %. Damit lag die gemessene Repression im Rahmen der Erwartungen, denn entgegen anderen Methoden zur Stilllegung eines Gens, wie z.B. einem kompletten genetisch determinierten *Knockout*, beruhte die Wirkung des mittels Lipofektion in die Zellen eingebrachten einzelsträngigen Inhibitors auf der spezifischen Bindung und damit funktionellen Inaktivierung der mikroRNA (Kobayashi *et al.* 2012; Stenvang *et al.* 2012; Thomson *et al.* 2013). Es wurden somit konkurrierende Moleküle transfiziert, was die Wahrscheinlichkeit der Bindung zwischen mikroRNA und entsprechenden Ziel-mRNAs herabsetzte. Neben der starken Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyps bzw. der Zelllinie, wird die Effizienz der chemisch basierten Lipofektion, welche auf der elektrostatischen Wechselwirkung der negativ geladenen RNA mit den eingesetzten kationischen Lipiden beruht, auch von weiteren Größen wie den vorhandenen Medienkomponenten, dem gewählten Verhältnis aus Transfektionsreagenz zu RNA-Molekülen und dem individuellen zellulären Potenzial zur endozytotischen Aufnahme der Partikel bzw. der effektiven Freisetzung im Zellinneren bestimmt (Schurig 2008; Shim *et al.* 2013). Die Anwesenheit von tierischem Serum im Kulturmedium der Zellen kann durch unerwünschte Wechselwirkungen mit den gebildeten Lipidkomplexen zur Verringerung der Transfektionseffizienz führen (Felgner *et al.* 1987; Groth 2000). Dieser Effekt konnte allerdings in den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente weitgehend minimiert werden, da in den ersten Tagen des *in vitro* Differenzierungsprozesses der Anteil an Serum sehr gering war und zudem die eingesetzte Transfektionsreagenz laut Herstellerangaben unter Anwesenheit von Serum genutzt werden kann. Dies wird durch gezielte Modifikation der Lipidstrukturen mit weiteren, dem Firmengeheimnis unterliegenden, Komponenten erreicht. Das korrekte Verhältnis von zu transportierender RNA und Transfektionsreagenz stellt einen weiteren bedeutenden Einflussfaktor dar, denn es beeinflusst die Ladung der formierten Komplexe. Ein Überschuss an RNA resultiert in einer negativen Gesamtladung und der Bildung kleinerer Komplexe, während sich bei steigender Lipidkonzentration bis zu einem nahezu ausgeglichenen Verhältnis mit fast neutraler Ladung größere Strukturen bilden. Für eine effiziente Aufnahme sind neutrale bis leicht positiv geladene Komplexe aufgrund des Aufbaus der Zellmembran besonders geeignet, wobei experimentell auch eine heterogene Mischung von Komplexen verschiedener Größen als erfolgreiche Variante bestätigt wurde (Zabner *et al.* 1995; Rädler *et al.* 1997; Groth 2000). Die Einstellung eines optimalen Mengenverhältnisses zwischen endogen vorhandenen miR-375-Molekülen und transfizierten Inhibitormolekülen ist ebenso bedeutend, da anderenfalls nur eine partielle Funktionsminderung der miR erzielt werden kann. Die Einschleusung exogener Moleküle in Kombination mit dem Stress-induzierenden Vorgang der Transfektion selbst, kann allerdings zu unerwünschten Nebeneffekten führen, die sich in einer gestörten *in vitro* Differenzierung bis hin zur Apoptose der Zellen äußern können. Die Abwägung einer optimalen Balance zwischen ausreichend hoher Dosierung von transfizierten Inhibitormolekülen zur Auslösung messbarer Effekte in Bezug auf Expressionsveränderungen und der Aufrechterhaltung einer ungestörten effizienten Entwicklung analysierbarer Mengen entodermaler Zellen stellte somit eine große Herausforderung dar. Bei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentration an Inhibitormolekülen bzw. der gewählten Transfektionsreagenz, die den Empfehlungen des Herstellers zur schonenden und gleichzeitig erfolgreichen Transfektionen besonders sensibler Zelltypen wie pluripotenten Stammzellen folgte, konnte mit

einer ungefähren Halbierung der Expression von miR-375 in entodermalen Vorläuferzellen ohne erhöhte apoptotische Vorgänge, was durch tägliche mikroskopische Beobachtung des Morphologiewandels kontrolliert wurde, von einem ausbalancierten und für die gewünschten Expressionsanalysen nutzbaren Ergebnis ausgegangen werden. Beide eingesetzte humane ESZ-Linien zeigten übereinstimmend ein großes Potenzial zur liposomal-basierten endozytotischen Aufnahme von kleinen RNA-Molekülen. Für eine noch umfassendere Repression der miR-375 im Zeitfenster der Formierung entodermaler Vorläuferzellen sind ausblickend umfangreiche Titrationsversuche zur Erfassung der optimalen transfizierbaren Konzentration an spezifischen Inhibitormolekülen denkbar, um die Wirkung der in dieser zellulären Entwicklungsetappe hoch aktiven miR-375 noch deutlicher zu inhibieren. Dabei sollte allerdings sowohl der limitierende Faktor des funktionalen Verhältnisses aus Inhibitormolekülen und Transfektionsreagenz zur Bildung optimaler Komplexe beachtet werden, als auch die zunehmende Stress-induzierende Belastung der Zellen im Umgang mit hochkonzentriert eingeschleuften exogenen Molekülen. Die Nutzung anderer Transfektionsmethoden, wie z.B. der allgemein sehr effektiven Elektroporation, bei der im Zuge einer kurzzeitig erzeugten Membranpermeabilität freie RNA-Moleküle ins Zellinnere gelangen können, stellte aufgrund des experimentellen Versuchsaufbaus keine nutzbare Alternative dar. Die Kultur der entodermal differenzierenden Zellen erfolgte adhärent in Form eines *Monolayers*. Die Überführung in eine für die Elektroporation notwendige Zellsuspension würde die kurzzeitige Ablösung der Zellen und damit verbundene Trennung interzellulärer Kontakte bedeuten. Eine Unterbrechung des adhärenen Wachstums während verschiedenen Etappen des *in vitro* Differenzierungsprozesses konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe allerdings bereits als sehr negative Einflussgröße auf die weitere Differenzierungseffizienz beobachtet werden, da anhand mikroskopischer Analysen der Zellmorphologie Formierungen detektiert wurden, die von den sukzessiven, stadiotypischen Morphologieveränderungen im Differenzierungsverlauf stark abwichen. Die folgende Grafik fasst die Summe der detektierten Auswirkungen einer Inhibitor-vermittelten Repression von miR-375, die im Einzelnen in Kapitel 3.5.1 erläutert wurden, noch einmal zusammen.

		miR-375 Inhibitor	
Expressionsänderung von:		ESZ-Linie H9	ESZ-Linie HUES-8
	miR-375	↓* (um ca. 50 %)	↓* (um ca. 30 %)
	SOX17	↓* (um ca. 42 %)	↓ (Trend)
	FOXA2	↓* (um ca. 60 %)	↓* (um ca. 65 %)

Abb. 84: Zusammenstellung der Effekte einer Transfektion von Inhibitormolekülen in pluripotente embryonale Stammzellen der Linien H9 und HUES-8 zum Beginn der entodermalen *in vitro* Differenzierung. Potenzielle Veränderungen im Expressionsniveau der entodermalen Marker miR-375, SOX17 und FOXA2 wurden am dritten Tag der Entwicklung mittels qPCR analysiert. Die Ergebnisse stehen im Vergleich zu Daten, die aus Proben gerichtet differenzierter Zellen gewonnen wurden, welche keiner Transfektion unterlagen. *p ≤ 0,05.

Die Ergebnisse zur Inhibitor-basierten Repression von miR-375 in generierten entodermalen Vorläuferzellen zeigten in beiden eingesetzten hESZ-Linien grundsätzlich große Übereinstimmungen. Die Expression von miR-375 konnte erfolgreich reprimiert werden, was wiederum mit einer verminderten Transkriptmenge der entodermal-assoziierten Gene *SOX17* und *FOXA2* korrelierte. Das Ausmaß der Repression war hierbei im Vergleich beider Linien sehr ähnlich, wobei insgesamt eine stärkere Reduktion in Bezug auf *FOXA2* detektiert werden konnte. Die Expression von *SOX17* war in den Inhibitor-transfizierten Zellen der Linie H9 um ca. 42 % reprimiert, was eine große Übereinstimmung zur detektierten Reduktion um ca. 40 % in den Zellen der Linie HUES-8 darstellte. Diese moderate Repression steht im Einklang mit Studien, aus denen hervorgeht, dass der Einfluss von mikroRNAs grundsätzlich eher zur Feinabstimmung der Aktivität und damit verbunden der Proteinsynthese der entsprechenden Zielgene dient (Baek et al. 2008). Daraus ist zu schließen, dass eine miR-Repression wiederum nur mit einer gemäßigten Reaktion auf assoziierte Gene einhergehen wird. Zusätzlich ist von weiteren, teilweise noch unbekanntem Effektoren und Signalwegen auszugehen, die neben mikroRNAs zur Regulation der Differenzierungsmarker beitragen. Die Beobachtungen zur Repression von *SOX17* konnten aufgrund starker Schwankungen der ermittelten Daten zum Grad der Verminderung innerhalb der unabhängig durchgeführten Versuchswiederholungen allerdings in den Zellen der Linie HUES-8 nicht als signifikante Reduktion bewertet werden. Schlussfolgernd bestätigten die experimentell generierten Ergebnisse in zwei verschiedenen humanen ESZ-Linien die Vermutung, dass der starken Expression von miR-375 während der entodermalen *in vitro* Differenzierung eine funktionale Rolle bei der effektiven Ausbildung dieser Vorläuferzellen und damit dem Ausgangsmaterial für eine anschließende pankreatische Weiterentwicklung zu Grunde liegt. Da aktuell keine publizierten Daten zu validierten Zielgenen von miR-375 in der entodermalen Differenzierungsphase vorliegen, sind die regulatorischen Mechanismen und Signalwege, die von der mikroRNA beeinflusst werden und zur Festlegung der pluripotenten Zellen auf ein entodermales Zellschicksal führen, weitgehend unbekannt. Die folgende Grafik bietet eine Übersicht zu möglichen Faktoren bzw. Signalübertragungsrouten, die potenziell zur Aktivierung von miR-375 beitragen und nachfolgend die pro-entodermale Wirkung der mikroRNA vermitteln können.

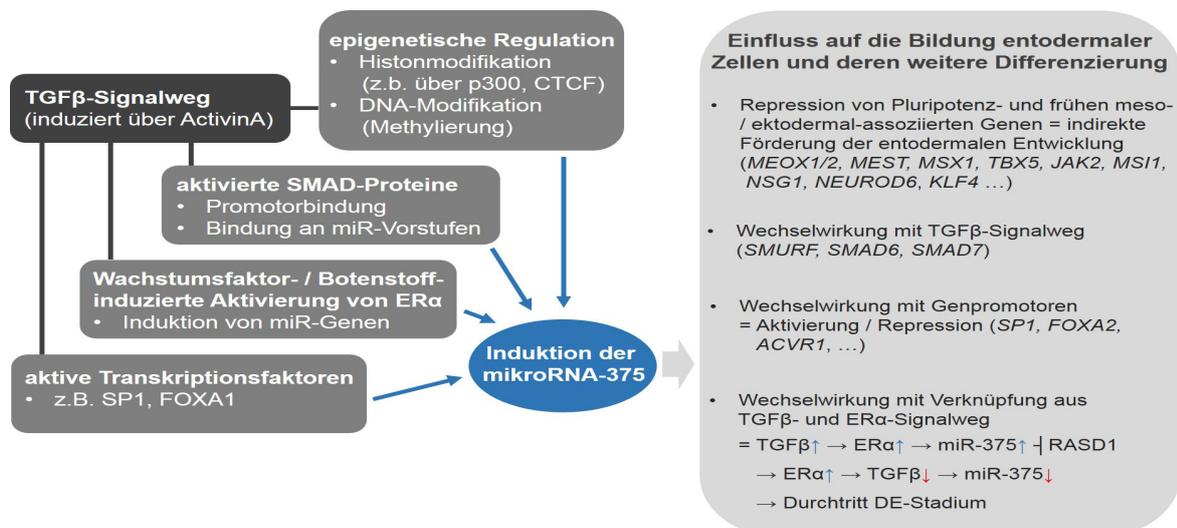


Abb. 85: Zusammenstellung potenzieller Mechanismen, die zur Aktivierung von miR-375 im Rahmen der gerichteten entodermalen *in vitro* Differenzierung bzw. zur Vermittlung der miR-induzierten Effekte beitragen können.

Die Hypothesen zur Erstellung der abgebildeten Interaktionsmechanismen ergaben sich aus umfangreichen Literaturrecherchen zur Induzierbarkeit und Wirkungsvermittlung von mikroRNAs, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert werden. Zusätzlich erfolgte der Einsatz zahlreicher *online*-Datenbanken wie *miRTar*, *DIANA-microT*, *miRWalk 2.0* und *microcosm* zur Erfassung und Bewertung potenzieller Zielgene von miR-375, deren Expression im Kontext zu bedeutenden Regulationsmechanismen der frühen *in vitro* Differenzierung, d.h. Spezifizierung von Keimblattderivaten und speziell der entodermalen Entwicklung steht (Hsu *et al.* 2011; Paraskevopoulou *et al.* 2013; Dweep und Gretz 2015; EMBL-EBI Enright Lab 2015). Ergänzend konnten über die Nutzung von Datenbanken, die zur Bereitstellung von Promotorsequenzen eukaryotischer Gene dienen und dem Einsatz dieser Sequenzen in *online* nutzbaren Registern zur Ermittlung von spezifischen TKF- und miR-Bindestellen, Vermutungen zur gegenseitigen Regulation von entodermal-assoziierten Genen und der mikroRNA-375 formuliert werden (Farre *et al.* 2003; Daily *et al.* 2012; Piriyaopongsa *et al.* 2014; Yang *et al.* 2013; Dreos *et al.* 2015). Basierend auf den recherchierten Daten konnten die bei der Zugabe von ActivinA zur Induktion einer gerichteten Differenzierung pluripotenter Stammzellen in die endotermale Entwicklungsrichtung aktivierten Regulationsmechanismen, die vor allem über den TGFbeta-Signalweg mediiert wurden, als eine potenzielle Ursache für die Aktivierung von miR-375 neben anderen entodermal-assoziierten Markern betrachtet werden.

Pluripotente Stammzellen zeichnen sich durch die Aktivität eines Netzwerkes an TKF und mikroRNAs aus, die sich gegenseitig regulieren und zum Erhalt des undifferenzierten Zustandes beitragen. Zusätzlich weisen die Zellen einen sehr „offenen“ Chromatinstatus und damit ein sehr aktives Transkriptom auf, was das umfassende Entwicklungspotenzial bestätigt. Die Aktivität entwicklungsforcierender Gene wird über verschiedene epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung an CpG-Inseln oder Histonmodifikationen, wie z.B. Methylierung und Acetylierung in einem pausierten Zustand gehalten, kann aber bei Induktion von Differenzierungsvorgängen gezielt aktiviert werden, was zur gerichteten Entwicklung in einen bestimmten spezialisierten Zelltyp beiträgt. Gleichzeitig kommt es mit dem Einsetzen von Differenzierungsprozessen zu reprimierenden Modifikationen, die zur Stilllegung Pluripotenz-assoziiierter Gene führen (Schuettengruber und Cavalli 2009; Kraushaar und Zhao 2013; Chen und Dent 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die gerichtete pankreatische Differenzierung humaner ESZ und iPSZ im ersten Schritt mittels Zugabe von ActivinA ins Differenzierungsmedium induziert, was zur Formierung definitiv entodermaler Vorläuferzellen führte. Im Zuge der während dieser zellulären Umstrukturierung auftretenden epigenetischen Modulationen, sind auch direkte Einflüsse auf die Aktivität von miR-375 denkbar. Das mikroRNA-Gen besitzt einen eigenen regulierbaren Promotor, dessen Sequenz zwei CpG-Inseln aufweist, womit eine Regulation der Aktivität über den Methylierungsgrad möglich ist (Deaton und Bird 2011; Yan *et al.* 2014). Die Induktion der entodermalen Differenzierung wird vermittelt über den durch ActivinA induzierten TGFbeta-Signalweg. In dessen Folge kommt es zur Aktivierung von SMAD-Proteinen, die aufgrund ihrer DNA-Bindefähigkeit als Transkriptionsaktivatoren wirken. Sie können weitere aktivierende Ko-Faktoren, wie z.B. die Histonacetyltransferase (HAT) p300 rekrutieren, die expressionsfördernde Histonmodifikationen vermittelt (Gaarenstroom und Hill 2014). Die oben erwähnten Datenbankenrecherchen zeigten, dass in der Promotorregion von miR-375 sowohl potenzielle Bindestellen für die SMAD-Proteine SMAD2, SMAD3 und SMAD4, als auch für den Ko-Aktivator p300 existieren. Die SMAD-Proteine sorgen mit der Aktivierung von zunächst frühen mesentodermal-assozii-

ierten Genen, wie *BRACHYURY*, *MIXL1* und *EOMES*, die wiederum als Transkriptionsaktivatoren von entodermalen Genen wie *FOXA2* und *SOX17* wirken, für eine sukzessive Einengung des zellulären Entwicklungspotenzials und zur Festlegung auf ein definitiv entodermales Zellschicksal (Loh und Lim 2011; Gaarenstroom und Hill 2014). Ergänzend zu den SMAD-Proteinen können weitere TKF zur Aktivierung von miR-375 beitragen. Die Promotorregion enthält auch Bindungsstellen für den Faktor SP1, der während frühen zellulären Differenzierungsphasen sehr aktiv ist (Marin *et al.* 1997) und den Faktor FOXA1, welcher im Zuge der TGFbeta-vermittelten entodermalen Entwicklung aktiviert wird (Teo *et al.* 2011). Diese Erkenntnisse weisen auf eine direkte Korrelation zwischen der über TGFbeta-induzierte Signalwege und Effektoren forcierten entodermalen Entwicklung der pluripotenten Stammzellen und der gleichzeitig auftretenden Aktivierung von miR-375 hin. Es ist den Ergebnissen der Datenbankenanalysen folgend zu vermuten, dass die Promotorregion des miR-375 Gens Ziel einer Reihe der induzierten TKF ist und daher ihre starke Expression die Formierung entodermaler Vorläuferzellen begleitet. Interessante Studien legen eine weitere Wirkungsstrategie der SMAD-Proteine bei der Regulation von miR-375 nahe. Butz *et al.* beschrieben die Förderung eines Prozessierungsschrittes während der Reifung endogen produzierter mikroRNAs durch direkte Wechselwirkung von SMAD-Proteinen mit der Ribonuklease DROSHA (Butz *et al.* 2012). Es wird angenommen, dass die Bindung der SMAD-Proteine über eine entsprechende Erkennungssequenz innerhalb der *pri*-miR vermittelt wird, aber Studien zeigten auch, dass nicht alle der über den TGFbeta-Signalweg in der Prozessierung geförderten miRs diese Sequenz aufweisen, was auf alternative Vorgänge schließen lässt (Davis *et al.* 2010; Blahna und Hata 2012). Die mikroRNA-375 verfügt zwar nicht über die bereits etablierte Erkennungssequenz, aber es bleibt eine induzierende Wirkung über die TGFbeta-vermittelten Signale mittels (noch) unbekannter Bindungsoptionen der SMAD-Proteine denkbar.

Neben der Möglichkeit zur Aktivierung von miR-375 über die ActivinA-vermittelte Induktion des TGFbeta-Signalweges und der damit assoziierten Effektormoleküle, weisen auch Studien zum Estrogenrezeptor ERalpha auf eine potenziell induzierende Wirkung hin. Die ERalpha-vermittelten Signale dienen der Regulation von zellulären Entwicklungsvorgängen und wirken stimulierend auf Wachstum und Differenzierung. Die Aktivierung des zumeist im Zellkern lokalisierten Rezeptors ist begleitet von seiner Dimerisierung und Assoziation mit Ko-Faktoren. Es folgt die Bindung an die DNA innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz und die anschließende Induktion der Transkription. Neben der klassischen Aktivierung von ERalpha über Bindung eines hormonalen Liganden, sind auch Liganden-unabhängige Formen der Rezeptoraktivierung bekannt. Es kommt dabei durch Phosphorylierungsereignisse an verschiedenen Domänen zur Aktivierung des Rezeptors, welche durch Signalwege induziert werden, die wiederum über Wachstumsfaktor-Rezeptoren vermittelt werden (Kostelac 2004). Weitere aktivierende Moleküle sind cAMP und CYCLIN D1 (Aronica und Katzenellenbogen 1993; Zwijsen *et al.* 1997). Damit ist sowohl eine über den TGFbeta-Signalweg induzierte, als auch eine über das in der frühen Embryonalentwicklung in Epiblastzellen nachgewiesene CYCLIN D1 vermittelte Aktivierung von ERalpha in den sich differenzierenden ESZ und iPSZ vorstellbar (Wianny *et al.* 1998). Auch wenn aktuell noch keine veröffentlichten Daten zu experimentell bestätigten Aktivierungsprozessen von miR-375 im Rahmen der entodermalen *in vitro* Differenzierung existieren, legen die hiermit vorgestellten Mechanismen doch eine direkte Abhängigkeit der miR-Induktion von den ActivinA-induzierten Effektoren, die zum Großteil über den TGFbeta-Signalweg aktiviert werden, nahe. Zu klären bleibt die Frage nach den potenziellen

Funktionen, die mit Hilfe der starken Expression von miR-375 in dieser ersten entscheidenden Etappe der pankreatischen Differenzierung verwirklicht werden. In Bezug auf potenzielle Zielgene, die direkt mit der entodermalen Differenzierung in Verbindung gebracht werden können, liegen bisher keine experimentell bestätigten Studien vor. Die Abbildung 85 dient daher auch zur Erläuterung der Erkenntnisse aus den im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Literaturrecherchen, welche mit den Ergebnissen aus den erwähnten Datenbankanalysen abgeglichen wurden. Daraus ergaben sich eine Reihe potenzieller Wirkmechanismen der miR-375, die zum einen die effektive Ausbildung entodermaler Zellen unterstützen und gleichzeitig den Durchtritt der Zellen durch diese Entwicklungsphase ermöglichen, was die weitere Differenzierung in Richtung pankreatische Progenitorzellen erlaubt. Wie in Kapitel 1.4.1 ausführlich erläutert, besteht die klassische Wirkung von mikroRNAs in der Regulation ihrer Zielgene auf posttranskriptionaler Ebene. Durch spezifische Bindung an eine mRNA erfolgt deren Translationshemmung und letztlich der Abbau, was grundsätzlich zur Repression des Zielgenes führt. Die vergleichende Analyse der genannten *online*-Datenbanken zur Vorhersage von Zielgenen der miR-375 zeigt, dass einige der detektierten Gene eine wichtige Rolle während der frühen Keimblattdifferenzierung zur Ausbildung ekto- bzw. mesodermaler Zellerivate spielen. Die Aktivität dieser Gene sollte für eine effektive und selektive *in vitro* Differenzierung in entodermale Zellen reprimiert werden, was durch eine starke Expression von miR-375 in diesem Entwicklungsstadium unterstützt werden kann. Zu den ermittelten Zielgenen gehören u.a. *MEOX1* und *MEOX2*, *MEST*, *MSX1* und *TBX5*, die mit der Festlegung eines mesodermalen Zellschicksals assoziiert werden (Beqqali *et al.* 2006; Outten *et al.* 2011; Rajala *et al.* 2011; Kadota *et al.* 2012). Die Zielgene *NSG1*, *NEUROD6* und *KLF4* sind hingegen mit der frühen neuronalen Differenzierung assoziiert, wobei *KLF4* auch zu den Mitgliedern des sich gegenseitig aktivierenden Netzwerkes aus Pluripotenz-assoziierten Genen gehört und seine Inhibierung somit auch den Austritt der Zellen aus dem Stammzellstatus fördert (Andersson *et al.* 2006; Baxter *et al.* 2009; Qin und Zhang 2012; Wei *et al.* 2013). Zu den weiteren potenziellen Zielgenen von miR-375 gehören auch *SMAD6*, *SMAD7* und *SMURF*, womit eine direkte Wechselwirkung mit Signalvermittlern des TGFbeta-Weges möglich ist. Alle drei Faktoren üben inhibierende Funktionen auf die TGFbeta-assoziierte Signaltransduktion aus, indem die Aktivität induktiver SMAD-Proteine (*SMAD1/2/3/4/5* und 8) gehemmt wird. Damit ist über die Aktivierung von miR-375 während der entodermalen Differenzierung die Ausbildung einer Signalschleife zu vermuten, indem der Fortgang der gerichteten Differenzierung und damit die SMAD-vermittelte Aktivierung entodermal-assoziiierter Gene durch die gezielte Repression inhibierender Faktoren unterstützt wird.

Neben dem klassischen Weg der posttranskriptionalen Regulation konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass mikroRNAs auch im Zellkern vorkommen und direkt auf die Transkriptionsaktivität von Genen durch Wechselwirkungen mit der entsprechenden Promotorregion einwirken können (Liao *et al.* 2010; Salmanidis *et al.* 2014). Der Kernimport der miR-Moleküle kann dabei über IMPORTIN-8 erfolgen, wobei AGO-Proteine bei diesem Vorgang schon an der mikroRNA gebunden vorliegen können. Umfassende Chromatin-Immunpräzipitations- und Sequenzierungsexperimente konnten die Kernlokalisierung und Promotorassoziation vieler mikroRNAs in Verbindung mit den bekannten, in Kapitel 1.4.1 vorgestellten, Ko-Faktoren wie DICER, AGO-Proteine und GW182 bestätigen. Das Zusammenspiel dieser Faktoren ist auch für die Ausübung der klassischen miR-Funktionsweise im Zytoplasma (RISC) notwendig. Zu den Auswirkungen der Promotorbindung zählen sowohl die Aktivierung als auch Repres-

sion des spezifischen Zielgens, was entscheidend von der Rekrutierung weiterer Ko-Faktoren abhängt. Die Ausbildung aktivierender Histonmodifikationen bei gleichzeitiger Verdrängung reprimierender assoziierter Proteine kann zur verstärkten Anlagerung und Funktion der Polymerase II führen, während die Ausbildung reprimierender Histonmodifikationen, vermittelt über Polycomb-Proteine wie z.B. EZH2, zur Inhibierung des entsprechenden Zielgens beitragen (Huang und Li 2012; Matsui *et al.* 2013; Salmanidis *et al.* 2014). Zusätzlich konnten Studien aufzeigen, dass im Rahmen von RNA-DNA-Wechselwirkungen Methylierungen an Cytosin und damit *de novo* Methylierungen verursacht werden können, was sich ebenfalls auf die Transkriptionsaktivität der betroffenen Gene auswirkt (Matzke *et al.* 2004).

Eine interessante Hypothese von Chen *et al.* basiert auf der beobachteten Verteilung von verschiedenen mikroRNAs in den Zellkompartimenten Zytoplasma und Nukleus. Die Kernlokalisierung längerer mikroRNA-Moleküle war deutlich ausgeprägter, was zu der Annahme führte, dass bei der Bindung von AGO2 an längere mikroRNAs im Zytoplasma eine spezifische Strukturänderung stattfindet, die den Kerntransport des Komplexes begünstigt (Chen *et al.* 2012). Die mikroRNA-375 gehört mit 22 Basenpaaren zu den längeren mikroRNA-Molekülen, die typischerweise etwa 19 bis maximal 25 Basenpaare umfassen können (Kim 2005). Mit diesen Erkenntnissen harmoniert eine Studie von Liao *et al.*, in der mittels *deep-sequencing* Verfahren die subzelluläre Lokalisation hunderter mikroRNAs in verschiedenen Zelllinien verglichen wurde. Große Übereinstimmungen beim Vergleich der nuklearen und zytosolischen Fraktion weisen darauf hin, dass der Transport von miR-Molekülen zwischen den Kompartimenten als durchaus gewöhnlicher Mechanismus angesehen werden kann. Zu den analysierten mikroRNAs gehörte auch miR-375, deren nukleare im Vergleich zur zytosolischen Lokalisation in den untersuchten Zelllinien um das ca. 2,4-fache höher war (Liao *et al.* 2010). Auch wenn die exakte subzelluläre Verteilung der miR-375 sicherlich zelllinienabhängigen Schwankungen unterliegt, kann aus den aufgeführten Studienergebnissen jedoch geschlossen werden, dass im Rahmen der starken Expression von miR-375 während der entodermalen *in vitro* Differenzierung ihre Wirkungen nicht nur über den klassischen, im Zytosol verankerten Weg, sondern auch im Zuge einer möglichen Kernlokalisierung durch die Regulation der Expression spezifischer Zielgene vermittelt werden. Mit Hilfe des *online* verfügbaren Programms *microPIR2* zur Vorhersage spezifischer Bindungen von mikroRNAs an Promotorsequenzen, welche nicht nur auf die klassische Paarung über die *seed*-Sequenz begrenzt ist, sondern sich über die gesamte Länge der miR erstrecken können, war im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Erfassung einiger potenzieller Zielgene möglich, die in direkter Verbindung zu den zellulären entodermal-assoziierten Signalwegen stehen. Zu diesen Genen gehören der ActivinA-Rezeptor Typ I (*ACVR1*) sowie die für TKF kodierenden Gene *SP1* und *FOXA2* (Piriyapongsa *et al.* 2014). Da in Bezug auf die Promotorbindung eine direkte Regulierung der Zielgene möglich ist, die sowohl aktivierend als auch reprimierend ausfallen kann, ist eine über miR-375 vermittelte Förderung der entodermal-assoziierten Signalwege denkbar, aber auch eine nachfolgend einsetzende reprimierende Wirkung, welche den schon entodermal-festgelegten Zellen den Durchtritt durch diese Entwicklungsphase erlaubt. Die Repression der TGFbeta-assoziierten Effektoren kann dabei als notwendiger Schritt zur Ausprägung anderer Signalkaskaden, die eine effektive Forcierung des Zellschicksals auf die pankreatische Linie herbeiführen, betrachtet werden. Die im Rahmen der durchgeführten Inhibitor-vermittelten Repression von miR-375 detektierten deutlicher ausgeprägten inhibierenden Effekte auf die Expressionsrate von *FOXA2* im Vergleich zu *SOX17*, können durch die Option einer direkten Promotorbindung und

potenziellen Aktivierung dieses Gens durch miR-375 begründet werden. Zusätzlich lassen publizierte Daten zur Interaktion zwischen Komponenten des TGFbeta-Signalweges und der ERalpha-vermittelten zellulären Prozesse auf eine modulierende Wirkung von miR-375 schließen, die neben anfänglich unterstützenden Aspekten zur möglichst selektiven Formierung entodermaler Zellen, auch die Aufrechterhaltung des zellulären Potenzials zum Eintritt in folgende Differenzierungsetappen umfasst. Wie bereits erwähnt, kann die Aktivierung von ERalpha ligandenunabhängig erfolgen, wobei dafür in Bezug auf die frühe Phase der entodermalen *in vitro* Differenzierung pluripotenter Stammzellen vor allem über den TGFbeta-Rezeptor vermittelte, aber auch über CYCLIN D1 medierte Signale in Frage kommen. Eine Studie von Simonini *et al.* zeigte, dass ERalpha die Expression von miR-375 aktivieren kann und *RASD1* als eines der negativ regulierten miR-Zielgene bestätigt werden konnte. Da das Protein *RASD1* als Inhibitor von ERalpha wirkt, kommt es zur Formation einer Signalschleife, in der die aktivierte miR-375 zur Aufrechterhaltung der ERalpha-Aktivität und damit zu ihrer eigenen Induktion beiträgt (Simonini *et al.* 2010). Allerdings konnten Matsuda *et al.* aufzeigen, dass eine Aktivierung von ERalpha auch zur Inhibierung des TGFbeta-Signalweges beitragen kann (Matsuda *et al.* 2001). Damit würden im Zuge der Etablierung des entodermalen Zellschicksals sukzessive die induzierenden Komponenten der TGFbeta-Signalkette, die zur Aktivierung von miR-375 beitragen, reduziert. Daraus resultiert auch eine Unterbrechung der ERalpha-miR-375-assoziierten Signalschleife, was letztlich die Weiterentwicklung der entodermal geprägten Zellen erlaubt. Somit bietet sich auch eine Erklärung für das sowohl in publizierten Studien als auch im Rahmen der Experimente der vorliegenden Dissertation beobachtete Absinken der Expression von miR-375 nach der Festlegung der differenzierenden Zellen auf die entodermale Richtung.

4.3.2 TALE-gesteuerte Induktion der miR-375-Expression während der Entstehung entodermaler Vorläuferzellen

Die mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelte Effizienz der Transfektion von TALEs zur Induktion von miR-375 im Rahmen der entodermalen *in vitro* Differenzierung fiel mit unter 5 % erfolgreich transfizierten Zellen bei den beiden eingesetzten Linien eher gering aus. Die übrigen Ergebnisse in Bezug auf potenzielle Veränderungen der Expressionsrate von miR-375, *SOX17* und *FOXA2* sind in der folgenden Grafik noch einmal kurz zusammengestellt.

miR-375 Induktion (TALEs)			
Expressionsänderung von:		ESZ-Linie HUES-8	iPSZ-Linie IMR90-4
miR-375		↑ (Trend)	↑* (um ca. 100 %)
SOX17		↔	↑ (Trend)
FOXA2		↑ (Trend)	↑* (um ca. 40 %)

Abb. 86: Effekte der Transfektion von TALEs in hESZ (HUES-8) und hiPSZ (IMR90-4) zum Beginn der entodermalen *in vitro* Differenzierung. Die Auswirkungen auf das Expressionsniveau der entodermalen Marker wurden am dritten Tag der Entwicklung mittels qPCR analysiert. Die Angaben beziehen sich auf Daten, die aus gerichtet differenzierten Zellen gewonnen wurden, die keiner Transfektion unterlagen. * $p \leq 0,05$.

Grundsätzlich stimmen die detektierten Effekte auf miR-375, SOX17 und FOXA2 nach der mittels TALEs potenziell induzierten Aktivität von miR-375 in ihrer Ausrichtung in Form einer Steigerung der Expressionsrate in den formierten entodermalen Derivaten der verwendeten hESZ und hiPSZ überein, was erwartungsgemäß entgegengesetzt zu den beobachteten Ergebnissen aus den in Kapitel 4.3.1 diskutierten Experimenten zur Inhibitor-gesteuerten Repression von miR-375 während der entodermalen Entwicklung steht. Zusammen betrachtet, bekräftigen die Ergebnisse zur Inhibierung und Induktion von miR-375 in dieser ersten entscheidenden Differenzierungsphase erneut die Hypothese, dass eine starke Expression von miR-375 zur effektiven Ausbildung entodermaler Zellen beiträgt, wobei generell gültige, zelllinienunabhängige Signalwege aktiviert werden, wie sie in Kapitel 4.2.1 vorgestellt wurden. Die mikroRNA-375 kann damit als grundsätzlicher Marker zur Charakterisierung entodermaler Zellerivate ergänzend zu den klassischen TKF SOX17 und FOXA2 eingesetzt werden.

Im Detail betrachtet, konnte in den Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4 eine signifikante Erhöhung der Transkriptmenge von miR-375 und FOXA2 mittels qPCR detektiert werden. Auch die Expressionsrate von SOX17 war erhöht, aber aufgrund von Schwankungen im Ausmaß des Effektes zwischen den Werten der einzelnen Versuchswiederholungen konnte hier keine Signifikanz der Änderung nachgewiesen werden. Die beobachteten Ergebnisse stimmen mit der insgesamt höheren Effizienz der TALE-Transfektion in Zellen der Linie IMR90-4 im Vergleich zu den hESZ der Linie HUES-8 überein. Grundsätzlich sollten für eine belastbare Aussage zur Transfektionseffizienz allerdings ergänzend zu den zwei durchflusszytometrischen Messungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Wiederholungen vergleichend in Zellen beider Linien erfolgen. Im Gegensatz zu den entodermalen Derivaten der hiPSZ, konnte in den differenzierten Zellen der hESZ keine Erhöhung der Transkriptmenge von SOX17 detektiert werden und auch die messbare, aber aufgrund von Werteschwankungen innerhalb der Versuchswiederholungen nicht als signifikant darstellbare Steigerung der Expressionsrate von FOXA2 blieb im Niveau hinter den analysierten Effekten aus Zellen der Linie IMR90-4 zurück. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine grundsätzliche Transfektion von TALEs zur gezielten Induktion von Genaktivitäten in humanen ESZ bzw. iPSZ möglich ist, aber die Effizienz unter Nutzung der gewählten Transfektionsreagenz und -methode gering ausgeprägt war und damit einer weiteren Optimierung bedarf. Eine Übersicht über potenzielle Einflussfaktoren, die eine effiziente Transfektion und intrazelluläre Wirkung von TALEs allgemein und speziell im sensiblen Zellmodell humaner pluripotenter Stammzellen beeinflussen können, bietet die folgende Abbildung.

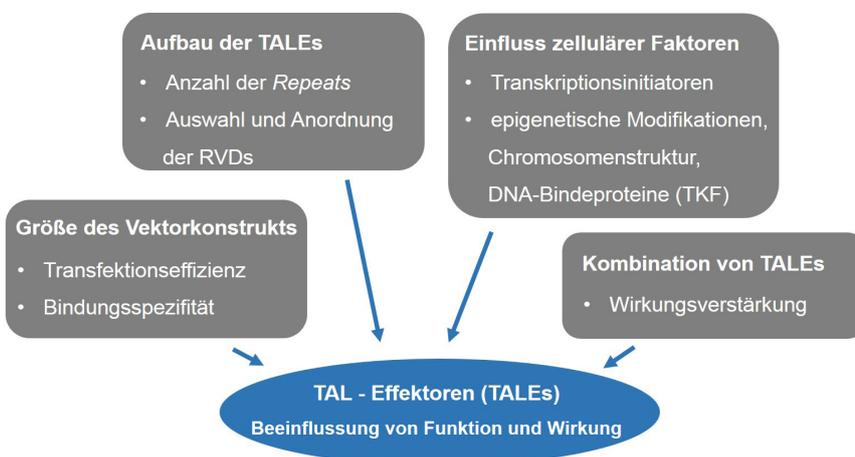


Abb. 87: Zusammenstellung von Einflussgrößen, die an der Regulation von Transfektionseffizienz und Ausmaß der intrazellulären Wirkung von TALEs beteiligt sind.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten TALE-enthaltenden Vektorkonstrukte waren mit einer Gesamtgröße von neun bis zehn Kilobasenpaaren sehr umfangreich, was sich grundsätzlich erschwerend auf die Aufnahme mittels chemisch basierter Transfektion in die sensiblen und besonders kleinen humanen pluripotenten Stammzellen auswirken kann. Bei der Wahl der Transfektionsmethode wurde, wie bereits in Kapitel 4.3.1 diskutiert, auf zwar allgemein effektivere, aber in Bezug auf den etablierten und damit vergleichbaren experimentellen Aufbau ungeeignete Methoden, wie z.B. die Elektroporation verzichtet. Außerdem wurde nur eine einmalige Transfektion der Vektoren an Tag eins des Differenzierungsprozesses durchgeführt, da im Rahmen des Protokolls kein weiterer Mediumwechsel bis zum Tag drei, dem Tag der Analyse der Zellen erfolgte und somit die Transfektion für 48h ungestört, wie laut Herstellerangaben der Transfektionsreagenz empfohlen, erfolgen konnte. Ausblickend könnte eine wiederholte Transfektion im Verlauf der dreitägigen entodermalen Differenzierung auf potenziell steigende Effekte in Bezug auf die Transfektionseffizienz getestet werden. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass die Einschleusung großer Konstrukte in die sich entwickelnden Zellen zu Stress-induzierten Veränderungen im Differenzierungsverhalten und der grundsätzlichen Vitalität führen können, was der selektiven und effizienten Formierung von ausreichend analysierbarem Material in Form entodermaler Progenitorzellen entgegen wirken könnte. Die experimentelle Annäherung an eine ideale Balance aus effizienter Transfektion und möglichst unbeeinträchtigter Differenzierungsleistung kann nur im Rahmen umfassender Titrationsversuche zur Ermittlung der idealen Zusammensetzung bzw. Konzentration von TALEs und Transfektionsreagenz und der Austestung der zellulären Belastungsgrenze bei wiederholten Transfektionsereignissen gefunden werden. Die Optimierung der Transfektionseffizienz muss sich ausblickend vor allem auf die Wahl der Transfektionsreagenz und -methode fokussieren, denn die grundlegende Herausforderung in Form der Konstruktgröße ist zumindest aktuell nicht veränderbar. Die zentrale Region der TALEs umfasst strukturell eine Folge von *Repeat*-Elementen, die jeweils ca. 34 Aminosäuren umfassen. Über zwei der enthaltenen Aminosäuren wird die spezifische Bindung an eine bestimmte Base der DNA vermittelt. Studien zeigten, dass bei der künstlichen Erstellung von TALEs erst ab einer Menge von ca. 10 *Repeats* eine effektive Induktion des spezifischen Zielgens messbar war und grundsätzlich die DNA-Bindfähigkeit mit der Zahl der *Repeats* anstieg (Boch *et al.* 2009). Zusätzlich scheint die Toleranz von vereinzelt auftretenden Fehlpaarungen zwischen Aminosäurerest und DNA-Base besser tolerierbar bei TALEs mit vielen *Repeats*, da trotzdem noch eine ausreichend starke Assoziation mit der DNA gewährleistet werden und so weiterhin eine effiziente induktive Wirkung vermittelt wird (Scholze und Boch 2010).

Neben der Anzahl an *Repeat*-Modulen sind noch weitere strukturelle Komponenten an der Regulation von DNA-Bindfähigkeit und damit Induktionskraft der TALEs beteiligt. Bei der gezielten Erstellung eines TALE spielen die Wahl der eingefügten RVDs, das heißt der zwei Aminosäuren innerhalb eines *Repeats*, die die DNA-Bindung organisieren, und die Reihenfolge der aneinander gereihten *Repeat*-Module eine entscheidende Rolle. Einige RVDs binden nicht nur ausschließlich eine spezifische Base, so dass Fehlpaarungen auftreten können. Der Anteil dieser Fehlpaarungen entscheidet über die Bindungsstärke des gesamten TALEs. Spezifisch und damit stark bindende RVDs können mit den Basen der DNA Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, während einige schwach bindende RVDs lediglich Van-der-Waals-Kontakte ausbilden. Aktuell ist allerdings noch unklar, warum manche RVDs je nach Zusammenstellung und Positionierung mit benachbarten Motiven sowohl effektive als auch schwache

Bindungseigenschaften aufweisen können (Scholze und Boch 2010; Streubel *et al.* 2012). In Bezug auf die im Rahmen der durchgeführten Experimente eingesetzten TALEs können demnach aufgrund von in den einzelnen Zelllinien individuell vorherrschenden und bisher ungeklärten Einflüssen unterschiedliche Bindungsstärken der verwendeten TALE-Konstrukte aufgetreten sein, was potenzielle Fehlpaarungen einschließt, die sich letztlich im unterschiedlichen Niveau der induktiven Funktion widerspiegeln.

Ein weiterer potenzieller Einflussfaktor auf die Effektivität der TALE-vermittelten Expressionssteigerung spezifischer Zielgene stellt die kombinierte Nutzung mehrerer TALEs dar, die an verschiedenen Stellen des entsprechenden Promotors binden können. Die Realisierbarkeit dieser Anwendung konnte bereits bestätigt werden und Studien bekräftigten zudem die Hypothese, dass die induktive Wirkung durch kombinierte Anwendung von mehreren TALEs potenziell ist (Römer *et al.* 2009; Richter und Boch 2013). Dieser Idee folgend, wurden für die durchgeführten Experimente zur Induktion der miR-375 im Verlauf der entodermalen *in vitro* Differenzierung alle fünf erstellten TALEs gemeinsam in die Zellen transfiziert. Aufgrund der vermuteten Limitierungen bei der generellen zellulären Aufnahmefähigkeit der großformatigen Vektorkonstrukte in Kombination mit der gewählten chemisch basierten Transfektionsmethode und der noch fehlenden Erfahrung zur individuellen Bindestärke und damit Wirkung der neu erstellten TALEs, war von dem gewählten kombinierten Einsatz die größte potenzielle Auswirkung auf die Expressionsrate von miR-375 und damit korrelierend auch auf die der Gene *SOX17* und *FOXA2* zu erwarten. Ausblickend können im Rahmen von umfangreichen Experimenten zur selektiven Nutzung einzelner TALEs bzw. der Austestung verschiedener Kombinationsvarianten die effektivsten Konstrukte, d.h. induktivste Mischung herausgestellt werden. Eine Reduktion der für eine starke Induktion von miR-375 notwendigen TALEs kann zur Verminderung von transfektionsbedingten Stresssignalen innerhalb der Zellen beitragen und somit bei effektiver Funktion der Konstrukte eine ebenso effektive entodermale Differenzierung uneingeschränkt ermöglichen. Zusätzlich sollte ausblickend die Optimierung von Transfektionsmethode und -reagenz im Fokus der Aufmerksamkeit stehen. Im Zuge der analysierten Transfektionseffizienz konnte ermittelt werden, dass der Anteil erfolgreich transfizierter Zellen in beiden eingesetzten Linien bei unter 5 % lag. Die insgesamt schwachen Effekte auf das Expressionsniveau der entodermal-assoziierten Marker lassen sich zum einen auf diese nicht optimale Transfektionsrate zurückführen, zum anderen können keine Aussagen zur individuellen intrazellulären Anreicherung und Wirkung der einzelnen TALEs gemacht werden, da eine spezifische Diskriminierung mittels Durchflusszytometrie nicht möglich war. Somit könnten die beobachteten Unterschiede in Bezug auf die Expressionsveränderungen zwischen den hESZ und hiPSZ auch teilweise auf statistische Verteilungsunterschiede der einzelnen TALEs mit potenziell unterschiedlicher Induktionswirkung innerhalb der Zellen zurückzuführen sein. Aussagen zur Heterogenität der transfizierten Zellen in Bezug auf Menge und Zusammensetzung der aufgenommenen TALEs waren zusammenfassend nicht möglich, könnten aber entscheidend für die gemessenen Effekte der Expressionsinduktion gewesen sein. Der Einsatz verschiedener Fluorochrome zur separaten Detektion wäre hierbei bei zukünftigen Experimenten zu überdenken. Zusätzlich können auch mittels Transfektion und durchflusszytometrischer Analyse von einzelnen TALEs individuelle Erkenntnisse über die potenziell zelllinien- und konstruktabhängige Aufnahme gewonnen werden und somit eine effektive und im Umfang möglichst reduzierte TALE-Mischung zur Minimierung zellulärer Stressreaktionen erstellt werden. Die Realisierung der TALE-basierten induktiven Wirkung zur Steigerung der Genexpression kann außerdem noch von weiteren Faktoren beein-

flusst werden, die innerhalb der transfizierten Zellen aktiv sind. Für die Assoziation der Effektoren mit der spezifischen DNA-Bindestelle selbst sind keine zellulären Faktoren notwendig, aber zur Ausübung ihrer Funktion muss ein Transkriptionsinitiations-Komplex formiert werden. Welche zellulären Komponenten hierbei beteiligt sind, ist allerdings noch unklar (Scholze und Boch 2010; Scholze und Boch 2011). Damit ist denkbar, dass die individuelle Ausprägung der TAL-vermittelten induktiven Wirkung auch abhängig ist von Bereitstellung und Kompatibilität der benötigten zellulären Ko-Faktoren, welche im Rahmen des Entwicklungszustandes der transfizierten Zellen und der potenziellen Stressinduktion beeinflusst werden können. Unterschiede in den messbaren Effekten in Bezug auf veränderte Genexpressionen zwischen verschiedenen Zelllinien können somit auch Ausdruck des Umgangs der Zellen mit den umfassenden Auswirkungen des Vorgangs einer Transfektion innerhalb eines Differenzierungsprozesses sein. Interessante Aspekte zur Rolle zellulärer Einfluss- und Störfaktoren bietet die Frage nach der Funktion epigenetischer Modifikationen, der Chromatinstruktur und der Präsenz endogener DNA-bindender Proteine wie TKF im Raum der Promotorregion des spezifisch mittels TALE zu induzierenden Zielgens (Boch 2011). In Bezug auf die im Rahmen der durchgeführten Experimente zur Induktion von miR-375 beobachteten Unterschiede in den eingesetzten hESZ und hiPSZ stehen vor allem epigenetische Markierungen im Fokus, denn diese können bei reprogrammierten hiPSZ zum Teil von denen in hESZ abweichen, was mit dem Begriff des epigenetischen Gedächtnisses beschrieben wird. Trotz der Rückführung in einen pluripotenten Zustand können epigenetische Marker der ursprünglichen somatischen Zelle vor dem Reprogrammierungsprozess bestehen bleiben, was das anschließende *in vitro* Differenzierungspotenzial beeinflussen kann (Naujok und Lenzen 2012). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete hiPSZ-Linie IMR90-4 hat ihren Ursprung in fetalen Lungenfibroblasten, einem entodermal determiniertem Zelltyp mit entsprechenden epigenetischen Modifikationen zur Regulation entwicklungssteuernder Gene (Nichols *et al.* 1977). Es ist zu vermuten, dass auch nach der Reprogrammierung entodermal assoziierte Markierungen erhalten bleiben, was sich generell positiv auf das Potenzial dieser Zellen zur *in vitro* Differenzierung in die erneut entodermale Richtung auswirken kann. Diese Korrelation wurde bereits in Kapitel 3.2.1 aufgezeigt, da im Zuge des gerichteten Differenzierungsprozesses die Expressionsrate der entodermalen Gene *SOX17* und *FOXA2* in den Derivaten der hiPSZ-Linie IMR90-4 im Vergleich zu den Zellen der hESZ-Linie HUES-8 leicht erhöht war. Diese Ergebnisse passen zu den detektierten stärkeren induktiven Effekten der TALE-Transfektion auf die Expressionsrate von miR-375, *SOX17* und *FOXA2* in den formierten entodermalen Vorläuferzellen der hiPSZ-Linie. Damit sind kombinatorisch wirkende Effekte möglich. Die TALE-basierte Induktion von miR-375 kann zu einer Verstärkung der entodermalen Entwicklung über die bereits in Kapitel 4.3.1 ausführlich diskutierten Signalwege beitragen, was vor allem mit einer starken Erhöhung der Transkriptmenge von *FOXA2* korrelierte. Wie ebenfalls in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, kann hierbei eine direkte aktivierende Wirkung von miR-375 auf *FOXA2* vermutet werden. Unterstützt werden die TAL-vermittelten Effekte potenziell durch das epigenetisch determinierte erhöhte Potenzial der Zellen zur entodermalen Spezialisierung, was insgesamt als eine Ursache für die deutlicheren Effekte in den Zellen der hiPSZ-Linie im Vergleich zu den Zellen der hESZ-Linie bei grundsätzlich ähnlicher Transfektionseffizienz angesehen werden kann. Dabei ist zu bedenken, dass mit dem Start der forcierten Differenzierung der pluripotenten Zellen grundsätzlich zahlreiche epigenetische Modulationen stattfinden, die zum einen zur sukzessiven Stilllegung Pluripotenz-assoziiierter Gene führen und zum anderen die Aktivierung

von spezifischen differenzierungsrelevanten Genen vermitteln (Wu und Sun 2006; Gan *et al.* 2007; Avrahami und Kaestner). Es ist zu vermuten, dass die miR-375 bei diesem Prozess auch eine Rolle spielt, denn zu ihren potenziellen Zielgenen, die über Recherchen unter Nutzung von *online* verfügbaren Programmen wie z.B. *DIANA-microT* und *miRWalk2.0* zur Vorhersage von Ziel-mRNAs ermittelt werden können, zählen auch Histondeacetylasen (Paraskevopoulou *et al.* 2013; Dweep und Gretz 2015). Die stärkere TALE-basierte Induktion von miR-375 in den entodermalen Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4 kann somit zur Erhöhung der miR-375-vermittelten Regulation von Histondeacetylasen während der entodermalen Festlegung des Zellschicksals beitragen, was schließlich in einer zusätzlichen Begünstigung der Ausbildung entodermaler Vorläuferzellen mündet. Dazu passend, konnte in einer Studie von Bultmann *et al.* gezeigt werden, dass eine effektive TALE-basierte Aktivierung von Genen besonders gut zu realisieren ist, wenn gleichzeitig potenziell repressiv wirkende epigenetische Modifikatoren wie Histondeacetylasen gehemmt werden (Bultmann *et al.* 2012).

Zusammenfassend lassen die ermittelten Daten zur vergleichenden TALE-basierten Induktion von miR-375 während der entodermalen *in vitro* Differenzierung von hESZ und hiPSZ darauf schließen, dass die künstlich erstellten Effektoren grundsätzlich ein interessantes und geeignetes Werkzeug zur spezifischen Modulation der Genexpression darstellen und damit zur gezielten Optimierung von *in vitro* Differenzierungsprozessen genutzt werden können. Der strukturelle Aufbau der TALEs erlaubt eine hohe Spezifität, was unerwünschte „*off-Target*“-Effekte minimiert, die zu unkontrollierbaren Auswirkungen auf das Zellverhalten beitragen können. Gleichzeitig führen die strukturellen Vorgaben auch zu Herausforderungen, denn mit einer Größe von neun bis zehn Kilobasenpaaren bedarf die effiziente Transfektion der TAL-enthaltenden designten Vektorkonstrukte einer ausgiebigen Optimierung unter Einstellung einer idealen Balance zwischen maximaler Funktionsausübung und möglichst minimaler Belastung für die behandelten Zellen. Das gilt besonders bei der Verwendung von pluripotenten Stammzellen, die unter dem Aspekt der biomedizinischen und translationalen Forschung ein besonders interessantes aber zugleich auch sehr sensibles Zellmodell darstellen.

Bei der gemeinsamen Betrachtung der Ergebnisse zur Modulation der Expressionsrate von miR-375 während der entodermalen *in vitro* Differenzierung fiel die große Geschlossenheit der Gesamtergebnisse auf. Die in Kapitel 4.3.1 beschriebene Inhibitor-vermittelte Repression von miR-375 korrelierte übereinstimmend in beiden eingesetzten Zelllinien mit einer Reduktion der Transkriptmenge der entodermal-assoziierten Marker *SOX17* und *FOXA2*, wobei der Effekt auf *FOXA2* deutlicher ausgeprägt war. Umgekehrt konnte im Rahmen der TALE-basierten Induktion von miR-375 eine Steigerung der Expressionsrate von *SOX17* und in erneut stärkerem Ausmaß auch von *FOXA2* detektiert werden. Schlussfolgernd bekräftigen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten die These, dass die mikroRNA-375 neben ihrer wichtigen Rolle bei der *in vitro* Differenzierung pankreatischer und speziell endokriner Zellen sowie beim Erhalt der Funktion reifer Beta-Zellen auch schon während der frühesten Etappe des Differenzierungsprozesses, nämlich die Festlegung der pluripotenten Stammzellen auf ein entodermales Schicksal von großer Bedeutung ist. In einem regulatorischen Netzwerk aus zahlreichen Einflüssen wie epigenetischen Modifizierungen sowie sukzessiver Aktivierung und gegenseitig positiver Beeinflussung von vielen Transkriptionsfaktoren ist auch die Induktion von miR-375 und daraus resultierend ihre fördernde Wirkung zur effektiven entodermalen Entwicklung eingebettet. Die in Kapitel 4.3.1 diskutierten Hypothesen zur Vermittlung der miR-375-assoziierten Effekte beinhalten zum einen indirekt

positive Aspekte, welche über die Inhibierung der mRNA von Genen, die an der Bahnung von meso- bzw. ektodermalen Differenzierungsrichtungen beteiligt sind, vermittelt werden. Zusätzlich ist auch die Repression von Negativregulatoren des über die Zugabe von ActivinA ins Differenzierungsmedium induzierten TGFbeta-Signalweges, der die entodermale Spezifizierung der Zellen bestimmt, zu vermuten. Ebenso weisen zahlreiche Studien auf eine alternative Wirkungsvermittlung von miR-375 hin, die über direkte Promotorbindung der spezifischen Zielgene mediiert wird und sowohl zur Repression aber auch Aktivierung der Transkription führen kann. Da entsprechende miR-Bindestellen im Promotor von *FOXA2* nachgewiesen werden konnten, ist hier zusätzlich ein direkter, potenziell aktivierender Effekt von miR-375 anzunehmen. Damit können die beobachteten starken Effekte auf die Expressionsrate von *FOXA2* bei der Modulation der Aktivität von miR-375 begründet werden.

Aktuell liegen keine publizierten Daten zum experimentellen Nachweis der beschriebenen Wirkungswege, Interaktionen und Zielgene von mikroRNA-375 während der entodermalen *in vitro* Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen vor. Weiterführende darauf bezugnehmende Studien, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr realisiert werden konnten, sollten sich anschließen. Besonders interessant wäre hierbei die Aufklärung der intrazellulären Lokalisation von miR-375 in den sich formierenden entodermalen Vorläuferzellen, was über die getrennte Analyse von zytoplasmatischer und nukleärer Fraktion realisierbar ist. Damit verbunden steht auch der Nachweis der, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, zur Wirkungsvermittlung an Genpromotoren notwendigen Ko-Faktoren wie AGO-Proteine und GW182. Die experimentelle Ermittlung potenzieller Ziel-mRNAs von miR-375 könnte den, über Nutzung von Programmen zur Bioinformatik-basierten Vorhersage von regulierten Genen vermuteten, repressiven Einfluss auf Inhibitoren des TGFbeta-Signalweges und Regulatoren der ekto- bzw. mesodermalen Differenzierung bestätigen. Dabei erscheint z.B. die Methode des AGO-HITS-CLIP (*cross-linking immunoprecipitation-high-throughput sequencing*) als geeignet. Mittels Immunpräzipitation können so unter Nutzung eines gegen das AGO2-Protein, welches Bestandteil eines funktionalen miR-Wirkungskomplexes ist, gerichteten Antikörpers alle zu einem bestimmten Zeitpunkt bzw. zellulären Entwicklungszustand vorhandenen miR-mRNA-Komplexe ausgefällt und die Identität der Zielgene mittels Sequenzierstudien bestimmt werden (Chi *et al.* 2009; Zhang und Darnell 2011).

5. Zusammenfassung

Die weltweit steigende Zahl an Diabetespatienten erfordert in Verbindung mit den aktuell nicht kurativen Therapieangeboten die Verfolgung neuer Forschungsansätze, die zu einem detaillierteren Verständnis der Pathologie und daraus abgeleitet zur Entwicklung neuartiger Behandlungsoptionen führen können. Humane pluripotente Stammzellen stellen hierbei ein sehr geeignetes Modell für die Generierung Insulin-produzierender Zellen dar. Diese können sowohl für *in vitro* Testsysteme zur Identifizierung neuartiger medikamentöser Wirkstoffe als auch perspektivisch für die Zellersatztherapie verwendet werden. Den etablierten Protokollen zur pankreatischen *in vitro* Differenzierung ist jedoch eine sehr geringe Effizienz gemein und die formierten Zellen müssen als nicht-terminal differenzierte Vorläufer bezeichnet werden, da *in vitro* eine adäquate, durch Glukose stimulierbare, Insulinsekretion in der Regel nicht erreicht werden kann. Dass die Zellen allerdings durchaus das Potenzial zur Funktionalität besitzen, konnte durch Transplantationsexperimente in immundefizienten, diabetischen Mäusen gezeigt werden. Nach einer vollständigen Ausreifung *in vivo*, deren zu Grunde liegenden Mechanismen bisher weitestgehend unbekannt sind, konnte eine korrekte Regulation des Blutglukosespiegels beobachtet werden. Für eine Optimierung der *in vitro* Generation von Insulin-produzierenden Zellen ist demnach ein tieferes Verständnis für potenzielle differenzierungsbestimmende Einflussgrößen nötig. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Nährstoff Glukose und Pankreas-assoziierten mikroRNAs zwei Größen, deren Bedeutung für die Funktion von Beta-Zellen bekannt ist, im Hinblick auf ihre potenziell entwicklungssteuernde Rolle schon während der Formierung dieses hochspezialisierten Zelltyps untersucht. Der Vergleich von eigenen Ergebnissen mit bereits bekannten Daten aus vorwiegend *in vivo* Studien an fetalem pankreatischen Gewebe verschiedener Entwicklungsstufen führte zur Hypothese, dass potenzielle Unterschiede sowohl im Expressionsverlauf bzw. -niveau einzelner mikroRNAs als auch im Angebot von Nährstoffen wie Glukose zwischen der *in vitro* Differenzierung und der *in vivo* stattfindenden Pankreasorganogenese einen Grund für die bisherige geringe Effizienz darstellen können. Zur Untersuchung dieser Annahme wurde zunächst ein *in vitro* Differenzierungsprotokoll etabliert, welches die erfolgreiche reproduzierbare Formierung Insulin-produzierender Vorläuferzellen vergleichend aus humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen erlaubte. Die Nutzung beider Zelltypen erfolgte zum einen zur Analyse zelllinienunabhängiger Signale und Regulationsmechanismen und zum anderen diente sie zur Beurteilung des pankreatischen Differenzierungspotenzials der künstlich erzeugten hiPSZ im Vergleich zu den als „Goldstandard“ geltenden hESZ.

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse ableiten:

- Die Etablierung eines geeigneten *in vitro* Differenzierungsprotokolls erlaubte eine vergleichbare, erfolgreiche und reproduzierbare Generierung Insulin-produzierender Vorläuferzellen aus den verwendeten humanen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen. Bestätigt wurde dies mit der ermittelten und den sukzessiv aufeinander folgenden Differenzierungsetappen entsprechenden Aktivität der Transkriptionsfaktoren SOX17, FOXA2, PDX1 und NGN3. Der Nachweis von INSULIN gelang zum Ende des Differenzierungsprozesses, wobei das niedrige Expressions- und Syntheseniveau die geringe Effizienz widerspiegelt, welche die aktuell etablierten *in vitro* Protokolle kennzeichnet.

- Neben der großen generellen Übereinstimmung des Expressionsverlaufs differenzierungsrelevanter Markergene und mikroRNAs sind Unterschiede im Niveau der Expression detektierbar, was auf ein individuelles Potenzial der Zelllinien zur pankreatischen Differenzierung verweist. Aus den erzielten Ergebnissen kann für die hESZ-Linie HUES-8 und die hiPSZ-Linie IMR90-4 ein vergleichbar hohes Differenzierungspotenzial aufgezeigt werden. Die Zellen der hESZ-Linie H9 waren hingegen gekennzeichnet durch eine insgesamt schwächere Aktivierung bedeutender Gene wie *SOX17* und *NGN3* und eine fehlende Zunahme der Expression von miR-375 im Verlauf der Ausbildung pankreatischer Vorläuferzellen. Für die durchgeführten Modifikationen des Basis-Differenzierungsprotokolls wurden schlussfolgernd die Linien HUES-8 und IMR90-4 verwendet.
- Es bestehen große Übereinstimmungen im Expressionsprofil der Pankreas-assoziierten mikro-RNAs miR-375, miR-124a, miR-30d, miR-335, miR-200c, miR-9 und miR-182 zwischen den eingesetzten hESZ-Linien H9 und HUES-8 sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4. Ebenso zeigten sich bedeutende Ähnlichkeiten zu bekannten Daten aus *in vivo* / *in vitro* Studien.
- Die mikroRNA-375 kann als Marker zur Charakterisierung definitiv entodermaler Vorläuferzellen angewendet werden und stellt eine Einflussgröße für die effiziente Ausbildung dieser Zellen dar. Die Phase der Formierung entodermaler Progenitorzellen korrelierte mit einer starken Expression von miR-375 in allen analysierten humanen pluripotenten Stammzelllinien, wobei ein Zusammenhang zwischen Differenzierungseffizienz und Aktivität der mikroRNA mittels Induktions- bzw. Inhibierungsexperimenten aufgezeigt werden konnte.
- Eine transfektionsbasierte Erhöhung der Konzentration von miR-375 in pankreatischen bzw. endokrinen Vorläuferzellen hat positive Auswirkungen auf die *in vitro* Differenzierung der eingesetzten hESZ und hiPSZ durch signifikante Steigerung der Expressionsrate differenzierungsrelevanter Gene wie *PDX1*, *NGN3*, *INSULIN* und *MAFA* sowie der mikroRNAs *pre-miR-375*, miR-375 und miR-30d (nur bei hiPSZ).
- Eine kurzzeitige Glukosestimulation während des *in vitro* Differenzierungsverlaufs zeigte positive Auswirkungen auf die *in vitro* Differenzierung der verwendeten hESZ und hiPSZ, wobei die ermittelten Effekte im Vergleich zur Modifikation mittels miR-375-Transfektion insgesamt ein geringeres Niveau aufwiesen. Es konnten signifikante Steigerungen der Expressionsrate differenzierungsrelevanter Gene wie *PDX1*, *NGN3*, *MAFA*, *NEUROD1* und *CHREBP* sowie der mikroRNAs miR-375 und miR-30d (nur bei hiPSZ) detektiert werden.
- Die kombinierte Anwendung aus Glukosestimulation und miR-375-Transfektion führte zu positiven Auswirkungen auf die *in vitro* Differenzierung der eingesetzten hESZ und hiPSZ, wobei additive und teilweise leicht synergistische Effekte in Bezug auf die Steigerung der Expressionsrate differenzierungsrelevanter Gene wie *PDX1*, *NGN3*, *INSULIN* und *MAFA* sowie der mikroRNAs miR-375, miR-30d und miR-124a im Vergleich zu den einzeln durchgeführten Protokollmodulationen ermittelt wurden.
- Die Modifikationen des etablierten Basis-Differenzierungsprotokolls, d.h. die Glukosestimulation (nur bei hiPSZ), die Transfektion von miR-375 und die Kombination aus beiden führten zu einer sig-

nifikanten Steigerung der Expressionsrate von Glucagon, aber eine Erhöhung der Proteinsynthese wurde nicht detektiert. Bei allen Modifikationen war keine signifikante Zunahme der Expression bzw. Translation von Somatostatin im Vergleich zum Basis-Differenzierungsprotokoll zu beobachten. Somit fördern die hier angewendeten Modifikationen nicht die Polyhormonalität der pankreatischen Zellen, wie dies in anderen Protokollen der Fall ist.

- Alle drei durchgeführten Modifikationen des etablierten Basis-Differenzierungsprotokolls führten vergleichend in den eingesetzten hESZ und hiPSZ zu einer signifikanten Steigerung der Insulinproduktion zum Endpunkt des *in vitro* Differenzierungsprozesses. Zwar verbleibt die Synthese in den *in vitro* formierten unreifen Vorläufern auf einem deutlich geringeren Niveau als bei *in vivo* vorkommenden Beta-Zellen, aber die mittels C-Peptid-ELISA detektierte Erhöhung der Hormonproduktion bekräftigt das Potenzial der verwendeten Protokollmodulationen zur Verbesserung der pankreatischen Differenzierungseffizienz.

Die gezielte Modulation von differenzierungssteuernden Größen wie mikroRNA-375 und Glukose, die bei der Ausbildung und dem Funktionserhalt von pankreatischen Beta-Zellen von Bedeutung sind, kann zu einer Annäherung an die molekularen Regulationsmechanismen beitragen, die während der *in vivo* stattfindenden Ausbildung dieses Zelltyps wirken und schlussfolgernd die Effizienz der *in vitro* Generation Insulin-produzierender Zellen steigern. Mit der vorliegenden Arbeit wird die wichtige Rolle der untersuchten Einflussgrößen aufgezeigt, wobei besonders die offensichtliche Allgemeingültigkeit der stimulierten zellulären Signalwege hervorzuheben ist, was durch Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen der verwendeten hESZ und hiPSZ verdeutlicht wird. Ausblickend verweisen die erzielten Resultate auf die Möglichkeit, durch gerichtete Modifikation weiterer Pankreas-assoziiierter mikroRNAs kombinatorisch positive Effekte zu erzielen. Ebenso bietet die intensive Untersuchung und nachfolgend potenzielle Optimierung der Zufuhr weiterer Nährstoffe wie Aminosäuren und Fettsäuren während des *in vitro* Differenzierungsverlaufs zusätzliche Optionen zur Verbesserung der pankreatischen *in vitro* Differenzierung.

6. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ac-pre-miRNA	<i>AGO2-cleaved precursor miRNA</i>
ADAR1 / 2	<i>Adenosine Deaminases Acting on RNA 1 / 2</i>
AGO2	<i>Argonaut Protein 2</i>
ALK5	<i>Activin Receptor-Like Kinase 5</i>
ARX	<i>Aristaless Related Homeobox</i>
as	<i>antisense</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
Bhlhe22	<i>Basic Helix-Loop-Helix Family, Member e22</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
cDNA	<i>complementary Desoxyribonucleid Acid</i>
Ca ²⁺	<i>Calcium-Ion</i>
CAF1	<i>CCR4-Associated Factor (Deadenylase)</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosinmonophosphate</i>
CCR4	<i>Carbon Catabolite Repressor Protein 4 (Deadenylase)</i>
CDK4 / 6	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4 / 6</i>
ChoRE	<i>Carbohydrate Response Element</i>
CHREBP	<i>Carbohydrate-Responsive Element-binding Protein</i>
C-MYC	<i>v-MYC Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>
C-Peptid	<i>Connecting Peptide</i>
CpG	<i>Cytosin-Phosphat-Guanin (5' - 3')</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding Factor</i>
Cy TM 5	<i>Cyanin 5</i>
CYP26	<i>Cytochrome P450, Family 26</i>
CXCR4	<i>Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4</i>
D	<i>Asparaginsäure (Aminosäure, Einbuchstabencode)</i>
DAPT	<i>N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester</i>
DCP2	<i>Decapping mRNA 2</i>
DDP-4	<i>Dipeptidylpeptidase 4</i>
DE	<i>Definitives Entoderm</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DNMT1	<i>DNA (cytosine-5-)-Methyltransferase 1</i>
DNMT3L	<i>DNA (cytosine-5-)-Methyltransferase 3-like</i>

dNTP	<i>desoxy-Ribonucleosid-Triphosphat</i>
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ERK1	Synonym für MAPK3 (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 3</i>)
ERK2	Synonym für MAPK1 (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>)
ESZ	Embryonale Stammzellen
et al.	<i>et alia</i> , lat. „und andere“
EV	Endokrine Vorläuferzellen
EZH2	<i>Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR2B	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2B</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FOXA2	<i>Forkhead-Box Protein A2</i>
G	Glycin (Aminosäure, Einbuchstabencode)
G1-Phase	<i>Gap1</i> - Phase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GIP	<i>Gastric Inhibitory Polypeptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
GLUT2	Glukosetransporter 2
GPR40	<i>G Protein-coupled Free Fatty Acid Receptor-1</i>
GSIS	Glukose-stimulierte Insulinsekretion
GW182	<i>Gawky</i>
H	Histidin (Aminosäure, Einbuchstabencode)
H9	humane embryonale Stammzelllinie (offizielle Bezeichnung: WA09)
HAT	Histonacetyltransferase
HbA1c	Glykohämoglobin
HDAC	Histondeacetylase
hESZ	humane embryonale Stammzellen
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
hiPSZ	humane induzierte pluripotente Stammzellen
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HMG	<i>High Mobility Group</i>
HNF1A / 4A	<i>HNF1 Homeobox A / HNF4 Homeobox A</i>
H ₂ O	Wasser
HUD	<i>ELAV-like Neuron-specific RNA-binding Protein 4 (Hu antigen D)</i>
HUES-8	humane embryonale Stammzelllinie HUES-8
I	Isoleucin (Aminosäure, Einbuchstabencode)
IDDM1	<i>Insulin Dependent Diabetes Mellitus 1</i>
IF	Immunfluoreszenz (-Analyse)

IGF-1	<i>Insulin Growth Factor-1</i>
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
IMR90-4	humane induzierte pluripotente Stammzelllinie (Klon 4)
IPZ	Insulin-produzierende Zellen
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
K	Lysin (Aminosäure, Einbuchstabencode)
K+	Kalium-Ionen
KAAD	3-Keto-N-Aminoethyl-N-Aminocaproyl-Di-Hydrocinnamoyl
KIR6.2	<i>Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor 6.2</i>
KGf	<i>Keratinocyte Growth Factor</i> (Synonym für FGF7)
KLF4 / 11	<i>Krüppel-Like Factor 4 / 11</i>
KO	<i>Knockout</i>
LIN28	<i>Lin-28 Homolog A</i>
MAFA / B / C	v-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog A / B / C
MAP4K4	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 4</i>
MEF(s)	murine embryonale Fibroblasten
MEK	Synonym für MAP2K7 (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7</i>)
MEOX1	<i>Mesenchyme Homeobox 1</i>
MEST	<i>Mesoderm Specific Transcript</i>
miR, miRNA	<i>micro Ribonucleic Acid</i>
MIXL1	<i>Mix paired-like Homeobox</i>
MTPN	<i>Myotrophin</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MW	Mittelwert
N	Asparagin (Aminosäure, Einbuchstabencode)
NANOG	<i>Nanog Homeobox</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acids</i>
NEUROD1 / 6	<i>Neurogenic Differentiation 1 / 6</i>
NGN3	<i>Neurogenin 3</i>
NKX6-1	<i>NK6 Homeobox 1</i>
NOT	<i>CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 1</i>
OCT4	<i>Octamer-binding Transcription Factor 4</i>
O-GlcNAc	O-Glykosylierung (N-Acetylglucosamin)
ONECUT2	<i>One Cut Homeobox 2</i>
p300	<i>E1A-binding Protein p300</i>
PACT	<i>Protein Activator of PKR</i>
PARP	<i>Poly(A)-binding Protein</i>
PAX4 / 6	<i>Paired Homeobox 4 / 6</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PD	Primitives Darmrohr
PDK-1	<i>Phosphoinositide-Dependent Kinase-1</i>
PDX1	<i>Pancreatic and Duodenal Homeobox 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
PNPaseold-35	<i>Polynucleotide Phosphorylase</i>
Poly(A)	Polyadenylierung
PP	Pankreatisches Polypeptid
pre-miRNA	<i>precursor</i> miRNA
pri-miRNA	<i>primary</i> miRNA
PTB	<i>Polypyrimidine Tract-binding Protein 1</i>
PV	Posteriorer Vorderdarm
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
RA	<i>Retinoic Acid</i>
RAB3A	<i>RAB3A, Member RAS Oncogene Family</i>
RAS	<i>Resistance to Audiogenic Seizures</i>
REST	<i>RE1-Silencing Transcription Factor</i>
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RLC	<i>RISC Loading Complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROCK	<i>p160-Rho-associated Coiled-Coil Kinase</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRP41	<i>Ribosomal RNA Processing Protein 41</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
RVD	<i>Repeat Variable Di-Residue</i>
s	<i>sense</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SEC24D	<i>SEC24 Family Member D</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
SIN3B	<i>SIN3 Transcription Regulator Family Member B</i>
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
SMAD	<i>SMAD Family (Mothers Against Decapentaplegic, Drosophila melanogaster)</i>
small molecules	kleine Moleküle (Molekulargewicht unter 800 g/mol)
SNAIL1	<i>Snail Family Zinc Finger 1</i>
SNAP25	<i>Synaptosomal-Associated Protein 25</i>
SNORD25	<i>Small Nucleolar RNA, C / D Box 25</i>

SOX2 / 6 / 17	<i>SRY-Related HMG Box 2 / 6 / 17</i>
SP1	<i>Sp1 Transcription Factor</i>
SRY	<i>Sex Determining Region Y</i>
SSEA-4 / -3	<i>Stage-Specific Embryonic Antigen-4 / -3</i>
STXBP1	<i>Syntaxin-binding Protein 1</i>
StZG	Stammzellgesetz
SUR1	<i>Sulfonylurea Receptor 1</i>
SUZ12	<i>Suppressor of Zeste 12 (Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)</i>
T2D	Typ2 - Diabetes mellitus
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAF3	<i>TAF3 RNA Polymerase II, (TATA box-binding Protein-associated Factor)</i>
TALE(s)	<i>Transcription Activator-Like Effector(s)</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TE	Tris-EDTA Puffer
TGF-beta (β)	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF β R / T β R	<i>Transforming Growth Factor β-Receptor</i>
TIMM8A	<i>Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 8 Homolog A</i>
TKF	Transkriptionsfaktor(en)
TRA-1-60 / -81	<i>Tumor-Related Antigen 1-60 / 1-81</i>
TRBP	<i>Tar RNA-binding Protein</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXNIP	<i>Thioredoxin Interacting Protein</i>
ÜN	Über Nacht
UTR	Untranslatierte Region
WNT	<i>Wingless-related Integration Site</i>
WNT3a	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family 3a</i>
XRN1	5'-3' Exoribonuklease 1
ZFPM2	<i>Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2</i>
18S rRNA	18S ribosomale RNA

Entsprechend der internationalen Nomenklatur sind in dieser Arbeit die Bezeichnungen humaner Gene kursiv und in Großbuchstaben geschrieben, während die Namen der Proteine in Großbuchstaben erscheinen. Fremdworte in englischer oder lateinischer Sprache sind kursiv dargestellt. Ganze Zahlen von 0 bis 12 werden im Text in Buchstaben, Zahlen ab 13 in Ziffern geschrieben.

Einheiten:

g:	Gramm	s:	Sekunde(n)	M:	Molar
mg:	Milligramm	min:	Minute(n)	mM:	Milimolar
µg:	Mikrogramm	h:	(hour) Stunde(n)	µM:	Mikromolar
ng:	Nanogramm	d:	(day) Tag(e)	pM:	Pikomolar
l:	Liter	bp:	Basenpaar(e)		
ml:	Milliliter	kb:	Kilobasen(paare)		
cm:	Zentimeter	g:	Erdbeschleunigung (Zentrifugation)		
mm:	Millimeter	Ø:	Durchmesser		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht zur zeitabhängigen Entwicklung verschiedener Formen des Diabetes mellitus ausgehend von einer regelrechten Glukosetoleranz bis zum manifesten Diabetes.....	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Rotations- und Fusionsereignisse während der Pankreasorganogenese.....	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der sequenziellen Abfolge der einzelnen Entwicklungsetappen während der Pankreasformation.....	12
Abbildung 4: Schema zur Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste.....	14
Abbildung 5: Übersicht zum Ablauf der Glukose-induzierten Insulinsekretion (GSIS).....	19
Abbildung 6: Schematische Darstellung der zellulären Synthese von mikroRNAs.....	24
Abbildung 7: Übersicht zum Einfluss zahlreicher Pankreas-assoziiertes mikroRNAs auf die Entstehung, den Erhalt und die Funktion von Beta-Zellen.....	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Signalwege, die zum Pluripotenzerhalt humaner embryonaler Stammzellen beitragen.....	41
Abbildung 9: Neubauer-Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahl.....	42
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kolonien der hESZ-Linien H9 und HUES-8 ..	44
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Basisprotokolls zur pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen.....	48
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Modifizierung des Basisprotokolls zur entodermalen <i>in vitro</i> Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen mittels spezifischem miR-375-Inhibitor	51
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Modifizierung des Basisprotokolls zur entodermalen <i>in vitro</i> Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen mittels TALEs.....	53

Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kolonien der hESZ-Linien H9 und HUES-8 sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4 zur Überprüfung der Stammzellmorphologie.....	64
Abbildung 15: Gelelektrophoresebild zum Nachweis der Aktivität Pluripotenz-assoziiierter Gene in den hESZ-Linien H9 und HUES-8 sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4.....	64
Abbildung 16: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Proteinnachweis der Pluripotenz-assoziierten Marker SOX2, OCT4, NANOG und SSEA-4 in den hESZ-Linien H9 und HUES-8 sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4.....	65 - 66
Abbildung 17: Aktivitätsnachweis der alkalischen Phosphatase in Zellen der hESZ-Linien H9 und HUES-8 sowie der hiPSZ-Linie IMR90-4.....	67
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Veränderung der Morphologie von Zellen der hESZ-Linie H9 im <i>in vitro</i> Differenzierungsverlauf.....	68
Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Veränderung der Morphologie von Zellen der hESZ-Linie HUES-8 im <i>in vitro</i> Differenzierungsverlauf.....	69
Abbildung 20: Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Veränderung der Morphologie von Zellen der hiPSZ-Linie IMR90-4 im <i>in vitro</i> Differenzierungsverlauf.....	70
Abbildung 21: Gelelektrophoresebild zur Expression der Pluripotenz-assoziierten Gene <i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> und <i>NANOG</i> im <i>in vitro</i> Differenzierungsverlauf in Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4 ...	71
Abbildung 22: Gelelektrophoresebild zur Darstellung der Expression differenzierungsrelevanter Gene während des <i>in vitro</i> Differenzierungsprozesses in Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4	72
Abbildung 23: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>SOX17</i> während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	74
Abbildung 24: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>FOXA2</i> während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	75
Abbildung 25: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>PDX1</i> während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	75
Abbildung 26: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>NGN3</i> während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	76
Abbildung 27: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>INSULIN</i> während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4.....	76
Abbildung 28: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Proteinnachweis von <i>SOX17</i> während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung in Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	79
Abbildung 29: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Proteinnachweis von <i>FOXA2</i> während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung in Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	80
Abbildung 30: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Proteinnachweis von <i>PDX1</i> während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung in Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	80

Abbildung 31: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Proteinnachweis von NGN3 während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung in Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	81
Abbildung 32: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Proteinnachweis von INSULIN und C-PEPTID während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4.....	81
Abbildung 33: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Proteinnachweis von GLUCAGON und SOMATOSTATIN sowie Ko-Färbungen von INSULIN + C-PEPTID, INSULIN + GLUCAGON und INSULIN + SOMATOSTATIN in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4.....	82
Abbildung 34: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-375 während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	85
Abbildung 35: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-124a während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	86
Abbildung 36: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-30d während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	86
Abbildung 37: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-335 während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	87
Abbildung 38: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-200c während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	87
Abbildung 39: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-9 während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	88
Abbildung 40: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-182 während der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4.....	88
Abbildung 41: Immunfluoreszenzanalyse von mittels Fluorochrom-gekoppelter Negativ-siRNA transfizierten Zellen der Linien H9, HUES-8 sowie IMR90-4.....	90 - 91
Abbildung 42: Durchflusszytometrische Analyse zur Ermittlung des Anteils transfizierter Zellen der Linien H9, HUES-8 sowie IMR90-4 mittels Fluorochrom-gekoppelter Negativ-siRNA.....	91
Abbildung 43: Lichtmikroskopische Aufnahmen zum Morphologiewandel der <i>in vitro</i> differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 nach der Transfektion von miR-375	93
Abbildung 44: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-375 in Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4 (Transfektion von miR-375).....	94
Abbildung 45: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>pre</i> -miR-375 in Zellen der Linien H9, HUES-8 und IMR90-4 (Transfektion von miR-375).....	95
Abbildung 46: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>PDX1</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Transfektion von miR-375).....	97
Abbildung 47: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>NGN3</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Transfektion von miR-375).....	98

Abbildung 48: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>INSULIN</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Transfektion von miR-375).....	98
Abbildung 49: Lichtmikroskopische Aufnahmen zum Morphologiewandel der <i>in vitro</i> differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 nach der Glukosestimulation	100
Abbildung 50: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-375 in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Glukosestimulation).....	101
Abbildung 51: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>PDX1</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Glukosestimulation).....	102
Abbildung 52: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>NGN3</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Glukosestimulation).....	103
Abbildung 53: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>INSULIN</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Glukosestimulation).....	103
Abbildung 54: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>CHREBP</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Glukosestimulation).....	104
Abbildung 55: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>NEUROD1</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Glukosestimulation).....	105
Abbildung 56: Lichtmikroskopische Aufnahmen zum Morphologiewandel der <i>in vitro</i> differenzierten Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 nach der Kombination aus Glukosestimulation und Transfektion von miR-375.....	106 - 107
Abbildung 57: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-375 in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Kombination: Glukosestimulation + Transfektion von miR-375).....	108
Abbildung 58: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>PDX1</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Kombination: Glukosestimulation + Transfektion von miR-375).....	109
Abbildung 59: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>NGN3</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Kombination: Glukosestimulation + Transfektion von miR-375).....	110
Abbildung 60: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>INSULIN</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (Kombination: Glukosestimulation + Transfektion von miR-375).....	111
Abbildung 61: Gelelektrophoresebild zum Vergleich des Expressionsmusters differenzierungsrelevanter Gene in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 im Rahmen der Modifikationen des Differenzierungsprotokolls.....	112 - 113
Abbildung 62: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>MAFA</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 im Rahmen der Modifikationen des Differenzierungsprotokolls.....	114
Abbildung 63: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>GLUCAGON</i> in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 im Rahmen der Modifikationen des Differenzierungsprotokolls.....	116
Abbildung 64: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von <i>SOMATOSTATIN</i> in Zellen der Lini-	

en HUES-8 und IMR90-4 im Rahmen der Modifikationen des Differenzierungsprotokolls.....	117
Abbildung 65: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-124a in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 im Rahmen der Modifikationen des Differenzierungsprotokolls.....	117
Abbildung 66: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-30d in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 im Rahmen der Modifikationen des Differenzierungsprotokolls.....	118
Abbildung 67: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Proteinnachweis von PDX1, NGN3, INSULIN und C-PEPTID sowie Ko-Färbungen von INSULIN + C-PEPTID, INSULIN + GLUCAGON und INSULIN + SOMATOSTATIN in Zellen der Linie HUES-8	119 - 120
Abbildung 68: Immunfluoreszenzaufnahmen zum Proteinnachweis von PDX1, NGN3, INSULIN und C-PEPTID sowie Ko-Färbungen von INSULIN + C-PEPTID, INSULIN + GLUCAGON und INSULIN + SOMATOSTATIN in Zellen der Linie IMR90-4	122 - 123
Abbildung 69: Vergleichende Analyse zur Veränderung des C-PEPTID-Gehalts im Differenzierungsmedium der Zelllinien HUES-8 und IMR90-4 mittels C-PEPTID-ELISA.....	125
Abbildung 70: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-375 in ESZ der Linien H9 und HUES-8 zur Analyse der Effizienz eines spezifischen miR-375-Inhibitors.....	127
Abbildung 71: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-375 in differenzierten entodermalen Zellen der Linien H9 und HUES-8 (miR-375-Inhibitor).....	128
Abbildung 72: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von SOX17 in differenzierten entodermalen Zellen der Linien H9 und HUES-8 (miR-375-Inhibitor).....	128
Abbildung 73: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von FOXA2 in differenzierten entodermalen Zellen der Linien H9 und HUES-8 (miR-375-Inhibitor).....	129
Abbildung 74: Immunfluoreszenzaufnahmen zur Bewertung der TALE-Transfektionsfähigkeit in Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4.....	130
Abbildung 75: Durchflusszytometrische Analyse des Anteils transfizierter Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 unter Nutzung eines GFP-markierten Negativ-TALE-Vektors.....	131
Abbildung 76: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von miR-375 in differenzierten entodermalen Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (TALE-Transfektion).....	131
Abbildung 77: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von SOX17 in differenzierten entodermalen Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (TALE-Transfektion).....	132
Abbildung 78: Relative Quantifizierung der Transkriptmenge von FOXA2 in differenzierten entodermalen Zellen der Linien HUES-8 und IMR90-4 (TALE-Transfektion).....	133
Abbildung 79: Schematische Darstellung des Expressionsverlaufs bedeutender Gene, die mit ihrer Aktivität die einzelnen Etappen der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung charakterisieren	137
Abbildung 80: Schematische Darstellung der Einflussfaktoren, die in Folge der Ausbildung pankreatischer Vorläuferzellen zur Aktivierung von miR-375 beitragen können.....	145

Abbildung 81: Schematische Darstellung der Signalwege, die in Folge der Glukosestimulation die Ausbildung pankreatischer und speziell endokriner Vorläuferzellen beeinflussen können.....	155
Abbildung 82: Schematische Darstellung der mittels Glukosestimulation, Transfektion von miR-375 und kombinierter Anwendung beider Protokollmodifikationen vermittelten zellulären Effekte, die zur Verbesserung der pankreatischen <i>in vitro</i> Differenzierung beitragen.....	165
Abbildung 83: Schematische Darstellung von Pankreas-assoziierten mikroRNAs, die während des <i>in vitro</i> Differenzierungsverlaufs aktiviert werden und über die Regulation zahlreicher potenzieller Zielgene zur Formierung Insulin-produzierender Zellen beitragen.....	167
Abbildung 84: Zusammenstellung der Effekte einer Inhibitor-basierten Repression von miR-375 auf die entodermale <i>in vitro</i> Differenzierung von Zellen der Linien H9 und HUES-8.....	175
Abbildung 85: Schematische Darstellung potenzieller Mechanismen, die zur Aktivierung von mikroRNA-375 und zur Vermittlung der miR-induzierten Effekte beitragen können.....	176
Abbildung 86: Zusammenstellung der Effekte einer Transfektion von TALEs in Zellen der Linie HUES-8 und IMR90-4 zum Beginn der entodermalen <i>in vitro</i> Differenzierung.....	181
Abbildung 87: Schematische Darstellung von Einflussgrößen, die an der Regulation von Transfektionseffizienz und Ausmaß der intrazellulären Wirkung von TALEs beteiligt sind.....	182

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kulturmedium der humanen embryonalen Stammzelllinien H9 und HUES-8.....	39
Tabelle 2: Kulturmedium der humanen induzierten Stammzelllinie IMR90-4.....	39
Tabelle 3: Kulturmedium der murinen embryonalen Fibroblasten (MEF).....	40
Tabelle 4: Medium für die pankreatische <i>in vitro</i> Differenzierung der hESZ und hiPSZ.....	40
Tabelle 5: Vergleich der Expressionserhöhung von miR-375.....	109
Tabelle 6: Vergleich der Expressionserhöhung von PDX1.....	110
Tabelle 7: Vergleich der Expressionserhöhung von NGN3.....	111
Tabelle 8: Vergleich der Expressionserhöhung von INSULIN.....	112
Tabelle 9: Vergleich der Expressionserhöhung von MAFA.....	115
Tabelle 10: Vergleich der Expressionserhöhung von GLUCAGON.....	116
Tabelle 11: Vergleich der Steigerung des C-PEPTID-Gehalts im Medium.....	125
Tabelle 12: <i>Primer</i> für die semiquantitative RT-PCR.....	XII
Tabelle 13: <i>Primer</i> für die quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	XII
Tabelle 14: Sequenzen der analysierten reifen mikroRNAs / <i>pre</i> -mikroRNA.....	XIII

Tabelle 15: Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzanalysen..... XIII

Tabelle 16: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzanalysen..... XIV

Tabelle 12: *Primer* für die semiquantitative RT-PCR. Bei der Erstellung der *Primer* wurden Exon-Exon-Grenzen berücksichtigt. *Das 18S-rRNA *Primer*-Paar wurde aufgrund der gewählten Produktgröße von 111 bp auch für die qRT-PCR verwendet. (s) *sense*, (as) *antisense*, (bp) Basenpaare.

Gen	Primersequenz (5' - 3')	Produktgröße (bp)	Zykluszahl
ARX	(s) CTGCTGAAACGCAAACAGAG (as) GGGCCATTGTGAAAAGAG	502	45
BHLHE22	(s) ATCCCCAGAATCTCGGTCTT (as) CGCCAAAACCTTTGAGCATTT	498	45
CMYC	(s) TTCGGGTAGTGAAAACCAG (as) TAGGAGGCCAGCTTCTCTGA	490	45
KLF4	(s) ACTCGCCTTGCTGATTGTCT (as) GTGGAGAAAGATGGGAGCAG	294	45
LIN28	(s) GGTTCGGCTTCTGTCCATGA (as) GGTGGCAGCTTGCATTCCTTG	313	45
MEOX1	(s) GCAGCGTACCCTGACTTCTC (as) CGGTTCTGGAACCACACTTT	497	45
NANOG	(s) TTCCTTCTCCATGGATCTG (as) ACTGGATGTTCTGGGTCTGG	483	45
NEUROD1	(s) TAGACCTGCTAGCCCCTCAG (as) GCCTTCATGCGTCTCAATTT	505	45
NEUROD6	(s) CTGAGAATCGGCAAGAGACC (as) CTGCACAGTAATGCATGCCG	433	45
NKX6-1	(s) ATTTCGTTGGGGATGACAGAG (as) TCAACAGCTGCGTGATTTTC	219	45
OCT4	(s) AGTGAGAGGCAACCTGGAGA (as) CAAAAACCTGGCACAAACT	447	45
ONECUT2	(s) GGTCTCAGGGGACTCTCTCC (as) TCCGGTGTCTTTTTCTTTG	511	45
PAX4	(s) GGCAAGAGAAGCTCAAGTGG (as) ACACAGGAGGGAGCAATCAC	498	45
PAX6	(s) ACCCATTATCCAGATGTGTTTGCCCGAG (as) ATGGTGAAGCTGGGCATAGGCGGCAG	317	45
SOX2	(s) AGTCTCCAAGCGACGAAAAA (as) GGAAAGTTGGGATCGAACAA	410	45
18S-rRNA*	(s) ACTCAACACGGGAAACCTCACC (as) CGCTCCACCAACTAAGAACGG	111	40

Tabelle 13: *Primer* für die quantitative *Real-Time* PCR. Die Erstellung der *Primer* erfolgte unter Beachtung der Exon-Exon-Grenzen. (s) *sense*, (as) *antisense*, (bp) Basenpaare.

Gen	Primersequenz (5' - 3')	Produktgröße (bp)	Zykluszahl
CHREBP	(s) ATCTCAGACACTCTTCCACCATGA (as) TGCCGACGTAGGCATCCT	79	45
FOXA2	(s) AAAAGCCTCCGGTTTCCACTA (as) TCAGAACTGCAGGTGCTTGA	62	45
GLUCAGON	(s) TGCTGATGGTTCTTCTCTGATG (as) CCTGTCAGTGATTTGGTCTGAAT	100	45
INSULIN	(s) CACACCTGGTGAAGCTCCTA (as) TCCGGCGGGTCTTG	73	45
NEUROD1	(s) GCTCCCATGTCTTCCAGTT (as) ATCAGTCAGAGGGCTTTCAAAGAA	83	45
NGN3	(s) GCTGCTCATCGCTCTCTATTCTT (as) CGAGGGTTGAGGCGTCAT	58	45
MAFA	(s) GTTTCGTTTTGTTTGTGGAATCTTT (as) CTCCGAAAACGGGCAGATC	135	45
PDX1	(s) GGCGTTGTTTGTGGCTGTT (as) GTCCCAAGGTGGAGTGTGTA	59	45
SOMATOSTATIN	(s) CTGCTAACTCAAACCCGGCTAT (as) CAGGATGTGAAAGTCTTCCAGAAG	82	45
SOX17	(s) CCAGAGGCTTTTTGGATGTTTT (as) AGGTAACTGAATGTCGAGGAGTGT	70	45

Tabelle 14: Sequenzen der analysierten reifen mikroRNAs / *pre*-mikroRNA

mikroRNA	Sequenz der analysierten reifen mikroRNAs / <i>pre</i>-mikroRNA (5' - 3')
miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
<i>pre</i> -miR-375	CCCCGCGACGAGCCCCUCGCACAAACCGGACCUGAGCGUUUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGAGGC
miR-30d	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG
miR-124a	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC
miR-335	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU
miR-200c	UAUACUGCCGGUAAUGAUGGA
miR-182	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU
miR-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA

Tabelle 15: Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzanalysen

	Hersteller	erzeugt in (Spezies)	Konzentration	Zielgewebe	Klonalität
Anti-OCT4	Peprotech, Hamburg (Human ESC/iPSC Characterization Kit)	Kaninchen	gebrauchs- fertige Lösung	humane pluripotente Stammzellen	keine Angabe
Anti-SOX2		Kaninchen			
Anti-SSEA-4		Maus			
Anti-NANOG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Ziege	1:50		polyklonal
Anti-SOX17	Abcam, Cambridge Großbritannien	Maus	1:50	Entoderm	monoklonal
Anti FOXA2	Merck Millipore, Schwalbach	Kaninchen	1:50	Entoderm	polyklonal
Anti-PDX1	Abcam, Cambridge Großbritannien	Kaninchen	1:500	Pankreas (pankreatische Vorläuferzellen)	polyklonal
Anti-NGN3	Merck Millipore, Schwalbach	Kaninchen	1:50	Pankreas (endokrine Vorläuferzellen)	polyklonal
Anti-INSULIN	Abcam, Cambridge Großbritannien	Meerschwein	1:50	β-Zellen (endokrine Vorläuferzellen)	polyklonal
Anti-C-Peptid	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main	Kaninchen	1:50	β-Zellen (endokrine Vorläuferzellen)	polykolonal
Anti-SOMATO- STATIN	Biomeda, Foster City Kalifornien	Kaninchen	1:50	δ-Zellen (endokrine Vorläuferzellen)	polyklonal
Anti- GLUCAGON	DakoCytomation, Glostrup Dänemark	Kaninchen	1:50	α-Zellen (endokrine Vorläuferzellen)	polyklonal

Tabelle 16: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzanalysen

	Hersteller	erzeugt in (Spezies)	gerichtet gegen (Spezies)	Konzentration	Klonalität
Alexa Fluor 488	Life Technologies, Darmstadt	Ziege	Maus	1:200	polyklonal
Alexa Fluor 488			Kaninchen		
Cy TM 5 AffiniPure	DIANOVA, Hamburg	Ziege	Kaninchen		
DyLight 488 (H+L)		Esel	Ziege		
FITC (H+L)	Abcam, Cambridge Großbritannien	Ziege	Meerschwein		
Sekundärantikörper für: OCT4, SOX2 und SSEA-4	Peprotech, Hamburg (Human ESC/iPSC Characterization Kit)	Ziege	OCT4 / SOX2: Kaninchen, SSEA-4: Maus	gebrauchsfertige Lösung	keine Angaben

Literaturverzeichnis

- Abdelalim, E. M.;** Emara, M. M. (2015). Advances and challenges in the differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic β cells. *World Journal of Stem Cells*. 7. 1. (174-181).
- Abdelmohsen, K.;** Hutchison, E. R.; Lee, E. K.; Kuwano, Y.; Kim, M. M.; Masuda, K.; Srikantan, S.; Subaran, S. S.; Marasa, B. S.; Mattson, M. P.; Gorospe, M. (2010). miR-375 Inhibits Differentiation of Neurites by Lowering HuD Levels. *Molecular and Cellular Biology*. 30. 17. (4197-4210).
- Ahlgren, U.;** Jonsson, J.; Edlund, H. (1996). The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development*. 122. 5. (1409-1416).
- Ahlgren, U.;** Jonsson, J.; Jonsson, L.; Simu, K.; Edlund, H. (1998). β -Cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the β -cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & Development*. 12. 12. (1763-1768).
- Akerblom, M.;** Jakobsson, J. (2014). MicroRNAs as Neuronal Fate Determinants. *The Neuroscientist*. 20. 3. (235-242).
- Aksoy, I.;** Jauch, R.; Chen, J.; Dyla, M.; Divakar, U.; Bogu, G. K.; Teo, R.; Leng Ng, C. K.; Herath, W.; Lili, S.; Hutchins, A. P.; Robson, P.; Kolatkar, P. R.; Stanton, L. W. (2013). Oct4 switches partnering from Sox2 to Sox17 to reinterpret the enhancer code and specify endoderm. *The EMBO Journal*. 32. 7. (938-953).
- Ali, M. K.;** Narayan, K. V.; Tandon, N. (2010). Diabetes & coronary heart disease: Current perspectives. *The Indian Journal of Medical Research*. 132. 5. (584-597).
- Ammälä, C.;** Eliasson, L.; Bokvist, K.; Berggren, P. O.; Honkanen, R. E.; Sjöholm, A.; Rorsman, P. (1994). Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91. 10. (4343-4347).
- Andersson, E.;** Tryggvason, U.; Deng, Q.; Friling, S.; Alekseenko, Z.; Robert, B.; Perlmann, T.; Ericson, J. (2006). Identification of Intrinsic Determinants of Midbrain Dopamine Neurons. *Cell*. 124. 2. (393-405).
- Andrali, S. S.;** Qian, Q.; Özcan, S. (2007). Glucose Mediates the Translocation of NeuroD1 by O-Linked Glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 282. 21. (15589-15596).
- Andrali, S. S.;** Sampley, M. L.; Vanderford, N. L.; Özcan, S. (2008). Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *The Biochemical Journal*. 415. 1. (1-10).
- Arabadjiev, B.;** Petkova, R.; Momchilova, A.; Chakarov, S.; Pankov, R. (2012). Of mice and men – differential mechanisms of maintaining the undifferentiated state in mESC and hESC. *BioDiscovery*. 2012. 3. (1-13).
- Araki, R.;** Uda, M.; Hoki, Y.; Sunayama, M.; Nakamura, M.; Ando, S.; Sugiura, M.; Ideno, H.; Shimada, A.; Nifuji, A.; Abe, M. (2013). Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 494. 7435. (100–104).
- Aramata, S.;** Han, S.-I.; Yasuda, K.; Kataoka, K. (2005). Synergistic activation of the insulin gene promoter by the β -cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1730. 1. (41-46).
- Aronica, S. M.;** Katzenellenbogen, B. S. (1993). Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate and insulin-like growth factor-I. *Molecular Endocrinology*. 7. 6. (743-752).

Avnit-Sagi, T.; Kantorovich, L.; Kredo-Russo, S.; Hornstein, E.; Walker, M. D. (2009). The Promoter of the pri-miR-375 Gene Directs Expression Selectively to the Endocrine Pancreas. *PLoS One*. 4. 4. (e5033).

Avrahami, D.; Kaestner, K. H. (2012). Epigenetic regulation of pancreas development and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 23. 6. (693-700).

Baccarini, A.; Chauhan, H.; Gardner, T. J.; Jayaprakash, A. D.; Sachidanandam, R.; Brown, B. D. (2011). Kinetic Analysis Reveals the Fate of a MicroRNA following Target Regulation in Mammalian Cells. *Current Biology*. 21. 5. (369-376).

Baek, D.; Villén, J.; Shin, C.; Camargo, F. D.; Gygi, S. P.; Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 455. 7209. (64-71).

Baetge, E. E. (2008). Production of β -cells from human embryonic stem cells. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 10. Suppl 4. (186-194).

Bail, S.; Swerdel, M.; Liu, H.; Jiao, X.; Goff, L. A.; Hart, R. P.; Kiledjian, M. (2010). Differential regulation of microRNA stability. *RNA*. 16. 5. (1032-1039).

Bar-Nur, O.; Russ, H. A.; Efrat, S.; Benvenisty, N. (2011). Epigenetic Memory and Preferential Lineage-Specific Differentiation in Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Human Pancreatic Islet Beta Cells. *Cell Stem Cell*. 9. 1. (17-23).

Baroukh, N.; Ravier, M. A.; Loder, M. K.; Hill, E. V.; Bounacer, A.; Scharfmann, R.; Rutter, G. A.; Van Obberghen, E. (2007). MicroRNA-124a Regulates Foxa2 Expression and Intracellular Signaling in Pancreatic β -Cell Lines. *The Journal of Biological Chemistry*. 282. 27. (19575-19588).

Baroukh, N. N.; Van Obberghen, E. (2009). Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain. *The FEBS Journal*. 276. 22. (6509-6521).

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 116. 2. (281-297).

Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 136. 2. (215-233).

Basford, C. L.; Prentice, K. J.; Hardy, A. B.; Sarangi, F.; Micallef, S. J.; Li, X.; Guo, Q.; Elefanty, A. G.; Stanley, E. G.; Keller, G.; Allister, E. M.; Nostro, M. C.; Wheeler, M. B. (2012). The functional and molecular characterisation of human embryonic stem cell-derived insulin-positive cells compared with adult pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 55. 2. (358-371).

Baxter, K. K.; Uittenbogaard, M.; Yoon, J.; Chiaramello, A. (2009). The Neurogenic Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor NeuroD6 Concomitantly Increases Mitochondrial mass and Regulates Cytoskeletal Organization in the Early Stages of Neuronal Differentiation. *ASN Neuro*. 1. 4. (AN20090036).

Beqqali, A.; Kloots, J.; Ward-van Oostwaard, D.; Mummery, C.; Passier, R. (2006). Genome-Wide Transcriptional Profiling of Human Embryonic Stem Cells Differentiating to Cardiomyocytes. *Stem Cells*. 24. 8. (1956-1967).

Bernstein, E.; Kim, S. Y.; Carmell, M. A.; Murchison, E. P.; Alcorn, H.; Li, M. Z.; Mills, A. A.; Elledge, S. J.; Anderson, K. V.; Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics*. 35. 3. (215-217).

Blahna, M. T.; Hata, A. (2012). Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Letters*. 586. 14. (1906-1912).

Blow, N. (2009). Journeys across the membrane. *Nature Methods*. 6. 4. (305-309).

Boch, J. (2011). TALEs of genome targeting. *Nature Biotechnology*. 29. 2. (135).

- Boch, J.;** Scholze, H.; Schornack, S.; Landgraf, A.; Hahn, S.; Kay, S.; Lahaye, T.; Nickstadt, A.; Bonas, U. (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*. 326. 5959. (1509-1512).
- Braun, J. E.;** Huntzinger, E.; Fauser, M.; Izaurralde, E. (2011). GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylation Complexes to miRNA Targets. *Molecular Cell*. 44. 1. (120-133).
- Bricambert, J.;** Miranda, J.; Benhamed, F.; Girard, J.; Postic, C.; Dentin, R. (2010). Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 120. 12. (4316-4331).
- Bruin, J. E.;** Reznia, A.; Xu, J.; Narayan, K.; Fox, J.; O'Neil, J.; Kieffer, T. J. (2013). Maturation and function of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors in macroencapsulation devices following transplant into mice. *Diabetologia*. 56. 9. (1987-1998).
- Bruin, J. E.;** Erener, S.; Vela, J.; Hu, X.; Johnson, J. D.; Kurata, H. T.; Lynn, F. C.; Piret, J. M.; Asadi, A.; Reznia, A.; Kieffer, T. J. (2014). Characterization of polyhormonal insulin-producing cells derived in vitro from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*. 12. 1. (194-208).
- Bucher, O.;** Wartenberg, H. (1997). Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Huber. Bern. ISBN: 3-456-82785-7.
- Bultmann, S.;** Morbitzer, R.; Schmidt, C. S.; Thanisch, K.; Spada, F.; Elsaesser, J.; Lahaye, T.; Leonhardt, H. (2012). Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Research*. 40. 12. (5368-5377).
- Burgess, R. J.;** Agathocleous, M.; Morrison, S. J. (2014). Metabolic regulation of stem cell function. *Journal of Internal Medicine*. 276. 1. (12-24).
- Büttner, D.;** Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of Xanthomonas virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews*. 34. 2. (107-133).
- Butz, H.;** Rácz, K.; Hunyady, L.; Patócs, A. (2012). Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNA machinery. *Trends in Pharmacological Sciences*. 33. 7. (382-393).
- Campbell, N. A.;** Reece, J. B.; Kratochwil, A.; Lazar, T. (2012). Biologie. Pearson Studium. München. ISBN: 9783827372871.
- Cano, D.;** Soria, B.; Martín, F.; Rojas, A. (2014). Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 71. 13. (2383-2402).
- Cao, L.-Z.;** Tang, D.-Q.; Horb, M. E.; Li, S.-W.; Yang, L.-J. (2004). High Glucose Is Necessary for Complete Maturation of Pdx1-VP16-Expressing Hepatic Cells into Functional Insulin-Producing Cells. *Diabetes*. 53. 12. (3168-3178).
- CarlRoth** (2015). Carlroth.com. URL: <https://www.carlroth.com/catalogue/catalogue.do?favOid=000000000014b2c00030023&act=showBookmark&lang=de-de&market=AT>. Stand: 16.07.2015.
- Cha-Molstad, H.;** Saxena, G.; Chen, J.; Shalev, A. (2009). Glucose-stimulated Expression of Txnip Is Mediated by Carbohydrate Response Element-binding Protein, p300, and Histone H4 Acetylation in Pancreatic Beta Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 284. 25. (16898-16905).
- Chen, B.;** Zhang, B.; Luo, H.; Yuan, J.; Skogerbø, G.; Chen, R. (2012). Distinct MicroRNA Subcellular Size and Expression Patterns in Human Cancer Cells. *International Journal of Cell Biology*. 2012. (672462).
- Chen, L.;** Yan, H.-X.; Chen, J.; Yang, W.; Liu, Q.; Zhai, B.; Cao, H.-F.; Liu, S.-Q.; Wu, M.-C.; Wang, H.-Y. (2007).

Negative Regulation of c-Myc Transcription by Pancreas Duodenum Homeobox-1. *Endocrinology*. 148. 5. (2168-2180).

Chen, S.; Borowiak, M.; Fox, J. L.; Maehr, R.; Osafune, K.; Davidow, L.; Lam, K.; Peng, L. F.; Schreiber, S. L.; Rubin, L. L.; Melton, D. (2009). A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nature Chemical Biology*. 5. 4. (258-265).

Chen, T.; Dent, S. Y. R. (2014). Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nature Reviews. Genetics*. 15. 2. (93-106).

Chen, X.; Liang, H.; Zhang, J.; Zen, K.; Zhang, C.-Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends in Cell Biology*. 22. 3. (125-132).

Chen, Y.; Verfaillie, C. M. (2014). MicroRNAs: the fine modulators of liver development and function. *Liver International*. 34. 7. (976-990).

Chi, S. W.; Zang, J. B.; Mele, A.; Darnell, R. B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*. 460. 7254. (479-486).

Chmielowiec, J.; Borowiak, M. (2014). In Vitro Differentiation and Expansion of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors. *The Review of Diabetic Studies*. 11. 1. (19-34).

Choo, A. B.; Tan, H. L.; Ang, S. N.; Fong, W. J.; Chin, A.; Lo, J.; Zheng, L.; Hentze, H.; Philp, R. J.; Oh, S. K. W.; Yap, M. (2008). Selection Against Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells by a Cytotoxic Antibody Recognizing Podocalyxin-Like Protein-1. *Stem Cells*. 26. 6. (1454-1463).

Chu, C.-Y.; Rana, T. M. (2006). Translation Repression in Human Cells by MicroRNA-Induced Gene Silencing Requires RCK/p54. *PLoS Biology*. 4. 7. (e210).

Chu, K.; Tsai, M.-J. (2005). Neuronatin, a downstream target of BETA2/NeuroD1 in the pancreas, is involved in glucose-mediated insulin secretion. *Diabetes*. 54. 4. (1064-1073).

Churko, J.; Burridge, P.; Wu, J. (2013). Generation of Human iPSCs from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Non-integrative Sendai Virus in Chemically Defined Conditions. In: Kao, R. L. (Hg.) *Cellular Cardiomylasty*. 1036. (81-88).

Collombat, P.; Mansouri, A.; Hecksher-Sorensen, J.; Serup, P.; Krull, J.; Gradwohl, G.; Gruss, P. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & Development*. 17. 20. (2591-2603).

Cowan, C. A.; Klimanskaya, I.; McMahon, J.; Atienza, J.; Witmyer, J.; Zucker, J. P.; Wang, S.; Morton, C. C.; McMahon, A. P.; Powers, D.; Melton, D. A. (2004). Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. *The New England Journal of Medicine*. 350. 13. (1353-1356).

Cyranoski, D. (2013). Stem cells cruise to clinic. *Nature News*. 494. 7438. (413).

Da Silva Xavier, G.; Sun, G.; Qian, Q.; Rutter, G. A.; Leclerc, I. (2010). ChREBP regulates Pdx-1 and other glucose-sensitive genes in pancreatic β -cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 402. 2. (252-257).

Daily, K.; Patel, V. R.; Rigor, P.; Xie, X.; Baldi, P. (2011). MotifMap: integrative genome-wide maps of regulatory motif sites for model species. *BMC Bioinformatics*. 12. 1. (495-508).

D'Amour, K. A.; Agulnick, A. D.; Eliazer, S.; Kelly, O. G.; Kroon, E.; Baetge, E. E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature Biotechnology*. 23. 12. (1534-1541).

- D'Amour, K. A.;** Bang, A. G.; Eliazer, S.; Kelly, O. G.; Agulnick, A. D.; Smart, N. G.; Moorman, M. A.; Kroon, E.; Carpenter, M. K.; Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 24. 11. (1392-1401).
- Davis, B. N.;** Hilyard, A. C.; Lagna, G.; Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*. 454. 7200. (56-61).
- Davis, B. N.;** Hilyard, A. C.; Nguyen, P. H.; Lagna, G.; Hata, A. (2010). Smad Proteins Bind a Conserved RNA Sequence to Promote MicroRNA Maturation by Drosha. *Molecular Cell*. 39. 3. (373-384).
- Dawson, E.;** Mapili, G.; Erickson, K.; Taqvi, S.; Roy, K. (2008). Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60. 2. (215-228).
- Deaton, A. M.;** Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*. 25. 10. (1010-1022).
- Deramaudt, T. B.;** Sachdeva, M. M.; Wescott, M. P.; Chen, Y.; Stoffers, D. A.; Rustgi, A. K. (2006). The PDX1 Homeodomain Transcription Factor Negatively Regulates the Pancreatic Ductal Cell-specific Keratin 19 Promoter. *The Journal of Biological Chemistry*. 281. 50. (38385-38395).
- Dhara, S. K.;** Stice, S. L. (2008). Neural differentiation of human embryonic stem cells. *The Journal of Cellular Biochemistry*. 105. 3. (633-640).
- Dhawan, S.;** Georgia, S.; Tschen, S.-I.; Fan, G.; Bhushan, A. (2011). Pancreatic β Cell Identity Is Maintained by DNA Methylation-Mediated Repression of Arx. *Developmental Cell*. 20. 4. (419-429).
- diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe** (2015). Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2015 - Die Bestandsaufnahme. Mainz. Online verfügbar unter: http://www.diabetesde.org/fileadmin/users/Patientenseite/PDFs_und_TEXTE/Infomaterial/Gesundheitsbericht_2015.pdf.
- Diederichs, S.;** Haber, D. A. (2007). Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression. *Cell*. 131. 6. (1097–1108).
- Ding, X.;** Saxena, N. K.; Lin, S.; Gupta, N. A.; Anania, F. A. (2006). Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology*. 43. 1. (173–181).
- Dingermann, T.;** Zündorf, I. (2013). Diabetes mellitus und die β -Zelle. *Pharmakon*. 1. 2. (112–119).
- Doench, J. G.;** Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development*. 18. 5. (504–511).
- Dorrell, C.;** Grompe, M. T.; Pan, F. C.; Zhong, Y.; Canaday, P. S.; Shultz, L. D.; Greiner, D. L.; Wright, C. V.; Streeter, P. R.; Grompe, M. (2011). Isolation of mouse pancreatic alpha, beta, duct and acinar populations with cell surface markers. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 339. 1-2. (144-150).
- Dreos, R.;** Ambrosini, G.; Périer, R. C.; Bucher, P. (2015). The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPD-new and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 43. D1. (92-96).
- Duarte A. I.;** Moreira P.; Oliveira C. R. (2012). Insulin in Central Nervous System: More than Just a Peripheral Hormone. *Journal of Aging Research*. 2012. (1-21).
- Dubois, N. C.;** Craft, A. M.; Sharma, P.; Elliott, D. A.; Stanley, E. G.; Elefanty, A. G.; Gramolini, A.; Keller, G. (2011). SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 29. 11. (1011-1018).

- Dweep, H.; Gretz, N.** (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature Methods*. 12. 8. (697).
- Ebert, A. D.; Svendsen, C. N.** (2010). Human stem cells and drug screening: opportunities and challenges. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 9. 5. (367-372).
- Ebert, M. S.; Sharp, P. A.** (2010). Emerging Roles for Natural MicroRNA Sponges. *Current Biology*. 20. 19. (858-861).
- Edlund, H.** (2002). Pancreatic organogenesis - developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature Reviews. Genetics*. 3. 7. (524-532).
- Efroni, S.; Duttagupta, R.; Cheng, J.; Dehghani, H.; Hoepfner, D. J.; Dash, C.; Bazett-Jones, D. P.; Le Grice, S.; McKay, R. D. G.; Buetow, K. H.; Gingeras, T. R.; Misteli, T.; Meshorer, E.** (2008). Global Transcription in Pluripotent Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2. 5. (437-447).
- Eliasson, L.; Esguerra, J. L. S.** (2014). Role of non-coding RNAs in pancreatic beta-cell development and physiology. *Acta Physiologica*. 211. 2. (273-284).
- EMBL-EBI Enright Lab** (2015). ebi.ac.uk. URL: <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>. Stand: 28.09.2015.
- Esguerra, J. L. S.; Bolmeson, C.; Cilio, C. M.; Eliasson, L.** (2011). Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat. *PLoS One*. 6. 4. (e18613).
- Evans, M. J.; Kaufman, M. H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292. 5819. (154-156).
- Farre, D.; Roset R.; Huerta, M.; Adsuara J. E.; Roselló L.; Albà M. M.; Messeguer X.** (2003). Identifikation of patterns in biological sequences at the ALGGEN server. *Nucleic Acids Research*. 31. 13. (3651-3653).
- Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M.** (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84. 21. (7413-7417).
- Fernandez-Zapico, M. E.; van Velkinburgh, J. C.; Gutiérrez-Aguilar, R.; Neve, B.; Froguel, P.; Urrutia, R.; Stein, R.** (2009). MODY7 gene, KLF11, is a novel p300-dependent regulator of Pdx-1 (MODY4) transcription in pancreatic islet β cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 284. 52. (36482-36490).
- Filhoulaud, G.; Guilmeau, S.; Dentin, R.; Girard, J.; Postic, C.** (2013). Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 24. 5. (257-268).
- Filipowicz, W.; Bhattacharyya, S. N.; Sonenberg, N.** (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews. Genetics*. 9. 2. (102-114).
- Filippova, G. N.** (2008). Genetics and Epigenetics of the Multifunctional Protein CTCF. *Current Topics in Developmental Biology*. 80. (337-360).
- Fogel, G. B.; Kai, Z. S.; Zargar, S.; Hinton, A.; Jones, G. A.; Wong, A. S.; Ficici, S. G.; Lopez, A. D.; King, C. C.** (2015). MicroRNA dynamics during human embryonic stem cell differentiation to pancreatic endoderm. *Gene*. 574. 2. (359-370).
- Folmes, C. D. L.; Nelson, T. J.; Martinez-Fernandez, A.; Arrell, D. K.; Lindor, J. Z.; Dzeja, P. P.; Ikeda, Y.; Perez-Terzic, C.; Terzic, A.** (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metabolism*. 14. 2. (264-271).

- Francis, N.;** Moore, M.; Asan, S. G.; Rutter, G. A.; Burns, C. (2015). Changes in microRNA expression during differentiation of embryonic and induced pluripotent stem cells to definitive endoderm. *Gene Expression Patterns*. 19. 1-2. (70-82).
- Friedman, R. C.;** Farh, K. K.-H.; Burge, C. B.; Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. 19. 1. (92-105).
- Fusaki, N.;** Ban, H.; Nishiyama, A.; Saeki, K.; Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 85. 8. (348-362).
- Gaarenstroom, T.; Hill, C. S.** (2014). TGF- β signaling to chromatin: How Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 32. (107-118).
- Gan, Q.;** Yoshida, T.; McDonald, O. G.; Owens, G. K. (2007). Concise Review: Epigenetic Mechanisms Contribute to Pluripotency and Cell Lineage Determination of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 25. 1. (2-9).
- Gantier, M. P.;** McCoy, C. E.; Rusinova, I.; Saulep, D.; Wang, D.; Xu, D.; Irving, A. T.; Behlke, M. A.; Hertzog, P. J.; Mackay, F.; Williams, B. R. G. (2011). Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Research*. 39. 13. (5692-5703).
- Gaspar-Maia, A.;** Alajem, A.; Meshorer, E.; Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 12. 1. (36-47).
- Gilbert, E. R.;** Liu, D. (2012). Epigenetics: the missing link to understanding β -cell dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Epigenetics*. 7. 8. (841-852).
- Gittes, G. K.;** Prasadani, K.; Tulachan, S. (2010). Pancreas and Islet Development. In: Efrat, S. (Hg.) *Stem Cell Therapy for Diabetes*. 2010. (3-40).
- Gore, A.;** Li, Z.; Fung, H.-L.; Young, J. E.; Agarwal, S.; Antosiewicz-Bourget, J.; Canto, I.; Giorgetti, A.; Israel, M. A.; Kiskinis, E.; Lee, J.-H.; Loh, Y.-H.; Manos, P. D.; Montserrat, N.; Panopoulos, A. D.; Ruiz, S.; Wilbert, M. L.; Yu, J.; Kirkness, E. F.; Izpisua Belmonte, J. C.; Rossi, D. J.; Thomson, J. A.; Eggan, K.; Daley, G. Q.; Goldstein, L. S. B.; Zhang, K. (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 471. 7336. (63-67).
- Götz, M.;** Stoykova, A.; Gruss, P. (1998). Pax6 Controls Radial Glia Differentiation in the Cerebral Cortex. *Neuron*. 21. 5. (1031-1044).
- Gradwohl, G.;** Dierich, A.; LeMeur, M.; Guillemot, F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97. 4. (1607-1611).
- Greber, B.;** Lehrach, H.; Adjaye, J. (2007). Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Transforming Growth Factor β Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts and Human ESCs (hESCs) to Support hESC Self-Renewal. *Stem Cells*. 25. 2. (455-464).
- Greber, B.;** Wu, G.; Bernemann, C.; Joo, J. Y.; Han, D. W.; Ko, K.; Tapia, N.; Sabour, D.; Sterneckert, J.; Tesar, P.; Schöler, H. R. (2010). Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 6. 3. (215-226).
- Gregory, R. I.;** Yan, K.-p.; Amuthan, G.; Chendrimada, T.; Doratotaj, B.; Cooch, N.; Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 432. 7014. (235).
- Groebner, M.;** David, R.; Franz, W. M. (2006). Embryonale Stammzellen. *Der Internist*. 47. 5. (502-508).

Groth, D. (2000). Entwicklung von liposomalen Gentransfersvesikeln auf der Grundlage optimierter kationischer Lipide. Dissertation (Dr. rer. nat.), angefertigt am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin. Berlin.

Guay, C.; Regazzi, R. (2013). Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology*. 9 9. (513-521).

Guillemain, G.; Filhoulaud, G.; Da Silva Xavier, G.; Rutter, G. A.; Scharfmann, R. (2007). Glucose Is Necessary for Embryonic Pancreatic Endocrine Cell Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. 282. 20. (15228-15237).

Guinez, C.; Filhoulaud, G.; Rayah-Benamed, F.; Marmier, S.; Dubuquoy, C.; Dentin, R.; Moldes, M.; Burnol, A.-F.; Yang, X.; Lefebvre, T.; Girard, J.; Postic, C. (2011). O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*. 60. 5. (1399-1413).

Guo, T.; Hebrok, M. (2009). Stem cells to Pancreatic β -Cells: New Sources for Diabetes Cell Therapy. *Endocrine Reviews*. 30. 3. (214-227).

Hansen, T. B.; Jensen, T. I.; Clausen, B. H.; Bramsen, J. B.; Finsen, B.; Damgaard, C. K.; Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 495. 7441. (384-388).

Hansson, M.; Tønning, A.; Frandsen, U.; Petri, A.; Rajagopal, J.; Englund, M. C.; Heller, R. S.; Hakansson, J.; Fleckner, J.; Skold, H. N.; Melton, D.; Semb, H.; Serup, P. (2004). Artfactual Insulin Release From Differentiated Embryonic Stem Cells. *Diabetes*. 53. 10. (2603-2609).

Hebrok, M.; Kim, S. K.; Jacques, B. S.; McMahon, A. P.; Melton, D. A. (2000). Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development*. 127. 22. (4905-4913).

Hebrok, M. (2012). Generating β Cells from Stem Cells-The Story So Far. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2. 6. (a007674).

Heidemann, C.; Boeing, H.; Pischon, T.; Nöthlings, U.; Joost, H.-G.; Schulze, M. B. (2009). Association of a diabetes risk score with risk of myocardial infarction, stroke, specific types of cancer, and mortality: a prospective study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam cohort. *European Journal of Epidemiology*. 24. 6. (281-288).

Heisler, S. (1983). Forskolin potentiates calcium-dependent amylase secretion from rat pancreatic acinar cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 61. 10. (1168-1176).

Henseleit, K. D.; Nelson, S. B.; Kuhlbrodt, K.; Hennings, J. C.; Ericson, J.; Sander, M. (2005). NKX6 transcription factor activity is required for α - and β -cell development in the pancreas. *Development*. 132. 13. (3139-3149).

Hering, B. J.; Bellin, M. D. (2015). Transplantation: Sustained benefits of islet transplants for T1DM. *Nature Reviews. Endocrinology*. 11. 10. (572-574).

Herold, G. (2015). Innere Medizin 2015. Selbstverlag. Köln. ISBN: 9783981466041.

Herszfeld, D.; Wolvetang, E.; Langton-Bunker, E.; Chung, T.-L.; Filipczyk, A. A.; Houssami, S.; Jamshidi, P.; Koh, K.; Laslett, A. L.; Michalska, A.; Nguyen, L.; Reubinoff, B. E.; Tellis, I.; Auerbach, J. M.; Ording, C. J.; Looijenga, L. H. J.; Pera, M. F. (2006). CD30 is a survival factor and a biomarker for transformed human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 24. 3. (351-357).

Hien, P.; Böhm, B. (2007). Diabetes-Handbuch. Eine Anleitung für Praxis und Klinik. Springer Medizin Verlag Heidelberg. Heidelberg. ISBN: 9783540485513.

Hien, P.; Claudi-Böhm, S.; Böhm, B. (2014). Diabetes 1x1. Diagnostik, Therapie, Verlaufskontrolle. Springer Berlin Heidelberg. Berlin und Heidelberg. ISBN: 978-3-642-44975-8.

Hinton, A.; Afrikanova, I.; Wilson, M.; King, C. C.; Maurer, B.; Yeo, G. W.; Hayek, A.; Pasquinelli, A. E. (2010). A Distinct MicroRNA Signature for Definitive Endoderm Derived From Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 19. 6. (797-807).

Hinton, A.; Hunter, S. E.; Afrikanova, I.; Jones, G. A.; Lopez, A. D.; Fogel, G. B.; Hayek, A.; King, C. C. (2014). sRNA-seq Analysis of Human Embryonic Stem Cells and Definitive Endoderm Reveals Differentially Expressed MicroRNAs and Novel IsomiRs with Distinct Targets. *Stem Cells*. 32. 9. (2360-2372).

Hou, P.-S.; Chuang, C.-Y.; Kao, C.-F.; Chou, S.-J.; Stone, L.; Ho, H.-N.; Chien, C.-L.; Kuo, H.-C. (2013). LHX2 regulates the neural differentiation of human embryonic stem cells via transcriptional modulation of PAX6 and CER1. *Nucleic Acids Research*. 41. 16. (7753-7770).

Hrvatin, S.; O'Donnell, C. W.; Deng, F.; Millman, J. R.; Pagliuca, F. W.; Dilorio, P.; Rezaia, A.; Gifford, D. K.; Melton, D. A. (2014). Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, β cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111. 8. (3038-3043).

Hsu, J. B.-K.; Chiu, C.-M.; Hsu, S.-D.; Huang, W.-Y.; Chien, C.-H.; Lee, T.-Y.; Huang, H.-D. (2011). miRTar: an integrated system for identifying miRNA-target interactions in human. *BMC Bioinformatics*. 12. (300).

Huang, G.; Ye, S.; Zhou, X.; Liu, D.; Ying, Q.-L. (2015). Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72. 9. (1741-1757).

Huang, V.; Li, L.-C. (2012). miRNA goes nuclear. *RNA Biology*. 9. 3. (269-273).

Huangfu, D.; Maehr, R.; Guo, W.; Eijkelenboom, A.; Snitow, M.; Chen, A. E.; Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature Biotechnology*. 26. 7. (795-797).

Huettl, R.-E.; Eckstein, S.; Stahl, T.; Petricca, S.; Ninkovic, J.; Götz, M.; Huber, A. B. (2015). Functional dissection of the Pax6 paired domain: Roles in neural tube patterning and peripheral nervous system development. *Developmental Biology*. In Druck. Stand: 03.12.2015.

Hummel, M.; Achenbach, P. (2015). Diabetes mellitus Typ 1. *Der Internist*. 56. 5. (475-483).

Huntzinger, E.; Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews. Genetics*. 12. 2. (99-110).

Hyka-Nouspikel, N.; Desmarais, J.; Gokhale, P. J.; Jones, M.; Meuth, M.; Andrews, P. W.; Nouspikel, T. (2012). Deficient DNA Damage Response and Cell Cycle Checkpoints Lead to Accumulation of Point Mutations in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 30. 9. (1901-1910).

Iguchi, H.; Urashima, Y.; Inagaki, Y.; Ikeda, Y.; Okamura, M.; Tanaka, T.; Uchida, A.; Yamamoto, T. T.; Kodama, T.; Sakai, J. (2007). SOX6 Suppresses Cyclin D1 Promoter Activity by Interacting with β -Catenin and Histone Deacetylase 1, and Its Down-regulation Induces Pancreatic β -Cell Proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*. 282. 26. (19052-19061).

Iizuka, K. (2013). Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism. *Endocrine Journal*. 60. 5. (543-555).

International Diabetes Federation (2013). IDF Diabetes Atlas Sixth edition. Online verfügbar unter: http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf. Stand: 15.07.2015.

Iorio, M. V.; Piovani, C.; Croce, C. M. (2010). Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: An intricate network. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1799. 10-12. (694-701).

Ishizuka, N.; Minami, K.; Okumachi, A.; Okuno, M.; Seino, S. (2007). Induction by NeuroD of the components required for regulated exocytosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 354. 1. (271-277).

Itoh, Y.; Kawamata, Y.; Harada, M.; Kobayashi, M.; Fujii, R.; Fukusumi, S.; Ogi, K.; Hosoya, M.; Tanaka, Y.; Uejima, H.; Tanaka, H.; Maruyama, M.; Satoh, R.; Okubo, S.; Kizawa, H.; Komatsu, H.; Matsumura, F.; Noguchi, Y.; Shinohara, T.; Hinuma, S.; Fujisawa, Y.; Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*. 422. 6928. (173-176).

Jahnke, H.-G.; Steel, D.; Fleischer, S.; Seidel, D.; Kurz, R.; Vinz, S.; Dahlenborg, K.; Sartipy, P.; Robitzki, A. A. (2013). A Novel 3D Label-Free Monitoring System of hES-Derived Cardiomyocyte Clusters: A Step Forward to *In Vitro* Cardiotoxicity Testing. *PLoS One*. 8. 7. (e68971).

Jang, J.; Ku, S. Y.; Kim, J. E.; Choi, K.; Kim, Y. Y.; Kim, H. S.; Oh, S. K.; Lee, E. J.; Cho, H.; Song, Y. H.; Lee, S. H.; Lee, S. H.; Suh, C. S.; Kim, S. H.; Moon, S. Y.; Choi, Y. M. (2008). Notch Inhibition Promotes Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Mesoderm Differentiation. *Stem Cells*. 26. 11. (2782-2790).

Jang, J.; Yoo, J.-E.; Lee, J.-A.; Lee, D. R.; Kim, J. Y.; Huh, Y. J.; Kim, D.-S.; Park, C.-Y.; Hwang, D.-Y.; Kim, H.-S.; Kang, H.-C.; Kim, D.-W. (2012). Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. *Experimental & Molecular Medicine*. 44. 3. (202-213).

Jennings, R. E.; Berry, A. A.; Kirkwood-Wilson, R.; Roberts, N. A.; Hearn, T.; Salisbury, R. J.; Blaylock, J.; Piper-Hanley, K.; Hanley, N. A. (2013). Development of the Human Pancreas From Foregut to Endocrine Commitment. *Diabetes*. 62. 10. (3514-3522).

Jiang, J.; Au, M.; Lu, K.; Eshpeter, A.; Korbitt, G.; Fisk, G.; Majumdar, A. S. (2007). Generation of Insulin-Producing Islet-Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 25. 8. (1940-1953).

Jiang, J.; Ding, G.; Lin, J.; Zhang, M.; Shi, L.; Lv, W.; Yang, H.; Xiao, H.; Pei, G.; Li, Y.; Wu, J.; Li, J. (2011). Different developmental potential of pluripotent stem cells generated by different reprogramming strategies. *Journal of Molecular Cell Biology*. 3. 3. (197-199).

Jiang, W.; Shi, Y.; Zhao, D.; Chen, S.; Yong, J.; Zhang, J.; Qing, T.; Sun, X.; Zhang, P.; Ding, M.; Li, D.; Deng, H. (2007). *In vitro* derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Research*. 17. 4. (333).

Jiang, W.; Sui, X.; Zhang, D.; Liu, M.; Ding, M.; Shi, Y.; Deng, H. (2011). CD24: A Novel Surface Marker for PDX1-Positive Pancreatic Progenitors Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 29. 4. (609-617).

Joglekar, M. V.; Parekh V. S.; Hardikar A. A. (2011). Islet-specific microRNAs in pancreas development, regeneration and diabetes. *Indian Journal of Experimental Biology*. 49. 6. (401-408).

Joglekar, M. V.; Patil, D.; Joglekar, V. M.; Rao, G. V.; Reddy, D. N.; Mitnala, S.; Shouche, Y.; Hardikar, A. A. (2009). The miR-30 family microRNAs confer epithelial phenotype to human pancreatic cells. *Islets*. 1. 2. (137-147).

Johannesson, M.; Ståhlberg, A.; Ameri, J.; Sand, F. W.; Norrman, K.; Semb, H. (2009). FGF4 and Retinoic Acid Direct Differentiation of hESCs into PDX1-Expressing Foregut Endoderm in a Time- and Concentration-Dependent Manner. *PLoS One*. 4. 3. (e4794).

Kaczynski, J.; Cook, T.; Urrutia, R. (2003). Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology*. 4. 2. (206).

Kadota, Y.; Yanagawa, M.; Nakaya, T.; Kawakami, T.; Sato, M.; Suzuki, S. (2012). Gene expression of meso-

derm-specific transcript is upregulated as preadipocytes differentiate to adipocytes in vitro. *The Journal of Physiological Sciences*. 62. 5. (403-411).

Kaiser, N.; Leibowitz, G.; Nesher, R. (2003). Glucotoxicity and β -Cell Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 16. 1. (5-22).

Kaneto, H.; Miyatsuka, T.; Kawamori, D.; Yamamoto, K.; Kato, K.; Shiraiwa, T.; Katakami, N.; Yamasaki, Y.; Matsuhisa, M.; Matsuoka, T.-a. (2008). PDX-1 and MafA Play a Crucial Role in Pancreatic β -Cell Differentiation and Maintenance of Mature β -Cell Function. *Endocrine Journal*. 55. 2. (235-252).

Kang, E.-S.; Han, D.; Park, J.; Kwak, T. K.; Oh, M.-A.; Lee, S.-A.; Choi, S.; Park, Z. Y.; Kim, Y.; Lee, J. W. (2008). O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. *Experimental Cell Research*. 314. 11-12. (2238-2248).

Kashyap, V.; Rezende, N. C.; Scotland, K. B.; Shaffer, S. M.; Persson, J. L.; Gudas, L. J.; Mongan, N. P. (2009). Regulation of Stem Cell Pluripotency and Differentiation Involves a Mutual Regulatory Circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 Pluripotency Transcription Factors With Polycomb Repressive Complexes and Stem Cell microRNAs. *Stem Cells and Development*. 18. 7. (1093-1108).

Kaspi, H.; Pasvolosky, R.; Hornstein, E. (2014). Could microRNAs contribute to the maintenance of β cell identity? *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 25. 6. (285-292).

Kataoka, K.; Han, S.-I.; Shioda, S.; Hirai, M.; Nishizawa, M.; Handa, H. (2002). MafA Is a Glucose-regulated and Pancreatic β -Cell-specific Transcriptional Activator for the Insulin Gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 277. 51. (49903-49910).

Kebede, M.; Ferdaoussi, M.; Mancini, A.; Alquier, T.; Kulkarni, R. N.; Walker, M. D.; Poitout, V. (2012). Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109. 7. (2376-2381).

Keller, D. M.; McWeeney, S.; Arsenlis, A.; Drouin, J.; Wright, C. V. E.; Wang, H.; Wollheim, C. B.; White, P.; Kaestner, K. H.; Goodman, R. H. (2007). Characterization of Pancreatic Transcription Factor Pdx-1 Binding Sites Using Promoter Microarray and Serial Analysis of Chromatin Occupancy. *The Journal of Biological Chemistry*. 282. 44. (32084-32092).

Kelly, O. G.; Chan, M. Y.; Martinson, L. A.; Kadoya, K.; Ostertag, T. M.; Ross, K. G.; Richardson, M.; Carpenter, M. K.; D'Amour, K. A.; Kroon, E.; Moorman, M.; Baetge, E. E.; Bang, A. G. (2011). Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 29. 8. (750-756).

Khoo, S.; Griffen, S. C.; Xia, Y.; Baer, R. J.; German, M. S.; Cobb, M. H. (2003). Regulation of Insulin Gene Transcription by ERK1 and ERK2 in Pancreatic β -Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 278. 35. (32969-32977).

Khvorova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*. 115. 2. (209-216).

Kim, D.; Kim, C.-H.; Moon, J.-I.; Chung, Y.-G.; Chang, M.-Y.; Han, B.-S.; Ko, S.; Yang, E.; Cha, K. Y.; Lanza, R.; Kim, K.-S. (2009). Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell*. 4. 6. (472-476).

Kim, K.; Zhao, R.; Doi, A.; Ng, K.; Unternaehrer, J.; Cahan, P.; Huo, H.; Loh, Y.-H.; Aryee, M. J.; Lensch, M. W.; Li, H.; Collins, J. J.; Feinberg, A. P.; Daley, G. Q. (2011). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 29. 12. (1117-1119).

Kim, N.; Kim, H.; Jung, I.; Kim, Y.; Kim, D.; Han, Y.-M. (2011). Expression profiles of miRNAs in human embryonic stem cells during hepatocyte differentiation. *Hepatology Research: the official Journal of the Japan Society of*

Hepatology. 41. 2. (170-183).

Kim, S. K.; Hebrok, M.; Melton, D. A. (1997). Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development*. 124. 21. (4243-4252).

Kim, S. K.; Melton, D. A. (1998). Pancreas development is promoted by cyclopamine, a Hedgehog signaling inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95. 22. (13036-13041).

Kim J.-W.; Seghers V.; Cho J.-H.; Kang Y.; Kim S.; Ryu Y.; Baek K.; Aguilar-Bryan L.; Lee Y.-D.; Bryan J.; Suh-Kim H. (2002). Transactivation of the Mouse Sulfonylurea Receptor I Gene by BETA2/NeuroD. *Molecular Endocrinology*. 16. 5. (1097-1107).

Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 6. 5. (376-385).

Kinkel, M. D.; Sefton, E. M.; Kikuchi, Y.; Mizoguchi, T.; Ward, A. B.; Prince, V. E. (2009). Cyp26 enzymes function in endoderm to regulate pancreatic field size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106. 19. (7864-7869).

Klein, D.; Misawa, R.; Bravo-Egana, V.; Vargas, N.; Rosero, S.; Piroso, J.; Ichii, H.; Umland, O.; Zhijie, J.; Tsino-remas, N.; Ricordi, C.; Inverardi, L.; Domínguez-Bendala, J.; Pastori, R. L. (2013). MicroRNA expression in alpha and beta cells of human pancreatic islets. *PLoS One*. 8. 1. (e55064).

Knittel, K. R. (2016). Pankreatische *in vitro* Differenzierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen – Einfluss von mikroRNAs und Glukose. Dissertation (Dr. med.) in Vorbereitung zur Einreichung an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle (Saale).

Kobayashi, N.; Uemura, H.; Nagahama, K.; Okudela, K.; Furuya, M.; Ino, Y.; Ito, Y.; Hirano, H.; Inayama, Y.; Aoki, I.; Nagashima, Y.; Kubota, Y.; Ishiguro, H. (2012). Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget*. 3. 11. (1455-1471).

Kobold, S.; Guhr, A.; Kurtz, A.; Löser, P. (2015). Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell Research Trends: Complementation and Diversification of the Field. *Stem Cell Reports*. 4. 5. (914-925).

Kostelac, D. (2004). Einfluss von Phytoestrogenen auf die Bindung der Estrogen Rezeptoren a und b an das Estrogen Response Element. Dissertation (Dr. rer. nat.), angefertigt an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH). Karlsruhe.

Kraushaar, D. C.; Zhao, K. (2013). The Epigenomics of Embryonic Stem Cell Differentiation. *International Journal of Biological Sciences*. 9. 10. (1134-1144).

Kredo-Russo, S.; Mandelbaum, A. D.; Ness, A.; Alon, I.; Lennox, K. A.; Behlke, M. A.; Hornstein, E. (2012). Pancreas-enriched miRNA refines endocrine cell differentiation. *Development*. 139. 16. (3021-3031).

Kreß, H. (2015). Forschung an pluripotenten Stammzellen. *Medizinrecht*. 33. 6. (387-392).

Krol, J.; Buskamp, V.; Markiewicz, I.; Stadler, M. B.; Ribi, S.; Richter, J.; Duebel, J.; Bicker, S.; Fehling, H. J.; Schübeler, D.; Oertner, T. G.; Schratz, G.; Bibel, M.; Roska, B.; Filipowicz, W. (2010). Characterizing Light-Regulated Retinal MicroRNAs Reveals Rapid Turnover as a Common Property of Neuronal MicroRNAs. *Cell*. 141. 4. (618-631).

Krol, J.; Loedige, I.; Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews. Genetics*. 11. 9. (597-610).

Krol, A. R. van der; Mur, L. A.; Beld, M.; Mol, J. N.; Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of

a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell*. 2. 4. (291-299).

Kroon, E.; Martinson, L. A.; Kadoya, K.; Bang, A. G.; Kelly, O. G.; Eliazer, S.; Young, H.; Richardson, M.; Smart, N. G.; Cunningham, J.; Agulnick, A. D.; D'Amour, K. A.; Carpenter, M. K.; Baetge, E. E. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*. *Nature Biotechnology*. 26. 4. (443-452).

Kuhn, S. (2011). MikroRNAs – Regulatoren der frühen pankreatischen Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen. Diplomarbeit, angefertigt am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).

Lammert, E.; Cleaver, O.; Melton, D. (2001). Induction of Pancreatic Differentiation by Signals from Blood Vessels. *Science*. 294. 5542. (564-567).

Latreille, M.; Hausser, J.; Stützer, I.; Zhang, Q.; Hastoy, B.; Gargani, S.; Kerr-Conte, J.; Pattou, F.; Zavanon, M.; Esguerra, J. L. S.; Eliasson, L.; Rüllicke, T.; Rorsman, P.; Stoffel, M. (2014). MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function. *The Journal of Clinical Investigation*. 124. 6. (2722-2735).

Latreille, M.; Herrmanns, K.; Renwick, N.; Tuschl, T.; Malecki, M.; McCarthy, M.; Owen, K.; Rüllicke, T.; Stoffel, M. (2015). miR-375 gene dosage in pancreatic β -cells: implications for regulation of β -cell mass and biomarker development. *Journal of Molecular Medicine*. 93. 10 (1159-1169).

Laugesen, A.; Helin, K. (2014). Chromatin Repressive Complexes in Stem Cells, Development, and Cancer. *Cell Stem Cell*. 14. 6. (735-751).

Lee, A. S.; Tang, C.; Rao, M. S.; Weissman, I. L.; Wu, J. C. (2013). Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nature Medicine*. 19. 8. (998).

Lee, E. K.; Kim, W.; Tominaga, K.; Martindale, J. L.; Yang, X.; Subaran, S. S.; Carlson, O. D.; Mercken, E. M.; Kulkarni, R. N.; Akamatsu, W.; Okano, H.; Perrone-Bizzozero, N. I.; Cabo, R.; Egan, J. M.; Gorospe, M. (2012). RNA-binding protein HuD controls insulin translation. *Molecular Cell*. 45. 6. (826-835).

Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75. 5. (843-854).

Levenberg, S.; Huang, N. F.; Lavik, E.; Rogers, A. B.; Itskovitz-Eldor, J.; Langer, R. (2003). Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100. 22. (12741-12746).

Li, M. V.; Chen, W.; Harmancey, R. N.; Nuotio-Antar, A. M.; Imamura, M.; Saha, P.; Taegtmeier, H.; Chan, L. (2010). Glucose-6-phosphate mediates activation of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 395. 3. (395-400).

Li, Y.; Kong, D.; Ahmad, A.; Bao, B.; Sarkar, F. H. (2014). The Role of miRNAs in the Development of Normal Pancreas and Pancreatic Cancer, and Their Roles in Tumor Progression. In: Rameshwar, S. (Hg.) *MicroRNA in Development*. 2014. (179-198).

Liang, G.; Zhang, Y. (2013). Genetic and Epigenetic Variations in iPSCs: Potential Causes and Implications for Application. *Cell Stem Cell*. 13. 2. (149-159).

Liao, J.-Y.; Ma, L.-M.; Guo, Y.-H.; Zhang, Y.-C.; Zhou, H.; Shao, P.; Chen, Y.-Q.; Qu, L.-H. (2010). Deep Sequencing of Human Nuclear and Cytoplasmic Small RNAs Reveals an Unexpectedly Complex Subcellular Distribution of miRNAs and tRNA 3' Trailers. *PLoS One*. 5. 5. (e10563).

Liebau, S.; Stockmann, M.; Illing, A.; Seufferlein, T.; Kleger, A. (2014). Induzierte pluripotente Stammzellen. *Der*

Internist. 55. 4. (460-469).

Lindsley, R. C.; Gill, J. G.; Kyba, M.; Murphy, T. L.; Murphy, K. M. (2006). Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development.* 133. 19. (3787-3796).

Liu, K.; Paterson, A. J.; Chin, E.; Kudlow, J. E. (2000). Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic β cells: Linkage of O-linked GlcNAc to β cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 97. 6. (2820-2825).

Loh, K. M.; Lim, B. (2011). A Precarious Balance: Pluripotency Factors as Lineage Specifiers. *Cell Stem Cell.* 8. 4. (363-369).

Longo, D. L.; Dietel, M.; Harrison, T. R. (2012). *Harrisons Innere Medizin.* Ausgabe in 4 Bänden inklusive Registerband. McGraw-Hill ABW Wiss.-Verlag, Berlin. ISBN: 9783940615206.

Löser, P.; Hanke, B.; Wobus Anne M. (2011). Humane pluripotente Stammzellen - Perspektiven ihrer Nutzung und die Forschungssituation in Deutschland. *Naturwissenschaftliche Rundschau.* 64. 9. (453-465).

Lovis, P.; Gattesco, S.; Regazzi, R. (2008). Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biological Chemistry.* 389. 3. (305-312).

Lu, J.; Hou, R.; Booth, C. J.; Yang, S.-H.; Snyder, M. (2006). Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 103. 15. (5688-5693).

Luciano, D. J.; Mirsky, H.; Vendetti, N. J.; Maas, S. (2004). RNA editing of a miRNA precursor. *RNA.* 10. 8. (1174-1177).

Lynn, F. C.; Skewes-Cox, P.; Kosaka, Y.; McManus, M. T.; Harfe, B. D.; German, M. S. (2007). MicroRNA Expression Is Required for Pancreatic Islet Cell Genesis in the Mouse. *Diabetes.* 56. 12. (2938-2945).

Mannucci, E. (2012). Insulin Therapy and Cancer in Type 2 Diabetes. *ISRN Endocrinology.* 2012. (240634).

Margueron, R.; Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 469. 7330. (343-349).

Marin, M.; Karis, A.; Visser, P.; Grosveld, F.; Philipsen, S. (1997). Transcription Factor Sp1 Is Essential for Early Embryonic Development but Dispensable for Cell Growth and Differentiation. *Cell.* 89. 4. (619-628).

Marson, A.; Levine, S. S.; Cole, M. F.; Frampton, G. M.; Brambrink, T.; Johnstone, S.; Guenther, M. G.; Johnston, W. K.; Wernig, M.; Newman, J.; Calabrese, J. M.; Dennis, L. M.; Volkert, T. L.; Gupta, S.; Love, J.; Hannett, N.; Sharp, P. A.; Bartel, D. P.; Jaenisch, R.; Young, R. A. (2008). Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells. *Cell.* 134. 3. (521-533).

Martin, D.; Allagnat, F.; Chaffard, G.; Caille, D.; Fukuda, M.; Regazzi, R.; Abderrahmani, A.; Waeber, G.; Meda, P.; Maechler, P.; Haefliger, J.-A. (2008). Functional significance of repressor element 1 silencing transcription factor (REST) target genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 51. 8. (1429-1439).

Martin, D.; Kim, Y.-H.; Sever, D.; Mao, C.-A.; Haefliger, J.-A.; Grapin-Botton, A. (2015). REST represses a subset of the pancreatic endocrine differentiation program. *Developmental Biology.* 405. 2. (316-327).

Martinez-Sanchez, A.; Nguyen-Tu, M.-S.; Rutter, G. A. (2015). DICER Inactivation Identifies Pancreatic β -Cell „Disallowed“ Genes Targeted by MicroRNAs. *Molecular Endocrinology.* 29. 7. (1067-1079).

Mathur, A.; Loskill, P.; Shao, K.; Huebsch, N.; Hong, S.; Marcus, S. G.; Marks, N.; Mandegar, M.; Conklin, B. R.; Lee, L. P.; Healy, K. E. (2015). Human iPSC-based Cardiac Microphysiological System For Drug Screening Appli-

cations. *Scientific Reports*. 2015. 5. (1-7).

Matsuda, T.; Yamamoto, T.; Muraguchi, A.; Saatcioglu, F. (2001). Cross-talk between Transforming Growth Factor- β and Estrogen Receptor Signaling through Smad3. *The Journal of Biological Chemistry*. 276. 46. (42908-42914).

Matsui, M.; Chu, Y.; Zhang, H.; Gagnon, K. T.; Shaikh, S.; Kuchimanchi, S.; Manoharan, M.; Corey, D. R.; Janowski, B. A. (2013). Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes. *Nucleic Acids Research*. 41. 22. (10086-10109).

Matsuoka, T.-A.; Kaneto, H.; Stein, R.; Miyatsuka, T.; Kawamori, D.; Henderson, E.; Kojima, I.; Matsuhisa, M.; Hori, M.; Yamasaki, Y. (2007). MafA regulates expression of genes important to islet beta-cell function. *Molecular Endocrinology*. 21. 11. (2764-2774).

Matzke, M.; Aufsatz, W.; Kanno, T.; Daxinger, L.; Papp, I.; Mette, M. F.; Matzke, A. J. M. (2004). Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*. 1677. 1-3. (129-141).

Mayshar, Y.; Ben-David, U.; Lavon, N.; Biancotti, J.-C.; Yakir, B.; Clark, A. T.; Plath, K.; Lowry, W. E.; Benvenisty, N. (2010). Identification and Classification of Chromosomal Aberrations in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 7. 4. (521-531).

Meister, G.; Landthaler, M.; Peters, L.; Chen, P. Y.; Urlaub, H.; Lührmann, R.; Tuschl, T. (2005). Identification of Novel Argonaute-Associated Proteins. *Current Biology*. 15. 23. (2149-2155).

Melkman-Zehavi, T.; Oren, R.; Kredo-Russo, S.; Shapira, T.; Mandelbaum, A. D.; Rivkin, N.; Nir, T.; Lennox, K. A.; Behlke, M. A.; Dor, Y.; Hornstein, E. (2011). miRNAs control insulin content in pancreatic β -cells via downregulation of transcriptional repressors. *The EMBO Journal*. 30. 5. (835-845).

Metukuri, M. R.; Zhang, P.; Basantani, M. K.; Chin, C.; Stamateris, R. E.; Alonso, L. C.; Takane, K. K.; Gramignoli, R.; Strom, S. C.; O'Doherty, R. M.; Stewart, A. F.; Vasavada, R. C.; Garcia-Ocaña, A.; Scott, D. K. (2012). ChREBP Mediates Glucose-Stimulated Pancreatic β -Cell Proliferation. *Diabetes*. 61. 8. (2004-2015).

Micallef, S. J.; Janes, M. E.; Knezevic, K.; Davis, R. P.; Elefanty, A. G.; Stanley, E. G. (2005). Retinoic Acid Induces Pdx1-Positive Endoderm in Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *Diabetes*. 54. 2. (301-305).

Miki, K.; Endo, K.; Takahashi, S.; Funakoshi, S.; Takei, I.; Katayama, S.; Toyoda, T.; Kotaka, M.; Takaki, T.; Umeha, M.; Okubo, C.; Nishikawa, M.; Oishi, A.; Narita, M.; Miyashita, I.; Asano, K.; Hayashi, K.; Osafune, K.; Yamanaka, S.; Saito, H.; Yoshida, Y. (2015). Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches. *Cell Stem Cell*. 16. 6. (699-711).

Mirmalek-Sani, S.-H.; Orlando, G.; McQuilling, J. P.; Pareta, R.; Mack, D. L.; Salvatori, M.; Farney, A. C.; Stratta, R. J.; Atala, A.; Opara, E. C.; Soker, S. (2013). Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 34. 22. (5488-5495).

Morbitzer, R.; Römer, P.; Boch, J.; Lahaye, T. (2010). Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107. 50. (21617-21622).

Moscou, M. J.; **Bogdanove, A. J.** (2009). A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*. 326. 5959. (1501).

Mosley, A. L.; Corbett, J. A.; Özcan, S. (2004). Glucose Regulation of Insulin Gene Expression Requires the Recruitment of p300 by the β -Cell-Specific Transcription Factor Pdx-1. *Molecular Endocrinology*. 18. 9. (2279-2290).

Mosley, A. L.; Özcan, S. (2004). The Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Protein (Pdx-1) Interacts with Histone Deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on Low Levels of Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. 279. 52. (54241-54247).

Müssig, K.; Staiger, H.; Kantartzis, K.; Fritsche, A.; Kanz, L.; Häring, H.-U. (2011). Type 2 diabetes mellitus and risk of malignancy: is there a strategy to identify a subphenotype of patients with increased susceptibility to endogenous and exogenous hyperinsulinism? *Diabetic Medicine: a Journal of the British Diabetic Association*. 28. 3. (276-286).

Nair, G.; Hebrok, M. (2015). Islet formation in mice and men: lessons for the generation of functional insulin-producing β -cells from human pluripotent stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*. 32. (171-180).

Nathan, G.; Kredon-Russo, S.; Geiger, T.; Lenz, A.; Kaspi, H.; Hornstein, E.; Efrat, S. (2015). MiR-375 Promotes Redifferentiation of Adult Human β Cells Expanded *In Vitro*. *PLoS One*. 10. 4. (e0122108).

National Center for Biotechnology Information, NCBI (2015). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Stand: 18.07.2015.

Naujok, O.; Burns, C.; Jones, P. M.; Lenzen, S. (2011). Insulin-producing Surrogate β -cells From Embryonic Stem Cells: Are We There Yet? *Molecular Therapy*. 19. 10. (1759-1768).

Naujok, O.; Lenzen, S. (2012). Pluripotente Stammzellen zur Zellersatztherapie des Diabetes mellitus. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 137. 20. (1062-1066).

Neve, B.; Fernandez-Zapico, M. E.; Ashkenazi-Katalan, V.; Dina, C.; Hamid, Y. H.; Joly, E.; Vaillant, E.; Benmezroua, Y.; Durand, E.; Bakaher, N.; Delannoy, V.; Vaxillaire, M.; Cook, T.; Dallinga-Thie, G. M.; Jansen, H.; Charles, M.-A.; Clément, K.; Galan, P.; Hercberg, S.; Helbecque, N.; Charpentier, G.; Prentki, M.; Hansen, T.; Pedersen, O.; Urrutia, R.; Melloul, D.; Froguel, P. (2005). Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102. 13. (4807-4812).

Newman, A. M.; Cooper, J. B. (2010). Lab-Specific Gene Expression Signatures in Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 7. 2. (258-262).

Newsholme, P.; Brennan, L.; Bender, K. (2006). Amino Acid Metabolism, β -Cell Function, and Diabetes. *Diabetes*. 55. Suppl 2. (39-47).

Nichols, W.; Murphy, D.; Cristofalo, V.; Toji, L.; Greene, A.; Dwight, S. (1977). Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science*. 196. 4285. (60-63).

Nikolova, G.; Jabs, N.; Konstantinova, I.; Domogatskaya, A.; Tryggvason, K.; Sorokin, L.; Fässler, R.; Gu, G.; Gerber, H.-P.; Ferrara, N.; Melton, D. A.; Lammert, E. (2006). The Vascular Basement Membrane: A Niche for Insulin Gene Expression and β Cell Proliferation. *Developmental Cell*. 10. 3. (397-405).

Ninov, N.; Borius, M.; Stainier, D. Y. R. (2012). Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development*. 139. 9. (1557-1567).

Nishimura, W.; Kondo, T.; Salameh, T.; El Khattabi, I.; Dodge, R.; Bonner-Weir, S.; Sharma, A. (2006). A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells. *Developmental Biology*. 293. 2. (526-539).

O'Connor, M. D.; Kardel, M. D.; Iosifina, I.; Youssef, D.; Lu, M.; Li, M. M.; Vercauteren, S.; Nagy, A.; Eaves, C. J. (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).

- Oh, Y. S.** (2015). Mechanistic insights into pancreatic beta-cell mass regulation by glucose and free fatty acids. *Anatomy & Cell Biology*. 48. 1. (16-24).
- Ohneda, K.**; Mirmira, R. G.; Wang, J.; Johnson, J. D.; German, M. S. (2000). The Homeodomain of PDX-1 Mediates Multiple Protein-Protein Interactions in the Formation of a Transcriptional Activation Complex on the Insulin Promoter. *Molecular and Cellular Biology*. 20. 3. (900-911).
- Ohtsuka, S.**; **Dalton, S.** (2008). Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Therapy*. 15. 2. (74).
- Okita, K.**; Matsumura, Y.; Sato, Y.; Okada, A.; Morizane, A.; Okamoto, S.; Hong, H.; Nakagawa, M.; Tanabe, K.; Tezuka, K.-I.; Shibata, T.; Kunisada, T.; Takahashi, M.; Takahashi, J.; Saji, H.; Yamanaka, S. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*. 8. 5. (409-412).
- Ooi, S. K. T.**; Qiu, C.; Bernstein, E.; Li, K.; Jia, D.; Yang, Z.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Lin, S.-P.; Allis, C. D.; Cheng, X.; Bestor, T. H. (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to *de novo* methylation of DNA. *Nature*. 448. 7154. (714-717).
- Osowski, C. M.**; Hara, T.; O'Sullivan-Murphy, B.; Kanekura, K.; Lu, S.; Hara, M.; Ishigaki, S.; Zhu, L. J.; Hayashi, E.; Hui, S. T.; Greiner, D.; Kaufman, R. J.; Bortell, R.; Urano, F. (2012). Thioredoxin-Interacting Protein Mediates ER Stress-Induced β Cell Death through Initiation of the Inflammasome. *Cell Metabolism*. 16. 2. (265-273).
- Otonkoski, T.**; Beattie, G. M.; Mally, M. I.; Ricordi, C.; Hayek, A. (1993). Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *Journal of Clinical Investigation*. 92. 3. (1459-1466).
- Ouaamari, A. E.**; Baroukh, N.; Martens, G. A.; Lebrun, P.; Pipeleers, D.; van Obberghen, E. (2008). miR-375 Targets 3'-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 and Regulates Glucose-Induced Biological Responses in Pancreatic β -Cells. *Diabetes*. 57. 10. (2708-2717).
- Outten, J. T.**; Cheng, X.; Gadue, P.; French, D. L.; Diamond, S. L. (2011). A high-throughput multiplexed screening assay for optimizing serum-free differentiation protocols of human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*. 6. 2. (129-142).
- Ouziel-Yahalom, L.**; Zalzman, M.; Anker-Kitai, L.; Knoller, S.; Bar, Y.; Glandt, M.; Herold, K.; Efrat, S. (2006). Expansion and redifferentiation of adult human pancreatic islet cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 341. 2. (291-298).
- Özcan, S.** (2014). Minireview: MicroRNA Function in Pancreatic β Cells. *Molecular Endocrinology*. 28. 12 (1922-1933).
- Ozsolak, F.**; Poling, L. L.; Wang, Z.; Liu, H.; Liu, X. S.; Roeder, R. G.; Zhang, X.; Song, J. S.; Fisher, D. E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & Development*. 22. 22. (3172-3183).
- Pagliuca, F. W.**; **Melton, D. A.** (2013). How to make a functional β -cell. *Development*. 140. 12. (2472-2483).
- Pagliuca, F. W.**; Millman, J. R.; Gürtler, M.; Segel, M.; Van Dervort, A.; Ryu, J. H.; Peterson, Q. P.; Greiner, D.; Melton, D. A. (2014). Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. *Cell*. 159. 2. (428-439).
- Paraskevopoulou, M. D.**; Georgakilas, G.; Kostoulas, N.; Vlachos, I. S.; Vergoulis, T.; Reczko, M.; Filippidis, C.; Dalamagas, T.; Hatzigeorgiou, A. G. (2013). DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Research*. 41. 1. (169-173).
- Pellegrini, S.**; Ungaro, F.; Mercalli, A.; Melzi, R.; Sebastiani, G.; Dotta, F.; Broccoli, V.; Piemonti, L.; Sordi, V. (2015). Human induced pluripotent stem cells differentiate into insulin-producing cells able to engraft in vivo. *Acta Diabetologica*. 52. 6. (1-11).

- Perakakis, N.;** Danassi, D.; Alt, M.; Tsaroucha, E.; Mehana, A. E.; Rimmer, N.; Laubner, K.; Wang, H.; Wollheim, C. B.; Seufert, J.; Páth, G. (2012). Human Krüppel-like factor 11 differentially regulates human insulin promoter activity in β -cells and non- β -cells via p300 and PDX1 through the regulatory sites A3 and CACCC box. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 363. 1-2. (20-26).
- Pfeiffer, A. F. H.; Klein, H. H.** (2014). Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. *Deutsches Ärzteblatt international*. 111. 5. (69-81).
- Piriyapongsa, J.;** Bootchai, C.; Ngamphiw, C.; Tongsimma, S. (2014). microPIR2: a comprehensive database for human-mouse comparative study of microRNA-promoter interactions. *Database*. 2014. (bau115).
- Plaisance, V.;** Abderrahmani, A.; Perret-Menoud, V.; Jacquemin, P.; Lemaigre, F.; Regazzi, R. (2006). MicroRNA-9 Controls the Expression of Granuphilin/Slp4 and the Secretory Response of Insulin-producing Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 281. 37. (26932-26942).
- Polo, J. M.;** Liu, S.; Figueroa, M. E.; Kulalert, W.; Eminli, S.; Tan, K. Y.; Apostolou, E.; Stadtfeld, M.; Li, Y.; Shioda, T.; Natesan, S.; Wagers, A. J.; Melnick, A.; Evans, T.; Hochedlinger, K. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 28. 8. (848-855).
- Postic, C.;** Dentin, R.; Denechaud, P.-D.; Girard, J. (2007). ChREBP, a Transcriptional Regulator of Glucose and Lipid Metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 27. (179-192).
- Poungvarin, N.;** Lee, J. K.; Yechool, V. K.; Li, M. V.; Assavapokee, T.; Suksaranjit, P.; Thepsongwajja, J. J.; Saha, P. K.; Oka, K.; Chan, L. (2012). Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) plays a pivotal role in beta cell glucotoxicity. *Diabetologia*. 55. 6. (1783-1796).
- Poy, M. N.;** Eliasson, L.; Krutzfeldt, J.; Kuwajima, S.; Ma, X.; Macdonald, P. E.; Pfeffer, S.; Tuschl, T.; Rajewsky, N.; Rorsman, P.; Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 432. 7014. (226-230).
- Poy, M. N.;** Spranger, M.; Stoffel, M. (2007). microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 9. Suppl 2. (67-73).
- Poy, M. N.;** Hausser, J.; Trajkovski, M.; Braun, M.; Collins, S.; Rorsman, P.; Zavolan, M.; Stoffel, M. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106. 14. (5813-5818).
- Qin, S.; Zhang, C.-L.** (2012). Role of Krüppel-Like Factor 4 in Neurogenesis and Radial Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *Molecular and Cellular Biology*. 32. 21. (4297-4305).
- Qiu, Y.;** Guo, M.; Huang, S.; Stein, R. (2002). Insulin Gene Transcription Is Mediated by Interactions between the p300 Coactivator and PDX-1, BETA2, and E47. *Molecular and Cellular Biology*. 22. 2. (412-420).
- Rädler, J. O.;** Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. (1997). Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes. *Science*. 275. 5301. (810-814).
- Rajagopal, J.;** Anderson, W. J.; Kume, S.; Martinez, O. I.; Melton, D. A. (2003). Insulin Staining of ES Cell Progeny from Insulin Uptake. *Science*. 299. 5605. (363).
- Rajala, K.;** Pekkanen-Mattila, M.; Aalto-Setälä, K. (2011). Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International*. 2011. (383709).
- Ramachandran, D.;** Roy, U.; Garg, S.; Ghosh, S.; Pathak, S.; Kolthur-Seetharam, U. (2011). Sirt1 and mir-9 expression is regulated during glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -islets. *The FEBS Journal*. 278.

7. (1167-1174).

Raum, J. C.; Gerrish, K.; Artner, I.; Henderson, E.; Guo, M.; Sussel, L.; Schisler, J. C.; Newgard, C. B.; Stein, R. (2006). FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 Regulate Islet β -Cell-Specific *mafA* Expression through Conserved Sequences Located between Base Pairs -8118 and -7750 Upstream from the Transcription Start Site. *Molecular and Cellular Biology*. 26. 15. (5735-5743).

Reubinoff, B. E.; Pera, M. F.; Fong, C. Y.; Trounson, A.; Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*. 18. 4. (399-404).

Rezania, A.; Riedel, M. J.; Wideman, R. D.; Karanu, F.; Ao, Z.; Warnock, G. L.; Kieffer, T. J. (2011). Production of Functional Glucagon-Secreting α -Cells From Human Embryonic Stem Cells. *Diabetes*. 60. 1. (239-247).

Rezania, A.; Bruin, J. E.; Riedel, M. J.; Mojibian, M.; Asadi, A.; Xu, J.; Gauvin, R.; Narayan, K.; Karanu, F.; O'Neil, J. J.; Ao, Z.; Warnock, G. L.; Kieffer, T. J. (2012). Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors Into Functional Islets Capable of Treating Pre-existing Diabetes in Mice. *Diabetes*. 61. 8. (2016-2029).

Rezania, A.; Bruin, J. E.; Arora, P.; Rubin, A.; Batushansky, I.; Asadi, A.; O'Dwyer, S.; Quiskamp, N.; Mojibian, M.; Albrecht, T.; Yang, Y. G. C.; Johnson, J. D.; Kieffer, T. J. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 32. 11. (1121-1133).

Richter, A.; **Boch, J.** (2013). Designer TALEs team up for highly efficient gene induction. *Nature Methods*. 10. 3. (207-208).

Rissland, O. S.; Hong, S.-J.; Bartel, D. P. (2011). MicroRNA Destabilization Enables Dynamic Regulation of the miR-16 Family in Response to Cell-Cycle Changes. *Molecular Cell*. 43. 6. (993-1004).

Robb, G. B.; **Rana, T. M.** (2007). RNA helicase A Interacts with RISC in Human Cells and Functions in RISC Loading. *Molecular Cell*. 26. 4. (523-537).

Rodriguez, A.; Griffiths-Jones, S.; Ashurst, J. L.; Bradley, A. (2004). Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research*. 14. 10a. (1902-1910).

Römer, P.; Recht, S.; Lahaye, T. (2009). A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106. 48. (20526-20531).

Ruby, J. G.; Jan, C. H.; Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 448. 7149. (83).

Rüegger, S.; **Großhans, H.** (2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends in Biochemical Sciences*. 37. 10. (436-446).

Russ, H. A.; Ravassard, P.; Kerr-Conte, J.; Pattou, F.; Efrat, S. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cells Expanded In Vitro from Lineage-Traced Adult Human Pancreatic Beta Cells. *PLoS One*. 4. 7. (e6417).

Sagal, J.; Zhan, X.; Xu, J.; Tilghman, J.; Karuppagounder, S. S.; Chen, L.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; Latterra, J.; Ying, M. (2014). Proneural Transcription Factor *Atoh1* Drives Highly Efficient Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Dopaminergic Neurons. *Stem Cells Translational Medicine*. 3. 8. (888-898).

Sakiyama, H.; Wynn, R. M.; Lee, W.-R.; Fukasawa, M.; Mizuguchi, H.; Gardner, K. H.; Repa, J. J.; Uyeda, K. (2008). Regulation of Nuclear Import/Export of Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP). Interaction of an α -helix of ChREBP with the 14-3-3 proteins and Regulation by Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 283. 36. (24899-24908).

Salmanidis, M.; Pillman, K.; Goodall, G.; Bracken, C. (2014). Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 54. (304-311).

Sander, M.; German, M. S. (1997). The β cell transcription factors and development of the pancreas. *Journal of Molecular Medicine*. 75. 5. (327-340).

Sander, M.; Sussel, L.; Conners, J.; Scheel, D.; Kalamaras, J.; Cruz, F. D.; Schwitzgebel, V.; Hayes-Jordan, A.; German, M. (2000). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development*. 127. 24. (5533-5540).

Satoh, S.-I.; Masatoshi, S.; Shou, Z.; Yamamoto, T.; Ishigure, T.; Semii, A.; Yamada, K.; Noguchi, T. (2007). Identification of cis-regulatory elements and trans-acting proteins of the rat carbohydrate response element binding protein gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 461. 1. (113-122).

Scholze, H.; Boch, J. (2010). TAL effector-DNA specificity. *Virulence*. 1. 5. (428-432).

Scholze, H.; Boch, J. (2011). TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology*. 14. 1. (47-53).

Schuettengruber, B.; Cavalli, G. (2009). Recruitment of Polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development*. 136. 21. (3531-3542).

Schuit, F.; Van Lommel, L.; Granvik, M.; Goyvaerts, L.; De Fauteur, G.; Schraenen, A.; Lemaire, K. (2012). β -Cell-Specific Gene Repression: A Mechanism to Protect Against Inappropriate or Maladjusted Insulin Secretion? *Diabetes*. 61. 5. (969-975).

Schurig, M. (2008). Identifizierung und Optimierung kritischer Schritte bei der Transfektion eukaryontischer Zellen. Dissertation (Dr. rer. nat.), angefertigt am Lehrstuhl für Chemie und Biopolymere der Technischen Universität München. München.

Schwartz, S. D.; Hubschman, J.-P.; Heilwell, G.; Franco-Cardenas, V.; Pan, C. K.; Ostrick, R. M.; Mickunas, E.; Gay, R.; Klimanskaya, I.; Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration. *The Lancet*. 379. 9817. (713-720).

Schweyen, S. M. (2014). Einfluss von Nährstoffen auf die pankreatische Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen. Dissertation (Dr. med), angefertigt am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle (Saale).

Scott, C. W.; Peters, M. F.; Dragan, Y. P. (2013). Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing. *Toxicology Letters*. 219. 1. (49-58).

Segev, H.; Fishman, B.; Schulman, R.; Itskovitz-Eldor, J. (2012). The Expression of the Class 1 Glucose Transporter Isoforms in Human Embryonic Stem Cells, and the Potential Use of GLUT2 as a Marker for Pancreatic Progenitor Enrichment. *Stem Cells and Development*. 21. 10. (1653-1661).

Senatskommission für tierexperimentelle Forschung, Deutsche Forschungsgemeinschaft (2004). Tierversuche in der Forschung. Bonn. Online verfügbar unter: http://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/geschaeftsstelle/publikationen/dfg_terversuche_0300304.pdf. Stand: 18.07.2015.

Shah, B. R.; Hux, J. E. (2003). Quantifying the Risk of Infectious Diseases for People With Diabetes. *Diabetes Care*. 26. 2. (510-513).

Shao, S.; Fang, Z.; Yu, X.; Zhang, M. (2009). Transcription factors involved in glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 384. 4. (401-404).

- Sheldon, S.; Poulton, K.** (2006). HLA Typing and Its Influence on Organ Transplantation. In: Hornick, P.; Rose, M. (Hg.) *Transplantation Immunology*. 333. (157-174).
- Shim, G.;** Kim, M.-G.; Park, J. Y.; Oh, Y.-K. (2013). Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8. 2. (72-80).
- Sim, S.-E.;** Bakes, J.; Kaang, B.-K. (2014). Neuronal Activity-Dependent Regulation of MicroRNAs. *Molecules and Cells*. 37. 7. (511-517).
- Simonini, P. S. R.;** Breiling, A.; Gupta, N.; Malekpour, M.; Youns, M.; Omranipour, R.; Malekpour, F.; Volinia, S.; Croce, C. M.; Najmabadi, H.; Diederichs, S.; Sahin, Ö.; Mayer, D.; Lyko, F.; Hoheisel, J. D.; Riazalhosseini, Y. (2010). Epigenetically Deregulated microRNA-375 Is Involved in a Positive Feedback Loop with Estrogen Receptor α in Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 70. 22. (9175-9184).
- Singer, R. A.;** Arnes, L.; Sussel, L. (2015). Noncoding RNAs in β cell biology. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 22. 2. (77-85).
- Sack, J. M.** (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development*. 121. 6. (1569-1580).
- Soggia, A.;** Flosseau, K.; Ravassard, P.; Szinnai, G.; Scharfmann, R.; Guillemain, G. (2012). Activation of the transcription factor carbohydrate-responsive element-binding protein by glucose leads to increased pancreatic beta cell differentiation in rats. *Diabetologia*. 55. 10. (2713-2722).
- Stadler, B.;** Ivanovska, I.; Mehta, K.; Song, S.; Nelson, A.; Tan, Y.; Mathieu, J.; Darby, C.; Blau, C. A.; Ware, C.; Peters, G.; Miller, D. G.; Shen, L.; Cleary, M. A.; Ruohola-Baker, H. (2010). Characterization of microRNAs Involved in Embryonic Stem Cell States. *Stem Cells and Development*. 19. 7. (935-950).
- Stefanovic, S.;** Abboud, N.; Désilets, S.; Nury, D.; Cowan, C.; Pucéat, M. (2009). Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate. *The Journal of Cell Biology*. 186. 5. (665-673).
- Steiner, D. J.;** Kim, A.; Miller, K.; Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition *Islets*. 2. 3. (135-145).
- Stenvang, J.;** Petri, A.; Lindow, M.; Obad, S.; Kauppinen, S. (2012). Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence*. 3. 1. (1).
- Stoffers, D. A.;** Zinkin, N. T.; Stanojevic, V.; Clarke, W. L.; Habener, J. F. (1997). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature Genetics*. 15. 1. (106-110).
- Strauss, S.** (2010). Geron trial resumes, but standards for stem cell trials remain elusive. *Nature Biotechnology*. 28. 10. (989-990).
- Streubel, J.;** Blücher, C.; Landgraf, A.; Boch, J. (2012). TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nature Biotechnology*. 30. 7. (593-595).
- Suh, M.-R.;** Lee, Y.; Kim, J. Y.; Kim, S.-K.; Moon, S.-H.; Lee, J. Y.; Cha, K.-Y.; Chung, H. M.; Yoon, H. S.; Moon, S. Y.; Kim, V. N.; Kim, K.-S. (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental Biology*. 270. 2. (488-498).
- Sumi, T.;** Tsuneyoshi, N.; Nakatsuji, N.; Suemori, H. (2008). Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/ β -catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*. 135. 17. (2969-2979).
- Takahashi, K.;** Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. (2007). Induction of

Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131. 5. (861-872).

Takahashi, K.; Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 126. 4. (663-676).

Talavera-Adame, D.; Wu, G.; He, Y.; Ng, T.; Gupta, A.; Kurtovic, S.; Hwang, J.; Farkas, D.; Dafoe, D. (2011). Endothelial Cells in Co-culture Enhance Embryonic Stem Cell Differentiation to Pancreatic Progenitors and Insulin-Producing Cells through BMP Signaling. *Stem Cell Reviews and Reports*. 7. 3. (532-543).

Tao, Z.; Shi, A.; Zhao, J. (2015). Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 73. 1. (181-185).

Taylor, C. J.; Peacock, S.; Chaudhry, A. N.; Bradley, J. A.; Bolton, E. M. (2012). Generating an iPSC Bank for HLA-Matched Tissue Transplantation Based on Known Donor and Recipient HLA Types. *Cell Stem Cell*. 11. 2. (147-152).

Teo, A. K. K.; Arnold, S. J.; Trotter, M. W. B.; Brown, S.; Ang, L. T.; Chng, Z.; Robertson, E. J.; Dunn, N. R.; Valier, L. (2011). Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through eomesodermin. *Genes & Development*. 25. 3. (238-250).

Teplyuk, N. M.; Uhlmann, E. J.; Wong, A. H-K.; Karmali, P.; Basu, M.; Gabriely, G.; Jain, A.; Wang, Y.; Chiocca, A. E.; Stephens, R.; Marcusson, E.; Yi, M.; Krichevsky, A. M. (2015). MicroRNA-10b inhibition reduces E2F1-mediated transcription and miR-15/16 activity in glioblastoma. *Oncotarget*. 6. 6. (3770-3783).

Thakore, P. I.; Gersbach, C. A. (2015). Genome Engineering for Therapeutic Applications. In: Laurence, J.; Franklin, M. (Hg) *Translating Gene Therapy to the Clinic*. (27-39).

Thomson, D. W.; Bracken, C. P.; Szubert, J. M.; Goodall, G. J. (2013). On Measuring miRNAs after Transient Transfection of Mimics or Antisense Inhibitors. *PLoS One*. 8. 1. (e55214).

Thomson, J. A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 282. 5391. (1145-1147).

Tillmar, L.; Carlsson, C.; Welsh, N. (2002). Control of Insulin mRNA Stability in Rat Pancreatic Islets. Regulatory Role of a 3'-untranslated Region Pyrimidine-rich Sequence. *The Journal of Biological Chemistry*. 277. 2. (1099-1106).

Tillmar, L.; Welsh, N. (2004). Glucose-induced binding of the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) to the 3'-untranslated region of the insulin mRNA (ins-PRS) is inhibited by rapamycin. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 260. 1. (85-90).

Toker, A.; Newton, A. C. (2000). Cellular Signaling. *Cell*. 103. 2. (185-188).

Tong, X.; Zhao, F.; Mancuso, A.; Gruber, J. J.; Thompson, C. B. (2009). The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106. 51. (21660-21665).

Tzur, G.; Levy, A.; Meiri, E.; Barad, O.; Spector, Y.; Bentwich, Z.; Mizrahi, L.; Katzenellenbogen, M.; Ben-Shushan, E.; Reubinoff, B. E.; Galun, E. (2008). MicroRNA Expression Patterns and Function in Endodermal Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One*. 3. 11. (e3726).

Uittenbogaard, M.; Baxter, K. K.; Chiaramello, A. (2010). NeuroD6 genomic signature bridging neuronal differentiation to survival via the molecular chaperone network. *Journal of Neuroscience Research*. 88. 1. (33-54).

University of Manchester (2015). miRBase.org. URL: <http://www.mirbase.org/index.shtml>. Stand: 09.07.2015.

- Uyeda, K.;** Yamashita, H.; Kawaguchi, T. (2002). Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP). *Biochemical Pharmacology*. 63. 12. (2075-2080).
- Vaidyanathan, K.; Wells, L.** (2014). Multiple Tissue-specific Roles for the O-GlcNAc Post-translational Modification in the Induction of and Complications Arising from Type II Diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*. 289. 50. (34466-34471).
- Vallier, L.;** Mendjan, S.; Brown, S.; Chng, Z.; Teo, A.; Smithers, L. E.; Trotter, M. W. B.; Cho, C. H.-H.; Martinez, A.; Rugg-Gunn, P.; Brons, G.; Pedersen, R. A. (2009). Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development*. 136. 8. (1339-1349).
- Vanderford, N. L.;** Andrali, S. S.; Özcan, S. (2007). Glucose Induces MafA Expression in Pancreatic Beta Cell Lines via the Hexosamine Biosynthetic Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 282. 3. (1577-1584).
- Van der Heiden, M. G.;** Cantley, L. C.; Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 324. 5930. (1029-1033).
- Van Hoof, D.;** D'Amour, K. A.; German, M. S. (2009). Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*. 3. 2–3. (73-87).
- Vanhoose, A. M.;** Samaras, S.; Artnier, I.; Henderson, E.; Hang, Y.; Stein, R. (2008). MafA and MafB Regulate Pdx1 Transcription through the Area II Control Region in Pancreatic β -Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 283. 33. (22612-22619).
- Van Ingen, H.;** Van Schaik, F. M. A.; Wienk, H.; Ballering, J.; Rehmann, H.; Dechesne, A. C.; Kruijzer, J. A. W.; Liskamp, R. M. J.; Timmers, H. T. M.; Boelens, R. (2008). Structural Insight into the Recognition of the H3K4me3 Mark by the TFIID Subunit TAF3. *Structure*. 16. 8. (1245-1256).
- Vaulont, S.;** Vasseur-Cognet, M.; Kahn, A. (2000). Glucose Regulation of Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 275. 41. (31555-31558).
- Vejnar, C. E.;** Zdobnov, E. M. (2012). MiRmap: comprehensive prediction of microRNA target repression strength. *Nucleic Acids Research*. 40. 22. (11673-11683).
- Waeber, G.;** Thompson, N.; Nicod, P.; Bonny, C. (1996). Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Molecular Endocrinology*. 10. 11. (1327-1334).
- Wandzioch, E.;** Zaret, K. S. (2009). Dynamic Signaling Network for the Specification of Embryonic Pancreas and Liver Progenitors. *Science*. 324. 5935. (1707-1710).
- Wang, H.;** Brun, T.; Kataoka, K.; Sharma, A. J.; Wollheim, C. B. (2007). MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia*. 50. 2. (348-358).
- Wang, R.-H.;** Xu, X.; Kim, H.-S.; Xiao, Z.; Deng, C.-X. (2013). SIRT1 Deacetylates FOXA2 and Is Critical for Pdx1 Transcription and β -Cell Formation. *International Journal of Biological Sciences*. 9. 9. (934-946).
- Warren, L.;** Manos, P. D.; Ahfeldt, T.; Loh, Y.-H.; Li, H.; Lau, F.; Ebina, W.; Mandal, P. K.; Smith, Z. D.; Meissner, A.; Daley, G. Q.; Brack, A. S.; Collins, J. J.; Cowan, C.; Schlaeger, T. M.; Rossi, D. J. (2010). Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 7. 5. (618-630).
- Watada, H.;** Kajimoto, Y.; Miyagawa, J.-I.; Hanafusa, T.; Hamaguchi, K.; Matsuoka, T.-A.; Yamamoto, K.; Matsuza-wa, Y.; Kawamori, R.; Yamasaki, Y. (1996). PDX-1 Induces Insulin and Glucokinase Gene Expressions in TC1 Clone 6 Cells in the Presence of Betacellulin. *Diabetes*. 45. 12. (1826-1831).

- Watanabe, K.;** Ueno, M.; Kamiya, D.; Nishiyama, A.; Matsumura, M.; Wataya, T.; Takahashi, J. B.; Nishikawa, S.; Nishikawa, S.-I.; Muguruma, K.; Sasai, Y. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 25. 6. (681-686).
- Webb, G. C.;** Akbar, M. S.; Zhao, C.; Steiner, D. F. (2000). Expression profiling of pancreatic β cells: Glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97. 11. (5773-5778).
- Wei, Z.;** Gao, F.; Kim, S.; Yang, H.; Lyu, J.; An, W.; Wang, K.; Lu, W. (2013). Klf4 Organizes Long-Range Chromosomal Interactions with the Oct4 Locus in Reprogramming and Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 13. 1. (36-47).
- Weinryb, N.; Bubela, T.** (2015). Stepping Into and Out of the Void: Funding Dynamics of Human Embryonic Stem Cell Research in California, Sweden, and South Korea. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2015 (1-7).
- Wernig, M.;** Meissner, A.; Foreman, R.; Brambrink, T.; Ku, M.; Hochedlinger, K.; Bernstein, B. E.; Jaenisch, R. (2007). *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 448. 7151. (318-324).
- Wertheim, J. A.; Leventhal, J. R.** (2015). Clinical Implications of Basic Science Discoveries: Induced Pluripotent Stem Cell Therapy in Transplantation - A Potential Role for Immunologic Tolerance. *American Journal of Transplantation*. 15. 4. (887-890).
- Whitehead Institute for Biomedical Research** (1998). Primer3: WWW primer tool. URL: http://biotools.umass-med.edu/bioapps/primer3_www.cgi. Stand: 18.07.2015.
- Wianny F.;** Real, F. X.; Mummery, C. L.; Van Rooijen, M.; Lahti, J.; Samarut, J.; Savatier, P. (1998). G1-Phase Regulators, Cyclin D1, Cyclin D2, and Cyclin D3: Up-Regulation at Gastrulation and Dynamic Expression During Neurulation. *Developmental Dynamics*. 212. (49-62).
- Winter, J.;** Jung, S.; Keller, S.; Gregory, R. I.; Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 11. (228-234).
- Witt, H.** (2013). Physiologie und Embryologie des Pankreas. In: Rodeck, B.; Zimmer, K.-P. (Hg.) *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*. 2013. (547-555).
- Wobus, A. M.; Boheler, K. R.** (2005). Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiological Reviews*. 85. 2. (635-678).
- Wobus, A. M.;** Guhr, A.; Löser, P. (2015). Forschung an humanen embryonalen Stammzellen in Deutschland – Historischer Rückblick und gegenwärtiger Stand. In: Arnold, N. (Hg.) *Biowissenschaften und Lebensschutz*. 2015 (126-160).
- Wu, H.;** Sun, Y. E. (2006). Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatric Research*. 59. 4 Pt 2. (21-25).
- Xu, X.;** Browning, V. L.; Odorico, J. S. (2011). Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells. *Mechanisms of Development*. 128. 7-10. (412-427).
- Xu, H.;** Tsang, K. S.; Chan, J. C. N.; Yuan, P.; Fan, R.; Kaneto, H.; Xu, G. (2013). The Combined Expression of Pdx1 and MafA With Either Ngn3 or NeuroD Improves the Differentiation Efficiency of Mouse Embryonic Stem Cells Into Insulin-Producing Cells. *Cell Transplantation*. 22. 1. (147-158).
- Yamanaka, S.** (2012). Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*. 10. 6. (678-684).
- Yan, J.;** Lin, J.; He, X. (2014). The emerging role of miR-375 in cancer. *International Journal of Cancer*. 135. 5. (1011-1018).

- Yang, D.**; Lutter, D.; Burtscher, I.; Uetzmann, L.; Theis, F. J.; Lickert, H. (2014). miR-335 promotes mesendodermal lineage segregation and shapes a transcription factor gradient in the endoderm. *Development*. 141. 3. (514-525).
- Yang, J.-H.**; Li, J.-H.; Jiang, S.; Zhou, H.; Qu, L.-H. (2013). CHIPBase: a database for decoding the transcriptional regulation of long non-coding RNA and microRNA genes from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*. 41. 1. (177-187).
- Yang, W.**; Chendrimada, T. P.; Wang, Q.; Higuchi, M.; Seeburg, P. H.; Shiekhattar, R.; Nishikura, K. (2006). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nature Structural & Molecular Biology*. 13. 1. (13-21).
- Ye, F.**; Duvallié, B.; Scharfmann, R. (2005). Fibroblast growth factors 7 and 10 are expressed in the human embryonic pancreatic mesenchyme and promote the proliferation of embryonic pancreatic epithelial cells. *Diabetologia*. 48. 2. (277-281).
- Yu, C.**; Xue, J.; Zhu, W.; Jiao, Y.; Zhang, S.; Cao, J. (2015). Warburg meets non-coding RNAs: the emerging role of ncRNA in regulating the glucose metabolism of cancer cells. *Tumor Biology*. 36. 1. (81-94).
- Yu, J.**; Vodyanik, M. A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J. L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G. A.; Ruotti, V.; Stewart, R.; Slukvin, I. I.; Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 318. 5858. (1917-1920).
- Zabner, J.**; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J. (1995). Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid. *The Journal of Biological Chemistry*. 270. 32. (18997-19007).
- Zhang, C.; Darnell, R. B.** (2011). Mapping *in vivo* protein-RNA interactions at single-nucleotide resolution from HITS-CLIP data. *Nature Biotechnology*. 29. 7. (607-614).
- Zhang, D.**; Jiang, W.; Shi, Y.; Deng, H. (2009). Generation of pancreatic islet cells from human embryonic stem cells. *Science in China Series C: Life Sciences*. 52. 7. (615-621).
- Zhang, J.**; Khvorostov, I.; Hong, J. S.; Oktay, Y.; Vergnes, L.; Nuebel, E.; Wahjudi, P. N.; Setoguchi, K.; Wang, G.; Do, A.; Jung, H.-J.; McCaffery, J. M.; Kurland, I. J.; Reue, K.; Lee, W.-N. P.; Koehler, C. M.; Teitell, M. A. (2011). UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells. *The EMBO Journal*. 30. 24. (4860-4873).
- Zhang, X.; Ho, S.-M.** (2010). Epigenetics meets endocrinology. *Journal of Molecular Endocrinology*. 46. 1. (11-32).
- Zhao, L.**; Guo, M.; Matsuoka, T.-A.; Hagman, D. K.; Parazzoli, S. D.; Poitout, V.; Stein, R. (2005). The Islet Beta Cell-enriched MafA Activator is a Key Regulator of Insulin Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 280. 12. (11887-11894).
- Zhao, T.**; Zhang, Z.-N.; Rong, Z.; Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 474. 7350. (212-215).
- Zhao, X.**; Mohan, R.; Özcan, S.; Tang, X. (2012). MicroRNA-30d Induces Insulin Transcription Factor MafA and Insulin Production by Targeting Mitogen-activated Protein 4 Kinase 4 (MAP4K4) in Pancreatic β -Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 287. 37. (31155-31164).
- Zwijnen, R. M.**; Wientjens, E.; Klompaker, R.; Van der Sman, J.; Bernards, R.; Michalides, R. J. (1997). CDK-Independent Activation of Estrogen Receptor by Cyclin D1. *Cell*. 88. 3. (405-415).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Diana Oelschlägel
Geburtsdatum /-ort: 14. April 1986 in Halle (Saale)
Nationalität: Deutsch

Ausbildung und beruflicher Werdegang

seit 04/2016	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Gastrointestinale Onkologie der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Halle (Saale)
04/2013 - 06/2015	Promotionsstipendium des Translationszentrums für Regenerative Medizin (TRM) Leipzig
11/2011 - 08/2016	Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Insa Schroeder Thema: „Pankreatische <i>in vitro</i> Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen – Welche Rolle spielen mikroRNAs und Glukose?“
05/2011 - 10/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie und Zellbiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2005 - 04/2011	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss als Diplom-Biologin Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Insa Schroeder am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Thema: “Pankreatische Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen”
08/1996 - 04/2005	Elisabeth-Gymnasium Halle (Saale) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Eingeworbene Drittmittel / Preise

04/2013 - 06/2015	TRM Award (Stipendium und Sachmittel) des Translationszentrums für Regenerative Medizin (TRM) Leipzig, C4117: „Manipulating pancreatic differentiation of pluripotent stem cells – which role play pancreatic microRNA?“
01/2013 - 12/2014	Wilhelm-Roux-Programm der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, FKZ 26/33: „Pancreatic differentiation and microRNA“

Halle (Saale), den 30.03.2016

Diana Oelschlägel

Publikationsverzeichnis

Artikel

Oelschlaegel D., Knittel K.R., Fischer B., Schroeder I.S. (2016). microRNA profiling and modulation during pancreatic *in vitro* differentiation of human pluripotent stem cells. Manuskript eingereicht bei *Scientific Reports*

Schroeder I.S., **Oelschlaegel D.**, Jung M. (2014). Stem Cell Applications for Pancreas Function. In Caglegari F., Waskow C. (Hg.), *Stem Cells: From Basic Research to Therapy, Volume 2: Tissue Homeostasis and Regeneration during Adulthood, Applications, Legislation and Ethics*. ISBN/DOI: 10.1201/b16962. CRC Press. (271-303)

Abstracts

Oelschlaegel D., Knittel K.R., Fischer B., Schroeder I.S. (2015). Enhancing the efficiency of pancreatic *in vitro* differentiation of human pluripotent stem cells via microRNA and glucose modulation. World Conference on Regenerative Medicine: 21.-23.10.2015 (Leipzig). *Regenerative Medicine* 10. (7s)

Oelschlaegel D., Knittel K.R., Fischer B., Schroeder I.S. (2014). Improving pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells via microRNA and glucose modulation. 5th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation: 08.-11.07.2014 (Dresden). ISBN: 978-3-9816508-4-6

Oelschlaegel D., Kuhn S., Lemke C., Schroeder I.S. (2013). Changing the miRNA-375 expression profile during pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. World Conference on Regenerative Medicine: 23.-25.10.2013 (Leipzig). *Regenerative Medicine*. 8. (6s)

Vorträge

Oelschlägel D., Knittel K.R., Fischer B., Schroeder I.S. (2015). Improving pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells via microRNA and glucose modulation. 12th German Islet Workshop 16.-18.3.2015, Bremen, Deutschland

Oelschlaegel D., Schroeder I. S. (2014). Pankreatische Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen – Welche Rolle spielen mikroRNAs und Nährstoffe? Wissenschaftliches Kolloquium des Translationszentrums für Regenerative Medizin (TRM) 21.08.2014, Leipzig, Deutschland

Oelschlägel D. (2014). Embryonale Stammzellen – kleine Alleskönner? Lange Nacht der Wissenschaften 24.06.2014, Leipzig, Deutschland

Oelschlägel D., Schroeder I.S. (2013). Changing the miR-375 expression profile during pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. 11th German Islet Workshop 15.-17.04.2013, Dresden, Deutschland

Poster

Knittel K.R., **Oelschlaegel D.**, Schroeder I.S., Fischer B. (2015). Improving the efficiency of pancreatic *in vitro* differentiation of human pluripotent stem cells via microRNA and glucose modulation. 3. Kongress für Doktorandinnen und Doktoranden der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 20.-21.11.2015, Halle (Saale), Deutschland

Oelschlaegel D., Knittel K.R., Fischer B., Schroeder I.S. (2015). Improving the efficiency of pancreatic *in vitro* differentiation of human pluripotent stem cells via microRNA and glucose modulation. 3rd Annual Conference of the German Stem Cell Network (GSCN) 09.-11.09.2015, Frankfurt am Main, Deutschland

Knittel K.R.*, **Oelschlaegel D.***, Fischer B., Schroeder I.S. (2014). Improving pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells via microRNA and glucose modulation. 2nd Annual Conference of the German Stem Cell Network (GSCN) 03.-05.11.2014, Heidelberg, Deutschland

Oelschlaegel D., Knittel K.R., Fischer B., Schroeder I.S. (2014). Improving pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells via microRNA and glucose modulation. 5th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation 08.-11.07.2014, Dresden, Deutschland

Oelschlaegel D., Kuhn S., Lemke C., Schroeder I.S. (2013). Influence of the microRNA-375 during pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. 1st Annual Conference of the German Stem Cell Network (GSCN) 11.-13.11.2013, Berlin, Deutschland

Oelschlaegel D., Kuhn S., Lemke C., Schroeder I.S. (2013). Changing the microRNA-375 expression profile during pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. World Conference on Regenerative Medicine 23.-25.10.2013, Leipzig, Deutschland

Oelschlaegel D., Kuhn S., Lemke C., Schroeder I.S. (2013). Changing the microRNA-375 expression profile during pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. 7th International Meeting of the Stem Cell Network NRW 23.-24.04.2013, Köln, Deutschland

Oelschlaegel D., Kuhn S., Lemke C., Schroeder I.S. (2012). microRNA expression during pancreatic differentiation of murine and human embryonic stem cells. 4th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation 18.-20.07.2012, Dresden, Deutschland

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Dissertation am Institut für Anatomie und Zellbiologie sowie die Einbindung in seine Arbeitsgruppe. Für die stetige Unterstützung und die Ermöglichung der Teilnahme an zahlreichen wissenschaftlichen Kongressen, die meine Zeit als Doktorandin sehr bereichert haben, bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. R. Gary Sawers möchte ich für die Betreuung meiner außerhalb des Instituts für Biologie angefertigten Dissertation danken.

Frau Dr. Insa Schroeder gilt mein Dank für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses spannenden Themas. Für die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge und Anregungen, die Unterstützung bei der selbstständigen Bearbeitung meines Projektes und die freundschaftliche Atmosphäre danke ich ihr ganz besonders.

Der gesamten ehemaligen Arbeitsgruppe Stammzellforschung von Frau Dr. Insa Schroeder und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Fischer danke ich für die freundschaftlich-kollegiale Arbeitsatmosphäre sowie die bereichernden Fachgespräche und das fortwährende Interesse an meiner Arbeit. Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Christine Fröhlich, die stets ein offenes Ohr sowohl für fachliche aber auch private Sorgen und Freuden hatte. Für ihre Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Tipps bei der praktischen Arbeit im Labor bin ich ihr sehr dankbar.

Frau PD Dr. med. Dagmar Riemann möchte ich meinen Dank für die investierte Zeit zur Betreuung der durchflusszytometrischen Analysen aussprechen.

Herrn Konrad R. Knittel möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die anregenden fachlichen Diskussionen danken.

Frau Annekatriin Richter danke ich für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Kooperation, verbunden mit vielen hilfreichen methodischen Ratschlägen und interessanten Gesprächen.

Ein herzliches Dankeschön gebührt meiner Familie und meinen Freunden, die mich mit stetigem Zuspruch während der gesamten Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Dem Translationszentrum für Regenerative Medizin (TRM) Leipzig und dem Wilhelm-Roux-Programm zur Nachwuchs- und Forschungsförderung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den 30.03.2016

Diana Oelschlägel