

Charakterisierung von *in vitro* differenzierten olfaktorischen Rezeptorneuronen aus induziert pluripotenten Stammzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
und
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Moritz Klingenstein
aus Groß-Gerau, Deutschland

Mai - 2017

Tag der mündlichen Prüfung: 11. September 2017

Dekan der Math.-Nat. Fakultät: Prof. Dr. W. Rosenstiel
Dekan der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Liebau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Strotmann

Prüfungskommission: Prof. Dr. Stefan Liebau
Prof. Dr. Jörg Strotmann
PD Dr. Andrea Wizenmann
PD Dr. Meltem Avci-Adali

Erklärung:

Ich erkläre, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Charakterisierung von *in vitro* differenzierten olfaktorischen Rezeptorneuronen aus induziert pluripotenten Stammzellen“

selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, den
Datum

.....
Unterschrift

Danksagungen

Mein erster Dank geht an meinen Betreuer und Doktorvater Stefan Liebau. Nicht nur fachlich konnte man jederzeit an seine Tür klopfen und einen Rat einholen, auch persönlich hatte er immer ein offenes Ohr für seine Doktoranden, was nicht zuletzt zu der guten Stimmung in dem ganzen Institut beitrug. Indem er mir die Freiheit ließ meine Forschung selbst zu gestalten, zu planen und die eigene Richtung einzuschlagen, lernte ich schnell selbstständig zu arbeiten, was in Zukunft nur hilfreich sein kann. Trotzdem fühlte ich mich nie im Stich gelassen oder schlecht betreut. Im Gegenteil, durch diese Freiheit konnte ich meine Ideen viel besser entfalten und mit ihm wissenschaftlich diskutieren. Außerdem hat er es mir ermöglicht und sogar gefördert nationale und internationale Kongresse zu besuchen, wodurch ich vor allem im Feld der olfaktorischen Forschung viele gute Kontakte knüpfen konnte.

Vielen Dank auch an Jörg Strotmann, der sich angeboten hat die Doktorarbeit als zweiter Berichtersteller zu bewerten, der aber auch als Kooperationspartner und als Experte in olfaktorischen Fragen immer ansprechbar war und mein Projekt durchgehend begleitet und unterstützt hat.

Danke auch an die Prüfer Eva Küppers und Meltem Avci-Adali, die sich die Zeit nehmen meiner Verteidigung beizuwohnen.

Vielen Dank auch an die Kooperationspartner. Die Leute der klinischen Anatomie, die uns immer mit frischen olfaktorischen Biopsien versorgt haben und auf die wir uns immer verlassen konnten, wenn uns mal wieder irgendwelche Medien, oder Supplements ausgegangen sind. Und an Stefan Hauser für die Benutzung des FACS-Geräts.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Arbeitsgruppe und Mitdoktoranden (Steffi, Jasmin, Kevin, Maira, Leo, Clara), die ich schon in Ulm kennen gelernt habe und die über die Zeit nicht nur nette Mitarbeiter, sondern sehr gute Freunde geworden sind. Die vielen Aktivitäten und Serienmarathons in der Mittagspause und an den Abenden ließen den Laboralltag erträglich werden und die Zeit hier wäre nicht so schön gewesen.

Herzlichen Dank auch für Sabine, die mit ihrem technischen und fachlichen Wissen und ihrem unermüdlichen Arbeitseinsatz eine große Unterstützung war und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank auch an die restlichen Mitarbeiter des Instituts, von denen wir sehr herzlich aufgenommen wurden, als wir aus Ulm angekommen sind. Vor allem die Ausflüge und Feiern haben sehr viel Spaß gemacht und werden in Zukunft hoffentlich mindesten genauso gut.

Ein großes Dankeschön auch an meine Freunde Hannes und Flo, die trotz der Entfernung nach dem Umzug nach Tübingen jederzeit für ein Spanferkel oder andere ‚Schweinereien‘ zu haben sind. Vielen Dank für eure Unterstützung und Freundschaft.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, meiner Mutter, die mich immer unterstützt hat, meinem Bruder Oli und Maya, meiner kleinen Nichte Mia, die mir das Leben versüßt und Dieter, der auch immer zur Stelle ist, wenn er gebraucht wird.

Auch meinem Vater möchte ich danken. Obwohl er leider nicht mitbekommen hat, wie ich meine Doktorarbeit geschrieben habe, wäre ich ohne ihn niemals so weit gekommen.

Mein größter Dank gilt meiner Seelenverwandten Steffi. Wir haben als Leiter der Gruppe ‚Scensation‘ die olfaktorische Forschung in diesem Institut etabliert und konnten durch hervorragende Zusammenarbeit das Projekt in kürzester Zeit voranbringen. Ich hoffe die lebendigen Diskussionen werden uns auch in Zukunft erhalten bleiben. Aber nicht nur als wertvolle Mitarbeiterin unterstützt sie mich. Auch als meine Lebenspartnerin ist sie immer für mich da und macht mich in jeder Hinsicht sehr glücklich. Unvergesslich bleiben mir die Urlaube und biologischen Exkursionen, die wir zusammen genossen haben, von denen es in Zukunft hoffentlich noch viele geben wird.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine zellbiologische in vitro Methodik, mit deren Hilfe man unterschiedlichste Gesichtspunkte des humanen olfaktorischen Systems beleuchten kann. Der Bedeutung des Geruchsinns (Olfaktion) wird in der Bevölkerung und in der Forschung im Vergleich zu den anderen Sinnen, wie zum Beispiel des Sehsinns, deutlich weniger Gewicht beigemessen. Und das obwohl die Olfaktion eine große Rolle in unserem Leben spielt. Es können nicht nur in hohem Maße und nachhaltig Erinnerungen mit Gerüchen verknüpft werden, oder eine Vielzahl von angenehmen oder unangenehmen Aromen unterschieden werden, sondern auch vor Gefahr warnen, sei es Rauch eines Feuers, oder vergammeltes Essen. Zudem besitzt das olfaktorische System einige besondere Eigenschaften. Das komplette olfaktorische Epithel (OE) kann von den olfaktorischen Basalzellen (Stammzellen) erneuert werden, darunter auch die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN), die als Teil des zentralen Nervensystems gelten und ihre Axone direkt in den olfaktorischen Bulbus im Telencephalon projizieren. Gleichzeitig sind die ORN über die Zilien ihres Dendriten, die in die Mukosa hineinragen, in direktem Kontakt zur Umwelt. Die olfaktorischen Rezeptoren (OR) sind in diesen Zilien verankert und können dort die Odoranten (Geruchsstoffe), die durch die Nase eingeatmet werden, binden. Dadurch wird ein Signal generiert, das zu den assoziativen Zentren des Gehirns weitergeleitet wird. Es existieren bis zu 800 verschiedene OR, die von eigenen Genen kodiert werden. Dies entspricht > 1 % des menschlichen, proteinkodierenden Genoms.

Um dieses faszinierende Gebiet im Menschen genauer zu erforschen, wurde in dieser Arbeit auf humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPSZ) zurückgegriffen. Diese werden von uns aus Keratinozyten aus gezupften Kopfharen reprogrammiert. Dafür wurden die Keratinozyten mit einem Lentivirus mit den vier „Yamanaka-Faktoren“ (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC*) infiziert, die die Zellen in einen ursprünglichen pluripotenten Zustand zurückführen. Die iPSZ haben das Potential, in alle Zellen der drei Keimblätter differenzieren zu können. Die vollständige Pluripotenz wurde mit immunzytochemischen Färbungen und Keimblattdifferenzierungen nachgewiesen.

Um das OE und die zugehörigen Zellen untersuchen zu können, wurde ein Protokoll entwickelt, mit dessen Hilfe iPSZ zu Neuronen differenzieren, die unter anderem ORN und andere Zellen des OE enthalten. In dieser Arbeit wurden ORN in der olfaktorischen Differenzierung durch die Expression von *OMP*, *NCAM2*, *UCHL1*, *GOLF*, *ADCY3* und *TMEM16B* nachgewiesen. Weiterhin wurden olfaktorische Basalzellen durch *SOX2* und *NGFR*, olfaktorische Vorläufer und unreife ORN durch *ASCL1* und *CALB2*, sowie Stützzellen des OE durch *ECAD* Expression nachgewiesen. Von allen Markern wurde die RNA-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt und die Proteine mit Immunfluoreszenz-Färbungen und teilweise mit Western Blot gezeigt. Für eine Quantifizierung für bestimmte Marker wurden FACS-Analysen durchgeführt.

Nach dem Nachweis der verschiedenen Marker und somit auch der olfaktorischen Zellen, wurden funktionelle Analysen durchgeführt, um zu zeigen, dass die ORN auf Duftstoffe reagieren können. Dafür wurde zunächst auf RNA-Ebene die Expression einiger ausgewählter OR (*OR1A1*, *OR1G1*, *OR2J2*, *OR2S2*, *OR2W1*, *OR5P3*, *OR13C8*, *OR13C5*) bestätigt, was die Voraussetzung einer funktionellen

Reaktion auf die Odoranten ist. Die Messung der Antwort wurde mit einem Kalzium-Imaging sichtbar gemacht. Dafür wurde die olfaktorisch differenzierten mit einem Fluorophor inkubiert, die nach Bindung mit Ca^{2+} -Ionen ein grünes Fluoreszenzsignal entsenden, das mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden konnte. Den Zellen wurde hierfür ein Odorantenmix zugefügt und die Reaktion der Zellen konnte durch deren Aufleuchten erkannt und aufgezeichnet werden.

Es wurde also gezeigt, dass mit diesem Protokoll aus iPSZ eine Neuronenkultur differenziert werden konnte, in der funktionelle ORN und andere Zelltypen des OE vorkommen. Für weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel Odorant-Rezeptor-Interaktionen oder entwicklungsbiologische Studien, muss das Protokoll soweit verbessert werden, dass die Anzahl der ORN deutlich zunimmt. Dann können auch Patienten-Analysen vorgenommen werden, indem iPSZ von Anosmie-Patienten generiert werden und diese zu ORN differenziert werden.

Summary

This thesis introduces an *in vitro* cell biological method illuminating different aspects of the human olfactory System. In the community and in research the importance of the sense of smell is less valued compared to other senses, like the sense of vision. Although, olfaction plays a crucial role in our life. Odors can not only establish strong and enduring memories or discriminate a huge variety of pleasant or unpleasant odors and aromas, but can also admonish dangers like fire or rotten food. Additionally, the olfactory system has special abilities. The complete olfactory epithelium (OE) can be regenerated by olfactory basal cells (stem cells), amongst them the olfactory receptor neurons (ORN), which are part of the central nervous system with their axons projecting towards the olfactory bulb in the telencephalon. Concurrently, the ORN exhibit a direct contact to the environment, with their cilia protruding into the olfactory mucosa. The olfactory receptors (OR) are located in the cilia and can bind the odorants inhaled through the nose. There, a signal is generated and transferred to the respective associative centres of the brain. There are nearly 800 different OR coding genes, representing more than 1 % of the human protein coding genome.

Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) were chosen as tool for investigating this fascinating field. iPSCs were reprogrammed from plucked hair derived keratinocytes. A lentivirus encoding the four 'Yamanaka-factors' (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*) was utilized to infect the keratinocytes and to facilitate the reprogramming towards a pluripotent origin. iPSCs have the potential to differentiate into all cells of the three germ layers. Full pluripotency was proven via immunocytochemical stainings and germ layer differentiation.

The investigation of the OE and its associated cell types was realised with the establishment of a protocol differentiating iPSCs to neurons, amongst them the ORN and other cells of the OE. In this thesis, these cells were verified in the olfactory differentiation. Therefore, the markers OMP, NCAM2, UCHL1, GOLF, ADCY3 and TMEM16B were used to identify ORN, SOX2 and NGFR show olfactory basal cells, ASCL1 and CALB2 are expressed in olfactory precursor populations and immature ORN and finally ECAD was used to detect supporting cells of the OE. The RNA-Expression was measured at different time-points and proteins were identified via immunofluorescence stainings and partly with Western Blot analysis. FACS analyses were used for quantification of distinct markers.

After proving the existence of the markers and the olfactory cells in the olfactory differentiation, functional analysis were performed to show the reaction of the ORN to odorants. First, RNA expression was evaluated for chosen OR (*OR1A1*, *OR1G1*, *OR2J2*, *OR2S2*, *OR2W1*, *OR5P3*, *OR13C8*, *OR13C5*) as a precondition of functional responses to odorants. Calcium-Imaging was used as a method to visualize the cellular response. Cells of the olfactory differentiation were incubated with a fluorophor showing a green fluorescence signal after binding Ca^{2+} -ions, detected by a fluorescent microscope. Cells responding to the odormix added to the medium via increasing intracellular Ca^{2+} concentrations, a green fluorescent signal is detected.

We can show that our protocol can differentiate iPSCs to a neuronal culture with functional ORN and other cell types of the OE. Following investigations such as odor-receptor-relations or developmental

studies, the protocol has to be improved to guarantee a higher amount of ORN. Then, patient specific analyses can be promoted with anosmia patient derived iPSCs differentiated to ORN.

INHALTSVERZEICHNIS:

DANKSAGUNGEN.....	VII
ZUSAMMENFASSUNG.....	IX
SUMMARY.....	XI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XVI
TABELLENVERZEICHNIS.....	XVII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XVIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Das olfaktorische System	1
1.1.1. Die Bedeutung des Geruchsinns.....	1
1.1.2. Aufbau und Anatomie	1
1.1.3. Entwicklung	4
1.1.3.1. Frühentwicklung	4
1.1.3.2. Neurulation und Präplakodale Region	6
1.1.3.3. Entwicklung des olfaktorischen Epithels.....	9
1.1.4. Olfaktorisches Epithel.....	11
1.1.4.1. Zelltypen	11
1.1.5. Signalrezeption und –transduktion	13
1.1.5.1. Olfaktorische Mukosa	13
1.1.5.2. Olfaktorische Rezeptoren	14
1.1.5.3. Duftstoffe	14
1.1.5.4. Signalrezeption und –Weiterleitung	15
1.2. Differenzierung	16
1.2.1. Induziert pluripotente Stammzellen (iPSZ)	16
1.2.1.1. Allgemein	16
1.2.1.2. Reprogrammierung.....	17
1.2.2. Olfaktorische Differenzierung	19
1.3. Ziel der Arbeit.....	20
2. Material	22
2.1. Zellkultur	22
2.1.1. Zelllinien	22
2.1.2. Medien	22
2.1.3. Grundmedien	24
2.1.4. Zusätze	24
2.2. Chemikalien, Enzyme und Zusätze.....	25
2.3. Lösungen und Puffer	26
2.4. Odoranten	27
2.5. Vektoren	27
2.6. Kits.....	28
2.7. Primer.....	28
2.8. Antikörper	29
2.9. Verbrauchsmaterialien.....	30

2.10.	Geräte	31
2.11.	Software.....	32
3.	Methoden.....	33
3.1.	Entnahme der humanen, olfaktorischen Biopsie.....	33
3.2.	Reprogrammierung zu induziert pluripotenten Stammzellen	33
3.2.1.	Keratinocyten Kultur	33
3.2.2.	Produktion des Reprogrammierungsvirus	33
3.2.3.	Reprogrammierung von Keratinocyten.....	34
3.2.4.	iPSZ Kultur	34
3.2.5.	iPSZ Charakterisierung	35
3.3.	Olfaktorische Differenzierung.....	36
3.3.1.	Embryoid-Body (EB)-Formation	36
3.3.2.	Neuronale Rosetten	36
3.3.3.	Neurale Stammzellen (NSZ).....	36
3.3.4.	Neurone.....	36
3.4.	Charakterisierung olfaktorischer Rezeptorneurone	37
3.4.1.	Proteinanalysen.....	37
3.4.1.1.	Immunofluoreszenz-Färbung.....	37
3.4.1.2.	Western Blot	38
3.4.1.3.	FACS-Analysen	38
3.4.2.	RNA-Analysen	39
3.4.2.1.	RNA-Isolation	39
3.4.2.2.	qRT-PCR.....	39
3.4.2.3.	StepOnePlus™ Real-time PCR System	40
3.4.2.4.	Biomark™	41
3.4.3.	Funktionelle Analysen	41
3.4.3.1.	Ca ²⁺ -Imaging.....	41
4.	Ergebnisse.....	42
4.1.	Olfaktorisches Epithel aus humaner Biopsie.....	43
4.1.1.	RNA-Expression	43
4.1.2.	Immunfluoreszenz.....	44
4.1.2.1.	Reife ORN	44
4.1.2.1.	Olfaktorische Signalkaskade	46
4.1.2.2.	Olfaktorische Basalzellen	47
4.1.2.1.	Olfaktorische Vorläuferzellen	48
4.1.2.2.	Stützzellen des OE.....	49
4.2.	iPSZ aus reprogrammierten Keratinocyten	51
4.2.1.	Reprogrammierung	52
4.2.2.	Charakterisierung.....	53
4.2.2.1.	Pluripotenzfärbung	53
4.2.2.2.	Keimblattdifferenzierung.....	54
4.3.	Olfaktorische Differenzierung.....	56
4.4.	Olfaktorische Rezeptorneurone <i>in vitro</i>	57
4.4.1.	OMP.....	58
4.4.1.1.	Expressions-Daten von <i>OMP</i>	58
4.4.1.2.	Immunfluoreszenz-Färbung mit <i>OMP</i>	59
4.4.1.3.	Western Blot mit <i>OMP</i>	60
4.4.1.4.	FACS mit <i>OMP</i>	61
4.4.1.	Olfaktorische Rezeptorneurone	63
4.4.1.1.	Expressionsdaten der ORN-Marker-Gene.....	63
4.4.1.2.	Expressionsverlauf der ORN-Marker-Gene.....	64
4.4.1.3.	Immunfluoreszenz-Färbung mit reifen ORN-Markern.....	65

4.4.1.4.	Western Blot mit ORN-Markern	67
4.4.1.5.	FACS mit ORN-Markern.....	68
4.4.2.	Olfaktorische Signalkaskade.....	70
4.4.2.1.	Expressionsdaten von Genen der olfaktorischen Signalkaskade	70
4.4.2.2.	Expressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Signalkaskade	71
4.4.2.3.	Immunfluoreszenz-Färbung von Markern der olfaktorischen Signalkaskade.....	71
4.4.2.4.	Western Blot mit Markern der olfaktorischen Signalkaskade	72
4.4.2.5.	FACS-Analyse mit Markern der olfaktorischen Signalkaskade.....	73
4.5.	Weitere olfaktorische Zellen <i>in vitro</i>	75
4.5.1.	Olfaktorische Basalzellen	75
4.5.1.1.	Expressionsdaten von Genen der olfaktorischen Basalzellen.....	75
4.5.1.2.	Expressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Basalzellen.....	76
4.5.1.3.	Immunfluoreszenz-Färbung von Markern der olfaktorischen Basalzellen	77
4.5.2.	Olfaktorische Vorläuferzellen.....	78
4.5.2.1.	Expressionsdaten von Genen der olfaktorischen Vorläuferzellen	78
4.5.2.2.	Expressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Vorläuferzellen	79
4.5.2.3.	Immunfluoreszenz-Färbung von Markern der olfaktorischen Vorläuferzellen	79
4.5.3.	Stützzellen	81
4.6.	Funktionelle Analysen	82
4.6.1.	Olfaktorische Rezeptoren.....	83
4.6.2.	Kalzium-Imaging	83
5.	Diskussion.....	87
5.1.	Olfaktorisches Epithel aus humaner Biopsie als positiv-Kontrolle.....	87
5.2.	Humane iPSC als Werkzeug zur Untersuchung des OE	88
5.2.1.	Welche Art der Reprogrammierung und welche Zellen werden genutzt?.....	88
5.2.2.	Charakterisierung der iPSC	90
5.2.3.	Was macht die iPSC zu einem geeigneten Modell für die Untersuchung von ORN?	90
5.2.4.	Zusammenfassung: iPSC als Werkzeug zur Untersuchung des OE	91
5.3.	ORN aus olfaktorischer Differenzierung	92
5.3.1.	OMP als Marker für reife ORN?.....	92
5.3.1.1.	OMP in der Biopsie	92
5.3.1.2.	OMP in der Differenzierung	93
5.3.1.3.	Zusammenfassung: Ist OMP als Marker für ORN geeignet?.....	96
5.3.2.	Weitere mögliche Marker für ORN	97
5.3.2.1.	UCHL1	97
5.3.2.2.	NCAM2	98
5.3.2.3.	Zusammenfassung: Marker für ORN.....	99
5.3.3.	Komponenten der olfaktorischen Signalkaskade als Marker für ORN?	100
5.3.3.1.	GOLF.....	101
5.3.3.2.	ADCY3	102
5.3.3.3.	TMEM16B	102
5.3.3.4.	Zusammenfassung: Komponenten der olfaktorischen Signalkaskade als Marker.....	103
5.3.4.	Olfaktorische Vorläuferzellen.....	104
5.3.4.1.	ASCL1	104
5.3.4.2.	CALB2	105
5.3.4.3.	Zusammenfassung: Olfaktorische Vorläuferzellen	106
5.3.5.	Zusammenfassung: ORN in der Differenzierung	106
5.4.	Andere Zelltypen des OE in der olfaktorischen Differenzierung.....	107
5.4.1.	Olfaktorische Basalzellen	107
5.4.2.	Stützzellen des OE	108
5.5.	Sind die ORN in der olfaktorischen Differenzierung funktionell?	108
5.5.1.	Welche OR wurden ausgewählt und warum?.....	109
5.5.2.	Expression der OR	110

5.5.3.	Kalzium-Imaging	110
5.5.4.	Zusammenfassung: funktionelle ORN in der olfaktorischen Differenzierung?	112
5.6.	Fazit und Ausblick	112
5.6.1.	Fazit	112
5.6.2.	Verbesserung des Protokolls	113
5.6.3.	Olfaktorische Basalzellen aus der Biopsie des OE	113
5.6.4.	Weitere Marker für die olfaktorischen Zelltypen	113
5.6.5.	Entwicklung des OE im Menschen	114
5.6.6.	Rezeptor-Odoranten Interaktionen	114
5.6.7.	Patientenspezifische ORN	114
6.	Literatur	115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Aufbau olfaktorisches System.	3
Abbildung 1.2:	Frühentwicklung bis zur Gastrulation	6
Abbildung 1.3:	Neurulation	8
Abbildung 1.4:	Schicksal der Zonen nach der Neurulation	8
Abbildung 1.5:	Plakoden	9
Abbildung 1.6:	Entwicklung des olfaktorischen Epithels	10
Abbildung 1.7:	Aufbau des olfaktorischen Epithels	11
Abbildung 1.8:	Olfaktorische Signalrezeption und -kaskade	16
Abbildung 1.9:	Stammzell Hierarchie	17
Abbildung 1.10:	Reprogrammierung	19
Abbildung 1.11:	Neuronale Differenzierung	20
Abbildung 4.1:	<i>OMP</i> -Expression in iPSZ und OE.	43
Abbildung 4.2:	Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit <i>OMP</i> und <i>TUBB3</i>	45
Abbildung 4.3:	Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit <i>UCHL1</i> und <i>OMP</i>	46
Abbildung 4.4:	Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit <i>TMEM16B</i> , <i>GOLF</i> und <i>ADCY3</i>	47
Abbildung 4.5:	Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit <i>SOX2</i> und <i>NGFR</i>	48
Abbildung 4.6:	Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit <i>ASCL1</i> und <i>CALB2</i>	49
Abbildung 4.7:	Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit <i>ECAD</i>	50
Abbildung 4.8:	Kopfhaar mit Wurzel	51
Abbildung 4.9:	Haarwurzel mit auswachsenden Keratinozyten.	52
Abbildung 4.10:	iPSZ-Kolonien	53
Abbildung 4.11:	Pluripotenzfärbung.	54
Abbildung 4.12:	Immunofluoreszenz-Färbung einer Keimblattdifferenzierung	55
Abbildung 4.13:	qRT-PCR einer Keimblattdifferenzierung	56
Abbildung 4.14:	Stadien der olfaktorischen Differenzierung.	57
Abbildung 4.15:	Relative <i>OMP</i> -Expression	58
Abbildung 4.16:	Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit <i>OMP</i> und <i>TUBB3</i>	60
Abbildung 4.17:	Western Blot mit <i>OMP</i>	61
Abbildung 4.18:	FACS-Analyse mit <i>OMP</i>	62
Abbildung 4.19:	FACS-Analyse mit <i>TUBB3</i>	63
Abbildung 4.20:	Relative Expression von Genen reifer ORN.	64
Abbildung 4.21:	Ex-pressionsverlauf der reifen ORN-Gene	65
Abbildung 4.22:	Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit <i>UCHL1</i> und <i>NCAM2</i>	66
Abbildung 4.23:	Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit <i>UCHL1</i> und <i>NCAM2</i>	67
Abbildung 4.24:	Western Blot mit <i>UCHL1</i>	68

Abbildung 4.25: FACS-Analyse mit UCHL1	69
Abbildung 4.26: FACS-Analyse mit NCAM2.....	69
Abbildung 4.27: Relative Expression von <i>GOLF</i> und <i>ADCY3</i>	70
Abbildung 4.28: Ex-pressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Signal-kaskade.	71
Abbildung 4.29: Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit <i>GOLF</i> und <i>TMEM16B</i> . 72	
Abbildung 4.30: Wetsern Blot mit <i>GOLF</i>	73
Abbildung 4.31: FACS-Analyse mit <i>GOLF</i>	74
Abbildung 4.32: FACS-Analyse mit <i>TMEM16B</i>	74
Abbildung 4.33: Relative Expression von <i>SOX2</i> und <i>NGFR</i>	76
Abbildung 4.34: Ex-pressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Basalzellen.	76
Abbildung 4.35: Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit <i>SOX2</i> und <i>NGFR</i>	77
Abbildung 4.36: Relative Expression von <i>ASCL1</i> und <i>CALB2</i>	78
Abbildung 4.37: Ex-pressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Vorläufer-zellen.	79
Abbildung 4.38: Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit <i>ASCL1</i> und <i>CALB2</i>	80
Abbildung 4.39: Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit <i>ASCL1</i> und <i>CALB2</i>	81
Abbildung 4.40: Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit <i>SOX2</i> und <i>ECAD</i>	82
Abbildung 4.41: Expressionsdaten von OR-Genen	83
Abbildung 4.42: Kalzium-Imaging mit EtOH.....	84
Abbildung 4.43: Kalzium-Imaging mit Odoranten-mix	85
Abbildung 4.44: Kalzium-Imaging mit Odoranten-mix	86

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.1: Abkürzungsverzeichnis</i>	XVIII
<i>Tabelle 2.1: Liste aller verwendeten Zelllinien</i>	22
<i>Tabelle 2.2: Liste aller verwendeten Medien und ihre Zusammensetzung</i>	22
<i>Tabelle 2.3: Liste aller verwendeten Grundmedien</i>	24
<i>Tabelle 2.4: Liste aller Zusätze der verwendeten Medien</i>	24
<i>Tabelle 2.5: Liste aller verwendeten Chemikalien, Enzyme und Zusätze</i>	25
<i>Tabelle 2.6: Liste aller verwendeten Lösungen und Puffer</i>	26
<i>Tabelle 2.7: Odorantenmix</i>	27
<i>Tabelle 2.8: Liste aller verwendeten Vektoren</i>	27
<i>Tabelle 2.9: Liste aller verwendeten Kits</i>	28
<i>Tabelle 2.10: Liste aller verwendeten Primer</i>	28
<i>Tabelle 2.11: Liste aller verwendeten Primärantikörper</i>	29
<i>Tabelle 2.12: Liste aller verwendeten Sekundärantikörper</i>	29
<i>Tabelle 2.13: Liste der Antikörper des Pluripotenzfärbekits</i>	30
<i>Tabelle 2.14: Liste aller verwendeten Verbrauchsmaterialien</i>	30
<i>Tabelle 2.15: Liste aller verwendeten Geräte</i>	31
<i>Tabelle 2.16: Liste der verwendeten Software</i>	32
<i>Tabelle 3.1: Mastermix für eine qRT-PCR</i>	40
<i>Tabelle 3.2: PCR-Lauf-Zeiten</i>	40
<i>Tabelle 5.1: Überblick der Methoden zum Nachweis von OMP</i>	96
<i>Tabelle 5.2: Überblick der Methoden zum Nachweis von UCHL1</i>	98
<i>Tabelle 5.3: Überblick der Methoden zum Nachweis von NCAM2</i>	99
<i>Tabelle 5.4: Überblick der Methoden zum Nachweis von GOLF</i>	102
<i>Tabelle 5.5: Überblick der Methoden zum Nachweis von ADCY3</i>	102
<i>Tabelle 5.6: Überblick der Methoden zum Nachweis von TMEM16B</i>	103
<i>Tabelle 5.7: Überblick der Methoden zum Nachweis von ASCL1</i>	105

Tabelle 5.8: Überblick der Methoden zum Nachweis von CALB2..... 105
Tabelle 5.9: Liste des Odorantenmixes mit den entsprechenden Rezeptoren 110

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1.1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADCY3	Adenylyl
AFP	Alpha Fetoprotein
ASCL1	Achaete-scute homolog 1
ATP	Adenosine Triphosphat
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
ca.	Circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CALB2	Calbindin 2
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphat
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
Cl ⁻	Chlorid-Ionen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EB	Embryoid Bodies
ECAD	E-Cadherin
EGF	Epidermal Growth Factor
et al.	Und andere
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FGF8	Fibroblast Growth Factor 8
FOXA2	Forkhead-Box Protein A2
FTDA	FGF2/TGFβ/Dorsomorphin/ActivinA

g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBZ	Globose Basalzellen
GDNF	Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GNAL	s. GOLF
GOLF	Guanin-Nucleotide Binding Protein Subunit alpha olfactory type
h	Stunde
HAS	Humanes Serum Albumin
HBZ	Horizontale Basalzellen
HCl	Salzsäure
HEK	Human Embryonic Kidney
HMBS	Hydroxymethylbilane Synthase
<i>In vitro</i>	‘im Glas’
<i>In vivo</i>	‘im Lebendigen’
iPSCs	Induced Pluripotente Stem Cells
iPSZ	Induziert Pluripotente Stammzellen
ITS	Insulin/Transferrin/Selenit
kDa	Kilodalton
KLF4	Kruppel Like Factor 4
MEF	Mausembryo-Fibroblasten
min	Minuten
ml	Milliliter
MYH6	Myosine Heavy Chain 6
n	Anzahl
NCAM2	Neural Cell Adhesion Molecule 2
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NSZ	Neurale Stammzellen
O₂	Sauerstoff
OBP	Odorant Binding Protein
OCAM	Olfactory Cell Adhesion Molecule
OCT4	Octamer Binding Transcription Factor 4
OE	Olfaktorisches Epithel
OMP	Olfaktorisches Marker Protein
OR	Olfaktorischer Rezeptor
OR13C5	Olfactory Receptor Family 13 Subfamily C Member 5
OR13C8	Olfactory Receptor Family 13 Subfamily C Member 8
OR1A1	Olfactory Receptor Family 1 Subfamily A Member 1
OR1G1	Olfactory Receptor Family 1 Subfamily G Member 1
OR2J2	Olfactory Receptor Family 2 Subfamily J Member 2
OR2S2	Olfactory Receptor Family 2 Subfamily S Member 2
OR2W1	Olfactory Receptor Family 2 Subfamily W Member 1
OR5P3	Olfactory Receptor Family 5 Subfamily P Member 3
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone
PAX6	Paired Box 6

PBS	Phosphate-Buffered Saline
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldehyd
PPR	Präplakodale Region
qRT-PCR	Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction
RA	Retinsäure
REF	Rattenembryo-Fibroblasten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute
SOX17	Sex Determining Region Y-Box 17
SOX2	Sex Determining Region Y-Box 2
SSEA4	Stage-Specific Embryonic Antigen 4
T	Brachyury
TGF-β1	Transforming Growth Factor Beta 1
TMEM16B	Transmembrane Protein 16B
TUBB3	Beta 3 Tubulin
UCHL1	Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Das olfaktorische System

Erstaunlicherweise ist das olfaktorische System beim Menschen im Vergleich zu den anderen sensorischen Organen bisher nur unzureichend untersucht. In dieser Arbeit soll mit Hilfe spezieller Methoden das Allgemeinverständnis des Olfaktorischen Systems und vor allem der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) genauer beleuchtet werden, um neue Erkenntnisse auch im Hinblick auf klinische Anwendungen zu erlangen. In der Einleitung zum olfaktorischen System wird deshalb auf die bisherigen Erkenntnisse eingegangen, wie anatomischer und funktioneller Aufbau des Systems, Entwicklung des olfaktorischen Epithels (OE) mit Rezeption der Geruchsstoffe und deren Signaltransduktion. Es gibt aber auch einen kurzen Abschnitt zur Bedeutung des Geruchssinnes um zu verdeutlichen, dass der olfaktorische Sinn ein nicht zu unterschätzender Bestandteil der Sensorik darstellt.

1.1.1. Die Bedeutung des Geruchsinns

Die Olfaktion hat im Tierreich einen enormen Stellenwert innerhalb der Sensorik. Unter anderem spielt sie eine entscheidende Rolle beispielsweise bei der Nahrungssuche, Reproduktion und Orientierung. Zusätzlich wird das soziale Zusammenleben bei vielen Spezies durch den Geruch gesteuert [1]. Auch beim Menschen sollte der Geruchssinn nicht unterschätzt werden. Gerüche können mit Erinnerungen und Emotionen in Verbindung gebracht werden und dienen zudem auch als Auslöser für Schutzreflexe wie Würgen und Erbrechen [2]. Mit ca. 800 Genen stellen die olfaktorischen Rezeptoren die größte Genfamilie im menschlichen Genom dar [3, 4], wobei 360 Rezeptor-Gene funktionell sind, die restlichen weitgehend Pseudogene ohne Effekt [5, 6]. Jede olfaktorische Sinneszelle ist auf einen spezifischen Rezeptortyp spezialisiert, jedoch kann jeder Rezeptor verschiedene Duftmoleküle erkennen. Dadurch ermöglicht sich eine Wahrnehmung von mehr als 10000 verschiedenen Odoranten, die sich in Kombination zu einem immensen Spektrum an Gerüchen vereinen [7].

1.1.2. Aufbau und Anatomie

Das olfaktorische System setzt sich aus verschiedenen einzelnen Bestandteilen zusammen. Hier wird zunächst ein Überblick über das komplette System gegeben – wo ist es lokalisiert, wie ist es aufgebaut, welche anatomischen Strukturen sind vorhanden und wie sind die einzelnen Bereiche miteinander verknüpft, oder anders gesagt, wie gelangt die Geruchsinformation aus der Umgebungsluft bis in den Wahrnehmungsbereich des zentralen Nervensystems. Dabei werden in diesem Kapitel nicht die Funktion und der Aufbau jedes einzelnen Abschnitts betrachtet, sondern es wird der Augenmerk auf den Überblick des gesamten olfaktorischen Systems gelegt. In den darauffolgenden Kapiteln werden einzelne Bereiche des Systems näher beleuchtet.

Das olfaktorische System hat die Funktion, Geruchsstoffe aus der Umwelt wahrzunehmen und zu interpretieren. Dafür werden die einzelnen Duftmoleküle mit der Luft durch die Nase aufgenommen,

wobei die Atemluft durch die beiden Nasenlöcher in die keilförmigen Nasenhöhlen eindringt [8] (Abbildung 1.1). Die Nasenhöhle gliedert sich in einen Vorhof und eine Nasenhaupthöhle. Der Übergang zur Nasenhaupthöhle ist die engste Stelle auf dem Weg der Luft und wird dort verwirbelt – ein wichtiger Vorgang für die olfaktorische Wahrnehmung, da so die Luft mit den Geruchsmolekülen an die Decke der Nasenhöhle gelangt, in der die Riechschleimhaut (OE und Lamina propria) lokalisiert ist. Die beiden Nasenhöhlen werden vom Nasenseptum getrennt, während die Mundhöhle durch den harten Gaumen abgegrenzt ist. Innerhalb der Nasenhaupthöhlen wird die Luft durch drei Wülste, die sogenannten Nasenmuscheln, in vier Luftkanäle eingeteilt. Über der oberen Nasenmuschel befindet sich die Riechschleimhaut mit den olfaktorischen Rezeptorneuronen, welches in etwa eine Größe von fünf Quadratzentimetern aufweist (Abbildung 1.1). Die Riechschleimhaut wird von der Nasenschleimhaut umgeben, die die restliche Oberfläche der Nasenhöhle überzieht. Im olfaktorischen Epithel kommen verschiedene Zelltypen vor – die ORN, Stützzellen, Vorläuferzellen und die Basalzellen, auf welche später jeweils noch genauer eingegangen wird. In der Lamina propria sind außerdem noch olfaktorische Drüsen lokalisiert, die den Schleim für die Epitheloberfläche produzieren. Die einströmende Luft mit den Geruchsstoffen passiert die Riechschleimhaut, die Geruchsmoleküle haften an dem sezernierten Schleim und werden von den olfaktorischen Rezeptoren (OR), die in den Zilien der ORN direkt an der Oberfläche der Riechschleimhaut in großer Zahl vorkommen, gebunden. Nach Signalgenerierung werden die Informationen über die Axone der ORN weitergeleitet. Die Axone werden gebündelt (Fila Olfactoria) und führen durch das knöcherne Siebbein, welches als Decke der Nasenhöhle die Grenze zum Gehirn bildet, direkt in den Bulbus olfactorius (Abbildung 1.1). Der Bulbus olfactorius ist eine Ausstülpung des Telencephalons und somit Teil des zentralen Nervensystems. Im Bulbus wird das Signal über verschiedene Interneurone in den olfaktorischen Kortex gesendet, in dem die Informationen der verschiedenen Geruchsstoffe verglichen, verarbeitet und weitergeleitet werden [Anatomie, Das Lehrbuch],[Anatomie],[Prometheus LernAtlas der Anatomie].

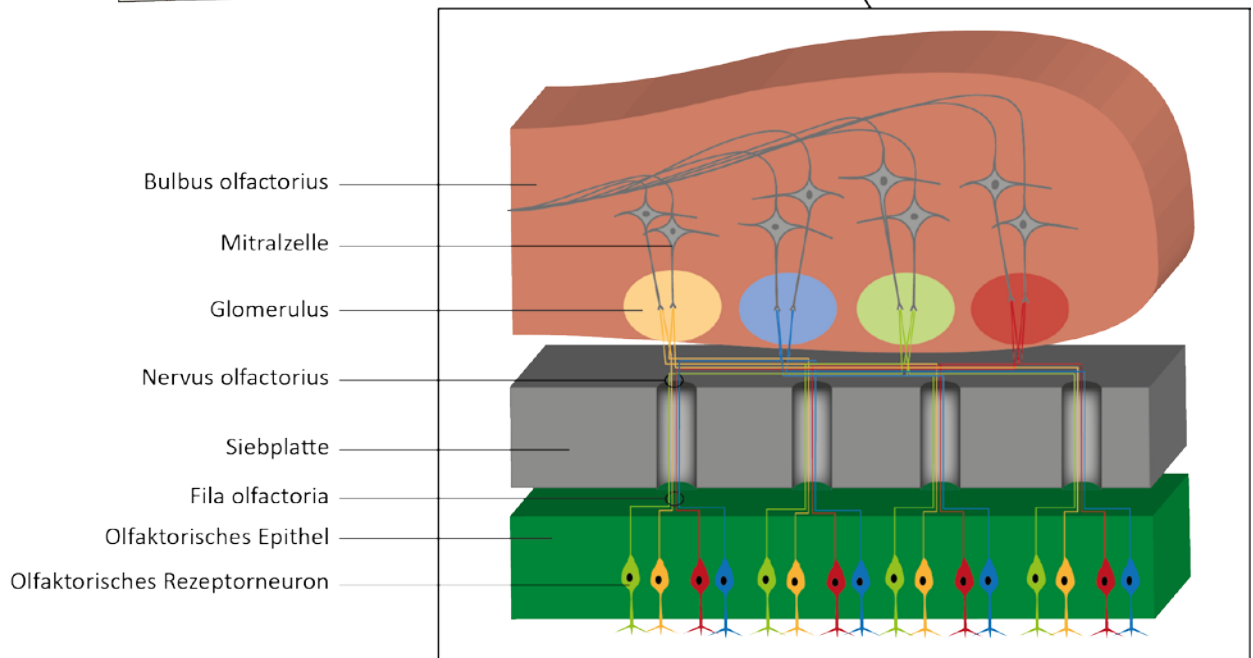
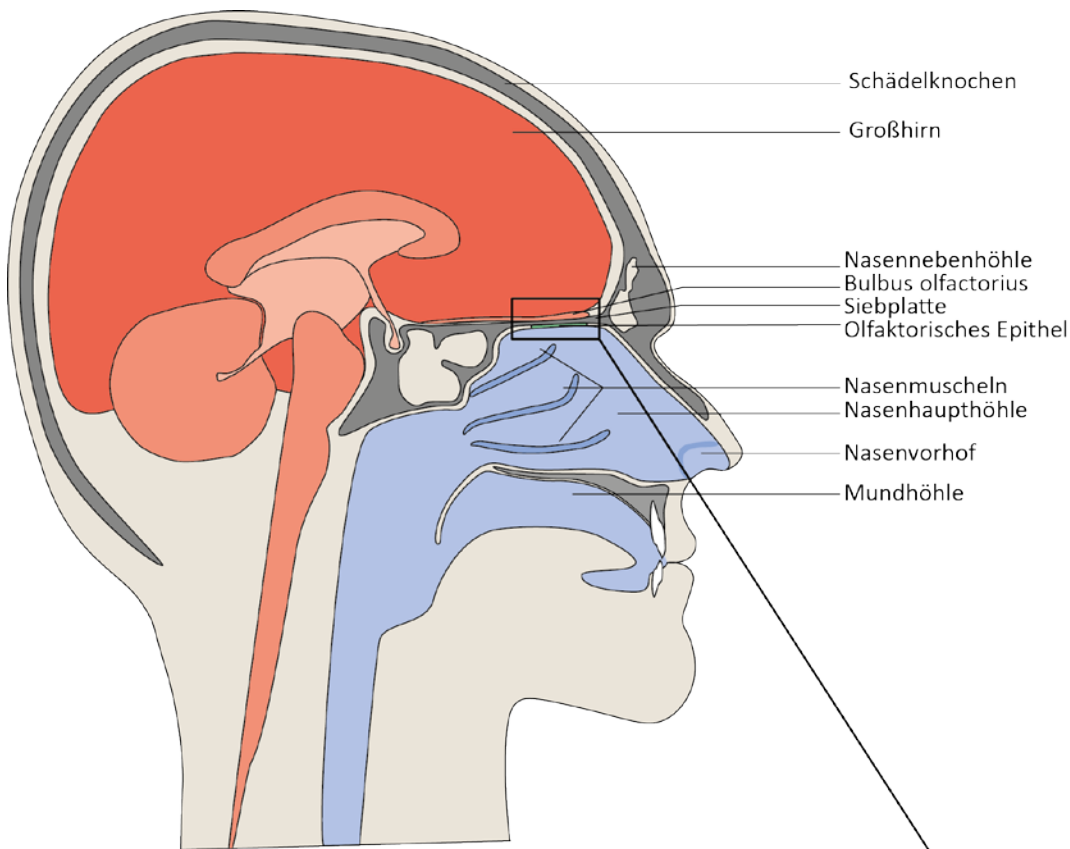


Abbildung 1.1: Aufbau olfaktorisches System.

Darstellung eines Sagittalschnittes des Kopfes. Die Hirnareale sind in rötlichen Farbtönen dargestellt, der Mund-, Nasen- und Rachenraum in blau, das olfaktorische Epithel in grün. Die knöchernen Anteile sind alle grau gefärbt. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt das olfaktorische Epithel mit den olfaktorischen Rezeptorneuronen, deren Axone durch die Siebplatte in den olfaktorischen Bulbus projizieren.

1.1.3. Entwicklung

Die Entwicklung des Menschen spielt in dieser Doktorarbeit eine große Rolle, da die Verwendung und die Differenzierung induziert pluripotenter Stammzellen (iPSZ) die Grundlage dieser Arbeit bildet. Um die Methodik zu verstehen und das Prinzip nachvollziehen zu können, soll zunächst im Überblick auf die Entwicklung des Menschen eingegangen werden, um anschließend die Entwicklung des Gehirns und insbesondere des olfaktorischen Systems in der Embryologie näher zu beleuchten.

1.1.3.1. Frühentwicklung

Die Entwicklung des Menschen beginnt mit der Verschmelzung zweier haploiden Gameten – Spermium und Eizelle – zur sogenannten Zygote, welche die genetische Information beider Elternteile trägt [9]. Die erste Teilung zum 2-Zell-Stadium setzt direkt mit der Fusionierung ein und kennzeichnet den Startpunkt einer Reihe weiterer mitotischer Teilungen. Die teilenden Zellen werden Blastomeren genannt und der kugelartige Zellverband wird als Morula bezeichnet [10]. Bis zu diesem Stadium sind die Zellen totipotent, das heißt sie können sowohl zu embryonalem als auch extraembryonalem Gewebe differenzieren. Ab dem 8-Zell-Stadium jedoch beginnen die Zellen sich voneinander zu differenzieren und die äußeren Zellen bilden eine epithelartige Struktur aus [11]. Wenn das 64-Zell-Stadium erreicht ist, entwickelt sich eine flüssigkeitsgefüllte sphärische Struktur, die sogenannte Blastozyste. Hier ist eine klare Abgrenzung zwischen den äußeren Trophoblastzellen und der inneren Zellmasse, dem Embryoblasten, sichtbar. Die Embryoblast-Zellen werden auch als embryonale Stammzellen bezeichnet, welche pluripotente Fähigkeiten besitzen. Das bedeutet, sie können zu allen zukünftigen Zelltypen des Embryos differenzieren, jedoch nicht zu extraembryonalem Gewebe, wie der Plazenta, was den Trophoblastzellen vorbehalten ist. Am Ende der ersten Woche findet die Implantation der Blastozyste in die Uteruswand statt [12]. Dafür verlässt die Blastozyste die schützende Zona pellucida und heftet sich mit den Trophoblastzellen an die Endometriumzellen des Uterus an, welche die Blastozyste innerhalb weniger Tage komplett umhüllen (Abbildung 1.2 A).

Schon während der Einnistung beginnt der Embryoblast eine zweiblättrige Keimscheibe zu bilden, indem sich die Zellen voneinander differenzieren. Es entstehen eine Zellschicht, die an die Trophoblastzellen angrenzt, der Epiblast und eine epithelartige Schicht, den Hypoblasten, welcher die Abgrenzung zur Blastozystenhöhle bildet [13, 14]. Durch Flüssigkeitseinlagerungen entsteht im Epiblasten ein weiterer Hohlraum, die Amnionhöhle, und die Epiblastzellen, die an den Trophoblasten grenzen, werden als Amnioblasten bezeichnet. Der Hypoblast stellt die Hülle der Blastozystenhöhle dar und wird später von den einwandernden Epiblastzellen, den zukünftigen Endodermzellen, verdrängt. Da der Hypoblast dann das Epithel des primären Dottersacks, welcher aus der Blastozystenhöhle hervorgeht, bildet, wird dieser auch als extraembryonales Mesoderm verstanden (Abbildung 1.2 B).

Ab Tag 14 beginnen die Zellen des Epiblasten eine Erhöhung zu bilden, die sich vom Rand zur Mitte hin verlängert und dort in einer knotenartigen Struktur, dem Primitivknoten, endet [15]. Die Epiblastzellen wandern entlang des Primitivstreifens in Richtung des Hypoblasten, dringen in die Zellschicht ein, ersetzen dessen Zellen und bilden als epitheliale Struktur das neu entstandene Endoderm, welches

später das Darmrohr darstellt. Weitere einwandernde Zellen ordnen sich als lockeres mesenchymales Bindegewebe zwischen Epiblast und Endoderm an und bilden das Mesoderm. Aus den verbleibenden Epiblastzellen entwickelt sich das dritte Keimblatt, das Ektoderm, welches die Außenhülle verkörpert, aus dem aber auch, zusätzlich zu dem Oberflächenektoderm, das Neuroektoderm, die Neuralleiste und die Plakoden entstehen. Dieser Vorgang wird Gastrulation genannt. Somit wird schon Ende der dritten Woche nach der Befruchtung der Grundbauplan des Embryos mit den drei Keimblättern festgelegt (Abbildung 1.2 C) [Anatomie, Das Lehrbuch], [Anatomie], [16].

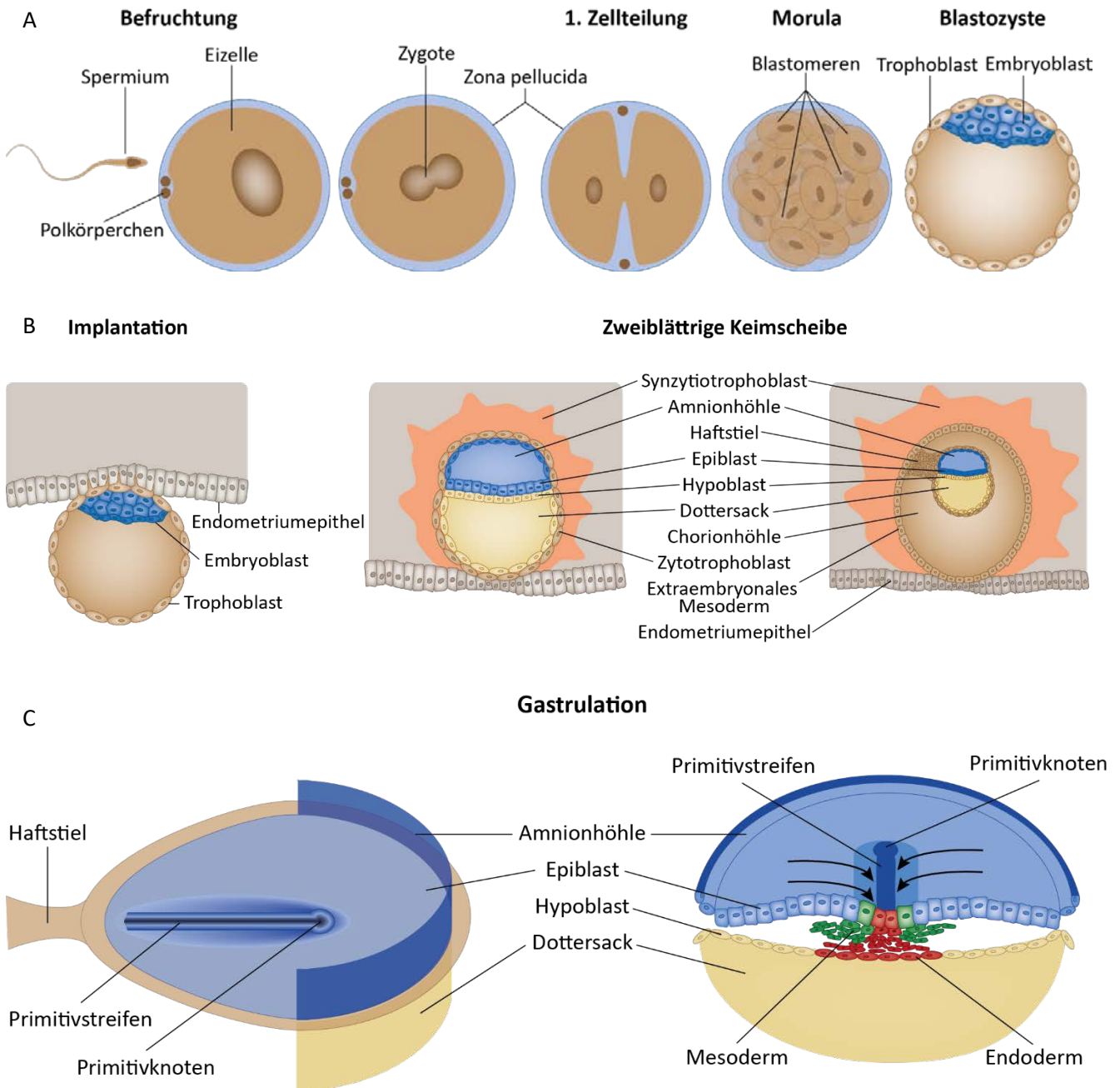


Abbildung 1.2: Frühentwicklung bis zur Gastrulation

A: Darstellung der Befruchtung mit anschließender Zellteilung bis zur Morula und Blastozyste. B: Darstellung der Implantation und Differenzierung zur zweiblättrigen Keimscheibe. C: Darstellung der Gastrulation.

1.1.3.2. Neurulation und Präplakodale Region

Um die Entwicklung des olfaktorischen Systems nachzuvollziehen, muss zunächst die Entstehung des Ektoderms mit seinen Bestandteilen beleuchtet werden. Dabei wird der Fokus auf die sogenannte Präplakodale Region (PPR) gelegt, da diese Region der Ursprung aller Plakoden (Adenohypophysen-Olfaktorische-, Linsen-, Trigeminal-, Ohr-Plakode) ist, [17],[18],[19],[20] einschließlich der Riechplakode aus der sich das OE entwickelt [21],[22].

Der Vorgang der Neurulation, Ende der dritten Embryonalwoche, gilt als initialer Startpunkt der Entwicklung des zentralen Nervensystems und bezeichnet die Bildung des Neuralrohrs. Insbesondere sind jedoch die Grenzstrukturen zwischen Neuroektoderm und Epidermis zu betrachten, da sich hier aus einer gemeinsamen Vorläuferzone die so genannte neurale Grenzzone, die Neuralleiste und die PPR entwickelt. Bevor die Neurulation beginnt, wandern die Epiblastzellen am Primitivknoten in Richtung anterior ein und bilden den Chordafortsatz aus, aus dem sich später die Chorda dorsalis herausbildet, welche schon während ihrer Entstehung ihrerseits den Start der Neurulation initiiert. Die erste Reaktion auf die Induktion ist die Bildung von Neuroektoblastzellen, die sich als mehrreihiges, prismatisches Epithel zur Neuralplatte formen [23]. Schon zu Beginn der Ausbildung der Neuralplatte befinden sich in der neuralen Grenzzone Vorläuferzellen, welche sich kurz vor Start der Neuralrohrbildung zu Neuralleiste und PPR differenzieren [24]. Diese beiden Zonen liegen auf der Grenze zwischen Neuroektoderm und Oberflächenektoderm. Die Neuralleiste liegt entlang der kompletten Körperachse des Embryos, die PPR hingegen zeigt sich Hufeisenförmig am anterioren Ende der Neuralplatte und auch die späteren Plakoden verteilen sich am kranialen Ende der Körperachse [25] (Abbildung 1.3). Das bedeutet, noch bevor die Neurulation mit der Entstehung des Neuralrohrs startet, sind bereits die vier Regionen (Oberflächenektoderm, PPR, Neuralleiste, Neuralplatte) innerhalb des Ektoderms definiert, aus denen sich später die unterschiedlichsten Strukturen ableiten. In Abbildung 1.4 sind die Bereiche mit ihren jeweiligen Bestimmungen dargestellt: Das Oberflächenektoderm wird hauptsächlich zu Epidermis und Haut. Die Neuralleistenzellen weisen eine mesenchym-ähnliche Wanderkapazität auf und können somit zu verschiedenen Regionen migrieren um sich dort unter anderem zu Gliazellen und Nervenzellen, insbesondere des peripheren und vegetativen peripheren Nervensystems, aber auch Hautpigmentzellen oder C-Zellen der Schilddrüse zu differenzieren. Die Neuralplatte als neurales Ektoderm formt sich zum Neuralrohr, welches sich zum zentralen Nervensystem entwickelt. Kranial entsteht das Gehirn während sich kaudal das Rückenmark in die Länge streckt. Aus der PPR entstehen verschiedene Plakoden, welche sich wiederum zu spezialisierten Systemen oder Zellen weiterentwickeln [26] (Abbildung 1.5). Durch spezifische Markerproteine können die jeweiligen Regionen voneinander abgegrenzt werden.

Induziert durch den Chordafortsatz erheben sich die Ränder der Neuralplatte zu Neuralfalten, während entlang der Längsachse direkt über der Chorda dorsalis eine Vertiefung entsteht, welche als Neuralrinne bezeichnet wird. Die Zellen lateral angrenzend zu den Neuralfalten sind die Neuralleistenzellen und lateral zu diesen Zellen schließt die PPR an. Die beiden Neuralwülste bewegen sich aufeinander zu bis sie sich treffen, miteinander verschmelzen und das Neuralrohr bilden. Der Verschluss der Neuralrohrs beginnt in der Mitte und setzt sich in kranialer und kaudaler Richtung fort. Die Neuralleistenzellen bilden die Neuralleiste zwischen dem Neuralrohr und dem Oberflächenepithel welches sich ebenfalls zusammenschließt. Die Zellen der PPR im verschmolzenen Oberflächenepithel differenzieren sich zu den verschiedenen Plakoden, unter anderem der Riechplakode, dem embryonalen Ursprung des Riechepithels [17, 19, 26] (Abbildung 1.5).

Zeitlich gesehen schließt die Neurulation am anterioren Neuroporus an Tag 24 und am posterioren Ende am 25. Tag ab [27], [Anatomie, Das Lehrbuch], [Anatomie], [Embryologie].

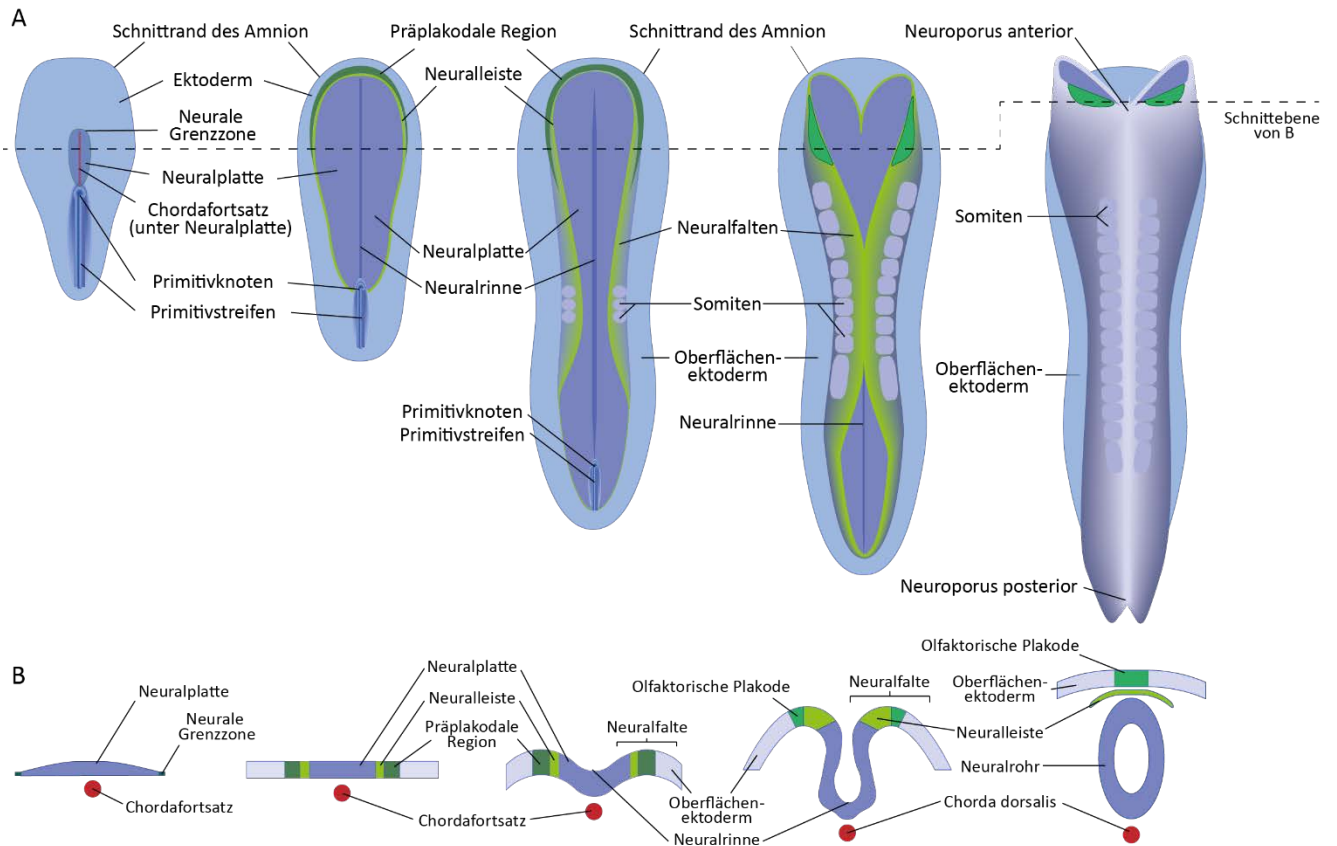


Abbildung 1.3: Neurulation

A: Aufsicht auf den Embryo während der Neurulation, mit Darstellung der verschiedenen Regionen (Neuralplatte, Neuralleiste, präplakodale Region). B: Darstellung der in A eingezeichneten Schnittebene mit denselben Stadien der Neurulation.

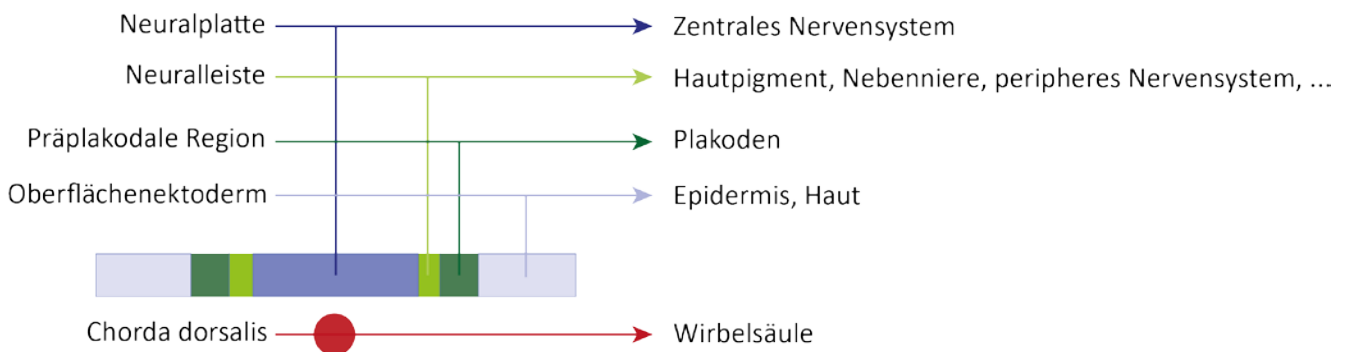
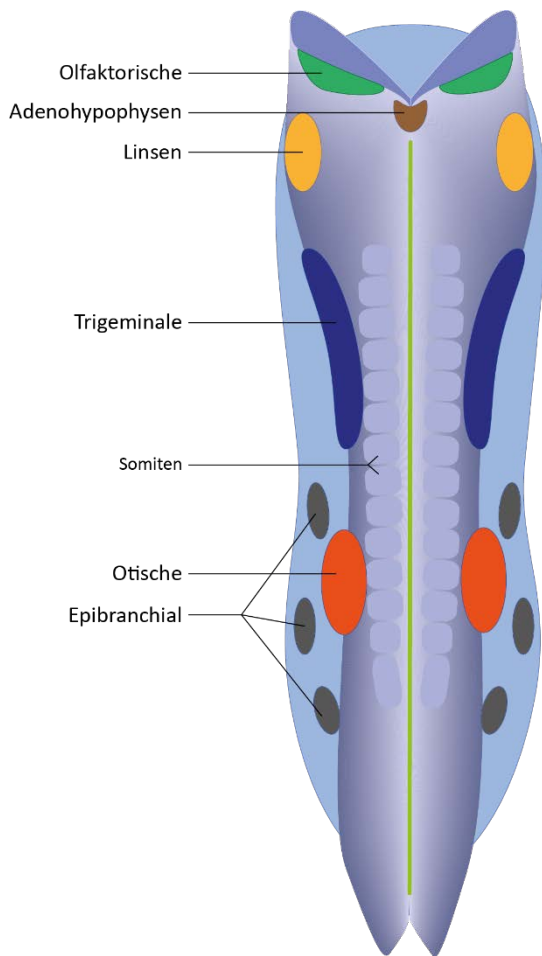


Abbildung 1.4: Schicksal der Zonen nach der Neurulation

In dieser Abbildung wird gezeigt in welche Zellen, Gewebe und Organe die Zellen der jeweiligen Zonen differenzieren.

**Abbildung 1.5: Plakoden**

Darstellung der Lokalisation der verschiedenen Plakoden. Am anterioren Ende des Neuralrohr liegt die olfaktorische Plakode (grün).

1.1.3.3. Entwicklung des olfaktorischen Epithels

Im vorangegangenen Abschnitt wurde auf die Neurulation und die Region der Vorläuferpopulation der Plakoden, die PPR, eingegangen. Der nächste Schritt in der Entwicklung zum olfaktorischen System ist die Entstehung der olfaktorischen Plakode [21, 22, 28, 29] (Abbildung 1.6). Die zukünftigen olfaktorischen Plakodenzellen befinden sich anterior des Neuralrohrs am Kopfende, differenzieren sich am Ende der Neurulation zur olfaktorischen Plakode und wandern nach der Schließung des anterioren Neuroporus im Oberflächenektoderm weiter zum kranialen Ende am Stirnfortsatz. An Tag 28 beginnen die Zellen der Riechplakode sich in das Oberflächenektoderm einzusenken. Parallel zum Einsinken der Plakodenzellen bildet das darunterliegende Mesenchym lateral der Riechplakoden Wülste aus, die später die Nasenlöcher darstellen. Durch das gleichzeitige Einsinken und Ausstülpfen entstehen die Riechgruben, die sich nach weiterem Wachstum zu primordialen Nasenhöhlen formen. Die beiden Nasenhöhlen werden vom sogenannten Nasenseptum getrennt. Das ektodermale Epithel der ehemaligen Riechplakoden spezialisiert sich zum Riechepithel mit den ORN. Zusätzlich zu den ORN und ihren Vorläuferzellen lassen sich Stützzellen, Basalzellen, Hüllzellen und Mikrovillizellen im OE finden. Die Axone der ersten ORN führen durch das Siebbein in Richtung Großhirn und induzieren das Ausstülpfen des Bulbus olfactorius aus dem Telencephalon, indem weitere Zellen plakodalen Ursprungs entlang der Axone zur embryonalen Hirnanlage wandern und sich dort an der Bildung des Bulbus

olfactorius beteiligen [30]. Die Axone besitzen einen Wachstumshügel an ihrem spitzen Ende, in dem Oberflächenrezeptoren lokalisiert sind, die auf äußere Signale reagieren können [31]. Diese anziehenden und abstoßenden Leitsignale werden vom umliegenden Mesenchym und wahrscheinlich auch vom Gehirn produziert und ausgeschüttet, um den Weg zur telencephalen Hirnanlage zu leiten. Auch OR sind im Wachstumshügel lokalisiert und spielen eine bedeutende Rolle bei der Axonverknüpfung mit dem Bulbus olfactorius [32, 33]. Nachdem sich der Bulbus olfactorius völlig ausgebildet hat, entstehen weitere ORN in der Riechschleimhaut und bilden mit ihren Axonen den Richnerv Nervus olfactorius [Anatomie, Das Lehrbuch], [Anatomie].

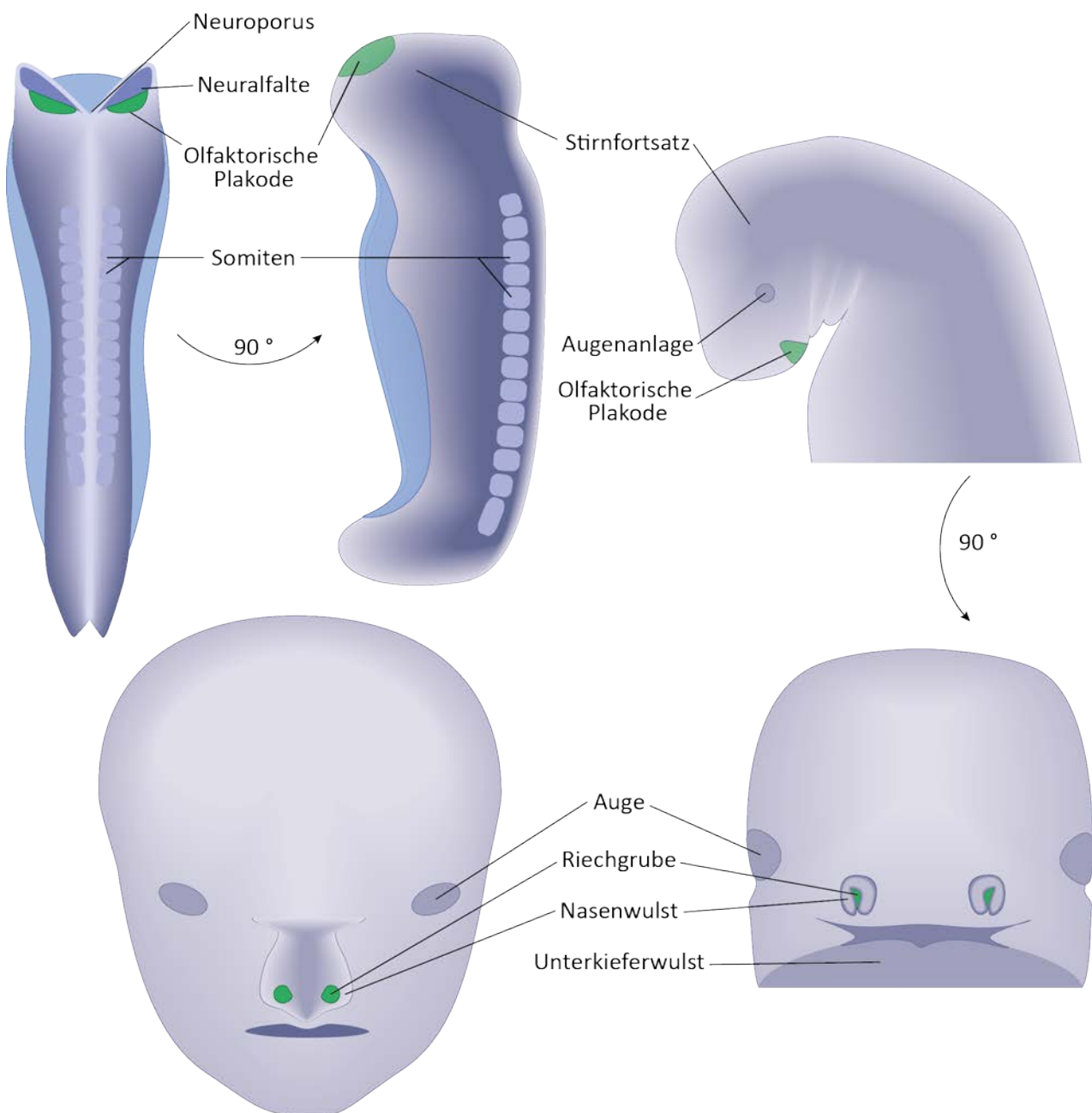


Abbildung 1.6: Entwicklung des olfaktorischen Epithels

Die olfaktorische Plakode hat sich während der Neurulation anterior entwickelt. Der Stirnfortsatz des Embryos bildet sich weiter aus und die Plakode wandert mit, bis sie in das Mesenchym zur Riechgrube einsinkt. Das Mesenchym bildet zusätzlich Wülste rund um die Riechgrube, welche später die Nasenflügel darstellen.

1.1.4. Olfaktorisches Epithel

Die Riechschleimhaut (OE und die darunterliegende Lamina propria) befindet sich beim Menschen an der Decke der jeweiligen Nasenhöhle und beträgt nur eine Größe von etwa fünf Quadratzentimetern. Diese kleine Fläche Epithel besitzt die Fähigkeit Tausende verschiedene Duftmoleküle zu binden und die Information zu empfangen, zu transduzieren und im Gehirn zu verarbeiten. Dadurch wird es dem Menschen ermöglicht eine Einschätzung seiner Umgebung zu geben, sei es das Riechen von gutem Essen oder das Vermitteln von Gefahr durch gefährliche Stoffe in der Luft [2].

Die ORN sind mit ihrer Funktion als Empfänger und Verarbeiter der Geruchswahrnehmung die wichtigsten Zellen im OE. Alle anderen Zelltypen dienen der Unterstützung der ORN und ihrer Funktion.

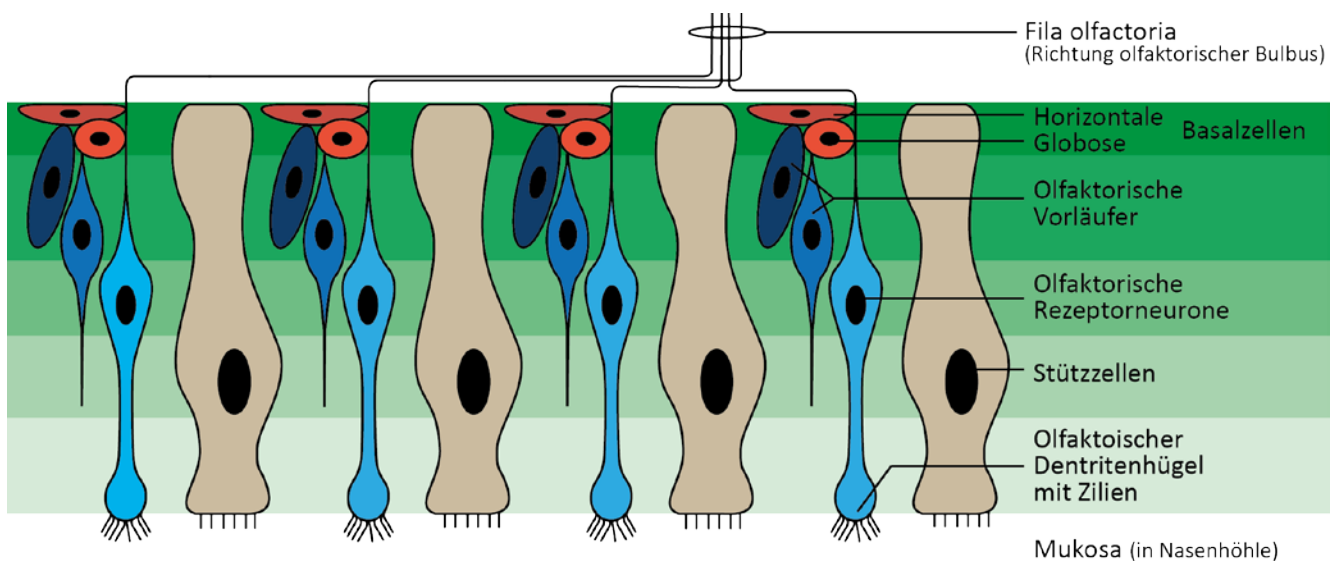


Abbildung 1.7: Aufbau des olfaktorischen Epithels

Das OE besitzt einen strukturierten Aufbau mit verschiedenen Zelltypen. Die wichtigsten sind hier schematisch mit ihrer Position innerhalb des Epithels dargestellt. Oben (Richtung Siebplatte und olfaktorischen Bulbus) liegen zwei Typen von Basalzellen (Rot). Aus den Basalzellen entwickeln sich zwei Vorläuferpopulationen (Dunkelblau), die wiederum zu ORN ausdifferenzieren können (Hellblau). Die ORN besitzen einen Dendriten, der bis zur Epitheloberfläche (unten) führt und dort zum sogenannten olfaktorischen Dendritenhügel verdickt. Dort sind auch die Zilien lokalisiert in denen sich die OR befinden. Die Stützzellen (Braun) dienen als Stützen des Epithels und besitzen einen Mikrovillisaum der ebenfalls in die Mukosa hineinragt.

1.1.4.1. Zelltypen

Olfaktorische Rezeptorneurone

Im OE befinden sich bis zu 30 Millionen ORN. Es handelt sich um bipolare Neurone, was bedeutet sie besitzen ein Axon und ein Dendrit, während der Zellkörper dazwischenliegt. Der Zellkörper siedelt sich im mittleren Teil des OE an und der Dendrit reicht zur Oberfläche des Epithels, an der er sich zum sogenannten Dendritenhügel verdickt (Abbildung 1.7)[34]. Dieser besitzt einen Ziliensaum, der in den Riechschleim hineinragt und somit direkt mit der Umwelt in Kontakt steht. Bis zu 17 unbewegliche Zilien können pro ORN auftreten [35, 36]. Dort sind auch die OR in der Oberflächenmembran verankert,

um die Geruchsstoffe aus dem Riechschleim zu binden. Das Axon wiederum projiziert, mit den anderen Axonen der ORN als olfaktorischer Nerv (Nervus olfactorius/erster Hirnnerv) in die andere Richtung durch das Siebbein in den Bulbus olfactorius in sogenannte Glomeruli (Abbildung 1.1) [37]. Von dort aus wird das Signal über verschiedene Interneurone weitergeleitet [38]. Somit stehen die ORN nicht nur in direktem Kontakt zur Umwelt, sondern auch zum Gehirn, was sie in dieser Beziehung einzigartig macht. Die ORN sind somit gleichzeitig primäre Sinneszellen und Neurone des zentralen Nervensystems. Als wichtigster Marker für reife ORN gilt das olfaktorische Marker Protein (OMP)[39].

Basalzellen

Eine weitere Besonderheit der ORN besteht in ihrer lebenslangen Regenerationsfähigkeit aus den Basalzellen [40-42]. Es wird zwischen zwei Arten von Basalzellen unterschieden. Die flachen horizontalen Basalzellen (HBZ), die direkt an der Basallamina im olfaktorischen Epithel lokalisiert sind [43, 44], und die rundlichen oder globosen Basalzellen (GBZ), die auf den HBZ aufliegen [45]. Unterschieden werden können die beiden Zelltypen durch Immunofluoreszenz-Färbung von Zytokeratinen. Die HBZ sind Zytokeratin positiv, während die GBZ eine negative Zytokeratin-Färbung zeigen. Das Potential für die Regeneration der ORN wird den GBZ zugeschrieben, da sie, im Gegensatz zu den HBZ, eine höhere Proliferationsrate besitzen und ASCL1 positive Vorläuferzellen hervorbringen, die sich wiederum in eine weitere Vorläuferpopulation entwickeln. Diese Vorläuferpopulation besitzt proliferierende Fähigkeiten und kann reife ORN produzieren. Die HBZ werden dagegen als Gewebestammzellen angesehen, die bei Schädigung des OE aktiviert werden und alle Zelltypen, inklusive der GBZ, regenerieren können [46, 47].

Stützzellen

Stützzellen sind säulenförmige Epithelzellen, die sich durch das komplette OE ziehen. An ihrem apikalen Ende befinden sich Mikrovilli, die in den Riechschleim hineinragen [48, 49]. Die Stützzellen sind eng mit den ORN verbunden, vor allem die Dendriten der ORN werden von den Stützzellen umhüllt. Die basalen Ausläufer der Stützzellen laufen zwischen den Zellkörpern der ORN zur Basalmembran hin, in der sie verankert sind [35]. Es werden verschiedene Funktionen mit den Stützzellen verbunden. Zum einen sind sie Produzenten von antibakteriellen und antiviralen Proteine, zeigen phagozytotische Fähigkeiten und dienen als strukturegebende Stützen des Epithels, stellen also einen Glia-ähnlichen Zelltyp dar. Zum anderen sollen sie auch an der Zusammensetzung des Riechschleims beteiligt sein und isolieren eventuell die olfaktorischen Dendriten [49].

Mikrovillizellen

Mikrovillizellen sind neuronartige Zellen mit einem unmyelinisierten Axon. Die Mikrovilli befinden sich apikal und ragen in den Reichschleim hinein. Es gibt zwei Typen von Mikrovillizellen, die einen mit steifen Mikrovilli, der zweite Typ mit lockeren Mikrovilli. Die Funktion dieser Zellen ist bisher jedoch nicht bekannt [50-52].

Hüllzellen

Hüllzellen ähneln sehr den Schwannzellen, da sie die Axone der ORN umhüllen und GFAP und S100, Marker für Gliazellen, exprimieren [53]. Die Axone werden von den Schwannzellen geschützt, vor allem wird aber das Axonwachstum von den Hüllzellen gefördert [54].

Olfaktorische Drüsen

Die Bowman-Drüsen oder olfaktorischen Drüsen sind nicht im Epithel angesiedelt, sondern in der Lamina propria, wobei die Ausführungszellen durch das OE an die Oberfläche führen [55, 56]. Die Drüsen produzieren den Hauptanteil des Riechschleims in dem die Odoranten gelöst werden. Zusätzlich zu den Odoranten-bindenden Stoffen werden Lysozym und andere Immunabwehr fördernde Substanzen in den Schleim sekretiert.

1.1.5. Signalrezeption und –transduktion

In diesem Kapitel werden die Vorgänge im OE, beginnend mit der Bindung des Odoranten an den Rezeptor, bis zur Generierung eines Aktionspotentials, behandelt. Zunächst wird auf die Bestandteile in der Mukosa eingegangen, die sich aus verschiedenen sezernierten Stoffen zusammensetzt. Die Bestandteile werden von olfaktorischen Zellen, aber auch von Drüsen des respiratorischen Epithels freigesetzt. Im nächsten Abschnitt werden die Moleküle beleuchtet, welche eine Bindung mit den OR eingehen können und somit eine Signalkaskade auslösen. Das Ende der Signalkaskade resultiert in einem Aktionspotential, welches den Reiz über das Axon in den olfaktorischen Bulbus weiterleitet.

1.1.5.1. Olfaktorische Mukosa

Das OE ist mit einer Mukosa bedeckt, die zum einen eine Schutz- und Abwehrfunktion besitzt, indem sie Giftstoffe und Pathogene abfängt, beziehungsweise abbaut, und zum anderen ist sie notwendig für die Lösung und die Rezeption der Duftstoffe. Die ORN besitzen wenig sekretorische Eigenschaften und besitzen somit auch sehr wenige Enzyme, die Fremdstoffe verstoffwechseln können. Neben den Stützzellen, die gewisse Substanzen in die Mukosa abgeben können [48, 49], sind vor allem die Bowman-Drüsen die Hauptproduzenten des Riechschleims [55, 56]. Der sezernierte Schleim besteht hauptsächlich aus Mukopolysacchariden mit verschiedenen funktionellen Gruppen. Weitere Bestandteile sind immunspezifische Stoffe wie Antikörper (IgA, IgM und IgG) und Lysozyme [57, 58], Enzyme [59], Antioxidantien [60], aber auch regulatorische Proteine [61, 62], von denen die Odoranten-Bindungs-Proteine (OBP) eine wichtige Rolle in der Rezeption der Duftstoffe spielen, indem sie die Odoranten zu den Rezeptoren führen und die Bindung fördern [63-65]. Das Protein MEGALIN sorgt dafür, dass diese Komplexe in die Stützzellen in Form von Lysosomen aufgenommen werden, wodurch der Weg für die nächsten Duftstoffe schneller freigemacht wird [66]. Nicht zuletzt wird über Aquaporine in den olfaktorischen Drüsen, aber auch in den Basalzellen und den Stützzellen, die Wasserzufuhr kontrolliert und damit auch die Konzentration der Proteine im Riechschleim [67]. Die Weiterleitung des Riechschleims kann nicht aktiv vom OE durchgeführt werden, da dieses keine

beweglichen Zilien besitzt, wodurch es abhängig von der ‚Clearance‘-Leistung des respiratorischen Epithels ist [68].

1.1.5.2. Olfaktorische Rezeptoren

Die OR sind membranständige, G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Im OE sind sie in den Zilien der ORN zu finden, wo sie in Kontakt mit der olfaktorischen Mukosa stehen und die Duftstoffe binden können [69]. Erstmals beschrieben und isoliert wurden die OR 1991 von Buck und Axel [3]. Die Rezeptoren werden in zwei Klassen (I und II) eingeteilt [6], wobei Klasse I hauptsächlich Wasserbewohnern vorbehalten ist, weswegen vermutet wird, dass es sich hierbei um Rezeptoren handelt, die wasserlösliche Geruchsstoffe binden können [70]. Bei den Säugetieren ist Klasse II die dominierende, doch auch hier sind 10-20 % Klasse I OR-Gene zu finden [71, 72]. Die OR Gene sind in den meisten Spezies die größte Genfamilie, so auch beim Menschen mit ca. 800 Genen, wovon jedoch etwa 400 Gene nicht funktionell als Pseudogene im Genom zu finden sind [4, 73, 74]. Zusammen entspricht das > 1 % des gesamten menschlichen proteinkodierenden Genoms. Andere Säugetiere haben ähnlich viele OR-Gene, wobei oft weniger Pseudogene und mehr funktionelle Gene vorhanden sind (Maus: ca. 1000 funktionelle Gene und 300 Pseudogene). Jedoch bedeutet das nicht zwangsläufig, dass Spezies mit mehr funktionellen Genen auch besser riechen, da die Fähigkeit Geruch wahrzunehmen auch von anderen Faktoren abhängt, wie zum Beispiel die Verschaltung in den Glomeruli im olfaktorischen Bulbus [75]. Es wurden auch Studien durchgeführt um die tatsächliche Anzahl an exprimierten Genen im olfaktorischen Epithel festzustellen. Beim Menschen wurden 437 exprimierte OR-Gene, Pseudogene miteingeschlossen, identifiziert [76].

Exprimiert werden die OR fast ausschließlich im OE, auch wenn in anderen Geweben, wie zum Beispiel in den Hoden, Expression nachgewiesen wurde [77]. Das OE kann in 4 Zonen eingeteilt werden, in denen nur bestimmte Rezeptoren exprimiert werden [78, 79]. Einige OR sind jedoch auch über das komplette OE verteilt. Außerdem werden je ORN immer nur ein OR exprimiert, während die anderen ausgeschaltet sind [7, 79, 80]. Interessanterweise führen die Axone der ORN die denselben OR exprimieren in den gleichen Glomerulus im olfaktorischen Bulbus [81, 82]. Es wird ein negativer Rückkopplungsmechanismus vermutet, der von dem funktionellen OR ausgeht, jedoch ist der Mechanismus bisher nicht vollständig geklärt [83].

1.1.5.3. Duftstoffe

Die meisten Duftstoffe die der Mensch erkennen kann, sind organische Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner als 300. Dazu zählen unter anderen auch Aldehyde und Aromaten. Beispielsweise ist Helional, ein Ligand von OR3A1, ein Aromat mit Aldehydgruppe und einem Molekulargewicht von 192,21. Jacquier *et al.* haben herausgefunden, dass weitere Liganden, die wie Helional zu den Aromaten gehören und zusätzlich eine Aldehyd- und eine Methylgruppe besitzen, ebenfalls an den OR binden können [84]. Zusätzlich besitzen diese Substanzen meist hydrophobe Elemente. Trotz der relativ geringen Anzahl an funktionellen OR (ca. 400) besitzt das humane

olfaktorische System das Potential Millionen verschiedener Duftstoffe zu unterscheiden [85]. Das liegt zum einen daran, dass ein Rezeptor verschiedene Duftstoffe erkennen kann, zum anderen kann ein Duftstoff an mehrere Rezeptoren binden [86]. Bis heute sind jedoch nur wenige dieser Kombinationen aus Rezeptor und Odorant bekannt. Das liegt hauptsächlich daran, dass die OR nicht in heterologen Zelllinien exprimiert werden können, da sie im endoplasmatischen Epithel verbleiben und nicht die Membran erreichen [87-90]. Jedoch konnten modifizierte OR (OR mit rho-Tag am N-Terminus) besser in heterologen Zelllinien exprimiert werden, wodurch einige wenige Odorant-Rezeptor-Interaktionen nachgewiesen werden konnten [86, 91-93].

1.1.5.4. Signalrezeption und –Weiterleitung

Die Signalrezeption ist der erste Kontakt der Duftstoffe mit dem Rezeptor in der Membran des ORN [94]. Voraussetzung dafür ist die räumliche Nähe von Duftstoff und Rezeptor, das heißt der Rezeptor muss in der Membran der Zilien der ORN lokalisiert sein und besitzt somit einen direkten Kontakt zur Mukosa [95, 96]. Zusätzlich müssen die Duftstoffe in der Mukosa gelöst, zum Rezeptor transportiert und präsentiert werden. Die meisten Duftstoffe binden mit einer schwachen hydrophobischen Bindung an den Rezeptor, der nach der Agonisten-Bindung seine Konformation ändert und am C-terminalen Ende das G-Protein (GOLF/G α olf) bindet [97]. Durch diese Aktivierung tauscht die Alpha-Einheit des G-Proteins Guanosin-Diphosphat mit Guanosin-Triphosphat. Dadurch löst sich G α olf von den Untereinheiten β und γ und bindet an die Adenylat-Cyclase III (ADCY3) [98]. Diese wird aktiviert und durch die Umwandlung von ATP in cAMP wird eine intrazelluläre Erhöhung der cAMP-Konzentration erzielt [94, 99]. cAMP dient als ‚second messenger‘ für heterotetramere Kalzium-Kanäle, die durch ihre Aktivierung einen Kalzium- und Natrium-Einstrom fördern. Die Ca²⁺-Ionen wiederum öffnen Kalziumabhängige Chloridkanäle, die Cl⁻-Ionen nach außen befördern, wodurch eine Depolarisation der Membran einsetzt, was die Entstehung des Aktionspotentials einleitet [100-103].

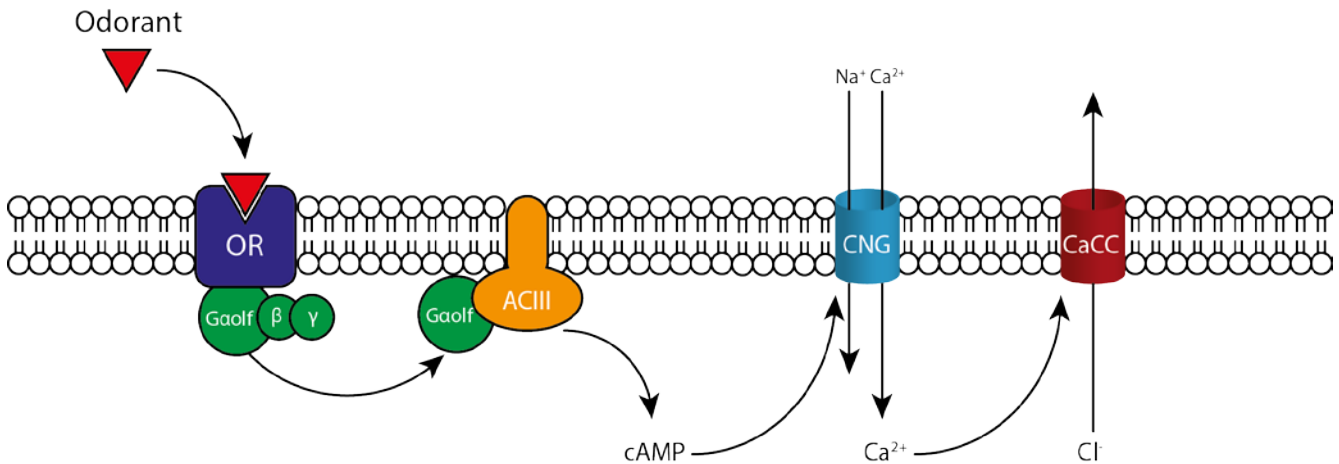


Abbildung 1.8: Olfaktorische Signalrezeption und -kaskade

Darstellung der olfaktorischen Signalkaskade nach der Bindung eines Duftstoffes an einen OR. Durch Konformationsänderungen des OR wird das G-Protein GOLF/Gaolf aktiviert und bindet und aktiviert wiederum die Adenylat-Cyclase III. Diese erhöht den intrazellulären cAMP-Spiegel, wodurch CNG-Kanäle geöffnet werden und Na⁺ und Ca²⁺ in die Zelle transportieren. Ca²⁺ öffnet Chlorid-Kanäle, wodurch das Membranpotential weiter erhöht wird.

1.2. Differenzierung

Die Entwicklung von ORN im Menschen wurde schon in Abschnitt 1.1.3. erläutert. Um diese Schritte in ein *in vitro* Modell zu übertragen, mussten einige Hürden genommen werden. In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie und aus welchem Ausgangsmaterial induziert pluripotente Stammzellen (iPSZ) hergestellt werden, welche Eigenschaften sie besitzen und wie man sie in Richtung ORN differenzieren kann.

1.2.1. Induziert pluripotente Stammzellen (iPSZ)

1.2.1.1. Allgemein

Im Laufe der Entwicklung differenzieren und proliferieren die Zellen ausgehend von der Zygote zu einem Organismus. Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die zu verschiedenen Zelltypen differenzieren können, aber auch in ihrem ‚Grundstadium‘ verbleiben und proliferieren können. Die Stammzellen werden anhand ihrer Potenz, das heißt in welche Zellen sie differenzieren können, unterschieden und benannt (Abbildung 1.9). Die Potenz der jeweiligen Stammzellpopulationen nimmt dabei während der Entwicklung zum Organismus mit jedem Stadium ab. Die potenteste und erste Stammzelle ist demnach die Zygote, welche demzufolge als totipotent bezeichnet wird – aus ihr können alle Zellen des menschlichen Körpers und zusätzlich extraembryonales Gewebe, wie zum Beispiel Teile der Plazenta entstehen [104]. Ebenso werden die Morula-Zellen als totipotente Stammzellen bezeichnet, da diese Zellen im Prinzip vervielfältigte Zygoten sind. Das nächste wichtige Stammzell-Stadium kennzeichnet die innere Zellmasse in der Blastozyste, die auch als embryonale Stammzellen

bezeichnet werden. Diese Zellen haben sich soweit differenziert, dass sie zu allen drei Keimblättern (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) differenzieren können, jedoch nicht zu extraembryonalem Gewebe. Diese Zellen werden als pluripotente Stammzellen bezeichnet [105, 106]. Als adulte Stammzellen werden diejenigen Zellen bezeichnet, die im entwickeltem Organismus spezifisch bestimmte Gewebe oder Organe regenerieren können. Diese Zellen werden daher auch als multipotente Stammzellen bezeichnet. Beispielsweise können neuronale Stammzellen alle Arten von Neuronen und Gliazellen bilden, jedoch keine nicht-neuronalen Zelltypen.

Als induziert pluripotente Stammzellen (iPSZ) werden diejenigen Zellen bezeichnet, die, ausgehend von einer somatischen Zellquelle, künstlich in ihren ursprünglichen pluripotenten Zustand ähnlich der einer embryonalen Stammzelle zurückversetzt werden [107, 108]. Die iPSZ sind nach der ‚Reprogrammierung‘ wieder auf dem Stand von embryonalen Stammzellen und können somit in alle drei Keimblätter differenzieren [109, 110].

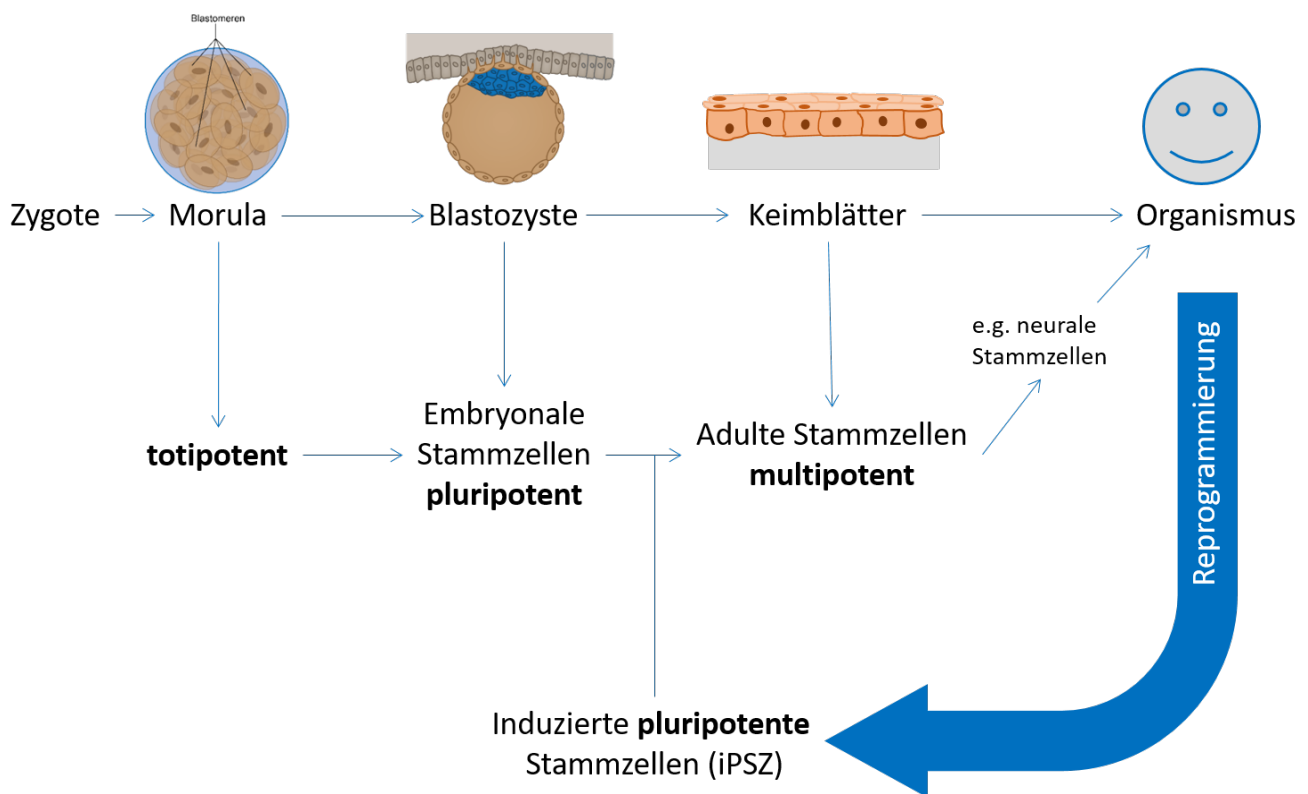


Abbildung 1.9: Stammzell Hierarchie

In dieser Abbildung sind die Stammzellen im Laufe der Entwicklung dargestellt. Die iPSZ ordnen sich bei den embryonalen Stammzellen ein. Beide sind pluripotent, das heißt sie können in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren.

1.2.1.2. Reprogrammierung

Die Herstellung von humanen iPSZ oder auch Reprogrammierung wurde erstmal 2007 publiziert [111]. Dabei wurden humane Fibroblasten durch eine ektopy Überexpression von *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *C-MYC* in ein pluripotentes Stadium, ähnlich dem der embryonalen Stammzellen, gezwungen. In späteren Publikationen wurde gezeigt das *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* ausreichend für die Reprogrammierung sind, meist

wurden aber noch andere Transkriptionsfaktoren wie *C-MYC*, *LIN28* oder *NANOG* verwendet um die Effizienz zu erhöhen [112-114]. Als somatische Zellquelle eignen sich alle teilenden Zellarten eines Organismus, jedoch sind alle Zelltypen unterschiedlich, insbesondere im Hinblick auf ihre Gewinnung, ihrer Handhabung und ihrer Reprogrammierungs-Effizienz [115]. Die ersten Protokolle wurden mit dermalen Fibroblasten durchgeführt, die bis heute als Standardquelle für Reprogrammierung gelten, da sie einfach zu handhaben sind und eine gute Effizienz aufweisen [111]. Als Ersatz für die Fibroblasten, die durch eine invasive Hautbiopsie gewonnen werden, können auch andere somatische Zellen, die einfacher zu isolieren sind, herangezogen werden [116-121]. Beispielsweise sind Keratinozyten aus gezupften Haaren bei ähnlicher Effizienz einfacher zu beschaffen – es müssen nur Haare mit Wurzeln gezupft werden [122]. Der Umgang und die Kultivierung der auswachsenden Keratinozyten ist im direkten Vergleich zu den Fibroblasten etwas schwieriger und bedarf ein wenig Erfahrung [115].

Es gibt verschiedene Methoden die Reprogrammierungsfaktoren in die somatischen Zellen einzubringen. Meist wird ein Lentivirus als Verpackung genutzt damit die Gensequenzen der Transkriptionsfaktoren in das Genom der Spenderzellen eingebaut werden können [112]. Aber auch andere Methoden wie Plasmid-Transfektion [123], ‚Small Molecules‘ [124] oder Adenoviren wurden etabliert [125-127]. Die Effizienz ist im Vergleich zum Lentivirus meist deutlich geringer, jedoch werden die anderen Methoden mehr und mehr gefragt, da bei einer Reimplantation ausdifferenzierter Zellen Methoden ohne Beeinflussung des menschlichen Genoms die erste Wahl sein werden.

In dieser Doktorarbeit wurden iPSZ mit einer multicistronischen Lentiviruskassette mit *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *C-MYC* aus Keratinozyten hergestellt [128] (Abbildung 1.10). Die Haare müssen mit einer Wurzel, die eine deutlich erkennbare, weiße äußere Wurzelscheide besitzt, vom Kopf oder einer anderen behaarten Stelle gezupft und in Matrigel ausplattiert werden, bis die Keratinozyten auswachsen [122]. Es wird ein spezielles Kalziumreduziertes Medium genutzt, da sich die Keratinozyten unter Kalziumhaltigen Medium nicht mehr teilen. Sind genügend Keratinozyten ausgewachsen (Dauer ca. 2-3 Wochen), werden sie mit dem Lentivirus infiziert, wodurch der Reprogrammierungs-Prozess eingeleitet wird. Die infizierten Zellen werden auf Ammenzellen überführt, da eine höhere Effizienz bei Wachstum auf Ratten-Embryo-Fibroblasten (REF) nachgewiesen wurde [129]. Nach ein bis zwei Wochen sind erste Stammzellkolonien zu erkennen, die in eine Matrigel basierte Zellkultur überführt werden, wenn sie einen Durchmesser von ca. 100 µm erreicht haben. Die iPSZ können dauerhaft in Kultur gehalten werden und werden regelmäßig passagiert. Ab der fünften Passage ist die generierte Linie stabil und kann charakterisiert werden. Dafür werden die iPSZ auf ihre Pluripotenz getestet, indem erstens eine Immunofluoreszenz-Färbung von spezifischen Pluripotenzmarkern und zweitens eine Keimblattdifferenzierung in alle drei Keimblätter durchgeführt. Bei der Keimblattdifferenzierung wird auf RNA- und auf Proteinebene nachgewiesen, ob Vertreter aller drei Keimblätter zu finden sind, wodurch bewiesen wird, dass die iPSZ das Potential haben alle drei Keimblätter auszubilden.

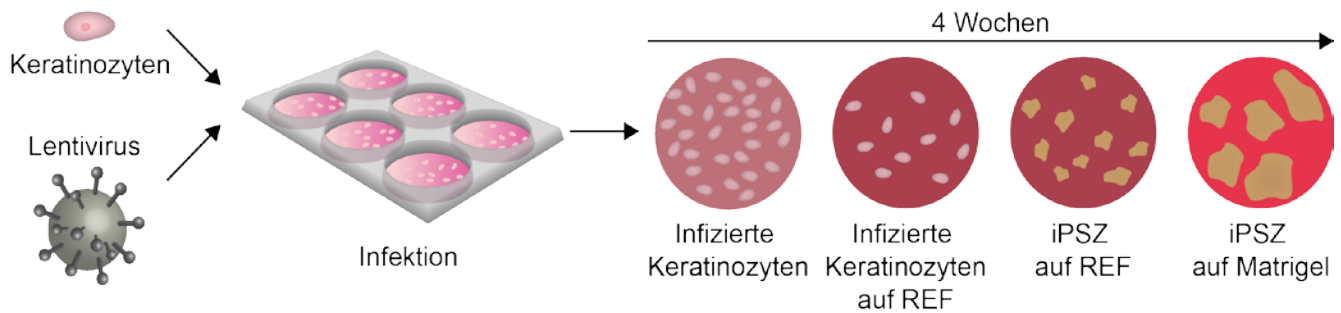


Abbildung 1.10: Reprogrammierung

Die Keratinozyten aus gezupftem Haar werden mit einem Lentivirus mit den vier Faktoren OCT4, SOX2, KLF4 und C-MYC infiziert und nach 2 Tagen auf irradierte REF gesetzt. Nach ca. zwei Wochen sind die ersten kleinen iPSZ-Kolonien zu sehen, die nach weiteren ein bis zwei Wochen auf Matrigel umgesetzt werden können.

1.2.2. Olfaktorische Differenzierung

Die iPSZ sind, wie ihr Name schon sagt, pluripotent und können in alle Zelltypen des Ursprungsorganismus differenzieren. Somit besitzen sie auch das Potenzial Neurone ektodermalen Ursprungs auszubilden. Die iPSZ müssen jedoch durch Zugabe bestimmter Faktoren in eine bestimmte Richtung gelenkt werden, damit man eine gute Populationsgröße des gewünschten Zelltyps erreicht. Es gibt viele publizierte Protokolle, die die Differenzierung verschiedener Neuronentypen beschreiben [130-132]. Die Gemeinsamkeit aller Protokolle ist die Imitation der Entwicklung des Nervensystems. Dabei sind meist die verschiedenen Schritte ähnlich. Als erstes wird der Embryo im Stadium der frühen Gastrula nachgeahmt, indem die iPSZ in Suspension genommen werden und sich spontan zu sogenannten ‚Embryoid Bodies (EB)‘ in Form von Kugeln anordnen. Diese werden auf Nährmedium ausplattiert und formen dort neuronalen Rosetten, die dem Neuralrohr entsprechen. Die Rosetten werden abgelöst und bilden sich zu Kugeln, welche hauptsächlich aus neuronalen Stammzellen (NSZ) und Vorläuferzellen bestehen. Wenn diese Kugeln Kontakt zu extrazellulärer Matrix wie z.B. Laminin bekommen, können die neuronalen Stammzellen zu Neuronen und Gliazellen differenzieren. Durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokinen wird die Ausbeute spezifischer neuronaler Subtypen erhöht.

Um ORN zu generieren, orientiert sich das Protokoll in dieser Doktorarbeit an diesen neuronalen Protokollen. Das heißt, es gibt ähnliche Stadien, jedoch werden andere Zusätze zugefügt. Zu beachten ist, dass bei dem olfaktorischen Protokoll die Entwicklung der PPR und der olfaktorischen Plakode gefördert wird, deren Zellen am Rand der Rosetten vorkommen. Diese Zellen werden durch entsprechende Zusätze induziert und in Richtung OE mit ORN gelenkt. Das gesamte Protokoll dauert mindestens 80 Tage und die Neurone können bis zu 180 Tage in der Kultur reifen bis sie relativ weit ausdifferenziert sind.

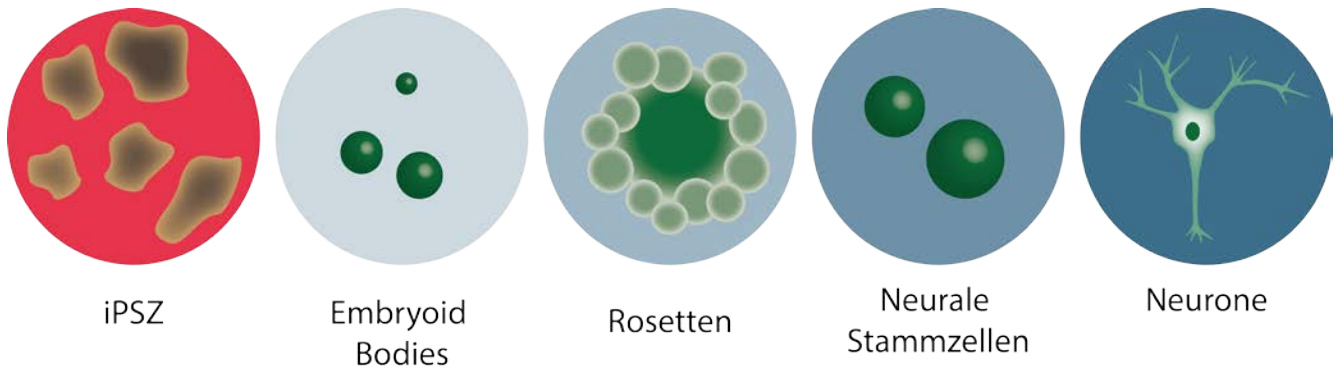


Abbildung 1.11: Neuronale Differenzierung

Bei einer neuronalen Differenzierung werden zunächst die iPSZ in Suspension genommen, wo sie sich zu Embryoid Bodies formen. Diese werden wieder ausplattiert und differenzieren zu neuronalen Rosetten, die dem Neuralrohr in der Entwicklung entsprechen. Die Zellen werden gelöst und in Suspension genommen. Dort lagern sie sich zu Kugeln zusammen, die neurale Stammzellen und Vorläuferzellen enthalten. Nach dem erneuten Ausplattieren differenzieren die Vorläufer zu reiferen Neuronen.

1.3. Ziel der Arbeit

Die Olfaktion wird als Wahrnehmung von Gerüchen, die sich in Form von einzelnen Duftstoffen aus der Luft zusammensetzen, charakterisiert. Im Vergleich zu den anderen Sinneseindrücken wird der Geruch oft vernachlässigt, da der Verlust des Geruchsinnes im Vergleich zur Erblindung als relativ geringe Beeinträchtigung betrachtet wird. Dennoch würden die Anosmie-Patienten widersprechen, denn der Geruchssinn spielt eine große Rolle in unserem Leben. Was weitgehend als Geschmack von Essen bezeichnet wird, ist eigentlich die Kombination der vier Geschmacksrezeptoren mit den Geruchsaromen, die von hunderten verschiedenen OR erfasst werden. Das ermöglicht dem Menschen die Unterscheidung von Millionen verschiedener Geruchseindrücken. Es ist erwiesen, dass Anosmie-Patienten durch die eingeschränkte Lebensqualität eher zu Depressionen neigen. Zudem kann der Geruchssinn auch vor Gefahren warnen, sei es vergammeltes Essen, oder aber der Geruch von Rauch eines Feuers. Die Anzahl der OR-Gene stellt fast 1 % des gesamten menschlichen Genoms dar und dennoch ist die Forschung der Olfaktion noch in ihren Kinderschuhen. Von den fast 800 OR und den mehr als 10000 verschiedenen Odoranten sind nur eine Handvoll Interaktionen bekannt. Die Entwicklung des OE wurde in verschiedenen Organismen rudimentär beschrieben, im Menschen wurde sie hingegen noch nicht vollständig nachvollzogen.

In dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, mit der die Forschung der humanen Olfaktion vorangetrieben werden kann. Sei es die Entwicklung des OE im Menschen oder die Rezeptor-Odorant-Kombinationen, mit diesem System können diese Fragestellungen behandelt werden.

Die Grundlage dieser Methode sind die iPSZ. Keratinozyten aus gezupften Haaren werden mit bestimmten Faktoren zu iPSZ reprogrammiert. Die iPSZ besitzen die Eigenschaften zum einen dauerhaft zu proliferieren und in ihrem Grundzustand zu verbleiben, zum anderen besitzen sie auch das Potential in alle Zellen der drei Keimblätter zu differenzieren, sollten sie die entsprechenden

Signale bekommen. Dadurch ist man in der Lage diese Zellen in eine bestimmte Richtung zu drücken, in diesem Fall in Richtung OE mit den ORN. Um die iPSZ in ORN differenzieren zu lassen, wurde im Zuge dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt, das sich einerseits auf andere schon bekannte neuronale Protokolle bezieht, zudem aber auch Erkenntnisse der olfaktorischen Entwicklung einbezieht. Dazu gehört die Förderung der PPR und der olfaktorischen Plakode durch Zugabe bestimmter Faktoren. Für den Nachweis der olfaktorischen Zellen in der Zellkultur, insbesondere der ORN, wurden am Ende der *in vitro* Differenzierung verschiedene Analysen durchgeführt: Expressionsanalysen mit qRT-PCR und Proteinanalysen mit Immunofluoreszenz-Färbungen, Western Blot und FACS-Analysen. Diese Versuche wurden mit verschiedenen Markern der verschiedenen Zelltypen des OE durchgeführt, wobei das Hauptaugenmerk auf den ORN lag. Im Anschluss wurden zusätzlich funktionelle Analysen in Form von Kalzium-Imaging durchgeführt, um nachzuweisen, dass die ORN auf die Zugabe von Odoranten reagieren.

2. Material

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zelllinien

In Tabelle 2.1 werden alle verwendeten Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 2.1: Liste aller verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Organismus	Verwendung
iPSZ K2	iPSZ aus reprogrammierten Keratinozyten von K2	Mensch	Ausgangszellen für die Differenzierung
iPSZ K8	iPSZ aus reprogrammierten Keratinozyten von K8	Mensch	Ausgangszellen für die Differenzierung
Keratinozyten K2	Haare von Kontrollperson 2	Mensch	Startlinie für die Reprogrammierung
Keratinozyten K8	Haare von Kontrollperson 8	Mensch	Startlinie für die Reprogrammierung
Lenti-X 293T	Nierenzellen HEK293 (Takara)	Mensch	Virusproduktion
MEF	CD1 Mausembryo-Fibroblasten E12,5 (StemCell™ Technologies)	Maus	Herstellung von konditioniertem Medium
REF	Rattenembryo-Fibroblasten E14,5	Ratte	Ammen-Zellen

2.1.2. Medien

In Tabelle 2.2 wird die Zusammensetzung aller verwendeten Medien aufgelistet.

Tabelle 2.2: Liste aller verwendeten Medien und ihre Zusammensetzung

Medium	Grundmedium	Zusätze
EB	DMEM/F-12, GlutaMAX™	1 % Antibiotikum- Antimykotikum 2 % B-27 Supplement 2 % Hormonmix 2 µM Dorsomorphin 10 µM SB431542
EB Formation	hESC Embryonic Stem Cell Media	Animal-Free Growth Factor Component 1 % Antibiotikum- Antimykotikum 10 nM Blebbistatin 10 nM Y-27632 2HCl
FTDA	DMEM/F-12, GlutaMAX™	1 % Chemisch definierte Lipide 1 % Humanes Serumalbumin 1 % Antibiotikum- Antimykotikum 0,1 % ITS Premix 5 ng/ml Activin A 10 ng/ml FGF2 0,5 ng/ml TGF-β1 0,05 nM Dorsomorphin
Haare	DMEM	Konditioniertes MEF Medium

		50 µg/ml Vitamin C 10 nM Y-27632 2HCl 10 ng/ml FGF2
Keratinocyten	EpiLife®	HKGS 10 nM Y-27632 2HCl
MEF/REF/Lenti-X	DMEM	10 % FBS 1 % Antibiotikum-Antimykotikum 1 % Nicht essentielle Aminosäuren 1 % GlutaMAX™
Neurone	DMEM/F-12, GlutaMAX™	1 % Antibiotikum- Antimykotikum 2 % B-27 Supplement 2 % Hormonmix 50 µg/ml Vitamin C 10 ng/ml BDNF 10 ng/ml GDNF 500 nM cAMP 5 ng/ml Aktivin A
NSZ	DMEM/F-12, GlutaMAX™	1 % Antibiotikum- Antimykotikum 2 % B-27 Supplement 2 % Hormonmix 100 ng/ml FGF8 5 ng/ml BMP4 1 µM Pumorphamin 0,1 µM Retinoic Acid
NSZ Formation	DMEM/F-12, GlutaMAX™	1 % Antibiotikum- Antimykotikum 2 % B-27 Supplement 2 % Hormonmix 10 nM Blebbistatin 10 nM Y-27632 2HCl 20 ng/ml FGF2 50 ng/ml EGF
Reprogrammierung	Knockout™ DMEM	20 % Serum Replacement 1 % GlutaMAX™ 1 % Nicht essentielle Aminosäuren 1 % Antibiotikum-Antimykotikum 50 mM β-Mercaptoethanol 50 µg/ml Vitamin C 10 nM Y-27632 2HCl 10 ng/ml FGF2
Rosetten	DMEM/F-12, GlutaMAX™	1 % Antibiotikum- Antimykotikum 2 % B-27 Supplement 2 % Hormonmix 2 µM Dorsomorphin 10 µM SB431542 20 ng/ml FGF2

2.1.3. Grundmedien

In Tabelle 2.3 werden die Grundmedien mit den zugehörigen Firmen und Bestellnummern aufgelistet.

Tabelle 2.3: Liste aller verwendeten Grundmedien

Grundmedium	Firma	Bestellnummer
Animal-Free Growth Factor Component	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	GF-hESC-500
DMEM (+ 4,5 g/l D-Glucose, + L-Glutamin, - Pyruvat)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	41965-039
DMEM/F-12, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	31331-028
EpiLife®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	M-EPI-500-CA
hESC Embryonic Stem Cell Media	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	BM-hESC
Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	S-001-5
Knockout™ DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10829-018

2.1.4. Zusätze

In Tabelle 2.4 werden alle Zusätze für die in der Zellkultur verwendeten Medien mit Firma und Bestellnummer aufgelistet.

Tabelle 2.4: Liste aller Zusätze der verwendeten Medien

Grundmedium	Firma	Bestellnummer
(±)-Blebbistatin	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland	BN0640
Activin A	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH6
Antibiotikum- Antimykotikum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	15240-062
B-27® Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	17504-044
BMP4	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	120-05ET
Brain-derived neurotrophic factor	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH1
Chemisch definiertes Lipidkonzentrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	11905-031
Dibutryl-cAMP	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland	BML-CN125
Dorsomorphin	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab120843
EGF	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH26
FGF2	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH146
FGF8	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	100-25
Fötale Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10500-064
GDNF	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom	GFH2
GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	35050-038
Humanes Serumalbumin	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel	05-720-1B
ITS Premix	Corning, Amsterdam, Niederlande	354350
KnockOut™ Serum Replacement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10828-028
MEM Non-Essential Amino Acids	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	11140-050
Purmorphamin	Phoenix GmbH, Karlsruhe, Deutschland	080-60A
Retinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	R2625
SB431542	Selleckchem, München, Deutschland	S1076
β-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	31350-010
TGF-β1	PeptoTech, Hamburg, Deutschland	100-21

Trichostatin A	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	CAY-89730
Vitamin C	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3525.1
Y-27632 2HCl	Selleckchem, München, Deutschland	S1049

2.2. Chemikalien, Enzyme und Zusätze

In Tabelle 2.5 werden alle verwendeten Chemikalien Enzyme und Zusätze aufgelistet.

Tabelle 2.5: Liste aller verwendeten Chemikalien, Enzyme und Zusätze

Grundmedium	Firma	Bestellnummer
1x Halt™ Protease + Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	78440
BCIP	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	B6777
CaCl₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	HN04.1
Cameleon™ Duo	LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA	928-60000
Cryostem	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel	05-710-1E
D(+)- Sucrose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4621.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4720.1
Dispase	Corning, Amsterdam, Niederlande	354235
Dnase 1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	18047-019
DPBS Calcium, Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	14040-091
DPBS ohne Calcium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	14190-094
Fluo4 AM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	F14201
Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	HN06.1
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3790,1
Hexadimethrinbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	107689
Holo-Transferrin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T0665
Insulin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	91077C
KCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	6781.3
Kollagen IV	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	C5533
Laminin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	11243217001
Lenti-X Concentrator	Takara Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	631232
Matrigel® hESC-Qualified Matrix	Corning, Amsterdam, Niederlande	354277
MgCl₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	8283.2
Mitomycin C	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	11435
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3957.1
NaH₂PO₄	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	2370.3
NaHCO₃	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	HN01.1
Natriumselenit	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	S5261
NBT	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	N5514
Normal Donkey Serum	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	D9663
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	0335
Polyethylenimin linear	Polysciences GmbH, Eppelheim, Deutschland	23966-2
Poly-L-Ornithin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P4957
Progesterone	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P8783

ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	P36935
Putrescin Dihydrochlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P7505
ReLeSR™	Stem Cell Technologies, Köln, Deutschland	05873
SDS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	71725
Sodium deoxycholate	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	30970
Synth-a-Freeze®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A12542-01
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	2449.2
Triton® X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3051.3
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	12604-021

2.3. Lösungen und Puffer

In Tabelle 2.6 sind alle Lösungen und Puffer die verwendet wurden aufgelistet.

Tabelle 2.6: Liste aller verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusätze	Konzentration	pH-Wert	Verwendung
	NaCl	150 mM		
	EDTA, pH8.0	5mM		
	Tris pH8.0	50mM		
	IGEPAL® CA-630	1%		
	Sodium Deoxycholate	0.5%		
	SDS	0.1%		
	Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	1x		
	Tris	0.25 M		
	Glycin	1.92 M		
	SDS	1% (w/v)		
	Tris-HCl; pH6.8	62mM		
	Glycerol	10%		
	SDS	2% (w/v)		
	β-mercaptoethanol	5%		
	Bromphenol Blau	0.00125%		
	Tris	250 mM		
	Glycine	1.92M		
	Tris	500 mM		
	NaCl	1.5M		
	Schweineserum	6%		
	NaCl	8 g/l		
	KCl	0,2 g/l		
	CaCl ₂	0,2 g/l		
	MgCl ₂	0,1 g/l		
	NaH ₂ PO ₄	0,05 g/l		
	NaHCO ₃	1 g/l		
	Glucose	1 g/l		

2.4. Odoranten

In Tabelle 2.7 sind alle gekauften Odoranten aufgelistet, die zu einem Odorantenmix mit 1 M aller 12 Odoranten zusammengefügt wurden.

Tabelle 2.7: Odorantenmix

Odorant	Aroma	Zustand	Lösungsmittel	Firma	Bestellnummer
(S)-(-)-Limonene	Limone	Flüssig	60 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W278904-SAMPLE-K
1-Heptanol	Fruchtig	Flüssig	60 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W278203-SAMPLE-K
1-Nonanol	Citrus, Rose	Flüssig	60 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W526509-SAMPLE-K
2-Heptanone	Banane, Zimt	Flüssig	70 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W224901-SAMPLE-K
Acetophenone	Mandel	Flüssig	50 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W224928-SAMPLE-K
Anisole	Anis	Flüssig	70 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W254800-SAMPLE-K
Coumarin	Scharf	fest	95 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W223018-SAMPLE-K
D-Camphor	Ätherisch, Minze	fest	95 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W504504-SAMPLE-K
D-Carvone	Kümmel	Flüssig	70 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W205532-SAMPLE-K
Isoamyl acetate	Banane, Birne	Flüssig	60 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W200905-SAMPLE-K
L-Carvone	Krautig, Pfefferminze	Flüssig	60 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W254401-SAMPLE-K
Nonanal	Limone, Grapefruit	Flüssig	60 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	W209708-SAMPLE-K

2.5. Vektoren

In Tabelle 2.8 werden die verwendeten Vektoren aufgelistet. Zwei davon wurden für die Virusproduktion benötigt, der dritte ist der Vektor mit den vier Reprogrammierungsfaktoren.

Tabelle 2.8: Liste aller verwendeten Vektoren

Vektor	Firma	Verwendung
psPAX2	Addgene, Cambridge, USA	Virusproduktion
pRRL.PPT.SF.hOKSMco.idTom.pre FRT	Warlich et al. 2011	Reprogrammierung
pMD2.6	Addgene, Cambridge, USA	Virusproduktion

2.6. Kits

In Tabelle 2.9 sind alle verwendeten Kits aufgeführt.

Tabelle 2.9: Liste aller verwendeten Kits

Kit	Firma	Bestellnummer
PreAmp Master Mix	Fluidigm, San Fransisco, USA	100-5581
Quantifast SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	204156
RNeasy Mini Isolationskit	Qiagen, Hilden, Deutschland	74106
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	23225

2.7. Primer

In Tabelle 2.10 sind sowohl die Primer für das Quantifast SYBR® Green RT-PCR Kit aufgelistet (Qiagen), als auch die Taq-Man Sonden für das Fluidigm (Life Technologies).

Tabelle 2.10: Liste aller verwendeten Primer

Primer	Firma	Bestellnummer
Hs_ADCY3_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00075348
Hs_ASCL1_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00237755
Hs_CALB2_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00018109
Hs_GNAL_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00023786
Hs_HMBS_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00014462
Hs_MYH6_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00030807
Hs_NANOG_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT01025850
Hs_OMP_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00237055
Hs_PAX6_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00071169
Hs_SOX2_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00237601
Hs_T_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00062314
Hs_TUBB3_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00089775
Hs_UCHL1_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00092666
ADCY3	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs01086502_m1
ASCL1	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs04187546_g1
CALB2	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs00418693_m1
GAPDH	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs02786624_g1
GNAL	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs00181836_m1
HMBS	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs00609296_g1
NCAM2	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs00189850_m1
OMP	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs01087269_s1
TUBB3	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs00801390_s1
UCHL1	Life Technologies, Paisley, United Kingdom	Hs00985157_m1

2.8. Antikörper

In Tabelle 2.11 werden alle verwendeten Primärantikörper aufgelistet, in Tabelle 2.12 alle Sekundärantikörper. Für die Pluripotenzfärbung wurde der StemLight™ Pluripotency Antibody Kit verwendet, die jeweiligen Antikörper werden in Tabelle 2.13 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Liste aller verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-ASCL1 (N17)	Ziege	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	Sc-13219
Anti-CALB2	Maus	1:100	Merck Milipore, Massachusetts, USA	MAB1568
Anti-DESMIN	Maus	1:500	Agilent, Santa Clara, USA	M0760
Anti-GOLF (K19)	Kaninchen	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	Sc-385
Anti-NCAM2	Maus	1:200	Merck Milipore, Massachusetts, USA	MAB5324
Anti-OMP	Ziege	1:200	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland	544-10001
Anti-PAX6	Kaninchen	1:100	BioLegend, Fell, Deutschland	901301
Anti-SOX17	Ziege	1:500	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF1924
Anti-TUBB3 (K18020)	Kaninchen	1:2000	BioLegend, Fell, Deutschland	802001

Tabelle 2.12: Liste aller verwendeten Sekundärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-Kaninchen-IgG (Alexa Fluor® 488)	H%L Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab150073
Anti-Kaninchen-IgG (Alexa Fluor® 568)	H%L Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	ab175470
Anti-Kaninchen-IgG (Alexa Fluor® 647)	H%L Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150075
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150105
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175472
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150107
Anti-Ziege-IgG H%L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150129
Anti-Ziege-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175474
Anti-Ziege-IgG H%L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab150131
Anti-Kaninchen-IgG (Alexa Fluor® 568)	H%L Ziege	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175471
Anti-Maus-IgG H%L (Alexa Fluor® 568)	Ziege	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175701

Anti-Maus-IgM H%L (Alexa Fluor® 568)	Ziege	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ab175702
--------------------------------------	-------	--------	----------------------------------	----------

Tabelle 2.13: Liste der Antikörper des Pluripotenzfärbekits

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti- OCT-4A (C30A3)	Kaninchen	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti- SOX2 (D6D9)	Kaninchen	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti- NANOG (D73G4)	Kaninchen	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti- SSEA4 (MC813)	Maus	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti- TRA-1-60	Maus	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti- TRA-1-81	Maus	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656

2.9. Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2.14 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 2.14: Liste aller verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Firma	Bestellnummer
0,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.704.700
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.706.700
12 Well Kulturplatten	Corning, Amsterdam, Niederlande	353043
12% Mini-PROTEAN® TGX™ Precas Gel	Bio-Rad, München, Deutschland	4561041
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	62.554.502
24 Well Kulturplatten	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland	662168
25 cm ² Kulturflaschen	Corning, Amsterdam, Niederlande	3815
250 ml Zellkulturflasche	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland	658175
50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland	227261
6 Well Kulturplatten	Corning, Amsterdam, Niederlande	353046
96 Well Kulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3926.500
96.96 Dynamic Array™ IFC	Fluidigm, San Fransisco, Californienm, USA	BMK-M-96.96
BD Plastipak 50 ml Spritzen	VWR, Darmstadt, Deutschland	300869
Clip Tip™ Pipettenspitzen 1- 10 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	94410210
Clip Tip™ Pipettenspitzen 10- 100 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	94410310
Clip Tip™ Pipettenspitzen 100- 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	94410710
Cryoröhrchen 1,2 ml	Corning, Amsterdam, Niederlande	430487
Nitril powderfree Handschuhe	ABENA, Zörbig, Deutschland	290417
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym, Hessich Oldendorf, Deutschland	720011
Pipettenspitzen 1000 µl	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland	740290
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	70.760.002
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1254.001
Serologische Pipette 25 ml	Corning, Amsterdam, Niederlande	357525
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1253.001
Whatman® gel blotting paper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	WHA10427804
Whatman® Protran® BA85 Nitrocellulose Membrane, 0,45 µm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	WHA10402506

2.10. Geräte

In Tabelle 2.15 sind alle verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 2.15: Liste aller verwendeten Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage BP2218-OCE	Satorius
Axio Imager M2 Forschungsmikroskop	Zeiss
Biomark™	Fluidigm
Eppendorf Multipette Stream	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 – 5 ml	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 20 – 200 µl	Eppendorf
Eppendorf Research Plus Pipette 500 – 5000 µl	Eppendorf
EVOS® FL Cell Imaging System	Thermo Fischer Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 1 – 10 µl	Thermo Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 10 – 100 µl	Thermo Scientific
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 100 – 1000 µl	Thermo Scientific
Flockeneisbereiter AF-103	Scotsman
Gefrierschrank GN 4113-20K	Liebherr
Heracell 240i CO ₂ Incubator	Thermo Scientific
Heraeus™ Fresco™ Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus™ Megafuge™ 16 Universalzentrifuge	Thermo Scientific
IKA® VXR basic Vibrax®	Aldrich
InoLab® Labor-pH-Meter	WTW
Kühl-Gefrierkombination CUN 3933-21B	Liebherr
Magnetrührer MR3001K	Heidolph
Mikrowelle MW13145W	Amica
Mini Proteau Tetracell	Bio-Rad
Minizentrifuge Sprout	Biozym
MSC-Advantage™ biologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2	Thermo Scientific
Nanophotometer™ P-Class	Implen
NeoVortex D-6012	NeoLab
Odyssey FC Imaging System	Li-Cor
PCR-Cycler 732-1210	Gene Technologies
Pipetus®	Hirschmann
PowerPac™ 200	Bio-Rad
Primovert inverses Mikroskop	Zeiss
Quantum ST4	Vilber Lourmat
Schüttelinkubator 3031	GFL
SH800Z Cell Sorter	Sony

StepOnePlus™ Real-time PCR System	Applied Biosystems
Thermomixer Pro	CellMedia
Ultraschallgerät Transsonic 460/H	Elma®
Ultra-Tiefkühlschrank Forma 900 Series	Thermo Scientific

2.11. Software

In Tabelle 2.16 ist die verwendete Software aufgelistet.

Tabelle 2.16: Liste der verwendeten Software

Software	Firma	Verwendung
Adobe Illustrator	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Republic of Ireland	Abbildungen
AxioVision SE64 Rel 4.9	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Mikroskopie
Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software v.3.0.2.	Fluidigm, San Fransisco, Californienm, USA	qRT-PCR
Image Studio Lite Version	LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA	Western Blot
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Schreiben, Rechnen
SH800 Software	Sony Biotechnology Inc., Weybridge, UK	FACS
StepOne Software V 2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	qRT-PCR
ZEN	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Mikroskopie

3. Methoden

3.1. Entnahme der humanen, olfaktorischen Biopsie

Es wurden humane Biopsien des olfaktorischen Epithels (OE) von anonymen Spendern entnommen. Durchgeführt wurde die Operation post mortem von Spezialisten der klinischen Anatomie in Tübingen.

3.2. Reprogrammierung zu induziert pluripotenten Stammzellen

Als Reprogrammierung wird der Vorgang bezeichnet, bei dem adulte Zellen durch die gezielte Überexpression spezieller Faktoren in ihren ursprünglichen pluripotenten Zustand zurückgeführt werden. Die Zellen werden als induziert pluripotente Stammzellen (iPSZ) konstatiert. Die somatische Zelllinie unserer Wahl sind die Keratinozyten, deren Gewinnung und Kulturbedingungen im nächsten Kapitel erläutert werden.

3.2.1. Keratinozyten Kultur

Unsere favorisierten Ursprungszellen sind die Keratinozyten, da sie durch kleine Vorteile gegenüber den Fibroblasten, insbesondere in Bezug auf ihrer vergleichsweise einfachen Beschaffung, bestechen. Trotz der simplen, von jedem durchzuführenden Prozedur des Haare Zupfens, bedarf das In-Kultur-Nehmen und Halten der Keratinozyten doch die Beachtung einiger wichtiger Aspekte.

Zunächst werden die Haare vom entsprechenden Probanden mit einem schnellen Ruck mit einer Pinzette samt der Wurzel aus der Kopfhaut gezogen. Für den Transport genügt ein mit DMEM gefülltes Falcon. Die Haare sollten eine Wurzel mit einer deutlich sichtbaren, weißlichen äußeren Wurzelscheide besitzen und kurz hinter dem Wurzelansatz abgeschnitten werden. Die Wurzeln werden in eine mit Matrigel-beschichteten T25 Zellkulturflaschen gebettet und mit 1 ml konditioniertem MEF-Medium versorgt. Mediumwechsel erfolgt täglich bis Keratinozyten aus den Wurzeln auswachsen. Ab jetzt wird alle zwei Tage 2 ml spezielles Kalziumreduziertes Keratinozyten-Medium mit ROCK-Inhibitor zugegeben. Nach ungefähr ein bis zwei Wochen können die Keratinozyten aus der fast vollen Flasche mit 1 ml Dispase fünf Minuten gelöst und entweder in Kryoröhrchen mit 800 µl Synthafreeze eingefroren, oder für die weitere Kultur in mit Collagen beschichteten 6-Well-Platten passagiert werden. Für die Kultur wird weiterhin alle zwei Tage Keratinozyten-Medium benutzt und die Platten werden in einem 5 % CO₂ und 5 % O₂ Inkubator bei 37 °C gelagert. Primäre Keratinozytenkulturen sollten nicht länger als vier Passagen gehalten werden, da sie mit jeder Passage immer mehr ausdifferenzieren, seneszierern und am Ende nicht mehr proliferieren. Für die weitere Reprogrammierung zu iPSZ werden ‚junge‘, sich teilende Keratinozyten benötigt.

3.2.2. Produktion des Reprogrammierungsvirus

Für die Verpackung eines Gens in einen lentiviralen Vektor werden 5*10⁶ HEK 293T Zellen auf eine Zellkultur Schale (Durchmesser 10 cm) ausplattiert und über Nacht in 10 ml Lenti-X-Medium bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag sollten die Zellen in der Schale etwa zu 60 % konfluent sein. Für die

Transfektion wird die DNA (8 µg OSKM-Vektor, 5,5 µg psPAX2-Vektor, 2 µg pMD2-Vektor) in 400 µl OptiMEM vorgelegt und 70 µl PEI zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird 1 ml DMEM hinzugefügt und gemischt. Das Medium in der Schale wird durch 6,5 ml DMEM ersetzt und die DNA-Mischung wird dazu getropft. Das Medium wird nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C entfernt und von 8 ml Lenti-X-Medium ersetzt. Nach zwei und vier Tagen wird das Medium erneut ersetzt und das alte Medium gesammelt. Das gesammelte Medium enthält den Lentivirus mit dem OSKM-Vektor und muss nun nur noch konzentriert werden. Dafür wird der Überstand bei 1500 rpm 2 min zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (0,45 µm Porendurchmesser). Zu drei Teilen Überstand kommt ein Teil Lenti-X Konzentrierer dazu und das Gemisch wird für mindestens 30 min bei 4 °C kaltgestellt. Im Anschluss folgt eine Zentrifugation bei 1500 g, 30 min ebenfalls bei 4 °C. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 1 ml Keratinozyten-Medium, ohne ROCK-Inhibitor, resuspendiert und als 100 µl Aliquotes bei -80 °C weggefroren.

3.2.3. Reprogrammierung von Keratinozyten

Es werden vier Pluripotenzgene (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *cMYC*) mit Hilfe eines lentiviralen Vektors in das Genom der Keratinozyten integriert, welche dann den Prozess der Reprogrammierung zu iPSZ in Gang setzen. Dafür wird zu einem 6-Well Keratinozyten mit 50 % Konfluenz 50 µl Virussuspension und 1 µg/ml Polybrene hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das gleiche wird am nächsten Tag wiederholt.

Zugleich werden die Rattenembryo Fibroblasten (REF), welche als Ammenzellen dienen sollen, vorbereitet. Damit die Fibroblasten sich nicht mehr teilen, aber dennoch lebensfähig, wird der Zellzyklus inaktiviert indem 2,5 h, 7,5 µg/ml Mitomycin C zu den ausplattierten REF zugegeben wird. Anschließend wird dreimal mit PBS +/- gewaschen. Die REF werden mit TrypLE Express gelöst, gezählt und je $1,5 \cdot 10^5$ Zellen auf vier 6-Wells verteilt.

Am dritten Tag nachdem zweimal infiziert wurde, werden die infizierten Keratinozyten mit TrypLE Express gelöst und auf die vier Wells mit Ammenzellen verteilt. Von nun an wird Reprogrammierungs-Medium verwendet, welches alle zwei Tage gewechselt wird. Nach etwa einer Woche sind die ersten kleinen Stammzellkolonien sichtbar und nach weiteren zwei bis drei Wochen sind die Kolonien groß genug um umgesetzt zu werden. Dafür wird ein 6-Well 1 h bei 37 °C mit 700 µl Matrigel beschichtet. Die Kolonien werden manuell mit einer 100 µl Pipette unter dem Mikroskop weggekratzt, aufgesaugt und in das beschichtete Well mit FTDA-Medium überführt.

3.2.4. iPSZ Kultur

Die Kulturbedingungen der iPSZ sind zum einen ein Inkubator mit 5 % O₂ und 5 % CO₂ bei 37 °C und zum anderen täglicher Mediumwechsel mit FTDA-Medium. Hauptsächlich werden die iPSZ in Matrigel-beschichteten (1 h bei 37 °C mit 700 µl) 6-Well Platten mit 1,5 ml FTDA-Medium kultiviert. Für die Passagierung der iPSZ wird ein Verhältnis von 1:6 angesetzt. Das bedeutet, wenn ein Well gesplittet werden soll, werden zunächst 6 neue Well mit Matrigel beschichtet und für eine Stunde bei 37 °C

inkubiert. Auf das Well der zu splittenden iPSZ wird 500 µl ReLeSR pipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird so viel ReLeSR abgenommen, dass nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm die Zellen bedeckt. Diese werden für weitere 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss wird ein ml FTDA-Medium zugegeben und die Zellen werden vorsichtig durch Klopfen gelöst und in ein Falcon mit 8 ml FTDA-Medium überführt. Die Zellen werden vorsichtig resuspendiert, ohne sie zu vereinzeln und auf die 6 neuen Wells verteilt.

Das gleiche Verfahren wird für das Einfrieren der iPSZ angewendet, nur wird hier am Ende nicht FTDA-Medium hinzugegeben, sondern 800 µl Cryostem. Nachdem die Zellen vorsichtig durch Klopfen gelöst wurden, werden diese in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für das Auftauen der Zellen wird ein Well 1 h bei 37 °C mit 700 µl Matrigel beschichtet. Die Zellen im Kryoröhrchen werden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und dann direkt in ein Falcon mit DMEM F12 überführt. Die iPSZ werden bei 1500 rpm 2 min zentrifugiert und das Zellpellet vorsichtig in 1,5 ml FTDA-Medium gelöst und in das beschichtete Well überführt.

Sollten die iPSZ spontan differenzieren werden sie unter dem Mikroskop mit 100 µl Spitzen vorsichtig weggekratzt.

3.2.5. iPSZ Charakterisierung

Immer wenn eine neue iPSZ-Linie hergestellt wurde, muss diese auf ihr pluripotentes Potential getestet werden. Das heißt die iPSZ müssen die Fähigkeit besitzen in alle drei Keimblätter zu differenzieren. Dafür werden verschiedene Analysen gemacht. Zunächst wird mit einer Immunofluoreszenz-Färbung in den iPSZ die Existenz von Pluripotenz-Markern (SOX2, NANOG, OCT4, SEAA4, TRA-1-60, TRA-1-81) nachgewiesen, Durchführung nach Protokoll des Pluripotenzfärbekits (Tabelle 2.12), dann wird eine Keimblattendifferenzierung durchgeführt, die den letztendlichen Nachweis bringt, dass die iPSZ in alle drei Keimblätter differenzieren können. Hier werden RNA-Expressionsdaten von Keimblattspezifischen Markern (*T* und *MYH6* für Mesoderm, *AFP* und *FOXA2* für Endoderm, *PAX6* und *TUBB3* für Ektoderm) ermittelt und mit den iPSZ verglichen und zusätzlich wird eine Immunofluoreszenz-Färbung mit Markern aller Keimblätter (*TUBB3* für Ektoderm, *DESMIN* für Mesoderm, *SOX17* für Endoderm) angefertigt. Für die Keimblattendifferenzierung wird eine 6-Well Platte iPSZ mit 500 µl ReLeSR gelöst (1 min Inkubation, dann abnehmen und weitere 5 min warten) und in 10 ml EB-Formationsmedium gelöst. Die Suspension wird gleichmäßig in einer 96-Well Platte verteilt (je 100 µl). Danach wird täglich eine Woche lang mit 100 µl Reprogrammierungsmedium gewechselt. Am letzten Tag werden jeweils zwei bis drei EBs auf ein beschichtetes (Matrigel, 1h bei 37 °C) 24-Well mit 500 µl Reprogrammierungsmedium überführt. Mediumwechsel ist alle zwei Tage.

Die Färbungen und die qRT-PCR werden standardmäßig durchgeführt (s. RNA-Analysen und Protein-Analysen).

3.3. Olfaktorische Differenzierung

3.3.1. Embryoid-Body (EB)-Formation

Für die EB-Formation werden drei volle 6-Well mit iPSZ benötigt. Die Zellen werden mit PBS -/- gewaschen und mit 500 µl/Well 37 °C warmem TrypLE behandelt. Nach 6-8 Minuten bei 37 °C, wenn alle Zellen gelöst sind, wird 1 ml Peprotech Medium zu jedem Well hinzugefügt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipetieren werden die Zellen gelöst, vereinzelt und anschließend in ein 15 ml Falcon überführt. Das Volumen wird auf 5 ml aufgefüllt und für 2 min bei 1500 rpm in die Zentrifuge gestellt. Der Überstand wird weggeworfen und es werden 10 ml EB-Formationsmedium zugegeben. Das Zellpellet wird resuspendiert und die Zellsuspension in eine 96-Well Platte verteilt (100 µl/Well). Die beladene Platte wird für 4 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Die komplette Differenzierung über werden die Zellen in einem Inkubator mit 37 °C, 5 % O₂ und 5 % CO₂ gehalten, somit wird die Platte nach der Zentrifugation in den Brutschrank mit diesen Bedingungen gestellt. An den nächsten drei Tagen wird täglich das Medium mit 100 µl EB-Medium gewechselt. Dafür wird mit der Absaugpumpe abgesaugt, bis nur noch der EB und etwa 20 µl Medium im Well übrigbleiben.

3.3.2. Neuronale Rosetten

An Tag 5 der Differenzierung werden die EBs ausplattiert, damit sie zu neuronalen Rosetten differenzieren können. Dafür werden zunächst zwei 48-Well Platten eine Stunde bei 37 °C mit Matrigel inkubiert. Das Medium in der 96-Well Platte wird abgesaugt und es werden je Well 200 µl Rosetten-Medium zugegeben. Ein EB wird mitsamt dem frischen Medium in ein beschichtetes 48-Well überführt. Das Medium wird die folgenden 8 Tage jeden zweiten Tag mit 200 µl frischen Rosetten-Medium ersetzt.

3.3.3. Neurale Stammzellen (NSZ)

Für die NSZ werden die Rosetten wieder in Suspension genommen. Zu jedem Well werden 200 µl Accutase hinzugefügt und 4 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird 300 µl DMEM F12 zugegeben und die Zellen werden mit einer Pipette abgespült und in ein Falcon überführt. Die Zellsuspension wird bei 1500 rpm 2 min zentrifugiert. Anschließend wird 20 ml NSZ-Formations-Medium hinzugefügt. Je 10 ml der Zellsuspension wird in eine low-attachment T75 Flasche überführt und in den Inkubator gestellt. Am folgenden Tag werden die Flaschen hochkant gestellt und nachdem die Zellen sich abgesetzt haben wird 7 ml Medium entnommen. Die gleiche Menge wird frisch wieder hinzugegeben (NSZ-Formations-Medium ohne Rock-Inhibitor und Blebbistatin). An Tag 16 wird auf NSZ-Medium umgestiegen welches auf gleiche Weise alle drei Tage gewechselt wird.

3.3.4. Neurone

Damit die Neurone aus den NSZ auswachsen können, werden 6-Well Platten mit Deckgläser ausgelegt, welche zwei Stunden mit Poly-D-Lysine und Laminin (1:200 in Poly-D-Lysine) bei 37 °C inkubiert

werden. Anschließend wird 1,5 ml Neuro-Medium in jedes Well vorgelegt und 4-8 NSZ zu jedem Well gegeben. Auch hier wird alle drei Tage Medium gewechselt, wobei 1 ml altes Medium vorsichtig abgenommen und 1 ml frisches Medium zugegeben wird. Bis zu 180 Tagen kann die Differenzierung andauern bis Versuche mit den Neuronen gestartet werden können, jedoch muss nicht für jeden Versuch eine solche Zeitspanne gewählt werden.

3.4. Charakterisierung olfaktorischer Rezeptorneurone

In diesem Schritt werden die ORN in der generierten Neuronen-Mischkultur charakterisiert. Außerdem werden weitere OE-spezifische Zelltypen gesucht und analysiert. Dabei gab es verschiedene Fragestellungen die beleuchtet werden. Zunächst wird über Protein- und RNA-Analysen festgestellt, ob ORN und assoziierte Zellen vorhanden sind und zusätzlich stellte sich die Frage wie viele ORN in dieser Kultur zu finden sind.

3.4.1. Proteinanalysen

3.4.1.1. Immunofluoreszenz-Färbung

Allgemeine Färbung

Einer der häufigsten und anschaulichsten Methoden Proteine nachzuweisen ist die Immunofluoreszenz-Färbung. Dafür erfolgt eine Fixierung der Zellen auf den Deckgläsern 15 min mit 4 % PFA (in 10 % D(+) Succrose). Anschließend wird zwei Mal 10 min mit PBS -/- gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgt durch Zugabe von 0,2 % Triton X, 5 Minuten lang. Zur Blockierung der unspezifischen Proteinbindungen werden die Zellen 90 min mit 5 % Donkey-Serum inkubiert. Der Primärantikörper des gewünschten Proteins wird ebenfalls in PBS -/- mit 5 % Donkey-Serum gelöst (Konzentration s. Tabelle 2.9) und die Zellen werden 2 Stunden bei RT inkubiert. Um die nicht gebundenen Antikörper abzuspülen, wird einmal 5 min mit PBS -/- und einmal 5 min mit PBS +/- gewaschen. Der Sekundärantikörper wird wie der Primärantikörper angesetzt (Konzentration s. Tabelle 2.10) und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird 5 min mit PBS -/- gewaschen und zum Schluss nochmal 10 Sekunden mit destilliertem H₂O. Für das Eindeckeln wird ein Tropfen Prolong Gold mit DAPI auf einen Objektträger getropft und das Deckglas mit den Zellen nach unten daraufgelegt. Nachdem Antrocknen (ca. 1-2 h bei RT) können die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet werden, oder bei 4 ° C bis zur Verwendung gelagert werden.

Färbung der humanen Biopsie

Die Färbung der humanen, olfaktorischen Biopsie wird genauso wie oben durchgeführt. Jedoch muss das Gewebstück vorher behandelt werden, damit es eingefroren werden kann.

Pluripotenz-Färbung

Die Pluripotenzfärbung wurde nach dem Protokoll des Pluripotenzfärbekits durchgeführt.

3.4.1.2. Western Blot

Als weiteren Nachweis von Proteinen wird auch ein Western Blot als Methode verwendet. Dafür werden die Zellen von drei 24-Well-Platten abgekratzt, in 5 ml PBS überführt und bei 4 °C und 400 g 2 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100 µl RIPA Puffer resuspendiert. Für eine gute Homogenisierung werden die Zellen zusätzlich in einem Ultraschallbad 2 min inkubiert (4 °C). Im Anschluss wird 5 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit dem Proteinlysate wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wird mit dem Pierce BCA-Protein Assay Kit nach dem Protokoll der Hersteller ermittelt.

Der nächste Schritt ist die Elektrophorese, bei der die Proteine in einem Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt werden. Dafür wird eine 20 µl Lösung aus 40 µg Protein mit 6x Ladepuffer und Wasser hergestellt. Die Probenlösung wird 2 min auf 95 °C erhitzt damit die Proteine denaturieren. Das Gel wird in die Gelkammer gespannt und die Kammer mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Proben werden in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wird ein Proteinmarker mit aufgetragen. Die Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) läuft 90 min bei 120 V.

Nachdem die Proteine aufgetrennt sind, werden sie vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran gebロットet. Dafür wird die Membran auf zwei Filterpapiere gelegt, darauf das Gel und ganz oben nochmal zwei Filterpapiere. Das ‚Blot-Sandwich‘ wird in das Blot-Gerät eingespannt, welches dann mit 1x Blot-Puffer befüllt wird. Gebლობet wird über Nacht mit 6 V und 200 mA bei 4 °C.

Nach dem Blotten wird die Membran entnommen und in einer Petrischale mit Blockierlösung eine Stunde blockiert. Im Anschluss wird die Membran über Nacht in eine frische Blockierlösung mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Petrischale steht dabei auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wird die Membran 3x5 min in 1x TBS mit 0,05 % Tween20 gewaschen. Danach wird die Membran 1,5 h in Blockierlösung mit Sekundärantikörper inkubiert. Im Anschluss wird nochmals 3x5 min in 1x TBS mit 0,05 % Tween20 gewaschen. Sichtbar gemacht werden die Banden in einem Zweifarben-Detektions-System von LI-COR (Odyssey® FC).

3.4.1.3. FACS-Analysen

Um einen Eindruck zu bekommen, wie viele positive Zellen der jeweiligen Antikörper in der olfaktorischen Differenzierung vorhanden sind, wird eine FACS-Analyse durchgeführt. Dafür werden zunächst die Zellen mit 0,05 % Trypsin gelöst und mit PBS + 2 % FCS in ein 15 ml Falcon überführt. Abzentrifugiert wird 5 min bei 1200 rpm. Der Überstand wird verworfen und die Zellen zum Fixieren in 4 % PFA mit 10 % Succrose resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden mit PBS + 0,1 % Triton 30 min auf Eis permeabilisiert. Nach der nächsten Zentrifugation wird zum Zellpellet 200 µl PBS + 0,1 % Triton mit Primärantikörper zugegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend einmal mit PBS

waschen und dann den Sekundärantikörper in PBS + 0,1 % Triton zugeben und erneut 1 h auf Eis inkubieren. Wieder mit PBS waschen und das Zellpellet in 200 µl PBS mit 0,05 % PFA aufnehmen und über Nacht bei 4 °C inkubieren. Am nächsten Tag wird mit PBS gewaschen und die Zellen werden durch ein Zellsieb (40 µm) gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation wird das Zellpellet in 200 µl PBS mit 2 % FCS resuspendiert. Die Zellen werden dann in einem FACS-Gerät analysiert.

3.4.2. RNA-Analysen

Für die RNA-Analysen wurde die quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) als Technik verwendet, um die Expression der Gene darstellen zu können. Es wurden zwei verschiedene Geräte verwendet, der StepOnePlus™ Real-time PCR System mit einer 96-Well Platte und der Biomark™ von Fluidigm. Grundsätzlich ist die Technik gleich, jedoch unterscheiden sich die Geräte in ihren Protokollen, da das Fluidigm-Gerät für große Ansätze ausgelegt ist (96 Proben können mit 96 Genen kombiniert werden). Daher wurden kleinere Versuche, wie der Vergleich der olfaktorischen Biopsie mit Stammzellen im StepOnePlus™ Real-time PCR System analysiert, die großen Ansätze, das heißt die RNA-Analysen der olfaktorischen Differenzierungen zu verschiedenen Zeitpunkten, wurden mit dem Biomark™ durchgeführt.

In den nächsten Abschnitten wird beschrieben wie die RNA isoliert wird, wie eine qRT-PCR grundsätzlich funktioniert und wie die Protokolle der beiden Geräte im Detail aussehen.

3.4.2.1. RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation werden die Zellen zunächst mit 500 µl TrypLE 8 min bei 37 °C gelöst und mit 10 ml DMEM in ein 15 ml Falcon überführt. Die Zellen werden gut resuspendiert und bei 1500 rpm 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird in 600 µl RLT-Puffer gelöst und entweder bei -80 °C weggefroren oder direkt weiterverarbeitet. Für die weitere Isolation der RNA wurde das RNeasy Mini Isolationskit verwendet. Dabei wurde nach Protokoll vorgegangen und die RNA in 2x30 µl RNase-freiem H₂O eluiert.

3.4.2.2. qRT-PCR

Die qRT-PCR basiert auf der Darstellung der relativen Menge an mRNA des zu untersuchenden Gens, durch ein Fluoreszenzsignal das an der RNA gekoppelt ist (Unterschiede je nach Technik) und während der PCR gemessen wird. Die PCR ist eine Vervielfältigung einer durch die Primer bestimmten Sequenz (DNA oder RNA). Das heißt es müssen als erstes Primer designt oder gekauft werden, die das gewünschte Gen von beiden Richtungen (5' und 3') flankieren. Um alle doppelsträngigen Gebilde zu trennen und Einzelstränge zu bekommen, wird bei der Denaturierung die Probe auf 95 °C erhitzt. Bei der sogenannten Annealing-Temperatur (je nach Primer ca. bei 68 °C) binden die Primer an ihre komplementären Sequenzen der DNA/RNA. Die Temperatur wird auf 72 °C erhöht damit die DNA-Polymerase optimal arbeiten kann und entlang den Primern den zweiten Strang mit freien Nukleotiden (dNTPs) ergänzt. Dann beginnt das Ganze von vorne mit der Denaturierung. Werden diese Zyklen oft

genug wiederholt bekommt man eine Anreicherung des Sequenzabschnittes, welcher von den Primer flankiert wird. Diese Technik wird in der qRT-PCR zu Nutze gemacht, da hier in jedem Schritt die Fluoreszenz eines DNA interkalierenden Farbstoffes oder einer Taq-Man-Sonde gemessen wird. Somit kann die relative Menge, die nach jedem Zyklus ansteigt, anhand der Fluoreszenz-Intensität errechnet werden. Es wird dabei immer auf ein Referenz-Gen zurückgegriffen, da nur so im Verhältnis zu diesem Gen die Proben untereinander verglichen werden können. Für eine qRT-PCR wird also RNA der zu analysierenden Proben, Primer der zu analysierenden Gene und des Referenzgens, eine reverse Transkriptase, die die RNA in cDNA umschreibt, eine DNA-Polymerase, ein Puffergemisch mit dNTPs und zu guter Letzt einen Farbstoff, bzw. eine Taq-Man-Sonde benötigt.

Der Unterschied zwischen einem DNA-interkalierenden Farbstoff und eine Taq-Man-Sonde ist hauptsächlich, dass der Farbstoff die gesamte DNA anfärbt, was nicht weiter schlimm ist, da sich nur die bestimmte Sequenz vervielfältigt. Eine Taq-Man-Sonde hingegen ist eine kurze spezifische Sequenz innerhalb des Gen, die ebenfalls wie die Primer bindet, zusätzlich jedoch noch einen Quencher auf der einen und ein Fluophor auf der anderen Seite besitzt. Der Quencher unterdrückt die Fluoreszenz des Farbstoffes so lange, bis die Sequenz von der DNA-Polymerase (hier eine Taq-Polymerase mit Exonuklease-Funktion) abgebaut wird und der Quencher räumlich von dem Fluophor entfernt wird. Diese Methode ist etwas spezifischer, da die Fluoreszenz nur gemessen werden kann, wenn eine Sonde abgebaut wird, während der DNA-interkalierende Farbstoff die Gesamtmenge an DNA misst.

Das StepOnePlus™ Real-time PCR System verwendet einen DNA-interkalierenden Farbstoff und der Biomark™ Taq-Man-Sonden.

3.4.2.3. StepOnePlus™ Real-time PCR System

Für das StepOnePlus™ Real-time PCR System wird nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Der Mastermix ist in Tabelle 3.1 angegeben und die PCR-Lauf-Zeiten in Tabelle 3.2.

Tabelle 3.1: Mastermix für eine qRT-PCR

Zusätze	Menge [μ l]
H ₂ O	6,8
Primer	2
2xPCRMix	10
Polymerase	0,2

Tabelle 3.2: PCR-Lauf-Zeiten

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Anzahl
	50	600	1
	95	300	1
	95	10	
	60	30	
Schmelzkurven	60-95	-	Alle 0,3 °C messen

3.4.2.4. Biomark™

Für die RNA-Expressions-Analysen großer Datenmengen wird der Biomark™ von Fluidigm® benutzt. Hier wird eine qRT-PCR automatisch durchgeführt und es können bis zu 96 Proben mit 96 Primer verglichen werden. Benutzt werden hier Taq-Man-Sonden. Hier muss jedoch die cDNA Synthese vorher durchgeführt werden. Dafür wird zunächst die DNA in den RNA-Proben durch die DNase 1 verdaut und nach 15 min wird das Enzym direkt mit der Stop-Lösung inaktiviert. Für die cDNA Synthese wird 80 ng RNA, 1 µl 5x RT Puffer, 0,25 µl dNTPs, 0,313 µl Hexanukleotide, 0,25 µl MMLV RT und 0,438 µl H₂O gemischt und für 1 h bei 37 °C und 10 min bei 85 °C inkubiert.

Die Reaktionsplatte wird dann nach dem Protokoll des Herstellers beladen und in den Biomark™ platziert.

3.4.3. Funktionelle Analysen

3.4.3.1. Ca²⁺-Imaging

Für den funktionellen Nachweis der ORN wird ein Ca²⁺-Imaging durchgeführt. Dafür werden die NSZ der Differenzierung auf IBIDIS ausplattiert. Am Tag der Analyse wird zu den Zellen 3 µM Fluo-4 AM für 30 min bei 37 °C zugegeben. Fluo-4 AM besitzt bei Kalzium-Bindung eine Emission von 516 nm. Im Anschluss werden die Zellen mit der Tyrode-Lösung gespült und nochmal 30 min mit 1 ml Tyrode-Lösung bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Zellen möglichst schnell und warm zum Mikroskop gebracht und 3 min werden alle 0,3 sec Bilder gemacht, um die Spontanaktivität zu ermitteln. Direkt darauf wird 1 ml Odorantenmix gleichmäßig zu den Zellen gegeben und es werden weitere 3 min Aufnahmen gemacht. Die Odoranten sind alle in EtOH gelöst und wurden in Tyrode-Lösung so verdünnt, dass eine Endkonzentration von 20 µM zu den Zellen gegeben wird. Als Kontrolle wird zusätzlich 20 µM EtOH zu den Zellen hinzugefügt und ebenfalls Aufnahmen gemacht.

4. Ergebnisse

Die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) sind spezielle Neurone die im olfaktorischen Epithel (OE) vorkommen. Die bipolaren Neurone liegen mittig im OE und besitzen ein Axon, welches mit den anderen Axonen zusammen als erster Hirnnerv (Nervus olfactorius) durch die Siebplatte direkt in den olfaktorischen Bulbus projiziert und einen Dendriten der zur Epitheloberfläche führt. Dort verdickt er sich zu dem sogenannten Dendritenhügel, an dem die Zilien mit den olfaktorischen Rezeptoren (OR) in die Mukosa der Nasenhöhle hineinragen, um Duftstoffe zu binden. Die ORN sind einzigartig in vielerlei Hinsicht. Zum einen fungieren sie als Rezeptorzelle, welche in direktem Kontakt zur Umwelt stehen und so die Duftstoffe erkennen und die Information verarbeiten können. Zum anderen sind die ORN gleichzeitig ZNS-zugehörige Neurone, welche die empfangene Information als Aktionspotential direkt in den olfaktorischen Bulbus weiterleiten. Außerdem können die Neurone lebenslang über Basalzellen regeneriert werden, was sie mit wenigen Ausnahmen, ebenfalls einzigartig im ZNS macht. Zusätzlich zu den Basalzellen und ORN gibt es olfaktorische Vorläuferzellen und Stützzellen, die das Epithel vervollständigen.

Obwohl das OE über einige besondere Eigenschaften verfügt und die OR die größte Genfamilie im Menschen darstellen (>1 % des proteinkodierenden Genoms), sind die ORN und ihre assoziierten Zellen nur oberflächlich erforscht worden. Das gilt nicht nur für die Rezeptor-Odoranten Beziehung und die Neurogenese im humanen olfaktorischen System, sondern auch für dessen embryonale Entwicklung. Das lässt sich darauf zurückführen, dass die Entnahme von humanem OE erschwert ist, da sie nur mit fachärztlicher Expertise erfolgen kann und dieser Eingriff unter örtlicher Betäubung stattfindet. Zusätzlich ist aber auch der gesellschaftliche Druck in Vergleich zu krankheitsbedingten Defiziten anderer Sinnesorgane, wie z.B. dem Auge, deutlich geringer.

Mit dem Modell der Differenzierung von ORN aus induziert pluripotenten Stammzellen (iPSZ) kann die schwierige Zugänglichkeit zum OE umgangen und die ORN *in vitro* untersucht werden. Das entwickelte Differenzierungsprotokoll zur Herstellung von ORN dient somit als Grundlage für die weiterführende Forschung am olfaktorischen System.

In den Ergebnissen wird im ersten Schritt das OE aus humanen Biopsien analysiert. Dies ermöglicht anschließend einen direkten Vergleich zwischen den olfaktorischen *in vivo* Neuronen und den ORN aus dem olfaktorischen Differenzierungsprotokoll. Das heißt, es wird zunächst das Ziel untersucht, zudem uns das Protokoll am Ende führen soll. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Herstellung und Charakterisierung der iPSZ, bis hin zur Charakterisierung der ORN am Ende des Protokolls, dargestellt.

Ergebnis Teil 1: Wie soll das Endprodukt/Ziel der *in vitro* Differenzierung aussehen?

- Analyse des humanen olfaktorischen Epithels mit Fokus auf die ORN

Ergebnis Teil 2: Wie kommt man zu den *in vitro* generierten ORN?

- iPSZ Gewinnung aus Haaren
- iPSZ Kultivierung und Charakterisierung

- IPSZ *in vitro* Differenzierung zu ORN

Ergebnis Teil 3: Erfüllen die *in vitro* generierten ORN die charakteristischen Eigenschaften der ORN des humanen Epithels?

- Charakterisierung der *in vitro* ORN

4.1. Olfaktorisches Epithel aus humaner Biopsie

Als erstes werden hier Ergebnisse gezeigt, die an olfaktorischem Material aus humanen Biopsien erstellt wurden. Diese Ergebnisse dienen als Anschauung und positiv-Kontrolle humaner OE, die zum Vergleich der *in vitro* Kultur herangezogen werden. Dabei wurden RNA-Analysen (qRT-PCR), aber hauptsächlich Protein-Analysen in Form von immunhistochemischen Färbungen durchgeführt. Unterteilt werden die Analysen in Marker reifer ORN, der Signalkaskade, der Vorläufer- und Basalzellen und den Stützzellen.

4.1.1. RNA-Expression

Bei der qRT-PCR wurde die Expression des olfaktorischen Marker-Proteins (*OMP*) dargestellt, da es ein wichtiger, in vielen Publikationen verwendeter Marker adulter ORN ist und dient hier als Hauptmarker für den Nachweis von reifen ORN. In Abbildung 4.1 ist die relative Expression von *OMP* in iPSZ im Vergleich zum OE dargestellt. Wie erwartet ist eine deutliche Expressionssteigerung (mehr als 25-fach) bei der Probe aus der humanen Biopsie des OE zu sehen.

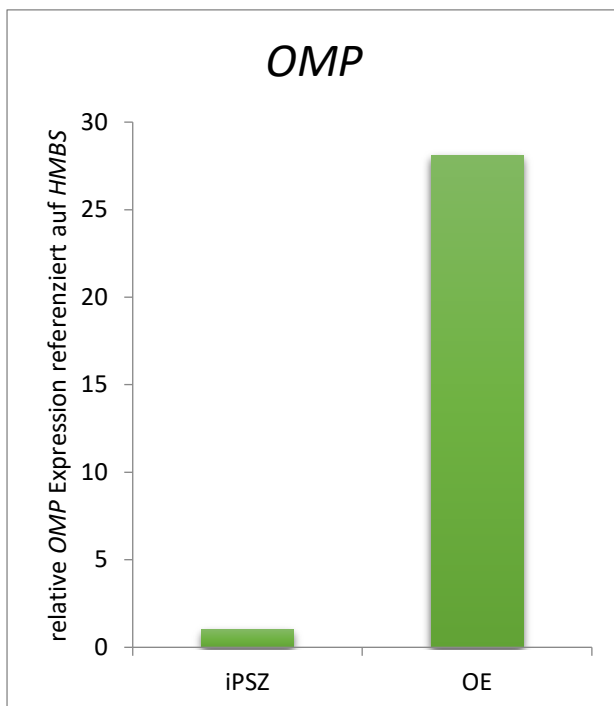


Abbildung 4.1: OMP-Expression in iPSZ und OE.

Darstellung der relativen *OMP*-Expression in iPSZ im Vergleich zum OE aus einer humanen Biopsie. Als Referenzgen dient *HMBS*. Anzahl der Versuche $n = 1$. Dadurch ist die Berechnung von Fehler und Signifikanz nicht möglich.

4.1.2. Immunfluoreszenz

4.1.2.1. Reife ORN

Wie schon erwähnt ist OMP der etablierte Marker für reife ORN und wurde deshalb auch in der Immunfluoreszenz als erstes für den Nachweis genutzt. Als weitere Marker für reife ORN wurden β -3-Tubulin (TUBB3) und Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCHL1) verwendet. Die Abbildung 4.2 zeigt eine Immunfluoreszenz-Färbung eines Kryoschnittes einer olfaktorischen Biopsie mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker TUBB3 in Rot, OMP, der Standard-Marker für reife ORN, in Grün und eine blaue Kernfärbung. Durch die Kernfärbung wird die mehrreihige Epithelstruktur deutlich sichtbar. Die OMP positiven Zellen sind medial angeordnet, die Dendriten reichen jedoch bis an die Epitheloberfläche. Je ORN ist ein einzelner Dendrit zu erkennen, der sich an der Epithelgrenze zum sogenannten dendritischen Knoten verdickt, auf dem die Zilien mit den OR lokalisiert sind. Diese sind in der OMP-Färbung nicht sehr gut zu erkennen, TUBB3 hingegen färbt diese Bereiche deutlich besser an. TUBB3 wird ebenfalls als Marker für ORN verwendet, da diese im OE die einzigen existenten Neurone sind. Dennoch gibt es nur wenige Zellen die gleichzeitig OMP und TUBB3 positiv sind. Während OMP als Marker für reife ORN gilt, ist TUBB3 auch und hauptsächlich in den noch unreifen ORN anzufinden. Der Übergang hier ist fließend, das heißt es gibt Zellpopulationen die sind nur TUBB3 positiv (unreife ORN), wenige Zellen die doppelt positiv sind (reife ORN) und reife ORN, die nur OMP färben. Die Axone der ORN sind hier in diesen Färbungen nicht zu sehen, da es schwierig ist die einzelnen, dünnen Axone beim Schneiden des Gewebes zu treffen. Am besten lassen sich die Axonbündel anfärben, die als Nervus olfactorius durch die Siebplatte zum olfaktorischen Bulbus führen.

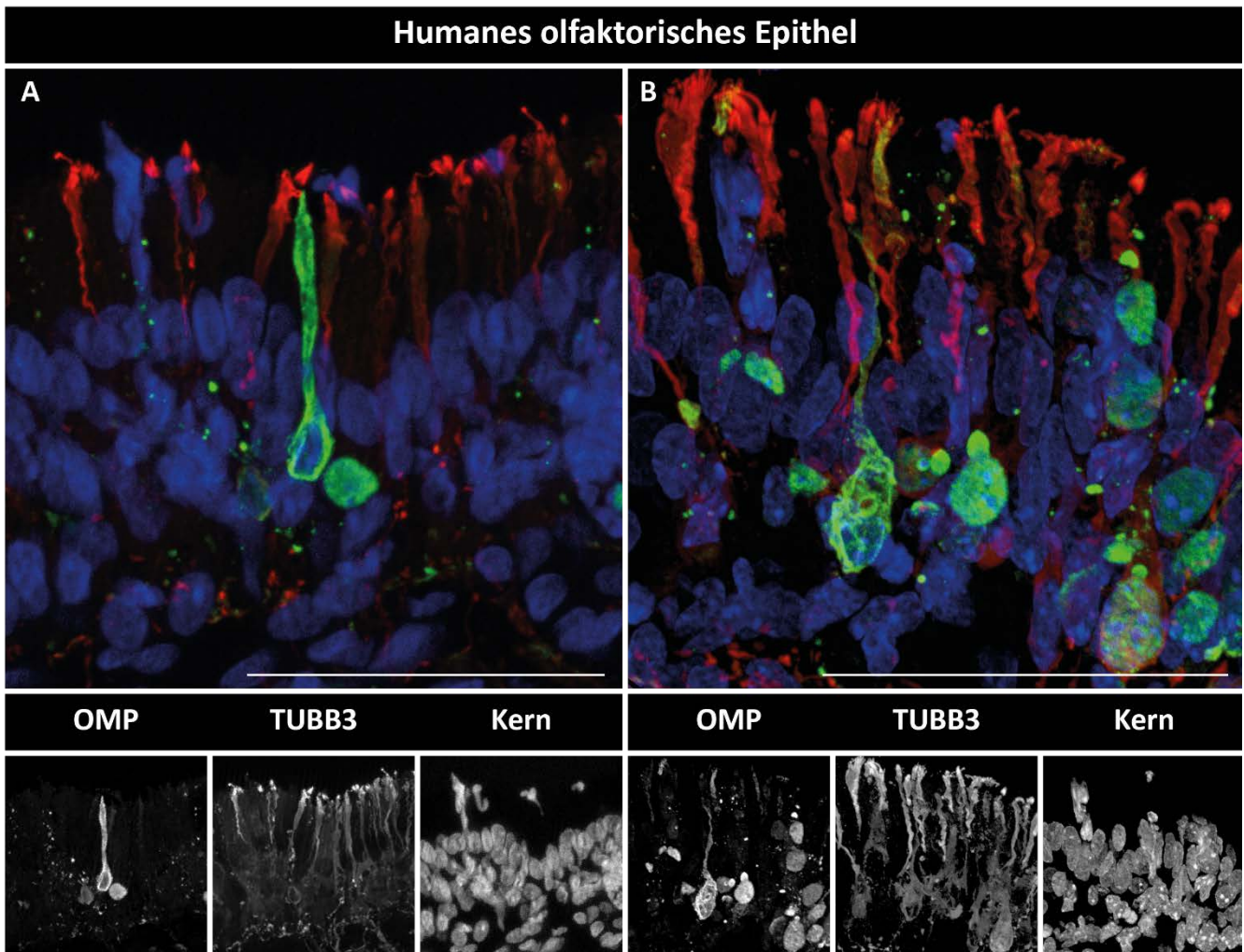


Abbildung 4.2: Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit OMP und TUBB3.

Immunofluoreszenz-Färbung von histologischen Gewebeschnitten humaner Biopsie des OE. In A und B wurde mit Antikörpern gegen OMP (Grün) für die reifen ORN und TUBB3 (Rot) für die Dendriten der reifen und unreifen ORN gefärbt. Zusätzlich wurde mit DAPI der Kern sichtbar gemacht. Maßstab: 50 μm .

Neben OMP als wichtigsten Marker reifer ORN wird auch UCHL1 verwendet um ORN im OE zu färben. In Abbildung 4.3 wurde UCHL1 in Grün und OMP in Rot dargestellt. Wie schon bei der OMP-Färbung zusammen mit TUBB3 sind manche Zellen einzeln gefärbt und manche weisen eine Doppelfärbung auf. Hier dominieren die Doppelfärbungen, was darauf hindeutet, dass UCHL1 ebenfalls reife ORN markiert.

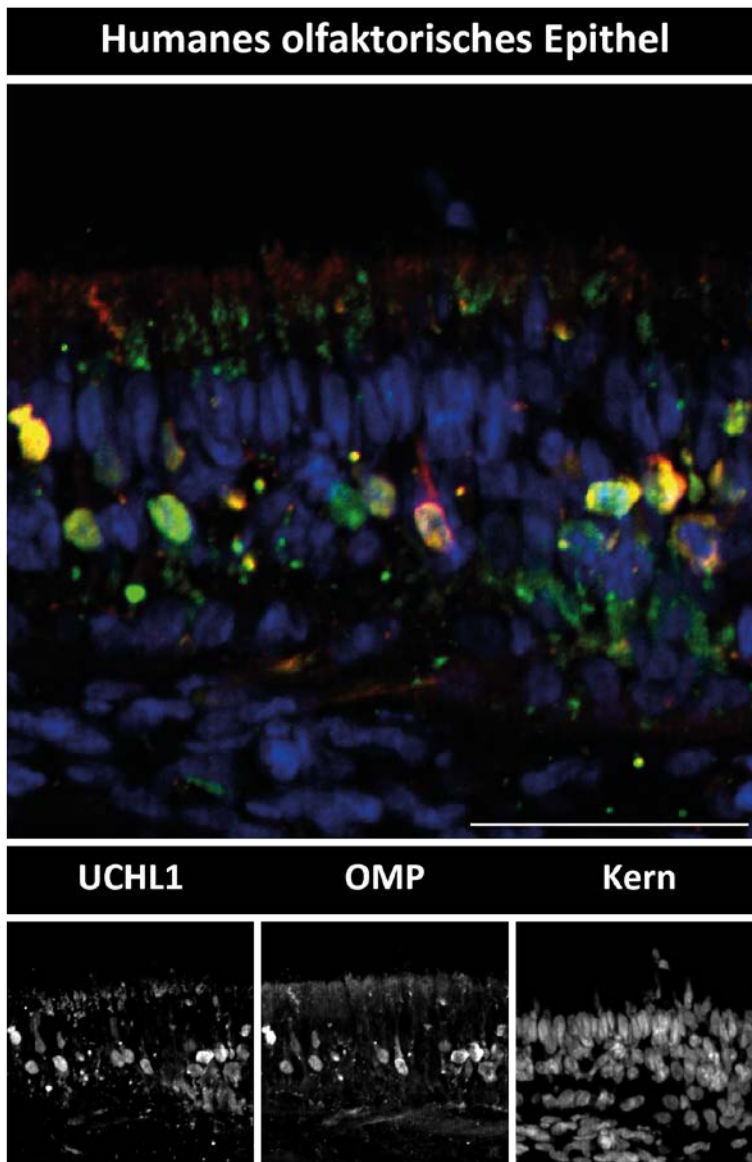


Abbildung 4.3: Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit UCHL1 und OMP.

Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten einer humanen Biopsie des OE. Es wurde UCHL1 in Grün und OMP in Rot dargestellt. Zusätzlich wurde mit DAPI der Kern sichtbar gemacht (Blau). Maßstab: 50 μm .

4.1.2.1. Olfaktorische Signalkaskade

Proteine der olfaktorischen Signalkaskade sind ebenfalls gute ORN Marker, da diese fast ausschließlich im olfaktorischen System zu finden sind. Die alpha Untereinheit des olfaktorischen G-Proteins (GOLF) ist Bestandteil des G-Protein gekoppelten OR und initiiert somit die Signalkaskade nach der Bindung des Odoranten an den Rezeptor. In Abbildung 4.4 B ist gut zu erkennen, dass das G-Protein in den Zilien des dendritischen Knotens – wo auch die Rezeption stattfindet – vorkommt. Die Adenylatcyclase 3 (ADCY3) hingegen ist im Zytoplasma des Dendriten selbst lokalisiert (Abbildung 4.4 C). Ein weiterer spezifischer Faktor in der Signalweiterleitung ist das Transmembran-Protein 16B (TMEM16B), ein Kalzium-gesteuerter Chloridkanal. Das Protein ist in der Membran der Dendriten zu erkennen (Abbildung 4.4 A).

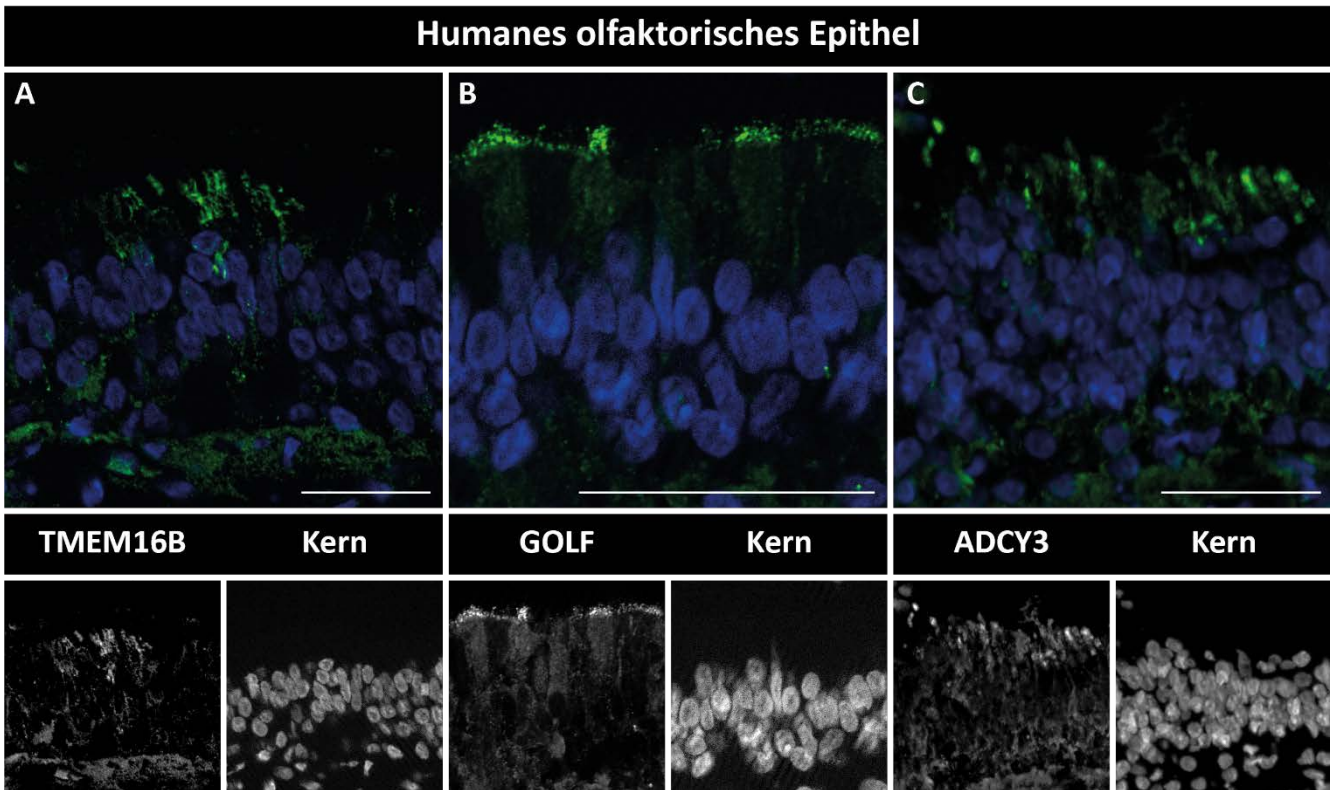


Abbildung 4.4: Immunfluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit TMEM16B, GOLF und ADCY3

Immunologische Färbung von histologischen Gewebeschnitten humaner Biopsie des OE. In A wurde mit Antikörpern TMEM16B in Grün dargestellt. In B wurde mit Antikörpern GOLF in Grün dargestellt. In C wurde mit Antikörpern ADCY3 in Grün dargestellt. Zusätzlich wurde mit DAPI der Kern sichtbar gemacht. Maßstab: 50 µm.

4.1.2.2. Olfaktorische Basalzellen

Die Basalzellen sind die Stammzellen des olfaktorischen Systems, aus dem sich die einzelnen Zellen – auch die ORN – komplett regenerieren können. Es gibt zwei Typen Basalzellen, die globosen und die horizontalen Basalzellen (GBZ und HBZ). Sex Determining Region Y-Box 2 (SOX2) ist ein Marker beider Zelltypen und färbt zusätzlich auch die Stützzellen an. In Abbildung 4.5 A ist SOX2 in grün dargestellt und zeigt positive Zellen in verschiedenen Zellschichten des Epithels. Ganz basal liegen Zellen mit flachem Zellkern, die teilweise SOX2 positiv sind. Apikal davon kommt eine Lage runder Zellen gefolgt von epithelartigen Zellen, die ebenfalls teilweise SOX2 Färbung aufweisen. Die flachen Zellen repräsentieren die HBZ während der epithelartige Zelltyp die Stützzellen darstellt. Ein Marker für die GBZ ist in Abbildung 4.5 B zu sehen. Der Nerve Growth Factor Receptor (NGFR) ist in der Membran der GBZ lokalisiert und ist als grüne, punktuelle Färbung zu sehen. Die GBZ liegen genau über den HBZ, die sich deutlich durch ihren flachen Zellkern von den GBZ abheben.

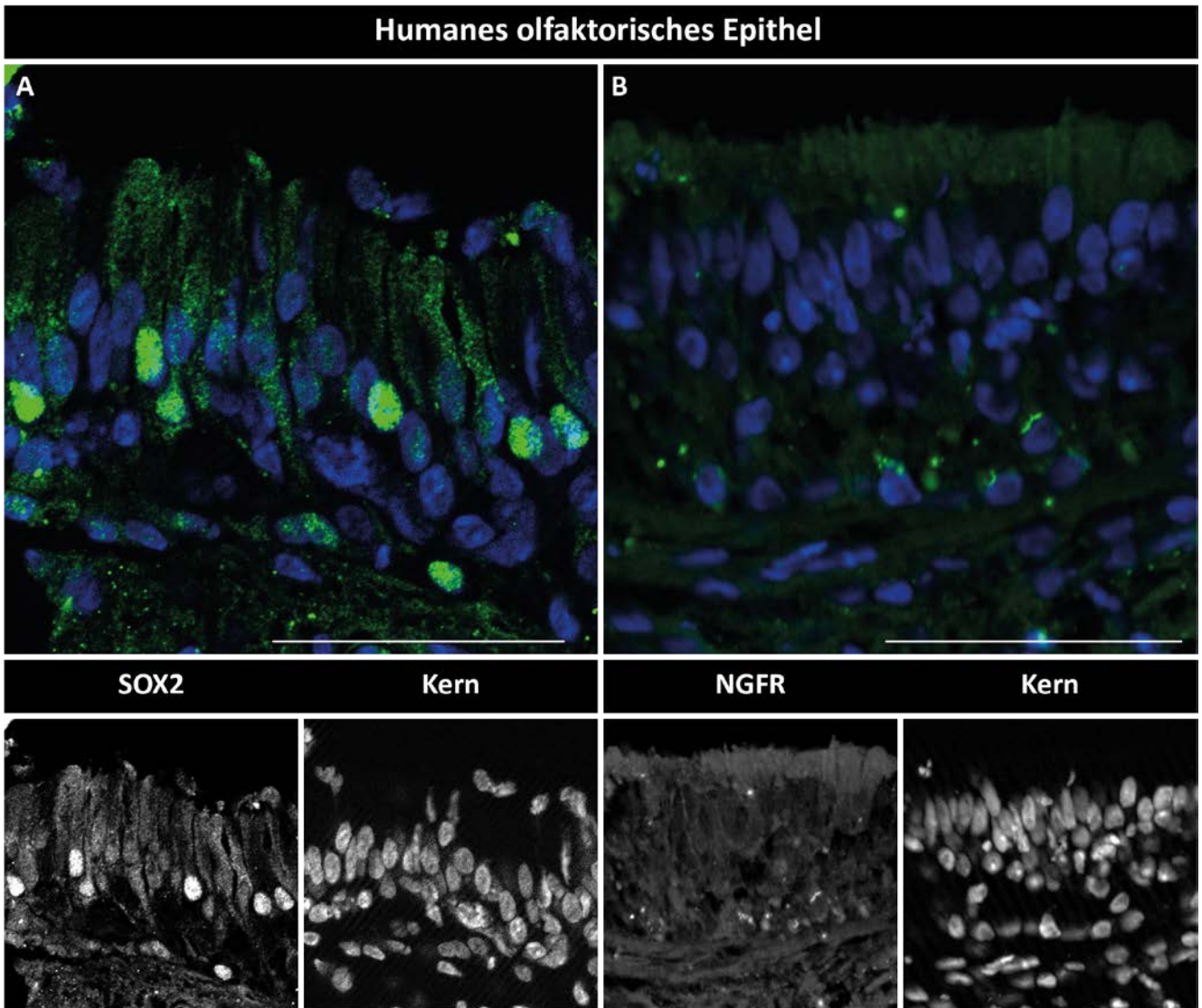


Abbildung 4.5: Immunfluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit SOX2 und NGFR.

Immunologische Färbung von histologischen Gewebeschnitten humaner Biopsie des OE. In A wurde mit Antikörpern SOX2 in Grün dargestellt. In B wurde mit Antikörpern NGFR in Grün dargestellt. Zusätzlich wurde mit DAPI der Kern sichtbar gemacht. Maßstab: 50 μm .

4.1.2.1. Olfaktorische Vorläuferzellen

Bei der Differenzierung der Basalzellen zu ORN passieren die Zellen Vorläuferstadien, die erst durch bestimmte Signale zu adulten ORN heranreifen. Diese Vorläuferpopulationen können durch bestimmte Marker sichtbar gemacht werden. Einer der Marker ist Achaete-Scute Complex-Like 1 (ASCL1) in grün, der in Abbildung 4.6 A etwas unterhalb der reifen (OMP positiven, rot) ORN zu erkennen ist. ASCL1 ist ein relativ früher Marker und kommt auch schon in den GBZ vor. Auch Calbindin 2 (CALB2) (grün) ist ein Vorläufermarker, der die Zellen unterhalb aber auch innerhalb der ORN-Population anfärbt (Abbildung 4.6 B). Hier ist es ähnlich wie bei TUBB3 dass manche Zellen OMP und CALB2 aufweisen, manche aber nur CALB2 positiv sind. CALB2 ist demnach ein Marker für späte Vorläufer und unreife ORN.

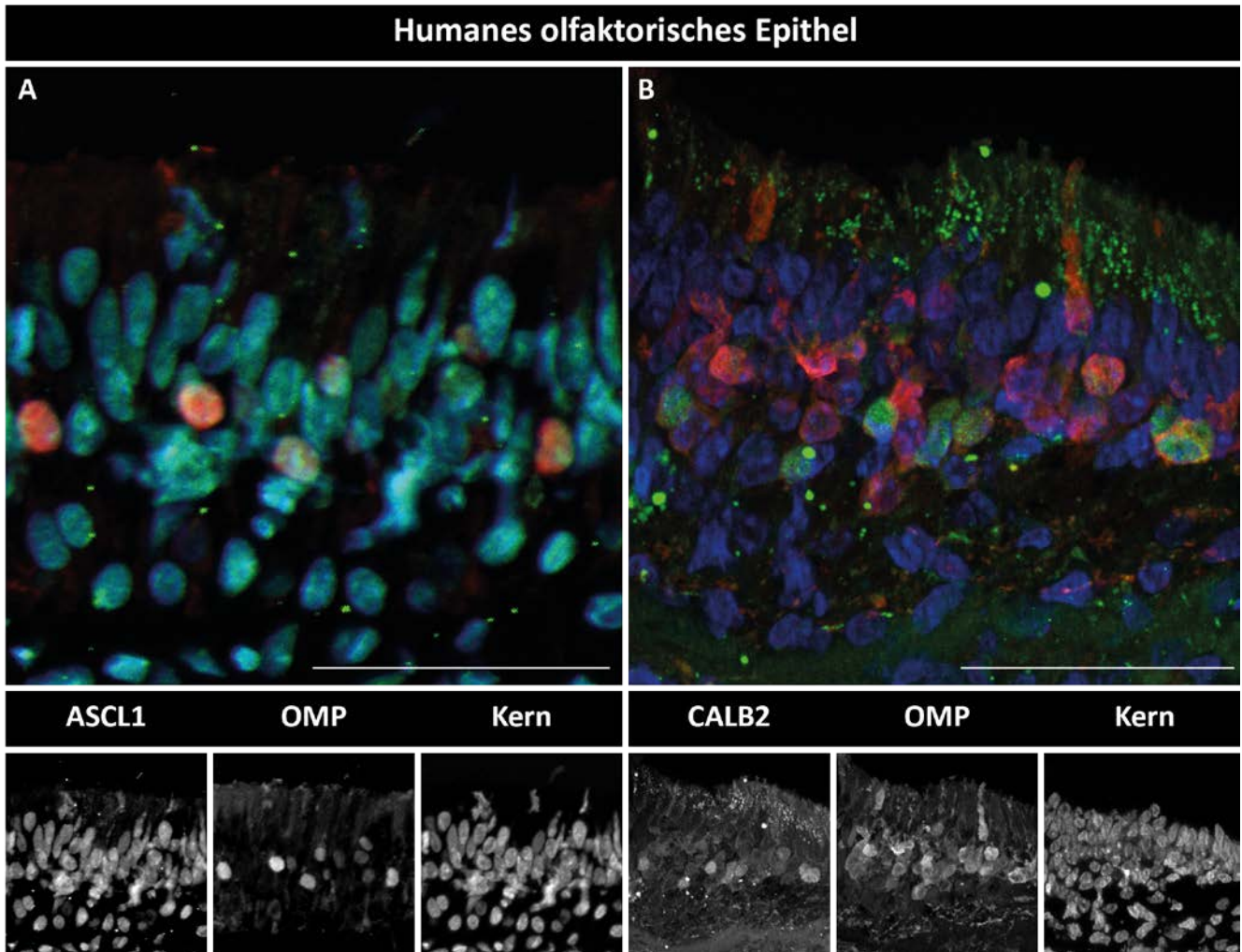


Abbildung 4.6: Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit ASCL1 und CALB2.

Immunologische Färbung von histologischen Gewebeschnitten humaner Biopsie des OE. In A wurde mit Antikörpern ASCL1 in Grün dargestellt und OMP in Rot. In B wurde mit Antikörpern CALB2 in Grün dargestellt und OMP in Rot. Zusätzlich wurde mit DAPI der Kern sichtbar gemacht. Maßstab: 50 μm .

4.1.2.2. Stützzellen des OE

Zusätzlich zu den ORN und deren Vorläufer sind im OE auch nicht-neuronale Zelltypen zu finden. Die Stützzellen reichen vom basalen Grund des Epithels bis an dessen Oberfläche und verbinden somit alle Zelltypen miteinander. E-Cadherin (ECAD) ist ein Marker für die Stützzellen, welche das Epithel zusammenhalten und die Zellen untereinander mit Nährstoffen versorgen. Man kann deutlich erkennen, dass das Zell-Kontakt-Protein ECAD (Grün) zwischen den Zellen in deren Membran lokalisiert ist (Abbildung 4.7). Zwischen den Stützzellen liegen die olfaktorischen Zellen, hier mit OMP (Rot) in den ORN dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Stützzellen die Struktur des Epithels ausmachen, die verschiedenen Zelltypen miteinander verbinden und so die Stabilität, aber auch die metabolische Unterstützung, gewährleisten.

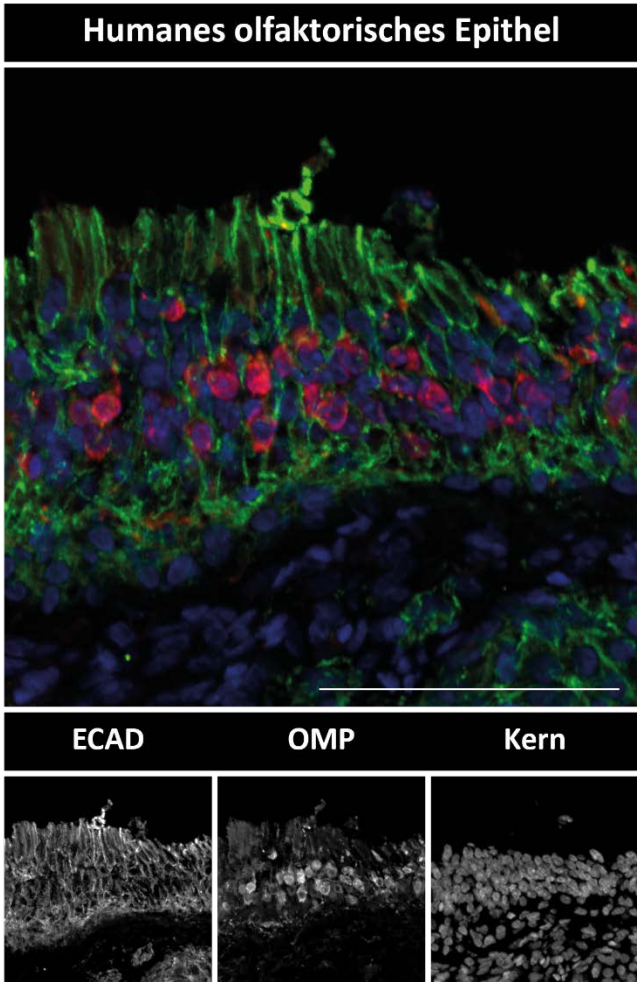


Abbildung 4.7: Immunofluoreszenz-Färbung des OE einer humanen Biopsie mit ECAD.

Immunologische Färbung von histologischen Gewebeschnitten humaner Biopsie des OE. Es wurde mit Antikörpern ECAD in Grün dargestellt und OMP in Rot. Zusätzlich wurde mit DAPI der Kern sichtbar gemacht. Maßstab: 50 µm.

4.2. iPSZ aus reprogrammierten Keratinozyten

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, welche Zellen mit dem Differenzierungsprotokoll in vitro generiert werden sollen. Hier werden die Ergebnisse gezeigt, wie die iPSZ generiert werden und ob sie auch das Potential besitzen zu olfaktorischen Zellen zu differenzieren.

Für die Reprogrammierung wird eine somatische Zellquelle benötigt. Hier werden Keratinozyten aus gezupften Haaren herangezogen. Ein freiwilliger, anonymer und gesunder Spender hat sich als Keratinozytenquelle zur Verfügung gestellt. Nach dem Zupfen der Haare ist zu beachten, dass die Wurzel groß genug ist und die äußere Wurzelscheide deutlich zu erkennen ist (s. Abbildung 4.8), da hier die Keratinozyten auswachsen.

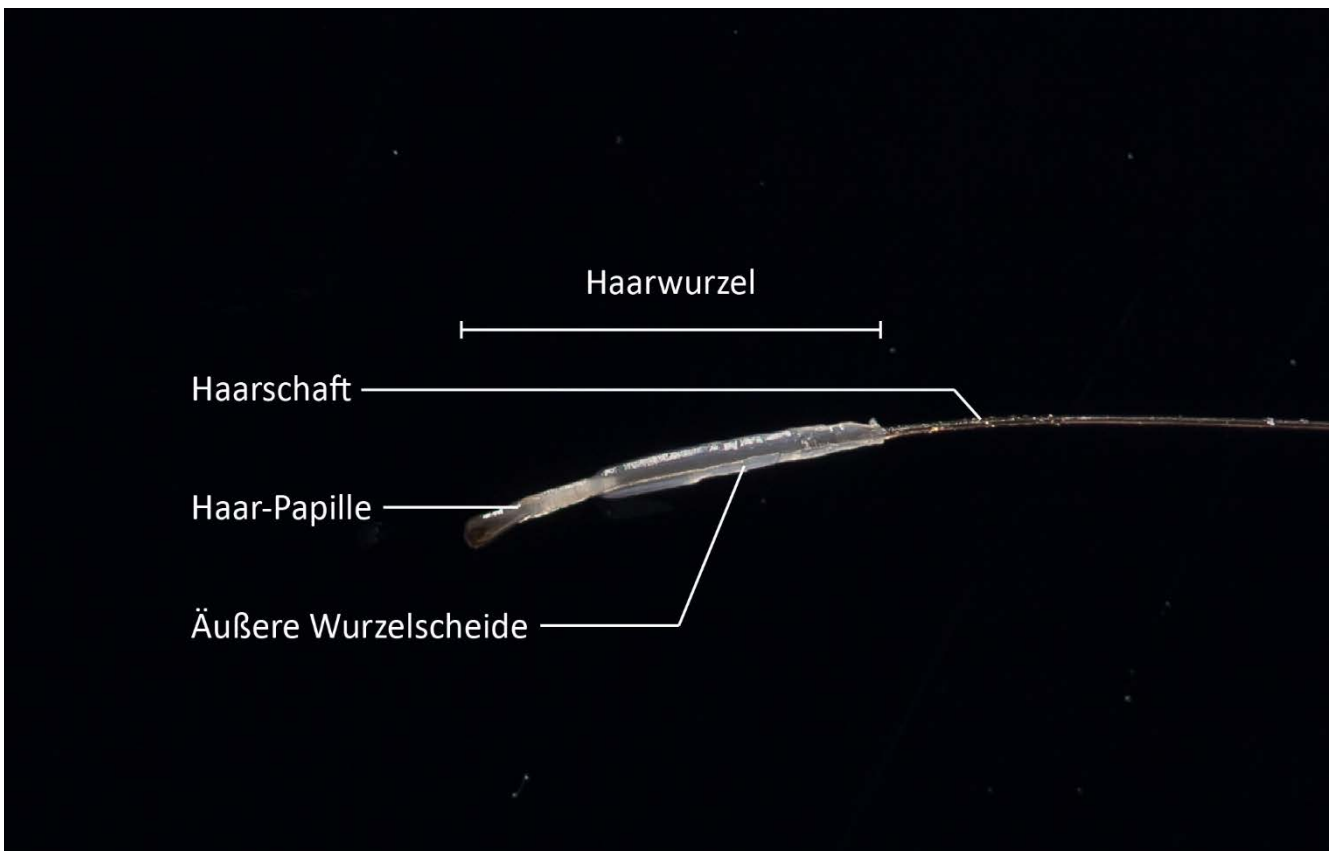


Abbildung 4.8: Kopfhaar mit Wurzel.

Bild eines gezupften Haares eines anonymen Spenders. Die Wurzel besitzt eine deutlich erkennbare weißliche äußere Wurzelscheide, aus denen später die Keratinozyten auswachsen.

Nach ein bis drei Tagen in speziellem Keratinozytenmedium und auf einer Matrigel-Beschichtung wachsen die ersten Keratinozyten aus der Haarwurzel aus. In Abbildung 4.9 ist zu erkennen, dass die Keratinozyten nicht am Ende der Wurzel, an der Haar-Papille proliferieren, sondern an der weißlichen äußeren Wurzelscheide. Die ausgewachsenen Zellen wurden entweder eingefroren oder direkt für die Reprogrammierung verwendet.

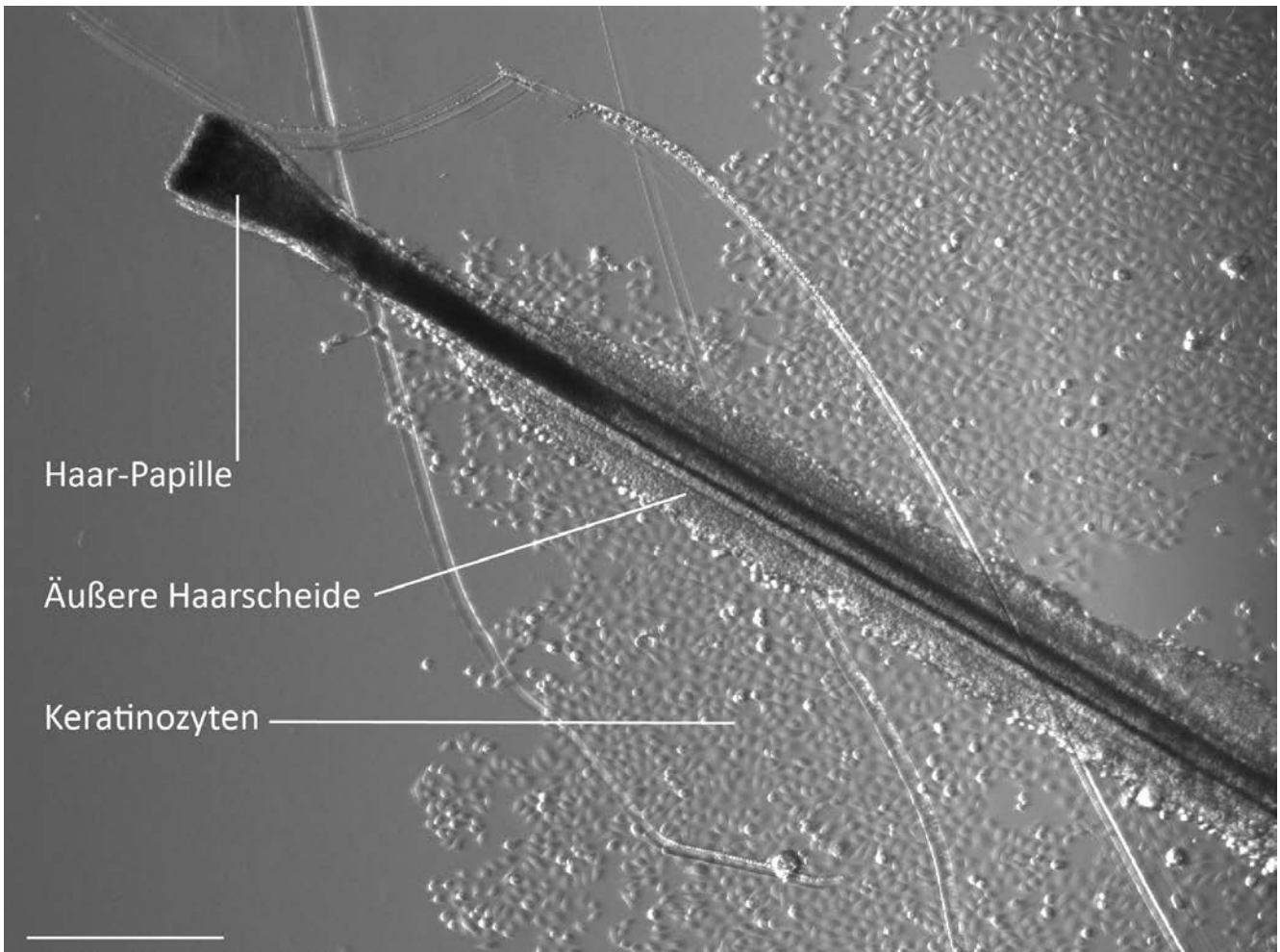


Abbildung 4.9: Haarwurzel mit auswachsenden Keratinozyten.

Lichtmikroskopische Darstellung eines Haares nach drei Tagen in Keratinozyten-Medium mit auswachsenden Keratinozyten an der äußeren Wurzelscheide. Maßstab: 100 μm .

4.2.1. Reprogrammierung

Die ausgewachsenen Keratinozyten des Spenders werden für die Reprogrammierung mit einem Lentivirus mit den vier Reprogrammierungsfaktoren (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC*) infiziert, auf Ammenzellen (Rattenembryo-Fibroblasten) gesetzt und mit einem speziellen Medium versorgt. Nach zwei Wochen sind kleine Stammzell-Kolonien zu erkennen (Abbildung 4.10 A), die in weiteren ein bis zwei Wochen groß genug werden, um in eine Ammenzellen-freie Kultur mit Matrigel-Beschichtung transferiert zu werden (Abbildung 4.10 B).

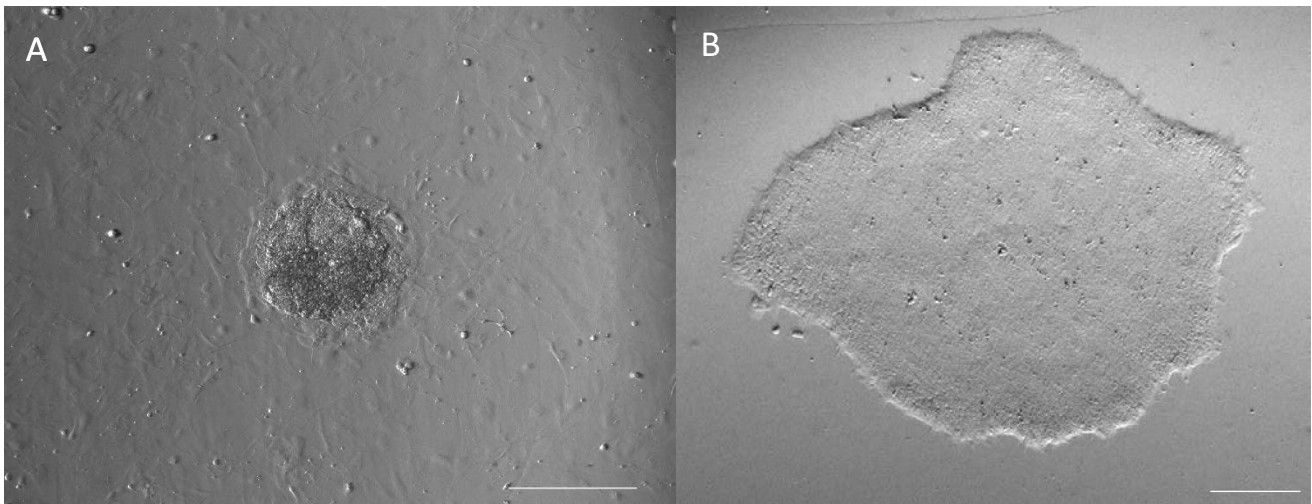


Abbildung 4.10: iPSC-Kolonien.

Lichtmikroskopische Darstellung von iPSC. In A 14 Tage alte, kleine Stammzellkolonie auf Ammen-Zellen. B zeigt eine große Stammzellkolonie in der fünften Passage auf Matrigel, nachdem sie nach 4 Wochen Reprogrammierung von den Ammenzellen genommen wurde (Passage 1). Maßstab: 100 μm .

4.2.2. Charakterisierung

Die Charakterisierung der iPSC dient als Nachweis der Stammzeleigenschaften. Dabei wird vor allem Fokus auf die Fähigkeit der Differenzierung in alle drei Keimblätter Wert gelegt. Dafür müssen die iPSC pluripotent sein, was durch eine Pluripotenzfärbung nachgewiesen wird. Außerdem wird für jede neue Linie eine Keimblattdifferenzierung durchgeführt, um auf Protein- und RNA-Ebene zu zeigen, dass die iPSC ektodermale, endodermale und mesodermale Marker exprimieren.

4.2.2.1. Pluripotenzfärbung

Für die Pluripotenzfärbung werden iPSC Kolonien auf sechs verschiedene Marker getestet. NANOG, OCT4 und SOX2 sind Standard-Pluripotenz-Marker und deren Lokalisation wird als Transkriptionsfaktoren im Kern erwartet. In Abbildung 4.11 ist die Kernfärbung der drei Marker zu erkennen (grün). Sie sind mit dem blauen Kernfarbstoff eindeutig kolokalisiert. Die Marker SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 sind ebenfalls Pluripotenzmarker, hier jedoch sind die Proteine in der Zellmembran lokalisiert, was in Abbildung 4.11 gut zu erkennen ist. Somit wurde die Pluripotenz der Stammzell-Kolonien in dieser iPSC-Linie nachgewiesen.

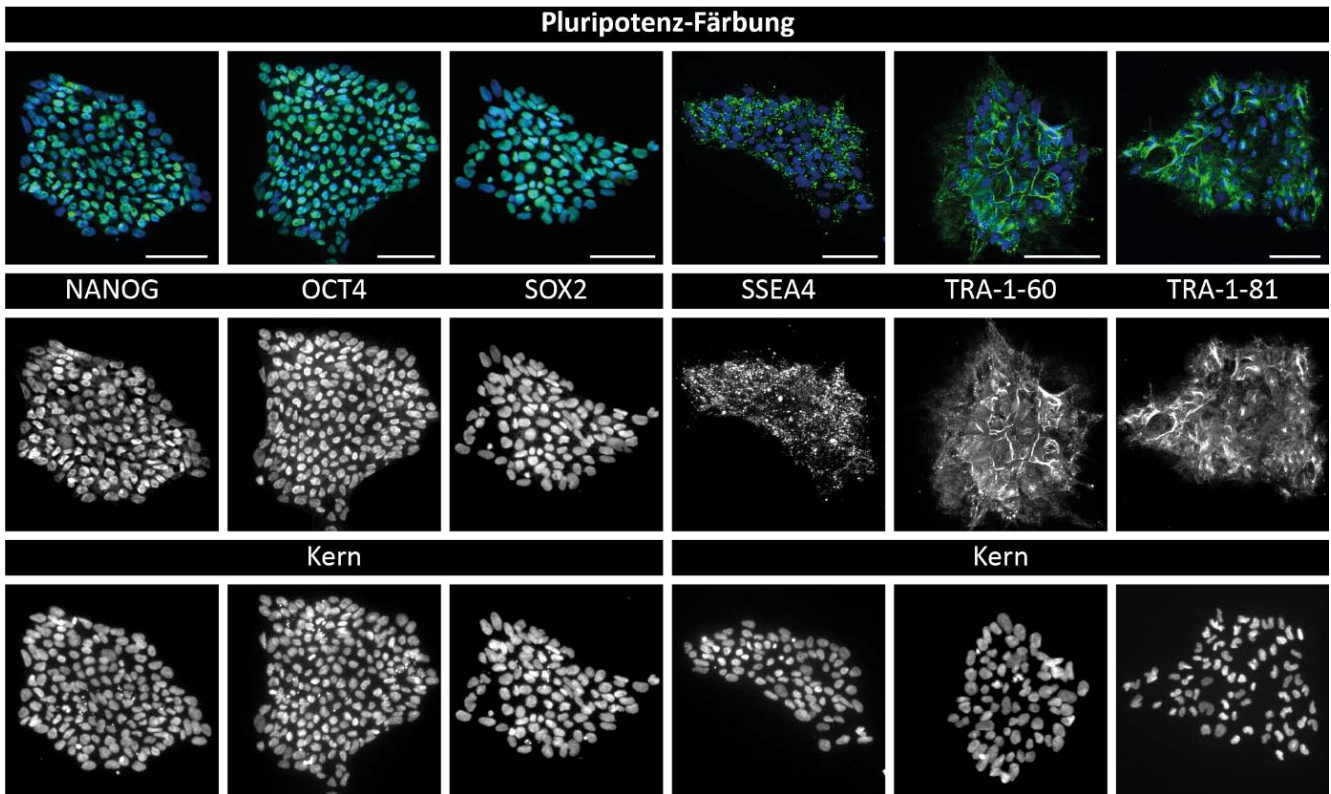


Abbildung 4.11: Pluripotenzfärbung.

Es wurden die Marker NANOG, OCT4, SOX2, SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 immunologisch gefärbt (Grün). Die erste Reihe zeigt die Überlagerung von den Markern mit der blauen Kernfärbung, die zweite Reihe nur die Marker und die dritte Reihe nur die Kernfärbung. Maßstab: 100 μm .

4.2.2.2. Keimblattdifferenzierung

Der letztendliche Nachweis, dass sich die iPSZ zu Zellen aus allen drei Keimblättern entwickeln können, ist die Keimblattdifferenzierung. Zum Nachweis der jeweiligen Vertreter der Keimblätter werden die Marker TUBB3 für Ektoderm, DESMIN für Mesoderm und SOX17 für Endoderm herangezogen. In Abbildung 4.12 ist die jeweilige positive Färbung in grün zu sehen. TUBB3 färbt das Zytoskelett der Neurone und neuronartigen Zellen, wodurch eindeutig nachgewiesen werden kann, dass aus den iPSZ ektodermale Zellen entstanden sind. SOX17 ist ein Transkriptionsfaktor, der in endodermalen Zellen auftritt. DESMIN ist ein mesodermaler Marker der im Zytoplasma lokalisiert ist.

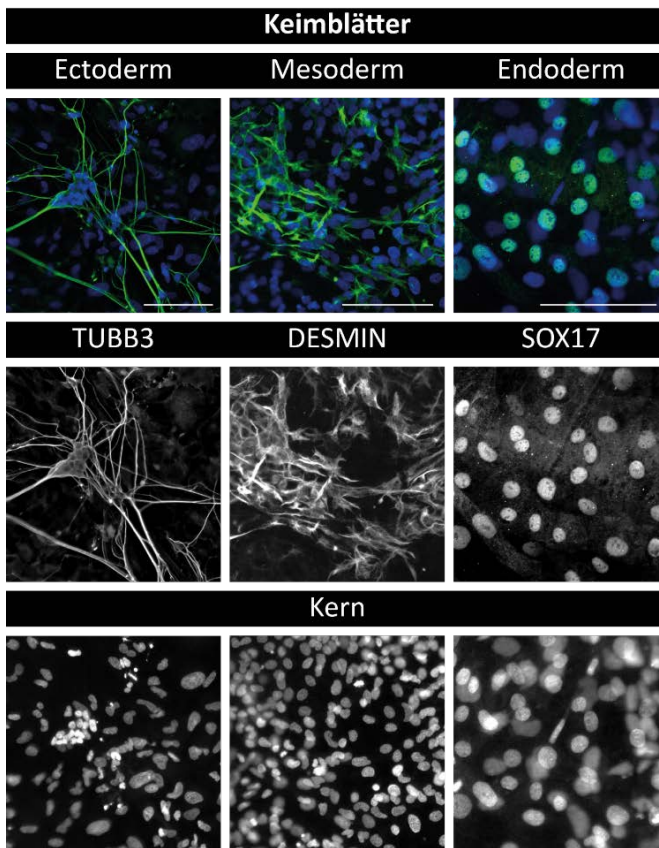


Abbildung 4.12: Immunofluoreszenz-Färbung einer Keimblattdifferenzierung.

In Grün dargestellt wurde TUBB3 für Ektoderm, DESMIN für Mesoderm und SOX17 für Endoderm benutzt. Blau ist die Kernfärbung mit DAPI. Die erste Zeile zeigt die Überlagerung von Markern und der Kernfärbung, die zweite Zeile zeigt nur die Marker und die dritte Zeile nur die Kernfärbung. Maßstab 50 μm .

In Abbildung 4.13 sind die qRT-PCR Daten aufgeführt. Hier wurden für jedes Keimblatt zwei Marker herangezogen (*T* und *MYH6* für Mesoderm, *AFP* und *FOXA2* für Endoderm, *PAX6* und *TUBB3* für Ektoderm) und in iPSZ – dieser Wert wurde auf den Wert eins gesetzt (blauer Balken) – und in der Keimblattdifferenzierung gemessen (grüne Balken). Normiert wurde auf *HMBS* als interne Kontrolle. Es ist gut zu erkennen, dass alle Gene in der Keimbahndifferenzierung deutlich angestiegen sind im Vergleich zu der Expression in den iPSZ. Deshalb kann man davon ausgehen, dass in der Differenzierung Vertreter aus jedem Keimblatt entstanden sind und somit der Beweis erbracht ist, dass die iPSZ die Fähigkeit besitzen in alle Keimblätter zu differenzieren.

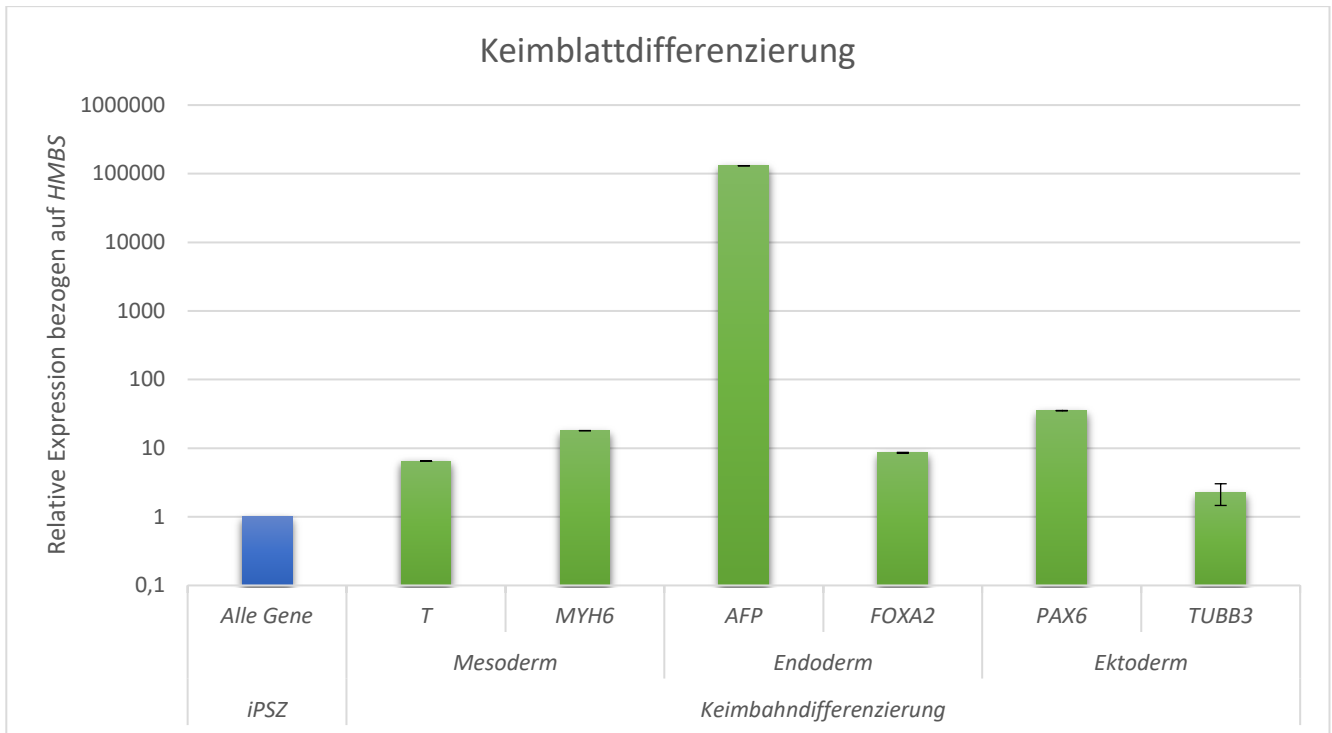


Abbildung 4.13: qRT-PCR einer Keimblattendifferenzierung.

Hier sind die relativen Expressionen der Markergene der einzelnen Keimblätter dargestellt (*T* und *MYH6* für Mesoderm, *AFP* und *FOXA2* für Endoderm, *PAX6* und *TUBB3* für Ektoderm). Alle Gene wurden auf *HMBS* als Referenzgen normiert und die Werte aller Gene wurde in den iPSZ auf den Wert 1 gesetzt (blauer Balken). Die Werte der Keimblattendifferenzierung der jeweiligen Gene werden als grüne Balken dargestellt. Die y-Achse besitzt eine logarithmische Skala, damit alle Werte sichtbar in einem Diagramm dargestellt werden können. Der Fehlerbalken entspricht dem SEM.

4.3. Olfaktorische Differenzierung

Es gibt verschiedene Schritte die während einer Differenzierung durchlaufen werden. In Abbildung 4.14 wurden die einzelnen Schritte der olfaktorischen Differenzierung mit dem Lichtbildmikroskop dokumentiert. Erster Schritt der Differenzierung ist die Embryoid Body (EB) Formation (Abbildung 4.14 A). Sie sind in Suspension gehaltene kugelige Zellaggregate, die dem frühen Embryo entsprechen. Wenn die EBs ausplattiert werden, bilden sich sogenannte neurale Rosetten (Abbildung 4.14 B). Dabei ordnen sich rund um den ausplattierten EB Zellen in kreisförmigen Gebilden an. Diese Bildung der Rosetten wird der Entstehung des Neuralrohrs gleichgesetzt. Die Rosetten werden abgelöst und wieder in Suspension gehalten bis sich Kugeln bilden, die hauptsächlich aus neuronalen Stammzellen und Vorläufern bestehen (Abbildung 4.14 C). Im letzten Schritt werden die Kugeln wieder ausgesät und die Neuronen-Vorläufer können reifen und auswachsen, bis eine funktionelle Neuronenkultur entsteht (Abbildung 4.14 D).

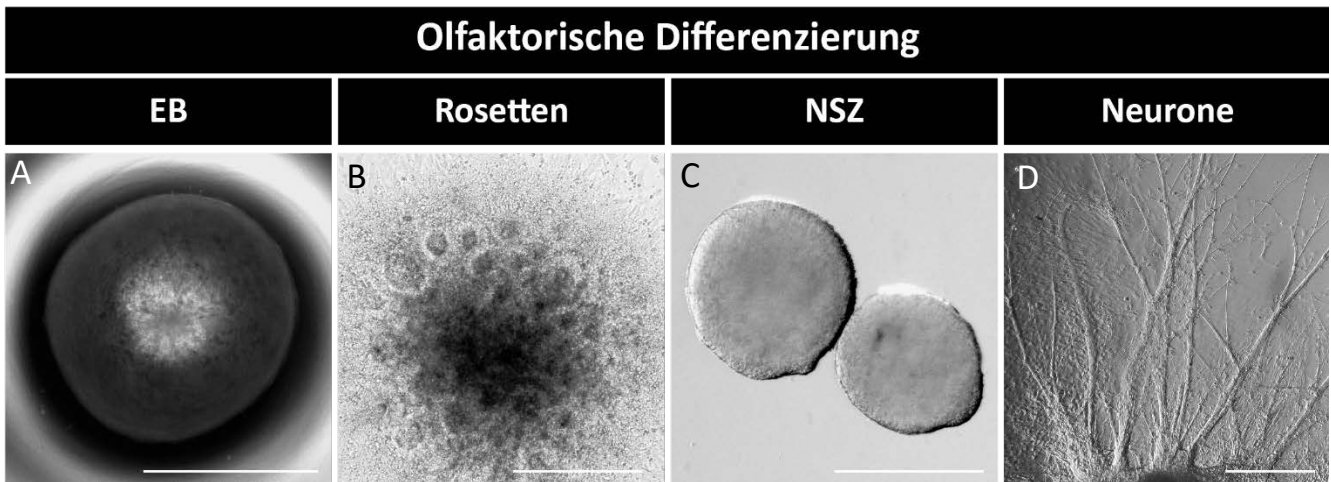


Abbildung 4.14: Stadien der olfaktorischen Differenzierung.

Lichtmikroskopische Bilder verschiedener Stadien einer olfaktorischen Differenzierung. A entspricht dem Embryoid Body (EB) Stadium in einer 96-Well Platte. In B sind die Rosetten rund um den ausplattierten EB zu sehen. In C sind zwei Kugeln neurale Stammzellen zu sehen. D ist ein Ausschnitt aus einer adhärenen Neuronenkultur. Maßstab: 100 µm.

4.4. Olfaktorische Rezeptorneurone *in vitro*

Ziel der olfaktorischen Differenzierung von iPSZ *in vitro* ist die Gewinnung von funktionellen ORN in einer neuronalen Kultur. Zur Überprüfung ob und wie viele ORN in der Endkultur vorhanden sind wird eine Charakterisierung der Endpopulation vorgenommen. Dabei wurde das Augenmerk vor allem auf OMP gelegt, da dieser Marker spezifisch für reife ORN ist. Zudem wurden weitere Marker für reife ORN (UCHL1 und NCAM2), Proteine die in der olfaktorischen Signalkaskade vorkommen (GOLF, ADCY3 und TMEM16B), Vorläufer-Marker und unreife ORN (ASCL1 und CALB2), Marker für Basalzellen (SOX2 und NGFR) und schließlich ECAD und SOX2 für die Stützzellen verwendet, um die jeweiligen Strukturen zu zeigen. TUBB3 als Marker für alle Neurone, aber auch für olfaktorische Vorläufer, unreife und reife ORN wurde ebenfalls verwendet. Dafür wurden verschiedene Analyse-Techniken eingesetzt.

Zunächst wurden die Expressionsprofile der Markergene im Vergleich zu iPSZ mittels qRT-PCR dargestellt. Es wurden zwei identische Differenzierungen untersucht, an denen an verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen wurden. Dadurch konnte auch ein Verlauf der Gene über die Differenzierungszeit dargestellt werden. Endpunkt bei Differenzierung 1 war Tag 121 und bei Differenzierung 2 Tag 106.

Die nächste Ebene zum Nachweis von olfaktorischen Zellen in der Differenzierung war die Protein-Analyse. Für alle Marker wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt, um den visuellen Nachweis der olfaktorischen Strukturen zu erbringen. Für OMP und die anderen Marker der ORN wurde zusätzlich ein Western Blot und eine FACS Analyse durchgeführt um zusätzliche eine Bestätigung zu bekommen und um einen Hinweis auf die Anzahl der reifen ORN in der Kultur zu erhalten.

4.4.1. OMP

Als erstes wird speziell auf den olfaktorischen Marker OMP eingegangen, da dieser explizit in reifen ORN exprimiert wird und dadurch zum wichtigsten Marker wird. Deshalb wurden hier zusätzlich zu den qRT-PCR Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen ein Western Blot und eine FACS-Analyse durchgeführt.

4.4.1.1. Expressions-Daten von *OMP*

Die qRT-PCR analysiert die relative Expression von *OMP* anhand der vorliegenden RNA. In Abbildung 4.15 wird die relative *OMP* Expression von Tag 121 der olfaktorischen Differenzierung mit der Expression in den iPSZ verglichen. Da in den Stammzellen so gut wie keine Expression vorhanden ist, kann ein 50facher Anstieg des RNA-Levels abgelesen werden. Es wurden jeweils drei biologischen Replikate miteinander verrechnet, wodurch sowohl der Fehler (SEM) als auch die Signifikanz dargestellt werden konnte. Mit einem Wert von unter 0,01 (genau: 0,008) ist die Expression von *OMP* an Tag 121 der Differenzierung stark signifikant erhöht. Das bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt *OMP* exprimiert ist, was wiederum ein Hinweis auf vorhandene ORN in der olfaktorischen Differenzierung an Tag 121 gibt.

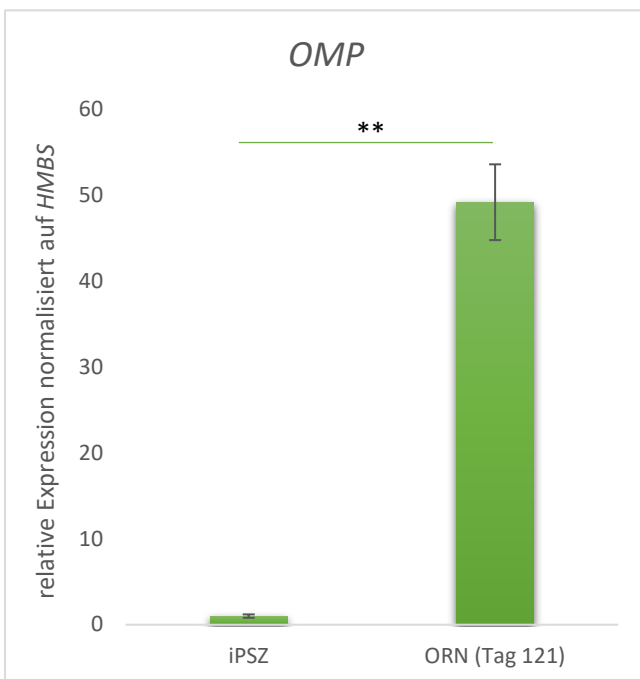


Abbildung 4.15: Relative *OMP*-Expression.

Darstellung der relativen Expression von *OMP* in iPSZ und in der Neuronenkultur (ORN) an Tag 121. Als internes Referenzgen dient *HMBS*. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Signifikanz: $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***.

4.4.1.2. Immunfluoreszenz-Färbung mit OMP

Die Immunfluoreszenz-Färbung soll die ORN in der olfaktorischen Differenzierung nachweisen. Dafür wurde zunächst OMP und TUBB3 gefärbt (Abbildung 4.16). Hier dient TUBB3 nicht zur Identifizierung von ORN oder deren Vorläufer, sondern hauptsächlich zur Darstellung der anderen Neurone im Kontrast zu der OMP-Färbung, die spezifisch die ORN färbt. In der Differenzierung mit adhärennten Kulturbedingungen wird keine Epithelstruktur erwarten, aber dennoch sollten OMP-positive Zellen durch das etablierte Protokoll zu erkennen sein. Man sieht in Abbildung 4.16 A eine dichte Neuronenpopulation (TUBB3-Färbung in rot) und ein einzelnes Neuron positiv für OMP in grün. Das Neuron ist nicht TUBB3 positiv, was für ein reifes ORN spricht, ebenso wie der bipolare Charakter der Zelle. In Abbildung 4.16 B sind innerhalb des Neuronennetzwerkes drei OMP-positive Zellen zu erkennen von denen zwei zusätzlich eine TUBB3-Färbung aufweisen. Da auch reife ORN TUBB3 exprimieren können, ist die Ko-Färbung erwartungsgemäß. Alle Zellen besitzen ebenfalls eine bipolare Struktur mit zwei Fortsätzen. Welcher der Fortsätze das Axon und welcher der Dendrit ist, ist in dieser Färbung nicht zu erkennen. Einen Dendritenhügel kann man hier ebenfalls nicht sehen, was die Frage aufwirft, ob in einer Zellkultur ohne Epithelstrukturen solche Formationen überhaupt zustande kommen. Auch nicht-bipolare Neuronentypen weisen teilweise OMP auf (nicht gezeigt), wobei der bipolare Anteil überwiegt. Möglicherweise werden die ORN durch die nicht vorhandene Struktur, im Epithel durch die Stützzellen gegeben, oder durch bestimmte Signale der Umgebung des Neurons, nicht immer in ihre bipolare Funktion gezwungen. Insgesamt sind die OMP positiven Neurone nur vereinzelt zu sehen und in der kompletten Kultur verteilt.

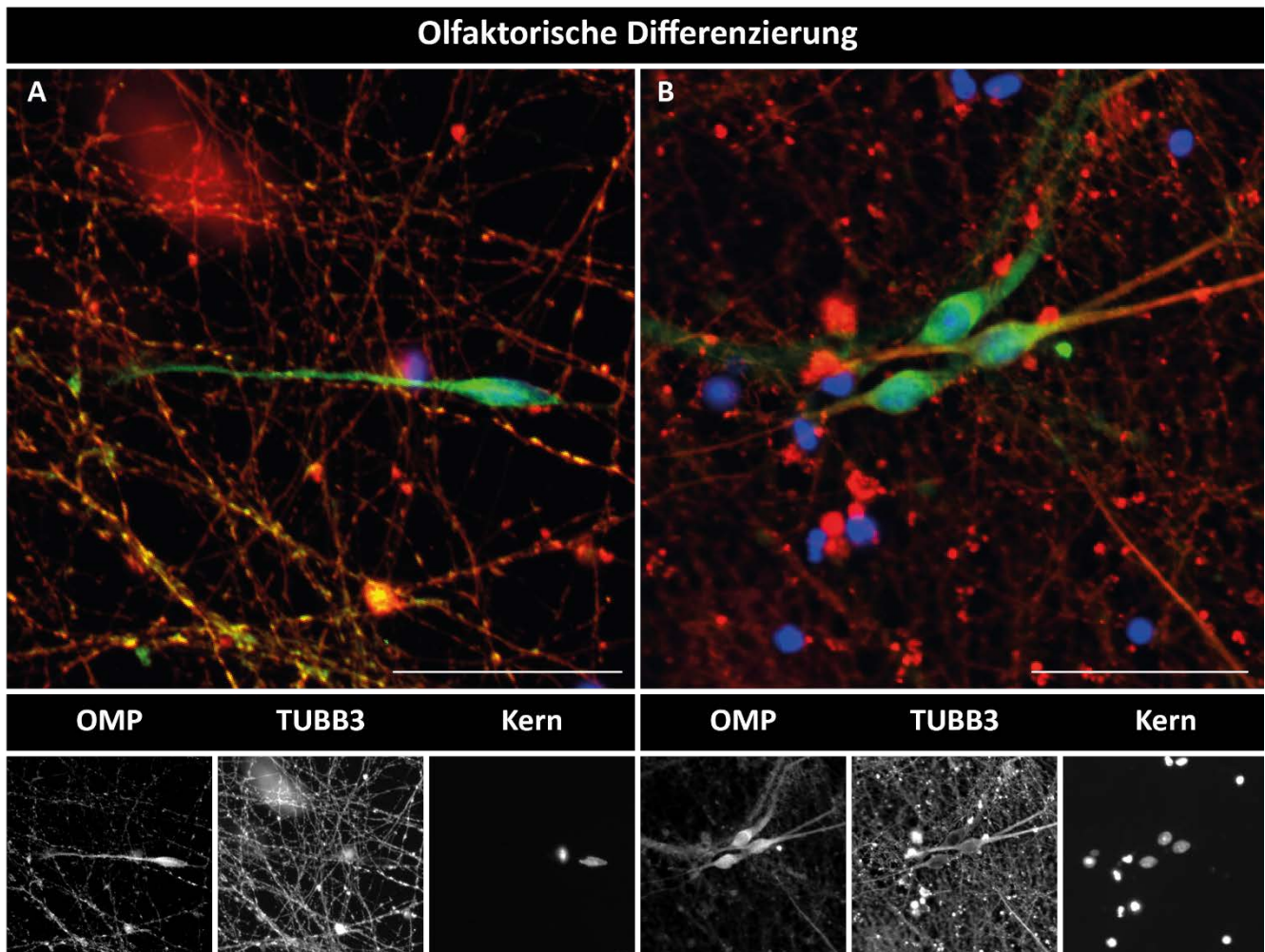
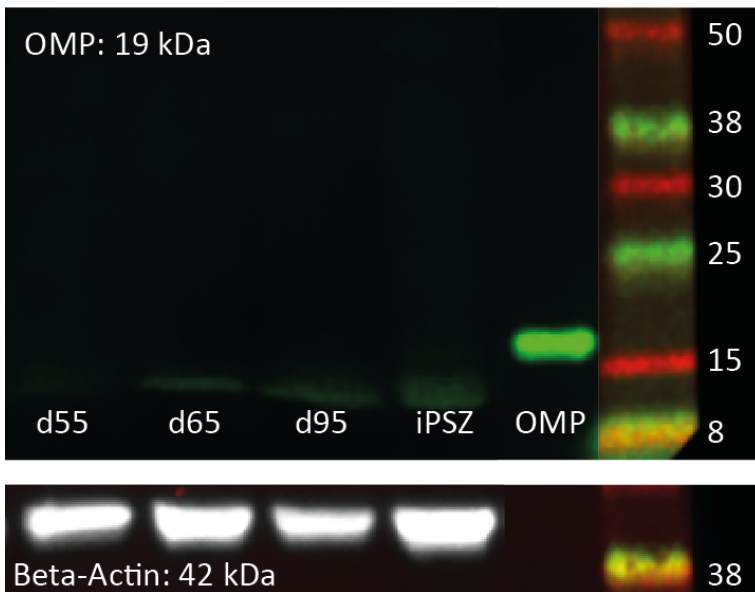


Abbildung 4.16: Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit OMP und TUBB3.

Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit OMP und TUBB3 an Tag 95. In A und B wurde OMP in Grün und TUBB3 in Rot gefärbt. Zusätzlich wurde der Kern mit DAPI kenntlich gemacht (Blau). Maßstab: 100 μm .

4.4.1.3. Western Blot mit OMP

Der Western Blot mit OMP wurde zusätzlich gemacht, um das Protein in den Zelllysaten nachzuweisen und somit die Färbung zu bestätigen. Da OMP als der wichtigste Marker gilt wurde hier zusätzlich ein rekombinantes OMP Protein aufgetragen um zu bestätigen, dass der Antikörper funktioniert. In Abbildung 4.17 wurden von links nach rechts zunächst Zelllysate der olfaktorischen Differenzierung zu drei verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen (Tag 55, Tag 65 und Tag 95). Zusätzlich wurde eine iPSZ Kontrolle und das rekombinante OMP Protein aufgetragen. Der Antikörper gegen OMP besitzt eine grüne Fluoreszenz. OMP ist ca. 19 kDa groß und kann in der Positivkontrolle (rekombinantes Protein) in dieser Größe nachgewiesen werden. In den anderen Proben ist jedoch keine OMP-Bande zu sehen. Durch die Beta-Actin-Kontrolle ist nachgewiesen, dass in allen Spuren Protein aufgetragen wurde. OMP ist in den differenzierten Zellen nicht im Western Blot nachzuweisen. Zwar sind in der Färbung an Tag 95 OMP-positive Zellen zu sehen, aber es sind nicht sehr viele, wahrscheinlich zu wenige um diese mit einer weniger sensitiven Methode wie dem Western Blot nachzuweisen.

**Abbildung 4.17: Western Blot mit OMP**

Darstellung eines Western Blots mit OMP (Grün) an den Tagen (d = Tag) 55, 65 und 95 der olfaktorischen Differenzierung und den iPSZ. In der unteren Zeile sieht man die Banden für Beta-Actin (Weiß) als Ladekontrolle. Aufgetragen wurden 40 μg Protein.

4.4.1.4. FACS mit OMP

Es konnten OMP-positive Zellen in der olfaktorischen Differenzierung durch eine Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden, jedoch reichte die Menge an positiven Zellen nicht aus, um ein positives Signal im Western Blot zu erhalten. Um die Anzahl der OMP-positiven Zellen zu bestimmen, wurde ein Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) durchgeführt. Bei dieser Technik werden Zellen gefärbt und anschließend in Suspension durch ein FACS-Gerät gepumpt, welches jede einzelne Zelle zählt und zusätzlich die gefärbten Zellen erkennt. Somit kann man in Relation zur Gesamtzellzahl den Anteil der positiven, hier OMP-gefärbten, Zellen ermitteln. Es wurden zwei Zeitpunkte gemessen, Tag 98 und Tag 162. Der erste Zeitpunkt wurde genauso wie die Färbung gewählt in der ein paar positive Zellen identifiziert werden konnten. Der zweite Zeitpunkt wurde später gewählt, da eventuell mehr reife ORN mit OMP zu finden sind. In Abbildung 4.18 A ist Tag 98 dargestellt und man erkennt nach abziehen der Negativ-Kontrolle (Blau) keine positiven OMP-Zellen (Rot). An Tag 162 der olfaktorischen Differenzierung wurden 0.64 % der Zellen als OMP-positiv erkannt. Diese Daten zeigen, dass die reifen ORN zu einem sehr späten Zeitpunkt der Differenzierung anteilig vermehrt vorkommen.

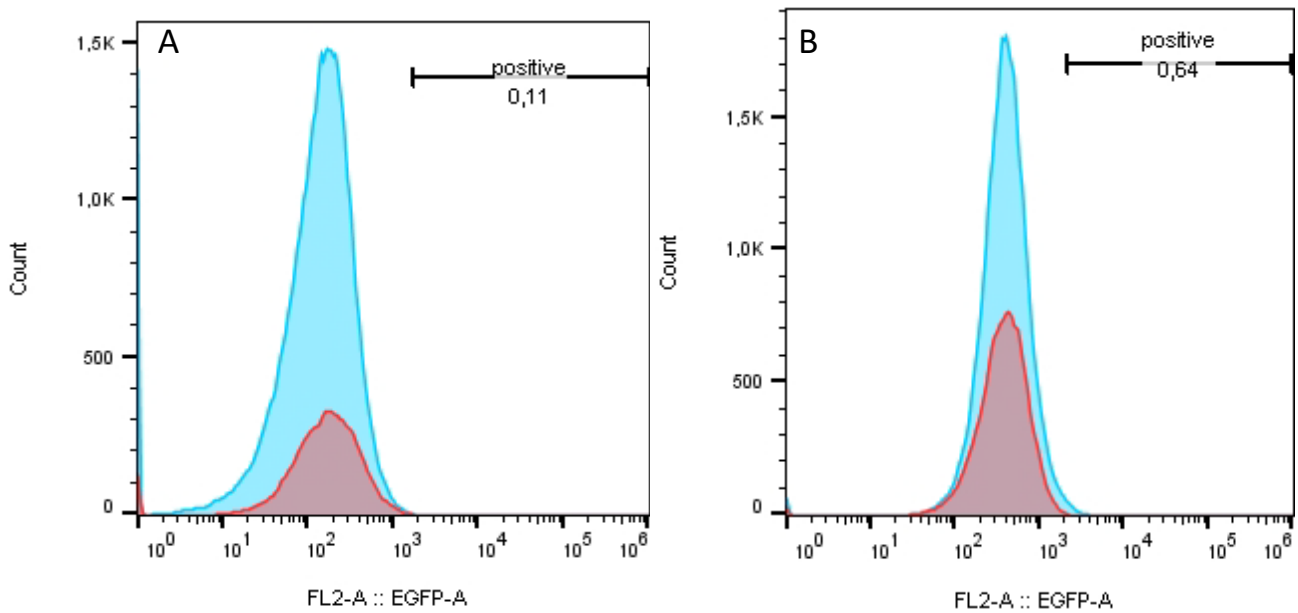


Abbildung 4.18: FACS-Analyse mit OMP

Darstellung der FACS-Ergebnisse mit OMP an Tag 98 (A) und Tag 162 (B). Die rote Kurve zeigt die Negativkontrolle in der nur die Zellen mit dem Sekundärantikörper gemessen wurden. In Blau sind die Zellen dargestellt, die mit OMP gefärbt wurden. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Zellen und die X-Achse die Fluoreszenz-Intensität. Oben rechts ist jeweils berechnet worden, wieviel Prozent der Zellen positiv sind.

Um eine Relation zu bekommen, wie viele der Zellen überhaupt Neurone sind, wurde auch die Anzahl der TUBB3-positiven Zellen mit einer FACS-Analyse ermittelt (Abbildung 4.19). An Tag 98 wurden 87,3 % positive Zellen ermittelt, an Tag 162 immer noch 65,7 %.

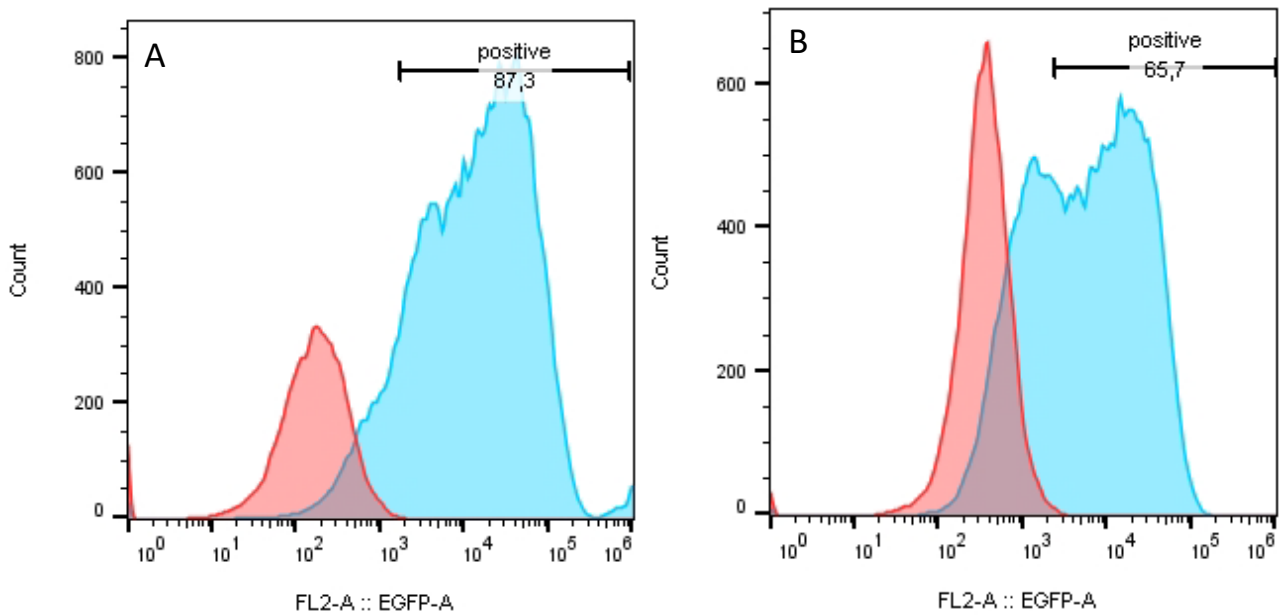


Abbildung 4.19: FACS-Analyse mit TUBB3

Darstellung der FACS-Ergebnisse mit TUBB3 an Tag 98 (A) und Tag 162 (B). Die rote Kurve zeigt die Negativkontrolle in der nur die Zellen mit dem Sekundärantikörper gemessen wurden. In Blau sind die Zellen dargestellt, die mit TUBB3 gefärbt wurden. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Zellen und die X-Achse die Fluoreszenz-Intensität. Oben rechts ist jeweils berechnet worden, wieviel Prozent der Zellen positiv sind.

4.4.1. Olfaktorische Rezeptorneurone

Zur Unterstützung der OMP-Ergebnisse wurden weitere Marker für ORN hinzugenommen und analysiert. Diese Marker (UCHL1 und NCAM2) sind ebenfalls in Publikationen im OE nachgewiesen worden und gelten als spezifische ORN Marker. Im Gegensatz zu OMP, das nur in reifen ORN vorkommt, können diese Marker auch in unreifen ORN gefunden werden. Auch hier wurden zunächst qRT-PCR Daten ausgewertet, um die Expression der Gene zu ermitteln, dann erfolgt die Proteinanalyse mittels Immunfluoreszenz-Färbung und teilweise mit Western Bot und FACS-Analyse.

4.4.1.1. Expressionsdaten der ORN-Marker-Gene

Die qRT-PCR Daten wurden auf *HMBS* als internes Referenzgen normalisiert und die relative Expression wurde in iPSZ und an Tag 106 der olfaktorischen Differenzierung gemessen (Abbildung 4.20). Bei beiden Genen ist ein Anstieg der Expression in der Differenzierung zu sehen – bei *UCHL1* ist die Expressionssteigerung signifikant ($p = 0,03$). Bei *NCAM2* konnte keine Signifikanz ermittelt werden, da in iPSZ kaum bis gar kein *NCAM2* vorhanden ist und nur einer der drei biologischen Replikate ermittelt wurde. Dadurch kommt auch der riesige Anstieg von fast 900facher Expression in den Neuronen im Vergleich zu den iPSZ zustande. Zusammenfassend lässt sich sagen dass die Gene eine deutliche Expression in der olfaktorischen Differenzierung aufweisen, was wiederum einen Hinweis auf ORN in der Neuronen-Kultur gibt.

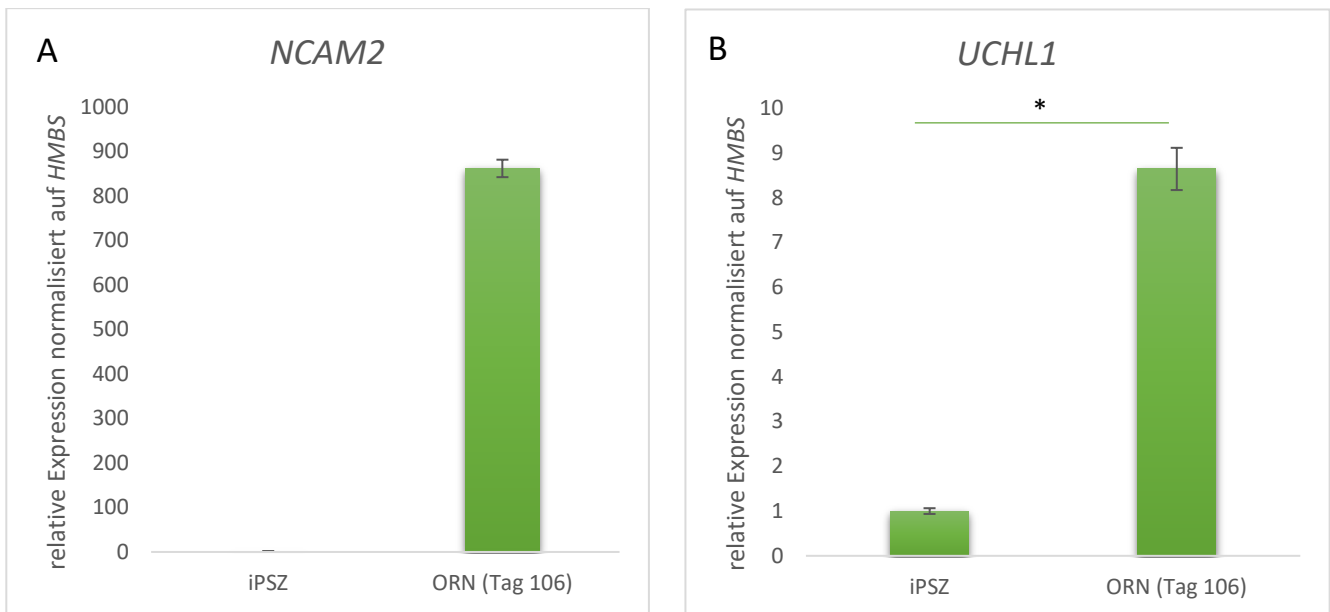


Abbildung 4.20: Relative Expression von Genen reifer ORN.

Darstellung der relativen Expression von reifen ORN Markergenen (A: *NCAM2*; B: *UCHL1*) in iPSZ und in der Neuronenkultur (ORN) an Tag 106. Als internes Referenzgen dient *HMBS*. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Signifikanz: $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***.

4.4.1.2. Expressionsverlauf der ORN-Marker-Gene

Verfolgt man die Expressionsdaten der ORN Marker über die gesamte Differenzierung kann man in einem Verlauf darstellen wie sich die Expression über die Zeit verändert. In Abbildung 4.21 sind alle drei Marker (*OMP* Blau, *UCHL1* Grün und *NCAM2* Rot) als Verlauf über neun Stadien (d = Tage), angefangen mit iPSZ, dargestellt. Bei allen Genen ist eine Steigerung zu erkennen. Am deutlichsten ist hier *NCAM2*, welches kontinuierlich bis zum Ende ansteigt, wobei hier auch von einer sehr geringen Expression in den iPSZ ausgegangen werden muss. *UCHL1* steigt nach Tag 6 an und hält ab Tag 33 das Expressionslevel relativ konstant. *OMP* hat die meisten Schwankungen, es steigt früh sehr stark an, fällt dann wieder zurück, hat sein Maximum bei Tag 70, sinkt aber am Ende wieder ab. Es ist gut zu erkennen, dass alle Gene ab den Stammzellen eine Expressionssteigerung haben und diese Tendenz bis zum Ende aufrechterhalten. Jedoch ist auch gut zu sehen, dass manche Gene schon sehr früh ansteigen und gegen Ende wieder leicht abfallen. Das kann damit zusammenhängen, dass die Zellen der Differenzierung nach so langer Zeit gestresster sind und manche Zelltypen weniger proliferieren und anteilig sogar zurückgehen, während zum Beispiel Neuroglia deutlich ihre Anzahl erhöhen.

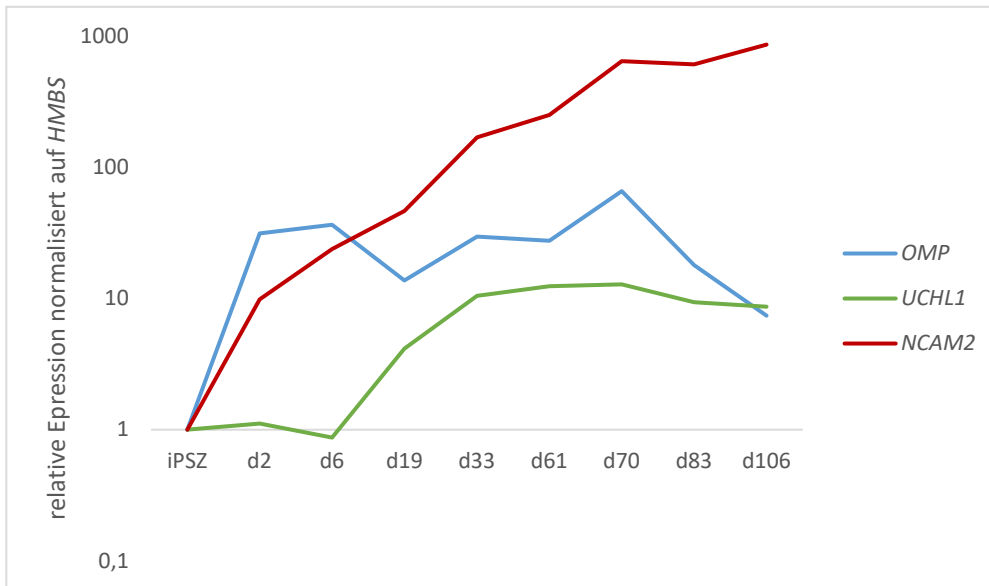


Abbildung 4.21: Expressionsverlauf der reifen ORN-Gene.

Darstellung der relativen Expression von reifen ORN Markergenen (*OMP*, *UCHL1*, *NCAM2*) in iPSZ und an acht verschiedenen Tagen der Differenzierung (d = Tag). Die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch dargestellt. Als internes Referenzgen dient *HMBS*.

4.4.1.3. Immunfluoreszenz-Färbung mit reifen ORN-Markern

Die Immunfluoreszenz-Färbung soll auf Proteinebene die Ergebnisse der qRT-PCR bestätigen. Erwartet werden einige positiv gefärbte Zellen in der differenzierten Neuronenkultur. In Abbildung 4.22 wurde UCHL1 (A) und NCAM2 (B) gefärbt. Während UCHL1 die ganze Zelle färbt, ist NCAM2 ein Protein, das an der Zell-Adhäsion in den olfaktorischen Axonen beteiligt ist und somit in der Membran der Zellen zu sehen ist. Die UCHL1 positiven Zellen sind meist bipolare Neurone und relativ häufig in der Färbung zu sehen. NCAM2 hat in Abbildung 4.22 B keine bipolare Morphologie, was aber nicht zwingend ein Ausschlusskriterium für ORN sein muss, da diese in der Zellkultur durch die fehlende Struktur des Epithels und die unterstützenden Signale der Stützzellen nicht zwangsläufig bipolare Strukturen bilden müssen.

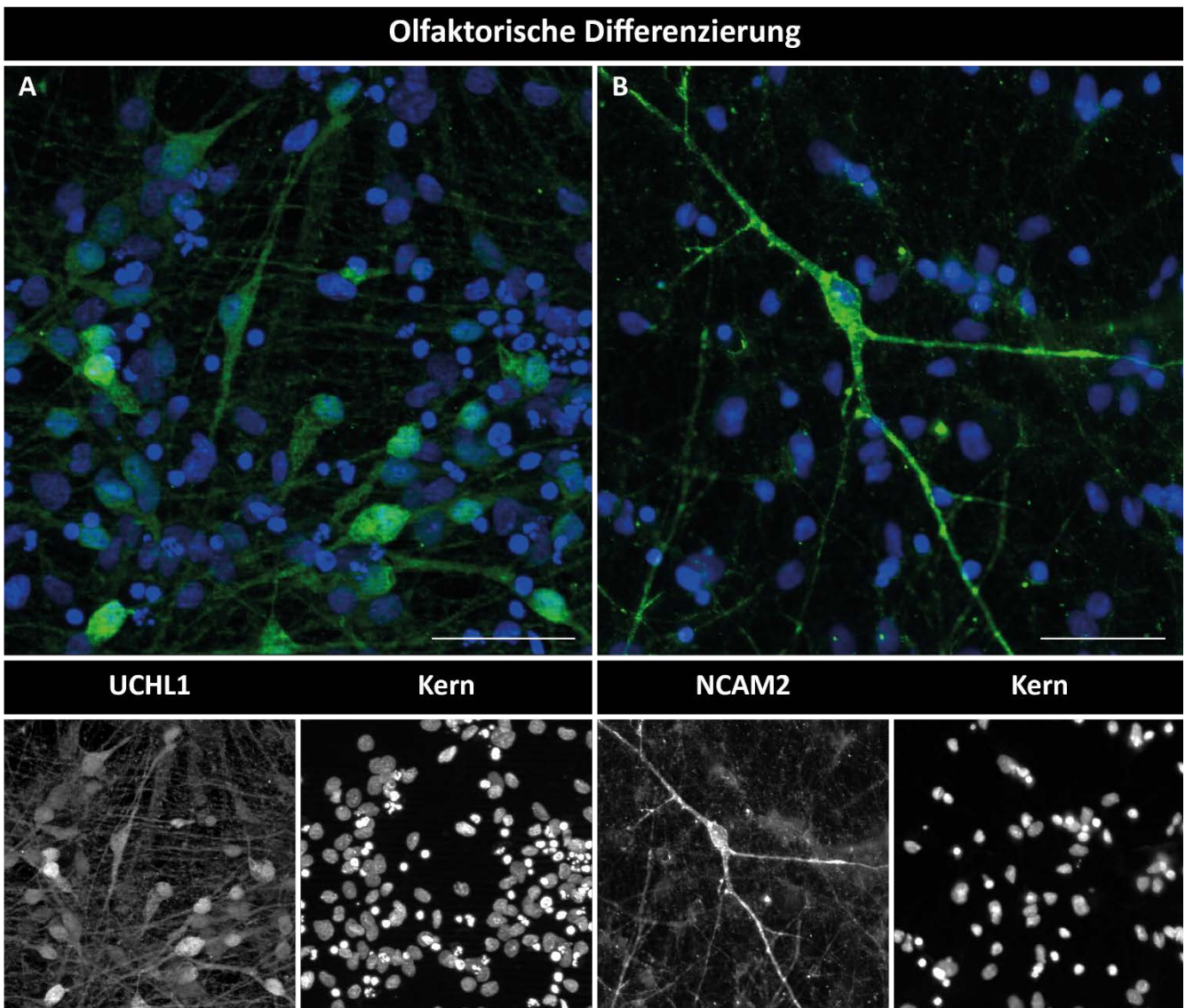


Abbildung 4.22: Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit UCHL1 und NCAM2.

Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung an Tag 95. In A wurde UCHL1 und in B wurde NCAM2 gefärbt (Grün). Zusätzlich wurde der Kern mit DAPI kenntlich gemacht (Blau). Maßstab: 50 μ m.

Betrachtet man die Doppelfärbung in Abbildung 4.23 können deutlich doppel-positive bipolare Zellen erkannt werden. Zusätzlich sind weitere UCHL1 positive Zellen (Rot) zu sehen, woraus sich schließen lässt, dass einige diese Zellen eventuell andere Neurone sind, während die doppel-positiven Zellen echte ORN zeigen.

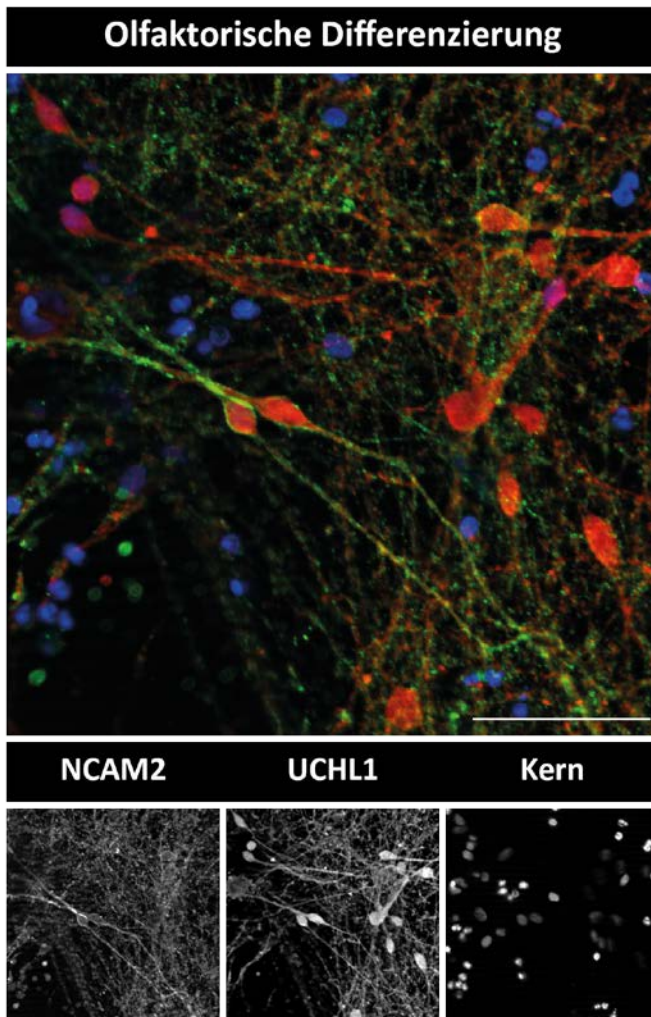


Abbildung 4.23: Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit UCHL1 und NCAM2.

Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung an Tag 95. Es wurde UCHL1 in Rot und NCAM2 in Grün gefärbt. Zusätzlich wurde der Kern mit DAPI kenntlich gemacht (Blau). Maßstab: 50 μ m.

4.4.1.4. Western Blot mit ORN-Markern

Die Daten der Immunfluoreszenz-Färbungen haben gezeigt, dass positive Zellen mit den Markern (UCHL1 und NCAM2) zu finden sind. Mit UCHL1 wurde zusätzlich ein Western Blot durchgeführt, um diese Ergebnisse zu bestätigen (Abbildung 4.24). Es wurden dieselben Proben wie bei den anderen Western Blot Analysen aufgetragen – Tag 55, 65 und 95 der Differenzierung und iPSZ. Es sind überall Banden auf der erwarteten Höhe von 25 kDa zu sehen. An Tag 55 der Differenzierung ist die Bande am schwächsten und nimmt an Tag 65 und 95 zu. Auch bei den iPSZ ist eine Bande zu sehen. Die Beta-Actin Banden zeigen eine gleichmäßige Beladung mit Protein.

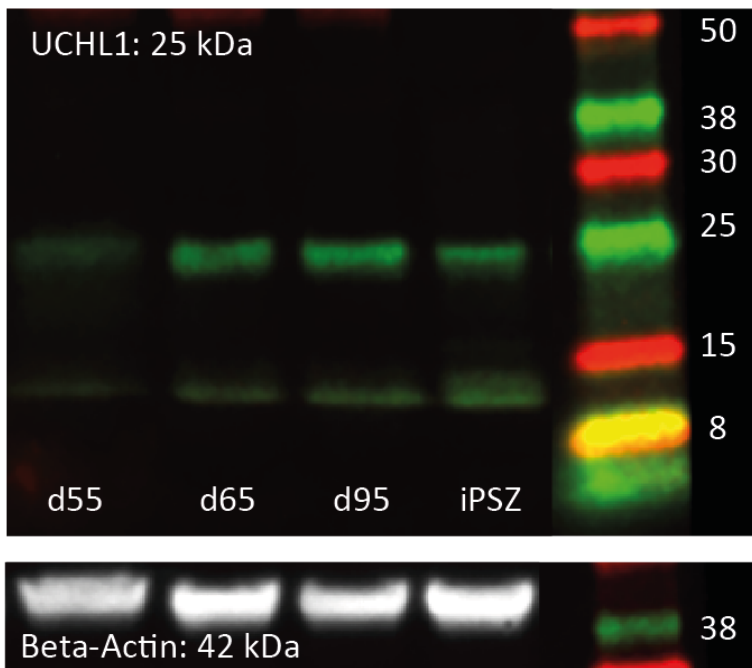


Abbildung 4.24: Western Blot mit UCHL1

Darstellung eines Western Blots mit UCHL1 (Grün) an den Tagen (d = Tag) 55, 65 und 95 der olfaktorischen Differenzierung und den iPSZ. In der unteren Zeile sieht man die Banden für Beta-Actin (Weiß) als Ladekontrolle. Aufgetragen wurden 40 μ g Protein.

4.4.1.5. FACS mit ORN-Markern

Wie schon bei OMP wurde auch mit UCHL1 und NCAM2 eine FACS-Analyse durchgeführt. Auch hier sollte ermittelt werden wie viele positiven Zellen in der Kultur zu zwei verschiedenen Zeitpunkten vorhanden sind (Tag 98 und Tag 163). Abbildung 4.25 zeigt den prozentualen Anteil von UCHL1 nach Abzug der Negativkontrolle. Im Gegensatz zu OMP sind deutlich mehr UCHL1 positive Zellen zu finden. Interessanterweise sind an Tag 98 (16,3 %, A) mehr UCHL1 positive Zellen als an Tag 163 (2,39 %, B). Das gleiche Bild zeigt sich in Abbildung 4.26, in dem die FACS-Analyse von NCAM2 dargestellt ist. Auch hier gibt es mehr positive Signale als bei OMP und an Tag 163 (29,2 %) sind weniger NCAM2 gefärbte Zellen als an Tag 98 (23,1 %).

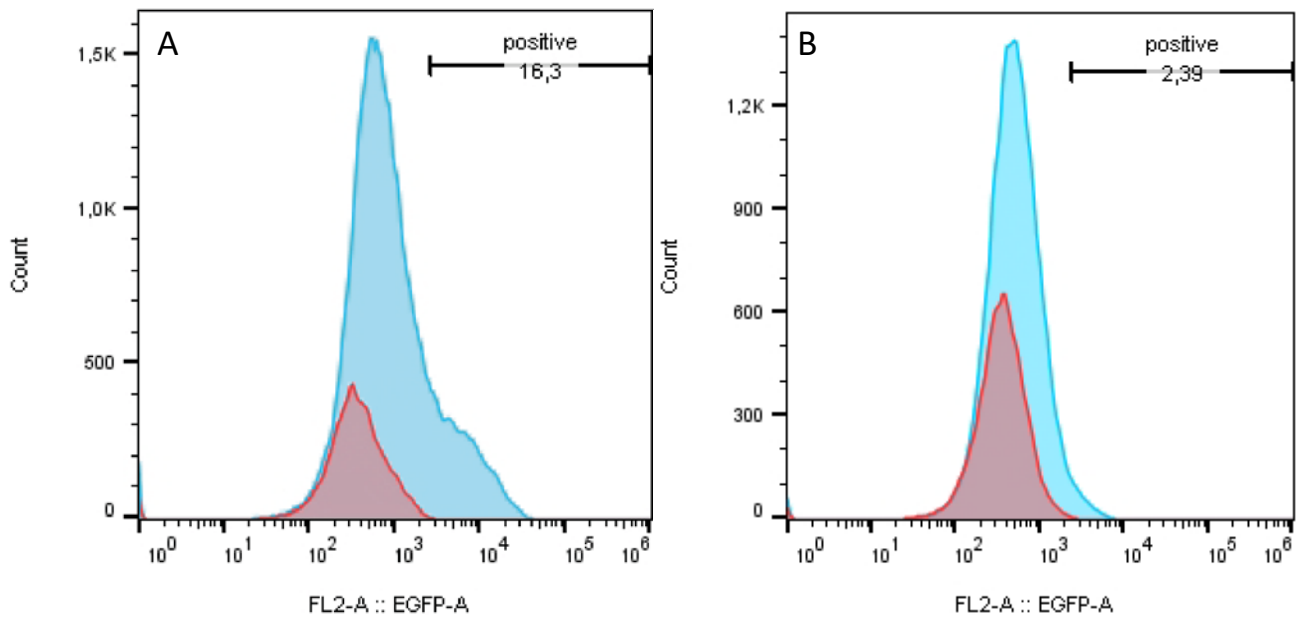


Abbildung 4.25: FACS-Analyse mit UCHL1

Darstellung der FACS-Ergebnisse mit UCHL1 an Tag 98 (A) und Tag 162 (B). Die rote Kurve zeigt die Negativkontrolle in der nur die Zellen mit dem Sekundärantikörper gemessen wurden. In Blau sind die Zellen dargestellt, die mit UCHL1 gefärbt wurden. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Zellen und die X-Achse die Fluoreszenz-Intensität. Oben rechts ist jeweils berechnet worden, wieviel Prozent der Zellen positiv sind.

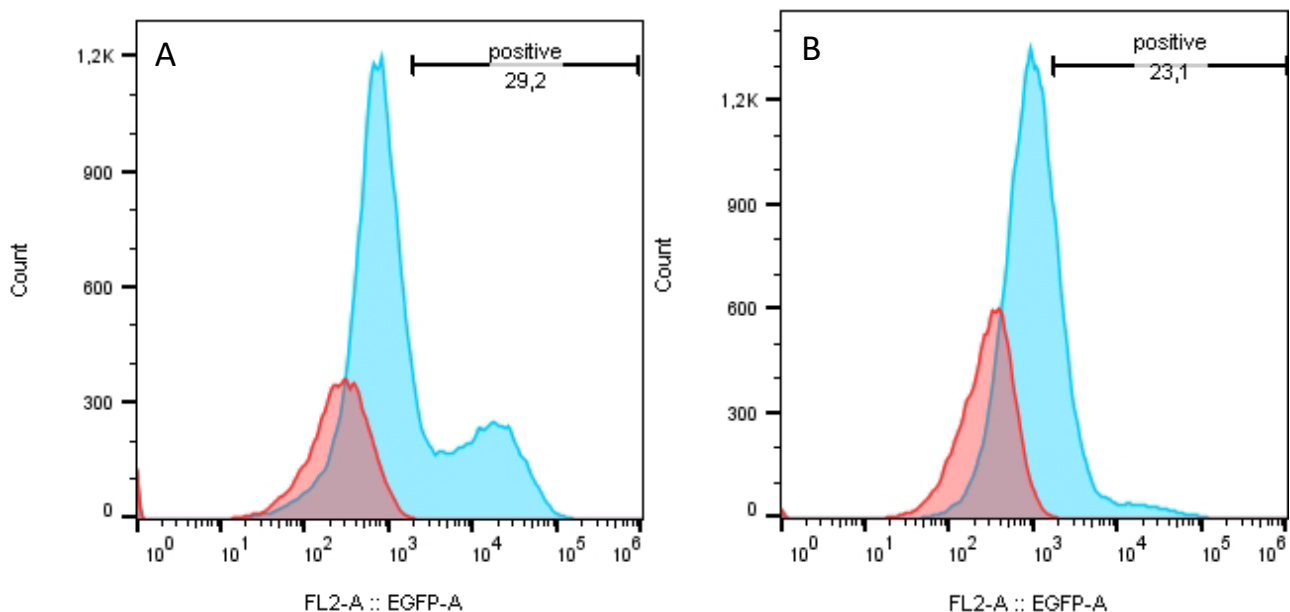


Abbildung 4.26: FACS-Analyse mit NCAM2

Darstellung der FACS-Ergebnisse mit NCAM2 an Tag 98 (A) und Tag 162 (B). Die rote Kurve zeigt die Negativkontrolle in der nur die Zellen mit dem Sekundärantikörper gemessen wurden. In Blau sind die Zellen dargestellt, die mit NCAM2 gefärbt wurden. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Zellen und die X-Achse die Fluoreszenz-Intensität. Oben rechts ist jeweils berechnet worden, wieviel Prozent der Zellen positiv sind.

4.4.2. Olfaktorische Signalkaskade

Die olfaktorische Signalkaskade wird gestartet sobald ein Odorant an den OR bindet. Die OR gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren und das assoziierte G-Protein (GOLF) ist spezifisch im olfaktorischen System und nur einigen wenigen anderen Regionen zu finden. Weitere Elemente der Signalkaskade, wie die Adenylat-Cyclase 3 (ADCY3) und der Kalzium-abhängige Chlorid-Kanal TMEM16B kommen fast ausschließlich in ORN vor. Deshalb wurden diese Vertreter ausgewählt, um einerseits die ORN in der Differenzierung, zusätzlich zu den anderen Markern, zu identifizieren. Andererseits bedeutet das Vorhandensein von Proteinen, die an der olfaktorischen Signalkaskade beteiligt sind, dass die ORN das Potential besitzen nach einer Odorantenbindung eine Signalkaskade auszulösen. Auch hier wurden zunächst die RNA-Daten analysiert, gefolgt von den Ergebnissen der Protein-Analyse.

4.4.2.1. Expressionsdaten von Genen der olfaktorischen Signalkaskade

Die qRT-PCR Daten der Signalkaskaden-Gene zeigen eine deutliche Expressionssteigerung bei *ADCY3* und *GOLF* an Tag 106 der olfaktorischen Differenzierung (Abbildung 4.27). Dabei ist der Anstieg im Vergleich zu den iPSZ bei *GOLF* signifikant. *TMEM16B* wurde ebenfalls gemessen, jedoch konnte hier in den Stammzellen keine Expression gemessen werden und in der Differenzierung nur sehr gering und nur an manchen Zeitpunkten, wodurch eine grafische Darstellung nicht möglich war. Entweder exprimieren die ORN in der Differenzierung wenig *TMEM16B*, eventuell, weil sie noch nicht reif genug sind, oder es gibt zu wenige ORN in der Zellkultur um eine ausreichende Expression von *TMEM16B* detektieren zu können.

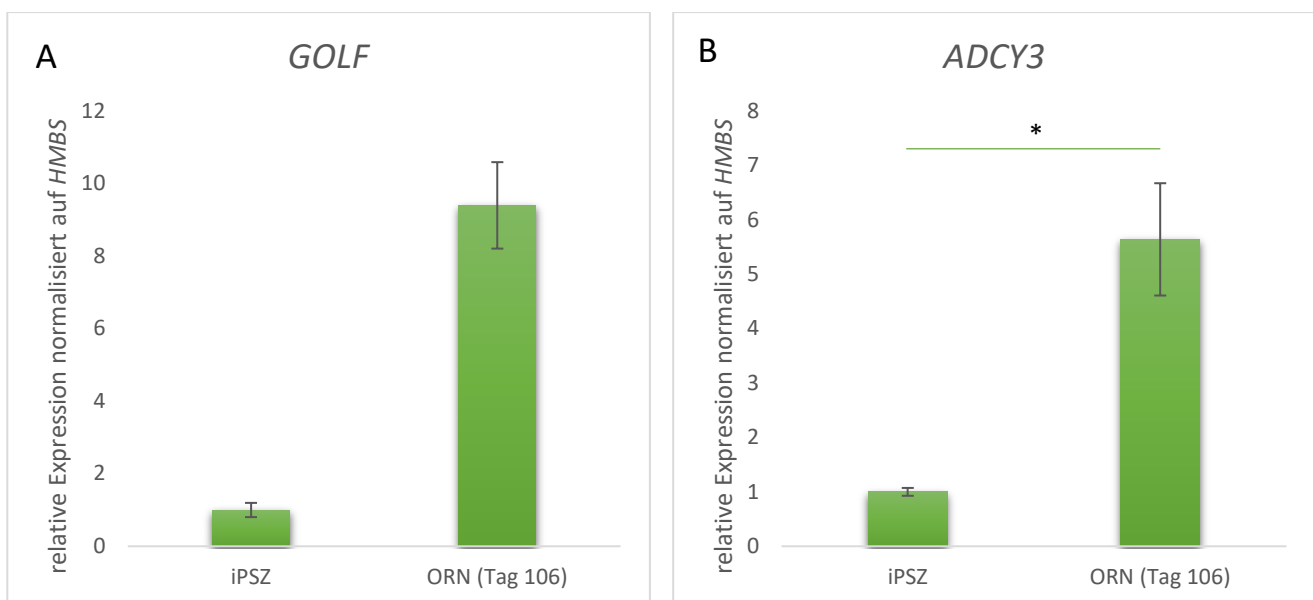


Abbildung 4.27: Relative Expression von *GOLF* und *ADCY3*.

Darstellung der relativen Expression von Genen der olfaktorischen Signalkaskade (A: *ADCY3*; B: *GOLF*) in iPSZ und in der Neuronenkultur (ORN) an Tag 106. Als internes Referenzgen dient *HMBS*. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Signifikanz: $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***.

4.4.2.2. Expressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Signalkaskade

Im Verlauf erkennt man auch bei den beiden Signalkaskaden-Genen *GOLF* und *ADCY3* einen kontinuierlichen Anstieg über die Zeit (Abbildung 4.28). *GOLF* hat seinen Höhepunkt schon an Tag 33 und fällt dann wieder leicht ab, während *ADCY3* einen konstanten Anstieg bis Tag 106 aufweist.

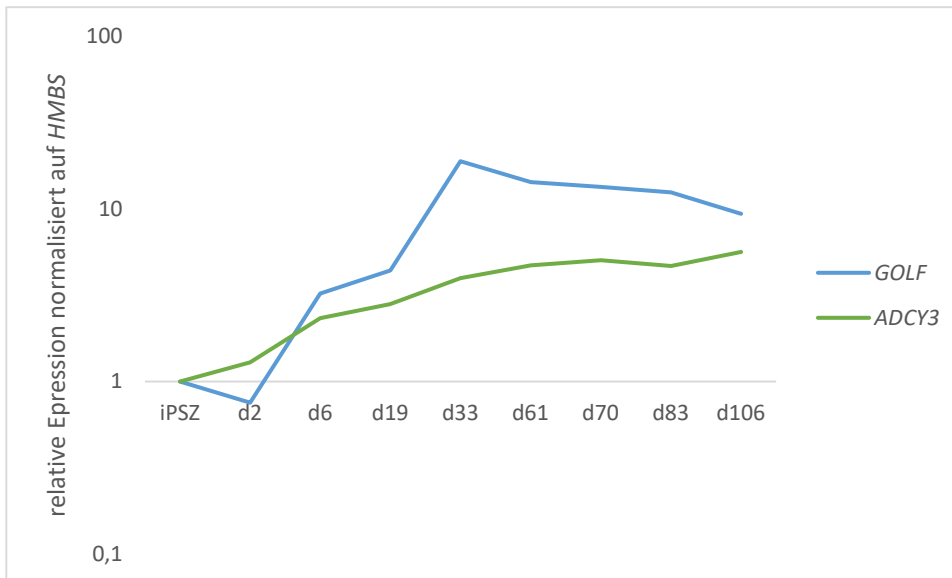


Abbildung 4.28: Expressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Signalkaskade.

Darstellung der relativen Expression von Genen der olfaktorischen Signalkaskade (*GOLF* und *ADCY3*) in iPSZ und an acht verschiedenen Tagen der Differenzierung (d = Tag). Die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch dargestellt. Als internes Referenzgen dient *HMBS*.

4.4.2.3. Immunfluoreszenz-Färbung von Markern der olfaktorischen Signalkaskade

In der Immunfluoreszenz-Färbung der Akteure der olfaktorischen Signalkaskade zeigt sich ein anderes Bild als die RNA-Daten vermuten lassen. *GOLF* konnte nachgewiesen werden, jedoch nicht *ADCY3*, die in der qRT-PCR deutlich exprimiert worden ist. *TMEM16B* wiederum konnte gefärbt werden, obwohl nur eine geringe Menge RNA ermittelt wurde. In Abbildung 4.29 ist die Färbung von *GOLF* (A) und *TMEM16B* (B) zu sehen. Beide sind mit OMP (rot) ko-gefärbt. Die Färbung von *GOLF* ist im Cytosol von Zellen zu erkennen, die nicht OMP positiv sind. Das wirft zwei Fragen auf: Sollte *GOLF* nicht wie bei der olfaktorischen Biopsie in den Dendriten zu erkennen sein und warum ist es nicht in den OMP-positiven Zellen zu sehen? Darauf gibt es mehrere mögliche Antworten. Zunächst mal ist es möglich, dass *GOLF* in der Zellkultur nicht in die Dendriten transportiert wird, sondern sich nur im Zellkörper verteilt, da dort auch die OR lokalisiert sind. Diese werden möglicherweise überall in der Membran verteilt, weil sie keine Signale aus der olfaktorischen Mukosa erhalten. Weiterhin ist es möglich, dass einige Zellen in der Neuronenkultur ebenfalls *GOLF* synthetisieren, da es in wenigen nicht-olfaktorischen Regionen ebenfalls vorkommt. *TMEM16B* hingegen besitzt eine eindeutige Ko-Lokalisierung mit OMP (Abbildung 4.29 B). Auffallend sind dabei die relativ großen Ausläufer der OMP-positiven Zellen, die mit einzelnen Chlorid-Kanälen besetzt sind.

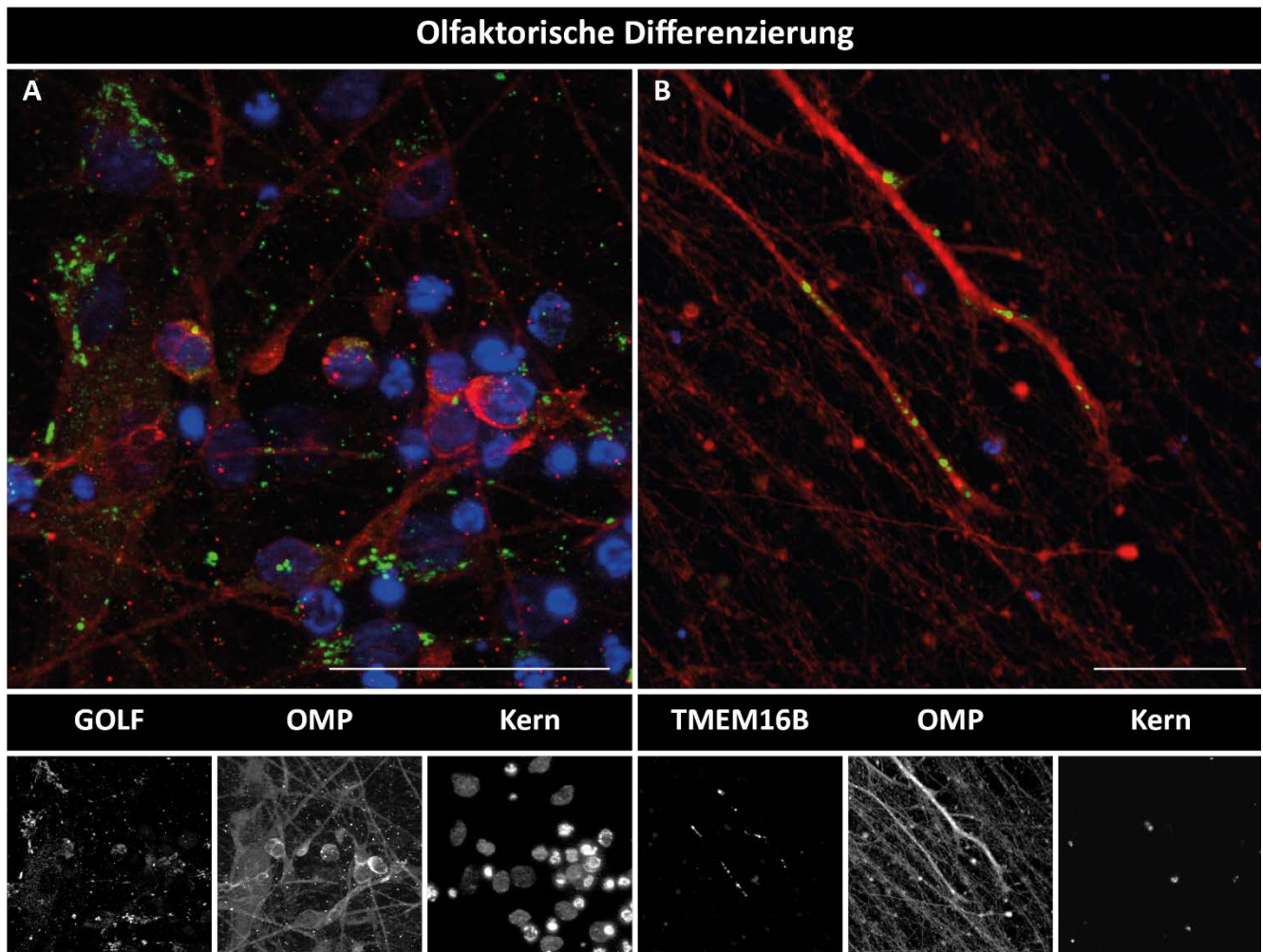


Abbildung 4.29: Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit GOLF und TMEM16B.

Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung an Tag. In A wurde GOLF (Grün) und OMP (Rot) gefärbt. In B wurde TMEM16B (Grün) und OMP (rot) gefärbt. Zusätzlich wurde der Kern mit DAPI kenntlich gemacht (Blau). Maßstab: 50 μm .

4.4.2.4. Western Blot mit Markern der olfaktorischen Signalkaskade

GOLF als einer der wichtigsten Bestandteile der olfaktorischen Signalkaskade wurde ebenfalls in einem Western Blot versucht zu detektieren. In Abbildung 4.30 sind Proben von iPSZ und der olfaktorischen Differenzierung an drei Zeitpunkten aufgetragen. Im Gegensatz zu den erwarteten Banden bei ca. 44 kDa sind in den Differenzierungsproben nur Banden in der Höhe von fast 70 kDa zu sehen.

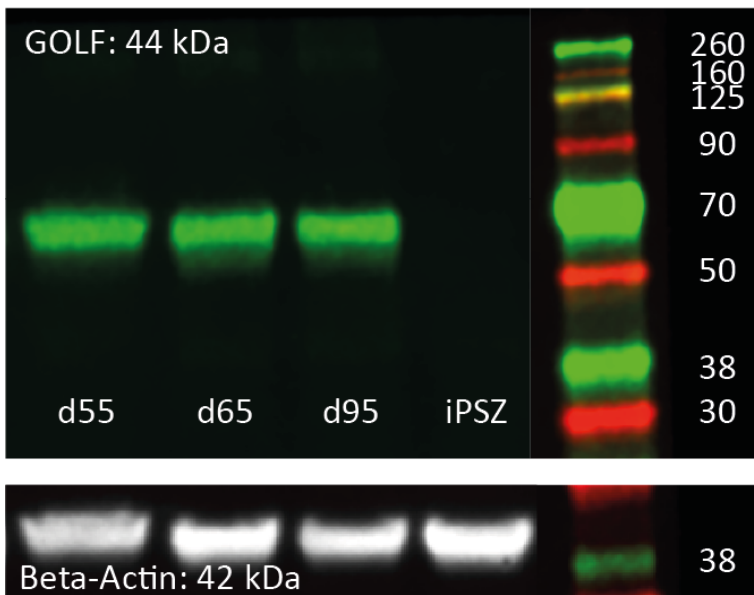


Abbildung 4.30: Western Blot mit GOLF.

Darstellung eines Western Blots mit GOLF (Grün) an den Tagen (d = Tag) 55, 65 und 95 der olfaktorischen Differenzierung und den iPSZ. In der unteren Zeile sieht man die Banden für Beta-Actin (Weiß) als Ladekontrolle. Aufgetragen wurden 40 µg Protein.

4.4.2.5. FACS-Analyse mit Markern der olfaktorischen Signalkaskade

In der FACS-Analyse der Marker der olfaktorischen Signalkaskade, wurden GOLF (Abbildung 4.31) und TMEM16B (Abbildung 4.32) gemessen. Bei GOLF wurden zwei Zeitpunkte der olfaktorischen Differenzierung analysiert. An Tag 98 konnten 58,5 % GOLF-positive Zellen gezählt werden (Abbildung 4.31 A), während an Tag 162 nur noch 4,8 % positive Zellen ermittelt werden konnten (Abbildung 4.31 B). In Abbildung 4.32 sind die TMEM16B-positiven Zellen an Tag 162 der Differenzierung gezeigt. Es konnten 13,2 % positive Zellen ermittelt werden.

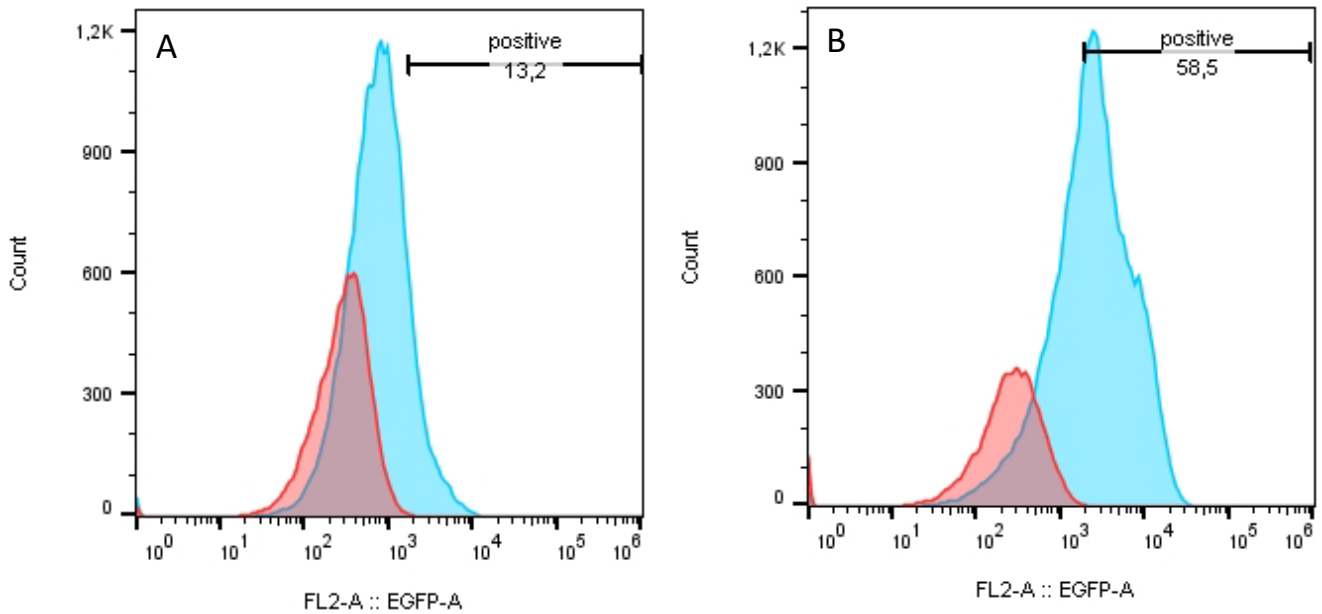


Abbildung 4.31: FACS-Analyse mit GOLF

Darstellung der FACS-Ergebnisse mit GOLF an Tag 98 (A) und Tag 162 (B). Die rote Kurve zeigt die Negativkontrolle in der nur die Zellen mit dem Sekundärantikörper gemessen wurden. In Blau sind die Zellen dargestellt, die mit GOLF gefärbt wurden. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Zellen und die X-Achse die Fluoreszenz-Intensität. Oben rechts ist jeweils berechnet worden, wieviel Prozent der Zellen positiv sind.

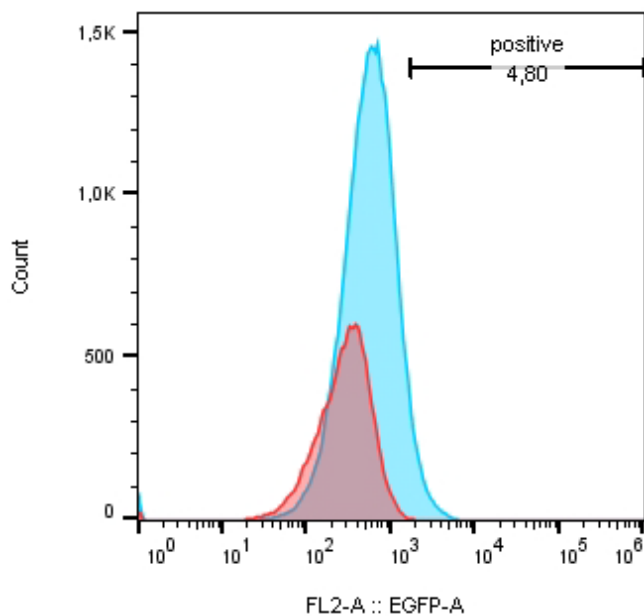


Abbildung 4.32: FACS-Analyse mit TMEM16B

Darstellung der FACS-Ergebnisse mit TMEM16B an Tag 162. Die rote Kurve zeigt die Negativkontrolle in der nur die Zellen mit dem Sekundärantikörper gemessen wurden. In Blau sind die Zellen dargestellt, die mit TMEM16B gefärbt wurden. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Zellen und die X-Achse die Fluoreszenz-Intensität. Oben rechts ist berechnet worden, wieviel Prozent der Zellen positiv sind.

4.5. Weitere olfaktorische Zellen *in vitro*

Nachdem die ORN *in vitro* angeschaut wurden, werden in diesem Abschnitt die Ergebnisse der nicht-neuronalen Zelltypen gezeigt, die ebenfalls im OE vorkommen, aber keine reifen ORN sind. Dazu zählen die Basalzellen, die Vorläuferzellen und die Stützzellen.

4.5.1. Olfaktorische Basalzellen

Die olfaktorischen Basalzellen dienen der Regeneration aller olfaktorischen Zellen im Riechepithel. Es gibt zwei Arten von olfaktorischen Basalzellen, die horizontalen Basalzellen (HBZ) und die globosen Basalzellen (GBZ). Es ist noch nicht ganz geklärt, welcher Basalzellentyp für welche Zelle verantwortlich ist. Es gibt Hinweise, dass die HBZ Ursprung der Stützzellen und der olfaktorischen Drüsen sind, während die GBZ die olfaktorischen Vorläuferpopulationen und damit auch die ORN erschaffen. Jedoch wird vermutet, dass die GBZ aus den HBZ hervorgehen, die dadurch den Ursprung aller Zellen des OE darstellen. Es wurden Marker benutzt die beide Basalzelltypen identifizieren (SOX2 und NGFR).

4.5.1.1. Expressionsdaten von Genen der olfaktorischen Basalzellen

Die qRT-PCR Daten von SOX2 zeigen einen signifikanten Anstieg der Expression in der olfaktorischen Differenzierung (Abbildung 4.33 A). *NGFR*, bei dem zwar eine deutliche Erhöhung zu sehen ist, zeigt keine Signifikanz (Abbildung 4.33 B). Während die Expression von SOX2 an Tag 106 ermittelt wurde, ist *NGFR* an Tag 121 einer anderen Differenzierung gemessen worden, da an Tag 106 keine *NGFR* Daten vorlagen. Es ist also festzuhalten, dass beide Gene erwartungsgemäß am Ende der Differenzierung eine verstärkte Expression aufweisen. In Kombination deutet das auf das Vorkommen von olfaktorischen Basalzellen in der Zellkultur hin. Jedoch ist vor allem SOX2 auch ein Gen, dass in anderen Stammzellen und Vorläufern von Neuronen vorkommt. Unter anderem auch in olfaktorischen Stützzellen. *NGFR* (Nerve Growth Factor Receptor) ist ebenfalls, wie der Name schon sagt, ein neuronenspezifisches Gen, dass in den olfaktorischen Basalzellen zwar vorkommt, jedoch nicht ausschließlich.

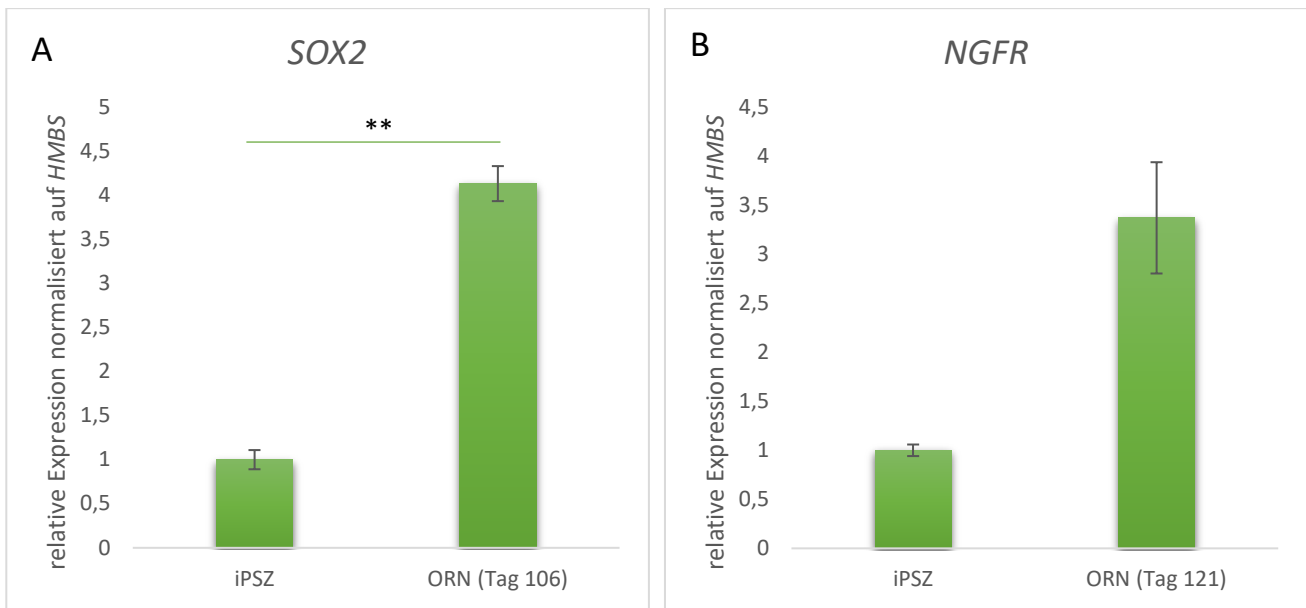


Abbildung 4.33: Relative Expression von *SOX2* und *NGFR*.

Darstellung der relativen Expression von Genen der olfaktorischen Basalzellen (A: *SOX2*; B: *NGFR*) in iPSZ und in der Neuronenkultur (ORN) an Tag 106 (*SOX2*) und Tag 121 (*NGFR*). Als internes Referenzgen dient *HMBS*. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Signifikanz: $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***.

4.5.1.2. Expressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Basalzellen

Betrachtet man den Verlauf der Basalzell-Marker sieht man auch hier einen kontinuierlichen Anstieg der gegen Ende etwas abfällt. *SOX2* ist etwas unbeständiger als *NGFR*. Möglicherweise liegt das daran, dass *SOX2* in anderen Zelltypen ebenfalls exprimiert wird und je nachdem wieviel Zellen mit *SOX2* Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten vorhanden sind, schwankt auch die *SOX2* Expression.

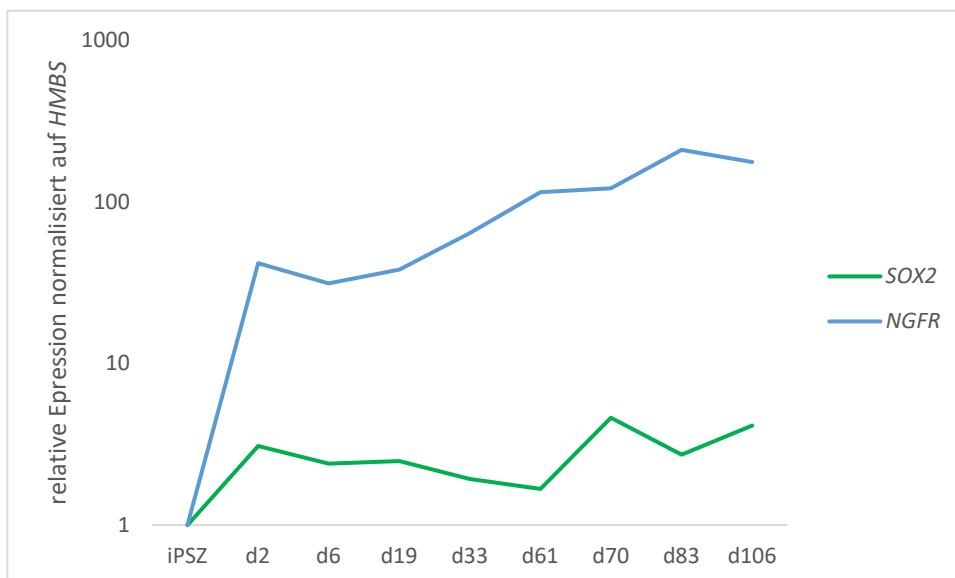


Abbildung 4.34: Expressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Basalzellen.

Darstellung der relativen Expression von Genen der olfaktorischen Basalzellen (*SOX2* und *NGFR*) in iPSZ und an acht verschiedenen Tagen der Differenzierung (d = Tag). Die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch dargestellt. Als internes Referenzgen dient *HMBS*.

4.5.1.3. Immunfluoreszenz-Färbung von Markern der olfaktorischen Basalzellen

In Abbildung 4.35 wurde SOX2 (grün) und NGFR (grün) zusammen mit TUBB3 (rot) gefärbt. SOX2 (A) ist zwischen den TUBB3 positiven Neuronen deutlich als Kernfärbung zu erkennen. Ob die gefärbten Zellen jedoch olfaktorische Basalzellen, olfaktorischen Stützzellen oder andere neuronale Vorläufer sind, ist hier nicht zu erkennen. NGFR färbt ebenfalls Zellen die nicht TUBB3 positiv sind, jedoch wird der Rezeptor punktuell in den Zellen erkannt, nicht im Zellkern wie bei den Transkriptionsfaktor SOX2. Auch hier ist es schwierig nachzuweisen, ob es sich um olfaktorische Basalzellen handelt oder um andere neuronale Zellen mit NGFR. Dazu sind weitere Analysen und Ko-Färbungen mit weiteren Markern notwendig.

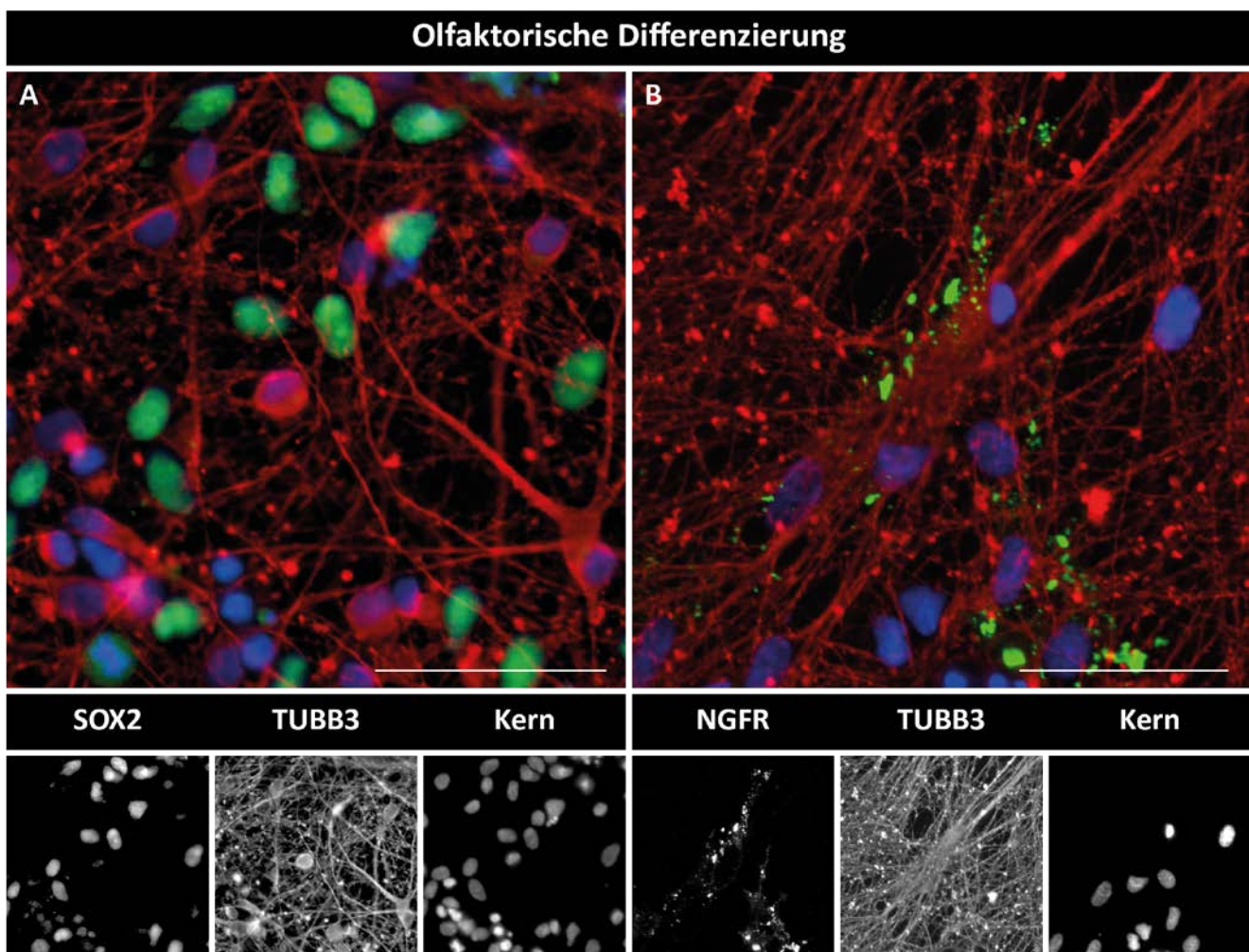


Abbildung 4.35: Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit SOX2 und NGFR.

Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung an Tag. In A wurde SOX2 (Grün) und TUBB3 (Rot) gefärbt. In B wurde NGFR (Grün) und TUBB3 (rot) gefärbt. Zusätzlich wurde der Kern mit DAPI kenntlich gemacht (Blau). Maßstab: 50 µm.

4.5.2. Olfaktorische Vorläuferzellen

Die Basalzellen sind der Ursprung aller Zellen im OE. Auch die ORN entwickeln sich aus den Basalzellen. Bevor sie jedoch reife, funktionelle ORN werden, durchlaufen sie verschiedene Vorläuferstadien, die durch bestimmte Marker gezeigt werden können. Zum besseren Verständnis wird die Vorläufergruppen in frühe Vorläufer und späte Vorläufer eingeteilt. Ein sehr früher Marker ist der Transkriptionsfaktor *ASCL1*, der teilweise auch noch in GBZ aber eben auch in frühen Vorläufern vorkommt. Ein späterer Marker für olfaktorische Vorläufer und auch für unreife ORN ist das Kalzium-bindende Protein Calbindin 2 (*CALB2*). *TUBB3* ist ebenfalls ein Marker der Vorläufer oder unreife ORN färbt, jedoch färbt *TUBB3* auch alle anderen Neurone und ist deshalb im Identifizieren von olfaktorischen Vorläufern oder ORN nicht zu verwenden.

4.5.2.1. Expressionsdaten von Genen der olfaktorischen Vorläuferzellen

Die Expressionsdaten zeigen eine deutliche Erhöhung in der Differenzierung an Tag 121 (Abbildung 4.36). *ASCL1* hat im Vergleich zu den iPSZ eine mehr als 1000fach höhere Expression (Abbildung 4.36 A). Jedoch ist das auf die niedrige, bis nicht vorhandene *ASCL1*-Expression in den iPSZ zurückzuführen. Betrachtet man die CT-Werte der qRT-PCR liegen diese bei der Differenzierung im normalen mittleren Bereich. *CALB2* zeigt eine signifikante Erhöhung der Expression in der Neuronenkultur (Abbildung 4.36 B). Die Expression der beiden Gene deutet darauf hin, dass olfaktorische Vorläufer verschiedenen Alters, bzw. ORN unterschiedlicher Reife in der Zellkultur enthalten sein können.

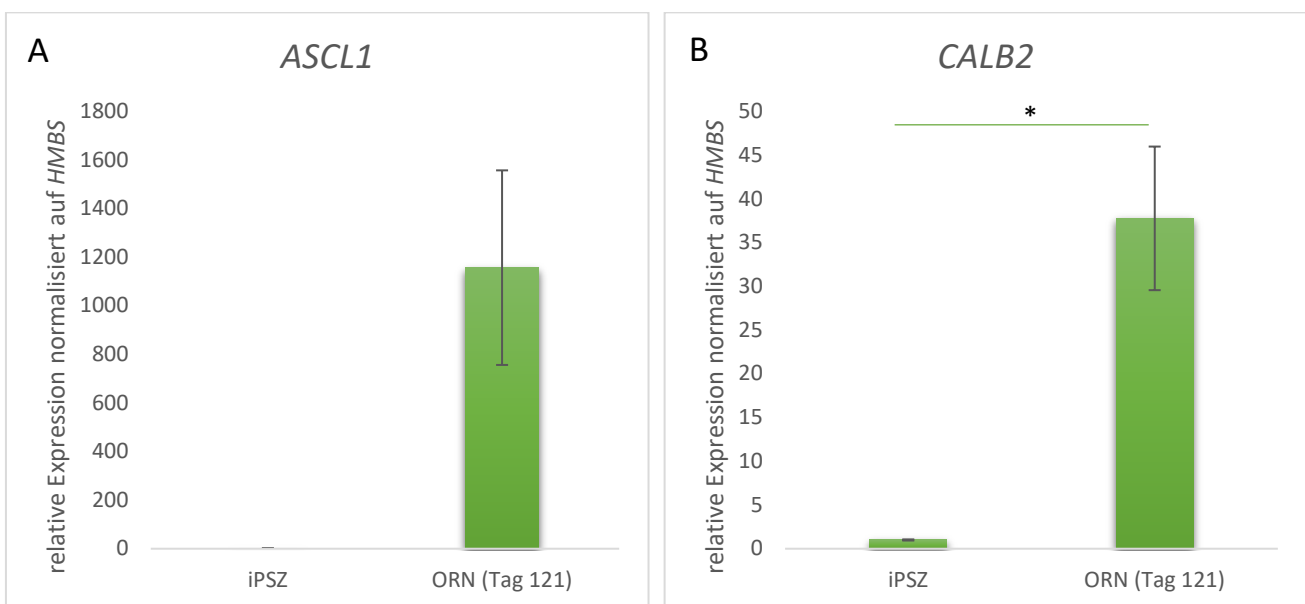


Abbildung 4.36: Relative Expression von *ASCL1* und *CALB2*.

Darstellung der relativen Expression von Genen der olfaktorischen Vorläuferzellen (A: *ASCL1*; B: *CALB2*) in iPSZ und in der Neuronenkultur (ORN) an Tag 106. Als internes Referenzgen dient *HMBS*. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Signifikanz: $p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***.

4.5.2.2. Expressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Vorläuferzellen

In Abbildung 4.37 wird der Verlauf der beiden Vorläufergene gezeigt. Hier wurden die Werte nicht auf iPSZ bezogen, da die Gene dort nicht exprimiert wurden. *CALB2* zeigt einen kontinuierlich wachsenden Anstieg mit Höhepunkt am letzten Tag 106. *ASCL1* hingegen steigt relativ früh, an Tag 6 schon stark an, fällt aber gegen Ende an Tag 83 und 106 wieder deutlich ab. Das zeigt, dass die *ASCL1* Expression in der Differenzierung viel früher startet, was auch zu erwarten ist, da *ASCL1* die frühen Vorläufer markiert, während *CALB2* die späten Vorläufer und unreifen ORN anfärbt.

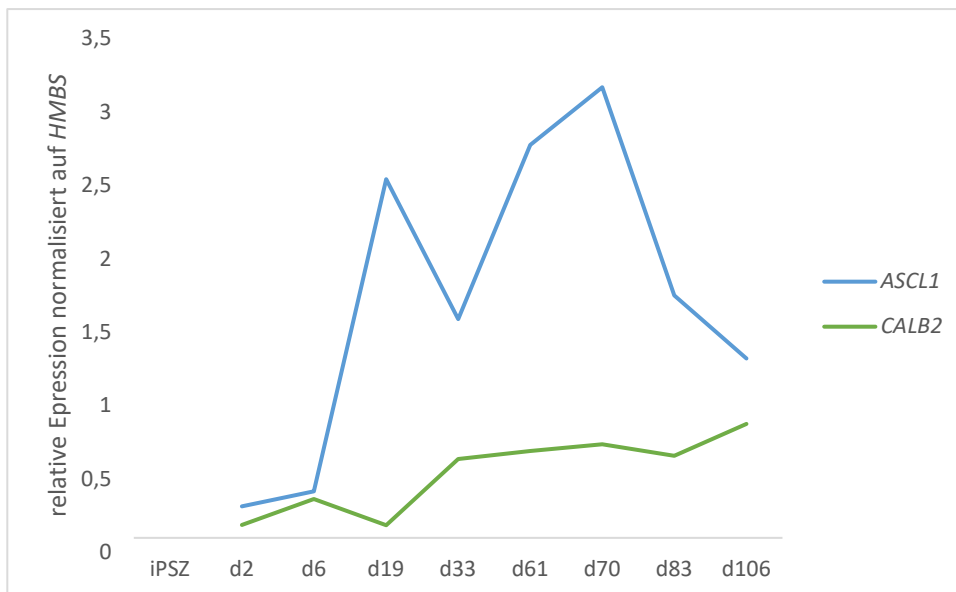


Abbildung 4.37: Expressionsverlauf von Genen der olfaktorischen Vorläuferzellen.

Darstellung der relativen Expression von Genen der olfaktorischen Vorläufer (*ASCL1* und *CALB2*) in iPSZ und an acht verschiedenen Tagen der Differenzierung (d = Tag). Die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch dargestellt. Als internes Referenzgen dient *HMBS*.

4.5.2.3. Immunfluoreszenz-Färbung von Markern der olfaktorischen Vorläuferzellen

Abbildung 4.38 zeigt die Färbung der olfaktorischen Differenzierung mit *ASCL1* und *CALB2* zusammen mit OMP. Es ist sehr schön zu erkennen, dass die *ASCL1*-positiven Vorläuferzellen erwartungsgemäß nicht mit OMP ko-lokalisieren (Abbildung 4.38 A). Der Transkriptionsfaktor ist eindeutig im Kern lokalisiert. *CALB2* hingegen färbt die komplette Zelle, wodurch schon die Struktur der späteren ORN zu erkennen ist. In Abbildung 4.38 B ist außerdem zu sehen, dass zusätzlich zu den allein *CALB2*-positiven Zellen auch Neurone zu sehen sind, die OMP und *CALB2* besitzen. Das könnten frühe reife ORN sein, die immer noch *CALB2* exprimieren, aber auch schon OMP.

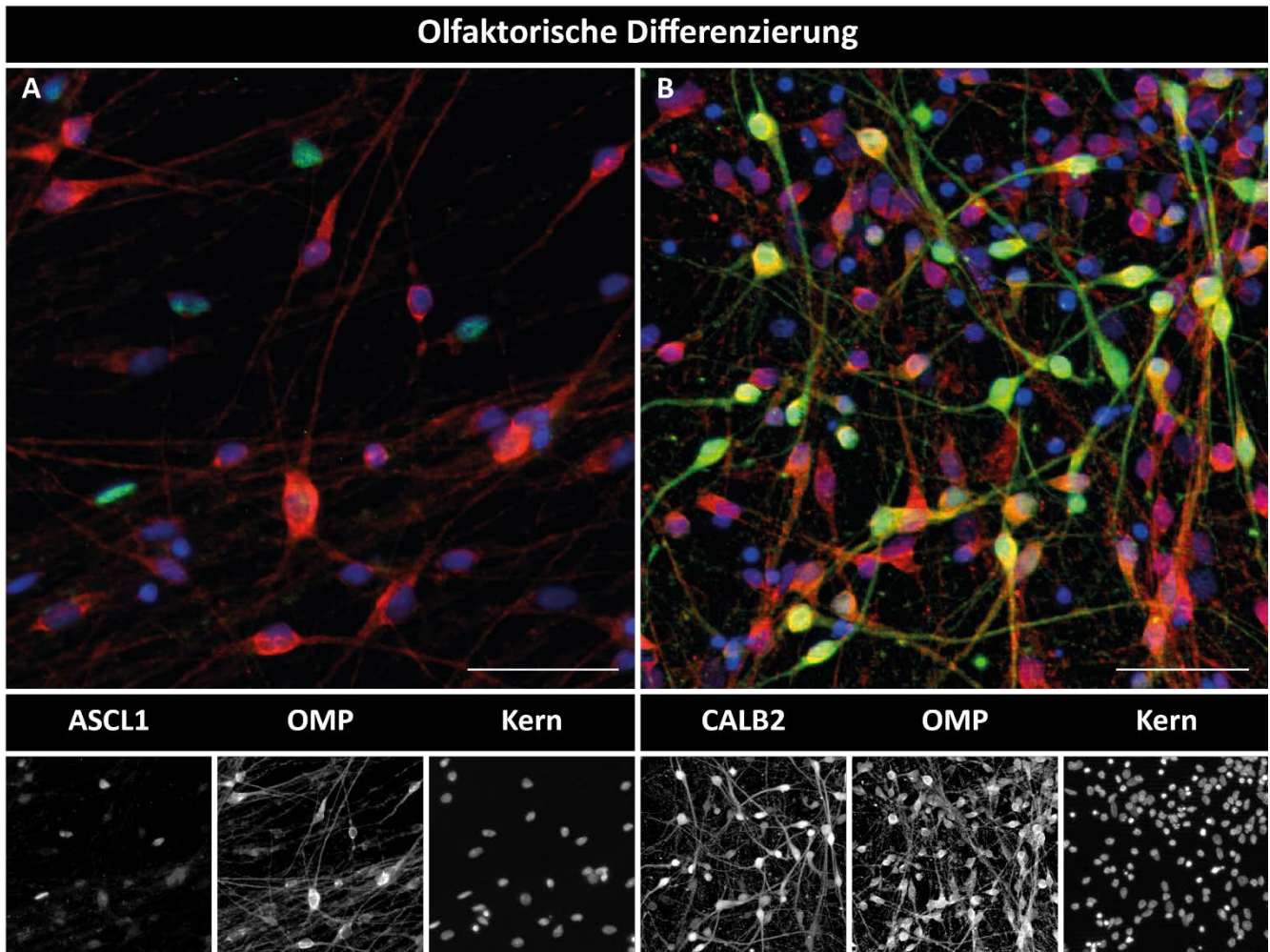


Abbildung 4.38: Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit ASCL1 und CALB2.

Immunfluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung an Tag. In A wurde ASCL1 (Grün) und OMP (Rot) gefärbt. In B wurde CALB2 (Grün) und OMP (Rot) gefärbt. Zusätzlich wurde der Kern mit DAPI kenntlich gemacht (Blau). Maßstab: 50 μm .

In der Abbildung 4.39 wurde CALB2 mit ASCL1 zusammen gefärbt. Es gibt hier keinerlei Überlappung der Färbungen, was bedeutet, dass die Marker wirklich verschiedene Vorläuferpopulationen anfärben. Auch hier die Neuronenstruktur in den CALB2 positiven Zellen zu erkennen, während sich die ASCL1 Färbung auf den Zellkern beschränkt.

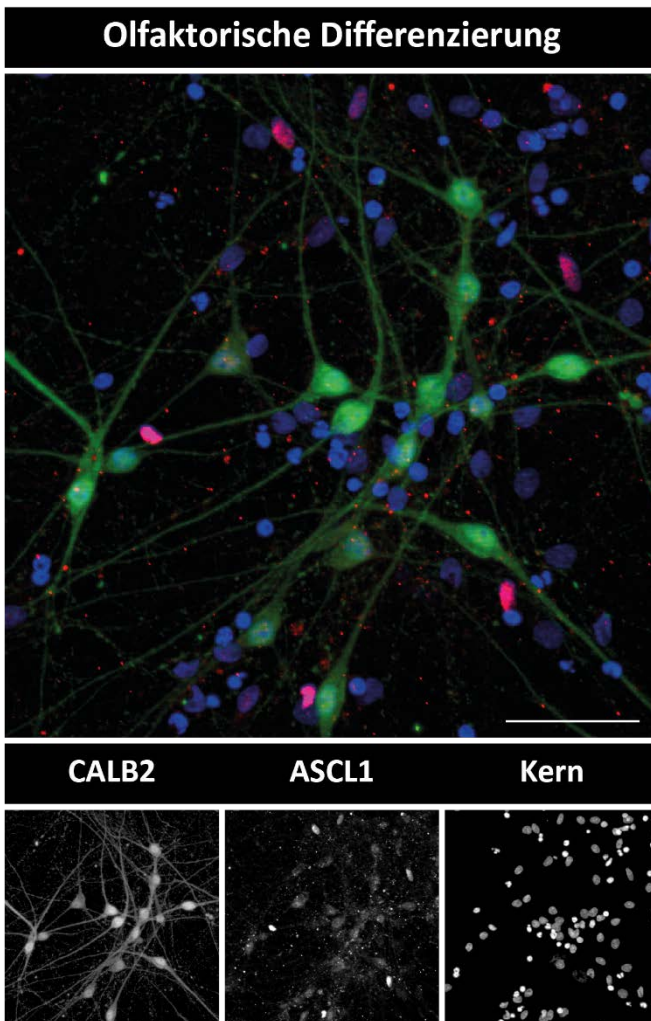


Abbildung 4.39: Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit ASCL1 und CALB2.

Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung an Tag. Es wurde ASCL1 in Rot und CALB2 in Grün gefärbt. Zusätzlich wurde der Kern mit DAPI kenntlich gemacht (Blau). Maßstab: 50 μm .

4.5.3. Stützzellen

Die Stützzellen dienen im OE als Unterstützer, sowohl in stabilisierender Art und Weise, als auch in metabolischer Funktion. Ob die Stützzellen in der olfaktorischen Differenzierung ebenfalls gebraucht werden, bzw. überhaupt vorhanden sind, ist in der Abbildung 4.40 zu sehen. Es wurde SOX2 (grün) und E-Cadherin (ECAD, rot) in A und ECAD (grün) und TUBB3 (rot) in B gefärbt. SOX2 ist ebenfalls ein Marker für Stützzellen, kommt aber auch in anderen Zellen vor, wie zum Beispiel olfaktorische Basalzellen (s.o.) und andere neuronale Vorläufer. Da in Abbildung 4.40 A ECAD und SOX2 nicht kolokalisieren, kann davon ausgegangen werden, dass die SOX2-positiven Zellen eventuell Basalzellen sind, oder aber andere neuronale Vorläuferzellen. ECAD ist in der olfaktorischen Differenzierung interessanter Weise im Kern lokalisiert, obwohl das Protein für Zell-Zellkontakte in der Biopsie des OE in der Membran der Zellen zu erkennen ist. In Abbildung 4.40 B ist zu sehen, dass ECAD in TUBB3 positiven Zellen zu sehen ist. Das bedeutet, entweder exprimieren ein Teil der Neurone ECAD, oder die Stützzellen haben auch TUBB3, was nicht abwegig ist, da auch die Stützzellen aus den olfaktorischen Basalzellen hervorgehen.

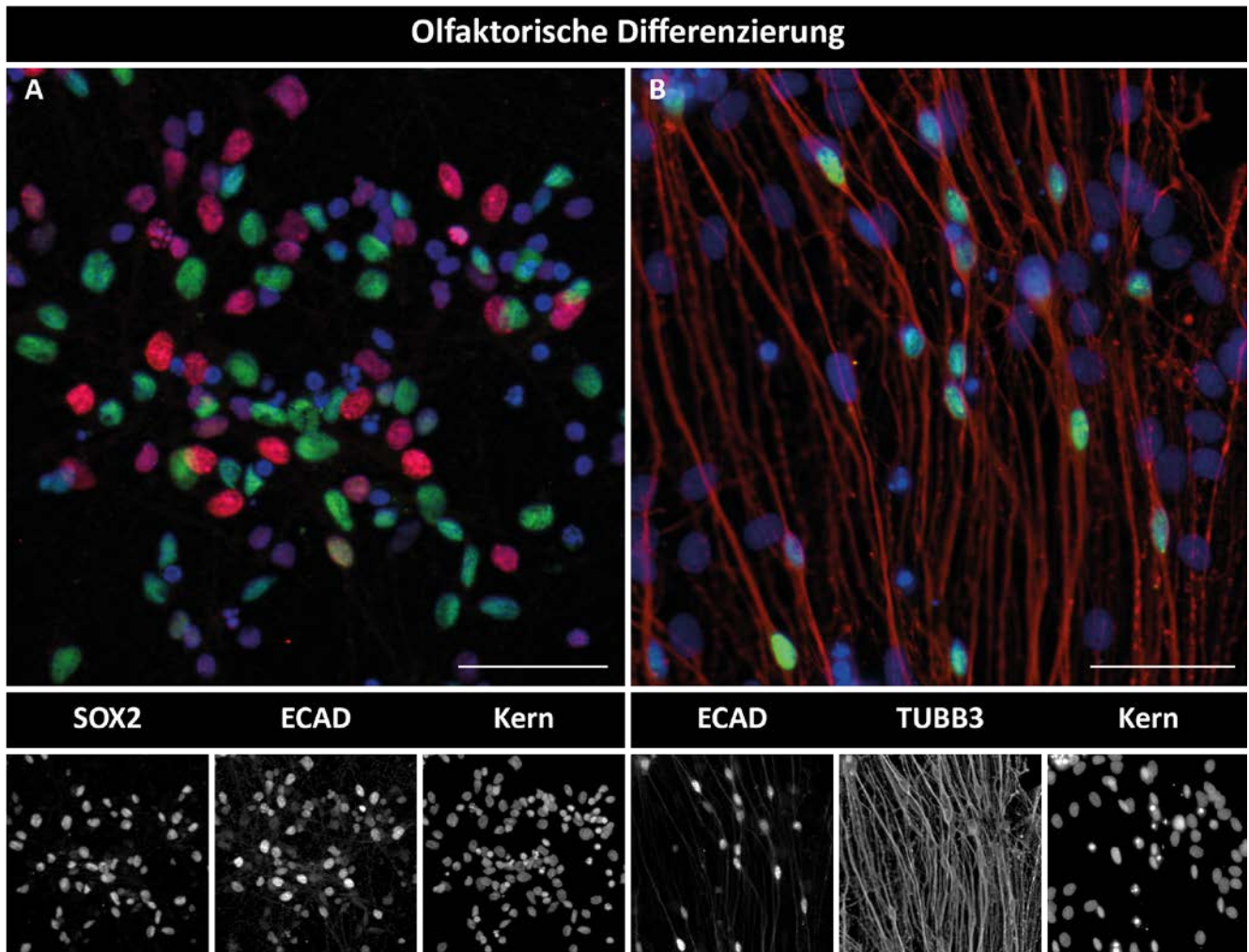


Abbildung 4.40: Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung mit SOX2 und ECAD.

Immunofluoreszenz-Färbung einer olfaktorischen Differenzierung an Tag. In A wurde SOX2 (Grün) und ECAD (Rot) gefärbt. In B wurde ECAD (Grün) und TUBB3 (Rot) gefärbt. Zusätzlich wurde der Kern mit DAPI kenntlich gemacht (Blau). Maßstab: 50 μm .

4.6. Funktionelle Analysen

Nachdem nachgewiesen wurde, dass ORN und auch andere olfaktorische Zellen in der olfaktorischen Differenzierung vorhanden sind, soll im nächsten Schritt bewiesen werden, dass die ORN auch funktionell sind. Dafür wurden die RNA-Daten einiger OR gemessen, die die Grundvoraussetzung der olfaktorischen Funktionalität sind. Zusätzlich wurde ein Kalzium-Imaging durchgeführt um zu zeigen, dass einerseits die Neurone der Zellkultur generell eine spontane Aktivität aufweisen, andererseits um eine Kalzium-Antwort nach einer Stimulation mit einem Odorantenmix zu bekommen. Die Aktivität sollte theoretisch nur von den ORN ausgehen, die die in dem Odorantenmix enthaltenen Duftstoffe mit ihren Rezeptoren binden können.

4.6.1. Olfaktorische Rezeptoren

Es wurden acht verschiedene OR ausgewählt und untersucht (OR1A1, OR1G1, OR2J2, OR2S2, OR2W1, OR5P3, OR13C8, OR13C5). Bei der Auswahl wurde vor allem darauf Wert gelegt, dass die OR schon untersucht und beschrieben worden sind und dass die jeweiligen Odoranten bekannt sind, die an den OR binden können. Für die Existenz der OR in der olfaktorischen Differenzierung *in vitro*, wurden zunächst die Expressionsdaten der OR ermittelt. In Abbildung 4.41 sind die Expressionen aller acht OR in den iPSZ und an Tag 121 der Differenzierung dargestellt. Für alle OR wurde die Grundexpression in den iPSZ auf den Wert 1 gesetzt und die Expression in der Differenzierung entsprechend angepasst. Es ist sehr gut zu sehen, dass alle acht OR eine deutliche Steigerung der Expression zeigen. Das zeigt, dass die OR in der olfaktorischen Differenzierung exprimiert werden. Dadurch werden funktionelle ORN durchaus wahrscheinlicher, da ohne OR-Expression eine Odoranten-Rezeption nicht zustande kommt.

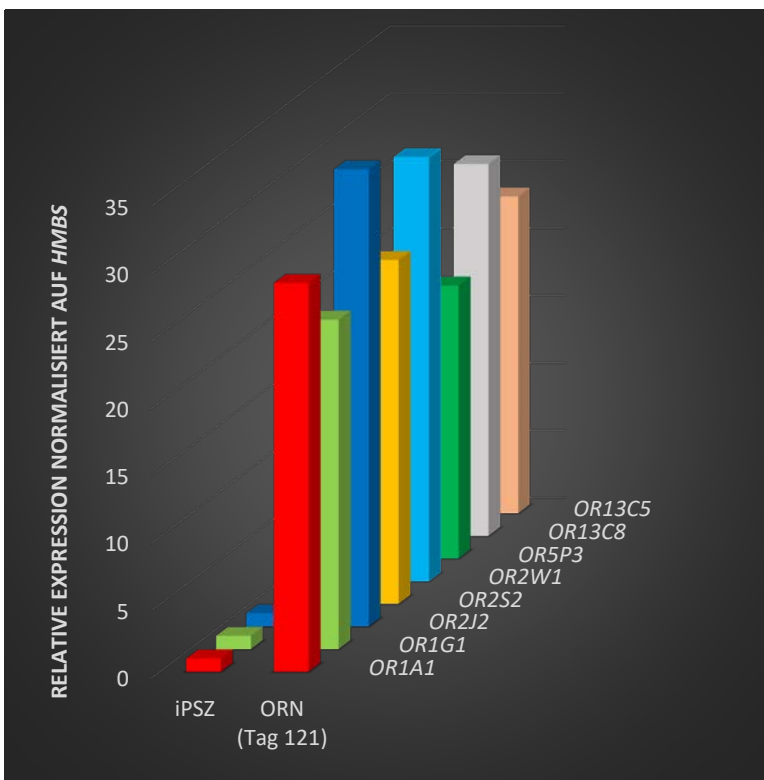


Abbildung 4.41: Expressionsdaten von OR-Genen

Darstellung der Expressionsdaten von acht verschiedenen OR-Genen (OR1A1, OR1G1, OR2J2, OR2S2, OR2W1, OR5P3, OR13C8, OR13C5) in iPSZ (Wert bei allen auf 1 gesetzt) und in Relation dazu die Expressionsdaten der olfaktorischen Differenzierung (ORN) an Tag 121. Als internes Referenzgen dient HMBS.

4.6.2. Kalzium-Imaging

Die Expression von Genen der olfaktorischen Signalkaskade und den OR deutet auf funktionelle ORN hin, jedoch muss die Funktion eindeutig erwiesen werden. Dafür wurde ein Kalzium-Imaging durchgeführt, bei dem ein Fluorophor bei Bindung an Kalzium ein Fluoreszenzsignal abgibt. Wenn den zuvor mit dem Farbstoff behandelten Zellen von außen Reize gegeben werden und Kalzium einströmt, kann man die Zellen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop aufleuchten sehen, da der Farbstoff an das Kalzium bindet. In diesem Fall sollen nur die ORN reagieren. Deshalb wird zu der Neuronenkultur ein Odorantenmix zugegeben auf den nur die ORN reagieren sollten, wenn die Duftstoffe an die

entsprechenden OR binden. Bevor der Odorantenmix zugegeben wurde, wurde die Spontanaktivität gemessen. Dafür wurde drei Minuten lang alle 0,3 Sekunden ein Bild aufgenommen. Die Bilder wurden übereinandergelagert und das erste Bild (Start) wurde von der Überlagerung abgezogen. Die Fluoreszenzsignale die übriggeblieben sind, entsprechen den Signalen, die während der drei Minuten dazugekommen sind.

Nach den drei Minuten Spontanaktivität wurde der Odorantenmix zugegeben und es wurde erneut drei Minuten lang alle 0,3 Sekunden Bilder aufgenommen. Auch hier wurde das Startbild von den übereinandergelegten Bildern abgezogen. Die Kombination von Spontanaktivität und der echten Zellreaktion wird dargestellt, indem zu dem überlagerten Bildern der Spontanaktivität das Differenzbild des Odorantenmixes addiert wird. Dabei wird in grün die Spontanaktivität dargestellt und in Rot die zusätzliche Reaktion auf den Odorantenmix.

Die Odoranten wurden fast alle in Ethanol (EtOH) gelöst. Deshalb wurde zunächst eine Negativkontrolle durchgeführt, indem die entsprechende Konzentration EtOH ohne Odoranten hinzugefügt wurde. In Abbildung 4.42 sieht man, dass kaum Spontanaktivität zu erkennen ist und nach der Zugabe von EtOH nur sehr wenige Zellen reagieren.

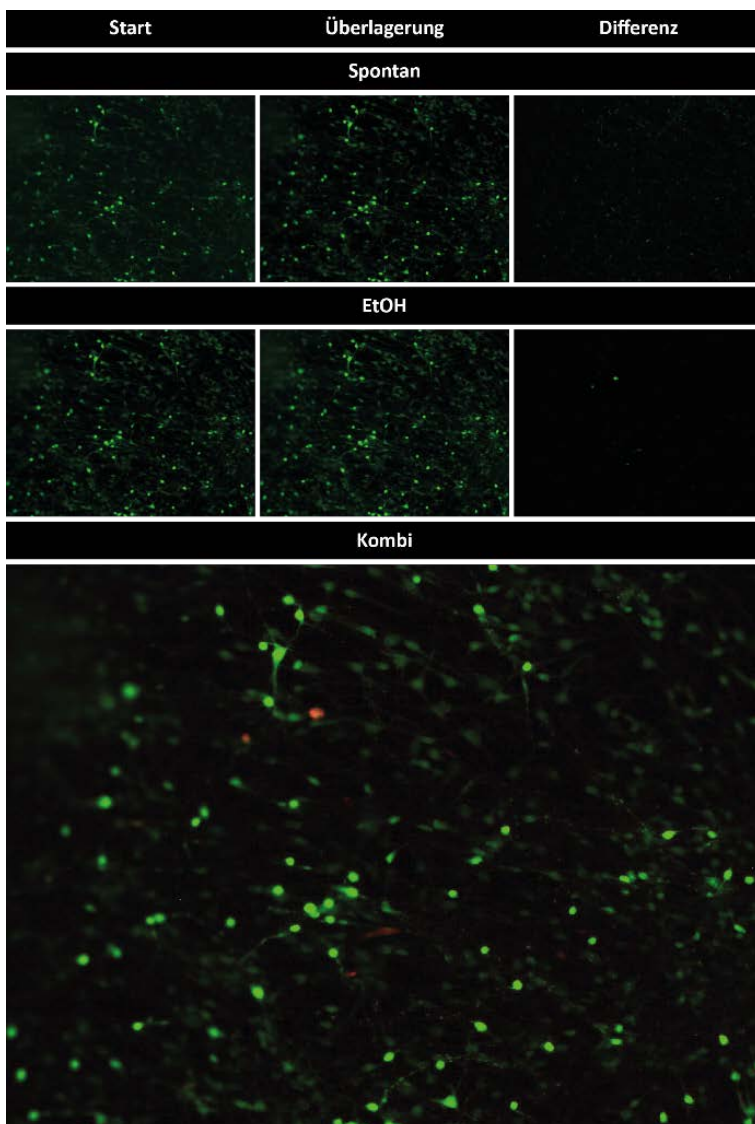


Abbildung 4.42: Kalzium-Imaging mit EtOH

Darstellung der verschiedenen Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop drei Minuten vor und drei Minuten nach Zugabe von Ethanol (EtOH). Für die Spontanreaktion (Spontan) wurde drei Minuten alle 0,3 Sekunden ein Bild gemacht. Start entspricht dem ersten Bild. Alle Bilder wurde übereinandergelegt (Überlagerung) und davon wurde das Startbild abgezogen (Differenz). Nach den ersten drei Minuten wurde EtOH zugegeben und erneut wurden drei Minuten alle 0,3 Sekunden ein Bild aufgenommen. Die Bilder Start, Überlagerung und Differenz wurde wie oben gefertigt. Für das Kombinationsbild (Kombi) wurde zu der Überlagerung Spontan (Grün) die Differenz EtOH (Rot) addiert.

In Abbildung 4.43 wurde eine ähnliche Stelle in der Differenzierung herausgesucht und nach der Messung der Spontanaktivität der Odorantenmix hinzugefügt. Man sieht auch hier fast keine Spontanaktivität, aber nach der Zugabe des Odorantenmixes eine deutliche Zunahme der aufleuchtenden Zellen. In der Kombination sind diese zusätzlich reagierenden Zellen in Rot dargestellt.

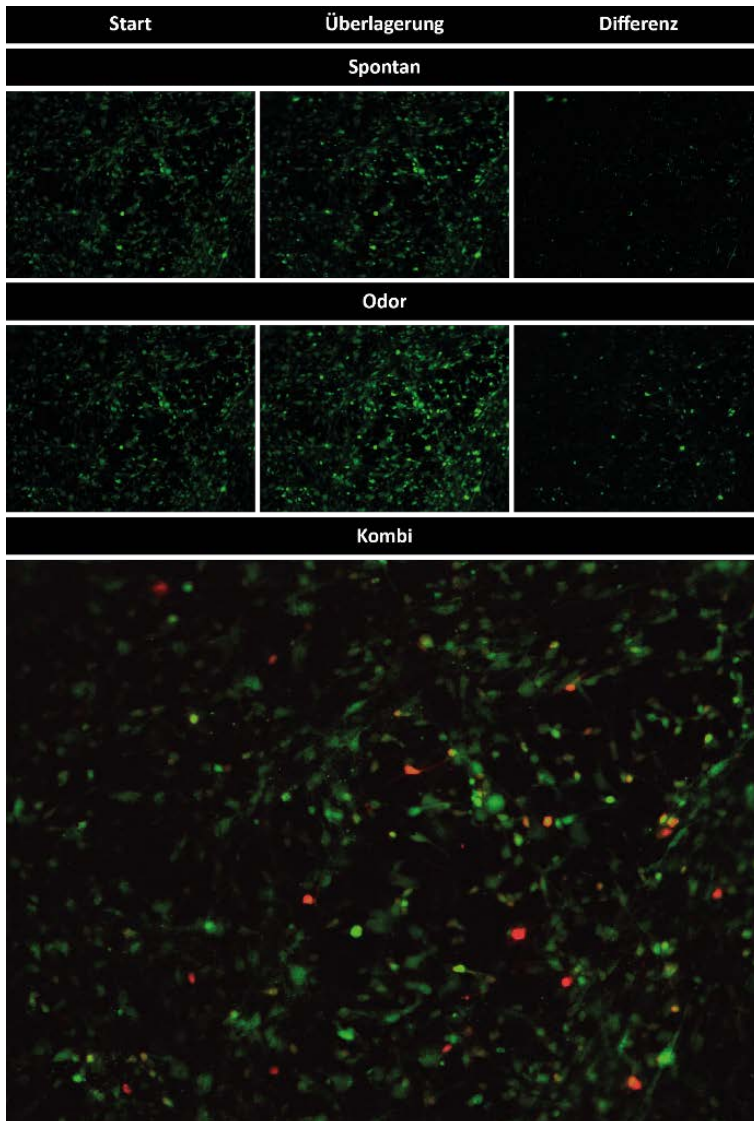


Abbildung 4.43: Kalzium-Imaging mit Odorantenmix

Darstellung der verschiedenen Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop drei Minuten vor und drei Minuten nach Zugabe des Odorantenmixes. Für die Spontanreaktion (Spontan) wurde drei Minuten alle 0,3 Sekunden ein Bild gemacht. Start entspricht dem ersten Bild. Alle Bilder wurde übereinandergelegt (Überlagerung) und davon wurde das Startbild abgezogen (Differenz). Nach den ersten drei Minuten wurde der Odorantenmix zugegeben und erneut wurden drei Minuten alle 0,3 Sekunden ein Bild aufgenommen. Die Bilder Start, Überlagerung und Differenz wurde wie oben gefertigt. Für das Kombinationsbild (Kombi) wurde zu der Überlagerung Spontan (Grün) die Differenz Odorantenmix (Rot) addiert.

In Abbildung 4.44 wurde eine andere Stelle in der Neuronenkultur gewählt. Hier ist ein dichteres Netzwerk aus Neuronen zu erkennen und die Spontanaktivität ist deutlich höher als bei den ersten beiden Bildern. Nach der Zugabe des Odorantenmixes hat sich die Aktivität der Neurone nochmals deutlich erhöht. Vor allem in der Kombination ist in Rot die Reaktion der Zellen auf den Odorantenmix zu erkennen.

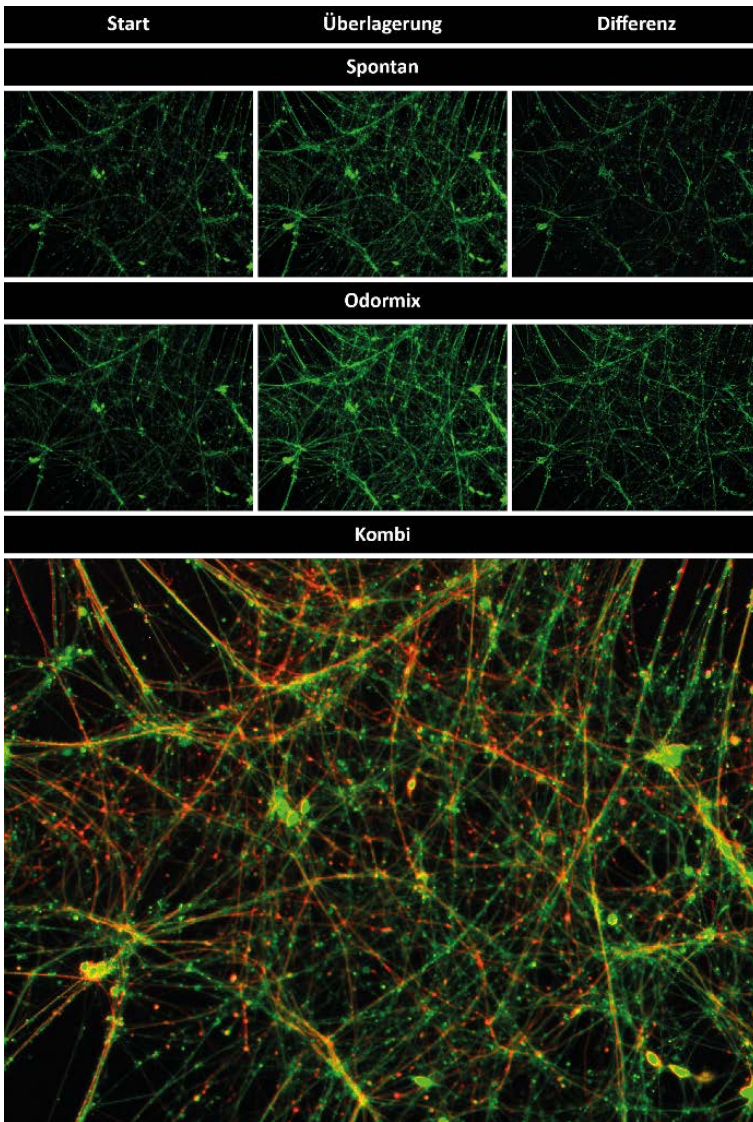


Abbildung 4.44: Kalzium-Imaging mit Odorantenmix

Darstellung der verschiedenen Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop drei Minuten vor und drei Minuten nach Zugabe des Odorantenmixes. Für die Spontanreaktion (Spontan) wurde drei Minuten alle 0,3 Sekunden ein Bild gemacht. Start entspricht dem ersten Bild. Alle Bilder wurde übereinandergelegt (Überlagerung) und davon wurde das Startbild abgezogen (Differenz). Nach den ersten drei Minuten wurde der Odorantenmix zugegeben und erneut wurden drei Minuten alle 0,3 Sekunden ein Bild aufgenommen. Die Bilder Start, Überlagerung und Differenz wurde wie oben gefertigt. Für das Kombinationsbild (Kombi) wurde zu der Überlagerung Spontan (Grün) die Differenz Odorantenmix (Rot) addiert.

5. Diskussion

5.1. Olfaktorisches Epithel aus humaner Biopsie als positiv-Kontrolle

Das olfaktorische Epithel (OE) befindet sich an der Decke der Nasenhöhle, zwischen oberer Nasenmuschel und Septum, direkt angrenzend zur Siebplatte. Genau dort ereignet sich der Vorgang des Riechens indem die in der Atemluft enthaltenen Duftstoffe an den olfaktorischen Rezeptoren (OR) in den olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) binden und eine Signalkaskade auslösen, die ein Aktionspotential generiert. Das OE hat einen einfachen epithelialen Aufbau mit vier Hauptzelltypen: ORN, olfaktorische Vorläuferzellen, Basalzellen und Stützzellen. Außerdem findet man im OE noch die Mikrovillarzellen, deren Bedeutung noch nicht geklärt ist und Ausführungsgänge der olfaktorischen Drüsen, die in der Lamina propria liegen, die hier in dieser Arbeit jedoch nicht weiter berücksichtigt werden. Um eine Idee der epithelialen Schichtung zu bekommen und die Zelltypen getrennt voneinander darzustellen, wurde von Körperspendern für die Forschung post mortem eine olfaktorische Biopsie entnommen und immunhistologisch analysiert. Das Hauptaugenmerk wurde natürlich auf die ORN gesetzt, weshalb hier die meisten Marker verwendet wurden. Allen voran ist das olfaktorische Marker Protein (OMP) der Marker der Wahl, wenn es um reife ORN geht. 1972 wurde ein Protein spezifisch für den olfaktorischen Bulbus gefunden [133], welches sich später als OMP herausstellte, das in den Axonen der ORN, die bis in den olfaktorischen Bulbus reichen, lokalisiert war [39, 134-136]. In anderen Forschungsgruppen wurden als weitere ORN-Marker werden Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1 (UCHL1), G-Protein, Olfactory Type (GOLF), Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) und Tubulin Beta 3 (TUBB3) aufgeführt [136, 137], die im Gegensatz zu OMP auch unreife ORN markieren. Weitere Proteine die spezifisch in reifen ORN vorkommen ist die Adenylate Cyclase 3 (ADCY3), als Teil der olfaktorischen Signalkaskade [98], und Transmembran Protein 16B (TMEM16B), ein Kalzium-gesteuerter Chlorid-Kanal [138, 139]. Zusätzlich zu den ORN finden sich auch weitere Zelltypen im OE, die ebenfalls untersucht wurden. Eine wichtige Zellgruppe sind die Basalzellen aus denen sich alle anderen olfaktorischen Zellen, auch die ORN, differenzieren [40, 44]. Mit den olfaktorischen Basalzellen besitzt das OE die Fähigkeit sich komplett zu regenerieren und zwar ein Leben lang [140, 141]. Nur wenige Neurone des ZNS besitzen neben den ORN lebenslanges Regenerationspotential. Da die ORN aber auch als eine der wenigen Neuronentypen gelten, die direkten Kontakt zur Außenwelt besitzen, ist es nicht verwunderlich, dass sie sich von äußerlichen Einflüssen, wie toxischen Substanzen, dauerhaft erholen müssen. Es gibt zwei Typen von Basalzellen, die horizontalen Basalzellen (HBZ) und die globosen Basalzellen (GBZ). Die HBZ sind flache Zellen am Grund des OE [44]. Direkt darüber liegen die GBZ, die zusätzlich zu ihrer runden Form proliferativer sind als die HBZ [142, 143]. Als Marker für beide Basalzelltypen wurden Sex Determining Region Y-Box 2 (SOX2) und Nerve Growth Factor Receptor (NGFR) verwendet [136, 137]. SOX2 kommt aber auch in anderen olfaktorischen Zellen vor, wie zum Beispiel Stützzellen. Die HBZ sind der Ursprung aller olfaktorischen Zellen, die zuerst zu GBZ differenzieren, welche dann wiederum das Potential haben einerseits Stützzellen und olfaktorische Drüsenzellen zu erschaffen, hauptsächlich jedoch die

Vorläuferpopulationen der ORN generieren. Die Vorläuferzellen können in Populationen mit unterschiedlicher Reifung auftreten. Das heißt es gibt frühe Vorläufer, die vor allem Achaete-scute homolog 1 (ASCL1) aufweisen, die wiederum eine späte Vorläuferpopulation produzieren [144], die Marker wie Calbindin 2 (CALB2) aufweisen [145], aber auch mit TUBB3 oder UCHL1 positiv gefärbt werden können [136]. Die Stützzellen des OE wurden in dieser Arbeit mit dem Marker E-Cadherin (ECAD) sichtbar gemacht. Betrachtet man die Färbungen in Abschnitt 4.1 kann man die jeweiligen Marker den Zelltypen sehr gut zuordnen, aber auch ohne Färbung ist eine schöne, geordnete Epithelstruktur zu erkennen. Beispielsweise kann man in Abbildung 4.2 sehr gut das OMP-positive ORN erkennen, während in Abbildung 4.5 SOX2 Zellen färbt, die am Grund des OE liegen und wahrscheinlich HBZ und GBZ sind.

Es ist also festzuhalten, dass alle epithelialen Zelltypen mit verschiedenen Markern dargestellt werden konnten. Ob die Marker sich auch für die Zellkultur eignen wird in den nächsten Abschnitten diskutiert, in denen Bezug auf die einzelnen Zelltypen mit den jeweiligen Markern genommen wird. Mit der Entnahme der Biopsie und der Analyse der Schnitte kann der Aufbau des OE und die jeweiligen Zellen charakterisiert werden. Es kann auch die Verteilung der OR innerhalb des OE ermittelt werden, wenn das komplette OE am Stück herausgelöst werden kann. Will man aber die Funktionsweise und die molekularen Mechanismen des OE und insbesondere der ORN im Menschen nachvollziehen, müssen andere Modelle herangezogen werden. Auch die Entwicklung des humanen OE speziell auf molekularer Ebene kann man bisher nur aus Tiermodellen übertragen. Eine Möglichkeit die humane Entwicklung nachzuvollziehen, die molekularen Mechanismen der OR im humanen OE zu beleuchten und die ORN funktionell zu untersuchen ist die Verwendung von induziert pluripotenten Stammzellen (iPSZ), reprogrammiert aus humanen, somatischen Zellen. Welche Vorzüge dieses *in vitro* Modell besitzt, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

5.2. Humane iPSZ als Werkzeug zur Untersuchung des OE

5.2.1. Welche Art der Reprogrammierung und welche Zellen werden genutzt?

Bevor erörtert wird welche Vorteile die iPSZ als humanes Modell besitzen, wird die Wahl der Reprogrammierungsmethode und die der somatischen Ausgangszellen erläutert. Grundsätzlich beruht die Reprogrammierung auf dem ursprünglichen Paper von Yamanaka *et al.* aus 2006 [146]. Dort wird beschrieben wie Maus-Fibroblasten in ihren früheren pluripotenten Zustand von embryonalen Stammzellen gezwungen werden. Dies wurde mit Hilfe einer ektopischen Expression von bestimmten Faktoren (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*) erreicht und der Vorgang wurde Reprogrammierung genannt. Ein Jahr später wurde diese Reprogrammierung auch mit humanen Fibroblasten durchgeführt und die Faktoren konnten teilweise ausgetauscht werden, wobei *OCT4* und *SOX2* essentiell sind [111]. Beispielsweise wurde *c-MYC* weggelassen oder *KLF4* und *c-MYC* mit *LIN28* und *NANOG* ersetzt [113, 114, 147]. Im Endeffekt unterscheiden sich die Effizienzen nicht sehr stark, es gibt aber Unterschiede

in der Art wie man die Faktoren in die Zelle einbringt. Die ursprüngliche und immer noch eine der effizientesten Methode ist die Verwendung eines lentiviralen Vektors, um die Faktoren in das Genom zu integrieren. Der Vektor der hier verwendet wurde ist ein multicistronischer lentiviraler Vektor mit den vier Faktoren *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* und *c-MYC* und außerdem ein vorangeschalteter Promotor, der bei einer starken endogenen Expression von *OCT4* epigenetisch ausgeschaltet wird. Zusätzlich besitzt der Vektor eine Sequenz, die für dTomato codiert [128]. Damit kann während der Reprogrammierung unter dem Fluoreszenzmikroskop nachvollzogen werden in welchen Zellen der Promotor mit den nachgeschalteten Faktoren aktiv ist. Der große Vorteil dieser Methode ist die hohe Effizienz und die einfache Transfektion mit dem Vektor, jedoch eignet sich diese Methode nur für *in vitro* Versuche. Wenn die Ambition ins Spiel kommt, die *in vitro* generierten Zellen und Gewebe in Zukunft wieder in den menschlichen Organismus zu transplantieren, eignet sich der lentivirale Vektor eher nicht. Das Virus selber ist zwar nicht schädlich, kann aber durch die Integration der Faktoren an der falschen Stelle im Genom Schäden anrichten. Wenn die Faktoren nach der Reprogrammierung völlig rückstandslos entfernt und nicht nur inaktiviert werden sollen, müssen andere Methoden, wie Reprogrammierung mit Sendai-Virus [148], RNA [149] oder ‚small molecules‘ [124] verwendet werden, die jedoch meist mit Effizienzverlusten einhergehen. Viele der Methoden sind schon soweit etabliert, dass sie mit guter Effizienz eingesetzt werden können, aber die meisten werden auf Basis der Fibroblasten als somatischen Zelltyp entwickelt [126]. Es können aber viele andere somatische Ausgangszellen verwendet werden, wie zum Beispiel Endothelzellen [119] oder andere Zelltypen aus Blut [150], oder sogar Epithelzellen, die aus Urin gewonnen werden [117]. In unserem Labor verwenden wir Keratinozyten aus gezupften Haaren [116, 122]. Der größte Vorteil ist hier die nicht-invasive Entnahme der Haare mitsamt der Wurzel, indem man sie einfach mit einer Pinzette vom Kopf zupft. Im Vergleich zu den Fibroblasten, die mittels invasiver Haut-Biopsie gewonnen werden, ist die Reprogrammierungseffizienz annähernd gleich, wenn nicht sogar etwas größer [115]. So können Haare von Patienten oder Kontrollpersonen jederzeit problemlos von Mitarbeitern entnommen werden, ohne dass die Anwesenheit von medizinischem Personal benötigt wird. Die Haare können auch sehr gut transportiert werden, es wird nur ein Falcon mit DMEM benötigt und jemand der kurz darauf hingewiesen wurde, auf was zu achten ist. Beispielsweise eignen sich nicht alle Haare für die Kultivierung; es ist eine gute Wurzel mit einer deutlich erkennbaren, weißlichen äußeren Wurzelscheide nötig, da nur dort die Keratinozyten auswaschen können. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass die Wurzeln nicht zu lange an der Luft sind, sondern direkt in das Medium gegeben werden, da die Haarwurzeln schnell austrocknen und die Proliferation der Keratinozyten erschwert wird. Für die Kultivierung der Keratinozyten wird ein spezielles Medium verwendet, welches eine reduzierte Kalzium-Konzentration ausweist, damit die Zellen nicht seneszent werden. Gegenüber den Fibroblasten brauchen die Keratinozyten ein bisschen mehr Fürsorge und sollten maximal vier bis fünf Passagen gehalten werden, während die Fibroblasten sehr schnell und lange wachsen und somit auch länger gehalten werden können. Bei der Reprogrammierung hat das langsamere Wachsen und das Kalzium-abhängige Verhalten der Keratinozyten jedoch wieder Vorteile, da die nicht infizierten Keratinozyten im Kalziumhaltigen Reprogrammierungs-Medium nicht weiterwachsen, während bei den Fibroblasten neben den

infizierten Zellen auch die übrigen weiterproliferieren und die entstehenden iPSZ-Kolonien leicht überwachsen können [115].

5.2.2. Charakterisierung der iPSZ

Bevor eine Differenzierung gestartet wird, müssen die iPSZ getestet werden. Am Wichtigsten ist dabei die Überprüfung ob die iPSZ auch wirklich pluripotent sind und sich somit in alle drei Keimblätter entwickeln können. Dafür wurde als erstes eine Pluripotenz-Analyse auf Protein-Ebene durchgeführt, indem die iPSZ mit Pluripotenzmarkern (SOX2, NANOG, OCT4, SSEA1, TRA-1-20, TRA-1-81) über fluoreszierende Antikörper sichtbar gemacht werden. In Abbildung 4.11 sieht man schön die Kernfärbung der Transkriptionsfaktoren SOX2, NANOG und OCT4 und die Färbung der Oberflächenmarker SSEA1, TRA-1-20 und TRA-1-81. Somit ist in den Stammzellkolonien erwiesen, dass sie diese Pluripotenzmarker besitzen. Um den letztendlichen Nachweis zu erhalten, dass die iPSZ in alle Keimblätter differenzieren können, wurde zusätzlich eine Keimblattdifferenzierung mit anschließender Protein- und RNA-Analyse durchgeführt. Mit einem bestimmten Protokoll werden die iPSZ zum Differenzieren angeregt und am Ende werden Vertreter aller drei Keimblätter nachgewiesen, indem spezifische Marker auf RNA- und auf Protein-Ebene gezeigt werden. Abbildung 4.13 zeigt die Expressionsdaten von jeweils zwei Vertretern der Keimblätter (*T* und *MYH6* für Mesoderm, *AFP* und *FOXA2* für Endoderm, *PAX6* und *TUBB3* für Ektoderm), die alle eine stärkere Expression in der Keimblatt-Differenzierung besitzen, als in den iPSZ (blauer Balken). In Abbildung 4.12 wurde mit *TUBB3* als Marker für ektodermale Zellen, mit *DESMIN* als Marker für mesodermale Zellen und *SOX17* als Marker für endodermale Zellen gefärbt. Zusammengenommen beweisen die beiden Abbildungen, dass die iPSZ die Fähigkeit besitzen Zellen auf allen drei Keimblättern zu generieren.

5.2.3. Was macht die iPSZ zu einem geeigneten Modell für die Untersuchung von ORN?

Warum wurden in dieser Arbeit iPSZ verwendet, um ORN zu generieren und diese zu untersuchen? Einer der ausschlaggebenden Vorteile dieser Methode ist die Forschung im humanen System. Durch die Entnahme der Haare von freiwilligen Kontrollpersonen und die Reprogrammierung zu iPSZ kann man mit einem guten Protokoll Zellen generieren, die das gleiche Genom besitzen, wie der Haar-Donor. Die Möglichkeit im humanen System zu forschen ist bei vielen Organen und Zelltypen nicht möglich, da sie sich nicht eignen, um Biopsien zu entnehmen, oder diese nicht in Kultur genommen werden können, wie zum Beispiel das Gehirn mit seinen vielen verschiedenen Neuronentypen unter anderem auch die ORN. Es wurden zwar schon Versuche unternommen Biopsien des OE zu entnehmen und diese Zellen in Kultur zu nehmen, jedoch ist ein Eingriff schmerzhaft und mit Risiken verbunden und sollte nur von spezialisierten HNO-Ärzten durchgeführt werden [151]. Versuche am Menschen sind ethisch nicht vertretbar und deshalb wird oft auf Tier-Modelle zurückgegriffen. Mit diesen Modellen kann viel von der Entwicklung auf den Menschen übertragen werden und auch die Organisation und Funktion des olfaktorischen Systems basiert weitgehend auf Ergebnissen aus Tier-Modellen [22, 78, 152, 153]. Im humanen System ist jedoch nicht sehr viel über das olfaktorische System bekannt, speziell

im Bereich der Entwicklung und dem molekularen Zusammenspiel von Odoranten, OR, ORN und den anderen assoziierten Zellen des OE gibt es noch große Lücken. Mit Hilfe der iPSZ kann die Entwicklung der ORN mit Hilfe des Differenzierungsprotokolls nachvollzogen werden, bzw. nähert man sich mit der Entwicklung des Differenzierungsprotokolls immer weiter der Entwicklung der ORN *in vivo* an. Die Entwicklung *in vivo* ist natürlich nicht eins zu eins übertragbar auf die Differenzierung *in vitro*, dennoch können bestimmte Signalwege und bestimmte Transkriptionsfaktoren zu verschiedenen Entwicklungsschritten betrachtet und analysiert werden. Ein weiterer großer Vorteil ist die Untersuchung von Zellen, die das gleiche Genom wie die Spender aufweisen. Damit können auch Patienten mit Anosmie im Vergleich zu Kontrollpersonen untersucht werden. Sollte die Anosmie einer Mutation in einem bestimmten Gen zugrunde liegen, kann möglicherweise ein Phänotyp in den differenzierten ORN zu erkennen sein.

5.2.4. Zusammenfassung: iPSZ als Werkzeug zur Untersuchung des OE

In diesem Abschnitt wurden die iPSZ beleuchtet: Welche Methoden zur Herstellung wurden verwendet, funktionieren die iPSZ und welche Vorteile haben die iPSZ bei der Untersuchung des OE?

Reprogrammierung:

- Keratinozyten als somatische Quelle, da sie eine **nicht-invasive** aber dennoch **effiziente somatische Quelle** darstellen
- Lentivirus als Transfektionsvektor, da dieser sehr gut etabliert und effizient ist. Dennoch ist eine Umstellung auf nicht integrierende Methoden denkbar.
- Generierte iPSZ sind **pluripotent und können in alle drei Keimblätter differenzieren**.

iPSZ als Werkzeug:

- OE mit ORN ist im Organismus schwer zugänglich und die Differenzierung bietet die **Produktion von ORN** in großem Maße für weitere Untersuchungen.
- Das olfaktorische System kann im **humanen System** untersucht werden, die meisten Studien wurden in Tiermodellen durchgeführt.
- Die **humane Entwicklung** des olfaktorischen Systems kann *in vitro* nachvollzogen werden.
- Es können **Patienten-spezifische iPSZ** generiert werden und somit auch ORN mit demselben Genom.

5.3. ORN aus olfaktorischer Differenzierung

5.3.1. OMP als Marker für reife ORN?

OMP gilt als anerkannter Marker für reife ORN und wird in vielen Publikationen als wichtigster Marker verwendet [39, 136, 137, 154, 155]. Das Protein wurde schon sehr früh beschrieben als einziger Marker für vollständig ausdifferenzierte ORN, welches in nicht olfaktorischen Geweben nicht vorkommt [133]. In aktuelleren Studien wurde OMP auch in nicht-olfaktorischen Geweben nachgewiesen [156]. Die Funktion des kleinen Proteins (19 kDa) ist bislang noch nicht vollständig erschlossen. Es wird vermutet, dass die Funktion von OMP eng mit der Antwort auf die Odoranten zu tun hat, da in einigen Studien mit Knock-Out Mäusen nachgewiesen wurde, dass die Reaktionszeit nach Odoranten-Bindung deutlich verlängert war. Zudem haben die Mäuse eine verringerte Sensitivität gegenüber Duftstoffen und können diese schlechter unterscheiden [157-159]. Eine Studie zeigt, dass OMP ein wichtiger Faktor für die Reifung der ORN sein kann [160], wodurch auch erklärt wird, warum OMP explizit in reifen ORN zu finden ist. Ein weiterer Hinweis, dass OMP eine wichtige Rolle in der Signalkaskade spielt, ist der Nachweis der von OMP, kombiniert mit verschiedenen OR und anderen spezifischen Signalkaskadengenen wie GOLF und ADCY3, in nicht-olfaktorischen Geweben [156]. Diese Erkenntnisse decken sich mit der Theorie, dass OMP auch Einfluss auf den cAMP-Spiegel hat. Sowohl das Grundlevel von cAMP, als auch die Konzentration von cAMP nach Aktivierung der ADCY3 bei Odoranten-Bindung, sollen von OMP geregelt werden [161]. Welche Funktionen die OR und der nachgeschaltete Signalweg in den nicht-olfaktorischen Geweben ausübt, ist meist nicht bekannt.

Welche Funktion OMP auch besitzt, das Protein ist eng verknüpft mit der olfaktorischen Antwort auf Odoranten und kommt zudem spezifisch in komplett ausgereiften ORN vor und nicht wie andere ORN-Marker auch in unreifen ORN, Vorläufern oder anderen Zellen des OE. Alles in allem sind das gute Voraussetzungen für einen guten Marker für reife ORN, sowohl in der humanen Biopsie, als auch in der olfaktorischen Differenzierung.

5.3.1.1. OMP in der Biopsie

In vielen Publikationen die olfaktorische Biopsien verwenden, wird OMP als der Marker für reife ORN genutzt und beschrieben, da er im Gegensatz zu anderen verwendeten Markern nicht in Vorläufern oder nicht ganz ausgereiften ORN vorkommt [136, 137]. In Abbildung 4.2 ist ein Ausschnitt aus dem OE einer olfaktorischen Biopsie zu sehen, in dem ORN mit OMP gefärbt wurden. Man kann sehr schön die zentrale Lage erkennen, die das ORN im Epithel einnimmt und die Struktur des ORN mit seinem Dendriten, welches zur Oberfläche reicht ist vor allem in Abbildung 4.2 A sehr gut zu sehen. Die Axone können so nicht dargestellt werden, was daran liegt, dass die Axone einen viel dünneren Durchmesser besitzen als die Dendriten und deshalb die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, dass ein Axon in einem Kryoschnitt längs angeschnitten wird. Aus demselben Grund sind auch viele ORN nur durch den Zellkörper geschnitten und der zugehörige Dendrit ist auf dem Schnitt nicht zu sehen. Eine Möglichkeit die Axone darzustellen, wäre ein Querschnitt durch die Axonenbündel, die kurz vor der Siebplatte

zusammenlaufen. Die Entnahme der Biopsie bereitet hier jedoch Schwierigkeiten. Das Epithel wurde mit einer Pinzette durch die Nase herausgezupft und man muss sich auf die Erfahrung des Präparators verlassen das schwierig zugängliche Epithel zu erlangen. Zudem bekommt man kein schönes, intaktes Stück Epithel, sondern es werden vielmehr zerfetzte Teile des OE, der Lamina Propria und des angrenzenden Respiratorischen Epithels eingebettet und durch viele Schnitte werden Epithelabschnitte gesucht und dann gefärbt. Diese Schwierigkeiten lassen sich auch auf die Abbildung 4.1 übertragen. Hier ist die relative *OMP* Expression in der Biopsie gegenüber der mRNA-Menge in den iPSZ dargestellt. Es ist zwar eine deutliche Expressionssteigerung zu erkennen (ca. 28fach), was beweist, dass in der Biopsie reife ORN vorhanden sind, aber wieviel davon OE und wieviel Respiratorisches Epithel oder anderes assoziiertes Material ist, kann man nicht beantworten. Dennoch ist das Vorhandensein von *OMP*-Expression und *OMP*-Protein der eindeutige Nachweis von reifen ORN. Für die humane Biopsie eignet sich der Marker *OMP* sehr gut. Hier werden tatsächlich nur die vollständig ausgereiften ORN gefärbt und sonst keine anderen Zellen des OE. Das zeigt sich in der Ko-Färbung mit *TUBB3*, welches auch ORN färbt, jedoch hauptsächlich unreife Neurone und mitunter exprimieren schon Vorläuferpopulationen *TUBB3*. Dadurch ergeben sich nur sehr wenige Ko-Lokalisationen. Auch in Kombination mit anderen Markern für ORN, wie zum Beispiel *UCHL1* (Abbildung 4.3), ist *OMP* nur in manchen *UCHL1* positiven Zellen zu erkennen. Auch hier sind unreife und reife ORN durch *UCHL1* dargestellt, während *OMP* nur die wirklich reifen ORN färbt.

5.3.1.2. *OMP* in der Differenzierung

Wer also *OMP* als Marker für die reifen ORN nutzen möchte, ist mit den Biopsie-Präparaten sehr gut aufgehoben. Betrachtet man jedoch *OMP* in der olfaktorischen Differenzierung wird es schwieriger sich nur auf *OMP* als Marker für ORN zu verlassen. Es wurden verschiedene Methoden verwendet um *OMP* darzustellen und somit auch die ORN sichtbar zu machen und zu quantifizieren. Die RNA-Expression wurde mit einer qRT-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung ermittelt und mit Immunfluoreszenz-Färbungen sollten die reifen ORN gezeigt werden. Zur Ermittlung der Anzahl der positiven ORN wurde zudem ein Western Blot und eine FACS-Analyse durchgeführt. In Tabelle 5.1 wird gezeigt welche Versuche erfolgreich waren und wie gut sie geeignet sind, um reife ORN mit Hilfe von *OMP* zu ermitteln.

Expressionsdaten von *OMP*

Als erstes wurden die Expressionsdaten von *OMP* in der olfaktorischen Differenzierung ermittelt und in Abbildung 4.15 an Tag 121 im Vergleich zu den iPSZ dargestellt. Die Ergebnisse sind vielversprechend, denn es konnte eine nahezu 50fache, hoch-signifikante Expressionssteigerung gemessen werden. Im Expressionsverlauf in Abbildung 4.21 sieht man, dass *OMP* schon sehr früh exprimiert wird und das Expressionslevel relativ konstant bis zum Ende der Differenzierung gehalten wird. In Mäusen wurde gezeigt, dass schon in der Entwicklung – ab Tag 15 im Maus-Embryo – *OMP* existiert [162]. Es wurde in denjenigen olfaktorischen Neuronen gefunden, die als erste ihre Axone in den olfaktorischen Bulbus projizieren und dort Synapsen mit den Mitralzellen ausbilden. Das zeigt, dass *Omp* schon in der

Entwicklung eine Rolle spielen kann und deshalb in der Differenzierung schon früh exprimiert wird. In Mäusen ist an Tag 30 nach der Geburt ist die Anzahl der Omp-positiven Neurone deutlich gesteigert. Zu diesem Zeitpunkt ist das OE vollständig ausdifferenziert und besitzt viele reife ORN. In der Differenzierung *in vitro* kann man diesen Anstieg bis Tag 121 nicht erkennen. Da die Versuche im humanen System durchgeführt werden, muss davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der reifen ORN an späteren Zeitpunkten noch deutlich steigt und Tag 121 zu früh für reife Zellen des OE ist.

Immunfluoreszenz-Färbung mit OMP

Entsprechend zu den RNA-Expressionsdaten wurde auch eine positive Protein-Färbung erwartet. Es konnten Neurone positiv mit OMP gefärbt werden, was sich jedoch schwieriger als erwartet herausstellte. In Abbildung 4.16 wurde OMP in Grün zusammen mit TUBB3 in Rot gefärbt. Ganz selten konnten OMP positive Zellen gefunden werden, die deutlich OMP positiv waren, aber nicht TUBB3 positiv (Abbildung 4.16 A). Die meisten Zellen waren Doppelpositiv (Abbildung 4.16 B), was gegen reife ORN spricht, da TUBB3 in reifen ORN wieder verschwindet und nur bei den unreifen ORN und Vorläuferpopulationen vorkommt [136, 145, 163]. Die OMP-Färbung bei den doppelpositiven Zellen ist auch nicht so eindeutig, wie die Färbung mit den TUBB3 negativen Zellen. Da es sich hier um eine neuronale Kultur handelt, sind natürlich sehr viele verschiedene Neuronentypen vorhanden, von denen die meisten TUBB3 positiv sind, da es sich hier um einen der bekanntesten Neuronenmarker handelt. TUBB3 eignet sich deshalb nicht sehr gut als ORN-Marker, ist jedoch hervorragend qualifiziert, um alle anderen Neurone darzustellen und von den ORN abzugrenzen. In der Zellkultur mit vielen verschiedenen Neuronentypen müssen zusätzlich noch weitere Aspekte im Vergleich zur Biopsie beachtet werden. Zum Beispiel können Neurone, die nicht im OE vorkommen, sich aber durchaus in der Differenzierung entwickeln können, ebenfalls OMP exprimieren [135]. OMP wird zwar weitgehend als spezifisch angesehen, es gibt jedoch auch Publikationen in denen Areale mit OMP-positiven Neuronen im ZNS beschrieben werden. Es sind kleine Populationen und auch sie sind teilweise mit dem olfaktorischen System assoziiert, nichtsdestotrotz können in der Zellkultur OMP-positive Neurone nicht eindeutig als ORN identifiziert werden. Es ist zwar relativ unwahrscheinlich, dass genau diese seltenen Populationen in der Kultur vorkommen, es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Das bedeutet, dass nur die Neurone als ORN definiert werden können, die OMP positiv sind, zugleich aber TUBB3 negativ, da die Doppelpositiven auch andere Neurone des ZNS verkörpern können. Wir gehen von einer geringen Zahl allein OMP-positiver ORN aus und eine etwas größere Zahl Doppelpositiver Zellen, die einerseits ORN darstellen können, aber auch andere Neurone des ZNS. Aufgrund dieser Ergebnisse ist OMP allein als Marker in der Zellkultur mit vielen verschiedenen Neuronentypen mit Vorsicht zu genießen und sollte immer in Kombination mit TUBB3 oder anderen Markern verwendet werden. Im Endeffekt bedeutet das, dass in der olfaktorischen Differenzierung reife ORN gefunden werden können, wenn OMP und TUBB3 zusammen gefärbt wird. Zu diesem Zeitpunkt (Tag 95) konnten nur wenige reife ORN gefunden werden. Anhand der RNA-Expressionsdaten ist genau das zu erwarten. Um die Anzahl der OMP-positiven ORN in der Zellkultur zu erhöhen, müssen sie länger kultiviert werden.

Das konnte in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da sich die Kulturbedingungen mit der Zeit verschlechtern.

Western Blot mit OMP

Auch wenn OMP nicht mehr der hochspezifische ORN-Marker ist, zumindest nicht in der neuronalen Zellkultur, ist es dennoch wahrscheinlich, dass die meisten OMP-positiven Zellen auch ORN sind. Deshalb wurden zusätzlich zu den Färbungen und der qRT-PCR weitere Versuche gemacht, um die Anzahl der OMP-positiven Zellen zu ermitteln. Als erstes wurde ein Western Blot gemacht, um mit dieser Methode einen zweiten Nachweis des Proteins OMP zu erhalten. In Abbildung 4.17 wurde Protein von einer iPSZ Linie und einer olfaktorischen Differenzierung an drei verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen (Tag 55, Tag 65 und Tag 95). Als Positiv-Kontrolle wurde ein rekombinantes Protein eingesetzt. OMP hat eine Größe von 19 kDa, wie sehr schön an der Positiv-Kontrolle zu erkennen ist. In den iPSZ und der Differenzierung sind keine Banden auf dieser Höhe zu erkennen. Das kann mehrere Gründe haben. Erstens ist der Western Blot keine sehr sensitive Methode, das heißt es muss sehr viel Protein vorhanden sein, um das Detektionslevel zu erreichen. Aus den Immunfluoreszenz-Färbungen mit OMP in der Differenzierung wissen wir, dass nur sehr wenig Neurone OMP positiv sind, wodurch die Menge an OMP womöglich nicht für einen Western Blot ausreicht. Die Proben im Western Blot wurden wie in der Färbung an Tag 95 der Differenzierung genommen. Die Expressions-Verlaufsdaten in Abbildung 4.21 zeigen, dass OMP schon sehr früh exprimiert wird, jedoch ist es möglich, dass die ORN erst zu späteren Zeitpunkten reifen und OMP als Protein nachweisbar ist. Der Western Blot eignet sich demnach zu diesem frühen Zeitpunkt nicht als Nachweismethode für OMP. An einem späteren Zeitpunkt kann diese Methode erneut eingesetzt werden, um die relative Menge an ORN zu ermitteln.

FACS-Analyse mit OMP

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein weiterer Versuch gestartet OMP und somit die ORN zu quantifizieren, indem eine FACS-Analyse mit den gefärbten Zellen durchgeführt wurde. Es wurden zwei Zeitpunkte gewählt, ein früherer mit 97 Tagen, der einhergeht mit den Färbungen und dem Western Blot, und diesmal auch ein späterer mit 162 Tagen, da vermutet wird, dass zu diesem Zeitpunkt mehr reife ORN zu finden sind. An Tag 97 ist kein OMP detektiert worden. In den Kurven ist zwar ein deutlicher Shift zu erkennen, aber die wenigen positiven Zellen liegen dennoch direkt an der Detektionsgrenze. An Tag 162 der Differenzierung ist jedoch eine sehr kleine aber eindeutige Population oberhalb des gesetzten Thresholds detektiert worden. Somit kann eindeutig eine OMP-positiv Population in der Kultur nachgewiesen werden. Wie oben schon erwähnt exprimieren auch andere Neurone OMP, jedoch sind bisher nur sehr kleine Gruppen bekannt und sollten hier nicht weiter ins Gewicht fallen. Ausschließen kann man diese Populationen jedoch nicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen OMP-positiven Zellen die in der Färbung gefunden wurden, nicht mit der FACS-Analyse detektiert werden können. Zu einem späteren Zeitpunkt erhöht sich die Anzahl der OMP-positiven Neurone soweit, dass sie mit dieser Methode erfasst werden können. Die Frage ist, ob diese

Population an späteren Zeitpunkten weiter zunimmt. Um dem nachzugehen, müssen die Zellkulturbedingungen soweit verbessert werden, dass Langzeitkulturen von 200 Tagen und mehr möglich sind.

Tabelle 5.1: Überblick der Methoden zum Nachweis von OMP

Methode	Zeitpunkt der Differenzierung	OMP nachgewiesen
RNA-Expression	Ab Tag 2	+
Immunfluoreszenz-Färbung	Tag 95	+
	Tag 55	-
	Tag 65	-
	Tag 95	-
	Tag 98	-
	Tag 162	+

5.3.1.3. Zusammenfassung: Ist OMP als Marker für ORN geeignet?

Es wurde geprüft, ob OMP reife ORN färbt und ob sich der Marker auch für die olfaktorische Differenzierung eignet. Außerdem sollte die Anzahl an reifen ORN in unserer Kultur ermittelt werden.

OMP als Marker für reife ORN in der Biopsie:

- Es werden ausschließlich reife ORN gefärbt
- Keine anderen Zelltypen des OE werden gefärbt
- OMP färbt die komplette Zelle, es können somit auch Dendrit und Axon dargestellt werden

→ **OMP eignet sich sehr gut als Marker für reife ORN** in einer humanen olfaktorischen Biopsie

OMP als Marker für reife ORN in der Differenzierung:

- Es konnte schon früh eine OMP-Expression nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass OMP schon in der Entwicklung eine Rolle spielt
- Die OMP-Expression ist im Vergleich zu den iPSZ sehr signifikant erhöht
- Es konnten ein paar Neurone mit OMP gefärbt werden (Tag 95)
- Nur zusammen mit TUBB3 kann man die Färbung nicht-olfaktorischer Neurone mit OMP ausschließen
- Im Western Blot konnte kein OMP an den Tagen 55, 65 und 95 nachgewiesen werden

→ Das etablierte Protokoll ist in der Lage **reife ORN zu generieren**

→ **OMP eignet sich gut als Marker für reife ORN**, wenn es in der Färbung mit TUBB3 kombiniert wird

→ Es muss ein **später Zeitpunkt** (150 und mehr Tage) für die Endanalysen gewählt werden, um gute Ergebnisse zu bekommen

Wie viele OMP-positiven Zellen sind in der Differenzierung zu finden:

- In der FACS-Analyse konnten an Tag 98 keine OMP-positiven Zellen nachgewiesen werden
 - An Tag 162 konnten 0,64 % der Zellen als OMP-positiv gewertet werden
- In der olfaktorischen Differenzierung sind 0,64 % der Zellen **reife ORN**
- An **späteren Zeitpunkten** (150 und mehr Tage) sind mehr reife ORN zu finden

5.3.2. Weitere mögliche Marker für ORN

Wie sich im vorherigen Abschnitt gezeigt hat, ist OMP ein guter Marker für reife ORN. Vor allem in der humanen Biopsie ist er sehr gut geeignet, um die ORN in der Epithelschicht sichtbar zu machen. In der olfaktorischen Differenzierung kann OMP erst sehr spät nachgewiesen werden. Durch das Vorkommen von OMP in anderen, mitunter neuronalen Geweben, kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass OMP-positive Färbungen auch ORN sind. Nur mit einer negativen Ko-Färbung mit TUBB3 kann ausgeschlossen werden, dass es sich um andere Neuronentypen als die ORN handelt. Die Unterstützung weiterer ORN-Marker ist die logische Schlussfolgerung für die weiteren Untersuchungen. Die Marker sollten auch ORN färben, die nicht komplett ausgereift sind, also auch in der Zellkultur die ORN früher anfärben. Außerdem sollten die Marker ausschließlich ORN färben und nicht in weiteren neuronalen Geweben erscheinen. Es erwies sich jedoch als schwierig solche Marker zu finden, da als weithin anerkannter Marker OMP gilt und nur sehr wenig andere Marker für ORN verwendet wurden. Die meisten der benutzten Proteine erwiesen sich als neuronale Marker, die sich in einer olfaktorischen Biopsie hervorragend für die Darstellung von ORN, die einzigen neuronalen Strukturen im OE, eignen. In der neuronalen Zellkultur, in der alle möglichen Typen von Neuronen zu finden sind, kommen diese Marker möglicherweise weniger in Frage. Nichtsdestotrotz wurden eine in anderen Publikationen verwendete Marker getestet.

5.3.2.1. UCHL1

Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCHL1) oder PGP 9.5 wurde in verschiedenen Publikationen auch als Marker für ORN in einer humanen olfaktorischen Biopsie beschrieben [136, 137]. Auch in unserer Biopsie des OE konnte UCHL1 die ORN sehr schön darstellen. In Abbildung 4.3 wurde UCHL1 in Grün und OMP in Rot gefärbt. Die meisten ORN weisen sowohl eine positive OMP-Färbung, als auch eine UCHL1-Färbung auf. Es gibt jedoch auch Zellen die zwar UCHL1 aufweisen, aber OMP-negativ sind. Das heißt UCHL1 färbt reife ORN, aber auch ORN die noch nicht so reif sind, dass sie OMP exprimieren. Somit ist mit diesen Ergebnissen UCHL1 ein guter Kandidat für einen Marker für ORN, der auch unreife ORN anfärbt und somit eine größere Population in der olfaktorischen Differenzierung zeigen kann. Die qRT-PCR Daten in Abbildung 4.20 B zeigen eine signifikante Erhöhung der Expression von *UCHL1* an Tag 106 der Differenzierung im Vergleich zu den iPSC. Auch im Expressionsverlauf (Abbildung 4.21) ist sehr

gut zu erkennen, dass *UCHL1* nach Tag 6 ansteigt und an Tag 33 ein Plateau erreicht, welches bis Tag 106 gehalten wird. Die Daten zeigen, dass eine gewisse Population von Zellen *UCHL1* im Laufe der Differenzierung exprimieren und womöglich ORN repräsentieren könnten. Um auch auf Proteinebene *UCHL1* nachzuweisen wurden auch hier die gleichen Analysen wie bei OMP durchgeführt. Wenn man den Western Blot in Abbildung 4.24 betrachtet, kann man Banden auf der Höhe von 25 kDa erkennen. An Tag 55 ist die Bande noch nicht so stark ausgeprägt und wie an Tag 65 und 95, was durchaus zu erwarten ist, da es mehr ORN geben sollte, je länger die Differenzierung dauert. Überraschenderweise ist auch bei den iPSZ eine deutliche Bande zu erkennen, die zwar nicht so stark ist wie in den Tagen 65 und 95, aber stärker als die Bande an Tag 55. Verglichen mit den Expressionsdaten sollte in den iPSZ auch kein Protein vorkommen. Jedoch müssen die RNA- und die Protein-Daten nicht immer übereinstimmen, da durch verschiedene Mechanismen die RNA-Expression durch die Proteine beeinflusst werden kann, bzw. trotz vorhandener mRNA die Translation verhindert werden kann. Auch bei der FACS Analyse konnten an Tag 98 16,3 % *UCHL1*-positive Zellen detektiert werden. Das ist eine überraschend große Zahl an positiven Zellen, sollte man von einer reinen ORN-Population ausgehen. An Tag 162 ist die Population der *UCHL1*-positiven Zellen mit 2,39 % deutlich geringer. Im Vergleich zu den OMP-Daten verhält es sich hier also umgekehrt. Da *UCHL1* hauptsächlich unreife ORN färbt, ist das durchaus zu erwarten, da zu den späteren Zeitpunkten weniger unreife ORN und dafür mehr reife ORN vorkommen sollten. Auch die Färbung an Tag 95 in Abbildung 4.22 A zeigt viele positive Zellen. Jetzt stellt sich die Frage ob *UCHL1* wirklich nur ORN färbt, oder aber auch andere Neurone. Wie erwartet findet sich *UCHL1* auch in anderen neuronalen Geweben [164]. Letztendlich kann daraus geschlossen werden, dass *UCHL1* einen guten Marker für die olfaktorische Biopsie verkörpert, in der nur die ORN *UCHL1* exprimieren. In der olfaktorischen Differenzierung ist *UCHL1* eher ungeeignet, da die meisten anderen Neurone ebenfalls *UCHL1* exprimieren. In Kombination mit anderen Marker, dann aber auch auf *UCHL1* zurückgegriffen werden.

Tabelle 5.2: Überblick der Methoden zum Nachweis von *UCHL1*

Methode	Zeitpunkt der Differenzierung	<i>UCHL1</i> nachgewiesen
RNA-Expression	Ab Tag 6	+
Immunofluoreszenz-Färbung	Tag 95	+
	Tag 55	+
	Tag 65	+
	Tag 95	+
	Tag 98	+
	Tag 162	+

5.3.2.2. NCAM2

Neural Cell Adhesion Molecule 2 (NCAM2) ist ein weiteres Protein, das als ORN Marker dienen könnte. Es wird auch Olfactory Cell Adhesion Molecule (OCAM) genannt, da es in den Axonen der ORN zu finden ist [165]. Dieses Protein ist jedoch nicht sehr gut als Marker in der olfaktorischen Biopsie geeignet, weil

NCAM2 hauptsächlich in den Axonen lokalisiert ist, die aber bei der Entnahme des OE und beim Schneiden der Biopsie nicht erhalten bleiben, um eine schöne Färbung zu erhalten. In der Zellkultur, mit intakten Axonen, kann eine schöne Färbung von Neuronen mit NCAM2 angefertigt werden (Abbildung 4.22 B). Auch in der qRT-PCR kann eine sehr starke Expression von *NCAM2* an Tag 106 der Differenzierung im Vergleich zu den iPSZ gemessen werden. Die extrem hohen Werte kommen höchstwahrscheinlich dadurch zustande, dass in den iPSZ so gut wie überhaupt keine Expression zu messen war. Dadurch konnte auch keine Signifikanz berechnet werden, da von den drei biologischen Replikaten nur einer gemessen werden konnte. Der Fehler an Tag 106 ist jedoch sehr gering und die biologischen Replikate waren an diesem Zeitpunkt sehr robust. Der Expressionsverlauf in Abbildung 4.21 zeigt sehr schön, dass die Expression von *NCAM2* sofort und kontinuierlich steigt, mehr sogar als die anderen Gene (*OMP* und *UCHL1*). In Abbildung 4.22 B wurde die Differenzierung an Tag 95 mit NCAM2-Antikörpern gefärbt und es sind positive Neurone zu sehen. Das Protein ist wie erwartet membranständig anzufinden. In Abbildung 4.23 ist eine Färbung von NCAM2 zusammen mit UCHL1 zu sehen, in der deutlich wird, dass NCAM2 positive Zellen UCHL1 exprimieren, aber es viele UCHL1 positiven Zellen gibt, die keine NCAM2 Färbung aufweisen. Da UCHL1 in vielen Neuronentypen vorkommt, kann man anhand der Farbe-Ergebnisse schließen, dass NCAM2 zumindest etwas spezifischer zu sein scheint. Auch in der FACS-Analyse konnte NCAM2 nachgewiesen werden. Auch hier ist an Tag 98 mehr detektiert worden (29,2 %) als an Tag 162, dennoch ist zu dem späten Zeitpunkt der Anteil an NCAM2 positiven Zellen mit 23,1 % immer noch ziemlich hoch. Doch trotz der vielversprechenden Ergebnisse ist auch NCAM2 auch in anderen Arealen des Gehirns anzutreffen. Zwar ist NCAM2 in olfaktorischen Axonen am besten beschrieben, aber auch andere Neurone profitieren von der Funktion von NCAM2 [165]. Das bedeutet für den Nachweis von ORN in unserer Kultur ist NCAM2 deutlich spezifischer als UCHL1, da es in weniger Subpopulationen vorkommt, aber man kann diese Neurone in unserer Zellkultur nicht ausschließen.

Tabelle 5.3: Überblick der Methoden zum Nachweis von NCAM2

Methode	Zeitpunkt der Differenzierung	NCAM2 nachgewiesen
RNA-Expression	Ab Tag 6	+
Immunofluoreszenz-Färbung	Tag 95	+
	Tag 98	+
	Tag 162	+

5.3.2.3. Zusammenfassung: Marker für ORN

Es wurden weitere Marker für ORN gesucht bzw. schon beschriebene Marker getestet, ob sie auch in der olfaktorischen Differenzierung verwendet werden können.

UCHL1:

- Färbt schön die ORN in der olfaktorischen Biopsie

- UCHL1 konnte in allen Analysen in der olfaktorischen Differenzierung nachgewiesen werden (qRT-PCR, Immunofluoreszenz-Färbung, Western Blot, FACS)
- UCHL1 kommt auch in vielen anderen Neuronentypen vor

→ Gut geeignet als **ORN-Marker in der olfaktorischen Biopsie**

→ **Nicht sehr gut** geeignet als ORN-Marker in der **olfaktorischen Differenzierung**

→ **Nur in Kombination** mit anderen Markern verwendbar

NCAM2:

- NCAM2 kommt vor allem in den Axonen der ORN vor und kann deshalb nicht in der olfaktorischen Biopsie nachgewiesen werden
- NCAM2 konnte in allen Analysen in der olfaktorischen Differenzierung nachgewiesen werden (qRT-PCR, Immunofluoreszenz-Färbung, Western Blot, FACS)
- NCAM2 kommt in einigen anderen Neuronentypen vor

→ NCAM2 ist **nicht sehr gut** geeignet, um ORN **im OE** zu färben, da es hauptsächlich in den Neuronen vorkommt

→ NCAM2 kann bedingt in der olfaktorischen Differenzierung verwendet werden. Es gibt auch andere Neurone die NCAM2 exprimieren, aber deutlich weniger als z.B. UCHL1

→ **In Kombination mit anderen Markern geeignet**

5.3.3. Komponenten der olfaktorischen Signalkaskade als Marker für ORN?

Als olfaktorische Signalkaskade wird die Reaktion der Zelle nach Bindung des Odoranten mit den Rezeptoren bis hin zur Generierung des Aktionspotentials definiert [166]. Die OR gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Wenn ein Duftstoff am OR in den Zilien der ORN bindet, wird die Alpha-Untereinheit des G-Proteins (GOLF) aktiviert und bindet an die ADCY3, die wiederum das cAMP in der Zelle erhöht [97, 98, 167]. cAMP bindet an membranverankerte Kanäle, die Ca^{2+} in die Zelle lassen, welches wiederum Chlorid-Kanäle – wie zum Beispiel TMEM16B – öffnet, die Cl^- aus der Zelle befördern [138, 139, 168]. Durch die Erhöhung des intrazellulären Potentials wird ein Aktionspotential generiert, welches über die Axone bis in den olfaktorischen Bulbus weitergeleitet wird. Drei der erwähnten, essenziellen Proteine der olfaktorischen Signalkaskade wurden in dieser Arbeit ebenfalls berücksichtigt (GOLF, ADCY3 und TMEM16B). Die Proteine kommen zwar nicht ausschließlich in den ORN vor, dennoch besitzen diese Proteine ebenfalls das Potential ORN zu kennzeichnen. Zudem ist das Vorkommen dieser Komponenten erforderlich für eine funktionelle Rezeption eines Duftstoffes und die Verarbeitung des Reizes in den ORN.

5.3.3.1. GOLF

Wie schon erwähnt ist GOLF das G-Protein, welches an die OR gekoppelt ist, nach Rezeption des Odoranten aktiviert wird und an die ADCY3 bindet. Das bedeutet, dass GOLF, ebenso wie die Rezeptoren, in den Zilien der ORN lokalisiert ist [167]. Das ist eindeutig in der GOLF-Färbung der Biopsie zu erkennen (Abbildung 4.4 B), in der das Protein punktuell nur im Epithelsaum zu erkennen ist, in dem auch die Zilien der ORN zu finden sind. GOLF eignet sich also hervorragend, um die Zilien in der olfaktorischen Biopsie anzufärben. In der Differenzierung wurde zunächst wieder die Expression von *GOLF* ermittelt. In Abbildung 4.27 A sieht man eine verstärkte Expression an Tag 106 der Differenzierung im Vergleich zu den iPSZ und in Abbildung 4.28 sieht man, dass die Expression von GOLF ab Tag 6 ansteigt, seinen Höhepunkt an Tag 33 besitzt und danach das Level relativ konstant hält. Das heißt, auch hier werden ab Tag 33 Zellen erwartet, die GOLF exprimieren und somit auch in der Färbung sichtbar sind. In Abbildung 4.29 A ist GOLF in Grün punktuell in den Zellen zu erkennen. Auffallend ist hier die Lokalisation von GOLF – eher im Zellkörper als in den Dendriten. OMP wurde ebenfalls gefärbt, hier in Rot dargestellt, und es ist deutlich zu erkennen, dass GOLF nicht in den OMP-positiven Zellen zu sehen ist. Möglicherweise sind diese ORN schon so reif, dass hier GOLF eher in den Dendriten sitzt, oder aber es sind unreife Neurone, die noch kein OMP aufweisen, aber GOLF schon exprimieren [169]. In Ratten wurde GOLF aber auch schon in anderen Gehirnregionen nachgewiesen, wodurch auch hier nicht-olfaktorische Neurone gefärbt worden sein können [170]. Auch in Regionen außerhalb des Gehirns wurde GOLF gezeigt, meistens zusammen mit OR-Genen, der ADCY3 und OMP [156]. Da hier jedoch eine Neuronenkultur vorliegt ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese Zellen hier vorkommen. Im Western Blot wird das Protein auf der Höhe von ungefähr 44 kDa erwartet, es sind jedoch Banden auf der Höhe von ca. 70 kDa zu erkennen. Da die Banden aber nur bei den Differenzierungen auftreten und nicht bei den iPSZ, ist es möglich, dass die Banden dennoch spezifisch sind. Eventuell ist die Alpha-Untereinheit des G-Proteins immer noch an die Beta- und Gamma-Untereinheiten gebunden, die eine Größe von 37 bzw. 8 kDa besitzen. In der FACS-Analyse spiegeln sich die Ergebnisse der qRT-PCR und der Färbung wieder. Zum frühen Zeitpunkt sind viele GOLF-positiven gemessen worden (58,5 %) und an Tag 162 nimmt die Anzahl der positiven Zellen deutlich ab (4,8 %). Das zeigt auch hier wieder, dass GOLF schon in den unreifen ORN vorkommt und später in der Differenzierung weniger unreife ORN vorkommen. Alles in allem ist GOLF ein interessanter Marker in der Biopsie des OE, in der olfaktorischen Differenzierung wiederum muss mit anderen Markern kombiniert werden, um eine spezifische Aussage machen zu können. Wenn jedoch mit anderen Markern positive ORN detektiert wurden, kann mit GOLF eventuell die Lokalisation der Zilien und somit auch der OR ausgemacht werden.

Tabelle 5.4: Überblick der Methoden zum Nachweis von GOLF

Methode	Zeitpunkt der Differenzierung	GOLF nachgewiesen
RNA-Expression	Ab Tag 6	+
Immunofluoreszenz-Färbung	Tag 95	+
	Tag 55	+
	Tag 65	+
	Tag 95	+
	Tag 98	+
	Tag 162	+

5.3.3.2. ADCY3

Genauso wie GOLF ist die ADCY3 in der olfaktorischen Signalkaskade von elementarer Bedeutung. In der Biopsie ist die ADCY3 sehr schön im apikalen Bereich des Epithels zu erkennen (Abbildung 4.4), wo es auch zu erwarten ist, da auch die ADCY3 in der Membran der Zilien verankert ist. In der Expression-Analyse in Abbildung 4.27 ist eine signifikant gesteigerte Expression von ADCY3 an Tag 106 im Vergleich zu den iPSZ zu sehen. Auch im Verlauf kann eindeutig ein kontinuierlicher Anstieg beobachtet werden (Abbildung 4.28). In der Färbung der olfaktorischen Differenzierung konnte jedoch keine ADCY3 nachgewiesen werden. Die ADCY3 zählt zu den Markern für reife ORN und kommt meist zusammen mit OMP auch in nicht-olfaktorischen Regionen vor [156, 167]. Es besteht die Möglichkeit, dass wie bei OMP an Tag 95 noch zu wenige reife ORN zu finden sind und deshalb ADCY3 nicht in der Färbung zu sehen ist. Auch hier müsste die Differenzierung deutlich verlängert werden, um mehr reife ORN zu erhalten.

Tabelle 5.5: Überblick der Methoden zum Nachweis von ADCY3

Methode	Zeitpunkt der Differenzierung	ADCY3 nachgewiesen
RNA-Expression	Ab Tag 6	+
Immunofluoreszenz-Färbung	Tag 95	-
	Tag 55	-
	Tag 65	-
	Tag 95	-

5.3.3.3. TMEM16B

TMEM16B ist ein Kalzium-abhängiger Chlorid-Kanal, der Cl^- aus der Zelle transportiert, wenn Ca^{2+} an TMEM16B bindet [138]. Da es aber auch noch andere Chlorid-Kanäle gibt, muss TMEM16B nicht zwangsläufig in jedem ORN vorkommen [100, 101]. In der Biopsie erkennt man die Färbung in den Dendriten der ORN (Abbildung 4.4 A). In den Expressionsdaten der olfaktorischen Differenzierung ist TMEM16B nicht dargestellt, weil in iPSZ keine Expression gemessen wurde und in der Differenzierung nur in sehr geringen Mengen an einigen wenigen Zeitpunkten (Daten nicht gezeigt). In der Färbung der

Differenzierung konnten jedoch einzelne Zellen TMEM16B aufweisen. In Abbildung 4.29 B ist deutlich zu erkennen, dass TMEM16B (Grün) in neuronalen Ausläufern lokalisiert ist, was sich mit den Erkenntnissen der Färbung des OE in der Biopsie deckt. Außerdem sind die Zellen, in denen TMEM16B punktuell zu sehen ist, zusätzlich OMP positiv (Rot). Das heißt, hier können über eine Kombination von zwei Markern eindeutig ORN gefärbt werden. Da die Mengen jedoch sehr gering sind konnte das Protein nicht in Western Blot Analysen nachgewiesen werden. In der FACS-Analyse wurde TMEM16B mit analysiert und an Tag 162 konnten 13,2 % positive Zellen bestimmt werden. Hier wurde TMEM16B zum frühen Zeitpunkt noch nicht mitgemessen, aber die Ergebnisse der Färbung (Tag 95) und der FACS-Analyse (Tag 162) legen nahe, dass TMEM16B, genau wie OMP, erst später exprimiert wird. Eine Markierung reifer ORN ist mit diesem Marker sehr gut denkbar, vor allem in Kombination mit OMP oder anderen Markern der olfaktorischen Signalkaskade.

Tabelle 5.6: Überblick der Methoden zum Nachweis von TMEM16B

Methode	Zeitpunkt der Differenzierung	TMEM16B nachgewiesen
RNA-Expression	-	-
Immunofluoreszenz-Färbung	Tag 95	+
	Tag 55	-
	Tag 65	-
	Tag 95	-
FACS	Tag 162	+

5.3.3.4. Zusammenfassung: Komponenten der olfaktorischen Signalkaskade als Marker

In diesem Kapitel wurden GOLF, ADCY3 und TMEM16B als Teile der olfaktorischen Signalkaskade in der olfaktorischen Differenzierung analysiert. Diese Proteine, die essenziell für die ORN sind, können als Marker dienen, sind aber gleichzeitig die Voraussetzung für eine funktionelle Signalaufnahme und Aktionspotentialgenerierung.

GOLF:

- Schöne Färbung in den Dendriten in der olfaktorischen Biopsie
 - RNA Expression in der olfaktorischen Differenzierung, konstant ab Tag 33
 - GOLF-Färbung in der olfaktorischen Differenzierung an Tag 95
 - Western Blot zeigt Banden mit der Größe von ca. 70 kDa, erwartet wurde 44 kDa
 - FACS-Analyse zeigt an Tag 98 58,5 % positive Zellen, an Tag 162 4,8 %
- ➔ GOLF konnte überall nachgewiesen werden und **eignet sich als Marker für ORN**
 - ➔ Vor allem die FACS-Analyse lässt vermuten, dass GOLF vor allem **unreife ORN** färbt
 - ➔ Da auch GOLF in nicht-olfaktorischen Regionen zu finden ist, sollte immer mit einer **Doppelfärbung** abgesichert werden

ADCY3:

- ADCY3 konnte schön in den Dendriten der ORN in der olfaktorischen Biopsie gefärbt werden
 - Die RNA-Expression während der olfaktorischen Differenzierung zeigt einen kontinuierlichen Anstieg
 - Es konnte keine Färbung an Tag 95 der olfaktorischen Differenzierung gefunden werden
- Die ADCY3 eignet sich hervorragend zum Darstellen der **Zilien der ORN in der olfaktorischen Biopsie**
- Für die olfaktorische Differenzierung ist ADCY3 für **frühe Zeitpunkte nicht geeignet**
- ADCY3 kann ein **guter Marker für reife ORN** sein, dafür müssen weitere Tests mit **späteren Zeitpunkten** der olfaktorischen Differenzierung gemacht werden

TMEM16B:

- TMEM16B konnte in den Dendriten der ORN in der olfaktorischen Biopsie gefärbt werden
 - Die RNA-Expression war sehr gering und konnte in der olfaktorischen Differenzierung nicht ermittelt werden
 - Es konnten einzelne ORN an Tag 95 der Differenzierung mit TMEM16B gefärbt werden
 - An Tag 162 konnten 13,2 % positive Zellen ermittelt werden
- TMEM16B eignet sich **gut als Marker für die Dendriten** der ORN in der olfaktorischen Biopsie
- In der olfaktorischen Differenzierung ist TMEM16B ein **Marker für reife ORN** und kann erst zu **späteren Zeitpunkten** detektiert werden

5.3.4. Olfaktorische Vorläuferzellen

Die olfaktorischen Vorläufer können in eine frühe und eine späte Population eingeteilt werden. Aus der späten Vorläuferpopulation entwickeln sich die ORN. Da manche Marker der Vorläufer auch in unreifen ORN noch auftreten, ist es interessant zu sehen, wie viele Zellen mit Vorläufermarker zu finden sind.

5.3.4.1. ASCL1

Einer der frühen Vorläufer-Marker ist Achaete-Scute Complex-Like 1 (ASCL1), der teilweise auch schon in den GBZ vorkommt [40, 136, 144]. In Abbildung 4.6 A ist sehr schön zu erkennen, dass ASCL1 die Zellen in der Mitte und am Grund des Epithels färbt. Die OMP-positiven Zellen werden dabei ausgelassen und sind nicht ASCL1 positiv. Das zeigt das ASCL1 ein Marker für frühe Vorläufer ist. Zusätzlich kommt ASCL1 auch schon in den GBZ vor die aus den HBZ hervorgehen. In der Differenzierung kann eine erhöhte Expression im Vergleich zu den iPSZ gemessen werden (Abbildung 4.36 A). In der Verlaufsdarstellung der RNA-Expression ist zu sehen, dass *ASCL1* sehr schwankt

(Abbildung 4.37). In iPSZ konnte hier keine Expression gemessen werden. Die Immunfluoreszenz-Färbung in Abbildung 4.38 A zeigt ASCL1 und OMP positive Zellen, die jedoch nicht ko-lokalisiert sind. Das zeigt, dass ASCL1 sehr früh in den Vorläufern vorkommt und in den reifen ORN nicht exprimiert wird. Da ASCL1 mit vielen anderen Gehirnregionen assoziiert ist, können diese positiven Zellen auch andere Neuronenvorläufer zeigen [171]. ASCL1 eignet sich gut als Marker in der olfaktorischen Biopsie, aber in der olfaktorischen Differenzierung muss auch hier mit anderen Markern abgesichert werden.

Tabelle 5.7: Überblick der Methoden zum Nachweis von ASCL1

Methode	Zeitpunkt der Differenzierung	ASCL1 nachgewiesen
RNA-Expression	Ab Tag 19	+
Immunofluoreszenz-Färbung	Tag 95	+

5.3.4.2. CALB2

Für die spätere Vorläufer-Population wurde Calbindin 2 (CALB2) verwendet [145]. Im Vergleich zu ASCL1 kommt CALB2 in der Biopsie nur mittig vor (Abbildung 4.6 B). Auch sind hier manche Zellen OMP positiv. Das zeigt, dass CALB2 zu den späten Vorläufern gehört und auch in unreifen ORN anzutreffen ist. Das macht diesen Marker für die Detektion von ORN in der olfaktorischen Differenzierung interessant, da dieser Marker schon früher exprimiert wird als OMP. In der Expressionsanalyse konnte eine signifikante Steigerung im Vergleich zu den iPSZ ermittelt werden (Abbildung 4.36 B). In der Verlaufsdarstellung steigt die Expression bis Tag 106 konstant an (Abbildung 4.37). Auch in der Färbung der olfaktorischen Differenzierung an Tag 95 konnten einige CALB2 positiven Zellen gefärbt werden. Es ist gut zu sehen, dass sie eine neuronale Struktur besitzen. Viele sind bipolar und weisen wie in der Biopsie eine Ko-Färbung mit OMP auf. Das unterstützt die Vermutung, dass auch unreife ORN mit CALB2 gefärbt werden. Auch hier muss beachtet werden, dass CALB2 in anderen Neuronen ebenfalls exprimiert wird. Aber in Kombination mit zum Beispiel OMP sind die positiven Zellen sehr wahrscheinlich ORN.

Tabelle 5.8: Überblick der Methoden zum Nachweis von CALB2

Methode	Zeitpunkt der Differenzierung	CALB2 nachgewiesen
RNA-Expression	Ab Tag 6	+
Immunofluoreszenz-Färbung	Tag 95	+

5.3.4.3. Zusammenfassung: Olfaktorische Vorläuferzellen

Es wurde ASCL1 für die frühen und CALB2 für die späten Vorläuferpopulationen verwendet.

ASCL1:

- Gute Färbung der **GBZ und Vorläufer in der olfaktorischen Biopsie**
 - Erhöhte RNA-Expression ab Tag 19
 - Schöne **Färbung in der olfaktorischen Differenzierung**, nicht-olfaktorische Zellen können aber nicht ausgeschlossen werden
 - Keine Kofärbung mit OMP
- **ASCL1 eignet sich als Marker früher Vorläufer und GBZ in der Biopsie**
- In der olfaktorischen Differenzierung kann ASCL1 **nur mit anderen Marker** zusammen verwendet werden

CALB2:

- Schöne Färbung von **Vorläufern und unreifen ORN in der olfaktorischen Biopsie**, teilweise mit OMP-Kofärbung
 - **Signifikante RNA-Expression** in der olfaktorischen Differenzierung im Vergleich zu den iPSZ
 - In der olfaktorischen Differenzierung wurden mit **CALB2 Neurone gefärbt**, auch hier teilweise zusammen mit OMP
- **CALB2 eignet sich für die Färbung von Vorläuferpopulationen und unreifen ORN in der olfaktorischen Biopsie**
- CALB2 eignet sich auch als Marker in der olfaktorischen Differenzierung, wenn es **mit anderen Markern**, wie OMP, kogefärbt wird

5.3.5. Zusammenfassung: ORN in der Differenzierung

Die wichtigste Aussage ist, dass in der olfaktorischen Differenzierung ORN gefunden wurden. Wie viele ORN wirklich in der Differenzierung vorkommen ist schwieriger zu beantworten, da hier immer die Möglichkeit besteht, dass auch andere Neurone die Marker exprimieren können. Zwar sind einige der Marker ziemlich spezifisch, wie zum Beispiel OMP, GOLF, ADCY3 und TMEM16B, aber auch diese Gene konnten in anderen Geweben nachgewiesen werden. In der Färbung kann man sich durch Doppelfärbungen absichern. Vor allem TUBB3 und OMP ist eine sehr gute Kombination, da TUBB3 die meisten Neuronen färbt, aber nicht reife ORN die aber OMP-positiv sind. In der FACS-Analyse können somit die wenigen OMP-positiven Zellen an Tag 162 auch andere Neurone sein, was jedoch sehr unwahrscheinlich ist, da OMP nur in wenigen, kleinen Subpopulationen im Gehirn vorkommt. Deshalb kann man davon ausgehen, dass 0,64 % der Zellen reife ORN sind. Es wird davon ausgegangen, dass viel mehr ORN, darunter OMP-negative, unreife ORN, vorhanden sind. Diese können aber nicht zu 100

% identifiziert werden, da viele Marker der unreifen ORN auch in anderen Neuronentypen vorkommen. Zur Verbesserung dieser Umstände können verschiedene Wege eingeschlagen werden. Wie schon öfters erwähnt kann eine Kombination der verschiedenen Marker die Wahrscheinlichkeit erhöhen wirklich ORN zu färben. Auch eine deutliche Verbesserung des Protokolls steigert die Wahrscheinlichkeit ORN mit diesen Markern anzufärben. Zudem sollten die Kulturbedingungen soweit verbessert werden, dass längere Differenzierungen mit 150 bis 250 Tagen möglich sind, ohne dass die Neurone vorher absterben. Eine weitere Möglichkeit die ORN eindeutig nachzuweisen, ist die Messung der Antwort der Neurone auf die Zugabe von Odoranten. Denn funktionelle ORN sollten die einzigen Neurone sein, die darauf reagieren. In dieser Arbeit wurde dies mit Kalzium-Imaging nachgewiesen und in Kapitel 5.5 diskutiert.

5.4. Andere Zelltypen des OE in der olfaktorischen Differenzierung

Nachdem die ORN mit verschiedenen Markern und Methoden nachgewiesen wurden, interessierte uns, ob auch die anderen Zelltypen des OE in der olfaktorischen Differenzierung auftauchen. Die Basalzellen sollten ebenfalls zu finden sein, weil die ORN aus diesen Zellen hervorgehen. Die Stützzellen des OE sind vermutlich schwerer in der Differenzierung zu finden, hier gibt es keine geordnete Struktur, dennoch entstehen auch die Stützzellen aus den Basalzellen und könnten somit in der Neuronenkultur ebenfalls zu finden sein. Hier wurden ebenfalls Expressions-Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen zum Nachweis von Proteinen durchgeführt.

5.4.1. Olfaktorische Basalzellen

Es wurden zwei verschiedene Marker für die Basalzellen genutzt. Der Transkriptionsfaktor Sex Determining Region Y-Box 2 (SOX2), der in beiden Basalzelltypen vorkommt, aber auch in Stützzellen, der Nerve Growth Factor Receptor (NGFR), der ebenfalls in beiden Basalzelltypen vorkommt und wie der Name schon sagt, auch in anderen neuralen Stammzellen und Vorläuferzellen, die den Nerve Growth Factor (NGF) für ihr Wachstum und ihre Differenzierung zu Neuronen benötigen [136, 137]. In der olfaktorischen Biopsie kann man mit beiden Markern gute Ergebnisse erhalten (Abbildung 4.5). Sowohl SOX2 als auch NGFR färben Zellen, die eindeutig am Epithelgrund lokalisiert sind. Zusätzlich dazu sind auch SOX2 positive Zellen zu sehen, die weiter oben im Epithel vorkommen. Die untersten Zellen sind höchstwahrscheinlich die HBZ, da sie auch die typische flache, horizontale Form besitzen. Die Zellen darüber können GBZ oder frühe Vorläufer sein. Die obersten sind wahrscheinlich Stützzellen, die ebenfalls SOX2 exprimieren können. Das heißt mit SOX2 kann man die Basalzellen hervorheben, aber auch andere Strukturen werden angefärbt und nur anhand der Lokalisation im OE kann man die verschiedenen Zelltypen voneinander unterscheiden. NGFR färbt hauptsächlich die GBZ, die eine Lage höher als die flachen HBZ liegen. NGFR färbt nicht den Zellkern oder die ganze Zelle, sondern ist als Rezeptor in der Membran der Basalzellen lokalisiert. In der olfaktorischen Differenzierung wurde die Expression beider Gene ermittelt und auch hier wurden signifikante Expressionssteigerungen an Tag 106 der Differenzierung im Vergleich zu den iPSZ gemessen (Abbildung 4.33). Die Verläufe der Basalzell-

Marker steigen ebenfalls im Laufe der Differenzierung an (Abbildung 4.34). Vor allem NGFR weist schon am zweiten Tag einen starken Anstieg auf und steigert sich weiter bis zum Ende der Differenzierung. SOX2 hat keine so deutliche Änderung und schwankt auch etwas mehr im Laufe der Differenzierung, was sich aber durch Expression von SOX2 in vielen verschiedenen Zelltypen erklären lässt. Da SOX2 auch ein Pluripotenz-Marker ist und schon in den iPSZ exprimiert wird, kann man von Anfang an von einer starken SOX2 Expression ausgehen. In der Immunfluoreszenz-Färbung der olfaktorischen Differenzierung sind sowohl SOX2 als auch NGFR positive Zellen zu erkennen (Abbildung 4.35). Zusätzlich wurde bei beiden auch TUBB3 mitgefärbt, um die Neurone in der Kultur darzustellen. Die SOX2 positiven Zellen sind keine Neurone und weisen auch keine TUBB3 Färbung auf. Ob die gefärbten Zellen jedoch olfaktorische Basalzellen sind, kann man nicht beantworten. Da SOX2 sowohl in Stützzellen, als auch in anderen neuronalen Stammzellen und Vorläuferzellen vorkommt, ist der Transkriptionsfaktor für den spezifischen Nachweis von Basalzellen in der neuronalen Zellkultur nicht geeignet. NGFR ist ebenfalls ein Protein, welches in anderen Vorläuferzellen vorkommen kann. Auch hier können die olfaktorischen Basalzellen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Für genauere Analysen der Basalzellen in der Zellkultur müssen weitere Marker hinzugezogen werden. Auch eine Verbesserung des Protokolls, und damit eine Verminderung von anderen neuronalen Stammzellen, ist denkbar. Dennoch weisen beide Marker auf die Existenz von neuronalen Basalzellen hin.

5.4.2. Stützzellen des OE

Die Stützzellen geben dem OE Stabilität und leisten den anderen olfaktorischen Zellen Beistand durch metabolische und strukturelle Unterstützung. Ob auch in der olfaktorischen Differenzierung, in der durch die adhärenzte Kultur keine physische Stütze gebraucht wird, Stützzellen zu finden sind, sollte mit dem Marker E-Cadherin (ECAD) getestet werden [136]. Im OE aus der Biopsie kann man die Färbung an der Membranoberfläche der Stützzellen erkannt werden, die sich durch das ganze OE ziehen (Abbildung 4.7). Auch SOX2 ist, wie oben schon erwähnt, in Stützzellen exprimiert und kann in Abbildung 4.5 teilweise den Stützzellen zugeordnet werden. In der Differenzierung wurde in Abbildung 4.40 ECAD einmal zusammen mit SOX2 und einmal mit TUBB3 gefärbt. Interessanterweise gibt es keine Doppelpositiven Zellen in der SOX2/ECAD Färbung. Die SOX2 positiven Zellen können auch olfaktorische Basalzellen oder andere neuronale Stammzellen sein. Auffallend ist auch, dass ECAD im Zellkern färbt und nicht wie im OE in der Zellmembran. Möglicherweise verbleibt das Protein im Zellkern, da keine Zell-Zell-Kontakte benötigt werden. Auch in Abbildung 4.40 B ist ECAD im Zellkern zu erkennen. Zusätzlich sind diese Zellen TUBB3-positiv, also neuronale Zellen. Das kann daran liegen, dass die olfaktorischen Stützzellen ebenfalls aus den Basalzellen entstehen und somit auch ektodermalen Ursprungs sind.

5.5. Sind die ORN in der olfaktorischen Differenzierung funktionell?

Wir haben in den vorherigen Versuchen herausgefunden, dass ORN in der olfaktorischen Differenzierung durchaus zu finden sind. Die große Frage ist jetzt, sind diese ORN auch funktionell?

Können diese Neurone ein Aktionspotential generieren? Kann das Aktionspotential durch die Rezeption von externen Duftstoffen erzeugt werden? Um diese Fragen zu beantworten mussten zunächst einige Voraussetzungen geschaffen werden. Die ORN benötigend weitgehend alle Komponenten der Signalkaskade. Einige davon konnten schon in Expressions- und/oder Protein-Analysen nachgewiesen werden, doch der wichtigste und initiale Schritt, die Rezeption, benötigt die Anwesenheit von OR. Um diese zu detektieren, stößt man auf zwei Probleme: Erstens gibt es sehr viele OR – mehr als 300 funktionierende Gene beim Menschen [72, 76] – und zweitens sind zurzeit keine brauchbaren Antikörper für die OR kommerziell aufzutreiben. Für das erste Problem gibt es eine einfache, aber auch riskante Lösung – es muss eine Auswahl getroffen werden, wodurch natürlich die Gefahr besteht genau die OE zu bestimmen, die in unserer Kultur eventuell nicht vorkommen. Durch das zweite Problem blieb uns nichts Anderes übrig, als die Expressions-Daten der ausgewählten OR zu ermitteln. Der zweite Teil der funktionellen Analyse ist in der Theorie simpel: Es wird ein Mix aus Odoranten zu den Zellen gegeben und untersucht, ob die Zellen darauf reagieren. Um diese Reaktion sichtbar zu machen, wurde ein so genanntes Kalzium-Imaging durchgeführt. Dabei werden die Zellen mit einem Farbstoff behandelt, der an Ca^{2+} -Ionen bindet. Sollte eine Änderung der Ca^{2+} -Konzentration, zum Beispiel durch die Öffnung von Kalzium-Kanälen und dem resultierenden Einstrom der Ionen, eintreten, wäre das durch ein Aufleuchten der Zellen zu erkennen.

5.5.1. Welche OR wurden ausgewählt und warum?

In dieser Arbeit konnten nicht alle OR untersucht werden, deshalb wurde eine Auswahl von acht verschiedenen OR getroffen, deren Expression exemplarisch analysiert wurden. Diese acht OR wurden anhand von unterschiedlichen Kriterien gewählt. OR2S2, OR13C5 und OR13C8 wurden ausgewählt, da in der Gruppe von Jörg Strotmann diese Rezeptoren schon in der Maus untersucht wurden [172, 173]. Die anderen fünf OR wurden anhand der Odoranten ausgesucht, die sie binden können. Nur für wenige OR ist sind die entsprechenden Duftstoffe beschrieben. Einer der besser beschriebenen OR ist OR1G1, die erste Isoform der Unterfamilie G der Familie 1 der OR [174-176]. Dieser OR wurde mit vielen Duftstoffen assoziiert, die teilweise auch an andere OR binden können. Dieser OR und die entsprechenden Duftstoffe dienten uns als Ausgang für die Suche weiterer OR. Es wurden OR gesucht, von denen die entsprechenden Odoranten bekannt waren und sie sollten auf möglichst viele Duftstoffe ansprechen. Außerdem haben wir darauf geachtet, dass die OR weitgehend mit den gleichen Duftstoffen aktiviert werden können, damit die Anzahl der Odoranten, mit denen die funktionellen Analysen durchgeführt werden sollen, relativ klein gehalten werden konnte. Im Endeffekt wurde zusätzlich zu OR1A1 auch OR1A1, OR2J2, OR2W1 und OR5P3 untersucht [86, 177]. Die Duftstoffe des Odorantenmixes sind in Tabelle aufgeführt. Die OR die den jeweiligen Odoranten binden können sind ebenfalls in der Tabelle angegeben. Drei der Duftstoffe binden nicht an die ausgewählten OR, sind jedoch weitverbreitete Liganden von anderen OR.

Tabelle 5.9: Liste des Odorantenmixes mit den entsprechenden Rezeptoren

Odorant	Aroma	OR1A1	OR1G1	OR2J2	OR2W1	OR5P3
(S)-(-)-Limonene	Limone	-	-	-	-	-
1-Heptanol	Fruchtig	+	-	+	+	+
1-Nonanol	Citrus, Rose	-	+	+	+	-
2-Heptanone	Banane, Zimt	+	-	-	+	-
Acetophenone	Mandel	-	-	-	+	+
Anisole	Anis	-	-	-	-	-
Coumarin	Scharf	-	-	+	+	+
D-Camphor	Ätherisch, Minze	-	-	-	-	-
D-Carvone	Kümmel	+	-	-	+	+
Isoamyl acetate	Banane, Birne	-	-	-	-	-
L-Carvone	Krautig, Pfefferminze	+	-	-	+	+
Nonanal	Limone, Grapefruit	-	+	-	+	-

5.5.2. Expression der OR

Damit die ORN in der Differenzierung untersucht werden können, müssen OR vorhanden sein, da sie die Duftstoffe binden und somit die erste Station der olfaktorischen Signalkaskade darstellen. Ohne die OR können keine Odoranten binden und somit ein Signal auslösen, dass ein Aktionspotential initiiert. Deshalb wurde die Expression von den ausgewählten OR gemessen. Eine Immunfluoreszenz-Färbung wurde mangels Antikörper nicht durchgeführt. In Abbildung 4.41 sind die Expressions-Daten der OR an Tag 121 der Differenzierung aufgeführt. Im Vergleich zu den iPSZ ist die Expression aller OR deutlich erhöht. Damit lässt sich die Aussage treffen, dass diese OR in der olfaktorischen Differenzierung exprimiert sind. Da die Expressions-Daten bei allen OR ähnlich sind, wird davon ausgegangen, dass auch die meisten anderen OR-Gene exprimiert werden. Durch diese Erkenntnisse kann man davon ausgehen, dass funktionelle OR in den ORN vorkommen. Ohne die Proteinanalyse kann jedoch nicht ermittelt werden, ob die OR auch in der Membran verankert sind.

5.5.3. Kalzium-Imaging

Kalzium-Imaging ist eine Methode, um die Funktionalität von Neuronen zu testen und sichtbar zu machen. In diesem Fall sollten die ORN auf ihre Funktionalität getestet werden. Die Zellen wurden mit einem Kalzium-bindenden Farbstoff behandelt und sobald die Neurone aktiv sind und sich eine Änderung des Kalzium-Spiegels ereignet, kann dieses Ereignis unter dem Mikroskop als Aufblitzen der Fluoreszenz des Farbstoffes beobachtet werden [178]. Um nur die ORN zu aktivieren, wurde der Odorantenmix zum Medium der Zellen hinzugefügt und gleichzeitig die Änderung der Fluoreszenz unter dem Mikroskop aufgenommen. Da viele Neurone eine Spontanaktivität besitzen, also auch ein Signal abgeben, ohne einen äußeren Reiz zu erhalten, wurde diese als erstes ermittelt, damit sie am Ende von der echten Antwort abgezogen werden kann. Dafür wurden drei Minuten lang alle 0,3

Sekunden ein Bild aufgenommen. Anschließend wurde der Odorantenmix hinzugefügt und eine weitere Aufnahmereihe von drei Minuten wurde gestartet. In den Abbildungen 4.42-4.44 sind jeweils mehrere Zeitpunkte dargestellt. In der ersten Spalte ist die Spontanaktivität abgebildet, mit dem ersten Ausgangsbild am Anfang der drei Minuten, in der Mitte die Überlagerung aller Bilder während dieser drei Minuten und rechts wurde das Ausgangsbild von den überlagerten Bildern abgezogen. Alles was in diesem Bild zu sehen ist, ist die Aktivität der Zellen, die innerhalb von drei Minuten detektiert wurde. In der nächsten Zeile sind die Bilder zu sehen, die nach Zugabe des Odorantenmixes aufgenommen wurden. Auch hier wurde links das Ausgangsbild dargestellt, in der Mitte die Überlagerung aller Bilder und rechts wurde das Ausgangsbild von den überlagerten Bildern abgezogen. Um deutlich zu machen wieviel Aktivität nach Odorantenzugabe dazukam, wurde im kombinierten Bild in Grün die übereinander gelagerten Bilder der Spontanaktivität gezeigt und in Rot das Differenzbild von der Überlagerung ohne das Ausgangsbild. Die Tage an denen ein Kalzium-Imaging gemacht wurden, mussten anhand des Zustands der Zellen in der Differenzierung ausgesucht werden. Die Zellen müssen noch soweit intakt und fest angeheftet sein, dass sie sich nach der Zugabe des Odorantenmixes nicht ablösen. Deshalb wurden relativ frühe Zeitpunkte (Tag 87 bei Abbildung 4.42 und 4.43 und Tag 60 bei Abbildung 4.44). Da die Odoranten alle in Ethanol (EtOH) gelöst wurden, wurde zunächst eine Kontrolle gemessen in der nur Ethanol in der gleichen Menge zugegeben wird, wie bei dem Odorantenmix (Abbildung 4.42). Als ersten wurde die Spontanaktivität gemessen, in der kein Signal zu sehen war, nach Abzug des Referenzbildes. Nach der Zugabe von EtOH wurde wieder gemessen und nur wenige, einzelne Signale konnten gemessen werden. Um vergleichbar zu bleiben, wurde im nächsten Versuch in Abbildung 4.43 eine Stelle gesucht, in der die Zellen morphologisch den Zellen aus Abbildung 4.42 gleichen. Auch hier wurde die gleiche Differenzierung an Tag 87 verwendet. Die gemessene Spontanaktivität ist wie bei dem ersten Versuch eigentlich nicht vorhanden, aber nach Zugabe des Odorantenmixes konnten deutlich mehr Zellen gesehen werden, die aufleuchten (rote Zellen im Kombinationsbild in Abbildung 4.43). Das zeigt, dass Zellen auf Odoranten wirken, aber nicht auf das Lösungsmittel EtOH. Die olfaktorische Differenzierung bringt verschiedene Zellpopulationen hervor und im Well verteilt können morphologisch gesehen unterschiedliche Bereiche erkannt werden. Deshalb wurde mit einer anderen Differenzierung an Tag 60 ein weiteres Kalzium-Imaging durchgeführt. Hier wurde im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen ein Bereich ausgesucht, indem viele Neuronenausläufer – Dendriten und Axone – zu sehen sind. Die Vermutung war eine höhere Reaktion auf den Stimulus, da bei Aktivierung der Neurone vor allem in den Neuriten eine Äderung in der Kalzium-Konzentration erfolgt. In Abbildung 4.44 sind schon bei der Messung der Spontanaktivität deutlich mehr Signale zu sehen, was bedeutet, dass hier funktionelle Neurone vorliegen. Ob diese Neurone auch ORN sind wurde durch die Zugabe des Odorantenmixes getestet. Im Kombinationsbild ist in Rot der Zuwachs an Aktivität in Folge der Odorantenzugabe zu sehen. Einige dieser Neurone reagieren also eindeutig auf die Odoranten. Das lässt vermuten, dass zumindest einige ORN in dieser Kultur vorhanden sind. Es wird nicht davon ausgegangen, dass alle Neurone die aufleuchten, auch ORN sind. Zu diesem Zeitpunkt erwarten wir anhand der vorherigen Ergebnisse nur wenige reife ORN. Wahrscheinlich sind die Neurone eher in einem Netzwerk über Synapsen verbunden und reife ORN

können das generierte Aktionspotential an andere Neurone übertragen. Diese Neurone würden ebenfalls ihre Ca^{2+} -Konzentration ändern, wodurch ein Signal zu erkennen ist. Möglicherweise sind diese Neurone sogar Mitralzellen oder andere Interneurone, die in den Glomeruli im olfaktorischen Bulbus mit den Axonen der ORN verbunden sind [32, 179]. Diese Ergebnisse zeigen nicht nur, dass sich reife ORN in dieser Kultur befinden, sondern auch, dass sie funktionell sind. Da zu einem sehr frühen Zeitpunkt gemessen wurde und in vorherigen Versuchen mit OMP gezeigt wurde, dass es später mehr reife ORN gibt, kann davon ausgegangen werden, dass das Signal in älteren Kulturen deutlich erhöht wird. Auch wurde nur eine Auswahl an Odoranten verwendet, die nicht alle OR ansprechen. Somit werden wahrscheinlich auch nicht alle ORN aktiviert, da ein ORN immer nur ein OR exprimiert [7, 78, 79, 83]. Im Endeffekt könnte durch eine Verbesserung des Protokolls und der Kulturbedingungen die Anzahl der funktionellen reifen ORN erhöht werden. Dann kann man auch die Versuchsanordnung soweit standardisieren, dass die Anzahl der funktionierenden Zellen ermittelt werden kann. Weiterhin sind auch elektrophysiologische Versuche denkbar um eindeutig funktionelle ORN zu ermitteln.

5.5.4. Zusammenfassung: funktionelle ORN in der olfaktorischen Differenzierung?

- Es konnte eine Expression von 8 verschiedenen OR in der olfaktorischen Differenzierung ermittelt werden
- Zellen reagieren mit Kalzium-Einstrom auf die Zugabe von Odoranten an Tag 60 und Tag 87

➔ Mit diesem Protokoll können funktionelle ORN geschaffen werden

5.6. Fazit und Ausblick

5.6.1. Fazit

Was haben wir in dieser Arbeit gelernt? Es wurde ein Protokoll entwickelt um aus iPSZ olfaktorische Zellen des OE zu differenzieren. Der Fokus wurde dabei auf die ORN gelegt. Mit OMP als wichtigster Marker wurde herausgefunden, dass es reife ORN in dieser Kultur gibt. Hier ist zu beachten, dass vor allem bei einer längeren Differenzierung (150 Tage und mehr) mehr reife ORN detektiert werden konnten. An früheren Zeitpunkten konnten nur Marker für unreife ORN oder Vorläufer detektiert werden. Hier ist Vorsicht geboten, da viele der Marker auch in anderen Neuronen exprimiert werden. Zudem wurden Marker für olfaktorische Basalzellen und für Stützzellen des OE in der Differenzierung nachgewiesen. Für den funktionellen Nachweis der ORN wurden einige Vertreter der olfaktorischen Signalkaskade, wie GOLF, ADCY3, TMEM16B und 8 verschiedene OR gemessen, damit die Voraussetzungen einer funktionellen Antwort gewährleistet sind. Im Anschluss wurde durch ein Kalzium-Imaging nachgewiesen, dass an Tag 60 und 87 funktionelle ORN in der Differenzierung vorkommen. Das heißt das Hauptziel wurde erreicht, es konnten funktionelle und reife ORN mit verschiedenen Methoden in dem olfaktorischen Differenzierungsprotokoll nachgewiesen werden.

5.6.2. Verbesserung des Protokolls

Mit diesem Protokoll als Basis können viele Aspekte angegangen werden. Doch zunächst sollte das Protokoll soweit verbessert werden, dass eine größere Anzahl reifer ORN untersucht werden kann. Dafür sollten die Kulturbedingungen soweit angepasst werden, dass längere Kulturen gehalten werden können, ohne dass die Neurone abschwimmen oder absterben. Das kann durch Verwendung größerer Wells geschehen, damit die Zellen zu späteren Zeitpunkten nicht zu dicht wachsen und die Neurone von Gliazellen oder ähnlichem überwachsen werden. Andere Beschichtungen sind eine Möglichkeit die Neurone länger auf den Wells anhaften zu lassen. Es sollte auch fokussiert werden, dass zu früheren Zeitpunkten mehr reife ORN in der Kultur zu finden sind. Wie wissen durch die Ergebnisse, dass auch schon früh funktionelle und auch OMP-positive ORN zu finden sind, wenn auch nur wenige. Diese Population kann man über FACS herausortieren und weiterkultivieren. Eine weitere Möglichkeit wäre an einem früheren Zeitpunkt anzusetzen und Zellen der olfaktorischen Plakode zu selektionieren und somit die Entstehung der olfaktorischen Zellen zu fördern. Interessante Marker dafür wären SIX1 und EYA2, die in der präplakodalen Region und in der olfaktorischen Plakode vorkommen [26]. Diese Marker sind in der Differenzierung im Rand der Rosetten zu finden und könnten dort von den anderen Zellen separiert werden. Mit den iPSZ als Ausgangszellen besteht auch die Möglichkeit über Vektoren Linien herzustellen, die den Promotor dieser Gene zusammen mit Genen fluoreszierender Proteine, wie zum Beispiel GFP, ins Genom der Zellen zu integrieren. Dadurch wird sobald die Promotoren aktiviert und abgelesen werden zusätzlich zu den Markern auch ein Fluoreszenzprotein synthetisiert, welchen die Zellen anzeigt, die man von den anderen trennen muss.

5.6.3. Olfaktorische Basalzellen aus der Biopsie des OE

Eine neue Herangehensweise für ein olfaktorisches Differenzierungsprotokoll wäre die Verwendung von olfaktorischen Stammzellen, also die Basalzellen, als Ausgangsmaterial für die Differenzierung. Tatsächlich wurden schon erste Versuche in diese Richtung durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Bisher konnten die Stammzellen aber nicht in Kultur gehalten werden. Orientiert wurde sich am Protokoll von Feron *et al.*, die schon erfolgreich humane Biopsien in Kultur genommen haben [151, 180]. Während diese Gruppe Zugang zu Biopsien lebender Menschen haben, wurde in dieser Arbeit auf Körperspender post mortem zurückgegriffen, wodurch die Qualität der Biopsie und auch der Basalzellen beeinträchtigt ist.

5.6.4. Weitere Marker für die olfaktorischen Zelltypen

Für den Nachweis der reifen ORN und den anderen Zellen des OE muss meistens eine Kombination an Antikörpern verwendet werden. Es gibt aber noch eine ganze Reihe von Marker die getestet werden können. In den OR gibt es zum Beispiel noch weitere Beteiligte der olfaktorischen Signalkaskade. Die cAMP-gesteuerten Kanäle, die nach cAMP-Bindung Natrium und Kalzium in die Zelle befördern sind ebenfalls speziell für das olfaktorische System beschrieben [181]. Auch die anderen Zelltypen, wie die

Vorläuferzellen können näher untersucht werden. Activatin Transcription Factor 5 (ATF5) ist zum Beispiel ein Marker, der in den Vorläufern exprimiert wird und bei der Reifung der ORN beteiligt sein soll [182, 183]. Auch die Basalzellen können mit weiteren Markern gezeigt werden. Die HBZ und die GBZ können vor allem mit Zytokeratinen auseinandergelassen werden, da die GBZ keine Zytokeratine exprimieren [136, 143].

5.6.5. Entwicklung des OE im Menschen

Die iPSC bieten die einzigartige Möglichkeit die Entwicklung des OE im Menschen zu betrachten, wenn man ein gutes Protokoll etabliert hat. Es ist einiges aus anderen Spezies bekannt, vor allem über die PPR und die olfaktorische Plakode, doch welche Faktoren zwischen Plakode und OE eine Rolle spielen ist noch unklar, genauso, ob die bisher bekannten Faktoren in der PPR und der Plakode auch beim Menschen zu finden sind. Hier gibt es noch viel Potential, Signalwege zu analysieren, die mit der Entwicklung des OE zu tun haben.

5.6.6. Rezeptor-Odoranten Interaktionen

Bisher sind nur sehr wenige OR bekannt die mit spezifischen Odoranten assoziiert sind [86]. Wenn ein Protokoll etabliert ist, mit dem man eine große Zahl ORN mit verschiedenen OR generieren kann, können Odoranten-Rezeptor Interaktionen untersucht werden. Beispielsweise ist denkbar, dass bei einer frühen Überexpression eines bestimmten OR am Ende eine ORN-Kultur entsteht, die nur diesen OR exprimiert. Dann könnte man systematisch verschiedene Duftstoffe für diesen OR testen.

5.6.7. Patientenspezifische ORN

Ein großer Vorteil der iPSC ist die Möglichkeit der Generierung patientenspezifischer Zellen. Das heißt, man kann von Anosmie-Patienten mit genetischem Hintergrund iPSC generieren, die das identische Genom aufweisen. Somit besitzen auch die differenzierten ORN die spezifische Mutation und können eventuell einen bestimmten Phänotyp aufweisen. Diese Erkenntnisse können helfen olfaktorische Krankheiten wie das Kallmann-Syndrom besser zu verstehen [184, 185].

6. Literatur

Bücher:

Anatomie Das Lehrbuch, J. Waschke, T.M. Böckers, F. Paulsen, 1. Auflage 2015, Elsevier GmbH, München
Anatomie, F.H. Martini, M.J. Timmons, R.B. Tallitsch, 6. Auflage 2012, Pearson Deutschland GmbH, München
Prometheus LernAtlas der Anatomie, Kopf und Neuroanatomie, M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, K. Wesker, 2006, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
Embryologie, K.L. Moore, T.V.N. Persaud, M.G. Torchia, 6. Auflage 2013, Elsevier GmbH, München

1. Ache, B.W. and J.M. Young, *Olfaction: diverse species, conserved principles*. Neuron, 2005. **48**(3): p. 417-30.
2. Albrecht, J. and M. Wiesmann, *[The human olfactory system. Anatomy and physiology]*. Nervenarzt, 2006. **77**(8): p. 931-9.
3. Buck, L. and R. Axel, *A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition*. Cell, 1991. **65**(1): p. 175-87.
4. Niimura, Y. and M. Nei, *Evolution of olfactory receptor genes in the human genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12235-40.
5. Malnic, B., P.A. Godfrey, and L.B. Buck, *The human olfactory receptor gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2584-9.
6. Niimura, Y. and M. Nei, *Evolutionary changes of the number of olfactory receptor genes in the human and mouse lineages*. Gene, 2005. **346**: p. 23-8.
7. Malnic, B., et al., *Combinatorial receptor codes for odors*. Cell, 1999. **96**(5): p. 713-23.
8. Hahn, I., P.W. Scherer, and M.M. Mozell, *Velocity profiles measured for airflow through a large-scale model of the human nasal cavity*. J Appl Physiol (1985), 1993. **75**(5): p. 2273-87.
9. Sutovsky, P. and G. Schatten, *Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion*. Int Rev Cytol, 2000. **195**: p. 1-65.
10. Foulk, R.A., *From fertilization to implantation*. Early Pregnancy, 2001. **5**(1): p. 61-2.
11. Morris, S.A., et al., *Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6364-9.
12. Denker, H.W., *Implantation: a cell biological paradox*. J Exp Zool, 1993. **266**(6): p. 541-58.
13. Yamanaka, Y., F. Lanner, and J. Rossant, *FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst*. Development, 2010. **137**(5): p. 715-24.
14. Stern, C.D. and K.M. Downs, *The hypoblast (visceral endoderm): an evo-devo perspective*. Development, 2012. **139**(6): p. 1059-69.
15. Halacheva, V., et al., *Planar cell movements and oriented cell division during early primitive streak formation in the mammalian embryo*. Dev Dyn, 2011. **240**(8): p. 1905-16.
16. Rock, J. and A.T. Hertig, *The human conceptus during the first two weeks of gestation*. Am J Obstet Gynecol, 1948. **55**(1): p. 6-17.
17. Streit, A., *Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes*. Dev Biol, 2004. **276**(1): p. 1-15.
18. Bailey, A.P., et al., *Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity*. Dev Cell, 2006. **11**(4): p. 505-17.
19. Streit, A., *The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia*. Int J Dev Biol, 2007. **51**(6-7): p. 447-61.
20. Saint-Jeannet, J.P. and S.A. Moody, *Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities*. Dev Biol, 2014. **389**(1): p. 13-27.
21. Bhattacharyya, S., et al., *Segregation of lens and olfactory precursors from a common territory: cell sorting and reciprocity of Dlx5 and Pax6 expression*. Dev Biol, 2004. **271**(2): p. 403-14.
22. Bhattacharyya, S. and M. Bronner-Fraser, *Competence, specification and commitment to an olfactory placode fate*. Development, 2008. **135**(24): p. 4165-77.

23. Stern, C.D., *Neural induction: 10 years on since the 'default model'*. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(6): p. 692-7.
24. McLaren, K.W., A. Litsiou, and A. Streit, *DLX5 positions the neural crest and preplacode region at the border of the neural plate*. *Dev Biol*, 2003. **259**(1): p. 34-47.
25. Bailey, A.P. and A. Streit, *Sensory organs: making and breaking the pre-placodal region*. *Curr Top Dev Biol*, 2006. **72**: p. 167-204.
26. Moody, S.A. and A.S. LaMantia, *Transcriptional regulation of cranial sensory placode development*. *Curr Top Dev Biol*, 2015. **111**: p. 301-50.
27. Nikolopoulou, E., et al., *Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms*. *Development*, 2017. **144**(4): p. 552-566.
28. Bhasin, N., et al., *Mesenchymal/epithelial regulation of retinoic acid signaling in the olfactory placode*. *Dev Biol*, 2003. **261**(1): p. 82-98.
29. Cuschieri, A. and L.H. Bannister, *The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy*. *J Anat*, 1975. **119**(Pt 2): p. 277-86.
30. Gong, Q. and M.T. Shipley, *Evidence that pioneer olfactory axons regulate telencephalon cell cycle kinetics to induce the formation of the olfactory bulb*. *Neuron*, 1995. **14**(1): p. 91-101.
31. Mueller, B.K., *Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding*. *Annu Rev Neurosci*, 1999. **22**: p. 351-88.
32. Feinstein, P. and P. Mombaerts, *A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system*. *Cell*, 2004. **117**(6): p. 817-31.
33. Strotmann, J., et al., *Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons*. *J Neurosci*, 2004. **24**(35): p. 7754-61.
34. Chuah, M.I., A.I. Farbman, and B.P. Menco, *Influence of olfactory bulb on dendritic knob density of rat olfactory receptor neurons in vitro*. *Brain Res*, 1985. **338**(2): p. 259-66.
35. Costanzo, R.M. and E.E. Morrison, *Three-dimensional scanning electron microscopic study of the normal hamster olfactory epithelium*. *J Neurocytol*, 1989. **18**(3): p. 381-91.
36. Menco, B.P., *Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and nasal respiratory structures of frog, ox, rat, and dog. I. A general survey*. *Cell Tissue Res*, 1980. **207**(2): p. 183-209.
37. Mombaerts, P., et al., *Visualizing an olfactory sensory map*. *Cell*, 1996. **87**(4): p. 675-86.
38. Najac, M., et al., *Monosynaptic and polysynaptic feed-forward inputs to mitral cells from olfactory sensory neurons*. *J Neurosci*, 2011. **31**(24): p. 8722-9.
39. Danciger, E., et al., *Olfactory marker protein gene: its structure and olfactory neuron-specific expression in transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(21): p. 8565-9.
40. Graziadei, P.P. and G.A. Graziadei, *Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons*. *J Neurocytol*, 1979. **8**(1): p. 1-18.
41. Huard, J.M., et al., *Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells*. *J Comp Neurol*, 1998. **400**(4): p. 469-86.
42. Leung, C.T., P.A. Coulombe, and R.R. Reed, *Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(6): p. 720-6.
43. Iwai, N., et al., *Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium*. *Stem Cells*, 2008. **26**(5): p. 1298-306.
44. Holbrook, E.H., K.E. Szumowski, and J.E. Schwob, *An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium*. *J Comp Neurol*, 1995. **363**(1): p. 129-46.
45. Chen, X., H. Fang, and J.E. Schwob, *Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium*. *J Comp Neurol*, 2004. **469**(4): p. 457-74.
46. Mackay-Sim, A., *Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa*. *Arch Ital Biol*, 2010. **148**(2): p. 47-58.
47. Suzuki, J., et al., *Neural crest-derived horizontal basal cells as tissue stem cells in the adult olfactory epithelium*. *Neurosci Res*, 2013. **75**(2): p. 112-20.
48. Rafols, J.A. and T.V. Getchell, *Morphological relations between the receptor neurons, sustentacular cells and Schwann cells in the olfactory mucosa of the salamander*. *Anat Rec*, 1983. **206**(1): p. 87-101.

49. Zielinski, B.S., M.L. Getchell, and T.V. Getchell, *Ultrastructural characteristics of sustentacular cells in control and odorant-treated olfactory mucosae of the salamander*. *Anat Rec*, 1988. **221**(3): p. 769-79.
50. Okano, M., A.F. Weber, and S.P. Frommes, *Electron microscopic studies on the distal border of the canine olfactory epithelium*. *J Ultrastruct Res*, 1967. **17**(5): p. 487-502.
51. Morrison, E.E. and R.M. Costanzo, *Morphology of the human olfactory epithelium*. *J Comp Neurol*, 1990. **297**(1): p. 1-13.
52. Moran, D.T., J.C. Rowley, 3rd, and B.W. Jafek, *Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell*. *Brain Res*, 1982. **253**(1-2): p. 39-46.
53. Au, E. and A.J. Roskams, *Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro*. *Glia*, 2003. **41**(3): p. 224-36.
54. Mackay-Sim, A. and J.A. St John, *Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries*. *Exp Neurol*, 2011. **229**(1): p. 174-80.
55. Tandler, B., D.R. Edelstein, and R.A. Erlandson, *Ultrastructure of submucosal glands in human anterior middle nasal turbinates*. *J Anat*, 2000. **197** (Pt 2): p. 229-37.
56. Bogdanffy, M.S., H.W. Randall, and K.T. Morgan, *Biochemical quantitation and histochemical localization of carboxylesterase in the nasal passages of the Fischer-344 rat and B6C3F1 mouse*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987. **88**(2): p. 183-94.
57. Kaliner, M.A., *Human nasal respiratory secretions and host defense*. *Am Rev Respir Dis*, 1991. **144**(3 Pt 2): p. S52-6.
58. Mellert, T.K., et al., *Characterization of the immune barrier in human olfactory mucosa*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1992. **106**(2): p. 181-8.
59. Ohkubo, K., et al., *Aminopeptidase activity in human nasal mucosa*. *J Allergy Clin Immunol*, 1998. **102**(5): p. 741-50.
60. Cross, C.E., et al., *Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids*. *Environ Health Perspect*, 1994. **102 Suppl 10**: p. 185-91.
61. Fujikura, T. and K. Okubo, *Adrenomedullin level in the nasal discharge from allergic rhinitis cohort*. *Peptides*, 2011. **32**(2): p. 368-73.
62. Chaen, T., et al., *Substance P and vasoactive intestinal peptide in nasal secretions and plasma from patients with nasal allergy*. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1993. **102**(1 Pt 1): p. 16-21.
63. Badonnel, K., et al., *Leptin-sensitive OBP-expressing mucous cells in rat olfactory epithelium: a novel target for olfaction-nutrition crosstalk?* *Cell Tissue Res*, 2009. **338**(1): p. 53-66.
64. Tegoni, M., et al., *Mammalian odorant binding proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1482**(1-2): p. 229-40.
65. Bianchet, M.A., et al., *The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition*. *Nat Struct Biol*, 1996. **3**(11): p. 934-9.
66. Strotmann, J. and H. Breer, *Internalization of odorant-binding proteins into the mouse olfactory epithelium*. *Histochem Cell Biol*, 2011. **136**(3): p. 357-69.
67. Ablimit, A., et al., *Immunolocalization of water channel aquaporins in the nasal olfactory mucosa*. *Arch Histol Cytol*, 2006. **69**(1): p. 1-12.
68. Proctor, D.F., et al., *Nasal mucociliary clearance in man*. *Ciba Found Symp*, 1978(54): p. 219-34.
69. Abaffy, T., A. Malhotra, and C.W. Luetje, *The molecular basis for ligand specificity in a mouse olfactory receptor: a network of functionally important residues*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(2): p. 1216-24.
70. Freitag, J., et al., *Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates*. *J Comp Physiol A*, 1998. **183**(5): p. 635-50.
71. Zhang, X. and S. Firestein, *The olfactory receptor gene superfamily of the mouse*. *Nat Neurosci*, 2002. **5**(2): p. 124-33.
72. Glusman, G., et al., *The complete human olfactory subgenome*. *Genome Res*, 2001. **11**(5): p. 685-702.
73. Nei, M., Y. Niimura, and M. Nozawa, *The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(12): p. 951-63.
74. Niimura, Y., A. Matsui, and K. Touhara, *Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals*. *Genome Res*, 2014. **24**(9): p. 1485-96.
75. Shepherd, G.M., *The human sense of smell: are we better than we think?* *PLoS Biol*, 2004. **2**(5): p. E146.

76. Zhang, X., et al., *Characterizing the expression of the human olfactory receptor gene family using a novel DNA microarray*. *Genome Biol*, 2007. **8**(5): p. R86.
77. Spehr, M., et al., *Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis*. *Science*, 2003. **299**(5615): p. 2054-8.
78. Ressler, K.J., S.L. Sullivan, and L.B. Buck, *A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 597-609.
79. Vassar, R., J. Ngai, and R. Axel, *Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium*. *Cell*, 1993. **74**(2): p. 309-18.
80. Serizawa, S., et al., *Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**(7): p. 687-93.
81. Ressler, K.J., S.L. Sullivan, and L.B. Buck, *Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb*. *Cell*, 1994. **79**(7): p. 1245-55.
82. Vassar, R., et al., *Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb*. *Cell*, 1994. **79**(6): p. 981-91.
83. Serizawa, S., K. Miyamichi, and H. Sakano, *One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system*. *Trends Genet*, 2004. **20**(12): p. 648-53.
84. Jacquier, V., H. Pick, and H. Vogel, *Characterization of an extended receptive ligand repertoire of the human olfactory receptor OR17-40 comprising structurally related compounds*. *J Neurochem*, 2006. **97**(2): p. 537-44.
85. Bushdid, C., et al., *Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli*. *Science*, 2014. **343**(6177): p. 1370-2.
86. Saito, H., et al., *Odor coding by a Mammalian receptor repertoire*. *Sci Signal*, 2009. **2**(60): p. ra9.
87. Malnic, B., *Searching for the ligands of odorant receptors*. *Mol Neurobiol*, 2007. **35**(2): p. 175-81.
88. Gimelbrant, A.A., et al., *Truncation releases olfactory receptors from the endoplasmic reticulum of heterologous cells*. *J Neurochem*, 1999. **72**(6): p. 2301-11.
89. Katada, S., M. Tanaka, and K. Touhara, *Structural determinants for membrane trafficking and G protein selectivity of a mouse olfactory receptor*. *J Neurochem*, 2004. **90**(6): p. 1453-63.
90. Lu, M., et al., *Endoplasmic reticulum degradation impedes olfactory G-protein coupled receptor functional expression*. *BMC Cell Biol*, 2004. **5**: p. 34.
91. Krautwurst, D., K.W. Yau, and R.R. Reed, *Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library*. *Cell*, 1998. **95**(7): p. 917-26.
92. Von Dannecker, L.E., A.F. Mercadante, and B. Malnic, *Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(24): p. 9310-4.
93. Zhuang, H. and H. Matsunami, *Synergism of accessory factors in functional expression of mammalian odorant receptors*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(20): p. 15284-93.
94. Kleene, S.J., *The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia*. *Chem Senses*, 2008. **33**(9): p. 839-59.
95. Takeuchi, H. and T. Kurahashi, *Distribution, amplification, and summation of cyclic nucleotide sensitivities within single olfactory sensory cilia*. *J Neurosci*, 2008. **28**(3): p. 766-75.
96. Lowe, G. and G.H. Gold, *The spatial distributions of odorant sensitivity and odorant-induced currents in salamander olfactory receptor cells*. *J Physiol*, 1991. **442**: p. 147-68.
97. Jones, D.T. and R.R. Reed, *Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction*. *Science*, 1989. **244**(4906): p. 790-5.
98. Bakalyar, H.A. and R.R. Reed, *Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection*. *Science*, 1990. **250**(4986): p. 1403-6.
99. Breer, H., I. Boekhoff, and E. Tareilus, *Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction*. *Nature*, 1990. **345**(6270): p. 65-8.
100. Kurahashi, T. and K.W. Yau, *Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells*. *Nature*, 1993. **363**(6424): p. 71-4.
101. Lowe, G. and G.H. Gold, *Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells*. *Nature*, 1993. **366**(6452): p. 283-6.
102. Reisert, J., et al., *Mechanism of the excitatory Cl⁻ response in mouse olfactory receptor neurons*. *Neuron*, 2005. **45**(4): p. 553-61.

103. Stephan, A.B., et al., *ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11776-81.
104. Smith, Z.D., C. Sindhu, and A. Meissner, *Molecular features of cellular reprogramming and development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(3): p. 139-54.
105. Mitalipov, S. and D. Wolf, *Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 185-99.
106. Rossant, J., *Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst*. Reprod Fertil Dev, 2007. **19**(1): p. 111-8.
107. Buganim, Y., D.A. Faddah, and R. Jaenisch, *Mechanisms and models of somatic cell reprogramming*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(6): p. 427-39.
108. Yamanaka, S., *A fresh look at iPS cells*. Cell, 2009. **137**(1): p. 13-7.
109. Bai, Q., et al., *Embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells? A DNA integrity perspective*. Curr Gene Ther, 2013. **13**(2): p. 93-8.
110. Marti, M., et al., *Characterization of pluripotent stem cells*. Nat Protoc, 2013. **8**(2): p. 223-53.
111. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
112. Maherali, N., et al., *A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 340-5.
113. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.
114. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
115. Raab, S., et al., *A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation*. Stem Cells Int, 2014. **2014**: p. 768391.
116. Aasen, T. and J.C. Izpisua Belmonte, *Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells*. Nat Protoc, 2010. **5**(2): p. 371-82.
117. Zhou, T., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from urine*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(7): p. 1221-8.
118. Giorgetti, A., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(4): p. 353-7.
119. Haase, A., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(4): p. 434-41.
120. Loh, Y.H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from human blood*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5476-9.
121. Yulin, X., et al., *Efficient generation of induced pluripotent stem cells from human bone marrow mesenchymal stem cells*. Folia Biol (Praha), 2012. **58**(6): p. 221-30.
122. Aasen, T., et al., *Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 1276-84.
123. Okita, K., et al., *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. Science, 2008. **322**(5903): p. 949-53.
124. Shi, Y., et al., *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(5): p. 568-74.
125. Okita, K. and S. Yamanaka, *Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011. **366**(1575): p. 2198-207.
126. O'Doherty, R., U. Greiser, and W. Wang, *Nonviral methods for inducing pluripotency to cells*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 705902.
127. Lin, T., et al., *A chemical platform for improved induction of human iPSCs*. Nat Methods, 2009. **6**(11): p. 805-8.
128. Warlich, E., et al., *Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming*. Mol Ther, 2011. **19**(4): p. 782-9.
129. Linta, L., et al., *Rat embryonic fibroblasts improve reprogramming of human keratinocytes into induced pluripotent stem cells*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(6): p. 965-76.

130. Stockmann, M., et al., *Developmental and functional nature of human iPSC derived motoneurons*. Stem Cell Rev, 2013. **9**(4): p. 475-92.
131. Zhang, P., N. Xia, and R.A. Reijo Pera, *Directed dopaminergic neuron differentiation from human pluripotent stem cells*. J Vis Exp, 2014(91).
132. Liu, Y., et al., *Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells*. Nat Protoc, 2013. **8**(9): p. 1670-9.
133. Margolis, F.L., *A brain protein unique to the olfactory bulb*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(5): p. 1221-4.
134. Farbman, A.I. and F.L. Margolis, *Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization*. Dev Biol, 1980. **74**(1): p. 205-15.
135. Baker, H., M. Grillo, and F.L. Margolis, *Biochemical and immunocytochemical characterization of olfactory marker protein in the rodent central nervous system*. J Comp Neurol, 1989. **285**(2): p. 246-61.
136. Holbrook, E.H., et al., *Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue*. Laryngoscope, 2011. **121**(8): p. 1687-701.
137. Witt, M., et al., *Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease*. Mov Disord, 2009. **24**(6): p. 906-14.
138. Pifferi, S., V. Cenedese, and A. Menini, *Anoctamin 2/TMEM16B: a calcium-activated chloride channel in olfactory transduction*. Exp Physiol, 2012. **97**(2): p. 193-9.
139. Pietra, G., et al., *The Ca²⁺-activated Cl⁻ channel TMEM16B regulates action potential firing and axonal targeting in olfactory sensory neurons*. J Gen Physiol, 2016. **148**(4): p. 293-311.
140. Schwob, J.E., *Neural regeneration and the peripheral olfactory system*. Anat Rec, 2002. **269**(1): p. 33-49.
141. Goldstein, B.J., et al., *Transplantation of multipotent progenitors from the adult olfactory epithelium*. Neuroreport, 1998. **9**(7): p. 1611-7.
142. Caggiano, M., J.S. Kauer, and D.D. Hunter, *Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus*. Neuron, 1994. **13**(2): p. 339-52.
143. Goldstein, B.J. and J.E. Schwob, *Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells*. J Neurosci, 1996. **16**(12): p. 4005-16.
144. Cau, E., S. Casarosa, and F. Guillemot, *Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage*. Development, 2002. **129**(8): p. 1871-80.
145. Wei, H., M.F. Lang, and X. Jiang, *Calretinin is expressed in the intermediate cells during olfactory receptor neuron development*. Neurosci Lett, 2013. **542**: p. 42-6.
146. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
147. Kim, J.B., et al., *Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors*. Nature, 2008. **454**(7204): p. 646-50.
148. Ban, H., et al., *Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(34): p. 14234-9.
149. Bernal, J.A., *RNA-based tools for nuclear reprogramming and lineage-conversion: towards clinical applications*. J Cardiovasc Transl Res, 2013. **6**(6): p. 956-68.
150. Merling, R.K., et al., *Transgene-free iPSCs generated from small volume peripheral blood nonmobilized CD34⁺ cells*. Blood, 2013. **121**(14): p. e98-107.
151. Feron, F., et al., *New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1998. **124**(8): p. 861-6.
152. Balmer, C.W. and A.S. LaMantia, *Noses and neurons: induction, morphogenesis, and neuronal differentiation in the peripheral olfactory pathway*. Dev Dyn, 2005. **234**(3): p. 464-81.
153. Burd, G.D., *Development of the olfactory nerve in the clawed frog, Xenopus laevis: II. Effects of hypothyroidism*. J Comp Neurol, 1992. **315**(3): p. 255-63.
154. Ekberg, J.A., et al., *OMP-ZsGreen fluorescent protein transgenic mice for visualisation of olfactory sensory neurons in vivo and in vitro*. J Neurosci Methods, 2011. **196**(1): p. 88-98.

155. Kott, J.N. and L.E. Westrum, *Developmental localization of GAP-43 and olfactory marker protein in rat olfactory bulb transplants*. *Int J Dev Neurosci*, 1996. **14**(7-8): p. 961-70.
156. Kang, N., et al., *Olfactory marker protein expression is an indicator of olfactory receptor-associated events in non-olfactory tissues*. *PLoS One*, 2015. **10**(1): p. e0116097.
157. Youngentob, S.L. and F.L. Margolis, *OMP gene deletion causes an elevation in behavioral threshold sensitivity*. *Neuroreport*, 1999. **10**(1): p. 15-9.
158. Youngentob, S.L., F.L. Margolis, and L.M. Youngentob, *OMP gene deletion results in an alteration in odorant quality perception*. *Behav Neurosci*, 2001. **115**(3): p. 626-31.
159. Kwon, H.J., et al., *Ca extrusion by NCX is compromised in olfactory sensory neurons of OMP mice*. *PLoS One*, 2009. **4**(1): p. e4260.
160. Lee, A.C., J. He, and M. Ma, *Olfactory marker protein is critical for functional maturation of olfactory sensory neurons and development of mother preference*. *J Neurosci*, 2011. **31**(8): p. 2974-82.
161. Dibattista, M. and J. Reisert, *The Odorant Receptor-Dependent Role of Olfactory Marker Protein in Olfactory Receptor Neurons*. *J Neurosci*, 2016. **36**(10): p. 2995-3006.
162. Graziadei, G.A., R.S. Stanley, and P.P. Graziadei, *The olfactory marker protein in the olfactory system of the mouse during development*. *Neuroscience*, 1980. **5**(7): p. 1239-52.
163. Roskams, A.J., X. Cai, and G.V. Ronnett, *Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat*. *Neuroscience*, 1998. **83**(1): p. 191-200.
164. Day, I.N. and R.J. Thompson, *UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein*. *Prog Neurobiol*, 2010. **90**(3): p. 327-62.
165. Yoshihara, Y., et al., *OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons*. *J Neurosci*, 1997. **17**(15): p. 5830-42.
166. Miyamoto, T., D. Restrepo, and J.H. Teeter, *Voltage-dependent and odorant-regulated currents in isolated olfactory receptor neurons of the channel catfish*. *J Gen Physiol*, 1992. **99**(4): p. 505-29.
167. Menco, B.P., et al., *Ultrastructural localization of olfactory transduction components: the G protein subunit Golf alpha and type III adenylyl cyclase*. *Neuron*, 1992. **8**(3): p. 441-53.
168. Pifferi, S., M. Dibattista, and A. Menini, *TMEM16B induces chloride currents activated by calcium in mammalian cells*. *Pflugers Arch*, 2009. **458**(6): p. 1023-38.
169. Cunningham, A.M., et al., *Olfactory receptor neurons exist as distinct subclasses of immature and mature cells in primary culture*. *Neuroscience*, 1999. **93**(4): p. 1301-12.
170. Herve, D., M. Rogard, and M. Levi-Strauss, *Molecular analysis of the multiple Golf alpha subunit mRNAs in the rat brain*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995. **32**(1): p. 125-34.
171. Osorio, J., et al., *Phylogenetic expression of the bHLH genes Neurogenin2, Neurod, and Mash1 in the mouse embryonic forebrain*. *J Comp Neurol*, 2010. **518**(6): p. 851-71.
172. Bautze, V., et al., *Identification of a natural source for the OR37B ligand*. *Chem Senses*, 2014. **39**(1): p. 27-38.
173. Bautze, V., et al., *Mammalian-specific OR37 receptors are differentially activated by distinct odorous fatty aldehydes*. *Chem Senses*, 2012. **37**(5): p. 479-93.
174. Kim, S.K. and W.A. Goddard, 3rd, *Predicted 3D structures of olfactory receptors with details of odorant binding to OR1G1*. *J Comput Aided Mol Des*, 2014.
175. Sanz, G., et al., *Relationships between molecular structure and perceived odor quality of ligands for a human olfactory receptor*. *Chem Senses*, 2008. **33**(7): p. 639-53.
176. Launay, G., et al., *Automatic modeling of mammalian olfactory receptors and docking of odorants*. *Protein Eng Des Sel*, 2012. **25**(8): p. 377-86.
177. Schmiedeberg, K., et al., *Structural determinants of odorant recognition by the human olfactory receptors OR1A1 and OR1A2*. *J Struct Biol*, 2007. **159**(3): p. 400-12.
178. Barreto-Chang, O.L. and R.E. Dolmetsch, *Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM*. *J Vis Exp*, 2009(23).
179. Huart, C., P. Rombaux, and T. Hummel, *Plasticity of the human olfactory system: the olfactory bulb*. *Molecules*, 2013. **18**(9): p. 11586-600.
180. Feron, F., et al., *Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1059**: p. 107-14.

181. Nakamura, T. and G.H. Gold, *A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia*. Nature, 1987. **325**(6103): p. 442-4.
182. Wang, S.Z., et al., *Transcription factor ATF5 is required for terminal differentiation and survival of olfactory sensory neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(45): p. 18589-94.
183. Hansen, M.B., et al., *Mouse Atf5: molecular cloning of two novel mRNAs, genomic organization, and odorant sensory neuron localization*. Genomics, 2002. **80**(3): p. 344-50.
184. Moya-Plana, A., et al., *PROKR2 and PROK2 mutations cause isolated congenital anosmia without gonadotropic deficiency*. Eur J Endocrinol, 2013. **168**(1): p. 31-7.
185. Karstensen, H.G. and N. Tommerup, *Isolated and syndromic forms of congenital anosmia*. Clin Genet, 2012. **81**(3): p. 210-5.