

# **Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus zu paraxialem Mesoderm *in vitro***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Arnold Günter Schröder  
aus Oelsnitz im Vogtland

Oktober, 2010



1. Gutachter: Professor Dr. Bernhard Herrmann
2. Gutachter: Professor Dr. Constance Scharff

Disputation am 6. Juni 2011



*The most important event in your life is not birth, marriage, or death  
but gastrulation*  
(Lewis Wolpert)



# Inhaltsverzeichnis

<b>Einführung</b> .....	<b>1</b>
Stammzellen in Medizin und Forschung.....	2
Signalwege in der frühen Embryonalentwicklung.....	2
<i>TGF<math>\beta</math>-Signalwege</i> .....	2
<i>Der kanonische Wnt-Signalweg</i> .....	4
Embryonalentwicklung und Entstehung des Mesoderms.....	5
<i>Entwicklung der Blastozyste</i> .....	5
<i>Entwicklung des Eizylinders</i> .....	7
<i>Gastrulation</i> .....	10
<i>Epithelial-Mesenchymale Transition im Primitivstreifen</i> .....	10
<i>Festlegung des Zellschicksals im Primitivstreifen</i> .....	12
<i>Primitivknoten</i> .....	13
<i>Schwanzknospe und Achsenverlängerung</i> .....	14
<i>Entwicklung des paraxialen Mesoderms</i> .....	14
Genexpression und Zelldifferenzierung .....	16
<i>T (Brachyury)</i> .....	16
<i>Msgn1</i> .....	17
Untersuchung der Embryonalentwicklung in vitro.....	18
<i>Isolation und Kultur embryonaler Stammzellen</i> .....	18
<i>Differenzierung embryonaler Stammzellen in vitro</i> .....	19
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
Mesoderm differenzierung in vitro.....	21
<i>Expression von Msgn1 während der Differenzierung in embryoid bodies</i> .....	21
<i>Herstellung von Msgn1-Reporterzellen</i> .....	22
<i>Differenzierung der Reporterzellen in verschiedenen Medien</i> .....	24
<i>Differenzierung in adhärenenten Kulturen</i> .....	27
<i>Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der in vitro Differenzierung</i> .....	29
<i>Untersuchung der co-Expression von TBX6 und dem Msgn1-Reporter</i> .....	30
<i>Herstellung einer Zelllinie mit zwei Reporter genen</i> .....	30
Analyse der Differenzierung in vitro .....	33
<i>Reporter genexpression im Verlauf der Differenzierung in vitro</i> .....	33
<i>Analyse der differenziellen Genexpression im in vitro Modell</i> .....	34
<i>Bioinformatische Verifizierung der Messergebnisse</i> .....	35
<i>Expressionsverlauf verschiedener Markergene während der Differenzierung</i> .....	36
<i>Betrachtung der differenziellen Genexpression in beiden Differenzierungsansätzen</i> ...	39
<i>Analyse der differenziell exprimierten Gene</i> .....	40
<i>Verteilung differenziell exprimierter Gene auf den Chromosomen</i> .....	42

<i>Gene mit möglicher Funktion in der Entstehung paraxialen Mesoderms.....</i>	44
<b>Diskussion.....</b>	<b>47</b>
Analyse der Mesodermbildung im in vitro Modell.....	48
<i>Induktion des Primitivstreifenstadiums in vitro.....</i>	48
<i>Paraxiales Mesoderm entsteht in vitro bei der Stimulation mit WNT3a und Noggin.....</i>	49
<i>Msgn1-Reporter exprimierende Zellen bilden nicht nur paraxiales Mesoderm in vitro.....</i>	53
<i>Epithelial-Mesenchymale Transitionen im in vitro Modell.....</i>	55
<i>Analyse der Lokalisierung differenziell exprimierter Gene auf den Chromosomen.....</i>	56
Identifikation von Genen mit möglicher Rolle in der Differenzierung paraxialen Mesoderms	
.....	57
<i>Analyse deregulierter Gene in der Entwicklung paraxialen Mesoderms.....</i>	57
Differenzierung embryonaler Stammzellen in vitro.....	59
<i>Adhärenz Kolonien verbessern die Differenzierung zu paraxialem Mesoderm.....</i>	59
<i>Stammzellendifferenzierung in serumhaltigen Kulturen.....</i>	60
<b>Material und Methoden.....</b>	<b>61</b>
<i>Oligonukleotide.....</i>	62
<i>Antikörper.....</i>	62
<i>Bakterienstämme.....</i>	63
<i>Herstellung der Reporterlinie für Msgn1.....</i>	63
<i>Herstellung des mCherry-Reporterplasmids.....</i>	63
<i>Integration des mCherry-Reporters in den T-Lokus.....</i>	63
<i>BAC-Recombineering.....</i>	64
<i>Isolation von BAC-DNS aus E. coli.....</i>	65
<i>Embryonale Stammzellen.....</i>	65
<i>Beschichtung der Zellkulturschalen.....</i>	65
<i>Routinemäßige Zellkultur.....</i>	65
<i>Vereinzeln von kultivierten Zellen.....</i>	66
<i>Transiente Transfektion embryonaler Stammzellen.....</i>	66
<i>Stabile Transfektion des BAC in embryonale Stammzellen.....</i>	66
<i>Analyse der Genexpression in tetraploid aggregierten Embryonen.....</i>	66
<i>Differenzierung embryonaler Stammzellen.....</i>	67
<i>Durchflusszytometrie.....</i>	68
<i>Expressionsanalyse mit quantitativer PCR.....</i>	68
<i>Expressionsanalyse mit RNS-Chips.....</i>	68
<i>Datenbankanalysen.....</i>	69
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>Synopsis.....</b>	<b>71</b>
<b>Abkürzungen und Glossar.....</b>	<b>72</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>73</b>

<b>Literatur</b> .....	<b>74</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>89</b>
Listen der differenziell exprimierten Gene.....	89
<i>WNT3a/Noggin, 72Std, T, aktiviert</i> .....	89
<i>WNT3a/Noggin, 72Std, T, deaktiviert</i> .....	91
<i>WNT3a/Noggin, 96Std, T, aktiviert</i> .....	92
<i>WNT3a/Noggin, 96Std, T, deaktiviert</i> .....	94
<i>WNT3a/Noggin, 96Std, Msgn1, aktiviert</i> .....	96
<i>WNT3a/Noggin, 96Std, Msgn1, deaktiviert</i> .....	97
<i>BMP4/DKK1, 72Std, T, aktiviert</i> .....	98
<i>BMP4/DKK1, 72Std, T, deaktiviert</i> .....	100
<i>BMP4/DKK1, 96Std, T, aktiviert</i> .....	103
<i>BMP4/DKK1, 96Std, T, deaktiviert</i> .....	104
<i>BMP4/DKK1, 96Std, Msgn1, aktiviert</i> .....	105
<i>BMP4/DKK1, 96Std, Msgn1, deaktiviert</i> .....	105
<i>Expression von Foxa2</i> .....	105



# Einführung

Während der frühen Embryonalentwicklung entstehen durch den Prozess der Gastrulation die drei Keimblätter, das Ektoderm, das Mesoderm und das Endoderm. Ein Subtyp des Mesoderms, das paraxiale Mesoderm, bildet zu beiden Seiten des Neuralrohres je einen mesenchymalen Gewebestreifen, dessen anteriorer Abschnitt in epitheliale Somiten kompartimentiert wird. Die Somiten durchlaufen nach ihrer Entstehung eine innere Differenzierung und bilden die Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur, des Axialskeletts und der Dermis.

Der Säugerembryo wächst im Schutz des Mutterleibs heran und ist nur mit großem Aufwand für wissenschaftliche Untersuchungen zugänglich. Die Isolierung embryonaler Stammzellen und das Etablieren von Verfahren zu ihrer Differenzierung in gewünschte Zellpopulationen unter kontrollierten Bedingungen ermöglichen die detaillierte Erforschung embryonaler Vorgänge. Die *in vitro* Differenzierung ist damit ein hervorragendes Instrument zur Untersuchung der frühen Embryonalentwicklung und die Basis für die Generierung gewünschter Gewebetypen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Entwicklung paraxialen Mesoderms *in vitro* zu modellieren und mit Hilfe dieses Systems neue Gene zu identifizieren, die eine Rolle in der Entstehung und der Reifung des paraxialen Mesoderms spielen. Die Ergebnisse dieser Studie geben Auskunft über transkriptionelle Vorgänge während der Embryonalentwicklung und sind ein Schritt für die gezielte Generierung mesodermaler Zellpopulationen, die für klinische Studien und die regenerative Medizin verwendet werden können. Sie liefern darüber hinaus Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen epithelial-mesenchymaler Transitionen, die eine zentrale Rolle in der Entwicklung und der Metastasierung von Tumoren spielen.

Im Folgenden werden zunächst die Eigenschaften von Stammzellen sowie die relevanten Signalwege für die Entstehung von Mesoderm im Embryo einführend beschrieben. Außerdem werden die morphologischen Prozesse der frühen Embryonalentwicklung und die molekularen Grundlagen ihrer Steuerung erläutert. Schließlich werden Grundlagen der Isolation, Kultur und *in vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen behandelt.

## **Stammzellen in Medizin und Forschung**

Stammzellen sind nicht ausdifferenzierte Zellen, die das Potenzial besitzen, sich in verschiedene Zelltypen zu entwickeln. Sie können sich selbst erneuern, also eine praktisch unbegrenzte Anzahl von Zellteilungen durchführen, bei denen mindestens eine der Tochterzellen die Eigenschaften der Mutterzelle behält. Ihr Differenzierungspotenzial unterscheidet sich je nach Stammzelltyp. Adulte Stammzellen, die beispielsweise ständig neue Hautzellen generieren oder das Darmepithel erneuern, können von Natur aus nur ein begrenztes Spektrum an Körperzellen generieren. Embryonale Stammzellen sind dagegen in der Lage als Vorläuferzellen für alle Zellen des Körpers und der Keimbahnzellen zu dienen (Smith 2001). Aufgrund dieser sogenannten Pluripotenz eignen sich embryonale Stammzellen als quasi unerschöpfliche Quelle für die Herstellung klinisch und wissenschaftlich relevanter Zellpopulationen in großem Maßstab.

## **Signalwege in der frühen Embryonalentwicklung**

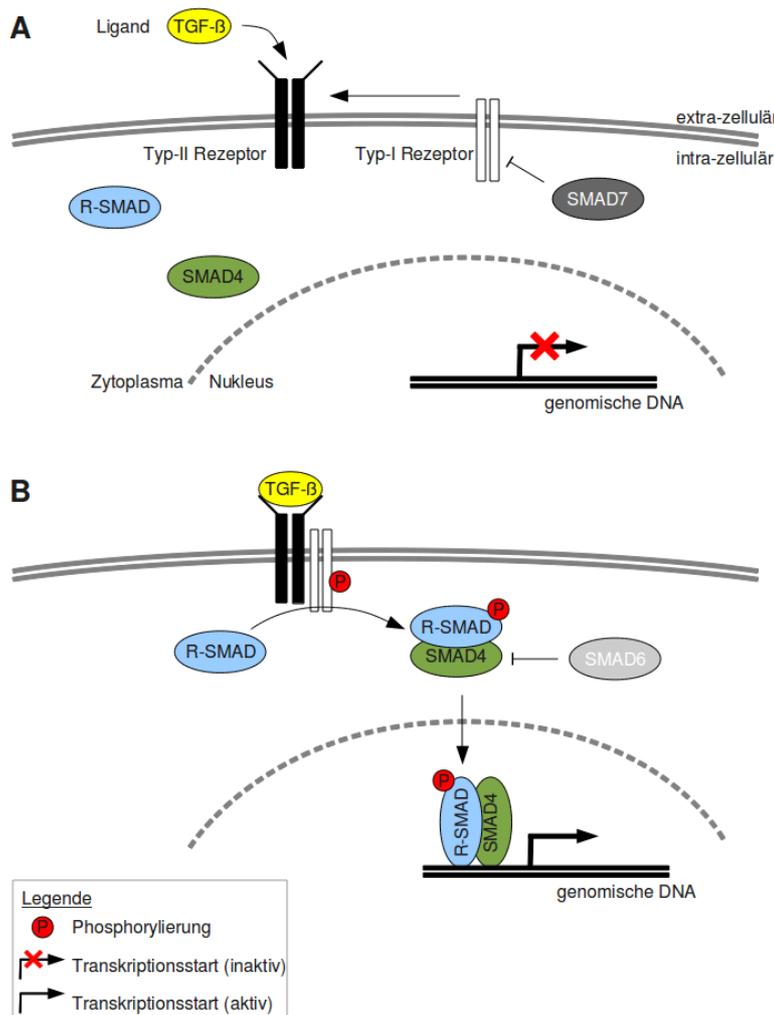
Die Gewebemuster im Embryo werden durch die Verteilung und die zeitliche Abfolge interzellulärer Signale gesteuert. Diese Signale regulieren die Zellproliferation, Apoptose und die Determinierung des Zellschicksals. Für die Prozesse, die in dieser Arbeit behandelt werden, sind TGF $\beta$ -Signale und der kanonische Wnt-Signalweg essentiell und werden im Folgenden beschrieben (Ang et al. 2004, Tam et al. 2007). Die Differenzierung von paraxialem Mesoderm wird außerdem durch FGF-Signale gesteuert (Deng et al. 1994, Feldman et al. 1995, Goldfarb 1996, Ciruna et al. 1997, Burdsal et al. 1998, Sun et al. 1999, Ciruna et al. 2001, Thisse et al. 2005). Der Fgf-Signalweg liegt jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit und wird in der Einführung nicht behandelt.

### ***TGF $\beta$ -Signalwege***

TGF $\beta$ -Proteine sind Morphogene, von denen insbesondere BMP-Signale und *Nodal* eine Rolle in der Embryonalentwicklung spielen. Sie sind für die Achsenbildung im Embryo und die Entwicklung des Mesoderms und Endoderms wichtig. Mausembryonen ohne *Nodal*- oder *Bmp*-Signale bleiben in der Embryonalentwicklung vor dem Erreichen der Gastrulation stehen und bilden kein Mesoderm und Endoderm aus (Zhou et al. 1993, Conlon et al. 1994, Winnier et al. 1995, Schier et al. 2000, Yamamoto et al. 2004). Neben den TGF $\beta$ -Signalen

sind ihre Antagonisten entscheidend an der Musterbildung im Embryo beteiligt. Ohne inhibierende Signale, wie den Bmp-Inhibitoren Noggin und Chordin, kann es zur ektopischen Ausbildung embryonaler Strukturen wie des Primitivstreifens kommen, deren Ausbildung durch TGF $\beta$ -Signale induziert wird (Zimmerman et al. 1996, Perea-Gomez et al. 2001, Schier 2003, Yamamoto et al. 2004, Petryk et al. 2005). In den hier betrachteten Prozessen spielen vor allem Signale von *Bmp2*, *Bmp4* und *Nodal* eine wichtige Rolle.

Die Weiterleitung der TGF $\beta$ -Signale funktioniert über einen enzymgekoppelten Signalweg, der abhängig vom Liganden unterschiedliche Rezeptoren und intrazelluläre Proteine einschließt. Die Liganden binden zunächst einen membranständigen Typ-II-Rezeptor, der daraufhin einen Typ-I Rezeptor rekrutiert. Beide Rezeptoren gehören zur Klasse der Serin-Threonin-Kinasen. Der Typ-II-Rezeptor katalysiert die Phosphorylierung des Typ-I Rezeptors, dieser phosphoryliert daraufhin das rezeptorregulierte SMAD (R-SMAD) im Zytoplasma. Das R-SMAD dimerisiert mit SMAD4, dem gemeinsamen co-SMAD aller TGF $\beta$ -



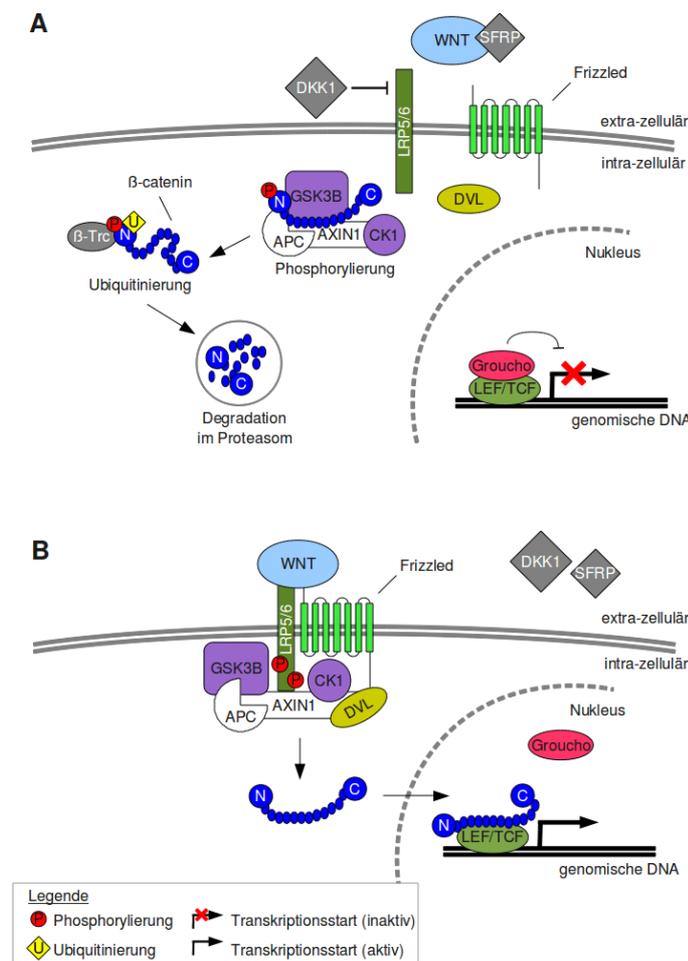
**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Tgf $\beta$ -Signalweges.** (A) Bindet kein Ligand an den Typ-II-Rezeptor, oder wird die Dimerisierung des Typ-I und Typ-II Rezeptors durch das inhibitorische SMAD7 verhindert, liegen sowohl beide membranständigen Rezeptoren als auch das Rezeptor-SMAD (R-SMAD) und SMAD4, das gemeinsame co-SMAD aller Tgf $\beta$ -Signale, nicht dimerisiert im Zytoplasma vor. Es findet keine Transkription der abhängigen Gene statt. (B) Bindet der Ligand aus der Tgf $\beta$ -Familie an den Typ-II Rezeptor, rekrutiert und phosphoryliert dieser einen Typ-I Rezeptor. Der Typ-I Rezeptor phosphoryliert seinerseits das R-SMAD. Das aktivierte R-SMAD dimerisiert mit SMAD4. Diese Bindung kann durch SMAD6 kompetitiv gehemmt werden. Das Dimer aus R-SMAD und co-SMAD wird in den Nucleus transloziert, bindet an die Promoterregion des DNS und agiert als Transkriptionsfaktor.

Signalwege. Das SMAD-Heterodimer wird in den Nucleus transloziert, wo es als Transkriptionsfaktorkomplex wirkt (Abbildung 1).

### Der kanonische Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt-Signalweg (Abbildung 2) ist für die Mesodermbildung im Embryo essentiell. Fehlt den Embryonen *Wnt3*, hört ihre Entwicklung vor dem Eintritt in die Gastrulationsphase auf (Liu et al. 1999). Obwohl homozygote *Wnt3a*-Mutanten einen Primitivstreifen ausbilden, weisen sie keine caudalen Somiten auf. Während die Entwicklung ihres anterioren Bereichs normal verläuft, sind diese Embryonen caudal der vorderen Extremitätenanlagen trunziert und zeigen keine Derivate des paraxialen Mesoderms (Takada et al. 1994, Yoshikawa et al. 1997).

Das zentrale zytoplasmatische Protein des kanonischen Signalweges ist  $\beta$ -catenin. In Abwesenheit passender Wnt-Liganden liegt  $\beta$ -catenin in einem Degradationskomplex gebunden vor. Hauptkomponenten dieses Komplexes sind die Gerüstproteine APC und AXIN1 sowie die Proteinkinasen GSK3B und CK1. Diese phosphorylieren das gebundene  $\beta$ -catenin, welches daraufhin im Komplex von  $\beta$ -Trc ubiquitiniert wird. Das markierte Molekül wird dann im Proteasom abgebaut. Ohne  $\beta$ -catenin binden LEF/TCF zusammen mit Groucho an die Promoterregion der DNS und hemmen die Transkription. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor kann durch DKK1 und SFRP inhibiert werden, die die LRP-Rezeptoren (DKK1) oder den Liganden binden (SFRP).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges.** (A) Bindet kein Ligand an die Wnt-Rezeptoren LRP5, LRP6 und Frizzled, liegt  $\beta$ -catenin in einem Degradationskomplex gebunden vor. Hauptkomponenten dieses Komplexes sind die Gerüstproteine APC und AXIN1 sowie die Proteinkinasen GSK3B und CK1. Diese phosphorylieren das gebundene  $\beta$ -catenin, welches daraufhin im Komplex von  $\beta$ -Trc ubiquitiniert wird. Das markierte Molekül wird dann im Proteasom abgebaut. Ohne  $\beta$ -catenin binden LEF/TCF zusammen mit Groucho an die Promoterregion der DNS und hemmen die Transkription. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor kann durch DKK1 und SFRP inhibiert werden, die die LRP-Rezeptoren (DKK1) oder den Liganden binden (SFRP). (B) Bindet der Ligand, bildet sich ein Komplex aus LRP, Frizzled und DVL, der den Degradationskomplex rekrutiert. Die Kinasen im Degradationskomplex phosphorylieren nun LRP.  $\beta$ -catenin wird frei und nicht mehr phosphoryliert. Es transloziert in den Kern, bindet statt des co-Repressors Groucho an LEF/TCF-Proteine und wirkt als co-Aktivator für die Transkription.

Proteindegradationskomplex gebunden vor und wird von GSK3B und CK1 phosphoryliert. Anschließend wird es durch  $\beta$ -Trcp ubiquitiniert und schließlich zum Proteasom transportiert und dort degradiert. In Abwesenheit von  $\beta$ -catenin im Nukleus binden Proteine der LEF/TCF-Familie gemeinsam mit Proteinen aus der Groucho/TLE-Familie sequenzspezifisch an regulatorische DNS-Regionen ihrer Zielgene und reprimieren deren Transkription (Grigoryan et al. 2008).

Binden Wnt-Proteine an die membranständigen Rezeptoren Frizzled sowie die co-Rezeptoren LRP5 und LRP6, wird zunächst DVL im Zytoplasma phosphoryliert und aktiviert. Aktiviertes DVL bindet an den Proteindegradationskomplex und reduziert die Aktivität von GSK3B.  $\beta$ -catenin wird daraufhin nicht mehr gebunden oder phosphoryliert, akkumuliert im Zytoplasma und wird in den Nukleus transloziert. Im Nukleus bildet es einen Komplex mit den LEF/TCF-Proteinen, welcher aktivierend auf die Genexpression wirkt (Grigoryan et al. 2008). Wnt-Signale können durch die Bindung von DKK1 an die co-Rezeptoren LRP5 und -6 inhibiert werden (Glinka et al. 1998, Semenov et al. 2001).

## **Embryonalentwicklung und Entstehung des Mesoderms**

Die Entwicklung eines Embryos aus einer befruchteten Eizelle erfordert den koordinierten Ablauf von Zellproliferation, morphologischen Veränderungen und Zelldifferenzierung. Es entstehen unterschiedliche Gewebe, die zur Bildung des Embryos oder zu seiner Verankerung im mütterlichen Gewebe und seiner Ernährung beitragen. Insbesondere die extraembryonalen Gewebe dienen als Quellen interzellulärer Signale, die die Musterbildung im frühen Embryo steuern.

### ***Entwicklung der Blastozyste***

Am dritten Tag nach der Befruchtung (E3,0) entsteht aus der kompaktierten Morula eine flüssigkeitsgefüllte Hohlkugel, die Blastozyste (Abbildung 3). Der Hohlraum wird als Blastozoel bezeichnet und ist vom Trophektoderm, einer epithelialen Zellschicht, umschlossen. Innerhalb des Blastozoels liegt die innere Zellmasse, die dem Trophoblasten anhaftet. Der eigentliche Embryo sowie die Keimbahnzellen gehen ausschließlich aus den Zellen der inneren Zellmasse hervor. Die der innere Zellmasse exprimiert *Pou5f1 (Oct4)*, *Nanog*, *Sox2* und *Sall4*, die den Stammzellcharakter der Zellen erhalten. Fehlt eines dieser

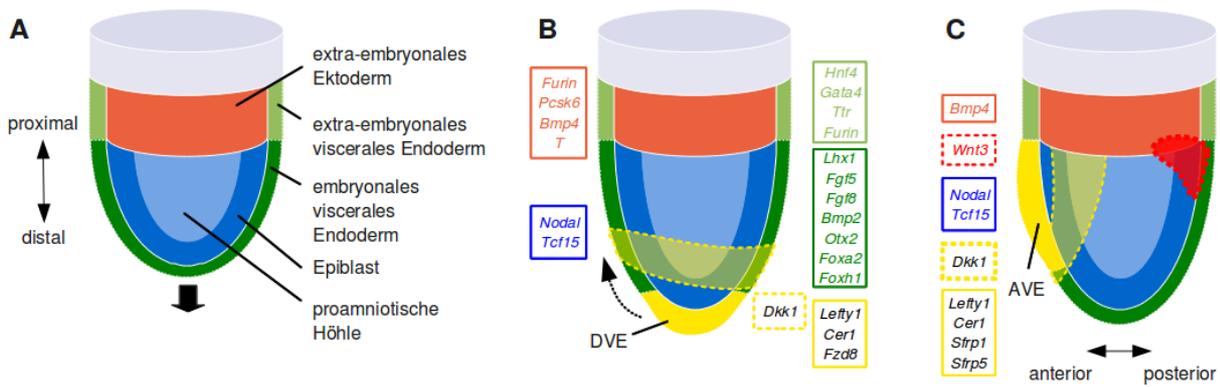


Zellmasse in Kontakt bleiben, bilden das viscerale Endoderm, das als wichtige Signalquelle für die weitere Entwicklung und Musterbildung im Embryo dient (Ang et al. 2004, Ben-Haim et al. 2006, Pfister et al. 2007, Tam et al. 2007). Die Zellen der inneren Zellmasse bilden schließlich das primitive Ektoderm das in der späteren Entwicklung auch als Epiblast bezeichnet wird. Es bildet kurz nach der Implantation ein Epithel aus, das mit seiner Basallamina dem visceralen Endoderm anliegt (Hogan et al. 1994). Allein aus den Zellen des Epiblasten gehen die drei embryonalen Keimblätter sowie die Keimbahnzellen hervor.

An E5,5 sind mit dem Trophektoderm, dem primitiven Endoderm und dem Epiblasten drei embryonale Gewebe entstanden, die vollkommen voneinander abgegrenzte Entwicklungslinien darstellen (Gardner 1985, Beddington et al. 1989, Rossant et al. 2003). Die extraembryonalen Gewebe dienen dem Schutz und der Ernährung des sich entwickelnden Embryos. Zwischen allen Geweben findet ein Signalaustausch statt, der für das korrekte Wachstum und für die Musterbildung im Embryo notwendig ist. Entfernt man eines dieser Gewebe oder Teile davon oder verpflanzt es an eine andere Stelle, führt das zu Veränderungen in der Genexpression und im Wachstum angrenzender Gewebe und schließlich zu Aberrationen im Embryo (Hogan et al. 1994, Beddington et al. 1998, Ang et al. 2004, Rossant et al. 2004, Ben-Haim et al. 2006, Pfister et al. 2007, Tam et al. 2007, Rossant et al. 2009).

### ***Entwicklung des Eizylinders***

Vor dem Einsetzen der Gastrulation, zwischen E5.0 und E5.5, entwickelt sich die Blastozyste zum Eizylinder (Abbildung 4). Das extraembryonale Ektoderm und der Epiblast strecken sich gemeinsam mit dem anliegenden visceralen Endoderm in das Blastozoel hinein und verdrängen dieses fast vollständig. Im Inneren des Epiblasten entsteht während dessen durch apoptotische Aktivität die proamniotische Höhle (Coucovanis et al. 1995), sodass der Epiblast eine becherförmige Struktur ausbildet, die mit ihrer Öffnung dem extraembryonalen Ektoderm anliegt. Der Eizylinder weist eine proximo-distale Achse auf, wobei das extraembryonale Ektoderm am proximalen Pol liegt. Nach der Streckung des Eizylinders bilden die Zellen des distalen visceralen Endoderms (DVE) eine erkennbare Verdickung aus, die über eine Seite des Epiblasten bis zu seiner proximalen Grenze wandert (Abbildung 4B).

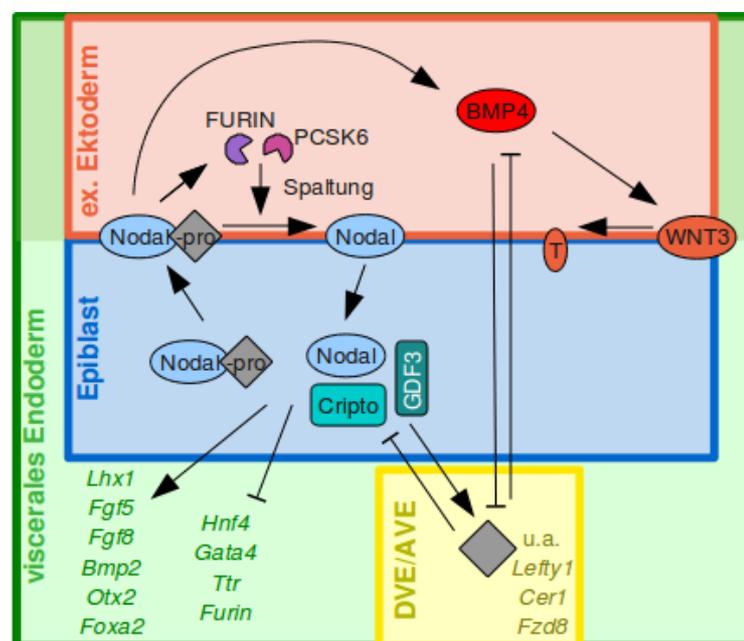


**Abbildung 4: Entwicklung und Genexpression im Eizylinder vor der Gastrulation.** Das murale Trophektoderm und das parietale Endoderm sind nicht abgebildet, der ektoplazentale Konus ist in grau angedeutet. Die zukünftig anteriore Seite des Embryos liegt links. (A) Streckung des Eizylinders im frühen Entwicklungsstadium. Die innere Zellmasse hat sich zum Epiblasten mit der proamniotischen Höhle ausgebildet und streckt sich gemeinsam mit dem aufliegenden visceralen Endoderm (Pfeil). Das viscerale Endoderm überdeckt auch das extraembryonale Ektoderm und teilt sich somit in einen embryonalen und einen extraembryonalen Bereich auf. (B) Genexpression im gestreckten Eizylinder. Die Gewebe des Eizylinders exprimieren charakteristische Moleküle (farbkodierte Boxen). Das distale extraembryonale Ektoderm exprimiert unter anderem *T*, *Bmp4*, *Furin* und *Pcsk6*. Das embryonale viscerale Endoderm ist weiter regionalisiert. *Dkk1* ist im visceralem Endoderm in einem distal liegenden Streifen exprimiert. Das distale viscerale Endoderm (DVE) bildet eine Verdickung aus (gelb), die charakteristische Gene exprimiert und an die zukünftige anteriore Seite des Embryos wandert (Pfeil). (C) Der Eizylinder kurz vor dem Einsetzen der Gastrulation. Die Zellen des DVE sind verlagert und markieren als antero-viscerales Endoderm (AVE) die anteriore Seite des Embryos und sekretiert Signale, die antagonistisch auf Tgf $\beta$ - und Wnt-Signale wirken. Die Expression der wichtigen Signalmoleküle ist in farbkodierten Boxen den embryonalen Regionen zugeordnet. *Wnt3* wird auf der Seite exprimiert, die dem AVE gegenüber liegt und zeigt das posteriore Ende des Embryos an. Die *T*-Expression verlagert sich zu diesem Zeitpunkt aus dem extraembryonalen Ektoderm in die Region der *Wnt3*-Expression im Epiblasten, wo sich der Primitivstreifen bildet.

Diese Zellen markieren das zukünftige anteriore Ende des Embryos und werden als antero-viscerales Endoderm (AVE) bezeichnet, dessen Signale die antero-posteriore Achse des Epiblasten festlegen (Abbildung 4C).

Die Zellen des Epiblasten exprimieren *Nodal*, das die Bmp-Expression im extraembryonalen Ektoderm induziert sowie das dem Epiblasten anliegende viscerale Endoderm zu embryonalem visceralem Endoderm spezifiziert (Brennan et al. 2001, Ben-Haim et al. 2006, Mesnard et al. 2006, Tam et al. 2007). Die proximo-distale Achse im Eizylinder manifestiert sich auf molekularer Ebene durch das Bmp-Signal aus dem extraembryonalen Ektoderm, das nach distal schwächer wird, sowie der Expression von *Wnt3* und einem verstärkten Nodal-Signal im proximalen Eizylinder (Abbildung 5) (Ang et al. 2004, Rivera-Perez et al. 2005, Soares et al. 2005, Ben-Haim et al. 2006, Chazaud et al. 2006b, Tam et al. 2007, Rossant et al. 2009). Am distalen Ende des Eizylinders, in ausreichender Distanz zu inhibierenden Bmp- und Wnt-Signalen (Donnison et al. 2005, Rodriguez et al. 2005,

Chazaud et al. 2006b, Richardson et al. 2006), spezifiziert Nodal die Zellen des DVE (Brennan et al. 2001, Mesnard et al. 2006). Diese Zellen exprimieren Antagonisten gegen Wnt- und TGF $\beta$ -Signale, die den proximo-distalen Signalgradienten im Epiblasten verstärken. Die Expression von *Wnt3* und *T (Brachyury)* am proximalen Eizylinder wird durch die anteriore Positionierung des DVE/AVE (Yamamoto et al. 2004) sowie *Dkk1*-exprimierender Zellen (Kimura et al. 2000, Perea-Gomez et al. 2001, Kimura-Yoshida et al. 2005) auf die zukünftig posteriore Seite des Embryos beschränkt und zeigt den Entstehungsort des Primitivstreifens an (Liu et al. 1999, Kimura et al. 2000, Perea-Gomez et al. 2001, Rivera-Perez et al. 2005, Ben-Haim et al. 2006).



**Abbildung 5: Molekulare Grundlagen der Achsenbildung.** Im Epiblasten wird Nodal-Protein synthetisiert, das im extraembryonalen Ektoderm die Expression der Proteinkonvertasen Furin und PCSK6 induziert. Diese spalten das Proprotein und verstärken so die Aktivität des Nodal-Proteins im proximalen Eizylinder. Durch die regionale beschränkte Verstärkung entsteht ein proximo-distaler Nodal-Signalgradient im Epiblasten. Das prozessierte Nodal-Signal aktiviert die Expression seines co-Rezeptors Cripto. Das Nodal-Signal im Epiblasten inhibiert *Hnf4*, *Gata4*, *Ttr* und *Furin* und verstärkt die Expression von *Lhx1*, *Fgf5*, *Fgf8*, *Bmp2*, *Otx2* und *Foxa2* im anliegenden visceralem Endoderm, sodass das extraembryonale und das embryonale viscerales Endoderm schließlich unterschiedliche Gene exprimieren. Das Nodal-Protein regt darüber hinaus die Expression von BMP4 im extraembryonalen Ektoderm (ex. Ektoderm) an. Das Bmp4-Signal aus dem extraembryonalen Ektoderm erzeugt ebenfalls einen proximo-distalen Gradienten im Eizylinder, der die Expression DVE-spezifischer Gene inhibiert. Nur am distalen Pol des gestreckten Eizylinders ist das Bmp4-Signal schwach genug, dass das prozessierte Nodal gemeinsam mit seinen co-Faktoren Cripto und GDF3 diese Gene aktivieren kann. Die DVE-spezifischen Gene erzeugen antagonistische Signale gegen BMP4 und Nodal und verstärken so den Signalgradienten im Epiblasten. Die Signale am proximalen Eizylinder führen zur regionalen Expression von *Wnt3* und *T*. Die Signale der DVE- und AVE-Zellen beschränken die Wirkung der TGF $\beta$ - und Wnt-Signale auf das gegenüber liegende Ende des Eizylinders und legen zunächst proximo-distale und schließlich die antero-posteriore Achse des Embryos fest (Ang et al. 2004, Tam et al. 2007).

Die Festlegung des anterioren und des posterioren Pols des zukünftigen Embryos im becherförmigen Epiblasten durch die Spezifizierung und Verschiebung des DVE/AVE ist eine Voraussetzung für die korrekte Positionierung des Primitivstreifens vor dem Einsetzen der Gastrulation. Die *T*-exprimierenden Zellen des Epiblasten beginnen schließlich mit der Ausbildung des Primitivstreifens und leiten damit die Gastrulation ein (Pfister et al. 2007, Tam et al. 2007, Rossant et al. 2009).

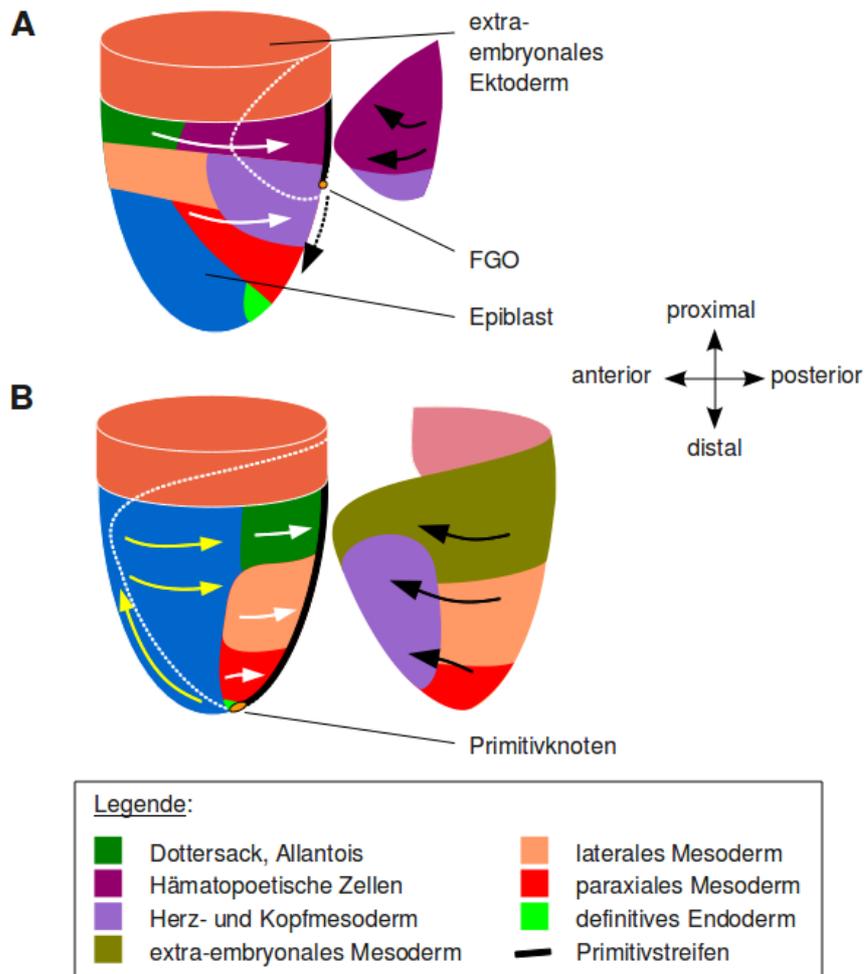
### ***Gastrulation***

Nach der Festlegung der antero-posterioren Achse des Embryos setzt um E6.5 die Gastrulation ein (Abbildung 6). Zunächst verschieben sich Zellen aus dem proximalen Epiblasten an das posteriore Ende des Embryos und bilden dort durch konvergente Extensionsbewegungen den Primitivstreifen. Die Zellen im Primitivstreifen lösen sich aus dem epithelialen Verband und verlassen den Epiblasten an seiner dem visceralen Endoderm zugewandten Seite, der ventralen Seite des Embryos. Der Primitivstreifen streckt sich zunehmend aus, bis er an E7,5 das distale Ende des Epiblasten erreicht. An seinem anterioren Ende bildet sich während der Ausstreckung der Primitivknoten heraus, der eine wichtige Funktion als Gastrula-Organisator annimmt (Tam et al. 1992, Hogan et al. 1994, Tam et al. 1997a, b, Robb et al. 2004).

Die Zellen, die den Epiblasten durch den Primitivstreifen verlassen, bilden das extraembryonale und das embryonale Mesoderm sowie das definitive Endoderm des Embryos. Die Zellen, die unter starkem Einfluss der Signale aus dem AVE stehen, bleiben im Epiblasten zurück. Sie ersetzen im Epiblasten die auswandernden Mesodermzellen und bilden das Neuroektoderm sowie die Vorläuferzellen des Oberflächenektoderms (Lawson et al. 1991, Lawson et al. 1992, Lawson et al. 1994, Parameswaran et al. 1995, Kinder et al. 1999, Lawson 1999, Kinder et al. 2000, Kinder et al. 2001a, b, Tam et al. 2004).

### ***Epithelial-Mesenchymale Transition im Primitivstreifen***

Die Zellen des Epiblasten bilden ein mehrreihiges Epithel (Jackson et al. 1981, Hogan et al. 1994). Epithelzellen haben eine apikobasale Achse und liegen einer Basalmembran auf, die sie von angrenzenden Geweben separiert. Epithelien bilden demnach Oberflächen zu



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des gastrulierenden Embryos.** Das viscerele Endoderm, der Dottersack und der ektoplazentale Konus sind nicht abgebildet. Das entstehende Mesoderm überdeckt den Epiblasten und wird aus Gründen der Übersichtlichkeit separiert dargestellt und die Ausbreitungsgrenze des Mesoderms über den Epiblasten durch die weiße gestrichelte Linie angezeigt. Die Ausbreitungsrichtung der Mesodermzellen ist durch schwarze Pfeile dargestellt. Die weißen Pfeile zeigen die Wanderung der Epiblastzellen zum Primitivstreifen an. Die gelben Pfeile zeigen die Wanderwege der im Epiblasten verbleibenden Ektodermzellen an. Die Lage der Vorläuferzellen im Epiblasten und die korrespondierenden Gewebe im Mesoderm sind farbkodiert dargestellt. Zellen aus den blau dargestellten Bereichen verbleiben im Epiblasten. (A) Frühe Phase. Der Primitivstreifen hat sich am posterioren Ende des Embryos gebildet und streckt sich zum distalen Pol aus (gestrichelter Pfeil). An seinem anterioren Ende bildet sich der frühe Gastrulaorganisator (FGO), eine Vorläuferstruktur des Primitivknotens. Die Vorläuferzellen von Mesoderm und Endoderm liegen im proximalen und lateralen Epiblasten. In das nascente Mesoderm sind in diesem frühen Stadium hämatopoetische Zellen eingewandert. Am distalen Ende des Primitivstreifens beginnen Vorläuferzellen des Kopf- und Herzmesoderms einzuwandern. (B) Später Primitivstreifen. Das Mesoderm hat den Epiblasten fast vollständig umschlossen. Der Primitivstreifen erstreckt sich bis zum distalen Pol des Embryos. An seinem anterioren Ende hat sich der Primitivknoten ausgebildet. Das Kopf- und Herzmesoderm kommt im anterioren Bereich des Embryos zum Liegen. Im Epiblasten sind die Vorläuferzellen des Mesendoderms weiter zum Primitivstreifen gewandert und werden durch nachwandernde primitive Ektodermzellen ersetzt (gelbe Pfeile). Am caudalen Primitivstreifen wandern die Zellen der Allantois und des Dottersacks in das nascente Mesoderm, weiter anterior das laterale Mesoderm und das paraxiale Mesoderm. Im Node-Bereich liegt das prospektive Endoderm, dessen Zellen später in das viscerele Endoderm interkalieren. Das axiale Mesoderm ist nicht dargestellt. nach: Murry et al. 2008, Kinder et al. 2001a

inneren Lumen (z.B. in Blutgefäßen, Drüsen, proamniotische Höhle) oder dem äußeren Bereich des Körpers aus und können als Barrieren oder der Absorption dienen. Die Zellen stehen über *adherens junctions*, Desmosomen, *tight junctions* und *gap junctions* in engem Kontakt mit einander und haben in erster Linie Zytokeratine als Intermediärfilamente. Mesenchymzellen dagegen zeigen keine Polarität, liegen keiner Basalmembran auf und stehen nicht in engem Kontakt mit einander. Sie sind in eine extrazelluläre Matrix eingebettet und besitzen die Fähigkeit zu migrieren. Als Intermediärfilamente kommen Vimentin und Desmin vor (Hay 2005, Thiery et al. 2009).

Im Primitivstreifen verlieren die Epiblastzellen ihre epithelialen Eigenschaften und nehmen mesenchymale Merkmale an. Sie bekommen migratorische Eigenschaften und durchbrechen die Basalmembran um sich aus dem Gewebeverband zu lösen (Hay 2005, Thiery et al. 2009). Im Primitivstreifen exprimieren die Zellen *Snai1* und *Fam48a* die der Inhibition der Transkription von *Cdh1* sowie zum Abbau des Adhäsionsproteins e-cadherin, das durch *Cdh1* kodiert wird, dienen. *Snai1*-defiziente Zellen verbleiben dagegen im Primitivstreifen und differenzieren dort weiter (Batlle et al. 2000, Cano et al. 2000, Carver et al. 2001, Zohn et al. 2006). Epithelial-Mesenchymale Transitionen (EMT) kommen in der Embryonalentwicklung häufig vor und sind ein wichtiges Instrument der Gewebebildung. In adulten Geweben, beispielsweise bei der Wundheilung, laufen ebenfalls EMT-Programme ab, die den Vorgängen im Embryo stark ähneln. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei Krankheiten wie Fibrosen und der Metastasierung von Tumoren (Thiery et al. 2009). Die EMT ist ein mehrstufiger Prozess. Neben dem Aufbrechen der Zellverbindungen ist es beispielsweise für die Zellen notwendig, migratorische Eigenschaften anzunehmen (Shook et al. 2003). Neben der Wirkung von *Snai1* und *Fam48a* sind vermutlich weitere Gene wichtig für den Ablauf der EMT. Die Untersuchung embryonaler EMT am Primitivstreifen kann Aufschluss über derartige Vorgänge geben.

### ***Festlegung des Zellschicksals im Primitivstreifen***

Die Bildung des Primitivstreifens kann in das frühe, das mittlere und das späte Stadium eingeteilt werden. Die Stadien sind durch die zunehmende Ausstreckung des Primitivstreifens gekennzeichnet. Das Schicksal der gastrulierenden Zellen hängt davon ab,

welchen Bereich des Primitivstreifens sie entlang seiner antero-posterioren Achse durchwandern und zu welchem Zeitpunkt der Gastrulation dies geschieht (Abbildung 6) (Lawson et al. 1991, Kinder et al. 1999, Kinder et al. 2001a). Zunächst verschieben sich die Zellen des proximalen Epiblasten an das caudale Ende des Embryos und migrieren dort durch den Primitivstreifen. Sie wandern über den proximalen Rand des Epiblasten hinaus und bilden das extraembryonale Mesoderm, hämatopoetische Zellen und die Keimbahnzellen. Zellen, die weiter anterior durch den Primitivstreifen wandern, bilden das embryonale Mesoderm. Sie verteilen sich zwischen dem becherförmigen Epiblasten und dem visceralen Endoderm und bilden eine geschlossene Zellschicht. Bei mittlerer Ausstreckung des Primitivstreifens durchwandern Zellen seinen anterioren Abschnitt, die im anterioren Bereich des Embryos das Herzmesoderm und das craniale Mesoderm bilden. Im Laufe der weiteren Ausdehnung des Primitivstreifens werden an seinem anterioren Ende die Zellen des distalen Epiblasten rekrutiert. In proximo-distaler Abfolge entstehen aus ihnen zunächst das Seitenplattenmesoderm und das paraxiale Mesoderm. Aus dem distalen Abschnitt des komplett ausgestreckten Primitivstreifens durchwandern ihn die Zellen des axialen Mesoderms und des definitiven Endoderms (Lawson et al. 1991, Parameswaran et al. 1995, Tam et al. 1997a, b, Kinder et al. 1999, Kinder et al. 2001a, Tam et al. 2004, Tam et al. 2007). Die Zellen des definitiven Endoderms interkalieren zwischen die Zellen des visceralen Endoderms und verdrängen es (Tam et al. 1992, Hogan et al. 1994, Tam et al. 1997a).

### ***Primitivknoten***

Sobald sich der Primitivstreifen etwa zur Hälfte ausgestreckt hat, wird an seinem anterioren Ende der Primitivknoten erkennbar. Diese morphologisch distinkte Struktur ist in der Lage, ektopisch embryonale Achsen zu induzieren. Sie besitzt die Eigenschaften eines Gastrula-Organisators im Sinne von Spemann und Mangold (Spemann et al. 1924, Gardner 1985) und ist mit der dorsalen Lippe der Amphibien-Gastrula und dem Hensen'schen Knoten der Vögel vergleichbar. Zellen mit Organisator-Eigenschaften lassen sich in der Maus bereits im posterioren Epiblasten des frühen Primitivstreifenstadiums als früher Gastrulaorganisator nachweisen (Abbildung 6) und bleiben im anterioren Ende des Primitivstreifens und seinen

anterioren Derivaten präsent. Sie sind ein wichtiger Signalgeber für die Musterbildung im Embryo (Hogan et al. 1994, Tam et al. 1997a, Tam et al. 2004, Rossant et al. 2009).

### ***Schwanzknospe und Achsenverlängerung***

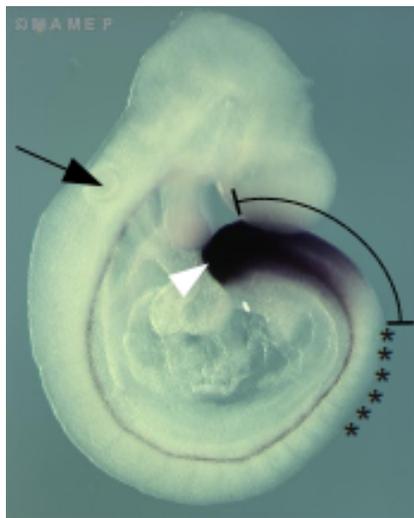
Nachdem sich der Primitivstreifen bis zum distalen Pol des Eizylinders ausgestreckt hat und die anterioren Strukturen angelegt sind, beginnt im Embryo die Achsenverlängerung. Der Primitivstreifen zieht sich ab E7,5 mit dem Primitivknoten an das posteriore Ende des Embryos in eine Endknospe, den *tail bud*, zurück. Diese Sprossungszone ist die einzige Quelle aller Zellen für die nun entstehenden posterioren Gewebe und behält Organisator-Eigenschaften (Griffith et al. 1992, Robb et al. 2004). Die embryonale Achse wird an ihrem caudalen Ende verlängert und es entstehen ebenfalls Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Diese Phase der Embryonalentwicklung kann als sekundäre Körperentwicklung der primären Körperentwicklung bis E7,5 gegenübergestellt werden (Griffith et al. 1992, Cambrey et al. 2002).

### ***Entwicklung des paraxialen Mesoderms***

Das paraxiale Mesoderm ist in zwei Gewebestreifen zu beiden Seiten des Neuralrohres angeordnet (Abbildung 7). Es erstreckt sich vom caudalen Ende des Embryos bis zum otischen Vesikel. Vor dem Einsetzen der Achsenverlängerung entsteht es am distalen Primitivstreifen, caudal des Primitivknotens. Während der Achsenverlängerung rekrutiert es Zellen aus dem *tail bud* (Tam et al. 1982, Griffith et al. 1992, Christ et al. 1995, Christ et al. 1998). Das junge paraxiale Mesoderm liegt als durchgehender mesenchymaler Gewebestrang vor. Am cranialen Ende dieses unsegmentierten Gewebes trennen sich epithelialisierte Gewebeportionen ab, die als Somiten bezeichnet werden. Das anteriore paraxiale Mesoderm weist daher eine charakteristische metamere Segmentierung auf, die die Segmentierung des Vertebratenkörpers widerspiegelt. Die sich ausbildenden Somiten sind transiente Strukturen, die kurz nach ihrer Entstehung eine innere Differenzierung durchlaufen und sich dann auflösen. Zellen, die nahe des Notochords liegen, bilden das Sklerotom, aus dessen Zellen das Achsenskelett entsteht. Die restlichen Zellen bilden das Dermomyotom, aus dem die gestreifte Muskulatur und die Haut des Rückens hervorgehen

(Tam et al. 1982, Christ et al. 1998).

Von der Entstehung des präsomitischen Mesoderms aus der Schwanzknospe bis zu seiner morphologisch erkennbaren Segmentierung an seinem anterioren Ende, läuft in den Zellen ein molekulares Programm ab, das das Einsetzen der Epithelialisierung und so die Positionierung der Somitengrenzen steuert. Dieses Programm beruht auf einem Wnt-Signalgradienten, der vom *tail bud* nach anterior abnimmt. Das Wnt-Signal führt zur Akkumulation von AXIN2 im Zytoplasma und schließlich zur Inhibition des Wnt-Signalweges. Ohne Wnt-Signal wird *Axin2* nicht weiter exprimiert, sodass seine Konzentration im



**Abbildung 7: Paraxiales Mesoderm.** Das Bild zeigt einen Embryo im Theiler-Stadium 14 (E9,5) mit *in situ* Hybridisierung gegen *T*, das im *tail bud* (weiße Pfeilspitze), dem unsegmentierten paraxialen Mesoderm (Linie mit Bemaßungsenden) und im axialen Mesoderm zu erkennen ist. Das somitische paraxiale Mesoderm ist als segmentierte Struktur dorsal im Embryo zu erkennen. Der schwarze Pfeil zeigt das otische Vesikel an, bis wohin sich das paraxiale Mesoderm erstreckt. Die Sterne zeigen die Positionen der jüngsten Somiten. (aus: MAMEP Datenbank, <http://mamep.molgen.mpg.de>)

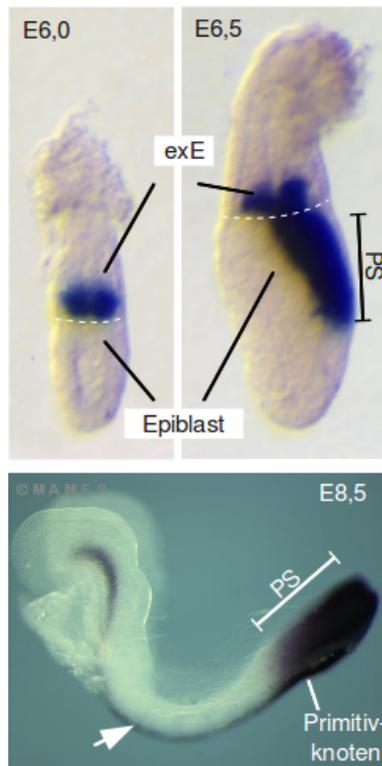
Zytoplasma wieder sinkt. Fällt sie unter eine kritische Grenze, wird die Inhibition des Wnt-Signals unterbrochen was erneut in der Expression von *Axin2* resultiert. Durch den negativen Rückkopplungsmechanismus unterliegt die Weiterleitung des Wnt-Signals einer oszillierenden Inhibition. Gleichzeitig führt dies, antizyklisch zur Aktivität des Wnt-Signalweges, zur periodischen Aktivierung des Notch-Signalweges. Je länger die Zellen im präsomitischen Mesoderm verbleiben, desto geringer wird die WNT3a-Konzentration im extrazellulären Bereich. Fällt die Wnt-Signalstärke unter eine kritische Grenze, wird kein neuer Zyklus ausgelöst und Notch bleibt aktiv. Posterior dieser Zellen wird eine Somitengrenze zu den noch oszillierenden Zellen eingezogen (Aulehla et al. 2003).

## Genexpression und Zelldifferenzierung

Die Differenzierung von Zellen kann als ein Prozess betrachtet werden, bei dem in zeitlicher Abfolge bestimmte Gene aktiv sind. Jeder Zustand der Zelle im Verlauf der Differenzierung lässt dabei unter natürlichen Umständen nur bestimmte Folgezustände zu. Welche Differenzierungsrichtung eingeschlagen wird, hängt von den auf die Zelle wirkenden Signalen ab. Eine ausdifferenzierte Zelle hat schließlich einen charakteristischen Satz aktiver Gene um ihre zelltypspezifischen Aufgaben zu erfüllen. Die Regulation der Genaktivität in der Zelle erfolgt durch verschiedene Prozesse. Die Transkription kann durch Veränderungen der Zugänglichkeit des Chromatins reguliert werden. Die Methylierung der DNS sowie die Acetylierung und Deacetylierung der Histone beeinflussen die Aktivität der DNS-Abschnitte. Transkriptionsfaktoren können allein oder im Zusammenspiel mit anderen Proteinen die Bindung der RNS-Polymerase begünstigen oder blockieren. Ihre Aktivität kann über ihre Synthese und Kernlokalisierung sowie durch die Bindung von co-Faktoren oder durch posttranslationelle Prozesse wie Phosphorylierung und Spaltung des Proteins reguliert sein. Einige Transkriptionsfaktoren sind charakteristisch und essentiell für die Entstehung bestimmter Zelltypen im Embryo. Für die Entwicklung von paraxialem Mesoderm sind die Transkriptionsfaktoren *T*, *Msn1* und *Tbx6* essentiell (Wilkinson et al. 1990, Chapman et al. 1998, Yoon et al. 2000a, b, Wittler et al. 2007).

### ***T (Brachyury)***

Der Transkriptionsfaktor *T (Brachyury)* aus der Familie der T-Box-Gene hat eine zentrale Funktion für die Mesodermbildung im Embryo. Etwa einen Tag vor Beginn der Gastrulation ist *T* im distalen extraembryonalen Ektoderm aktiv (Abbildung 8). Kurz vor dem Einsetzen der Gastrulation an E6,5 kann das Transkript nur noch im Bereich des sich bildenden Primitivstreifens nachgewiesen werden. *T* ist über die gesamte Länge des Primitivstreifens und im Primitivknoten stark exprimiert. Zusätzlich ist es im gesamten axialen Mesoderm aktiv. Während der Achsenverlängerung bleibt das Transkript im *tail bud* und im präsomitischen Mesoderm nachweisbar (Wilkinson et al. 1990). In homozygoten Mutanten sind die Bildung des Mesoderms und die Migration der Zellen aus dem Primitivstreifen gestört. Die Embryonen entwickeln kein Notochord, zeigen eine fehlerhafte Ausbildung der

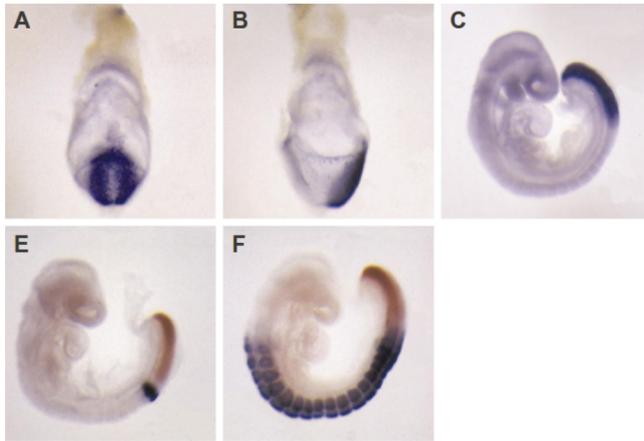


**Abbildung 8: Expression von Brachyury während der frühen Embryogenese.** Vor dem Einsetzen der Gastrulation an E6,0 ist *T* im gesamten distalen Bereich des extraembryonalen Ektoderms (exE) exprimiert. Die Expression verlagert sich nach posterior und in den Epiblasten. *T* ist schließlich am Entstehungsort des Primitivstreifens (PS) exprimiert. Die gestrichelte weiße Linie zeigt die Grenze zwischen Epiblast und exE an. Nach 8,5 Tagen lässt sich das Transkript im Primitivstreifen, Primitivknoten, jungen Mesoderm und im axialen Mesoderm (Pfeil) nachweisen. (Fotos E6,0 und E6,5: (Rivera-Perez et al. 2005), E8,5 MAMEP Datenbank, <http://mamep.molgen.mpg.de>).

Allantois sowie der Somiten und zeigen eine gestörte Entwicklung des Rumpfes. Sie sterben kurz nach der Gastrulation. Ist nur ein Allel mutiert, resultiert das in einem verkürzten und geknickten Schwanz und teilweise in Missbildungen im Beckenbereich adulter Tiere (Yanagisawa et al. 1981, Rivera-Perez et al. 2005). Die Expression von *T* kann in der Maus durch Bmp-, Wnt- und Nodal-Signale induziert werden (Wilson et al. 1993, Arnold et al. 2000, Ben-Haim et al. 2006, Suzuki et al. 2006).

### ***Msgn1***

*Msgn1* gehört zu den bHLH-Transkriptionsfaktoren und ist zwischen Amphibien und Plazentatieren gut konserviert (Yoon et al. 2000b). Seine Expression (Abbildung 9) ist in der Maus mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen bis zum Einsetzen der Gastrulation nicht detektierbar. Nach der Bildung des Primitivstreifens wird *Msgn1* im nascenten Mesoderm aktiviert, sobald dieses den Primitivstreifen verlässt. Die Boten-RNS ist während der Gastrulation entlang des gesamten Primitivstreifens zu sehen, jedoch nicht im Primitivstreifen selbst oder im definitiven Endoderm oder im Ektoderm. Während der Achsenverlängerung ist es im *tail bud* exprimiert und bleibt nur im präsomitischen Mesoderm aktiv. Im segmentierten paraxialen



**Abbildung 9: Expression von *Msgn1* während der frühen Embryogenese.** (A,B) E7,5: Mit dem Einsetzen der Gastrulation ist *Msgn1* beidseitig entlang des Primitivstreifens erkennbar, jedoch nicht im Primitivstreifen selbst (A: von posterior, B: laterale Ansicht, anterior liegt links). (C) E9,5: Die Expression erstreckt sich vom *tail bud* über das präsomitische Mesoderm, ist jedoch nicht in den Somiten vorhanden. (E,F) E9,5: Die Expressionen von *Msgn1* (rot) schließt sich mit der Expression der Marker für den entstehenden Somiten *Mesp1* (E) sowie dem Somitenmarker *Tcf15* (F, beide blau) aus (modifiziert nach [Yoon et al. 2000b])

Mesoderm ist *Msgn1* nicht mehr aktiv. Seine Expression schließt sich mit den frühen Somitenmarkern *Mesp1* und *Mesp2* sowie *Tcf15* aus. Es kann auch, sobald nach 14,5 Tagen Embryonalentwicklung kein paraxiales Mesoderm mehr gebildet wird, nicht mehr nachgewiesen werden (Yoon et al. 2000a). Null-Mutanten von *Msgn1* bilden caudal der vorderen Extremitätenanlage kein paraxiales Mesoderm aus und sterben ab (Yoon et al. 2000b).

### **Untersuchung der Embryonalentwicklung *in vitro***

Der Embryo nistet sich bei Plazentatieren bereits im Blastozystenstadium in die Uteruswand ein, sodass die Isolation ausreichender Zellmengen für molekularbiologische Untersuchungen einen erheblichem Aufwand erfordert. Es ist daher erstrebenswert, für die detaillierte Untersuchung der frühen Embryonalentwicklung von Säugetieren *in vitro* Modelle zu etablieren. Embryonale Stammzellen können routinemäßig in großen Mengen produziert werden und haben eine große Ähnlichkeit mit den Zellen der inneren Zellmasse. Sie sind in der Lage, alle Gewebe des Embryos zu generieren und lassen sich mit relativ geringem Aufwand genetisch manipulieren. Die Kulturbedingungen können im Labor überwacht und gesteuert werden. Embryonale Stammzellen eignen sich aus diesen Gründen ausgezeichnet zur Modellierung embryologischer Vorgänge *in vitro*.

### **Isolation und Kultur embryonaler Stammzellen**

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus können 3,5 Tage nach der Befruchtung der Eizelle aus der inneren Zellmasse des Embryos isoliert werden. Sie können in Medium gehalten werden, das mit fötalem Kälberserum versetzt und von embryonalen Fibroblasten

oder von Teratokarzinomzellen konditioniert wurde. Werden die Zellen regelmäßig vereinzelt und wieder ausgesät, lassen sie sich praktisch unbegrenzt in undifferenziertem Zustand propagieren und vermehren (Evans et al. 1981, Martin 1981). Sie bewahren ihre Morphologie und halten die Expression der Pluripotenzmarker *Pou5f1*, *Nanog* und *Sox2* sowie die des Oberflächenmarkers SSEA1 und die Aktivitäten von Telomerase und alkalischer Phosphatase aufrecht (Solter et al. 1978, Evans et al. 1981, Martin 1981, Rosner et al. 1990, Hofmann et al. 1993, Niwa et al. 2000, Cavaleri et al. 2003, Chambers et al. 2003, Mitsui et al. 2003). Durch die Zugabe von rekombinantem LIF in das Stammzellmedium kann die Notwendigkeit, serumhaltiges Medium zu konditionieren oder die embryonalen Stammzellen in co-Kultur mit embryonalen Fibroblasten zu halten, umgangen werden. Die Zellen können dann in einer gelatinierten Zellkulturschale in Reinkultur gehalten werden (Smith et al. 1988, Williams et al. 1988). Wird die Zugabe von LIF mit der Zugabe von BMP4 kombiniert, behalten die embryonalen Stammzellen der Maus auch in serumfreiem Medium ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Ying et al. 2003a).

### ***Differenzierung embryonaler Stammzellen in vitro***

Werden embryonale Stammzellen unter Bedingungen gehalten, die die Selbsterneuerung nicht unterstützen, beginnen sie zu differenzieren. Die Differenzierungsrichtung ist von den Signalen abhängig, die dann auf die Zellen wirken (Keller 1995, Smith 2001, Keller 2005, Murry et al. 2008). Zur Differenzierung embryonaler Stammzellen sind verschiedene Methoden entwickelt worden (Murry et al. 2008). Eine etablierte Methode zur Differenzierung embryonaler Stammzellen ist die Kultivierung frei schwimmender Zellaggregationen. Innerhalb der sich ausbildenden kugelförmigen Kolonien können Derivate der drei embryonalen Keimblätter sowie viscerales Endoderm entstehen (Doetschman et al. 1985). Nach der inneren Differenzierung bezeichnet man diese Kolonien wegen ihrer embryoähnlichen Struktur mit dem englischen Fachbegriff als *embryoid bodies*. Adhärenzte Zellkulturen führen in der Regel zu flach auswachsenden Kolonien. Die Zellen werden meist auf extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagenen oder Fibronectin gehalten oder mit anderen Zelltypen, wie den Zelllinien OP9 oder HepG2 co-kultiviert. Die Signale der co-kultivierten Zellen unterstützen die gewünschte Differenzierung der ES-Zellen in die gewünschte Richtung.

Die Differenzierung embryonaler Stammzellen lässt sich durch die Zusammensetzung des Mediums beeinflussen. Fötales Rinderserum enthält Signale, die die Differenzierung embryonaler Stammzellen beeinflussen. Die Zusammensetzung von Seren ist jedoch kaum definierbar und unterliegt einer Variabilität. Die im Serum enthaltenen Faktoren begünstigen außerdem nicht alle Differenzierungsrichtungen der Stammzellen und können die Entstehung des gewünschten Zelltyps sogar behindern. Zur Untersuchung verschiedener Signalwege lassen sich die Medien gezielt mit chemischen Wirkstoffen oder rekombinanten Proteinen in unterschiedlichen Konzentrationen und zeitlich kontrolliert supplementieren (Keller 1995, Keller 2005, Murry et al. 2008). Um die Einflüsse des Serums auszuschließen, eignen sich serumfreie Medien besonders für die gezielte *in vitro* Differenzierung.

Embryonale Stammzellen lassen sich genetisch manipulieren ohne dass sie dabei ihre Pluripotenz verlieren. Um die Differenzierung in die gewünschte Richtung zu bewirken, kann die genetische Information für Transkriptionsfaktoren oder von Molekülen, die in wichtigen Signalwegen eine Rolle spielen, in die Zellen eingeschleust oder aus dem Genom deletiert werden. Genomische Manipulationen lassen sich jedoch im Vergleich zu Medienzusätzen nur eingeschränkt dosieren und zeitlich kontrollieren (Keller 1995, Keller 2005, Murry et al. 2008).

Die Kapazität der embryonalen Stammzellen alle embryonalen Gewebe generieren zu können hat zur Folge, dass die Differenzierungsrichtung der Stammzellen nur eingeschränkt gesteuert werden kann. Um eine reine Population des erwünschten Zelltyps zu bekommen ist es daher notwendig, den gewünschten Zelltyp anhand seiner charakteristischen Eigenschaften von den anderen Zellen, die in der Differenzierungskultur entstehen, zu isolieren. Dies kann über charakteristische Oberflächenmoleküle erfolgen, soweit diese bekannt sind (Nishikawa et al. 1998). Alternativ kann den Zellen ein Reporter gen eingeschleust werden, das die Zellen markiert, die den gewünschten Zustand erreicht haben (Keller 1995, Keller 2005, Murry et al. 2008).

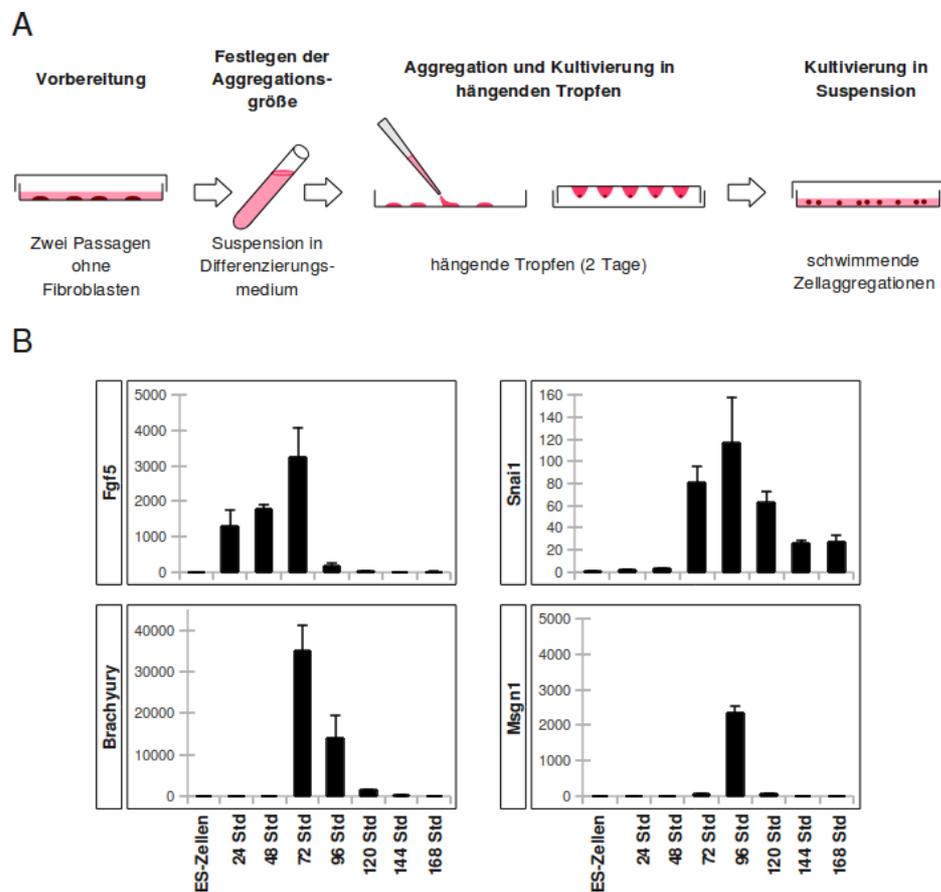
Bei der Differenzierung embryonaler Stammzellen lag der Fokus in der Vergangenheit vor allem auf der Herstellung von Endodermderivaten, hämatopoetischen Zellen, Herzmesoderm und verschiedenen neuronalen Zelltypen. Die Herstellung paraxialen Mesoderms und seiner Derivate ist dagegen bislang nur wenig beachtet worden.

# Ergebnisse

## Mesodermdifferenzierung *in vitro*

### Expression von *Msgn1* während der Differenzierung in embryoid bodies

Die Aggregation embryonaler Stammzellen und ihre Differenzierung in frei schwimmenden *embryoid bodies* in serumhaltigem Medium ist eine häufig angewandte Methode zur Herstellung embryonaler Zelltypen *in vitro* (Doetschman et al. 1985). In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob bei der Differenzierung mit dieser Methode präsomitisches



**Abbildung 10: Differenzierung aggregierter embryonaler Stammzellen in serumhaltigem Medium.** (A) Schema des Protokolls. Die Zellen wurden zwei Passagen ohne Fibroblasten in LIF-supplementiertem Stammzellmedium gehalten. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt, in Differenzierungsmedium mit 20% Serum resuspendiert, zu je 500 Zellen in hängenden Tropfen mit je 20µl Volumen aggregiert und zwei Tage kultiviert. Nach Ablauf der 2 Tage wurden die Zellaggregationen mit frischem Differenzierungsmedium in nicht adhätierenden Kulturschalen gehalten. (B) Die Expression der Marker-gene *Fgf5*, *T (Brachyury)*, *Snai1* und *Msgn1* wurde alle 24 Stunden nach Aggregationsbeginn mit quantitativer PCR ermittelt. Die Skala der y-Achsen zeigt die Vervielfachung der Transkriptmenge im Verhältnis zu undifferenzierten embryonalen Stammzellen an. Std: Stunden; ES-Zellen: embryonale Stammzellen

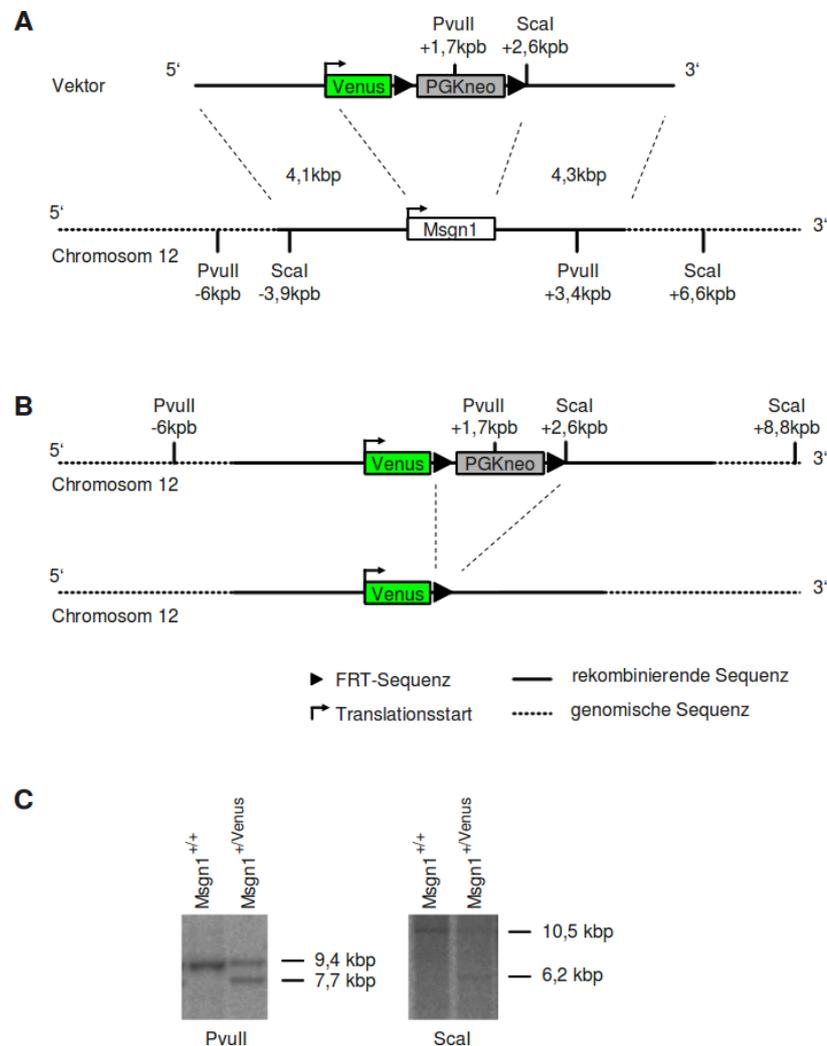
Mesoderm entsteht (Abbildung 10). Vor der Aggregation der embryonalen Stammzellen und im Abstand von 24 Stunden nach Beginn der Differenzierung wurde ein Teil der Zellen abgenommen und die RNS isoliert. Zur molekularen Analyse der Differenzierung wurden die Transkriptmengen von *Fgf5*, *T (Brachyury)*, *Msgn1* und *Snai1* in den RNS-Proben mit quantitativer PCR verglichen. Nach 24 Stunden konnte eine verstärkte Expression des Epiblast-Markergens *Fgf5* (Goldfarb et al. 1991, Hebert et al. 1991) gemessen werden, die 72 Stunden nach Differenzierungsbeginn von der Aktivität der Primitivstreifenmarker *T (Brachyury)* (Wilkinson et al. 1990) und *Snai1* (Nieto et al. 1992, Rivera-Perez et al. 2005) abgelöst wurde. Die Expression beider Gene, insbesondere von *T*, schwächte sich zu den folgenden Messzeitpunkten ab. Nach 96 Stunden wurde eine stark angestiegene Expression von *Msgn1*, einem Markergen für präsomitisches Mesoderm, gemessen (Yoon et al. 2000a), die zu den folgenden Messzeitpunkten wieder deutlich schwächer wurde. Die Ergebnisse zeigten eine sequenzielle Expression von *Fgf5*, *T*, *Snai1* und *Msgn1*, die der erwarteten Expressionsabfolge bei der Entstehung von paraxialem Mesoderms entspricht. Bei der *in vitro* Differenzierung von *embryoid bodies* in serumhaltigem Medium werden demnach die untersuchten Markergene für die Entstehung paraxialen Mesoderms exprimiert.

### **Herstellung von *Msgn1*-Reporterzellen**

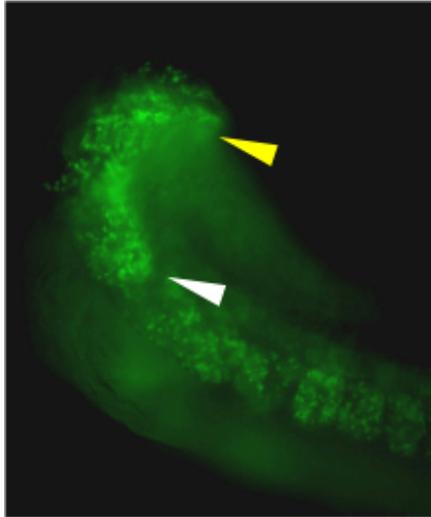
Für die routinemäßige und quantifizierbare Analyse der Differenzierung zu präsomitischem Mesoderm, wurde eine Reporter-Zelllinie für das Markergen *Msgn1* verwendet (Abbildung 11). In diesen Zellen wurde das offene Leseraster von *Msgn1* mittels homologer Rekombination durch die kodierende Sequenz des fluoreszierenden Proteins Venus sowie einer von FRT-Sequenzen flankierten Neomycin-Selektionskassette ersetzt (Dr. Lars Wittler, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) (Capecchi 1989, Sauer 1994, Nagai et al. 2002). Die Selektionskassette wurde durch transiente Transfektion der Zellen mit einem Expressionsvektor, der die kodierende Sequenz der *flp*-Rekombinase enthielt, wieder entfernt.

Um die korrekte Expression des Reporters zu verifizieren, wurden durch tetraploide Aggregation aus den Reporterzellen generierte Embryonen im Theiler-Stadium 14 (etwa E9,5) (Theiler 1972) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Expression des fluoreszierenden Reporterproteins deckte sich mit der Verteilung der Boten-RNS im Wildtyp-Embryo

(Yoon et al. 2000b). Zellen am caudalen Ende des Embryos und im präsomitischen Mesoderm zeigten erwartungsgemäß eine starke Aktivität des fluoreszierenden Reporters (Abbildung 12).



**Abbildung 11: Genomische Modifikation zur Herstellung der *Msgn1*-Reporterzelllinie.** (A) In das Vektor-Plasmid wurden etwa 9kbp des *Msgn1*-Lokus kloniert und das offene Leseraster von *Msgn1* (weißes Rechteck) wurde durch die kodierende Sequenz von Venus (grünes Rechteck) und eine von FRT-Sequenzen flankierte Selektionskassette (PGKneo, graues Rechteck) ersetzt. Dieser Vektor wurde zur homologen Rekombination in embryonale Zellen transfiziert. (B) Der Genlocus von *Msgn1* enthält nach der Rekombination den Venus-Reporter und die Selektionskassette (oben). Die Selektionskassette wurde durch *flp*-Rekombinase vermittelte Rekombination der FRT-Sequenzen ausgeschnitten. Im Genlocus von *Msgn1* ist das offene Leseraster am Startkodon durch die kodierende Sequenz von Venus ersetzt (unten). (C) Southern Blot zum Nachweis der korrekten Integration. Die relevanten Schnittstellen und ihr Abstand zum Startkodon sind in (A) und (B) angegeben. Im modifizierten 5'-Abschnitt lässt sich die erwartete 7,7 kbp-Bande nachweisen, im 3' Abschnitt die 6,2 kbp-Bande. Die 9,4 kbp-Bande und die 10,5 kbp-Bande repräsentieren das Wildtyp-Allel.



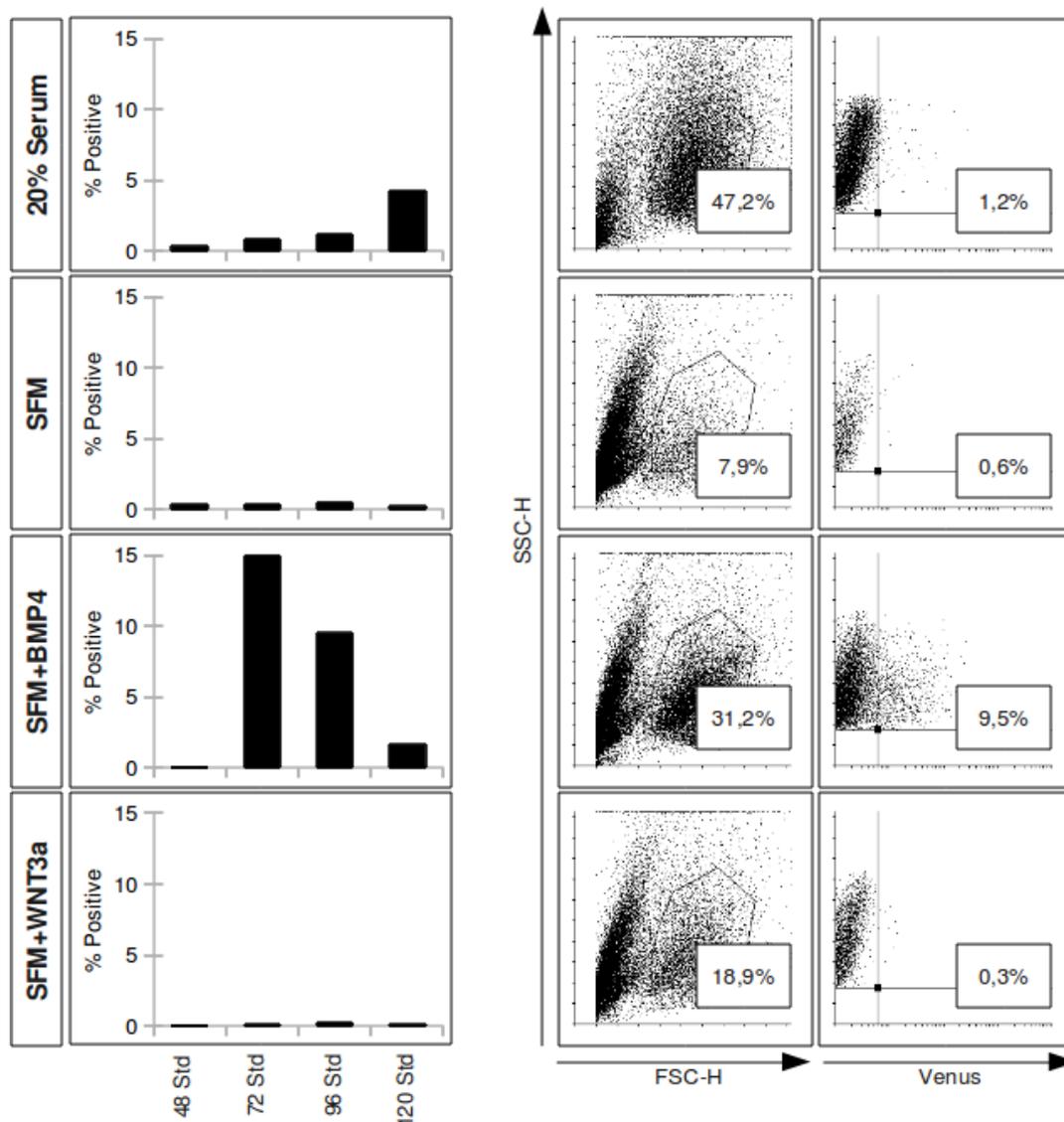
**Abbildung 12: Expression des *Msgn1*-Reporters an E9,5.** Die Aufnahme zeigt das caudale Ende der Embryonen mit dem präsomitischen Mesoderm und den jüngsten Somiten. Der weiße Pfeil zeigt das anteriore Ende des präsomitischen Mesoderms an, der gelbe Pfeil den *tail bud*. Die Zellen im präsomitischen Mesoderm und im *tail bud* zeigen das fluoreszente Protein. Das Fluoreszenzsignal bleibt in den jungen Somiten detektierbar.

### ***Differenzierung der Reporterzellen in verschiedenen Medien***

Im ersten Experiment konnte das Transkript von *Msgn1* in *embryoid bodies* nachgewiesen werden, die in serumhaltigem Medium differenziert wurden. Um den Anteil *Msgn1*-Reporter exprimierender Zellen zu quantifizieren, wurden die *Msgn1*-Reporterzellen nach dem gleichen Verfahren differenziert und die fluoreszierenden Zellen mit einem Durchflusszytometer ausgezählt. Neben dem zuvor verwendeten Differenzierungsmedium mit 20% Serumanteil wurde serumfreies Differenzierungsmedium verwendet. Da Wnt- und Bmp-Signale *in vivo* eine wichtige Rolle in der Mesodermbildung spielen (Winnier et al. 1995, Liu et al. 1999), wurde das serumfreie Medium sowohl ohne Zusätze als auch mit rekombinantem BMP4- oder WNT3a-Protein verwendet. In reinem serumfreiem Medium aggregierten die Zellen wesentlich langsamer und die Zellaggregationen waren deutlich weniger kompakt als in den anderen Medien. Die Ausbeute an fluoreszierenden Zellen hing stark vom verwendeten Medium ab (Abbildung 13). In serumhaltigem Medium exprimierten 120 Stunden nach Differenzierungsbeginn etwa 5% der Zellen den Reporter. In serumfreiem Medium allein oder nach Zugabe von Wnt3a-Protein konnten praktisch keine fluoreszierenden Zellen detektiert werden. Auffällig war dagegen, dass im serumfreien Medium mit BMP4 bis zu 15% der Zellen den Reporter aktiviert hatten. Bemerkenswert war auch, dass die höchste Ausbeute bereits nach 72 Stunden Differenzierungsdauer gemessen werden konnte.

Im Durchflusszytometer wurden intakte Zellen von toten Zellen und anderen Partikeln

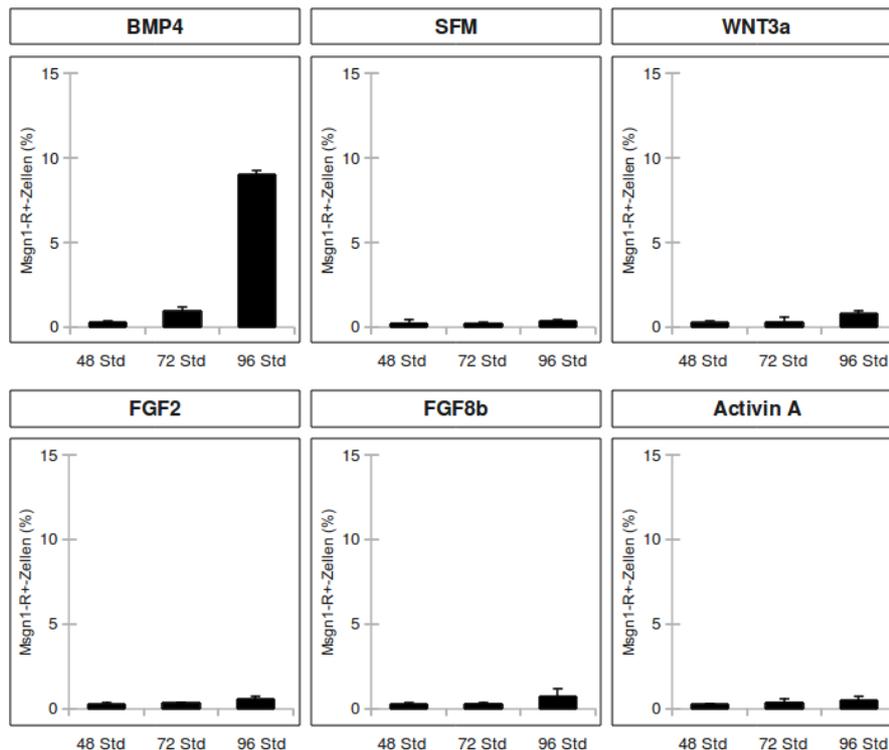
anhand ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Lichts unterschieden (Abbildung 13). Nach 96 Stunden Differenzierungsdauer konnte im serumhaltigen Medium der größte Anteil lebender Zellen gefunden werden. In serumfreiem Medium allein wurden nur sehr wenige intakte Zellen gemessen. Der Anteil intakter Zellen stieg jedoch deutlich an, wenn das



**Abbildung 13: Aktivierung des *Msgn1*-Reporters in verschiedenen Zellkulturmedien.** *Msgn1*-Reporterzellen wurden über 120 Stunden in verschiedenen Medien differenziert und der Anteil fluoreszierender Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem Durchflusszytometer bestimmt. Die Diagramme links zeigen den prozentualen Anteil fluoreszierender Zellen (% Positive) zu den angegebenen Messzeitpunkten an. Die Streudiagramme rechts zeigen die durchflusszytometrische Analyse der Proben nach 96 Stunden. Die Intensität des Vorwärtsstrelights (FSC-H) oder der Fluoreszenz (Venus) ist gegen die des Seitwärtsstrelights (SSC-H) aufgetragen. Die Messpunkte in der eingegrenzten Region repräsentieren intakte Zellen. Der angegebene Prozentwert im linken Streudiagramm zeigt den Anteil der Messpunkte an, die in diese Region fallen, der Wert rechts den Anteil fluoreszierender Zellen. In serumhaltigem Medium ist ein großer Anteil intakter Zellen erkennbar. In serumfreiem Medium (SFM) kamen besonders wenige intakte Zellen vor. Der Wert verbessert sich durch die Zugabe rekombinanter Proteine deutlich. Nur die Zugabe von BMP4 führt zu einem großen Anteil fluoreszierender Zellen.

Medium mit rekombinantem BMP4 oder WNT3a versetzt wurde.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Überlebensraten der Zellen als auch die Differenzierungseffizienz zu *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen stark vom verwendeten Medium abhingen. In mit BMP4 supplementiertem serumfreiem Medium konnten sowohl hohe Überlebensraten als auch der größte Anteil von Zellen mit aktiviertem *Msgn1*-Reporter gemessen werden.



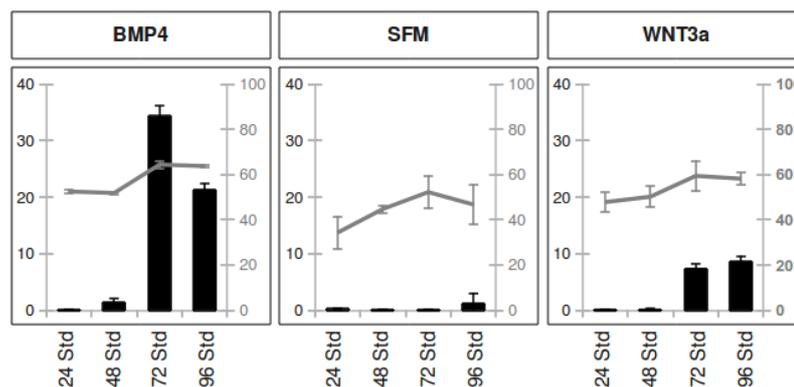
**Abbildung 14: Aktivierung des *Msgn1*-Reporters in serumfreien Medien.** *Msgn1*-Reporterzellen wurden in schwimmenden Zellaggregationen in serumfreiem Medium durch Zugabe rekombinanter Proteine (10ng/ml BMP4, 50ng/ml WNT3a, je 200ng/ml FGF2 und FGF8b, 100ng/ml Activin A) stimuliert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil fluoreszierender Zellen zu den angegebenen Messzeitpunkten nach Differenzierungsbeginn an. Std=Stunden

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob sich durch Zugabe weiter rekombinanter Proteine, deren Signale eine Rolle in der Mesodermbildung spielen (Conlon et al. 1994, Yamaguchi et al. 1994, Ciruna et al. 2001), zu serumfreiem Medium ebenfalls *Msgn1*-Reporter exprimierende Zellen generieren lassen. Das serumfreie Medium wurde entweder mit BMP4, WNT3a, FGF2, FGF8b oder Activin A versetzt (Abbildung 14). Erneut konnte nur

nach Zugabe von rekombinantem BMP4 eine nennenswerte Anzahl fluoreszierender Zellen gefunden werden. Auch die Erhöhung der Konzentration des WNT3a-Proteins im Medium von 10ng/ml auf 50ng/ml brachte keine bedeutende Steigerung der Ausbeute in diesem Differenzierungsansatz.

### **Differenzierung in adhärenenten Kulturen**

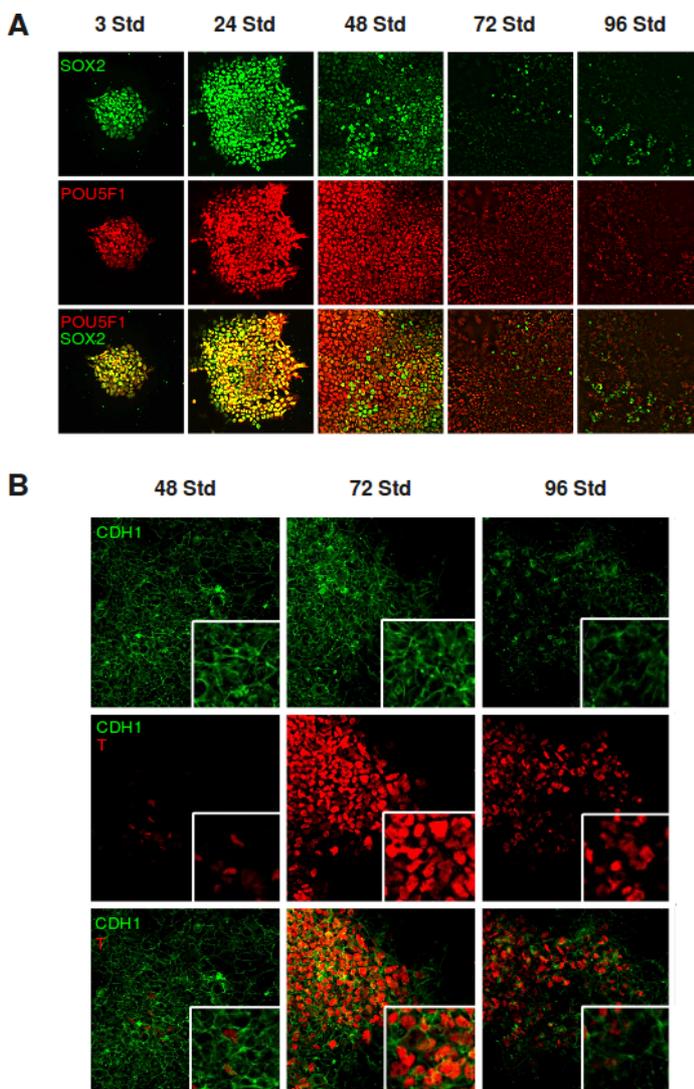
Die Experimente haben gezeigt, dass die *in vitro* Differenzierung stark von der Medienzusammensetzung beeinflusst wird. Um das Verfahren zu optimieren, wurde versucht die Zellen in adhärenenter Zellkultur zu differenzieren, anstatt frei schwimmende *embryoid bodies* zu generieren. Um gleichmäßig große, undifferenzierte Kolonien zu erhalten, wurden die Zellen vor dem Ausplattieren über Nacht in Stammzellmedium aggregiert. Auf fibronektinbeschichteten Kulturschalen hafteten die Aggregationen schnell an und bildeten Kolonien gleicher Größe. Adhärenente Zellkolonien wuchsen im Gegensatz zu schwimmenden Kolonien innerhalb weniger Stunden flach aus und bildeten erst nach fortgeschrittener Differenzierung wenige übereinander liegende Zellschichten. Bei der Verwendung gelatinebeschichteter Zellkulturschalen dauerte die Adhäsion der Aggregationen erheblich länger. Die Kolonien breiteten sich kaum aus und behielten meist eine haufenförmige Morphologie (Daten nicht gezeigt). Für die nachfolgenden Experimente wurden die Kulturgefäße durchgehend mit



**Abbildung 15: Reporterexpression in adhärenenten Zellkolonien.** Die Balken zeigen den Anteil von *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten an. Die grauen Linien zeigen den Anteil intakter Zellen. Die Balken beziehen sich auf die linke y-Achse, die Kurve auf die rechte y-Achse. Die Werte beider y-Achsen sind Prozentangaben. In allen Ansätzen ist eine hohe Überlebensrate der Zellen zu erkennen. Der Anteil Reporter exprimierender Zellen ist in beiden supplementierten Medien hoch.

Fibronektin beschichtet. Das serumfreie Differenzierungsmedium wurde mit BMP4 oder mit WNT3a versetzt.

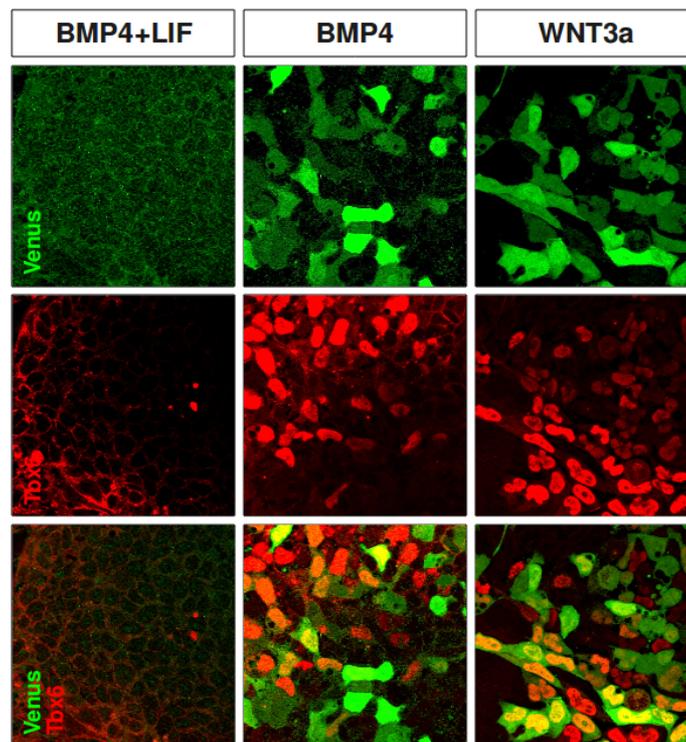
Die Analyse mit dem Durchflusszytometer zeigte, dass sich das Plattieren der zuvor aggregierten Kolonien auf Fibronektin positiv auf die Überlebensrate der Zellen in allen verwendeten serumfreien Medien auswirkte (Abbildung 15). Bemerkenswert ist, dass auf mit Fibronektin beschichteten Platten auch bei Zusatz von rekombinantem WNT3a ein Anteil von 5 - 10% Reporter exprimierender Zellen gemessen werden konnte. Durch die Adhäsion auf fibronektinbeschichteten Kulturschalen wurden sowohl die Überlebensraten als auch die Ausbeute an *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen bei der Stimulation rekombinantem WNT3a deutlich erhöht. Das beschriebene Differenzierungsverfahren wurde für die folgenden Versuche beibehalten.



**Abbildung 16: Expression von Differenzierungsmarkern während der *in vitro* Differenzierung.** Die Bilder zeigen Antikörperfärbungen auf adhärenierten und durch BMP4-Zugabe differenzierten Stammzell-Kolonien zu den angegebenen Zeitpunkten. (A) zeigt die Expression von SOX2 (grün, obere Reihe) und POU5F1 (rot, mittlere Reihe). In der unteren Reihe sind beide Färbungen überlagert. Beide Stammzellmarker wurden ab 48 Stunden nach Differenzierungsbeginn deutlich schwächer detektiert. Nur vereinzelte Zellen halten die Expression aufrecht. (B) Zeigt die Expression des Epithelmarkers e-cadherin (CDH1, obere Reihe) im Vergleich mit dem Primitivstreifenmarker T (Brachyury) (mittlere Reihe) zu den angegebenen Zeitpunkten. Bis 72 Stunden nach Differenzierungsbeginn ist e-cadherin stark an der Plasmamembran der Zellen nachweisbar. Nach 72 Stunden steigt die Konzentration des T-Proteins stark an, gefolgt von einer Verringerung der Expression beider Proteine. Std= Stunden.

### **Expression von Differenzierungsmarkern im Verlauf der *in vitro* Differenzierung**

In den adhärennten Zellkolonien wurde die Expression weiterer Proteine im Verlauf der Differenzierung mit BMP4 immunocytochemisch untersucht. Die Expression der Stammzellmarker SOX2 und POU5F1 (OCT4) nahm nach 24 Stunden Differenzierung deutlich ab (Abbildung 16A). Nur vereinzelte Zellen hielten die Expression dieser Proteine über den gesamten Untersuchungszeitraum aufrecht. Die Expression von *Cdh1*, das für das Adhäsionsprotein e-cadherin kodiert, ist charakteristisch für epitheliale Zellen und wird beim Eintritt der Epiblastzellen in den Primitivstreifen inhibiert (Nieto et al. 1992, Carver et al. 2001, Zohn et al. 2006). Zu Beginn der *in vitro* Differenzierung war e-cadherin an der Plasmamembran der Zellen zu finden. Nach dem Einsetzen der *T*-Expression ging die e-cadherin-Konzentration jedoch deutlich zurück (Abbildung 16B).



**Abbildung 17: Expression von Tbx6 und Venus.** Gezeigt sind Antikörperfärbungen auf adhärennten Zellkolonien nach 96 Stunden Differenzierung. Serumfreies Medium mit BMP4 und LIF inhibierte die Differenzierung der Zellen (Ying et al. 2003b). Stimulation mit BMP4 oder mit WNT3a führte zur Expression des *Msgn1*-Reporters und von TBX6. In der oberen Reihe ist der Nachweis des Venus-Proteins abgebildet, in der Mitte TBX6. In der unteren Reihe sind beide Färbungen überlagert.

## **Untersuchung der co-Expression von TBX6 und dem Msgn1-Reporter**

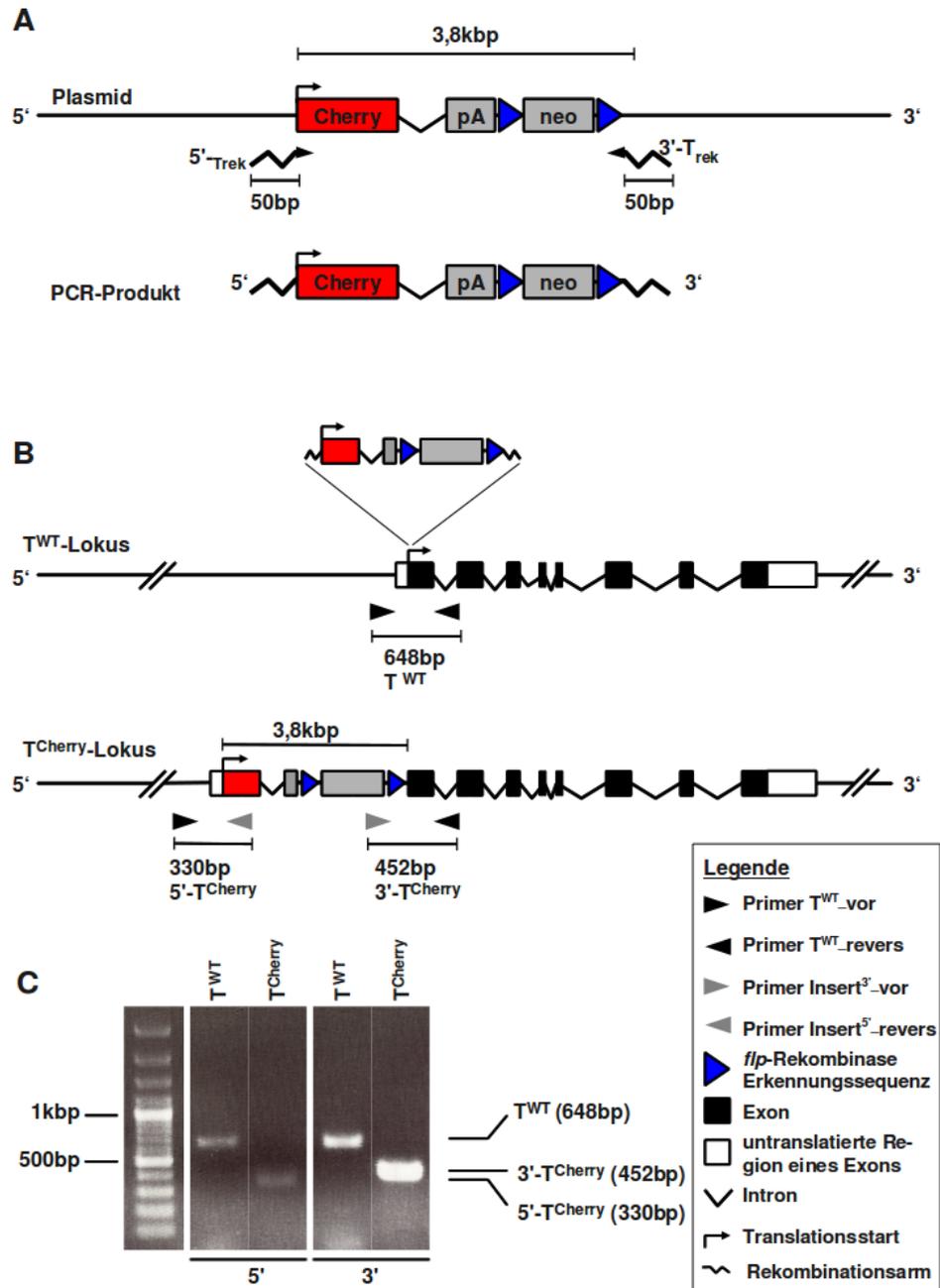
Neben der Expression des *Msgn1*-Reporters wurde untersucht, ob die mit WNT3a oder BMP4 differenzierten Zellen einen weiteren spezifischen Marker für präsomitisches Mesoderm exprimierten. Auf den adhärenen Zellkolonien wurde die Expression des Reporterproteins Venus und des Transkriptionsfaktors TBX6, einem zweiten Markerprotein für präsomitisches Mesoderm (Chapman et al. 1996), immunocytochemisch vergleichend untersucht (Abbildung 17). Durch die Antikörperfärbungen konnte gezeigt werden, dass der *Msgn1*-Reporter mit TBX6 in den gleichen Zellen co-exprimiert wird.

## **Herstellung einer Zelllinie mit zwei Reportergenen**

Durch die Modifikation des *Msgn1*-Lokus wurde in den Zellen ein Markergen für präsomitisches Mesoderm exprimiert. Um die Zellen zu identifizieren, die im *in vitro* Modell das Primitivstreifenstadium erreichen, wurde der *Msgn1*-Reporterzelllinie durch die Integration eines modifizierten BAC (engl.: *bacterial artificial chromosome*) zusätzlich ein fluoreszierender Reporter für *T* (*Brachyury*) eingeschleust (Abbildung 18). In diesem BAC wurde das offene Leseraster des roten Fluoreszenzfarbstoffes mCherry (Shaner et al. 2004) am Startkodon für *T* integriert. Auf dem integrierten DNS-Abschnitt folgte hinter der kodierenden Sequenz von mCherry ein Intron, ein Polyadenylierungssignal und eine von FRT-Sequenzen flankierte Neomycin-Selektionskassette zur Selektion.

Die Funktionalität der beiden Reporter wurde fluoreszenzmikroskopisch anhand ihrer Expression in tetraploid komplementierten Embryonen im Theiler-Stadium 12 (E8,5) unter-

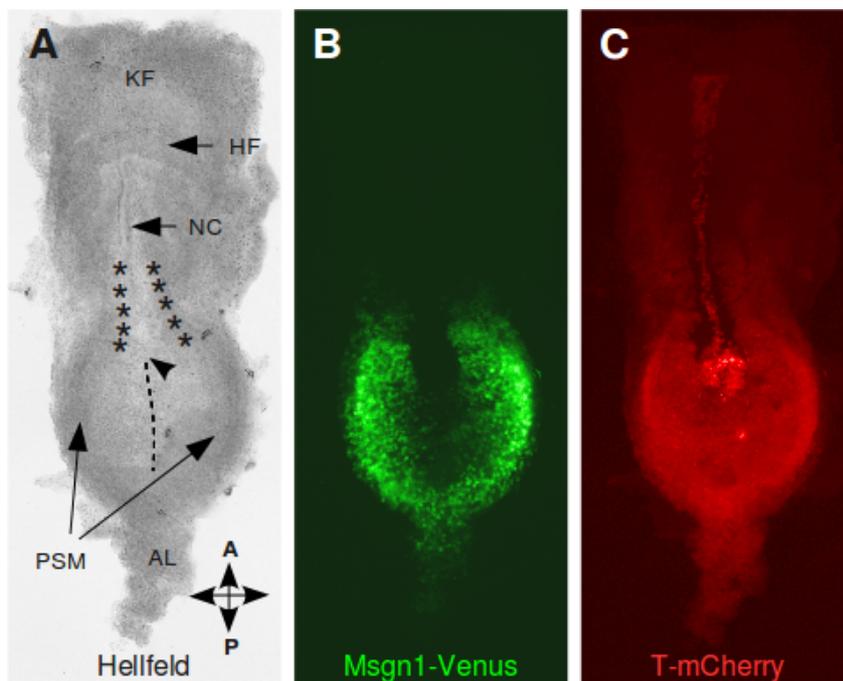
**Abbildung 18: Integration von mCherry in den T-Lokus.** (A) Die Integrationskassette (3,8kbp) enthält die codierende Sequenz von mCherry, gefolgt von einem Intron und einem Polyadenylierungssignal (pA) sowie einer Selektionskassette (neo). Diese setzt sich aus einem PGK-Promoter, einer EM7-Promotersequenz, der kodierenden Sequenz für Neomycin und einem Polyadenylierungssignal zusammen (nicht im Einzelnen dargestellt). Die Selektionskassette ist von Erkennungssequenzen für *flp*-Rekombinase flankiert. Die Integrationskassette wurde mit PCR amplifiziert. Neben der bindenden Sequenz (Pfeilspitzen) waren die 3'-Enden beider Primer ( $T_{rek}$ ) mit Rekombinationsarmen von 50bp Länge versehen. Diese Sequenzen waren homolog zu den jeweils 50 Basenpaaren vor und hinter dem Translationsstart von *T* im Wildtyp-Lokus. (B) Der Wildtyp-Lokus ( $T^{WT}$ ) wurde auf einem BAC durch das Einsetzen des PCR-Produkts mittels *Rekombineerung*-Technik modifiziert. Im modifizierten Lokus ( $T^{Cherry}$ ) folgt dem Methionin-Kodon von *T* das offene Leseraster von mCherry. Durch das Einsetzen der Selektionskassette wird das PCR-Produkt zwischen den Primern  $T^{WT}_{vor}$  und  $T^{WT}_{revers}$  von 648bp Länge um 3,8kbp verlängert. Statt dessen lassen sich nun mit den  $T^{WT}$ -Primern und den Primern  $Insert^3_{vor}$  und  $Insert^5_{revers}$  zwei PCR-Produkte mit einer Länge von 330bp (5'-Ende) und 452bp (3'-Ende) generieren. (C) Nachweis der korrekten Positionierung der Integrationskassette. In der Wildtyp-Kontrolle ( $T^{WT}$ ) entsteht das vorhergesagte PCR-Fragment von 648bp Länge. Im modifizierten Lokus entstehen die PCR-Produkte mit einer Länge von 330bp (5'- $T^{Cherry}$ ) und 452bp (3'- $T^{Cherry}$ ).



sucht (Abbildung 19). Die Fluoreszenz des *Msn1*-Reporters war ausschließlich im caudalen Bereich des Embryos bis zum Bereich des Primitivknotens erkennbar. Das Signal war wie erwartet zu beiden Seiten des Primitivstreifens im entstehenden Mesoderm ausgeprägt zu sehen, aber nicht im Primitivstreifen selbst und nicht im Primitivknoten. Zellen an der Basis der Allantois zeigten ebenfalls Fluoreszenzaktivität. In den posterioren Somiten war die Fluoreszenz schwach erkennbar und nahm nach anterior ab.

Das Fluoreszenzsignal des *T*-Reporters war im Bereich des Primitivstreifens sowie im

Primitivknoten und im axialen Mesoderm, im nascenten Mesoderms und in der Allantois zu sehen. Das Signal nahm im Mesoderm, mit Ausnahme des axialen Mesoderms, rostral des Primitivknotens ab. Im Primitivknoten war besonders intensive rote Fluoreszenz zu erkennen. Im Neuralrohr war keine Fluoreszenz erkennbar. Das Expressionsmuster beider Reporterproteine im untersuchten Embryonalstadium entsprach früheren Beschreibungen der Expressionsmuster von *T* und *Msgn1* (Wilkinson et al. 1990, Wasiak et al. 1999, Yoon et al. 2000a).



**Abbildung 19: Expression der Reporterproteine.** Die Bilder zeigen einen aus der dualen Reporterzelle generierten Embryo im Theiler-Stadium 12 (E8,5). (A) Hellfeldaufnahme mit Bezeichnung der anatomischen Strukturen: Die Pfeilspitze zeigt die Position des Primitivknotens, die gestrichelte Linie den Verlauf des Primitivstreifens, die Sterne zeigen die Position der Somiten an. KF=Kopffalte; HF=Herzfalte; NC=Notochord; PSM=präsomitisches Mesoderm; AL=Allantois-Anlage; A=anterior; P=posterior (B) Das Fluoreszenzsignal des *Msgn1*-Reporters (*Msgn1*-Venus) setzt am Primitivstreifen ein und wird in laterale Richtung stärker. Das Venus-Protein ist entlang des gesamten Primitivstreifens im Mesoderm erkennbar. Im Primitivknoten ist kein Signal zu erkennen. Ein schwaches Signal ist im jüngsten Somiten erkennbar. (C) Die rote Fluoreszenz des *T*-Reporters (*T*-mCherry) ist im Primitivstreifen und im Mesoderm zu erkennen. Anterior des Primitivknotens schwächt sich das Signal ab und bleibt nur im axialen Mesoderm erhalten. In der Allantois wird das Signal schwächer. Ein Teil der Zellen im Primitivknoten zeigt ein besonders intensives Signal.

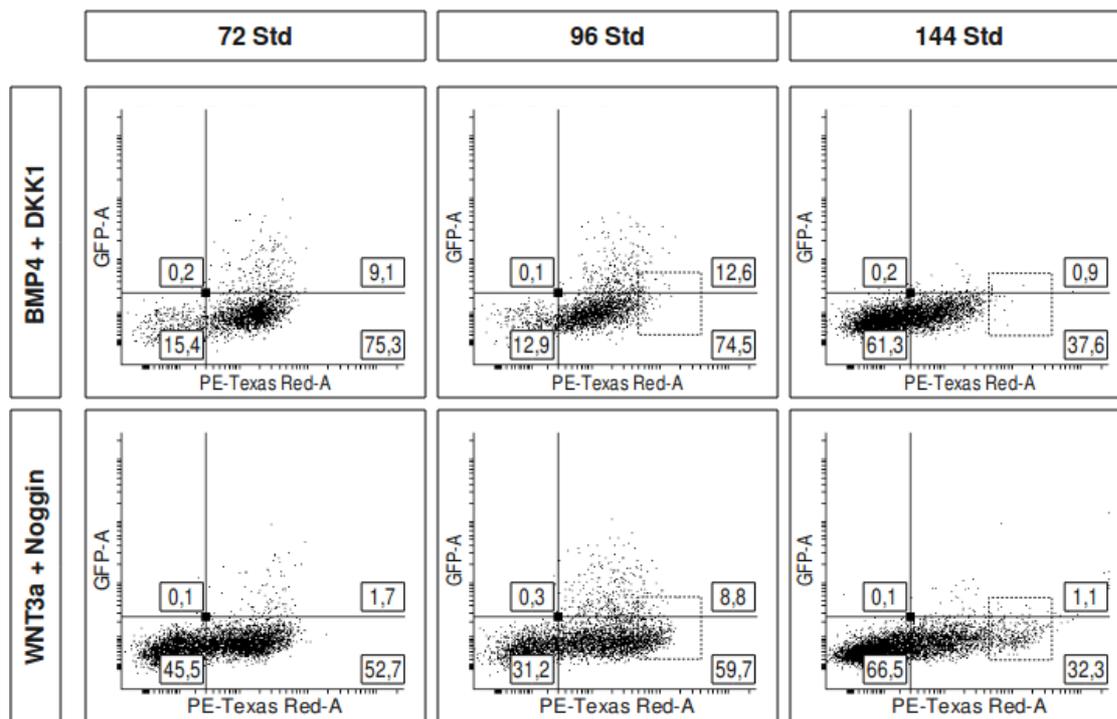
## **Analyse der Differenzierung *in vitro***

In den vorangegangenen Experimenten wurde ein Verfahren zur Differenzierung embryonaler Stammzellen *in vitro* etabliert. Die generierte Reporterzelllinie zeigte die erwartete Expression des *T*-Reporters und des *Msgn1*-Reporters im Embryo. Zur näheren Untersuchung der Entstehung paraxialen Mesoderms im *in vitro* Modell wurden die embryonalen Stammzellen dieser dualen Reporterzelllinie mit dem zuvor beschriebenen Verfahren unter der Verwendung rekombinanter Signalproteine in serumfreiem Medium differenziert. Durch die Expression des *T*-Reporters wurde der Übergang aus dem epiblastähnlichen Stadium zum Primitivstreifen im *in vitro* Modell erkennbar gemacht. Der *Msgn1*-Reporter wurde verwendet, um den Übergang aus dem Primitivstreifenstadium zu präsomitischem paraxialen Mesoderm anzuzeigen.

Die Zellen wurden nach dem zuvor beschriebenen Verfahren in adhärenenten Kolonien durch Stimulation mit rekombinantem BMP4 oder WNT3a differenziert. Um den Einfluss des jeweilig anderen Signalweges zu minimieren, wurde dem Medium mit BMP4 zusätzlich der Wnt-Inhibitor DKK1 (Fedi et al. 1999, Mao et al. 2001) zugegeben. Dem Differenzierungsansatz mit WNT3a wurde der Bmp-Inhibitor Noggin (Zimmerman et al. 1996) zugesetzt.

### ***Reporterexpression im Verlauf der Differenzierung in vitro***

Die Expression der fluoreszierenden Reporterproteine im Verlauf der *in vitro* Differenzierung wurde mit dem Durchflusszytometer untersucht (Abbildung 20). Beide fluoreszierenden Reporter konnten in Zellen beider Ansätze detektiert werden. Die Expression der Reporter zeigte in beiden Differenzierungsansätzen die erwartete Abfolge und rekapitulierte den Ablauf *in vivo*. Die Zellen im *in vitro* Modell zeigten zunächst den Eintritt in das Primitivstreifenstadium durch die rote Fluoreszenz des *T*-Reporters an. Ein Teil dieser Zellen aktivierte daraufhin den *Msgn1*-Reporter. Auffällig war, dass im Verlauf der Differenzierung im Ansatz mit WNT3a und Noggin eine Zellpopulation entstand, die eine deutlich intensivere Expression des Brachyury-Reporters zeigte. Diese stark fluoreszierende Zellpopulation war bei der Differenzierung mit BMP4 und DKK1 nicht zu erkennen. Interessanterweise ließ sich *in vivo* ebenfalls eine auffallend intensive *T*-Reporterexpression im Primitivknoten von Embryonen im Theiler Stadium 12 feststellen (Abbildung 19).



**Abbildung 20: Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalyse der dualen Reporterlinie während der Differenzierung.** In den Streudiagrammen sind die Zellen anhand der Intensität ihrer grünen und roten Fluoreszenz zu drei verschiedenen Messzeitpunkten aufgetragen. Die obere Reihe zeigt die Differenzierung mit BMP4 und DKK1, die untere Reihe die Differenzierung mit WNT3a und Noggin zu den angegebenen Zeitpunkten. In den Quadranten ist der prozentuale Anteil der Zellen angegeben. In beiden Ansätzen ist der größte Anteil grün fluoreszierender Zellen nach 96 Stunden zu sehen. Nach 96 Stunden und besonders nach 144 Stunden fällt im Ansatz mit WNT3a und Noggin eine Zellpopulation mit besonders hoher mCherry-Aktivität auf (Kasten bei 144 Std), die im anderen Ansatz nicht zu sehen ist.

### **Analyse der differenziellen Genexpression im *in vitro* Modell**

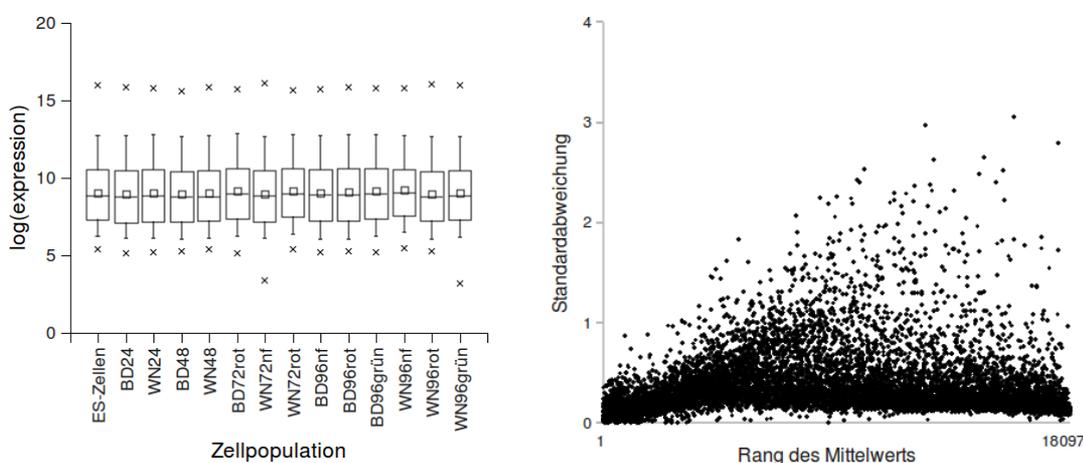
Zur Validierung der *in vitro* Differenzierung und zur Identifikation von Genen, die eine bislang unbekannte Rolle in der Entstehung paraxialen Mesoderms spielen, wurden die transkriptionellen Änderungen in den differenzierenden Zellen untersucht. Von den undifferenzierten Zellen wurden unmittelbar vor dem Aggregationsschritt RNS-Proben genommen. Nach 24 und 48 Stunden wurde die RNS aller Zellen eines Ansatzes für die Expressionsanalyse isoliert. Nach 72 und 96 Stunden wurden die Zellen vor der RNS-Präparation mit Hilfe des Durchflusszytometers sortiert. Die Zellen ohne Reporteraktivität, die Zellen mit aktivem *T*-Reporter und die Zellen mit aktivem *Msgn1*-Reporter wurden von einander isoliert. Die Genexpression der isolierten Zellpopulationen wurde mit einem RNS-Chip (MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip, Illumina) analysiert. Aus beiden Ansätzen konnte erst nach 96 Stunden Differenzierung eine für die Chip-Analyse ausreichende Menge von *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen isoliert werden. Nach 72 Stunden konnten im

Ansatz mit BMP4 und DKK1 nicht genügend Zellen ohne Reporteraktivität für eine Transkriptionsanalyse isoliert werden.

### **Bioinformatische Verifizierung der Messergebnisse**

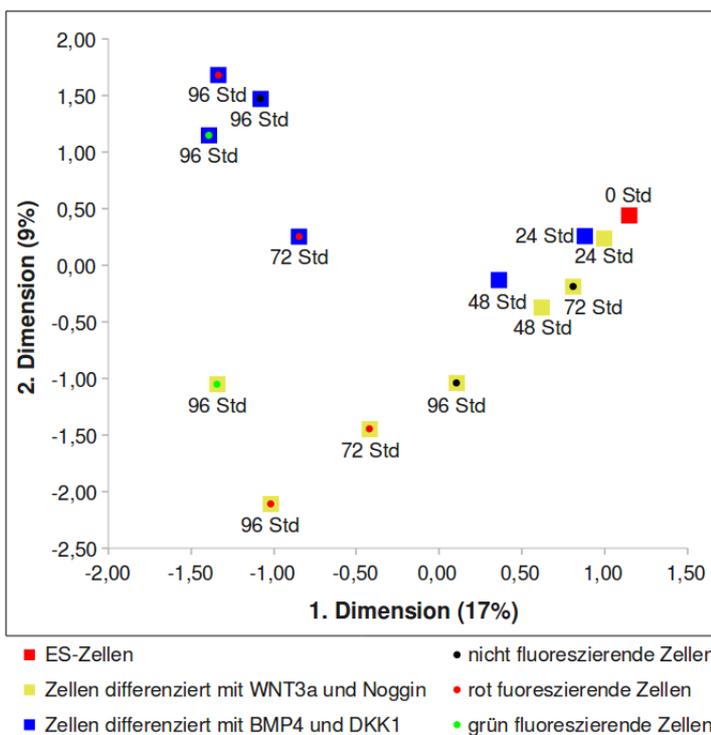
Die ausgelesenen Expressionswerte wurden normalisiert (varianzstabilisierende Normalisierung [Huber et al. 2003]), und die Konsistenz der Messwerte wurde analysiert (Abbildung 21). Die normalisierten Messwerte aus den einzelnen RNS-Proben wurden in einem *box-plot* aufgetragen und folgten einer ähnlichen Verteilung. Wurden die Mittelwerte aller Messungen für jedes Gen nach Größe sortiert und die zugehörigen Standardabweichungen dagegen aufgetragen, konnte die Unabhängigkeit der Standardabweichungen von der Größe der Mittelwerte gezeigt werden. Beide Analysen sprechen für eine gute Konsistenz der Messwerte und deuten nicht auf systematische Fehler hin.

Die Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen RNS-Proben wurden mittels einer Korrespondenzanalyse visualisiert (Abbildung 22). Hierbei werden die hochdimensionalen Messwerte einer Probe auf zwei orthogonale Dimensionen projiziert, die jeweils eine Linearkombination der hochdimensionalen Messwerte sind und die größtmögliche Varianz



**Abbildung 21: Bioinformatische Verifizierung der Messresultate.** links: Die normalisierten Messwerte aus jeder RNS-Probe sind gruppiert in einem *box-plot* aufgetragen und zeigen eine ähnliche Verteilung in allen Proben. Auf der X-Achse sind die Zellpopulationen aufgetragen. Die Großbuchstaben geben den Differenzierungsansatz an (BD=BMP4 und DKK1; WN=WNT3a und Noggin), die Zahl den Zeitpunkt der Probenahme in Stunden und die Kleinbuchstaben die Farbe des fluoreszenten Reporters (nf: nicht fluoreszent). In der rechten Abbildung ist die Standardabweichung aller Messwerte jedes Gens gegen den Mittelwert aufgetragen. Die Mittelwerte sind nach Größenrang auf der X-Achse sortiert. Die Standardabweichungen zeigen keine Abhängigkeit von der Größe der Mittelwerte. Beide Verteilungen weisen auf eine gute Konsistenz der Messwerte und keine systematischen Fehler hin.

erklären (Fellenberg et al. 2001). Der Abstand zweier Punkte in dem Koordinatensystem reflektiert die Ähnlichkeit der repräsentierten Messpunkte. In der Korrespondenzanalyse war erkennbar, dass die Expressionswerte in beiden Ansätzen mit zunehmender Differenzierungsdauer immer weniger Ähnlichkeit mit den Expressionswerten embryonaler Stammzellen aufwiesen. Außerdem unterschieden sich die Transkriptome der Zellen in beiden Differenzierungsansätzen zunehmend von einander. In der Korrespondenzanalyse ist demnach eine mit der Zeit zunehmende Differenzierung der Zellen beider Ansätze erkennbar. Die transkriptionellen Veränderungen wiesen abhängig von den zugegebenen Signalproteinen Unterschiede auf, auch wenn die Zellen den gleichen Reporter exprimieren.



**Abbildung 22: Vergleich der Expressionswerte in einer Korrespondenzanalyse.** Jeder Punkt repräsentiert die Gesamtheit aller gemessenen Expressionswerte einer Probe. Der Abstand der Messpunkte reflektiert die Ähnlichkeit der Proben. Es ist erkennbar, dass sich die Expressionswerte in den Proben mit zunehmender Dauer des Experiments immer mehr von den Werten embryonaler Stammzellen unterscheiden. Außerdem ist zu sehen, dass sich die Differenzierungsansätze im Lauf der Differenzierung zunehmend von einander unterscheiden. Die Zahl gibt den Zeitpunkt der Probenahme an (Std: Stunden).

### **Expressionsverlauf verschiedener Markergene während der Differenzierung**

Zur Verifizierung des *in vitro* Differenzierungsprozesses wurde die Expression bekannter Markergene für bestimmte embryonale Zelltypen bei der Stimulation mit WNT3a und Noggin oder BMP4 und DKK1 im Zeitverlauf betrachtet (Abbildung 23). Die Expression der stammzellspezifischen Markergene *Nanog*, *Sox2*, *Pou5f1* (*Oct4*), *Zfp42*, *Gdf3* und *Dppa4* wurde im Laufe der Differenzierung in beiden Ansätzen reduziert (Hosler et al. 1989, Rogers et al. 1991, Nichols et al. 1998, Avilion et al. 2003, Bortvin et al. 2003, Chambers et al. 2003, Mitsui et al. 2003, Chen et al. 2006). Der Epiblastmarker *Fgf5* (Goldfarb et al. 1991, Hebert

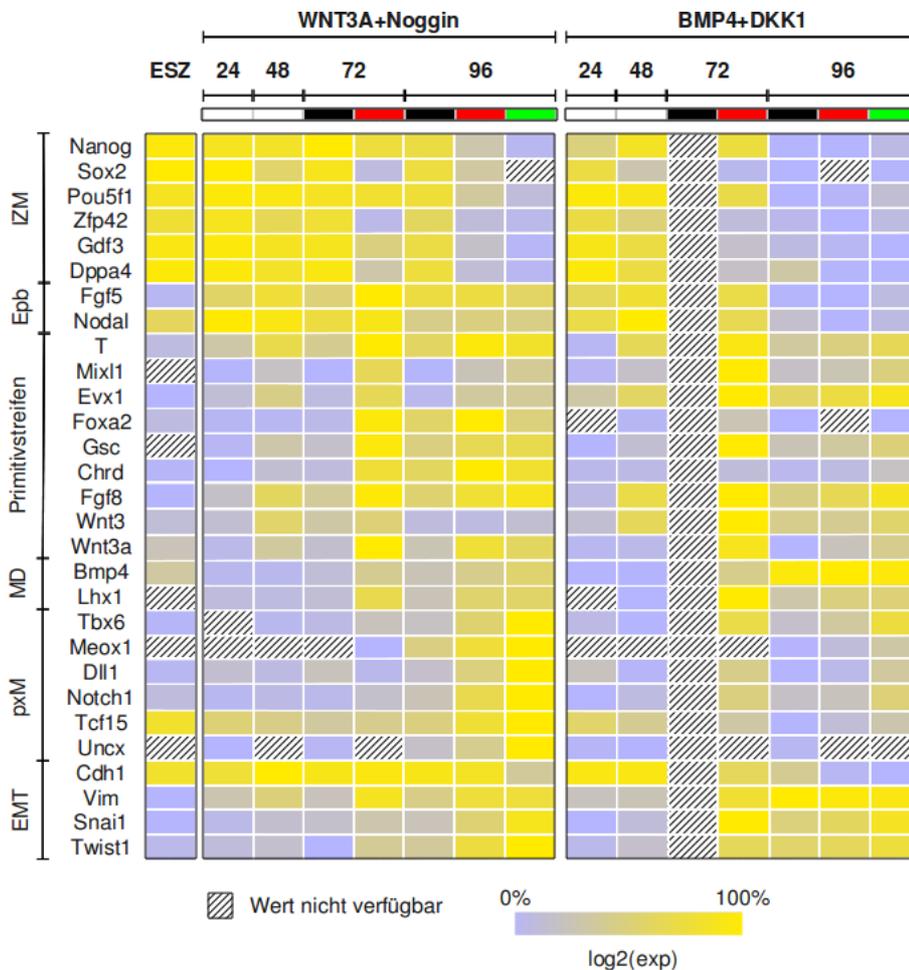
et al. 1991) wurde während der ersten 24 Stunden der Differenzierung in beiden Ansätzen aktiviert, während *Nodal* (Conlon et al. 1994, Collignon et al. 1996) bereits in embryonalen Stammzellen aktiv war. Bei der Verwendung von BMP4 und DKK1 ließ die Expression beider Gene zwischen 72 und 96 Stunden Differenzierungsdauer stark nach, blieb jedoch im Ansatz mit WNT3A und Noggin in allen Zellpopulationen deutlich detektierbar.

Bei der Bildung von Mesoderm und Endoderm im Eizylinder durchwandern die Zellen den Primitivstreifen und exprimieren dabei charakteristische Gene. Die neun untersuchten Primitivstreifenmarker (Abbildung 23) waren alle in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen aktiviert. *Chrd* und *Foxa2*, die insbesondere im anterioren Bereich des ausgestreckten Primitivstreifens exprimiert sind (Ang et al. 1993, Shawlot et al. 1998), erschienen im Ansatz mit BMP4 und DKK1 nur schwach exprimiert, während das *in vivo* ähnlich exprimierte *Gsc* (Blum et al. 1992) nach 72 Stunden kurzzeitig in diesem Ansatz aktiviert war. In beiden Ansätzen wurden demnach Gene exprimiert, die in den Zellen beim Durchwandern des Primitivstreifens *in vivo* aktiviert werden. Dennoch können Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Gene, abhängig von den verwendeten Signalproteinen erkannt werden.

In beiden Differenzierungsansätzen wurden die betrachteten Markergene für nascentes Mesoderm (*Lhx1*, *Bmp4* [Jones et al. 1991, Barnes et al. 1994, Shawlot et al. 1995, Winnier et al. 1995, Carver et al. 2001]) exprimiert. Die Markergene für paraxiales Mesoderm (*Tbx6*, *Meox1*, *Tcf15*, *Dll1*, *Notch1* und *Uncx* [Amo et al. 1992, Candia et al. 1992, Bettenhausen et al. 1995, Burgess et al. 1995, Chapman et al. 1996, Neidhardt et al. 1997]) waren im Differenzierungsansatz mit WNT3a und Noggin in den *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen stark exprimiert und bei der Stimulation mit BMP4 und DKK1 weniger aktiv. Im letzteren Ansatz war dagegen *Bmp4*, das im Embryo verstärkt in posteriorem Mesoderm zu finden ist (Winnier et al. 1995), nach 96 Stunden wesentlich stärker exprimiert.

Die Deaktivierung des Epithelmarkers *Cdh1* und die Aktivierung von *Snai1*, *Twist1* und *Vim* charakterisieren eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von Zellen (Shook et al. 2003, Thiery et al. 2009). Während die Aktivierung von *Vim* in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen beider Ansätze zeitgleich erfolgt, wurden *Snai1*, das im Primitivstreifen sowie im nascenten Mesoderm exprimiert ist (Nieto et al. 1992), sowie der

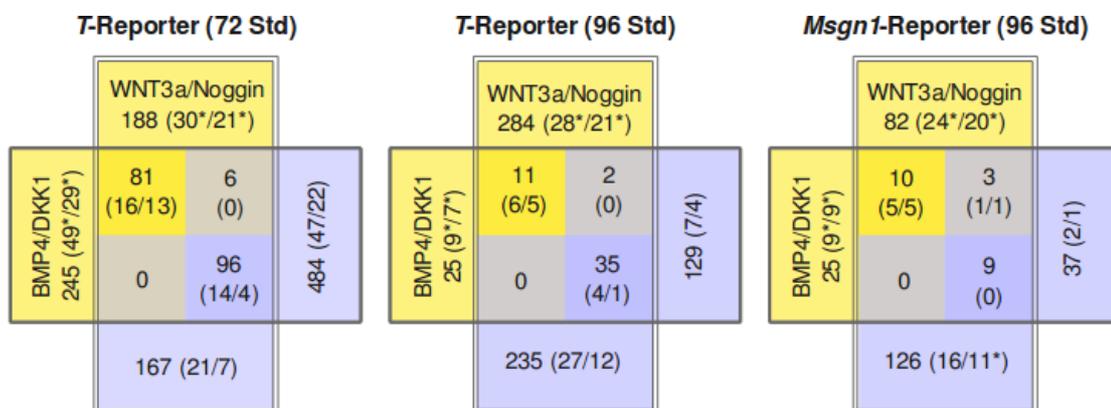
Mesodermmarker *Twist1* (Conlon et al. 1994) im Ansatz mit WNT3a und Noggin erst in den *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen verstärkt exprimiert. In Übereinstimmung damit wurde die Deaktivierung von *Cdh1* im Ansatz mit WNT3a und Noggin erst in den *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen deutlich.



**Abbildung 23: Expression von Markergenen.** Die Expression der Gene ist zu den angegebenen Zeitpunkten farblich kodiert dargestellt. Die Werte entsprechen dem Logarithmus der Expressionsstärke. Der höchste Messwert jedes Transkripts aus allen Messungen wurde auf 100% gesetzt. Eine starke Expression ist gelb dargestellt, eine schwache Expression in blau. Oben sind die Zeitpunkte der Probenahme in Stunden angegeben. Zu den Messzeitpunkten nach 24 und 48 Stunden sind die Zellen nicht mit dem Zytometer sortiert (weiße Markierung). Nach 72 Stunden wurden rot fluoreszierende Zellen (*T*-Reporter, rote Markierung) und nicht fluoreszierende Zellen (schwarze Markierung) getrennt analysiert. Nach 96 Stunden wurden zusätzlich grün fluoreszierende Zellen isoliert (*Msgn1*-Reporter, grüne Markierung). Im Ansatz mit BMP4 und DKK1 konnten die Expressionswerte der nicht fluoreszierenden Zellen nach 72 Stunden nicht ermittelt werden. Die Gene sind gruppiert. Die erste Gruppe enthält Markergene für die innere Zellmasse (IZM), die zweite Gruppe Epiblastmarker (Epb). Gene der dritten Gruppe sind im Primitivstreifen exprimiert. Die vierte Gruppe enthält Gene aus dem frühen Mesoderm (MD). Die Markergene des paraxialen Mesoderms (pxM) sind in einer eigenen Gruppe dargestellt. Die letzte Gruppe zeigt Gene der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). *Cdh1* wird während der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) herunterreguliert und die *Vim*-Expression wird verstärkt. Dieser Vorgang wird von *Snai1* und *Twist1* reguliert. weitere Abkürzungen: ESZ=embryonale Stammzellen; log(exp)=Logarithmus der Expressionsstärke

## Betrachtung der differentiellen Genexpression in beiden Differenzierungsansätzen

Auf Grundlage der Genexpressionsdaten wurden Gene gesucht, die in den Reporter exprimierenden Zellpopulationen differentiell exprimiert waren und damit eine mögliche Rolle in der Mesodermdifferenzierung spielen. Von 18097 Genen, die auf dem Chip repräsentiert waren, wurden in allen Ansätzen insgesamt 1256 verschiedene Gene als differentiell exprimiert gewertet. Die unterschiedlich exprimierten Gene beider Ansätze wurden miteinander verglichen. Eine signifikante Anzahl von Genen ist in den korrespondierenden Zellpopulationen beider Ansätze gleichermaßen hoch- oder herunterreguliert ( $p < 0,01$ ), während nur sehr wenige Gene in einem Ansatz hoch- und im anderen Ansatz herunterreguliert sind (Abbildung 24). Die transkriptionellen Veränderungen in den Zellen beider Differenzierungsansätze weisen demnach große Ähnlichkeiten auf. Unter den differentiell exprimierten Genen wurde der Anteil transkriptionsregulierender Gene ermittelt. Neben den bekannten Transkriptionsfaktoren wurden Gene dazu gezählt, die im Nukleus an Transkriptionsfaktoren oder das Chromatin binden und damit einen direkten Einfluss auf die Transkription haben können. Es konnte festgestellt werden, dass unter den hochregulierten Genen aller Ansätze sowohl die Transkriptionsfaktoren als auch die potenziell transkriptions-



**Abbildung 24: Differenziell exprimierte Gene in reporterexprimierenden Zellen.** In den Quadranten ist die Anzahl differenziell exprimierter Gene der fluoreszierenden Zellpopulationen beider Differenzierungsansätze angegeben. Die Differenzierungsansätze mit WNT3a und Noggin sind senkrecht dargestellt, die Differenzierungsansätze mit BMP4 und DKK1 waagrecht. Blau unterlegte Bereiche zeigen herunterregulierte Gene des Ansatzes an, gelb unterlegte Bereiche hochregulierte Gene. Die Überschneidungen zeigen, wie viele der Gene aus den Bereichen in beiden Ansätzen gemeinsam vorkommen. Die erste Zahl in Klammern zeigt alle potenziell transkriptionsregulierenden Gene aus der Gesamtmenge an, die zweite Zahl nur die Transkriptionsfaktoren. Die potenziell transkriptionsregulierenden Gene und die Transkriptionsfaktoren sind in allen Gruppen hochregulierter Gene signifikant angereichert (Sternmarkierung). Die Transkriptionsfaktoren sind außerdem in den herunterregulierten Genen der *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen im Ansatz mit Wnt3a und Noggin angereichert (alle  $p$ -Werte  $< 0,01$ ).

regulierenden Faktoren signifikant angereichert sind ( $p < 0,01$ ). Unter den herunterregulierten Genen war keine signifikante Anreicherung dieser Faktoren erkennbar ( $p\text{-Wert} > 0,05$ ). 96 Stunden nach Beginn Stimulation mit WNT3a und Noggin waren in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen nur die Transkriptionsfaktoren im engeren Sinne signifikant angereichert ( $p < 0,05$ ).

### ***Analyse der differenziell exprimierten Gene***

Unter den als hochreguliert eingestuften Genen sollten Faktoren identifiziert werden, die eine bislang unbekannte Rolle in der Bildung paraxialen Mesoderms spielen. Zur Validierung der Parameter, die zur Bestimmung hochregulierter Gene angewandt wurden, wurden die als hochreguliert eingestuften Gene nach bekannten Markergenen durchsucht (Tabelle 1). Unter den in *T*-Reporter exprimierenden Zellen hochregulierten Genen waren in beiden Ansätzen die Primitivstreifenmarker *T* (Wilkinson et al. 1990, Rivera-Perez et al. 2005, Inman et al. 2006), *Gsc* (Blum et al. 1992, Conlon et al. 1994), *Fgf8* (Crossley et al. 1995, Lorenzi et al. 1995), *Mixl1* (Pearce et al. 1999, Robb et al. 2000) und *Evx1* (Dush et al. 1992) zu finden (Tabelle 1). Außerdem wurden die hochregulierten Gene nach Markergenen für paraxiales Mesoderm durchsucht (Tabelle 1). Alle neun untersuchten Markergene für paraxiales Mesoderm waren in den *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen hochreguliert, wenn die Zellen mit WNT3a und Noggin stimuliert wurden. Die Gene *Tbx6* (Chapman et al. 1996), *Uncx* (Neidhardt et al. 1997), *Dll1* (Bettenhausen et al. 1995), *Pdgfra* (Takakura et al. 1997), *Foxc2* (Winnier et al. 1997) und *Tcf15* (Burgess et al. 1995) waren im Differenzierungsansatz mit BMP4 und DKK1 nicht unter den hochregulierten Genen. Die Gene *Meox1* (Candia et al. 1992), *Foxc1* (Sasaki et al. 1993) und *Notch1* (Amo et al. 1992) waren dagegen in beiden Differenzierungsansätzen verstärkt aktiv.

Im Embryo entstehen entlang der antero-posterioren Ausstreckung des Primitivstreifens unterschiedliche Gewebe. Im Experiment wurden bei der Differenzierung mit WNT3a die Bmp-Signale inhibiert während bei der Stimulation mit BMP4 die Wnt-Signale blockiert wurden. Daher wurde untersucht, ob die hochregulierten Gene beider Ansätze auf die Entstehung von Zellen des anterioren Primitivstreifens oder seiner Derivate hindeuten. Von 19 Genen, die im anterioren Primitivstreifen und im Primitivknoten exprimiert sind (Tamplin et

		72 Std		96 Std			
		T-Reporter		T-Reporter		Msn1-Reporter	
		WNT3a Noggin	BMP4 DKK1	WNT3a Noggin	BMP4 DKK1	WNT3a Noggin	BMP4 DKK1
Primitivstreifen	<i>Evx1</i>	+	+	+			
	<i>Fgf8</i>	+	+	+	+		
	<i>Gsc</i>	+	+	+			
	<i>Mixl1</i>	+	+				
	<i>T</i>	+	+	+	+		
anteriöer Primitivstreifen und Primitivknoten	<i>1700009P17Rik</i>	+		+			
	<i>1700027A23Rik</i>			+		-	
	<i>Chrd</i>	+		+			
	<i>Cyb561</i>		-			-	
	<i>Foxa1</i>			+			
	<i>Foxd4</i>			+			
	<i>Gal</i>			+			
	<i>Gstm5</i>	+		+			
	<i>Mlf1</i>			+			
	<i>Prnp</i>			+			
	<i>Shh</i>			+			
	<i>Smoc1</i>		-	+			+
	<i>Tmprss2</i>	+			-		
paraxiales Mesoderm	<i>Dll1</i>			+		+	
	<i>Foxc1</i>		+	+	+	+	+
	<i>Foxc2</i>					+	
	<i>Meox1</i>			+		+	+
	<i>Notch1</i>		+	+		+	
	<i>Pdgfra</i>			+		+	
	<i>Tbx6</i>					+	
	<i>Tcf15</i>			+		+	
	<i>Uncx</i>					+	
definitives Endoderm	<i>Cer1</i>			+			
	<i>Cldn4</i>		-	-	-	-	-
	<i>Foxa1</i>			+			
	<i>Gprc5c</i>			+			
	<i>Itga3</i>		-		-	-	-
	<i>Shh</i>			+			
	<i>Sox17</i>	+					
	<i>Tmprss2</i>	+			-		
	<i>Trh</i>		-		+		

**Tabelle 1: Gewebespezifische Markergene unter den differenziell exprimierten Genen.** Die Listen der als differenziell exprimiert eingestuft Gene wurden nach Markergenen für Primitivstreifen und paraxiales Mesoderm untersucht. In den Zeilen sind die untersuchten Markergene gruppiert, die Spalten zeigen die untersuchte Zellpopulation zu den angegebenen Messzeitpunkten an. „+“ gibt an, dass das untersuchte Gen als verstärkt exprimiert eingestuft wurde, „-“ zeigt eine Reduktion der Transkriptmenge an. *T* war erwartungsgemäß in allen Zellpopulationen hochreguliert, die eine *T*-Reporteraktivität zeigten. Von 20 Genen, deren Expression im Primitivknoten beschrieben ist, wurden 12 in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen bei der Stimulation mit WNT3a und Noggin verstärkt exprimiert, 11 davon nach 96 Stunden, vier bereits nach 72 Stunden. Alle 9 untersuchten Markergene für paraxiales Mesoderm waren in den *Msn1*-Reporter exprimierenden Zellen aktiviert, wenn sie mit WNT3a und Noggin stimuliert wurden. Sechs Markergene für definitives Endoderm treten in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen nach der Stimulation mit WNT3a und Noggin verstärkt auf, keins in den *Msn1*-Reporter exprimierenden Zellen.

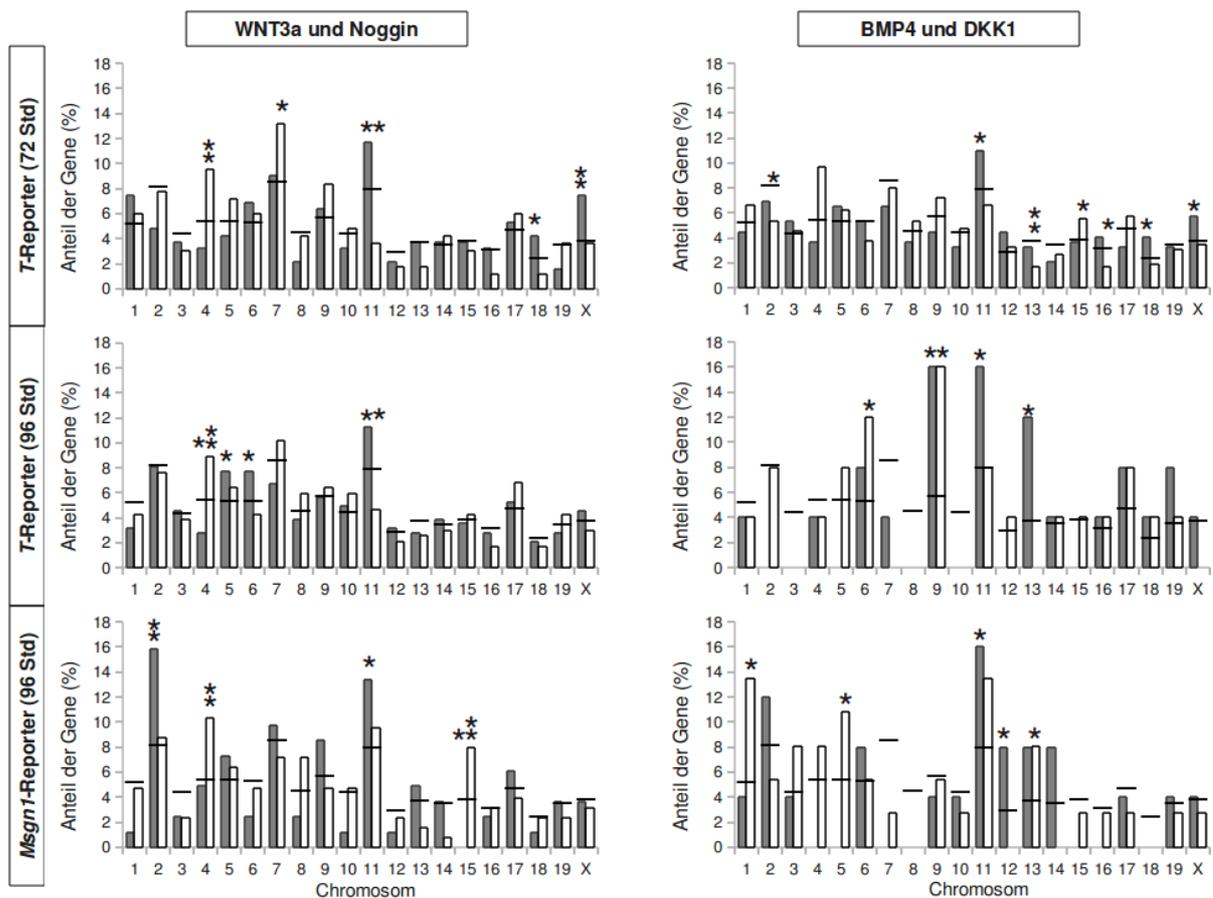
al. 2008), waren 12 in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen des Differenzierungsansatzes mit WNT3a und Noggin hochreguliert (Tabelle 1). Bei der Differenzierung mit BMP4 und DKK1 war keines dieser Gene hochreguliert. Das charakteristische Markergen für den Primitivstreifen *Foxa2* (Ang et al. 1993) war mit den verwendeten stringenten Parametern nicht unter den differenziell exprimierten Genen zu finden. Wurde die Stringenz für den Illumina Detektionswert von 0,99 auf 0,5 verringert, ist auch für *Foxa2* eine rund 26fach verstärkte Expression in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen nach 72 Stunden Differenzierungsdauer zu erkennen, jedoch nur bei der Differenzierung mit WNT3a und Noggin.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob bei der Differenzierung mit WNT3a und Noggin auch vermehrt Derivate des Primitivknotens und des anterioren Primitivstreifens entstehen. Von 15 Genen, die im definitiven Endoderm des Embryos exprimiert sind (Tamplin et al. 2008), wurden neun Gene als differenziell exprimiert eingestuft (Tabelle 1). Sechs dieser Gene (*Cer1*, *Foxa1*, *Gprc5c*, *Shh*, *Sox17*, *Tmprss2*) waren nur im Differenzierungsansatz mit WNT3a und Noggin hochreguliert. Allein *Trh* wurde bei der Differenzierung mit BMP4 und DKK1 verstärkt exprimiert. Zusammengefasst ließ sich bei der Analyse der differenziell exprimierten Gene feststellen, dass die bei der Differenzierung von paraxialem Mesoderm und weiterer Derivate des anterioren Primitivstreifens erwarteten Markergene im *in vitro* Modell hochreguliert waren. Es war deutlich, dass diese Markergene nur bei der Differenzierung mit WNT3a und Noggin, jedoch nicht mit BMP4 und DKK1 hochreguliert wurden, obwohl der *Msgn1*-Reporter in beiden Ansätzen aktiviert werden konnte.

### ***Verteilung differenziell exprimierter Gene auf den Chromosomen***

Es wurde untersucht, ob die differenziell exprimierten Gene gehäuft auf bestimmten Chromosomen liegen (Abbildung 25). Vor dem Hintergrund der 18097 auf dem Chip repräsentierten Gene, konnte festgestellt werden, dass deregulierte Gene in signifikanter Häufung auf bestimmte Chromosomen verteilt waren. Beide Differenzierungsansätze zeigten abgesehen von einer Häufung aktivierter Gene auf Chromosom 11 wenig Ähnlichkeit. Bei der Differenzierung mit WNT3a und Noggin lagen herunterregulierte Gene aller fluoreszierenden Zellpopulationen signifikant häufig auf dem Chromosom 4 ( $p < 0,01$ ). Mit der Aktivierung des

*Msgn1*-Reporters änderte sich die Verteilung der differenziell exprimierten Gene in diesem Ansatz deutlich. Die aktivierten Gene lagen gehäuft auf Chromosom 2, während deaktivierte Gene insbesondere auf Chromosom 15 zu finden waren (beide  $p < 0,01$ ), wobei kein aktiviertes Gen auf dem Chromosom 15 lag ( $p < 0,05$ ). Bei der Differenzierung mit BMP4 und DKK1 lagen besonders viele deregulierte Gene auf Chromosom 9 ( $p < 0,05$ ). Die in den *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen deaktivierten Gene waren in diesem Ansatz insbesondere auf den Chromosomen 1 und 13 zu finden, während die hochregulierten Gene

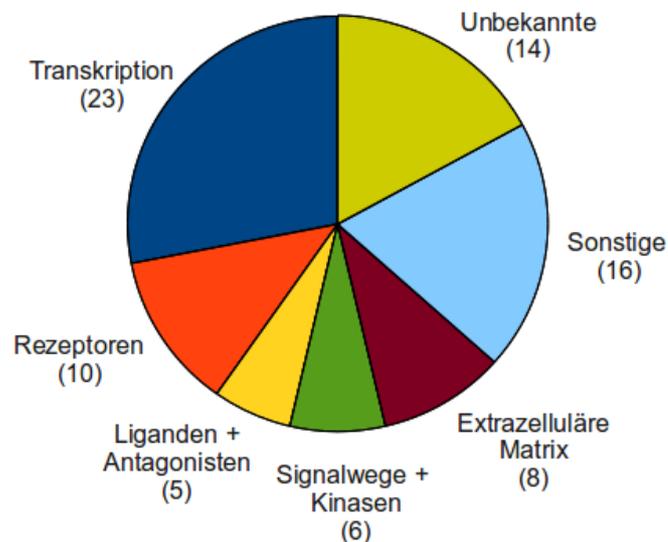


**Abbildung 25: Lokalisierung der differenziell exprimierten Gene auf den Chromosomen.** Von den differenziell exprimierten Genen der *T*-Reporter und *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellpopulationen wurden die Genorte den Chromosomen zugeordnet und mit dem Anteil aller auf dem Chip repräsentierten Gene auf dem Chromosom verglichen (schwarze Striche). Die grauen Balken zeigen den Anteil der hochregulierten Gene an, die auf dem Chromosom liegen, die weißen Balken den Anteil der herunterregulierten Gene. Stark signifikante Abweichungen vom Referenzwert ( $p$ -Wert  $< 0,01$ ) sind durch zwei Sterne markiert. Weniger signifikante Abweichungen ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) durch einen Stern. Ein signifikant erhöhter Anteil aktivierter Gene liegt in allen Populationen beider Ansätzen auf Chromosom 11 ( $p < 0,05$ ). Im Ansatz mit WNT3a und Noggin sind auf dem Chromosom 4 in allen Populationen herunterregulierte Gene mit stark signifikanter Häufung vertreten ( $p < 0,01$ ). In den *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen dieses Ansatzes liegen hochregulierte Gene gehäuft auf Chromosom 2 ( $p < 0,01$ ). Auf Chromosom 15 wurde in dieser Zellpopulation dagegen kein verstärkt exprimiertes Gen gefunden, jedoch ein stark signifikant erhöhter Anteil reduziert exprimierter Gene. Die deregulierten Gene häufen sich bei der Differenzierung mit BMP4 und DKK1 auf andere Chromosomen als im Ansatz mit WNT3a und Noggin. (Std=Stunden)

auf Chromosom 12 lagen (alle  $p < 0,05$ ). In den beiden Differenzierungsansätzen traten damit deutliche Unterschiede in der Verteilung deregulierter Gene auf den Chromosomen auf.

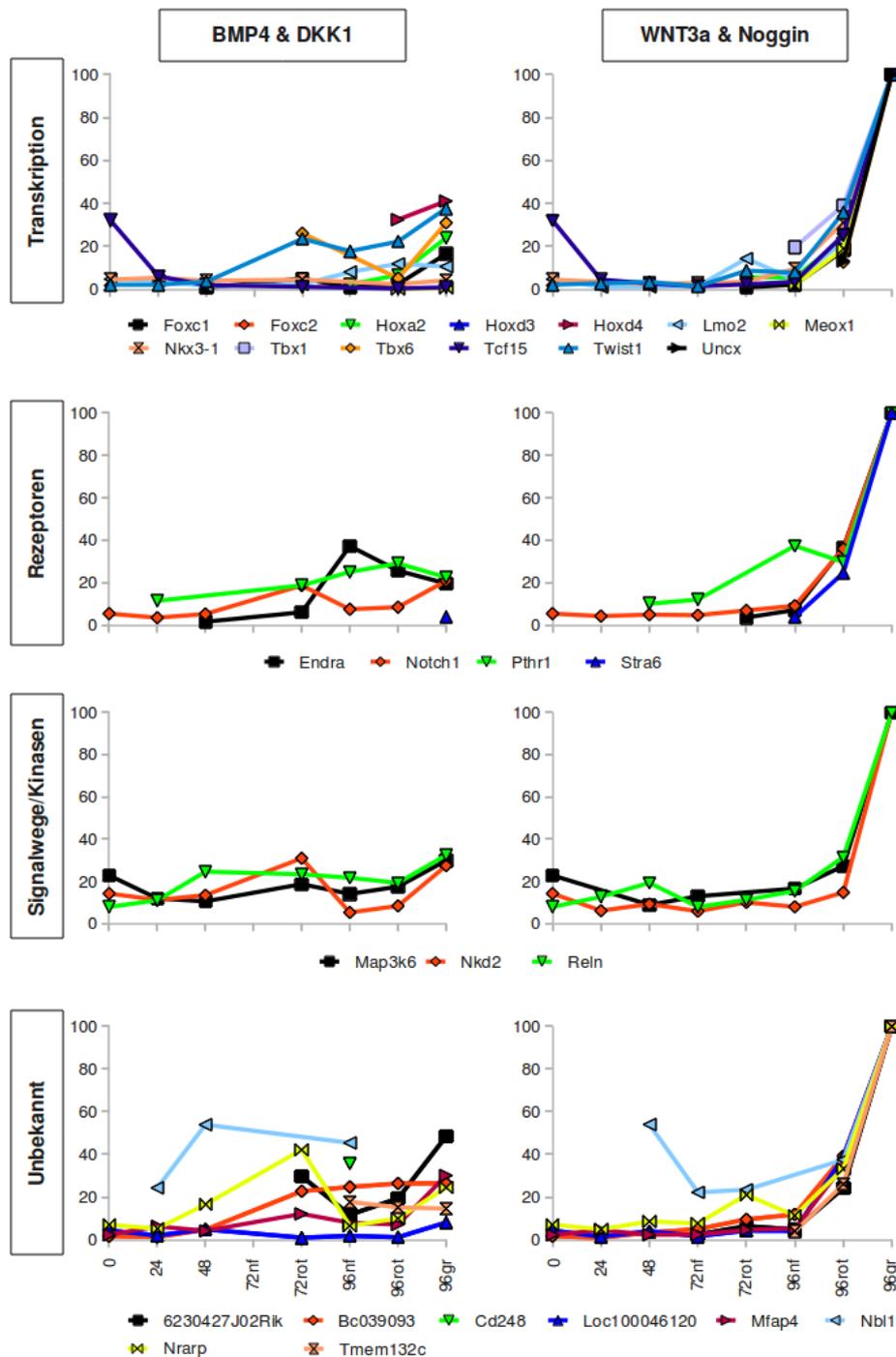
### **Gene mit möglicher Funktion in der Entstehung paraxialen Mesoderms**

Nach Stimulation mit WNT3a und Noggin wurden in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen Gene aktiviert, die im anterioren Bereich des Primitivstreifens und seiner Derivate exprimiert sind. In der aus diesen Zellen entstehenden Subpopulation mit aktiviertem *Msn1*-Reporter konnten zahlreiche hochregulierte Gene gefunden werden, die charakteristisch für paraxiales Mesoderm sind. Unter den hochregulierten Genen dieser Zellpopulation können daher weitere Faktoren vermutet werden, die eine bislang unbekannte Rolle in der Bildung paraxialen Mesoderms spielen.



**Abbildung 26: Klassifizierung hochregulierter Gene in paraxialem Mesoderm nach Funktion.** Das Diagramm zeigt die Klassifizierung von Genen, die in den *Msn1*-Reporter exprimierenden Zellen nach Stimulation mit WNT3a und Noggin hochreguliert waren. In der Gruppe „Transkription“ sind Transkriptionsfaktoren und Gene zusammengefasst, die nicht an DNS binden, jedoch im Nukleus mit den Transkriptionsfaktoren interagieren. Liganden und Antagonisten schließen Rezeptor-Liganden und Antagonisten aus dem extrazellulären Raum ein, die wie beispielsweise *Sfrp* die Ligandenbindung an die Rezeptoren modulieren können. Alle Proteine mit Kinase-Aktivität sowie Faktoren, die an der Perzeption und Weiterleitung von Signalen im Zytoplasma beteiligt sind, sind der Gruppe „Signalwege und Kinasen“ zugeordnet.

Die hochregulierten Gene wurden zunächst manuell nach ihrer Funktion in sieben Gruppen klassifiziert (Abbildung 26). Vier dieser Gruppen wurden nach Kandidatengenen mit direktem und zellautonomen Einfluss auf die Genexpression durchsucht. Zu den transkriptionsregulierenden Genen wurden die bekannten Transkriptionsfaktoren sowie weitere Gene



**Abbildung 27: Expressionsverlauf der Kandidatengene.** Die Expressionswerte der hochregulierten Gene in der *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellpopulation nach Stimulation mit WNT3a und Noggin wurden mit den Expressionswerten nach Stimulation mit BMP4 und DKK1 im Zeitverlauf verglichen. Gene die nur nach Stimulation mit WNT3a und Noggin hochreguliert waren, wurden als Kandidatengene angesehen. Die Abbildung zeigt diese Gene, eingeteilt in funktionale Gruppen. Für jedes Gen wurde der höchste aller gemessenen Expressionswerte auf 100 (y-Achse) gesetzt und die anderen Werte im Verhältnis dazu angegeben. Werte die nicht genau bestimmt werden konnten (Detection < 0,99) wurden nicht berücksichtigt. Man erkennt, dass die ausgewählten Gene nur in der *Msgn1*-Reporter exprimierenden Population des Ansatzes mit WNT3a und Noggin verstärkt exprimiert sind.

gruppiert, die im Nukleus an die DNS oder die Transkriptionsfaktoren binden. Weitere Kandidatengene wurden unter den Rezeptoren sowie unter den Kinasen und zytoplasmatischen Signalproteinen gesucht. Außerdem wurden Gene mit bislang unbekannter Funktion nach möglichen Faktoren untersucht, die eine zellautonome Rolle in der Bildung paraxialen Mesoderms haben. Gene, die den anderen Gruppen zugeordnet wurden, haben vermutlich keinen bedeutenden Einfluss auf die Zelldifferenzierung, oder sie wirken nicht zellautonom und wurden daher nicht näher betrachtet. Die Expression der Gene im Verlauf der Differenzierung in beiden Ansätzen wurde mit einander verglichen. Gene, die im Ansatz mit WNT3a und Noggin, jedoch nicht bei der Verwendung von BMP4 und DKK1, besonders in der *Msgn1*-Reporter exprimierenden Population hochreguliert waren, wurden als Kandidatengene ausgewählt (Abbildung 27).

Unter den transkriptionsregulierenden Genen und wurden 13 Gene mit dem gesuchten Expressionsprofil gefunden (*Foxc1*, *Foxc2*, *Hoxa2*, *Hoxd3*, *Hoxd4*, *Lmo2*, *Meox1*, *Nkx3-1*, *Tbx1*, *Tbx6*, *Tcf15*, *Twist1*, *Uncx*), von den Rezeptoren wurden 4 Gene ausgewählt (*Ednra*, *Notch1*, *Pthr1*, *Stra6*). Unter den Kinasen und anderen Proteinen, die bei der Weiterleitung der Signale im Zytoplasma beteiligt sind, konnten 3 Kandidaten gefunden werden (*Map3k6*, *Reln*, *Nkd2*) und unter den Genen mit unbekannter Funktion waren 8 Kandidatengene (*6230427J02Rik*, *Bc039093*, *Cd248*, *Loc100046120*, *Mfap4*, *Nbl1*, *Nrarp*, *Tmem132c*). Insgesamt konnten mit der beschriebenen Differenzierungsmethode und den verwendeten Auswahlparametern 28 Kandidatengene gefunden werden, die eine mögliche Rolle in der Bildung paraxialen Mesoderms spielen.

## Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, um embryonale Stammzellen der Maus unter weitgehend kontrollierten Bedingungen mit hoher Ausbeute zu paraxialem Mesoderm zu differenzieren. Die Zellen wurden in Kolonien mit definierter Größe adhären auf fibronektinbeschichteten Zellkulturschalen differenziert. Zur Steuerung der Differenzierung wurde das serumfreie Kulturmedium mit den rekombinanten Proteinen WNT3a und Noggin oder BMP4 und DKK1 versetzt. Zur Analyse der *in vitro* Differenzierung wurde eine embryonale Stammzelllinie generiert, die beim Eintritt in das Primitivstreifenstadium einen *T*-Reporter und bei der Entstehung paraxialen Mesoderms einen *Msgn1*-Reporter aktivierte. Mit Hilfe der unterschiedlich fluoreszierenden Reportergene konnte der Ablauf der Differenzierung *in vitro* verfolgt, die Ausbeute an differenzierten Zellen quantifiziert und die Zellen beider distinkter Stadien für nähere Untersuchungen isoliert werden. Die Analyse der transkriptionellen Besonderheiten der Reporter exprimierenden Zellpopulationen zeigte bedeutende Unterschiede in der *in vitro* Differenzierung in Abhängigkeit von den zugegebenen Signalproteinen. Obwohl in beiden Differenzierungsansätzen sowohl ein Primitivstreifenstadium durchlaufen wurde und *Msgn1*-Reporter exprimierende Zellen entstanden, bildeten sich nur unter Einfluss der Signalproteine WNT3a und Noggin Zellen mit den transkriptionellen Eigenschaften des paraxialen Mesoderms, jedoch nicht bei der Verwendung von BMP4 und DKK1. Unter dem Einfluss von WNT3a und Noggin wurden darüber hinaus weitere charakteristische Gene für den anterioren Primitivstreifen und seiner Derivate aktiviert. Das hier beschriebene *in vitro* Modell zur Mesodermdifferenzierung konnte für eingehende transkriptionelle Untersuchungen genutzt und neue Gene mit möglicher Funktion in der Entwicklung paraxialen Mesoderms konnten identifiziert werden.

Die Abfolge der Expression untersuchter Markergene bei der *in vitro* Differenzierung zeigte, dass die Zellen in beiden Differenzierungsansätzen ihren Stammzellcharakter verloren und ein Epiblastenstadium sowie ein Primitivstreifenstadium durchliefen um schließlich Mesoderm oder Endoderm zu generieren. Die Aktivierung und Deaktivierung der Markergene konnte zu scharf abgegrenzten Zeitpunkten beobachtet werden. Die Abfolge und die zeitliche Präzision der Markergenaktivierung wiesen darauf hin, dass bei der

Differenzierung *in vitro* in den Zellen ähnliche Prozesse in der gleichen Abfolge ablaufen wie im Embryo. Der Übergang zu bestimmten embryonalen Gewebetypen erschien entsprechend auch *in vitro* nur möglich, wenn zuvor bestimmte Differenzierungsstadien durchlaufen worden sind. In den fluoreszierenden Zellpopulationen beider Ansätze wurde ein signifikant erhöhter Anteil von Transkriptionsfaktoren und potenziell transkriptionsregulierenden Faktoren unter den aktivierten Genen ermittelt. Dies zeigte, dass in den untersuchten Zellpopulationen starke transkriptionelle Veränderungen statt fanden und noch keine terminale Differenzierung erfolgt war. Im Vergleich der differenziell exprimierten Gene konnten große Überschneidungen in beiden Ansätzen gefunden werden. Dennoch zeigten insbesondere die Unterschiede in der Expression spezifischer Markergene, dass in beiden Ansätzen unterschiedliche Entwicklungsrichtungen eingeschlagen wurden.

## **Analyse der Mesodermbildung im *in vitro* Modell**

### ***Induktion des Primitivstreifenstadiums in vitro***

Die Expression des Primitivstreifenmarkers *T* (*Brachyury*) konnte in dieser Arbeit sowohl durch die Stimulation mit Serum als auch durch kombinierte Zugabe von BMP4 und DKK1 oder WNT3a und Noggin ausgelöst werden. Experimente an Mäusen, Knochenfischen (*Danio rerio*), Amphibien (*Xenopus laevis*) und embryonalen Stammzellen der Maus zeigten, dass sowohl Signale des kanonischen Wnt-Signalweges als auch Nodal-Signale für die Bildung des Primitivstreifens im Wirbeltierembryo essentiell sind (Conlon et al. 1994, Jones et al. 1995, Feldman et al. 1998, Liu et al. 1999, Vonica et al. 2002, Gadue et al. 2006, Nostro et al. 2008). Übereinstimmend damit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass für die Induktion des Primitivstreifens *in vitro* die Zugabe von rekombinantem WNT3a bei gleichzeitiger Hemmung des BMP-Signalweges ausreicht, um sowohl eine endogene Expression von *Nodal* zu erhalten, als auch das für die Induktion der *T*-Expression ebenfalls erforderliche Wnt-Signal bereit zu stellen.

Bei Zugabe von BMP4 und DKK1 in das Kulturmedium wurde wie im Ansatz mit WNT3a und Noggin endogenes *Wnt3* aktiviert und die Expression von endogenem *Nodal* wurde zunächst aufrecht erhalten. Bmp-Signale sind im Eizylinder zwar für das Auslösen der Gastrulation unbedingt notwendig (Mishina et al. 1995), der Primitivstreifen entwickelt sich jedoch auch,

wenn die Epiblastzellen nach gewebespezifischer Ablation des Bmp-Rezeptors *Bmpr1a* kein Bmp-Signal empfangen können (Miura et al. 2006), Bmp-Signale also nicht direkt auf die gastrulierenden Zellen einwirken. Experimente an embryonalen Stammzellen und Embryonen der Maus zeigten, dass Bmp-Signale die Expression von *Wnt3* im visceralen Endoderm und im Epiblasten induzieren (Ben-Haim et al. 2006, Nostro et al. 2008) und ohne kanonisches *Wnt*-Signal kein *Nodal* aktivieren können (Liu et al. 1999). Die Induktion der Gastrulation durch Bmp-Signale während der *in vitro* Differenzierung geschieht demnach wahrscheinlich über die Aktivierung von endogenem *Wnt3* in den differenzierenden Stammzellen. Im Gegensatz zu früheren Berichten (Gadue et al. 2006, Nostro et al. 2008), gelang die Aktivierung des *T*-Reporters in dieser Studie trotz der Zugabe des Wnt-Inhibitors DKK1. Dies könnte damit erklärt werden, dass BMP4 als Morphogen konzentrationsabhängig wirkt und die hier verwendete hohe BMP4-Konzentration von 10ng/ml eine besonders starke Induktion von Wnt-Genen zur Folge hatte. Das resultierende autokrine Wnt-Signal konnte daher wesentlich stärker sein, als bei Nostro et al. (2008) und eventuell nicht mehr vollständig durch das DKK1 im Medium inhibiert werden. Darüber hinaus wurden die Zellen adhärent auf Fibronectin kultiviert, was die Expression des *T*-Reporters unterstützen kann (Evans et al. 2007). Die Aktivierung der *T*-Expression durch Serum ist dagegen vermutlich dem Anteil an Signalstoffen im Serum zuzuschreiben. Insbesondere konnte in Kälberserum zuvor eine BMP-Signalaktivität nachgewiesen werden (Kodaira et al. 2006).

### ***Paraxiales Mesoderm entsteht in vitro bei der Stimulation mit WNT3a und Noggin***

Neben dem Auslösen der Gastrulation wirken die Signale von Bmp, Wnt und Nodal auf die Entwicklung des Primitivstreifens und seiner Derivate. Im Eizylinder unterliegen die verschiedenen Abschnitte entlang der antero-posterioren Achse des Primitivstreifens dem Einfluss unterschiedlicher Signale. Während am posterioren Primitivstreifen sowie im extraembryonalen Ektoderm *Bmp2* und *Bmp4* exprimiert werden, sind am anterioren Primitivstreifen vor allem *Nodal* und Bmp-Antagonisten aktiviert (Conlon et al. 1994, Winnier et al. 1995, Collignon et al. 1996, Acampora et al. 1998, Biben et al. 1998, Rhinn et al. 1998, Shawlot et al. 1998, Beddington et al. 1999, Coucouvanis et al. 1999, Acampora et al. 2001,

Brennan et al. 2001, Yamamoto et al. 2004). *Wnt3a* und *Wnt3* werden dagegen im gesamten Primitivstreifen transkribiert (Takada et al. 1994, Liu et al. 1999). Die unterschiedlichen Signaleinflüsse und die resultierende Expression unterschiedlicher Gene (Pfister et al. 2007) spiegelt sich darin wieder, dass entlang des Primitivstreifens unterschiedliche Gewebe entstehen (Lawson et al. 1991, Kinder et al. 2001a).

In dieser Arbeit wurden der Wnt-Signalweg und der Bmp-Signalweg durch die Zugabe rekombinanter Proteine aktiviert. Bei der Verwendung von WNT3a wurde der Bmp-Signalweg durch die Zugabe von Noggin inhibiert, während der Verwendung von BMP4 der Wnt-Inhibitor DKK1 zugegeben wurde. Die fehlende Aktivierung der Markergene für den anterioren Primitivstreifen einschließlich des Primitivknotens bei der Stimulation mit BMP4 und DKK1 zeigte, dass die entstehenden Zellpopulationen des Primitivstreifenstadiums auf transkriptioneller Ebene wenig Ähnlichkeit mit den Zellen des anterioren Primitivstreifens hatten. Dagegen deutete die Expression einer Vielzahl der Markergenen darauf hin, dass bei der *in vitro* Differenzierung mit WNT3a und Noggin Zellen mit transkriptioneller Ähnlichkeit zum anterioren Primitivstreifen und Primitivknoten entstanden. In embryonalen Stammzellen aktiviert eine hohe Konzentration von Activin A, das auf die Zellen ähnlich wie Nodal wirkt, in serumfreiem Medium die Marker für anterioren Primitivstreifen einschließlich des Primitivknotens und Endoderm, eines Derivats dieser Struktur (Kubo et al. 2004, Tada et al. 2005, Yasunaga et al. 2005, Gadue et al. 2006), während geringere Konzentrationen Zellen mit Charakteristika weiter posteriorer Abschnitte des Primitivstreifens entstehen lassen (Gadue et al. 2006). In dieser Studie war *Nodal* in den embryonalen Stammzellen und während der ersten Differenzierungstage in beiden Ansätzen aktiviert. Nach dem Einsetzen der *T*-Expression wurde es nur bei der Differenzierung mit WNT3a und Noggin mit abgeschwächter Intensität weiter exprimiert. Es ist daher möglich, dass in erster Linie das Nodal-Signal für die Expression der Markergene des anterioren Primitivstreifens verantwortlich ist. Bei seruminduzierter Differenzierung von *embryoid bodies* verstärkt eine partielle Inhibierung des kanonischen Wnt-Signals durch chemische Wirkstoffe die Aktivität eines Reporters für *Foxa2*, einem Markergen des anterioren Primitivstreifens (Gadue et al. 2006). Das legt nahe, dass Wnt-Signale zwar die Expression von *Nodal* unterstützen, der Spezifizierung des anterioren Primitivstreifens durch Nodal-Signale aber entgegen wirken.

Bezüglich der Expression von Markergenen für den Primitivknoten ist es eine interessante Beobachtung in dieser Arbeit, dass bei der *in vitro* Differenzierung mit WNT3a und Noggin eine Zellpopulation mit besonders intensiver *T*-Reporterexpression entstand. Die Tatsache, dass der Reporter im Primitivknoten der untersuchten Embryonen ebenfalls besonders intensiv aktiviert war, lässt vermuten dass bei der *in vitro* Differenzierung unter Wnt-Einfluss Zellen mit Eigenschaften des Primitivknotens generiert wurden. Die erhöhte Intensität der Expression des fluoreszenten Reporters könnte damit zusammen hängen, dass Zellen des Primitivknotens über einen verlängerten Zeitraum in dieser Struktur verbleiben und so das fluoreszierende Protein akkumulieren. Dagegen durchwandern die Zellen des Mesoderms und des Endoderms den Primitivstreifen vergleichsweise zügig und exprimieren den Reporter nur transient. Es ist daher vorstellbar, dass es sich bei den *in vitro* entstehenden stark fluoreszierenden Zellen tatsächlich um Zellen mit Organistoreigenschaften handelte, die ähnlich wie die Zellen des Primitivknotens *in vivo* besonders lange *T* exprimierten. Durch Isolation und nähere Untersuchung dieser Zellen könnte geklärt werden, ob diese Zellen für die Expression der Markergene des Primitivknotens in der *T*-Reporter exprimierenden Population verantwortlich sind. Es könnte weiter untersucht werden, ob es sich eventuell tatsächlich um Zellen mit Organistoreigenschaften handelt oder ob sie einer Subpopulation des Primitivknotens ähneln.

Neben der Ausbildung verschiedener Abschnitte des Primitivstreifens zeigten die Expressionsdaten auch, dass die Derivate des anterioren Primitivstreifens einschließlich des Primitivknotens nur bei der Differenzierung mit WNT3a und Noggin entstanden. Nur bei der *in vitro* Differenzierung mit WNT3a und Noggin entstanden Zellen, die Markergene des paraxialen Mesoderms und des Endoderms exprimierten, jedoch nicht bei der Stimulation mit BMP4 und DKK1. Manipulationen in den Signalwegen für Bmp, Wnt und Nodal geben Aufschluss über die Rolle dieser Signale bei der Musterbildung im Primitivstreifen und im nascenten Mesoderm sowie im Endoderm. Ein starkes Nodal-Signal scheint die Entstehung des anterioren Primitivstreifens und seiner Derivate zu fördern. So zeigen Maus-Embryonen mit einer hypomorphen *Nodal*-Mutation Defekte in der Ausbildung des Primitivknotens und der aus ihm entstehenden Gewebe, wie der Prächordalplatte, des Notochords und des definitiven Endoderms (Lowe et al. 2001). Ein starkes Wnt-Signal wirkt auf die Zellen des

anterioren Primitivstreifens dagegen antagonistisch zu *Nodal* und induziert die Eigenschaften der posterior anschließenden Abschnitte. Denn werden im Maus-Embryo die co-Rezeptoren für den kanonischen Wnt-Signalweg, *Lrp5* und *Lrp6* derart mutiert, dass nur wenig Wnt-Signal von den Zellen perzipiert werden kann, zeigen die Embryonen eine Expansion des anterioren Primitivstreifens und seiner Derivate nach caudal, jedoch keine *Tbx6*-Expression und bilden kein paraxiales Mesoderm (Kelly et al. 2004). Die Zugabe von rekombinantem WNT3a in die Differenzierungskultur könnte demnach zumindest teilweise über die Aktivierung von *Nodal* zur Expression von Markergenen für den anterioren Primitivstreifen einschließlich des Primitivknotens geführt haben. Gleichzeitig wirkten das zugegebene WNT3a sowie die aktivierten endogenen Wnt-Signale antagonistisch zu *Nodal* und begünstigten die Entwicklung paraxialen Mesoderms. Eine erhöhte Konzentration von WNT3a im Differenzierungsmedium könnte demnach der Expression von Markergenen für den Primitivknoten verstärkt entgegen wirken und zur verbesserten Induktion paraxialen Mesoderms führen.

Bei der Differenzierung mit BMP4 und DKK1 wurden kaum Anzeichen für die Entstehung anterioren Primitivstreifens, Endoderms oder paraxialen Mesoderms gefunden. Zum Einen kann dies der Wirkung von DKK1 als Wnt-Inhibitor zugeschrieben werden. Darüber hinaus zeigen Bmp-Signale *in vitro* eine posteriorisierende Wirkung, wobei die Zugabe von BMP4 oder Serum zur Expression von *Kdr* führt, einem Marker für posterior entstehendes Mesoderm das kein definitives Endoderm mehr bilden kann (Kubo et al. 2004, Park et al. 2004, Ema et al. 2006, Gadue et al. 2006, Kodaira et al. 2006, Nostro et al. 2008). Darüber hinaus kann die Expression von Markergenen für den anterioren Primitivstreifen in mit WNT3a und Activin A stimulierten Differenzierungskulturen durch Bmp-Signalinhibition verstärkt werden (Nostro et al. 2008). Demnach scheint auch BMP4 eine antagonistische Wirkung auf die Entstehung anterioren Primitivstreifens und seiner Derivate zu haben. Die Wirkung von Bmp-Signalen auf das sich entwickelnde Mesoderm zeigen Embryonen mit gewebespezifischer *Bmpr1a*-Ablation im Epiblasten. Sie bilden ektopische Somitenreihen auf Kosten des Seitenplattenmesoderms aus, zeigen keine Herzanlagen, wenig Dottersackmesoderm und eine verkümmerte Allantois (Miura et al. 2006). Bmp-Signale scheinen demnach notwendig, um das aus dem posterioren Primitivstreifen auswandernde Mesoderm

zu Geweben zu spezifizieren, die caudal des paraxialen Mesoderms entstehen. Die Spezifizierung paraxialen Mesoderms kann demnach durch ein dominantes Bmp-Signal inhibiert werden und die Differenzierung weiter posterior entstehenden Mesoderms begünstigen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung des Primitivstreifens und die Spezifizierung unterschiedlicher Derivate durch die Zugabe unterschiedlicher Signale *in vitro* modelliert werden kann. Im hier vorgestellten Differenzierungsverfahren wirkt das zugegebene Wnt-Signal positiv auf die Generierung von paraxialem Mesoderm und seine unmittelbaren Vorläuferzellen. Dabei wirkt es vermutlich der durch *Nodal* induzierten Bildung des anterioren Primitivstreifens und seiner Derivate entgegen. Eine hohe Konzentration von WNT3a im Differenzierungsmedium könnte folglich die Bildung von paraxialem Mesoderm weiter unterstützen. Am *in vitro* Modell könnte ebenfalls untersucht werden, bis zu welchem Grad Nodal-Signale zu inhibieren sind, um die Entstehung paraxialen Mesoderms zu fördern. Die Inhibierung von Bmp-Signalen durch die Zugabe von Noggin in das Differenzierungsmedium mit WNT3a verhinderte vermutlich die Spezifizierung mesodermaler Gewebe, die im Embryo caudal des paraxialen Mesoderms entstehen. Zusammenfassend unterstreichen die Untersuchungsergebnisse die Rolle der Wnt-Signale in der Spezifizierung paraxialen Mesoderms. Es zeigt auch, dass die *in vitro* Kultur in serumfreiem Medium in Verbindung mit rekombinanten Signalproteinen aufgrund ihrer Flexibilität eine leistungsfähige Methode für die Modellierung embryonaler Vorgänge darstellt.

### ***Msgn1-Reporter exprimierende Zellen bilden nicht nur paraxiales Mesoderm in vitro***

Obwohl die Differenzierung mit BMP4 und DKK1 einen großen Anteil *Msgn1*-Reporter exprimierender Zellen hervor brachte, konnte keine Aktivierung weiterer Markergene für paraxiales Mesoderm festgestellt werden. Die Aktivität des *Msgn1*-Reporters in Embryonen konnte darüber hinaus entlang des gesamten Primitivstreifens beobachtet werden. Bereits in vorhergehenden Studien wurde die *Msgn1*-Transkription entlang des gesamten Primitivstreifens beschrieben (Yoon et al. 2000b). Zusätzlich zeigt  $\beta$ -Galaktosidase, die unter der Kontrolle eines *Msgn1*-Promoterfragments exprimiert wird, bei 9,5 Tage alten Embryonen neben dem paraxialen Mesoderm auch im lateralen Mesoderm sowie in einer

Region ventral des *tail bud* Aktivität (Wittler et al. 2007). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Aktivierung von *Msgn1* nicht zwangsläufig paraxiales Mesoderm und seine Vorläuferzellen markiert, da das paraxiale Mesoderm nur aus dem Abschnitt des Primitivstreifens entsteht, der caudal an den Primitivknoten anschließt (Lawson et al. 1991, Kinder et al. 1999). Vielmehr scheint *Msgn1* auch in anderen, caudal am Primitivstreifen auswandernden Zellen des nascenten Mesoderms zumindest kurzzeitig exprimiert zu sein.

Die Expression von *Tbx6*, einem essentiellen Gen für die Entstehung paraxialen Mesoderms (Chapman et al. 1998), war bei der *in vitro* Differenzierung mit WNT3a und Noggin bedeutend stärker als in den *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen bei der Differenzierung mit BMP4 und DKK1. Übereinstimmend damit konnte zuvor gezeigt werden, dass die Expression von *Tbx6* im präsomitischen Mesoderm von der *Wnt3a*-Expression abhängig ist (Wittler et al. 2007). Zudem konnten Wittler und Kollegen zeigen, dass ein *Msgn1*-Promoterfragment direkt durch kanonische Wnt-Signale im Zusammenspiel mit *Tbx6* aktiviert werden kann (Wittler et al. 2007). Bei der *in vitro* Differenzierung mit WNT3a und Noggin wurde der *Msgn1*-Reporter demnach durch das Wnt-Signal in Zusammenspiel mit dem gleichfalls aktivierten *Tbx6* angeregt. In den Zellen, die mit BMP4 und DKK1 stimuliert wurden, konnte der *Msgn1*-Reporter dennoch stark aktiviert werden, obwohl zum einen das Wnt-Signal weitgehend inhibiert, und zum anderen kaum verstärkte Expression von *Tbx6* erkennbar war. Diesbezüglich ist interessant, dass das von Wittler und Kollegen verwendete Promoterfragment trotz der Mutierung aller Bindestellen für T-Box- oder Lef/Tcf-Proteine noch immer in einer Domäne ventral des *tail bud* aktiv ist und die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität weiterhin im lateralen Mesoderm verbleibt. Die Betrachtung der Genexpression von *Bmp2* und *Bmp4* im Embryo legt nahe, dass beide Gewebe unter Bmp-Signaleinfluss stehen (Winnier et al. 1995, Goldman et al. 2000). Dass auch im hier vorgestellten *in vitro* Modell durch Stimulation mit BMP4 und DKK1 in großem Ausmaß *Msgn1*-Reporter exprimierende Zellen generiert werden konnten, deutet ebenfalls darauf hin dass die Aktivierung des *Msgn1*-Reporters nicht allein von einem kanonischen Wnt-Signal und *Tbx6* abhängt, sondern darüber hinaus durch Bmp-abhängige Prozesse erzielt werden kann. Dass die so entstehenden *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen jedoch keine transkriptionellen Merkmale paraxialen Mesoderms zeigten, bedeutet dass es unter Bmp-Einfluss nicht zur

Spezifikation paraxialen Mesoderms kommt und das die Expression von *Msgn1* kein exklusives Merkmal für Zellen des paraxialen Mesoderms oder seiner Vorläuferzellen ist.

### ***Epithelial-Mesenchymale Transitionen im in vitro Modell***

Zusätzlich zur Differenzierung in paraxiales Mesoderm ließ sich mit dem *in vitro* System die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Zellen modellieren. Der Expressionsverlauf von *Cdh1*, *Vim*, *Twist1* und *Snai1* hat gezeigt, dass die Zellen bei der *in vitro* Differenzierung zu Mesoderm eine EMT durchlaufen, ähnlich den Zellen des Primitivstreifens *in vivo* (Shook et al. 2003, Thiery et al. 2009). Die Analyse zeigte jedoch, dass die EMT im *in vitro* System bei der Differenzierung mit WNT3a und Noggin gegenüber dem anderen Ansatz verzögert ist und *Cdh1* in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen nach 96 Stunden noch aktiv war und erst mit dem Einsetzen der *Msgn1*-Expression deutlich reduziert wurde. Es ist möglich, dass der Verlauf der EMT von der Stärke der zugegebenen Signale abhängig ist. Es kann jedoch ebenso darauf hindeuten, dass die EMT auch *in vivo* im anterioren Primitivstreifen verzögert ist. Der migratorische Phänotyp kann notwendig sein, dass Zellen bestimmte Signalumgebungen verlassen und in andere Milieus einwandern können, um ein anderes Schicksal anzunehmen. An Epiblast-Explantaten führen EMT, die durch einen Antikörper gegen e-cadherin ausgelöst werden, zum Verlust des Stammzellmarkers SSEA1 in den Zellen (Burdal et al. 1993). Zellen im Primitivstreifen des Embryos, die aufgrund von Mutationen keine EMT durchlaufen und im Primitivstreifen akkumulieren, exprimieren die frühen Mesoderm-Marker *Lhx1*, *T* und *Evx1* sowie *Meox1* und *Tbx6* (Kitajima et al. 2000, Carver et al. 2001, Zohn et al. 2006). Dennoch konnte nicht beobachtet werden, dass aus diesen Zellen weiter spezifizierte Mesodermpopulation wie Herzmesoderm oder paraxiales Mesoderm entstehen (Kitajima et al. 2000). Da eine feste Abfolge von Signalen für die Differenzierung bestimmter Gewebe notwendig sein kann (Gouon-Evans et al. 2006, Naito et al. 2006, Park et al. 2006, Nostro et al. 2008) ist es denkbar, dass die Mesodermzellen entlang ihrer Migrationswege im Embryo eine Abfolge unterschiedlicher Signale empfangen. Dass kann der Grund sein, warum Zellen die den mesenchymalen Phänotyp nicht annehmen können, sich im Embryo nicht zu Geweben spezifizieren, die in größerer Entfernung zum Primitivstreifen entstehen. Eine zeitlich kontrollierte EMT in den verschiedenen Bereichen

des Primitivstreifens kann also eine Voraussetzung dafür sein, dass die Zellen zum richtigen Zeitpunkt den Primitivstreifen verlassen um in die richtige Signalumgebung zu wandern. Interessanterweise ist in den *T*-Reporter exprimierenden Zellen bei der Differenzierung mit WNT3a und Noggin das Gen *Flrt3*, das für ein Transmembranprotein kodiert, verstärkt exprimiert. Dieses Gen ist in Bereichen des Embryos, die epithelial bleiben, exprimiert und verhindert eine EMT der Zellen (Egea et al. 2008). Die genaue Rolle dieses Gens ließe sich durch eine Analyse der *Flrt3*-Expression während der Ausstreckung des Primitivstreifens und im *in vitro* System weiter aufklären. Die Expression verschiedener EMT-assoziiierter Gene zeigte, dass die vorliegenden Expressionsdaten weiteren Aufschluss darüber geben können, welche Gene an der Steuerung der EMT entlang des Primitivstreifens beteiligt sind. EMT sind neben ihrer Rolle in der Gastrulation ein zentraler Vorgang für die Progression von Tumoren. Die Erkenntnisse über die Genexpression während der EMT im *in vitro* Modell können daher neue Aufschlüsse über Charakteristika dieser Vorgänge geben und einen Grundstein für die Entwicklung neuer Krebstherapien legen.

### ***Analyse der Lokalisierung differenziell exprimierter Gene auf den Chromosomen***

In dieser Arbeit konnten durch Stimulation mit WNT3a und Noggin Zellen mit transkriptionellen Eigenschaften paraxialen Mesoderms generiert werden. Gene, die während der *in vitro* Differenzierung zu paraxialem Mesoderm aktiviert wurden, lagen dabei gehäuft auf den Chromosomen 11 und 2, während besonders viele deaktiviert Gene auf den Chromosomen 4 und 15 lokalisiert waren. Die Konzentration differenziell exprimierter Gene auf bestimmte Regionen des Chromatins kann bedeuten, dass diese Gene nicht unabhängig von einander reguliert wurden, sondern ganze Chromosomenabschnitte möglicherweise den gleichen regulatorischen Mechanismen unterliegen. Beim Übergang vom Primitivstreifenstadium zu paraxialem Mesoderm war außerdem ein markanter Wechsel in den aktivierten und deaktivierten Chromosomen zu erkennen. Das zeigt an, dass bei der Festlegung des Zellschicksals zu paraxialem Mesoderm tief greifende Änderungen im Transkriptom stattfinden. Darüber hinaus konnte bei der Differenzierung unter dem Einfluss von BMP4 und DKK1 ein abweichendes Aktivierungsmuster der Chromosomen gefunden werden. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass in den beiden hier verwendeten

Differenzierungsansätzen unterschiedliche Gewebe generiert wurden. Eine genauere Analyse der aktivierten genomischen Bereiche bei der Differenzierung zu präsomitischem Mesoderm kann die Suche nach Kandidatengenen für die Steuerung der Entwicklung von paraxialem Mesoderm unterstützen und der Aufklärung von Mechanismen dienen, die der Differenzierung von spezifischen Geweben zu Grunde liegen.

Bei der Untersuchung ganzer Mausembryonen zwischen Tag 6 und Tag 9 der Embryonalentwicklung, konnte die hier beschriebene Lokalisierung aktivierter Gene nicht gezeigt werden (Mitiku et al. 2007). An Tag 8 der Embryonalentwicklung wurde eine Anreicherung aktivierter Gene auf Chromosom 7 fest gestellt und der Effekt dem Einsetzen der Somitogenese zugeschrieben. In der Studie wurden jedoch ganze Embryonen ohne ihre extraembryonalen Gewebe analysiert. Da zeitgleich mit der Entwicklung des paraxiales Mesoderms eine Vielzahl anderer Prozesse im Mesoderm stattfinden, wie Musterbildung im neuralen Gewebe und die Herzentwicklung, ist es wahrscheinlich, dass die hier beobachtete Aktivität der Chromosomen in den Daten von Mitiku et al. (2007) keine signifikanten Änderungen hervorrufen. Das zeigt, dass durch *in vitro* Studien isolierte Aspekte der Embryonalentwicklung bedeutend gezielter untersucht werden können.

## **Identifikation von Genen mit möglicher Rolle in der Differenzierung paraxialen Mesoderms**

### ***Analyse deregulierter Gene in der Entwicklung paraxialen Mesoderms***

Unter den aktivierten Genen in der *Msgn1*-Reporter exprimierenden Population konnten bei der Differenzierung unter Einfluss von WNT3a und Noggin 28 Gene gefunden werden, die nur in dieser Population außerordentlich stark exprimiert waren und auch bei der Differenzierung mit BMP4 und DKK1 kaum aktiviert wurden. Vielen dieser Gene konnte bereits eine Rolle in der Entwicklung des paraxialen Mesoderms zugeschrieben werden. Das zeigt, dass sich durch die Verwendung des *in vitro* Differenzierungssystems sowie die verwendete Methode zur Identifizierung von Kandidatengenen valide Daten generieren lassen. Die größte Gruppe spezifisch aktivierter Gene waren Transkriptionsfaktoren oder an Transkriptionsfaktoren bindende Proteine. Unter ihnen war das Gen *Lmo2*. Es kodiert für ein LIM-Zinkfinger Protein das im Nukleus mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren

komplexieren kann (Wadman et al. 1997, Ono et al. 1998). Obwohl *Lmo2* besonders in hämatopoetischen Zellen exprimiert ist, wurde sein Transkript auch in den Somiten detektiert (Silver et al. 1997, Manaia et al. 2000). Entsprechend treten in der homozygoten Mutante hauptsächlich hämatopoetische Defekte auf, jedoch sind auch Defekte in der Somitenbildung und eine verkürzte antero-posteriore Achse beschrieben. Die Mutation ist embryonal nach etwa 10 Tagen lethal (Warren et al. 1994). Eine mögliche Rolle von *Lmo2* in der Entwicklung paraxialen Mesoderms wurde bislang nicht untersucht. Eine gewebespezifische Ablation im paraxialen Mesoderm könnte Aufschluss über die Rolle des Gens bei der Bildung somitischen Mesoderms geben.

*Stra6* war in den in den *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen deutlich verstärkt exprimiert. Es kodiert für einen membranständigen Rezeptor, dessen mutanter Phänotyp nicht bekannt ist. Seine Expression wurde während der Gastrulation im Mesoderm beschrieben, jedoch nicht im Primitivstreifen (Bouillet et al. 1997). Über seine Funktion ist nichts bekannt. Die Expression von *Stra6* ist in embryonalen Karzinomzellen durch Retinsäurestimulation aktivierbar (Bouillet et al. 1997). Retinsäure spielt seinerseits eine Rolle in der Differenzierung verschiedener Gewebe, unter anderem im anterioren präsomitischen Mesoderm (Aulehla et al. 2010). Demnach kann *Stra6* eine Rolle in der Entwicklung des paraxialen Mesoderms spielen.

*Map3k6* kodiert für eine zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase und spielt eine Rolle in der Weiterleitung extrazellulärer Signale, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren resultiert. *Map3k6* kann mit *Map3k5* interagieren und nach Stress-Stimuli Apoptose auslösen (Ortner et al. 2007, Takeda et al. 2007). Darüber hinaus kann *Map3k6* auch die Genexpression von VEGF regulieren (Eto et al. 2009). Möglicherweise ist die Expression anderer Gene auch von *Map3k6* reguliert. Ein lethaler Phänotyp ist nicht bekannt, Effekte der *Map3k6*-Mutation werden wegen der großen Anzahl von Map3-Kinasen jedoch möglicherweise kompensiert (Craig et al. 2008).

Unter den Genen mit unbekannter Funktion konnte die Aktivität eines LacZ-Reporterproteins von *6230427j02rik* zuvor ab E8,0 beschrieben und im paraxialen Mesoderm nachgewiesen werden (Reid et al. 2010). Homozygote Mutationen des Gens führten in einigen Embryonen zu Exencephali (Reid et al. 2010), was eine Funktion in EMT bedeuten kann. Weitere Gene

mit dem gesuchten Expressionsmuster, jedoch mit bislang unbekannter Funktion sind *Bc039093*, das für das Zink-Finger-Protein 362 (ZFP362) kodiert, sowie *Tmem132c*, das für ein membranständiges Rezeptorprotein kodiert. Diese Gene wurden bislang nicht eingehend untersucht.

## **Differenzierung embryonaler Stammzellen *in vitro***

### ***Adhärente Kolonien verbessern die Differenzierung zu paraxialem Mesoderm***

In der vorliegenden Arbeit wurden embryonale Stammzellen sowohl in frei schwimmenden Kolonien als *embryoid bodies* als auch auf fibronektinbeschichteten Kulturschalen in serumfreiem Medium differenziert. Bei der Differenzierung in adhärennten Kolonien konnte eine deutliche höhere Überlebensrate der Zellen in serumfreiem Medium erzielt werden. Außerdem stieg der Anteil der Zellen, die nach Stimulation mit WNT3a den *Msn1*-Reporter aktivierten, bei dieser Kulturform deutlich an. Möglich ist, dass die komplexen dreidimensionalen Strukturen aus vielen unterschiedlichen Geweben, die sich in *embryoid bodies* bilden und der resultierende Signalaustausch zwischen den Zellen der Induktion zu paraxialem Mesoderm durch WNT3a und Noggin entgegen wirkt (Doetschman et al. 1985, Keller 1995, Robertson et al. 2000, Aubert et al. 2002, Hamazaki et al. 2004). Es ist außerdem nicht geklärt, wie gut verschiedene Signalproteine aus dem Medium zu den Zellen im Inneren der Aggregation vordringen. In adhärennten Kulturen sind die Zellen durch die flache Morphologie der Kolonien vermutlich besser durch Signale aus dem Medium zu erreichen. Die Zellen können außerdem echte basale und apikale Membranbereiche ausbilden und ähneln morphologisch mehr den Zellen des mehrreihigen Epithels im Epiblasten. Außerdem ist es möglich, dass Zell-Matrix-Interaktionen die Differenzierung der Zellen beeinflussen. Während die extrazelluläre Matrix in einem *embryoid body* in einem wenig kontrollierbaren Prozess von den Zellen produziert wird, ermöglichen es adhärennte Zellkulturen, definierte Untergründe zu verwenden und auf diese Weise die Differenzierung zu unterstützen. Besonders bei der Verwendung von Fibronektin als Untergrund konnte ein besonders gutes Anheften und Ausbreiten der Kolonien sowie hohe Überlebensraten im Vergleich mit Gelatine beobachtet werden. Ähnlich den embryonalen Stammzellen zeigen Experimente mit Epiblast-Explantaten, dass das Überleben epithelialer Zellen auf Fibronektin in serumfreiem Medium

deutlich höher ist als auf anderen Substraten (Burdsal et al. 1993). Die erhöhten Überlebensraten freischwimmender Kolonien nach Zugabe von Bmp- oder Wnt-Signalproteinen ist gleichermaßen vermutlich auf die Aktivierung von endogenem *Fn1* in den Zellen zurückzuführen (ten Berge et al. 2008), während die geringe Anzahl intakter Zellen in reinem serumfreiem Medium auf die nicht ausreichende Produktion einer extrazellulären Matrix geschuldet ist.

Durch die Aggregation definierter Zellmengen vor Beginn der Differenzierung konnten Kolonien gleicher Größe ohne innere Differenzierung hergestellt werden. Somit waren weitgehend ähnliche Bedingungen in allen Kolonien gewährleistet. Das Arbeiten mit adhärenen Zellkolonien hatte darüber hinaus entscheidende technische Vorteile. Die Kolonien konnten in wesentlich kleineren Kulturgefäßen mit bedeutend weniger Medium und damit ressourcensparender differenziert werden. Der Behandlungsaufwand der adhärenen Kulturen war wesentlich geringer als in frei schwimmenden Kolonien. Adhärenente Kolonien eignen sich demnach, sowohl eine Vielzahl verschiedener Bedingungen in kleinen Ansätzen parallel zu untersuchen, als auch große Mengen spezifischer Zelltypen zu generieren.

### ***Stammzellendifferenzierung in serumhaltigen Kulturen***

Die geringe Ausbeute *Msgn1*-Reporter exprimierender Zellen bei der Stimulation mit Serum zeigte, dass sich Serum nicht optimal für die Generierung spezifischer Zelltypen eignet. Einzelne Differenzierungsrichtungen können vermutlich unter Serum einfluss nicht entstehen, da bestimmte Signale inhibiert und speziell benötigte Signale in einer auf einander abgestimmten Konzentration oder einer bestimmten Abfolge notwendig sind (Gouon-Evans et al. 2006, Kodaira et al. 2006, Naito et al. 2006, Park et al. 2006, ten Berge et al. 2008, Nostro et al. 2008). Da Serum eine unbekannt Zusammensetzung von Signalstoffen enthält, können vermutlich keine optimalen Bedingungen für die Entstehung paraxialen Mesoderms geschaffen werden. Zwar konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Serum förderlich für das Wachstum der Zellen ist, dennoch konnte auch gezeigt werden, dass die erhöhte Flexibilität bei der Verwendung definierter Medien ungleich mehr Möglichkeiten eröffnet, Zellen gezielt in distinkte Populationen zu differenzieren und die Einflüsse einzelner Signale zu analysieren. Daher kann die Verwendung von Serum allein nicht ausreichen, um alle Möglichkeiten, die die *in vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen bietet, voll auszuschöpfen.

## Material und Methoden

Die im folgenden nicht näher beschriebenen Standardmethoden wurden aus Sambrook et al. (1989) übernommen. Diese Methoden waren die Kultivierung und Lagerung von *E. coli* Bakterien, Herstellung chemisch und elektrokompetenter Bakterien, Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung linearisierter DNS, Transformation von *E. coli* Bakterien und Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen. Abweichungen von den Verfahren sind im Text angegeben. Nach Angaben der Hersteller wurden durchgeführt: Die Plasmid-DNS-Präparation aus Bakterienkulturen mit QIAprep spin (Qiagen), PCR mit Phusion High-Fidelity PCR Kit (Finnzymes), Elution von DNS aus Agarosegelen mit dem Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega), die radioaktive Markierung von DNS mit dem Rediprime II DNA labelling System (Amersham), RNS-Präparation mit Trizol (Invitrogen), Ligationen mit LigaFast (Promega), cDNS-Synthese aus RNS mit MMLV, RNase H<sup>-</sup> reverse Transkriptase (Promega), Konzentrationsmessungen von DNS und RNS mit dem NanoPhotometer (Implen), Konzentrationsmessungen von RNS mit Qubit (Invitrogen). Sequenzierungen von Plasmiden wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) oder Agowa (Berlin) durchgeführt.

Folgende Geräte wurden verwendet: Pipetten (Eppendorf, Gilson), Mehrkanalpipetten, Tischzentrifugen und Zellkulturzentrifugen (Eppendorf), Elektroporator Gene Pulser (BioRad), Inversmikroskop (Leica), Inversmikroskop AxioObserver mit Apotom und den Filtersätzen 38HE und 43HE sowie AxioVision Software (Zeiss), Gelelektrophoresekammern (PeqLab), sterile Werkbank für Zellkulturarbeiten (Heraeus), AbiPrism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Folgendes Verbrauchsmaterial wurde verwendet: 15ml- und 50ml Probenröhrchen (Greiner, Corning), 0,5, 1,5 und 2,0 ml Reaktionsröhrchen (Eppendorf), PCR-Reaktionsröhrchen (PeqLab), 96-Well Reaktionsplatten für quantitative PCR (ABI), Sterilfilter mit der Porengröße 0,2 µm (Millipore), Zellkulturschalen und sterile Einmalpipetten (Corning), Kulturgefäße für Antikörperfärbungen und fluoreszenter Mikroskopie (Ibidi), Reaktionsröhrchen für

Durchflusszytometrie, mit und ohne Zellfilter (BD Biosciences), Elektroporationsküvetten (BioRad).

Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Roth, Sigma oder Invitrogen verwendet. Soweit erhältlich, stammen alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sowie das T4-Polymerase Klenow Fragment von Promega. Nicht bei Promega erhältliche Enzyme wurden von New England Biolabs bezogen. Oligonukleotide wurden von MWG Biotech und Invitrogen synthetisiert.

### **Oligonukleotide**

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
3'-T <sub>rek</sub>	tccactcggctactgcaggctctccctcgcgctctctgtgcccgaggctgtatattatgtacctgactgatg
5'-T <sub>rek</sub>	tgttggtagggagtcaagactcctggaaggtggagaggggtggcgggaggatggtgagcaagggcga
bglopA_rev	tatatatgtacagcagctcgagttcataagagaa
bglopA_vor	tatatatgtacaagtaagctgagaattcaggggtga
Fgf5_for	cgaggagtttcagcaacaa
Fgf5_rev	cgcgacgcataggtattat
Hprt_for	gcttccctggtaagcagtaca
Hprt_rev	gagaggtcctttcaccagcaa
Msgn1_for	cagaaaggcagcaaagtcaaga
Msgn1_rev	ccccgatgtactgtatgggtga
Snai1_for	cttgtgtctgcacgacctgt
Snai1_rev	ggagcaggagaatggcttc
T_for	tgctgcctgtgagtcataac
T_rev	cagctgtctgggagcctgg
Tbx6_for	ggtagcatccgcattgaagt
Tbx6_rev	ctgagctttgaagccagagg
T <sup>WT</sup> _for	gggacccattttctcttcc
T <sup>WT</sup> _rev	gttctgtagggggaaagt
Insert <sup>3'</sup> _for	tcgactagagcttgccggaac
Insert <sup>5'</sup> _rev	aagcgcatgaactccttgat

### **Antikörper**

<u>Antigen</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Konzentration</u>
Venus/GFP	Huhn	Abcam	1:1000
TBX6	Kaninchen	Phillip Grote	1:50
SOX2	Ziege	R&D Systems	1:100
Brachyury (T)	Kaninchen	Bernhard Herrmann	1:500
e-cadherin	Maus	BD Transduction Labs	1:150

POU5F1	Kaninchen	Santa Cruz	1:50
Huhn-IG	Esel	Dianova	1:1000
Kaninchen-IG	Esel	Dianova	1:1000
Ziege-IG	Esel	Dianova	1:1000
Maus-IG	Esel	Dianova	1:1000

### ***Bakterienstämme***

Elektromax Stbl4 (Invitrogen)

DH5alpha, elektrokompetent (eigene Herstellung)

TOP 10, chemisch kompetent (Invitrogen)

DH10B, Zellen für Recombineering, chemisch kompetent (ImaGenes)

### ***Herstellung der Reporterlinie für *Msgn1****

In den embryonalen Stammzellen wurde das offene Leseraster von *Msgn1* über homologe Rekombination durch die kodierende Sequenz von Venus (Nagai et al. 2002), gefolgt von der Selektionskassette PL451 (Liu et al. 2003) ersetzt (Dr. Lars Wittler, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin). Die Selektionskassette wurde durch transiente Transfektion der Stammzellen mit pCAGGS\_Flpe\_IRES\_puro (Schaft et al. 2001) entfernt.

### ***Herstellung des mCherry-Reporterplasmids***

Als Ausgangsplasmid diente PL451 (Liu et al. 2003) in einem pBS\_KS-Vektor (Stratagene, Heinrich Schrewe, Max Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin). Zur Herstellung von Cherry\_PL451 wurde das offene Leseraster von mCherry (Shaner et al. 2004) in die HindIII-Schnittstelle eingefügt. Aus dem Plasmid pBI-GL (Clontech) wurde das Polyadenylierungssignal von  $\beta$ -Globin aus dem Kaninchen mit der vorangestellten intronischen Sequenz mittels PCR mit dem Primerpaar bglopA\_vor und bglopA\_rev herausamplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in die BsrGI Schnittstelle von mCherry\_PL451 eingefügt. Alle Klonierungsschritte wurden zur Analyse sequenziert.

### ***Integration des mCherry-Reporters in den T-Lokus***

Cherry\_pA\_PL451 wurde mit SacII und Acc65I verdaut und das 3,9kbp-Fragment wurde aus

dem Gel extrahiert. Mit den Primern 5'-T<sub>rek</sub> und 3'-T<sub>rek</sub> wurde der Abschnitt vom ATG des offenen Leserasters für mCherry bis zur zweiten FRT-Sequenz amplifiziert. Dazu wurden dem Standard-PCR-Ansatz mit Phusion-Polymerase 2% DMSO zugegeben. Es wurden 30 Zyklen (15 sek, 98°C Denaturierung, 15 sek, 56°C Anlagerung, 80 sek, 72°C Elongation) bei einer initialen Denaturierung von 2 min bei 98°C und finalen Elongation von 2 min bei 72°C gefahren. Die PCR-Reaktion wurde danach mit 10U DpnI versetzt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Das 4kbp-Fragment wurde aus dem Gel extrahiert und mit Natrium-Acetat und Ethanol gefällt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in den BAC R24-530D4 (imaGenes) integriert.

### ***BAC-Recombineering***

Es wurde das Red/ET BAC-Recombineeringssystem (GeneBridges) verwendet. Die Bakterien wurden mit dem pSC101-BAD-gbaA(tet)-Plasmid transfiziert. In zwei 2ml-Reaktionsgefäßen wurden jeweils 1.4ml LB-Medium mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol und 5 µg/ml Tetracyclin vorgelegt, mit 10 - 30µl einer frischen Übernachtskultur dieser transfizierten Bakterien angeimpft und auf einem Schüttelinkubator bei 30°C und 1000rpm bis zum Erreichen des OD600-Wertes von 0,2 inkubiert. Es wurden 30µl 10% L-Arabinose oder Wasser zur Kontrolle zugegeben. Die Röhrchen wurden bei 37°C und 1000rpm für weitere 45 - 60min inkubiert, bis zu einem OD600-Messwert von 0,4. Die Zellen wurden in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 10000rpm sedimentiert und der Überstand vorsichtig weitestgehend entfernt. Der bakterielle Niederschlag wurde in 1ml gekühlter 10%iger Gylzerollösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert und dieser Waschschrift ein Mal wiederholt. Der Überstand wurde bis auf 20 - 40µl abgenommen und in das Restvolumen wurden 300ng des PCR-Produktes gemischt und der gesamte Ansatz in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 1mm) überführt und elektroporiert (200Ohm, 1800V, 25µF). Die Bakteriensuspension wurde in frisches LB-Medium überführt und Stunde bei 37°C und 1000rpm schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden auf eine Agarplatte mit 10µg/ml Kanamycin plattiert und 24 bis 48h bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden zur Kontrolle jeweils auf eine Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin und eine mit 50 µg/ml Kanamycin gepickt. Nur die Kolonien, die auf Kanamycin, nicht aber auf Ampicillin wuchsen, wurden weiter verwendet.

### ***Isolation von BAC-DNS aus E. coli***

2 ml der bakteriellen Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und das Pellet wurde in 250µl P1-Puffer (Qiagen) vorsichtig resuspendiert. Es wurden 250µl des Puffers P2 beigemischt und 5 Minuten lysiert. Die Reaktion wurde mit 350µl des Puffers N3 neutralisiert und das Pellet abzentrifugiert. Die DNS wurde aus dem Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, abzentrifugiert, kurz luftgetrocknet und in 20µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### ***Embryonale Stammzellen***

Es wurden embryonale Stammzellen der Maus verwendet. Für die Analyse mittels quantitativer PCR wurden embryonale Stammzellen der F1-Generation aus einer Kreuzung der Stämme CJ57BL/6 und 129 verwendet (George et al. 2007). Die Stammzelllinie TS3, die für die Reporterlinien verwendet wurde, wurde aus CJ57BL6/J-Inzuchtstämmen isoliert (T. Shimizu und H. Schrewe, nicht publiziert).

### ***Beschichtung der Zellkulturschalen***

Gelatine (Sigma) wurde zu 0,2% in sterilem Wasser auf dem Boden der Zellkulturschalen verteilt und für mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gelatinelösung wurde vor dem Aufbringen der Zellsuspension abgesaugt. Fibronectin (Calbiochem) wurde zu 10µg/ml in PBS gelöst. Der Boden des Kulturgefäßes wurde mit der Fibronectinlösung bedeckt und über Nacht bei 4°C oder 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Unmittelbar vor dem Aussäen der Zellen wurde die Fibronectinlösung abgesaugt und die Schale ein Mal mit PBS gewaschen.

### ***Routinemäßige Zellkultur***

Embryonale Stammzellen wurden auf mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen (Corning) in Stammzellmedium aus *knockout* DMEM (Invitrogen) mit 15% stammzellgetestetem fötalem Kälberserum (Pan Biotech, Invitrogen), 2mM GlutaMax II (Invitrogen), 0,1mM nicht-essentieller Aminosäuren (Invitrogen), 0,1mM β-Mercaptoethanol (Sigma) und 1000u/ml LIF (Chemicon) bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 7,5% Kohlendioxidanteil

kultiviert. Zur routinemäßigen Expansion wurden die Zellen auf einer konfluenten Schicht mitomycinbehandelter Fibroblasten kultiviert. Bei Erreichen einer kritischen Koloniengröße oder halbkonfluenten Kolonien wurden die Zellen passagiert. Kulturen ohne Fibroblasten wurden nach spätestens 48 Stunden passagiert. Fibroblasten wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (PAA), 1% GlutaMax II, 0,1mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1% Penicillin/Streptomycin (Cambrex) expandiert.

### ***Vereinzeln von kultivierten Zellen***

Kulturen mit serumhaltigem Medium wurden ein Mal mit PBS (Cambrex) gewaschen. Zur Dissoziation wurden die Zellen mit TrypLE (Invitrogen) bedeckt und bei 37°C in den Brutschrank gestellt, bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipette in ihrem Kulturmedium mechanisch vereinzelt.

### ***Transiente Transfektion embryonaler Stammzellen***

Auf 35mm Zellkulturschalen wurden  $5 \times 10^6$  Fibroblasten über Nacht anwachsen lassen. Darauf wurden  $10^6$  embryonale Stammzellen ausgesät, nach 24 Stunden ein Mal gewaschen und mit nach Herstellerangaben angesetzter Transfektionslösung aus 800 $\mu$ l OptiMEM-I, 12 $\mu$ l Lipofectamin2000 (beides Invitrogen) und 4 $\mu$ g zirkulärer Plasmid-DNS für 4 bis 5 Stunden inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde daraufhin mit Stammzellmedium mit LIF ersetzt.

### ***Stabile Transfektion des BAC in embryonale Stammzellen***

Das BAC wurde mit PI-SceI linearisiert. Zur stabilen Transfektion embryonaler Stammzellen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen vereinzelt, in PBS gewaschen, in 0,8ml PBS überführt, mit 5  $\mu$ g des linearisierten und der mit Isopropanol gefällten BAC-DNS vermischt und in eine Elektroporationsküvette (4mm) überführt. Die Elektroporation wurde bei 240V und 500 $\mu$ F durchgeführt.

### ***Analyse der Genexpression in tetraploid aggregierten Embryonen***

Die tetraploide Aggregation der embryonalen Stammzellen (Nagy et al. 1993, Eakin et al. 2006) wurde von Karol Macura (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin)

durchgeführt. Die Embryonen wurden 6,5 Tage nach dem Retransfer in die Leihmutter aus dem Uterus präpariert in PBS mit 50% Glycerol eingebettet und als Frischpräparat fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

### ***Differenzierung embryonaler Stammzellen***

Die Zellen wurden vor Beginn der Differenzierung für zwei Passagen auf gelatinebeschichteten Platten ohne Fibroblasten gehalten und anschließend vereinzelt. Vereinzelte Zellen wurden abzentrifugiert und in der erforderlichen Konzentration resuspendiert. Mit einer Mehrkanalpipette wurden Tropfen der Zellsuspension auf dem Boden einer Bakterienkulturschale verteilt. Nach dem Aufsetzen des Deckels wurde die Schale umgedreht, sodass die Mediumtropfen mit den Zellen herabgingen und sich die Zellen im Konus des Tropfens sammelten. Zur Kultivierung wurde die Schale in den Brutschrank gestellt. Bei der Differenzierung in serumhaltigem Medium wurden 500 Zellen in einem Tropfenvolumen von 20µl aggregiert und 48 Stunden kultiviert. Danach wurden die *embryoid bodies* in frisches Medium überführt und frei schwimmend in nicht adhärenen Kulturschalen gehalten, das Medium wurde täglich gewechselt. Das serumhaltige Medium setzte sich zu 80% aus IMDM (Invitrogen) mit 2mM Glutamax II, 0,1mM nicht-essentielle Aminosäuren und 0,1mM β-Mercaptoethanol und zu 20% aus fötalem Kälberserum (PAA) zusammen. Serumfreies Medium wurde aus jeweils 100ml Neurobasal und DMEM/F12, 1ml N2-Supplement, 2ml B27, 0,05% BSA Fraction V, 2mM Glutamax II (alle Invitrogen) und 0,15mM 1-Thioglycerol (Sigma) hergestellt. In serumfreiem Medium wurden die Zellen zunächst direkt in ihrem Differenzierungsmedium aggregiert. Ab dem zweiten Experiment wurden die Zellen zunächst über Nacht in hängenden Tropfen in Stammzellmedium mit LIF aggregiert, dann in serumfreiem Medium gewaschen und schließlich im Differenzierungsmedium auf nicht adhärenen Platten gehalten. Adhärenz differenzierte Zellen wurden in serumhaltigem Stammzellmedium mit LIF zu je 200 Zellen in hängenden Tropfen über Nacht in einem Tropfenvolumen von 5µl aggregiert und anschließend in serumfreiem Differenzierungsmedium ausplattiert. Die Konzentrationen der rekombinanten Proteine (alle R&D Systems) betragen 10ng/ml BMP4, 500ng/ml DKK1, 10ng/ml und 50ng/ml WNT3a, 500ng/ml Noggin, 200ng/ml Fgf2 und Fgf8b sowie 100ng/ml Activin A.

### **Durchflusszytometrie**

Es wurden die Durchflusszytometer FACSCalibur und FACSAriaII (BD Biosciences) verwendet. Die Zellen wurden routinemäßig in TrypLE ohne Phenolrot bei Raumtemperatur dissoziiert und nach Zugabe der gleichen Menge PBS im Durchflusszytometer analysiert. Für die RNS-Probenahme wurden die Zellen 30 Minuten bei 4°C dissoziiert und auf anschließend auf Eis gehalten. Die Zellen wurden direkt in Trizol (Invitrogen) sortiert.

### **Expressionsanalyse mit quantitativer PCR**

Die quantitative PCR wurde mit dem Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transkriptmengen der untersuchten Gene wurden ins Verhältnis zur Transkriptmenge des Referenzgens *Hprt* gesetzt. Als Vergleichswert dienten die undifferenzierten embryonalen Stammzellen direkt vor Beginn des Aggregationsschrittes. Die Expressionswerte der Gene in den einzelnen Proben wurden nach der deltaCT-Methode

$FC = e^{(\Delta Ct(Kontrolle) - \Delta Ct(Experiment))}$  berechnet.  $FC$  gibt die Vervielfachung (*Fold Change*) an, wobei  $e$  die Amplifikationseffizienz der Primer pro Zyklus darstellt und vereinfachend als 2 (100%) angenommen wurde sowie  $\Delta Ct = Ct(Zielgen) - Ct(Referenzgen)$ . Die Primerpaare wurden zuvor auf optimale Effizienz getestet.

### **Expressionsanalyse mit RNS-Chips**

Zur Analyse der Genexpression in den isolierten Stammzellpopulationen wurde das MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip System von Illumina verwendet. Die Verarbeitung der isolierten aufgereinigten RNS und das Auslesen des Chips wurden von der Service-Einheit des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik durchgeführt. Die Daten wurden mit der GenomeStudio Software Version 1.0.6 (Illumina) ausgewertet. Es wurde die Normalisierungsmethode „cubic spline“ und kein Fehlermodell der Software angewendet. Die varianzstabilisierende Normalisierung (Huber et al. 2003) und die Korrespondenzanalyse (Fellenberg et al. 2001) wurden von Utz Pape durchgeführt. Die normalisierten Werte wurden mit QtiPlot 0.9.7.10, GENE-E 1.0.397 und Openoffice 3.2 analysiert. Für die Expressionsanalyse der Markergene wurden Messwerte mit einem Illumina Detektionswert >0,5 zugelassen. Zur Feststellung differenziell exprimierter Gene für die Kandidatengene wurden

nur die Messwerte berücksichtigt, deren Expression präzise bestimmt werden konnte (Illumina Detection >0,99). Gene wurden als differenziell exprimiert gewertet, wenn sich deren Expressionwert in den fluoreszierenden Zellen im Vergleich zu jeder verglichenen Zellpopulationen mindestens um den Faktor 2,5 oder 0,4 unterschied. Die Expressionswerte aus den *Msgn1*-Reporter exprimierenden Zellen wurden mit den Werten aller anderen Zellpopulationen nach 72 und 96 Stunden Differenzierungsdauer verglichen. Die Werte der *T*-Reporter exprimierenden Zellen, die nach 72 Stunden Differenzierungsdauer geerntet wurden, wurden mit denen der nicht fluoreszierenden Zellen des gleichen Zeitpunktes sowie aus den Zellen nach 48 Stunden Differenzierungsdauer verglichen. Die Genexpression der *T*-Reporter exprimierenden Zellen, die nach 96 Stunden gewonnen wurden, wurden mit den nicht fluoreszierenden Zellen des gleichen sowie des vorhergehenden Zeitpunktes verglichen.

### ***Datenbankanalysen***

Soweit nicht anders angegeben wurde zur Analyse und Beschreibung der Kandidatengene die *Mouse Genome Database* und die *Gene Expression Database* der *Mouse Genome Informatics* Webseite des *Jackson Laboratory*, Bar Harbor, Maine (URL: <http://www.informatics.jax.org>, August, September 2010) verwendet (Smith et al. 2007, Bult et al. 2008).

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Entstehung paraxialen Mesoderms im Mausembryo in einem *in vitro* System zu modellieren. Mit Hilfe des *in vitro* Modells sollten transkriptionelle Veränderungen in den embryonalen Stammzellen im Verlauf der Differenzierung ausgelesen und analysiert werden. Es wurde ein Differenzierungsprotokoll in einer adhärenenten Zellkultur etabliert, um aus embryonalen Stammzellen der Maus mit hoher Effizienz paraxiales Mesoderm zu generieren. Zur Beobachtung des Differenzierungsverlaufs und zur Analyse der transkriptionellen Veränderungen in den Zellen während verschiedener Phasen der Differenzierung wurde eine Reporterlinie mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Markergenen generiert. Diese Stammzelllinie zeigte den Eintritt der Zellen in den Primitivstreifen über einen *T*-Reporter sowie die Bildung von Mesoderm über einen *Msgn1*-Reporter an. Die Reporterzellen wurden zur Differenzierung in serumfreiem Medium gehalten und mit BMP4 und DKK1 oder WNT3a und Noggin stimuliert. Mit Hilfe der Reporter gene konnten die Zellen des Primitivstreifens und des Mesoderms mit einem Durchflusszytometer während der *in vitro* Differenzierung isoliert und ihre Transkription vergleichend untersucht werden. Obwohl die fluoreszierenden Reporter in beiden Ansätzen aktiviert wurden, konnte gezeigt werden, dass nur bei der Stimulation mit WNT3a und Noggin Zellen mit transkriptionellen Eigenschaften des anterioren Primitivstreifens und paraxialen Mesoderms entstehen. Unter den differenziell exprimierten Genen konnten Faktoren identifiziert werden, die möglicherweise eine bislang unbekannte Rolle bei der Entstehung von paraxialem Mesoderm spielen.

## Synopsis

The aim of this study was to model the differentiation of paraxial mesoderm in the mouse embryo using an *in vitro* system. A protocol was established that allowed the generation of paraxial mesoderm from murine embryonic stem cells with high efficiency. Using this *in vitro* differentiation technique, transcriptional changes in murine embryonic stem cells were monitored and analyzed in the course of their differentiation. To track the differentiation, a dual reporter cell line was generated, harboring distinguishable fluorescent reporter genes for *T* (*Brachyury*) and *Msgn1* activity. These reporter genes showed the transition to the primitive streak stage and adoption of mesoderm fate, respectively. The differentiation of the reporter cells was induced in serum-free medium containing two combinations of recombinant proteins, either WNT3a and Noggin or BMP4 and DKK1. Using the two reporter genes, it was possible to isolate cells of each stage of differentiation and do comparative transcriptional analysis. It was found that both reporters were activated under both conditions. Transcriptional analysis revealed that only after stimulation with WNT3a and Noggin the cells showed expressional characteristics of paraxial mesoderm and anterior streak derivatives. Genes which were only upregulated in the *Msgn1*-reporter expressing population after stimulation with WNT3a and Noggin were identified and represent genes with a potential role in the development of paraxial mesoderm.

# Abkürzungen und Glossar

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
BAC	artifizielles bakterielles Chromosom Englisch: <i>bacterial artificial chromosome</i>
bHLH	basische Helix-Schleife-Helix (englisch: <i>basic Helix-Loop-Helix</i> ): Charakteristisches Proteinstrukturmotiv einer Familie der Transkriptionsfaktoren
BSA	Bovines Serumalbumin
DMEM	Dubecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
FSC	Vorwärts-Streulicht in der Durchflusszytometrie Englisch: <i>forward scatter</i>
FSC-H	Intensität des Vorwärts-Streulichts in der Durchflusszytometrie Englisch: <i>forward scatter hight</i>
FRT	Flp-Rekombinase Erkennungssequenz Englisch: <i>flp recombinase target site</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein Englisch: <i>green fluorescent protein</i>
kbp	Kilobasenpaar(e)
min	Minute(n)
OD600	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung Englisch: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion Englisch: <i>polymerase chain reaction</i>
PGKneo	Selektionskassette bestehend aus kodierender Sequenz für Neomycin unter der Kontrolle des ubiquitären Phosphoglycerat-Kinase (PGK) Promoters
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute Englisch: <i>rounds per minute</i>
SSC (Durchflusszytometrie)	Seitwärts-Streulicht Englisch: <i>side scatter</i>
SSC-H	Intensität des Seitwärts-Streulichts in der Durchflusszytometrie Englisch: <i>side scatter hight</i>
Std	Stunde(n)

Basiseinheiten sind nach dem SI angegeben. Die Gensymbole wurden nach der aktuellen Nomenklatur des Jackson Laboratoriums ([www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)) verwendet.

## Danksagung

Während meiner Zeit am Max Planck Institut für Immunbiologie sowie am Max Planck Insitut für Molekulare Genetik habe ich eine freundliche und intellektuell anregende Atmosphäre genießen dürfen. Insbesondere möchte ich Bernhard Herrmann danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesen Orten eine interessante Fragestellung zu bearbeiten sowie für seine geduldige Unterstützung auf dem langen Weg zum Ziel. Mein Dank gilt auch Contance Scharff für ihre Zeit und ihre Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für Entwicklungsgenetik danken, die mit großen und kleinen Beiträgen zum Gelingen meiner Arbeit und zu einer großartigen Arbeitsatmosphäre beigesteuert haben. Besonders möchte ich mich neben meinen beiden langjährigen Begleitern Manuela Scholze und Hermann Bauer, bei Lars Wittler, Heiner Schrewe, Phillip Grote, Markus Morkel, Karol Macura, Nathalie Veron, Joana Alves Vidigal, Eun-ha Shin, Antje Brouwer-Lehmitz, Solveig Müller, Andrea König und Lorenz Neidhardt für ihre Unterstützung bedanken. Außerdem gilt mein großer Dank Utz Pape und Holger Klein für ihre unschätzbar wertvolle Hilfe bei der bioinformatischen Analyse meiner Daten, Nils Rademacher für seine Einführung und seine Ratschläge zur Durchflusszytometrie und Tobias Nolden für die fruchtbaren Diskussionen über Stammzellendifferenzierung.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und der Familie Großmann für den Rückhalt und ihre Ermutigungen danken. Mein ganz großer Dank gilt Katja für ihre Geduld und ihre immerwährende Unterstützung.

# Literatur

- D. Acampora, V. Avantaggiato, F. Tuorto, P. Briata, G. Corte & A. Simeone (1998): *Visceral endoderm-restricted translation of Otx1 mediates recovery of Otx2 requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation*. Development 125(24), 5091-5104
- D. Acampora, P. P. Boyl, M. Signore, J. P. Martinez-Barbera, C. Ilengo, E. Puelles, A. Annino, H. Reichert, G. Corte & A. Simeone (2001): *OTD/OTX2 functional equivalence depends on 5' and 3' UTR-mediated control of Otx2 mRNA for nucleo-cytoplasmic export and epiblast-restricted translation*. Development 128(23), 4801-4813
- F. F. D. Amo, D. E. Smith, P. J. Swiatek, M. Gendron-Maguire, R. J. Greenspan, A. P. McMahon & T. Gridley (1992): *Expression pattern of Motch, a mouse homolog of Drosophila Notch, suggests an important role in early postimplantation mouse development*. Development 115(3), 737-744
- S. L. Ang, A. Wierda, D. Wong, K. A. Stevens, S. Cascio, J. Rossant & K. S. Zaret (1993): *The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins*. Development 119(4), 1301-1315
- S.-L. Ang & D. B. Constam (2004): *A gene network establishing polarity in the early mouse embryo*. Semin. Cell Dev. Biol. 15(5), 555-561
- S. J. Arnold, J. Stappert, A. Bauer, A. Kispert, B. G. Herrmann & R. Kemler (2000): *Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Mech. Dev. 91(1-2), 249-258
- J. Aubert, H. Dunstan, I. Chambers & A. Smith (2002): *Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation*. Nat. Biotechnol. 20(12), 1240-5
- A. Aulehla & O. Pourquié (2010): *Signaling gradients during paraxial mesoderm development*. Cold Spring Harb Perspect Biol 2(2), a000869
- A. Aulehla, C. Wehrle, B. Brand-Saberi, R. Kemler, A. Gossler, B. Kanzler & B. G. Herrmann (2003): *Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis*. Dev. Cell 4(3), 395-406
- A. A. Avilion, S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian & R. Lovell-Badge (2003): *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. Genes Dev. 17(1), 126-140
- J. D. Barnes, J. L. Crosby, C. M. Jones, C. V. Wright & B. L. Hogan (1994): *Embryonic expression of Lim-1, the mouse homolog of Xenopus Xlim-1, suggests a role in lateral mesoderm differentiation and neurogenesis*. Dev. Biol. 161(1), 168-178
- E. Batlle, E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida & A. Garcia De Herreros (2000): *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat. Cell Biol. 2(2), 84-9
- R. S. Beddington & E. J. Robertson (1989): *An assessment of the developmental potential of*

*embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo*. Development 105(4), 733-737

- R. S. Beddington & E. J. Robertson (1998): *Anterior patterning in mouse*. Trends Genet. 14(7), 277-284
- R. S. Beddington & E. J. Robertson (1999): *Axis development and early asymmetry in mammals*. Cell 96(2), 195-209
- N. Ben-Haim, C. Lu, M. Guzman-Ayala, L. Pescatore, D. Mesnard, M. Bischofberger, F. Naef, E. J. Robertson & D. B. Constam (2006): *The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4*. Dev. Cell 11(3), 313-23
- D. ten Berge, W. Koole, C. Fuerer, M. Fish, E. Eroglu & R. Nusse (2008): *Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies*. Cell Stem Cell 3(5), 508-518
- B. Bettenhausen, M. H. de Angelis, D. Simon, J. L. Guénet & A. Gossler (1995): *Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta*. Development 121(8), 2407-2418
- C. Biben, E. Stanley, L. Fabri, S. Kotecha, M. Rhinn, C. Drinkwater, M. Lah, C. C. Wang, A. Nash, D. Hilton, S. L. Ang, T. Mohun & R. P. Harvey (1998): *Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule*. Dev. Biol. 194(2), 135-151
- M. Blum, S. J. Gaunt, K. W. Cho, H. Steinbeisser, B. Blumberg, D. Bittner & E. M. D. Robertis (1992): *Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene gooseoid*. Cell 69(7), 1097-1106
- A. Bortvin, K. Eggan, H. Skaletsky, H. Akutsu, D. L. Berry, R. Yanagimachi, D. C. Page & R. Jaenisch (2003): *Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei*. Development 130(8), 1673-1680
- P. Bouillet, V. Sapin, C. Chazaud, N. Messaddeq, D. Décimo, P. Dollé & P. Chambon (1997): *Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein*. Mech. Dev. 63(2), 173-186
- J. Brennan, C. C. Lu, D. P. Norris, T. A. Rodriguez, R. S. Beddington & E. J. Robertson (2001): *Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo*. Nature 411(6840), 965-969
- C. J. Bult, J. T. Eppig, J. A. Kadin, J. E. Richardson, J. A. Blake & M. G. D. Group (2008): *The Mouse Genome Database (MGD): mouse biology and model systems*. Nucleic Acids Res. 36(Database issue), D724-D728
- C. A. Burdsal, C. H. Damsky & R. A. Pedersen (1993): *The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak*. Development 118(3), 829-44
- C. A. Burdsal, M. L. Flannery & R. A. Pedersen (1998): *FGF-2 alters the fate of mouse epiblast from ectoderm to mesoderm in vitro*. Dev. Biol. 198(2), 231-44

- R. Burgess, P. Cserjesi, K. L. Ligon & E. N. Olson (1995): *Paraxis: a basic helix-loop-helix protein expressed in paraxial mesoderm and developing somites*. Dev. Biol. 168(2), 296-306
- N. Cambray & V. Wilson (2002): *Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge*. Development 129(20), 4855-66
- A. F. Candia, J. Hu, J. Crosby, P. A. Lalley, D. Noden, J. H. Nadeau & C. V. Wright (1992): *Mox-1 and Mox-2 define a novel homeobox gene subfamily and are differentially expressed during early mesodermal patterning in mouse embryos*. Development 116(4), 1123-36
- A. Cano, M. A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo & M. A. Nieto (2000): *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat. Cell Biol. 2(2), 76-83
- M. R. Capecchi (1989): *Altering the genome by homologous recombination*. Science (80-) 244(4910), 1288-1292
- E. A. Carver, R. Jiang, Y. Lan, K. F. Oram & T. Gridley (2001): *The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition*. Mol. Cell. Biol. 21(23), 8184-8
- F. Cavaleri & H. R. Schöler (2003): *Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra*. Cell 113(5), 551-552
- I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie & A. Smith (2003): *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell 113(5), 643-55
- D. L. Chapman, N. Garvey, S. Hancock, M. Alexiou, S. I. Agulnik, J. J. Gibson-Brown, J. Cebra-Thomas, R. J. Bollag, L. M. Silver & V. E. Papaioannou (1996): *Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development*. Dev. Dyn. 206(4), 379-90
- D. L. Chapman & V. E. Papaioannou (1998): *Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6*. Nature 391(6668), 695-7
- C. Chazaud & J. Rossant (2006b): *Disruption of early proximodistal patterning and AVE formation in Apc mutants*. Development 133(17), 3379-3387
- C. Chazaud, Y. Yamanaka, T. Pawson & J. Rossant (2006a): *Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway*. Dev. Cell 10(5), 615-624
- C. Chen, S. M. Ware, A. Sato, D. E. Houston-Hawkins, R. Habas, M. M. Matzuk, M. M. Shen & C. W. Brown (2006): *The Vg1-related protein Gdf3 acts in a Nodal signaling pathway in the pre-gastrulation mouse embryo*. Development 133(2), 319-329
- B. Christ & C. P. Ordahl (1995): *Early stages of chick somite development*. Anat. Embryol. 191(5), 381-96
- B. Christ, C. Schmidt, R. Huang, J. Wilting & B. Brand-Saberi (1998): *Segmentation of the*

- vertebrate body*. Anat Embryol (Berl) 197(1), 1-8
- B. Ciruna & J. Rossant (2001): *FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak*. Dev. Cell 1(1), 37-49
- B. G. Ciruna, L. Schwartz, K. Harpal, T. P. Yamaguchi & J. Rossant (1997): *Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (Fgfr1) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak*. Development 124(14), 2829-41
- J. Collignon, I. Varlet & E. J. Robertson (1996): *Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning*. Nature 381(6578), 155-158
- F. L. Conlon, K. M. Lyons, N. Takaesu, K. S. Barth, A. Kispert, B. Herrmann & E. J. Robertson (1994): *A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse*. Development 120(7), 1919-1928
- E. Coucouvanis & G. R. Martin (1995): *Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo*. Cell 83(2), 279-287
- E. Coucouvanis & G. R. Martin (1999): *BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo*. Development 126(3), 535-546
- E. A. Craig, M. V. Stevens, R. R. Vaillancourt & T. D. Camenisch (2008): *MAP3Ks as central regulators of cell fate during development*. Dev. Dyn. 237(11), 3102-3114
- P. H. Crossley & G. R. Martin (1995): *The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo*. Development 121(2), 439-51
- C. X. Deng, A. Wynshaw-Boris, M. M. Shen, C. Daugherty, D. M. Ornitz & P. Leder (1994): *Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization*. Genes Dev. 8(24), 3045-3057
- T. C. Doetschman, H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt & R. Kemler (1985): *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. J Embryol Exp Morphol 87, 27-45
- M. Donnison, A. Beaton, H. W. Davey, R. Broadhurst, P. L'Huillier & P. L. Pfeffer (2005): *Loss of the extraembryonic ectoderm in Elf5 mutants leads to defects in embryonic patterning*. Development 132(10), 2299-2308
- M. K. Dush & G. R. Martin (1992): *Analysis of mouse Evx genes: Evx-1 displays graded expression in the primitive streak*. Dev. Biol. 151(1), 273-287
- G. S. Eakin & A.-K. Hadjantonakis (2006): *Production of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos*. Nat Protoc 1(3), 1145-1153
- J. Egea, C. Erlacher, E. Montanez, I. Burtscher, S. Yamagishi, M. Hess, F. Hampel, R. Sanchez, M. T. Rodriguez-Manzaneque, M. R. Bösl, R. Fässler, H. Lickert & R. Klein (2008): *Genetic ablation of FLRT3 reveals a novel morphogenetic function for the anterior visceral endoderm in suppressing mesoderm differentiation*. Genes Dev. 22(23), 3349-3362
- M. Ema, S. Takahashi & J. Rossant (2006): *Deletion of the selection cassette, but not cis-*

*acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors. Blood 107(1), 111-7*

- N. Eto, M. Miyagishi, R. Inagi, T. Fujita & M. Nangaku (2009): *Mitogen-activated protein 3 kinase 6 mediates angiogenic and tumorigenic effects via vascular endothelial growth factor expression. Am. J. Pathol. 174(4), 1553-1563*
- E. A. Evans & D. A. Calderwood (2007): *Forces and bond dynamics in cell adhesion. Science (80- ) 316(5828), 1148-1153*
- M. J. Evans & M. H. Kaufman (1981): *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292(5819), 154-6*
- P. Fedi, A. Bafico, A. N. Soria, W. H. Burgess, T. Miki, D. P. Bottaro, M. H. Kraus & S. A. Aaronson (1999): *Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. J. Biol. Chem. 274(27), 19465-19472*
- B. Feldman, M. A. Gates, E. S. Egan, S. T. Dougan, G. Rennebeck, H. I. Sirotkin, A. F. Schier & W. S. Talbot (1998): *Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. Nature 395(6698), 181-185*
- B. Feldman, W. Poueymirou, V. E. Papaioannou, T. M. DeChiara & M. Goldfarb (1995): *Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. Science (80- ) 267(5195), 246-9*
- K. Fellenberg, N. C. Hauser, B. Brors, A. Neutzner, J. D. Hoheisel & M. Vingron (2001): *Correspondence analysis applied to microarray data. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(19), 10781-10786*
- P. Gadue, T. L. Huber, P. J. Paddison & G. M. Keller (2006): *Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103(45), 16806-11*
- R. L. Gardner (1985): *Clonal analysis of early mammalian development. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 312(1153), 163-178*
- S. H. L. George, M. Gertsenstein, K. Vintersten, E. Korets-Smith, J. Murphy, M. E. Stevens, J. J. Haigh & A. Nagy (2007): *Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104(11), 4455-4460*
- A. Glinka, W. Wu, H. Delius, A. P. Monaghan, C. Blumenstock & C. Niehrs (1998): *Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. Nature 391(6665), 357-362*
- M. Goldfarb (1996): *Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. Cytokine & Growth Factor Reviews 7(4), 311-25*
- M. Goldfarb, B. Bates, B. Drucker, J. Hardin & O. Haub (1991): *Expression and possible functions of the FGF-5 gene. Ann. N. Y. Acad. Sci. 638, 38-52*
- D. C. Goldman, G. R. Martin & P. P. Tam (2000): *Fate and function of the ventral ectodermal ridge during mouse tail development. Development 127(10), 2113-23*
- V. Gouon-Evans, L. Boussemart, P. Gadue, D. Nierhoff, C. I. Koehler, A. Kubo, D. A. Shafritz

- & G. Keller (2006): *BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm*. Nat. Biotechnol. 24(11), 1402-1411
- C. M. Griffith, M. J. Wiley & E. J. Sanders (1992): *The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue*. Anat. Embryol. 185(2), 101-13
- T. Grigoryan, P. Wend, A. Klaus & W. Birchmeier (2008): *Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice*. Genes Dev. 22(17), 2308-2341
- T. Hamazaki, M. Oka, S. Yamanaka & N. Terada (2004): *Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation*. J. Cell. Sci. 117(Pt 23), 5681-5686
- E. D. Hay (2005): *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. Dev. Dyn. 233(3), 706-20
- J. M. Hebert, M. Boyle & G. R. Martin (1991): *mRNA localization studies suggest that murine FGF-5 plays a role in gastrulation*. Development 112(2), 407-15
- M. C. Hofmann & J. L. Millán (1993): *Developmental expression of alkaline phosphatase genes; reexpression in germ cell tumours and in vitro immortalized germ cells*. Eur. Urol. 23(1), 38-44; discussion 45
- B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini & E. Lacy (1994): *Manipulating the Mouse Embryo*. 2 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- B. A. Hosler, G. J. LaRosa, J. F. Grippo & L. J. Gudas (1989): *Expression of REX-1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells*. Mol. Cell. Biol. 9(12), 5623-5629
- W. Huber, A. von Heydebreck, H. Suettmann, A. Poustka & M. Vingron (2003): *Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data*. Stat Appl Genet Mol Biol 2, Article3
- K. E. Inman & K. M. Downs (2006): *Localization of Brachyury (T) in embryonic and extraembryonic tissues during mouse gastrulation*. Gene Expr. Patterns 6(8), 783-93
- B. W. Jackson, C. Grund, S. Winter, W. W. Franke & K. Illmensee (1981): *Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. II. Epithelial differentiation and intermediate-sized filaments in early postimplantation embryos*. Differentiation 20(3), 203-216
- C. M. Jones, M. R. Kuehn, B. L. Hogan, J. C. Smith & C. V. Wright (1995): *Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation*. Development 121(11), 3651-3662
- C. M. Jones, K. M. Lyons & B. L. Hogan (1991): *Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse*. Development 111(2), 531-542
- G. Keller (2005): *Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine*. Genes Dev. 19(10), 1129-55
- G. M. Keller (1995): *In vitro differentiation of embryonic stem cells*. Curr. Opin. Cell Biol. 7(6),

- O. G. Kelly, K. I. Pinson & W. C. Skarnes (2004): *The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice*. *Development* 131(12), 2803-2815
- C. Kimura, K. Yoshinaga, E. Tian, M. Suzuki, S. Aizawa & I. Matsuo (2000): *Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals*. *Dev. Biol.* 225(2), 304-21
- C. Kimura-Yoshida, H. Nakano, D. Okamura, K. Nakao, S. Yonemura, J. A. Belo, S. Aizawa, Y. Matsui & I. Matsuo (2005): *Canonical Wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm*. *Dev. Cell* 9(5), 639-650
- S. J. Kinder, D. A. Loebel & P. P. Tam (2001a): *Allocation and early differentiation of cardiovascular progenitors in the mouse embryo*. *Trends Cardiovasc. Med.* 11(5), 177-184
- S. J. Kinder, S. S. Tan & P. P. Tam (2000): *Cell grafting and fate mapping of the early-somite-stage mouse embryo*. *Methods Mol. Biol.* 135, 425-437
- S. J. Kinder, T. E. Tsang, S. L. Ang, R. R. Behringer & P. P. Tam (2001b): *Defects of the body plan of mutant embryos lacking Lim1, Otx2 or Hnf3beta activity*. *Int. J. Dev. Biol.* 45(1), 347-355
- S. J. Kinder, T. E. Tsang, G. A. Quinlan, A. K. Hadjantonakis, A. Nagy & P. P. Tam (1999): *The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo*. *Development* 126(21), 4691-701
- S. Kitajima, A. Takagi, T. Inoue & Y. Saga (2000): *MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm*. *Development* 127(15), 3215-3226
- K. Kodaira, M. Imada, M. Goto, A. Tomoyasu, T. Fukuda, R. Kamijo, T. Suda, K. Higashio & T. Katagiri (2006): *Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345(3), 1224-1231
- A. Kubo, K. Shinozaki, J. M. Shannon, V. Kouskoff, M. Kennedy, S. Woo, H. J. Fehling & G. Keller (2004): *Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture*. *Development* 131(7), 1651-62
- K. A. Lawson (1999): *Fate mapping the mouse embryo*. *Int. J. Dev. Biol.* 43(7), 773-775
- K. A. Lawson & W. J. Hage (1994): *Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse*. *Ciba Found. Symp.* 182, 68-84; discussion 84-91
- K. A. Lawson, J. J. Meneses & R. A. Pedersen (1991): *Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo*. *Development* 113(3), 891-911
- K. A. Lawson & R. A. Pedersen (1992): *Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse*. *Ciba Found. Symp.* 165, 3-21; discussion 21-6
- P. Liu, N. A. Jenkins & N. G. Copeland (2003): *A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations*. *Genome Res.* 13(3), 476-484

- P. Liu, M. Wakamiya, M. J. Shea, U. Albrecht, R. R. Behringer & A. Bradley (1999): *Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation*. Nat. Genet. 22(4), 361-5
- M. V. Lorenzi, J. E. Long, T. Miki & S. A. Aaronson (1995): *Expression cloning, developmental expression and chromosomal localization of fibroblast growth factor-8*. Oncogene 10(10), 2051-2055
- L. A. Lowe, S. Yamada & M. R. Kuehn (2001): *Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo*. Development 128(10), 1831-1843
- A. Manaia, V. Lemarchandel, M. Klaine, I. Max-Audit, P. Romeo, F. Dieterlen-Lièvre & I. Godin (2000): *Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites*. Development 127(3), 643-653
- B. Mao, W. Wu, Y. Li, D. Hoppe, P. Stannek, A. Glinka & C. Niehrs (2001): *LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins*. Nature 411(6835), 321-325
- G. R. Martin (1981): *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78(12), 7634-7638
- D. Mesnard, M. Guzman-Ayala & D. B. Constam (2006): *Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning*. Development 133(13), 2497-2505
- Y. Mishina, A. Suzuki, N. Ueno & R. R. Behringer (1995): *Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis*. Genes Dev. 9(24), 3027-3037
- N. Mitiku & J. C. Baker (2007): *Genomic analysis of gastrulation and organogenesis in the mouse*. Dev. Cell 13(6), 897-907
- K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda & S. Yamanaka (2003): *The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells*. Cell 113(5), 631-42
- S. Miura, S. Davis, J. Klingensmith & Y. Mishina (2006): *BMP signaling in the epiblast is required for proper recruitment of the prospective paraxial mesoderm and development of the somites*. Development 133(19), 3767-3775
- C. E. Murry & G. Keller (2008): *Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development*. Cell 132(4), 661-680
- T. Nagai, K. Ibata, E. S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba & A. Miyawaki (2002): *A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications*. Nat. Biotechnol. 20(1), 87-90
- A. Nagy, J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly & J. C. Roder (1993): *Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(18), 8424-8428
- A. T. Naito, I. Shiojima, H. Akazawa, K. Hidaka, T. Morisaki, A. Kikuchi & I. Komuro (2006): *Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103(52), 19812-

- L. M. Neidhardt, A. Kispert & B. G. Herrmann (1997): *A mouse gene of the paired-related homeobox class expressed in the caudal somite compartment and in the developing vertebral column, kidney and nervous system*. *Dev. Genes Evol.* 207(5), 330-339
- J. Nichols, B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler & A. Smith (1998): *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. *Cell* 95(3), 379-391
- M. A. Nieto, M. F. Bennett, M. G. Sargent & D. G. Wilkinson (1992): *Cloning and developmental expression of Sna, a murine homologue of the Drosophila snail gene*. *Development* 116(1), 227-37
- S. I. Nishikawa, S. Nishikawa, M. Hirashima, N. Matsuyoshi & H. Kodama (1998): *Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages*. *Development* 125(9), 1747-57
- N. Nishioka, S. Yamamoto, H. Kiyonari, H. Sato, A. Sawada, M. Ota, K. Nakao & H. Sasaki (2008): *Tead4 is required for specification of trophoblast in pre-implantation mouse embryos*. *Mech. Dev.* 125(3-4), 270-283
- H. Niwa, J. Miyazaki & A. G. Smith (2000): *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells*. *Nat. Genet.* 24(4), 372-376
- H. Niwa, Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi & J. Rossant (2005): *Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation*. *Cell* 123(5), 917-29
- M. C. Nostro, X. Cheng, G. M. Keller & P. Gadue (2008): *Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood*. *Cell Stem Cell* 2(1), 60-71
- Y. Ono, N. Fukuhara & O. Yoshie (1998): *TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3*. *Mol. Cell. Biol.* 18(12), 6939-6950
- E. Ortner & K. Moelling (2007): *Heteromeric complex formation of ASK2 and ASK1 regulates stress-induced signaling*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362(2), 454-459
- M. Parameswaran & P. P. Tam (1995): *Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation*. *Dev. Genet.* 17(1), 16-28
- C. Park, I. Afrikanova, Y. S. Chung, W. J. Zhang, E. Arentson, G. Hua Fong Gh, A. Rosendahl & K. Choi (2004): *A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells*. *Development* 131(11), 2749-2762
- C. Park, K. Lavine, Y. Mishina, C.-X. Deng, D. M. Ornitz & K. Choi (2006): *Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation*. *Development* 133(17), 3473-3484

- J. J. Pearce & M. J. Evans (1999): *Mml, a mouse Mix-like gene expressed in the primitive streak*. Mech. Dev. 87(1-2), 189-192
- A. Perea-Gomez, K. A. Lawson, M. Rhinn, L. Zakin, P. Brûlet, S. Mazan & S. L. Ang (2001): *Otx2 is required for visceral endoderm movement and for the restriction of posterior signals in the epiblast of the mouse embryo*. Development 128(5), 753-765
- A. Petryk, O. Shimmi, X. Jia, A. E. Carlson, L. Tervonen, M. P. Jarcho, M. B. O'connor & R. Gopalakrishnan (2005): *Twisted gastrulation and chordin inhibit differentiation and mineralization in MC3T3-E1 osteoblast-like cells*. Bone 36(4), 617-626
- S. Pfister, K. A. Steiner & P. P. Tam (2007): *Gene expression pattern and progression of embryogenesis in the immediate post-implantation period of mouse development*. Gene Expr. Patterns 7(5), 558-73
- B. S. Reid, T. D. Sargent & T. Williams (2010): *Generation and characterization of a novel neural crest marker allele, Inka1-LacZ, reveals a role for Inka1 in mouse neural tube closure*. Dev. Dyn. 239(4), 1188-1196
- M. Rhinn, A. Dierich, W. Shawlot, R. R. Behringer, M. L. Meur & S. L. Ang (1998): *Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification*. Development 125(5), 845-856
- L. Richardson, M.-E. Torres-Padilla & M. Zernicka-Goetz (2006): *Regionalised signalling within the extraembryonic ectoderm regulates anterior visceral endoderm positioning in the mouse embryo*. Mech. Dev. 123(4), 288-296
- J. A. Rivera-Perez & T. Magnuson (2005): *Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3*. Dev. Biol. 288(2), 363-71
- L. Robb, L. Hartley, C. G. Begley, T. C. Brodnicki, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins & A. G. Elefanty (2000): *Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of murine and human homologues of a Xenopus mix gene*. Dev. Dyn. 219(4), 497-504
- L. Robb & P. P. Tam (2004): *Gastrula organiser and embryonic patterning in the mouse*. Semin. Cell Dev. Biol. 15(5), 543-54
- S. M. Robertson, M. Kennedy, J. M. Shannon & G. Keller (2000): *A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1*. Development 127(11), 2447-2459
- T. A. Rodriguez, S. Srinivas, M. P. Clements, J. C. Smith & R. S. P. Beddington (2005): *Induction and migration of the anterior visceral endoderm is regulated by the extra-embryonic ectoderm*. Development 132(11), 2513-2520
- M. B. Rogers, B. A. Hosler & L. J. Gudas (1991): *Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes*. Development 113(3), 815-824
- M. H. Rosner, M. A. Vigano, K. Ozato, P. M. Timmons, F. Poirier, P. W. Rigby & L. M. Staudt (1990): *A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo*. Nature 345(6277), 686-92

- J. Rossant, C. Chazaud & Y. Yamanaka (2003): *Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358(1436), 1341-8; discussion 1349
- J. Rossant & P. P. Tam (2004): *Emerging asymmetry and embryonic patterning in early mouse development*. Dev. Cell 7(2), 155-64
- J. Rossant & P. P. Tam (2009): *Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse*. Development 136(5), 701-13
- A. P. Russ, S. Wattler, W. H. Colledge, S. A. Aparicio, M. B. Carlton, J. J. Pearce, S. C. Barton, M. A. Surani, K. Ryan, M. C. Nehls, V. Wilson & M. J. Evans (2000): *Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation*. Nature 404(6773), 95-99
- M. Sakaki-Yumoto, C. Kobayashi, A. Sato, S. Fujimura, Y. Matsumoto, M. Takasato, T. Kodama, H. Aburatani, M. Asashima, N. Yoshida & R. Nishinakamura (2006): *The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development*. Development 133(15), 3005-3013
- J. Sambrook, T. Maniatis & E. Fritsch (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. J. Sambrook & E. Fritsch (Ed.), 2 NY Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- H. Sasaki & B. L. Hogan (1993): *Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo*. Development 118(1), 47-59
- B. Sauer (1994): *Site-specific recombination: developments and applications*. Curr. Opin. Biotechnol. 5(5), 521-527
- J. Schaft, R. Ashery-Padan, F. van der Hoeven, P. Gruss & A. F. Stewart (2001): *Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes*. Genesis 31(1), 6-10
- A. F. Schier (2003): *Nodal signaling in vertebrate development*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19, 589-621
- A. F. Schier & M. M. Shen (2000): *Nodal signalling in vertebrate development*. Nature 403(6768), 385-9
- M. V. Semenov, K. Tamai, B. K. Brott, M. Kühl, S. Sokol & X. He (2001): *Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6*. Curr. Biol. 11(12), 951-961
- N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer & R. Y. Tsien (2004): *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein*. Nat. Biotechnol. 22(12), 1567-72
- W. Shawlot & R. R. Behringer (1995): *Requirement for Lim1 in head-organizer function*. Nature 374(6521), 425-430
- W. Shawlot, J. M. Deng & R. R. Behringer (1998): *Expression of the mouse cerberus-related gene, Cerr1, suggests a role in anterior neural induction and somitogenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95(11), 6198-6203

- D. Shook & R. Keller (2003): *Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development*. Mech. Dev. 120(11), 1351-83
- L. Silver & J. Palis (1997): *Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis*. Blood 89(4), 1154-1164
- A. G. Smith (2001): *Embryo-derived stem cells: of mice and men*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17, 435-62
- A. G. Smith, J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl & D. Rogers (1988): *Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides*. Nature 336(6200), 688-90
- C. M. Smith, J. H. Finger, T. F. Hayamizu, I. J. McCright, J. T. Eppig, J. A. Kadin, J. E. Richardson & M. Ringwald (2007): *The mouse Gene Expression Database (GXD): 2007 update*. Nucleic Acids Res. 35(Database issue), D618-D623
- M. L. Soares, S. Haraguchi, M.-E. Torres-Padilla, T. Kalmar, L. Carpenter, G. Bell, A. Morrison, C. J. A. Ring, N. J. Clarke, D. M. Glover & M. Zernicka-Goetz (2005): *Functional studies of signaling pathways in peri-implantation development of the mouse embryo by RNAi*. BMC Dev. Biol. 5, 28
- D. Solter & B. B. Knowles (1978): *Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75(11), 5565-5569
- H. Spemann & H. Mangold (1924): *Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren*. Dev. Genes Evol. 100, 599-638
- D. Strumpf, C.-A. Mao, Y. Yamanaka, A. Ralston, K. Chawengsaksophak, F. Beck & J. Rossant (2005): *Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst*. Development 132(9), 2093-2102
- X. Sun, E. N. Meyers, M. Lewandoski & G. R. Martin (1999): *Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo*. Genes Dev. 13(14), 1834-46
- A. Suzuki, A. Raya, Y. Kawakami, M. Morita, T. Matsui, K. Nakashima, F. H. Gage, C. Rodriguez-Esteban & J. C. Izpisua Belmonte (2006): *Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103(27), 10294-9
- S. Tada, T. Era, C. Furusawa, H. Sakurai, S. Nishikawa, M. Kinoshita, K. Nakao, T. Chiba & S. Nishikawa (2005): *Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture*. Development 132(19), 4363-74
- S. Takada, K. L. Stark, M. J. Shea, G. Vassileva, J. A. McMahon & A. P. McMahon (1994): *Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo*. Genes Dev. 8(2), 174-89
- N. Takakura, H. Yoshida, Y. Ogura, H. Kataoka, S. Nishikawa & S. Nishikawa (1997): *PDGFR alpha expression during mouse embryogenesis: immunolocalization analyzed by whole-mount immunohistostaining using the monoclonal anti-mouse PDGFR alpha*

*antibody APA5*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 45(6), 883-93

- K. Takeda, R. Shimozono, T. Noguchi, T. Umeda, Y. Morimoto, I. Naguro, K. Tobiume, M. Saitoh, A. Matsuzawa & H. Ichijo (2007): *Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 2 functions as a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in a heteromeric complex with ASK1*. J. Biol. Chem. 282(10), 7522-7531
- P. P. Tam & R. S. Beddington (1992): *Establishment and organization of germ layers in the gastrulating mouse embryo*. Ciba Found. Symp. 165, 27-41; discussion 42-9
- P. P. Tam & R. R. Behringer (1997a): *Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan*. Mech. Dev. 68(1-2), 3-25
- P. P. Tam & D. A. Loebel (2007): *Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation*. Nature Reviews Genetics 8(5), 368-81
- P. P. Tam & S. Meier (1982): *The establishment of a somitomeric pattern in the mesoderm of the gastrulating mouse embryo*. American Journal of Anatomy 164(3), 209-25
- P. P. Tam, K. A. Steiner, S. X. Zhou & G. A. Quinlan (1997b): *Lineage and functional analyses of the mouse organizer*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 62, 135-44
- Tam, P. P. L. & Gad, J. M. (2004). *Gastrulation in the mouse embryo*. In: Stern, C. D. (Ed.), *Gastrulation. From Cells to Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- O. J. Tamplin, D. Kinzel, B. J. Cox, C. E. Bell, J. Rossant & H. Lickert (2008): *Microarray analysis of Foxa2 mutant mouse embryos reveals novel gene expression and inductive roles for the gastrula organizer and its derivatives*. BMC Genomics 9, 511
- K. Theiler (1972): *The House Mouse. Atlas of Embryonic Development*. Nachdruck 1989 Springer Verlag, New York
- J. P. Thiery, H. Acloque, R. Y. J. Huang & M. A. Nieto (2009): *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell 139(5), 871-890
- B. Thisse & C. Thisse (2005): *Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development*. Dev. Biol. 287(2), 390-402
- A. Vonica & B. M. Gumbiner (2002): *Zygotic Wnt activity is required for Brachyury expression in the early Xenopus laevis embryo*. Dev. Biol. 250(1), 112-127
- I. A. Wadman, H. Osada, G. G. Grütz, A. D. Agulnick, H. Westphal, A. Forster & T. H. Rabbitts (1997): *The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins*. EMBO J. 16(11), 3145-3157
- A. J. Warren, W. H. Colledge, M. B. Carlton, M. J. Evans, A. J. Smith & T. H. Rabbitts (1994): *The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development*. Cell 78(1), 45-57
- S. Wasiak & D. Lohnes (1999): *Retinoic acid affects left-right patterning*. Dev. Biol. 215(2), 332-342
- D. G. Wilkinson, S. Bhatt & B. G. Herrmann (1990): *Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation*. Nature 343(6259), 657-9

- A. F. Williams & A. N. Barclay (1988): *The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition*. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 381-405
- V. Wilson, P. Rashbass & R. S. Beddington (1993): *Chimeric analysis of T (Brachyury) gene function*. *Development* 117(4), 1321-1331
- G. Winnier, M. Blessing, P. A. Labosky & B. L. Hogan (1995): *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*. *Genes Dev.* 9(17), 2105-2116
- G. E. Winnier, L. Hargett & B. L. Hogan (1997): *The winged helix transcription factor MFH1 is required for proliferation and patterning of paraxial mesoderm in the mouse embryo*. *Genes Dev.* 11(7), 926-940
- L. Wittler, E. H. Shin, P. Grote, A. Kispert, A. Beckers, A. Gossler, M. Werber & B. G. Herrmann (2007): *Expression of Msn1 in the presomitic mesoderm is controlled by synergism of WNT signalling and Tbx6*. *EMBO Rep.* 8(8), 784-9
- R. Yagi, M. J. Kohn, I. Karavanova, K. J. Kaneko, D. Vullhorst, M. L. DePamphilis & A. Buonanno (2007): *Transcription factor TEAD4 specifies the trophoctoderm lineage at the beginning of mammalian development*. *Development* 134(21), 3827-3836
- T. P. Yamaguchi, K. Harpal, M. Henkemeyer & J. Rossant (1994): *fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation*. *Genes Dev.* 8(24), 3032-44
- M. Yamamoto, Y. Saijoh, A. Perea-Gomez, W. Shawlot, R. R. Behringer, S.-L. Ang, H. Hamada & C. Meno (2004): *Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo*. *Nature* 428(6981), 387-392
- K. O. Yanagisawa, H. Fujimoto & H. Urushihara (1981): *Effects of the brachyury (T) mutation on morphogenetic movement in the mouse embryo*. *Dev. Biol.* 87(2), 242-248
- M. Yasunaga, S. Tada, S. Torikai-Nishikawa, Y. Nakano, M. Okada, L. M. Jakt, S. Nishikawa, T. Chiba, T. Era & S.-I. Nishikawa (2005): *Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells*. *Nat. Biotechnol.* 23(12), 1542-1550
- Q. L. Ying, J. Nichols, I. Chambers & A. Smith (2003b): *BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3*. *Cell* 115(3), 281-92
- Q. L. Ying, M. Stavridis, D. Griffiths, M. Li & A. Smith (2003a): *Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture*. *Nat. Biotechnol.* 21(2), 183-6
- J. K. Yoon, R. T. Moon & B. Wold (2000a): *The bHLH class protein pMesogenin1 can specify paraxial mesoderm phenotypes*. *Dev. Biol.* 222(2), 376-91
- J. K. Yoon & B. Wold (2000b): *The bHLH regulator pMesogenin1 is required for maturation and segmentation of paraxial mesoderm*. *Genes Dev.* 14(24), 3204-14
- Y. Yoshikawa, T. Fujimori, A. P. McMahon & S. Takada (1997): *Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in*

*the mouse. Dev. Biol. 183(2), 234-242*

- X. Zhou, H. Sasaki, L. Lowe, B. L. Hogan & M. R. Kuehn (1993): *Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. Nature 361(6412), 543-547*
- L. B. Zimmerman, J. M. D. Jesús-Escobar & R. M. Harland (1996): *The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. Cell 86(4), 599-606*
- I. E. Zohn, Y. Li, E. Y. Skolnik, K. V. Anderson, J. Han & L. Niswander (2006): *p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation. Cell 125(5), 957-69*

# Anhang

## Listen der differenziell exprimierten Gene

In jeder Liste sind die Gene angegeben, die in der betreffenden Population als hochreguliert eingestuft wurden. Der Listentitel bezeichnet den Ansatz, den Messzeitpunkt und das aktivierte Reportergen der Zellpopulation und ob die aufgelisteten Gene als aktiviert oder deaktiviert eingeordnet wurden. In den Spalten sind die log2-Werte der Expression in allen Ansätzen angegeben. Werte mit einer Detektion <0,99 sind nicht angegeben (N/A).

### Abkürzungen:

T, Msgn1: Symbol des exprimierten Reportergens

WN: WNT3a und Noggin

BD: BMP4 und DKK1

nf: nicht fluoreszierende Zellen

Std: Stunden (Messzeitpunkt)

### WNT3a/Noggin, 72Std, T, aktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD	Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
1110012L19RIK	8.9	8.6	10.38	7.9	9.2	9.4	9.3	9.7	9.6	9.5	9.8	CAR14	7.3	7.7	8.6	10.5	10.2	9.7	8.9	10.9	9.9	10.5	10.7
1700007G11RIK	6.8	6.1	8.5	7.1	8.4	6.3	6.6	7.7	N/A	N/A	N/A	CASP6	8.3	8.2	9.7	9	9.9	10.2	8.8	9.7	9.6	9.6	10
1700009P17RIK	6.1	6.7	8.4	7.3	10	7.7	6.7	6.7	6.5	7.2	7.1	CASP7	7.5	7.5	8.8	7.5	8.4	8.5	7.7	8.3	7.4	7.4	8
1700027N10RIK	N/A	6.2	7.5	7.1	9	7.2	N/A	N/A	6	6.2	6.5	CASP8	6.8	6.4	7.7	7.3	8.2	7.6	7	7.2	7.8	7.1	6.9
1700088E04RIK	6.7	6.7	9.5	8.3	10.7	8.4	6.3	7.4	7.3	7.2	7.8	CCNO	9.5	8.3	10.9	8.1	9.3	8.5	7.7	9.3	6	7.2	7.7
2310007A19RIK	6	6.8	7.8	7.6	8.9	6.5	6.8	6.4	6.6	6.9	6.9	CDKN1C	5	5.1	8.4	7	8.5	6.7	4.9	5.9	4.8	N/A	4.8
2310010M24RIK	6.6	N/A	8	7.2	8.7	7	6.4	6.1	6	6.1	N/A	CDX1	6.4	N/A	7.3	6.7	7.1	7.1	5.7	7	5.6	N/A	5.7
2310016C16RIK	9	8.5	10	9.3	10.7	10.8	9.4	9.3	10.2	9.9	10.1	CDX2	7.7	6.7	10.9	9.1	11.6	10	7.4	9.4	11.9	11.8	12.4
5133401N09RIK	9.1	8.9	10.8	9.3	10.1	9.6	9.1	10.2	9.1	9.5	9.7	CHRD	6.9	6.6	10.8	9.8	12.2	11	6.4	6.7	6.2	6.5	7.2
6030429G01RIK	6.4	7.2	8.4	7.1	8.6	8	6.5	7.5	5.9	6.5	7.4	CHST1	8	8.2	9.4	10.2	9.2	9.1	8.1	8.4	7.4	7.4	8
6230427J02RIK	N/A	6	7	6.7	8.3	9.7	N/A	8.5	7.6	8.1	9	CHST7	7.4	N/A	9.2	7.5	9.4	11.1	6.9	10.9	7.2	8.7	10.5
6330403K07RIK	7.8	7.8	9	9.2	10.4	10.4	8.3	9.4	10.1	10.2	10.8	CITED2	7	7	8.1	7.2	8.2	8.9	7.1	7.6	8.4	8.4	8.3
8430415E04RIK	8.5	6.5	9.6	6.2	6.8	6.7	8.8	8.9	5.6	5.9	6	CMTM6	10.1	10.4	11.3	10.2	10.4	10	10.1	11.2	10.5	10.6	10.8
ADAMTS15	6.2	N/A	7.4	7	8.2	8.4	6.2	6.5	6.4	N/A	6.4	CMTM8	8.3	8.2	9.2	9.5	10.3	7.8	8.8	7.2	8	7.7	7.3
ADRA2A	7	6.1	9.9	7.6	10.3	9.5	6.4	8.8	7	7.8	8.8	COL16A1	6.8	6	8.4	7.4	8.7	8.4	6.4	6.5	6.9	6.6	7.1
AMIGO2	7.1	6.5	8.2	7.5	8.5	8.2	6.8	7.7	8.3	8.1	8.4	CXCR4	6.4	6.1	7.4	7.8	8.7	9.2	N/A	10	9.8	9.5	9.5
APPL1	10.6	10.3	11.5	10.1	10.4	10.4	10.6	11.4	10.6	10.3	10.4	CXX1A	7.8	6.8	9	7.2	8	8.1	7.6	8	6.9	7.4	7.7
ARID3B	10.6	10.5	11.9	10.8	11.9	12	10.6	11.9	11.4	11.9	11.8	CXX1C	7.5	6.7	9.8	7.3	8.6	9.1	7.7	9.2	7.1	7.7	8.7
ATP10A	8	7.8	9	7.7	7.7	6.8	7.9	8	N/A	6.5	7.3	CYB5	8.8	8.2	10.3	8.4	9	9.1	8.6	9.8	7.9	7.9	8.4
ATP1B2	7.2	7	8.4	8	8.2	8.4	7.7	9	8.1	8.4	8.8	CYP7B1	7.7	7.4	8.9	7.5	8.2	9	7.6	8	6.4	6.7	7.9
BAHCC1	10.2	9.5	11.2	10.6	11.1	11.2	10.7	10.3	10.2	10.9	11.2	D0H4S114	10.7	10.8	11.9	12.1	12.9	13.1	10.6	10.8	11.1	10.9	10.9
BC023829	8.6	7.2	10.3	7.9	8.9	8.8	8.9	10.1	9.2	9.5	9.8	DBN1	6.8	6.9	8	8.1	8.6	8.7	7.3	7.5	8.3	8	8.1
BICC1	6.4	6	9.2	8.1	10.7	10	6.2	7.4	6.8	7.3	7.9	DGKK	7	N/A	10.1	7.8	9.7	8.7	6.6	9	6.6	7.3	7.6
BMP4	7.8	8.4	10.1	9.2	10.3	11	7.4	10.3	13.6	13.8	13.6	DNAJB13	N/A	6	7.7	7.2	9.7	6.9	N/A	N/A	N/A	N/A	6.1
C130034I18RIK	7	N/A	8.1	6.7	7.2	7.7	6.1	N/A	N/A	N/A	N/A	EFNB1	7.4	7.5	9.3	8.6	9.2	9.4	7.4	8.6	10.2	10.1	19.3
CALCA	8.3	8	9.7	9.4	10.7	8.2	8.5	6.6	6	N/A	N/A	EIF2AK2	8.2	7.9	9.4	8.4	9.1	8.9	8.3	8.7	8.9	8.6	8.6
CAPN6	6.2	6.1	7.2	9.9	10.5	9.5	N/A	8.1	12.2	12.1	11.3	EPOR	6.1	N/A	7.1	N/A	7	7.1	6.6	6.9	6.8	6.3	6.9
												EVX1	9.3	7.1	10.5	6.7	8.7	8.8	10.2	12.6	10.2	11	11.9
												FAH	11.5	11.3	12.5	10.8	11.1	11.4	11.4	12	10.7	10.3	10.9
												FGF5	10.4	8.9	11.7	10.2	10.2	9.4	10.5	10	N/A	N/A	6.4

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
FGF8	9.9	8.1	12.493	11.1	11.8	10.5	12.6	8.8	10.1	11.7	
FKBP14	6.9	6.2	8.1	7.1	9	8.3	6.7	8.1	7.7	7.5	7.9
FOXB1	6.4	N/A	7.4	6.2	6.9	7.4	5.8	5.9	5.6	N/A	N/A
FOXJ1	6.2	N/A	7.4	N/A	7.5	6.3	6	N/A	6.2	6	N/A
FST	9	6.9	10.475	8.2	9.3	8.7	10.3	N/A	6.3	7.5	
FUT10	7.3	7	8.3	7.6	8.3	8.6	7.7	9.1	8.7	9	9.2
FZD2	6.3	6.3	7.5	8.2	9.2	9.3	6.8	7	7.8	7.6	7.5
GALNT1	7.6	7.5	8.7	7.7	8.5	8.4	7.9	9	8.9	8.6	8.9
GATA6	7.9	8.2	9.6	9	9.1	9.5	6.5	11.9	11.6	12	11.6
GBA2	6.4	6.2	7.8	6.9	6.9	7.3	6.8	7	7.1	7	7
GBP3	6.1	N/A	8.6	6.3	7.9	8.5	N/A	7.3	6	6.2	7.7
GBX2	8.7	8.9	10.7	11.6	11.8	12.5	7.3	9.6	8.3	9.9	11.3
GM1673	7.3	7.1	8.5	8.6	10.297	7.1	7.8	8.3	8.7	8.7	
GOLM1	10.5	10.4	11.5	11.5	12.2	11.8	11	11.6	11.4	11.2	11.3
GREB1	7.5	6.8	8.6	8.7	10.2	10.8	7.8	10.59	10.1	10.5	
GSC	7.3	6.5	11.183	9.4	9.5	6.3	11.47	7.5	8.5		
GSTM5	8.2	7.8	9.2	8.1	9.8	10	8.3	8.4	8.3	8.1	9.2
H2-M3	7.2	6.4	8.6	6.5	7.7	7.3	7.4	8.1	6	6	7.3
HES1	9.4	9.2	10.794	10.498	10.111	10.1	10.4	10.4			
HOXB2	6.1	6.1	7.8	7.9	9.6	10.9	N/A	8.4	10.4	10.8	10.7
HRC	6.5	7.4	8.6	8	8.8	8.7	7.1	6.9	7.9	7.6	7.6
HTRA1	7.2	7.5	8.4	7.6	9.4	9.7	6.8	7.6	8	7.8	8.7
ID1	6.7	6.4	8.2	9.1	9.6	9.3	10	11	10.8	11.1	11.7
IFI35	6.4	N/A	8	N/A	7.4	7.7	6.1	7.7	6.3	6	7
IGFBP3	8.2	7	10.576	8.8	8.1	8.9	9.2	6.7	6.7	7.1	
IGFBP4	7	7.1	8.3	9.3	10.9	12.574	11.3	12.2	12.1	12.3	
IGFBP5	6.6	6.8	8.8	12.3	13.6	12.268	N/A	8.1	7.6	6.4	
IGTP	7.5	7.6	10.781	10.398	7.6	9.4	7.4	7.6	9		
IIGP2	7.2	7.4	10.784	10.710	8.7	9.9	7.2	8	9.6		
IL13RA1	6.1	6.1	7.3	6.5	8.3	7.4	6.4	7.4	N/A	N/A	6.5
IL17RC	6	6.3	7.7	6.5	7.7	7.7	5.9	7	6.3	6.5	7.5
IRF1	10.297	11.793	10.298	9.8	10.892	9.4	10.1				
IRX3	6.6	6.9	8.7	10.511	10.974	8.3	10.3	10.2	10.1		
KLHL32	6.2	N/A	7.5	N/A	7.5	7.1	N/A	6.6	N/A	N/A	6.1
LAPTM4B	N/A	5.6	6.5	N/A	6.4	6.8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
LBH	7.1	7.2	9.9	9.2	10.6	10	7	8.6	8.1	8.6	8.7
LEFTY1	12.6	11.9	13.6	10.3	11.5	11.5	11.7	10.773	7.8	8.5	
LGALS3	9.5	9.3	10.598	10.5	10.489	9.8	9.9	9	9.8		
LHX1	N/A	6.2	9.9	7	9	9.1	N/A	12	7.3	8.6	8.8
LMO2	7.1	7.3	9.6	8.4	10	11.573	7.7	9	9.4	9.2	
LOC100038882	6.9	N/A	9.9	7.1	8.9	8.8	N/A	8.3	6.3	6.8	8.1
LOC100044190	8.2	8.2	9.9	8.4	9.1	9.1	8.3	9.4	8.2	8.2	8.8
LOC212390	7.3	6.8	9.3	6.9	9.1	8.7	6.5	7.8	6.5	6.8	7.9
LOC621823	7	6.6	8.8	7.5	8.6	8.5	7	8.8	7.3	7.4	8.1
LRIG1	7.8	8.2	10.195	11.4	11.474	8.9	7.3	7.7	8.4		
LRIG3	10.5	10.5	12	12.6	12.7	10.6	11.494	9.8	11		
MEIS2	8.1	8.2	10	10.3	11.6	12.679	11	11.5	11.8	11.9	
MGST1	6.4	N/A	7.4	N/A	7.5	N/A	6.8	6.1	5.9	N/A	N/A
MIXL1	6.4	N/A	9.2	N/A	6.7	7.5	6.3	11.363	6.8	8.2	
MMD	9.3	9.4	10.595	10.511	9.8	10.5	10.4	10.3	10.9		
MMP2	9.5	9.2	10.7	10.4	11.9	12.8	10.3	11	12.2	12.3	12.8
MOCS1	10	9.4	11.6	10.2	11.1	10.797	10.9	11.5	11.7	12.1	
MOGAT2	6.6	7	7.9	7.5	9	9.1	N/A	8.8	9.9	10.4	10.3
MOXD1	7.5	6.2	8.8	7.7	9.5	6.7	8	7	N/A	N/A	N/A
MYCL1	10.6	10.1	11.6	10.5	11	9.7	10.6	11.793	9.3	9.7	
NDRG1	7.3	7.3	9.1	8	7.5	6.6	6.8	7.2	9.2	8.6	7.2
NDRG3	7.8	7.2	9.7	7.4	8.6	8.7	7.6	9.2	7.6	7.7	8.6
NDRL	8	7.7	9.6	8.6	8.2	8	7.6	7.9	9.9	9.1	8.1
NEDD9	8	7.6	9.2	9.2	10.483	7.9	8.7	9.1	8.5	7.4	
NKX1-2	7.5	6.5	9.8	7.6	7.5	6.3	N/A	6.8	N/A	N/A	6.5
NMB	6.8	6.6	7.9	6.8	7.3	7.3	6.8	8.2	7.2	7.5	7.8
NME5	6.5	N/A	9.9	7.7	10.884	6.7	7.7	N/A	6.3	7.1	
NOG	6.1	N/A	7.7	7	9.3	7.6	6	N/A	6.9	6.9	6.9
NPY	6.4	N/A	8.1	N/A	6.1	N/A	6.5	7	N/A	N/A	N/A
NUDT9	9.6	9.4	10.697	10.7	10.996	10	10	10.1	10.1		
OASL2	6.2	N/A	8.7	N/A	7.7	8.1	N/A	7.5	N/A	N/A	7.3

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
OAT	12.2	11.9	13.4	12.2	12.4	12.3	11.7	12.7	12.4	12.5	12.7
OLIG1	11.8	10.9	13.1	10.4	10.184	12.2	12	7.6	7.9	7.9	
PACRG	6.1	6.3	8.5	7.6	9.8	7.7	6.5	6.8	6	6.9	7.5
PARP12	6.2	N/A	7.4	N/A	6.9	6.8	N/A	6.2	N/A	N/A	6.3
PARP14	6.1	N/A	9.3	7.2	8.3	8.3	6.4	8.3	6.4	7.3	8
PCDH21	6.4	6.6	7.7	6.7	6.4	6.3	N/A	6.1	N/A	N/A	N/A
PDLIM4	7.3	8.1	9.9	9.2	11	11.676	11.1	11.8	12.3	12.5	
PEG3	7.5	6.9	8.5	7	7.8	7.3	8	9	9.2	9.3	8.6
PGK1	6.1	N/A	8.1	N/A	7.7	6.9	6.6	7.5	6.1	6.2	6.2
PJA1	10.1	10.3	11.4	10.8	11.2	11.6	10.3	11.6	12.5	12.3	12
PLEKHA8	7.2	7	8.2	7.4	8.2	8.1	7.3	8.3	7.3	7.6	7.9
PLXNA2	6.1	6.2	9.1	8	9.6	10.767	10.798	9.9	10.5		
POU6F1	8.6	7.6	10.376	8.9	7.7	8.2	9.1	6.3	6.4	6.7	
PRICKLE1	10.595	12	11.2	12	11.7	10.5	11.3	10.8	10.7	11.2	
PSMB10	10.8	10.3	12.5	10.8	11.9	11.9	10.7	12	10.2	10.8	11.7
PSMB9	7.8	7.5	9.3	7.5	8.6	8.9	7.8	8.1	6.2	6.9	8.2
PSME1	11.4	11.6	12.8	11.8	12.5	12.5	11.5	12.2	11.9	12.1	12.5
PUNC	9.5	9	10.6	10.2	11	11.8	10.1	10.7	11.3	11.5	11
RAB38	6.5	6.1	7.9	7.4	9.5	7.3	5.9	6.6	6.1	5.9	5.8
RAB8B	9.9	9.5	11.2	10.4	11.4	11.8	10.2	11.4	10.9	11.1	11.3
RAMP2	8.2	8.1	9.5	10	11.4	11.182	8.2	8.6	9	8.7	
RAP2C	9.9	9.5	10.897	10.3	10.1	10.2	10.6	10.6	10.4	10.4	
RGS12	8.5	8.4	9.7	8.7	9.3	9.1	8.5	9.5	9.1	8.9	8.9
RGS16	7.2	6.7	8.4	7.5	7.7	7.8	7.1	7.1	N/A	N/A	6.1
RGS17	7.2	N/A	8.5	7	8.5	7.9	7.5	7.6	N/A	6.6	6.9
RSPO3	6.9	6.4	10.185	11.2	11.964	10.392	9.8	11.5			
SCARA3	6.5	6.3	8.6	8.5	11.3	11.272	6.7	7.4	8.4	10.2	
SCLY	9.3	9.4	10.792	9.5	9.2	9.5	10.487	8.7	9		
SH3PXD2B	6.9	6.3	8	8.5	9.4	9	6.8	7.9	8.1	8.6	8.7
SHISA2	7.2	7.5	8.5	9.1	10	9.6	7.7	6.4	7.3	7.5	8.4
SLC38A5	7	6.5	8.4	7.3	7.9	6.9	7.9	8.5	6.5	7.2	7.3
SLIT2	6.6	7.6	9.8	8.9	11.798	N/A	7.2	8.6	7.8	7.1	
SMO	8.3	7.6	9.5	9.1	10	9.7	8.9	9.7	9.6	9.7	9.7
SOX17	N/A	6.5	8.6	8.1	8.8	7.7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SPIN2	8.4	7.6	9.3	8.4	8.8	8.4	8.6	8	12.2	11.8	11
SPINK3	10.4	10.4	11.4	13.2	13.5	10.3	10.366	9.7	9	7.4	
SPSB4	7.5	7.2	8.6	8.8	9.9	9.7	7.6	7.6	8.3	8.6	8
ST3GAL6	7.7	8	8.9	8.3	9.2	8.7	8.2	8.9	9.7	9.9	9.8
STAT1	6.2	N/A	7.8	N/A	7.4	7.8	6	7.1	6.4	6.6	7
STK39	8.4	8.2	9.6	8.9	9.2	9.2	8.6	9.5	10	10	9.9
SULF1	9	8.1	9.9	9	10.5	10.587	9.3	8.4	8.8	9.5	
T	11.795	14.1	11	13.8	12.8	11.4	13.691	10.1	11.4		
TAP2	6.8	6.9	9.4	7	8.6	8.3	7.2	8.6	6.4	7.2	8.4
TAPBP	6.1	5.9	7.7	6.2	7.2	7.3	N/A	6.6	6.3	6.1	6.6
TCEA3	9.8	9.4	10.891	10	9.5	9.7	10	7.7	8	8.7	
TCEAL1	6.2	5.8	7.2	6.4	7.4	7.3	6.3	7.8	7.6	7.7	7.6
TEKT1	N/A	5.6	6.7	6.2	8.5	5.8	N/A	N/A	N/A	5.8	5.9
TGFB1	7.2	6.5	8.5	7	8	8.3	6.9	9.9	9.5	10	10.2
TMC7	9.1	8.9	10.699	10.7	11.199	10.8	10.2	10.7	10.9		
TMEM108	6.1	N/A	7.5	7.7	9.4	8.3	6.1	N/A	10	10	8.5
TMPRSS2	8.9	9.1	10.4	10.4	10.986	8.8	9.2	10.483	7.4		
TNFRSF1A	5.5	5.7	6.7	6.2	6.8	7.8	6.1	7.4	8	7.8	7.4
TOR3A	N/A	6	7.3	6.8	6.6	N/A	6.7	6.2	N/A	N/A	6.3
TRIM56	6.4	6.2	7.7	N/A	7.2	6.3	7	6.8	6.5	6.3	
TTYH1	7.4	N/A	8.9	7.6	8.1	7.5	7.3	N/A	N/A	N/A	7.2
TXNIP</											

## WNT3a/Noggin, 72Std, T, deaktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nt_72StdWN	T_72StdWN	nt_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nt_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD	Gensymbol	48Std_WN	nt_72StdWN	T_72StdWN	nt_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nt_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
1190002H23RIK	7.7	8.7	6.3	8.1	N/A	N/A	6.6	6.3	6	N/A	6.2	EPHX2	8.6	9.5	7	8	7.4	6.4	7.4	6.7	5.9	N/A	6.2
1190005I06RIK	8.5	8.8	6.5	7.7	6.2	6.2	8.3	N/A	6.1	N/A	6.2	ESCO2	10.3	10.7	9.4	9.5	8.8	9.2	10.3	9.9	9.3	9	9.6
1700012H05RIK	10.8	11.2	7.8	10.2	6.6	N/A	10	7.1	6.4	N/A	N/A	ESRRB	12.5	13.9	9.8	12.6	8.9	N/A	10.9	7.1	8.3	7.1	N/A
1700019D03RIK	11.2	11.1	19.9	10.3	8.1	N/A	11.3	8.1	7.1	6.4		FABP3	12.3	13.3	10.1	12	9.4	7.5	12.5	9.1	11.5	9.1	8.1
2410081M15RIK	8.4	8.8	7.5	8.5	7.2	6.1	7.6	6.5	6.2	5.8	5.9	FBXO15	10.5	11.7	8.5	10.6	7.5	6.4	8.9	7.2	6.6	5.9	6.2
2410116G06RIK	11.1	12	8.4	10.9	7.7	6.2	9.4	7.6	6.8	N/A	N/A	FLVCR2	8.3	8.8	6.4	8.2	7.3	6.7	8.1	6.3	8.2	6.7	N/A
2410146L05RIK	12.2	13.2	7.4	11.6	7.2	N/A	10.3	6.4	7.1	N/A	N/A	FOLR1	8.6	8.8	6	7.8	5.8	N/A	7.7	N/A	6.6	N/A	N/A
2610305D13RIK	10.4	10	8.4	9.1	7.5	7.4	10.1	8.6	7.9	7.6	7.7	GAB1	12.8	13.2	11.5	12.5	11.3	11.3	12.5	10.5	11.6	11	10.9
4632404H22RIK	9.4	10	8.4	9.1	8.2	8.4	9.7	8.7	9.8	9.3	9.1	GADD45A	10.4	10.5	8.9	10	8.9	8.9	9.9	8.1	8.2	8	8.4
AA467197	8.6	9.7	7.1	8.7	6.1	N/A	9	7.8	6.3	N/A	N/A	GADD45G	9.4	9.7	7	9.8	8.6	9.7	8.8	N/A	11.4	10.5	9.1
AARD	8	9.2	6.8	8.7	8.5	8.3	7.5	8.3	7.8	8.1	7.6	GDF3	11.2	11.3	8.6	10.2	6.5	N/A	10.3	6.5	N/A	N/A	N/A
ACTA2	8.8	8.8	6.2	8.4	7.9	8.5	7.6	5.5	9.4	7.5	7.4	GM129	9.3	9	7.3	8.7	7.3	6.9	8.7	7.7	7.4	7.5	7.9
ACTR3B	7.2	7.7	6.3	6.9	6	N/A	7.2	6.3	N/A	N/A	N/A	GPRC5A	8.9	8.8	7.6	8.6	7.6	6.3	8.5	N/A	9.1	6.6	N/A
ADAM23	9.1	9	6.3	8.3	6.3	6.5	8.3	6.6	N/A	N/A	6.6	GRAMD1B	7.3	7.8	6.2	7.2	6.2	6.4	7	N/A	6.3	N/A	N/A
AHNAK2	9	9.7	7.9	8.8	7.9	7.3	8.8	6.9	8.6	6.7	6.3	GRIT	8	8.3	6.9	7.5	6.8	6.5	7.9	7	7.1	7.1	6.8
AKAP12	13	13.2	11.6	12.1	10.7	10.1	12.9	11	12.6	11.9	11.2	GSTM2	11.3	12.3	9.9	11.3	10.3	9.7	10.7	9.1	9.8	8.9	9.3
AKP2	8.8	10.3	7.4	9.1	7.8	8.6	7.7	8.3	8.4	8.9	9.4	GSTP2	9.6	10.8	6.5	9.8	6.6	N/A	8.3	N/A	N/A	N/A	N/A
AKR1B8	7.5	7.6	6.4	7.9	6.6	6.9	6.8	6.2	8.1	7.4	7.1	GSTT2	9.5	10.2	8.3	8.9	7.9	7.5	9.6	7.8	7.5	7.7	7.4
ANGPTL4	8.6	8.8	6.9	8.3	6.4	N/A	8.2	7.5	6.4	6.2	6.6	GTSF1L	9.1	9.8	6.9	8.9	6.4	N/A	7.6	6.3	N/A	N/A	N/A
ANKRD12	8.1	8.3	6.8	N/A	N/A	7	8.1	N/A	7.3	7.5	7.4	HELB	N/A	10.2	9	N/A	8.8	N/A	N/A	N/A	N/A	9.1	9.2
ANKRD47	8.6	9.6	7.6	8.5	7.7	7.6	8.5	7.4	7.7	7.4	7.5	HYAL1	8	8.2	7	6.6	6.8	7.3	8.3	6.4	7.1	6.5	6.7
ANKRD56	9.1	9.5	8.2	8.9	8.3	6.9	9.6	6.7	9.7	9.2	9	IGF2	12.6	12.9	11.6	14.5	15.1	15.4	13.4	11.8	15.5	15.7	15.4
AOAH	9.1	9.4	6.6	8.6	6	N/A	8.2	6.2	N/A	N/A	N/A	INA	8.3	8.3	7.4	8	6.9	6.3	7.8	6.4	N/A	N/A	N/A
APOA2	9.4	9.6	8.3	8.8	7.8	7.2	8.6	7.1	6.4	N/A	N/A	IRAK2	7.4	8.1	6.2	7.3	6.6	6.2	7	N/A	6.8	6.2	5.7
APOBEC1	7.7	8.2	6.4	6.7	6.1	N/A	8	N/A	N/A	N/A	N/A	KIF5C	8.6	8.1	7.2	8.8	8.2	7.6	8.6	N/A	8.5	8.1	8
APOC1	9.9	10.6	8.9	9.9	8	7.3	9.5	8.1	8.3	7.5	7.6	KLF2	10.9	11.9	9.7	11.1	8.4	6.1	8.6	N/A	7.3	7.1	6.3
ARHGEF3	10.2	10	7.2	9.4	7.2	6.7	9.3	6.6	8.9	8.6	8.1	KLF9	11.4	11.7	9.8	10.5	8.6	8.4	11.3	10	9.4	8.4	8.3
ARHGEF4	8.7	9.2	7.6	8.2	7.1	6.8	9.3	8.3	8.1	8.1	8.1	KNDC1	10	11.1	7.8	10.1	8.6	6.3	9.6	6.5	7.7	6	N/A
ASAH3L	7.7	8.2	6.2	7.4	6.5	6.5	7.2	6.2	6.6	N/A	N/A	LAMA1	8.9	9.9	6.3	10.4	9	10.4	7.2	7.9	8.3	8.3	9
ATAD4	7.5	8.8	6.1	8.1	5.9	N/A	7.8	N/A	6.4	N/A	N/A	LAMB3	8.6	8.8	7.5	7.9	8.2	N/A	8.4	N/A	7.5	N/A	N/A
ATG9B	9.3	10	7.7	9.6	7.5	6.2	8.8	7.6	8.8	7.2	6.3	LAPTM5	10.7	11.9	9.6	10.5	7.9	6.8	9.7	N/A	8.6	6.8	6.6
ATP1B1	11.6	11.8	10.5	11.2	9.5	7.6	11.9	9.1	9.7	7.9	6.9	LIPH	7.6	8.3	6.7	7.4	6.4	N/A	6.6	N/A	5.9	N/A	N/A
AU018091	8	9	6.2	8.3	N/A	N/A	6.9	N/A	6.9	N/A	N/A	LTBP4	9.9	10	8.5	9.1	N/A	N/A	9.6	7.7	7.1	6.9	7.1
AXL	9	9.4	8	9	8.6	8.6	9.6	7.2	9.6	8.4	8.1	MANBA	10	11.1	7.9	9.9	8.3	7.7	8.8	6.8	7.6	6.6	6.9
BACH2	8.4	9	7.2	7.3	8	8.2	8	7.4	8.9	8.9	8.3	MBNL2	9.9	10	8.3	9.2	9.2	8.8	9.9	8.4	9.7	9.3	9.1
C2	8.2	9.8	6.6	8.5	6.9	N/A	8.7	6.2	8.2	6.4	N/A	MCAM	8.9	9.4	7.6	8.4	7.7	6.7	8.9	6.8	7.7	6.4	6.4
CAPN5	8.3	9.5	7.3	8.7	7.7	6.6	8.6	7.4	10.4	10.6	9.5	MEF2B	8.3	8.3	6.8	7.5	6.2	N/A	8.4	6.6	6.7	6.6	6.6
CBR3	10.7	10.4	9.3	9.8	8.9	9.7	10.2	9.5	7	7.2	8.3	MIB2	9.9	10.6	8.8	10.1	9.4	9.8	9.3	9.2	10.1	10.2	10.2
CBX7	10.5	10.7	9.3	9.9	8.2	7.2	10.2	7.8	8.2	7.9	7.6	MKRN1	9.4	9.3	8	8.6	7	6.1	8.9	6.5	6.5	6.6	6.6
CDS1	9.7	10.7	8.7	9.2	8	6.9	9.4	8.7	8.2	7.6	7.2	MOCOS	7.7	7.9	6.7	7.4	N/A	N/A	7.1	N/A	6	N/A	N/A
CHAC1	12.1	10.9	9.5	10.5	8.4	8.2	12	10.7	10.1	10.8	10.8	MREG	10.2	11.2	8.2	10	8.1	6.8	9.8	8	8	6.6	7
CHKA	9.3	N/A	8.3	8.1	N/A	N/A	9.3	N/A	8.5	N/A	N/A	MSR2	8.5	9	7.6	8.7	7.8	7.1	7.7	7.6	7.3	6.8	6.7
CHST8	8.1	9.1	6.2	8.2	7.4	8.4	7.3	N/A	7.6	7.5	6.7	MTSS1	7.7	8.3	6.5	7.4	6.6	6.4	7.7	N/A	6.8	6.8	6.6
CLN3	10.2	10.3	9.3	9.7	9.5	8.9	9.9	7.7	9.5	8.9	8.3	MVP	9.4	10	8.2	9.6	8.5	8.3	9.1	7.5	9.5	8.8	8.1
COBL	N/A	8.2	6.1	N/A	N/A	6.7	N/A	5.7	N/A	N/A	N/A	MYBL2	10.1	10.9	8.4	10	8.1	N/A	9.2	8.6	9.1	9.2	8.9
COL18A1	11.6	11.8	10.3	11.3	10	9.9	11.4	N/A	11.2	10.9	10	MYLPF	10.6	11.7	6.7	10.2	7.3	N/A	7.5	N/A	6.8	6.9	6.6
COL4A1	11	10.9	7	11.5	11.1	11.3	10.8	10.9	11.7	11	10.5	MYST4	N/A	9.5	7.6	8.4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	7.7
COL4A2	10.1	10.1	8.5	10.8	10.3	10.5	9.9	9.7	11.2	10.2	9.9	NDG2	13.5	14	12	13	10.9	9.6	12.9	11.5	10.4	10	8.9
CPNE9	7.3	8.2	6.2	7.4	N/A	N/A	7.7	N/A	N/A	N/A	N/A	NFATC2IP	8.2	8.8	7.1	7.8	6.3	6.5	7.5	6.9	6.1	N/A	7
CRYAB	8.6	8.4	7.2	9	7.7	6.5	8.4	6.4	9.6	7.2	6.4	NGFR	7.5	7.3	6.4	7.5	7.3	8.6	6.7	6.3	6.3	6.5	7.6
CTSH	8.9	9.1	7.5	9.4	8.3	7.5	8.7	6.7	7.9	7.1	7.7	NIBAN	7.7	7.7	6.7	6.7	6.4	6.1	7.9	N/A	6.1	N/A	N/A
CXCL16	9.7	9.3	7.9	8.6	7.4	N/A	9.6	6.9	8.7	N/A	N/A	NOD1	9.4	9	7.9	8.3	6.8	N/A	8.1	6.5	N/A	N/A	N/A
D4BWG0951E	8	8	6.9	7.8	7.3	N/A	7.6	N/A	6.1	N/A	N/A	NUPR1	11.1	10.9	9.7	9.3	7.9	7.8	10.4	6.6	7.1	6.1	6.4
DDC	7.8	8.2	6.5	8.2	8	7.6	7.5	6.7	8.1	7.4	7.4	NXT2	10.4	10.4	9.4	9.7	8.8	9	10.1	9.4	8.3	8.1	8.5
DDIT3	9.7	9.8	7.7	8.5	7.6	6.8	9.7	7.1	8	7.7	6.9	PDGFA	11.3	11.9	10.2	11.2	11	9.8	10.9	10.1	11.1	10.8	10.6
DGKA	9.5	10.3	8.6	9.6	8.5	7.9	9.4	7.9	9.3	8.1	7.8	PDLIM1	12.2	12.7	10.9	12.4	10.7	10.3	11.9	10.6	12.4	11.7	10.7
DNAJC6	9.2	10.6	6.2	9.6	5.8	N/A	8.4	N/A	5.9	N/A	N/A	PGLYRP1	7.8	8.1	6.4	6.7	6.9	7	5.9	N/A	N/A	N/A	6.3
DNMT3L	12.8	13.3	7	12.3	7.8	N/A	11	N/A	7.7	6	N/A	PHF17	11.4	N/A	10.1	10.7	9.7	N/A	N/A	9	9.9	N/A	9.3
DPP7	11.2	11.7	9.4	10.6	9.7	9.3	10.8	9.7	10.2	9.5	9.3	PKP3	7.6	7.9	6.6	7.4	6.4	N/A	7.4	N/A	7.4	5.9	N/A
DPPE5	15.4	16.1	12.3	15	11.8	9.2	14.2	11.1	10.8	8.5	9.1	PLA2G10	9.5	10.3	7.4	9.4	N/A	N/A	9.4	6.4	N/A	N/A	N/A
DUSP1	11.8	11.8	10.5	11.3	9.9	9.1	11.4	10.2	10.2	9.4	9.4	PLA2G1B	11.9	12.1	9	10.8	7.5	N/A	11.8	1.1	6.2	N/A	N/A
ENO2	7.9	8.6	6.6	7.9	7.1	6.6	8.5	6.4	7.7	7.9	7.5	PLAC8	9.5	9.3	8	9.3	8.1	7.5	9.4	9.4	9.8	8.8	8

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
REV1	10	9.9	8.6	9.4	8.8	8.9	9.9	8.8	9	9.1	9.2
RFX2	9.7	11.18.7	10.39.2	8.3	8.6	7.3	7.2	7.2	7.2	7.5	
RHOX5	10.4	10.67.9	10.67.5	7.4	9.3	7.1	8.5	7.1	7		
RPP25	11.2	11.89.2	11	8.4	7.3	10.58	8.8	8.1	8.2		
RRAGD	8.8	9.2	7.8	8.7	7.7	8.1	8.9	8.8	8.6	8.3	8
SDC4	10.4	11	9.3	10.69.3	7.8	9.9	8.3	9.3	8.6	8.1	
SEMA4A	8.2	7.9	6.9	8	6.7	6.5	8.5	7	7	6.8	6.8
SEMA4B	11.1	11.8	10.1	11.2	10.29.4	10.89.6	10.11	0	9.9		
SERPINE2	7.7	8	6.4	7.1	6.6	7.2	7.8	6.6	7	7.1	6.9
SLC38A2	10.1	9.9	8.7	9.6	9	9.5	9.9	9.4	9.9	10.29.9	
SLC6A9	9.3	8.6	7.6	8.3	7.9	8.3	9.1	7.9	8.5	8.9	8.9
SMPDL3B	10.6	11.28.8	10.37.8	7.6	9.8	7.7	8.2	7.4	7.8		
SNAI3	10.4	10.28.9	9.2	7.7	N/A	10.67.5	7.4	6.6	N/A		
SNX30	8.6	9.5	7.7	8.5	7.3	7.4	8.9	7.5	8.4	8	7.9
SORD	9	9.5	7.7	8.2	6.9	7	9	8.1	7.4	7.2	7.1
STAG3	8.2	9.3	7	8.3	6.9	6.9	8.2	7.2	7.3	8.2	8
STARD8	7.3	7.5	6	7.8	7.3	8.3	7.9	7.9	13.11.3	11.8	
SYNGR3	8.7	8.6	7.5	8.6	7.7	7	8.9	6.8	7	6.9	N/A
SYP	8.6	8.8	7.6	7.8	7.1	7.6	8.7	7.7	7.2	6.9	7
SYT9	9	9.3	8.1	8.6	6.4	6.4	8.8	6.8	6.6	6	N/A
TBC1D13	11.3	12.1	10.4	11.3	10.4	10.4	10.6	10.8	10.5	10.6	10.6
TCFAP2C	10.5	12.29.3	11	8.8	7.9	9.1	10	9.1	8.6	7.9	
TDRD12	10.5	11.56.4	10.27.1	N/A	8.3	N/A	6.6	6	N/A		
TEX19	10.3	10.76.9	10.16.4	N/A	8.7	6.3	6.8	N/A	N/A		
THY1	9.2	9.1	7.4	9.2	7.2	6.6	9.8	7.3	8.1	7.4	6.8
TIMP1	10.2	10.49.3	10	8.9	9.2	10.28.9	9.2	8.6	9		
TMEM16J	7.8	8.6	6.5	7.5	6	N/A	8	N/A	N/A	N/A	N/A
TMPRSS13	7.6	8	6.5	7.3	6.3	N/A	7.3	5.7	6.8	5.6	N/A
TRIB3	10.1	9.4	7.8	8.8	N/A	N/A	9.9	7.9	7.8	7.9	7.4
TSPAN17	8	8.2	7	7.7	N/A	N/A	8.1	N/A	6.8	N/A	6.1
UBD	7.8	9.3	6.3	7.6	6	N/A	7	N/A	N/A	N/A	N/A
UCHL1	9.4	9.5	8.4	9.8	9.1	7.7	9.1	6.5	7.2	7	7.1
USP28	9.7	10.38.6	10	8.7	8.8	9.7	9.1	8.5	8.8	8.9	
UTF1	11.3	11.79.7	11.17.8	N/A	N/A	10.97.1	6.9	9.4	N/A	N/A	
WNT4	7.5	7.3	6.3	7.2	6.5	N/A	8.1	N/A	8.1	6.5	5.8
ZFP296	8.9	9.7	7.2	9	6.3	N/A	7.9	6.8	6.5	6.3	6.3
ZFP57	9.5	9.9	8.3	8.9	8.2	9.4	9.2	9.4	8.4	8.3	8.7
ZFP655	10.9	11.29.9	10.39.7	9.8	10.9	10.3	10.4	10.4	10.3		

### WNT3a/Noggin, 96Std, T, aktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
1110012D08RIK	8.9	9	9.9	9.6	10.5	10.29.1	10	9.6	9.7	10	
1110017D15RIK	8.1	8.1	8.9	8	10.18.6	8	N/A	N/A	N/A	8.2	
1200009O22RIK	N/A	N/A	N/A	7.4	8.5	9	N/A	7.7	6.9	6.6	7.5
1700007G11RIK	6.8	6.1	8.5	7.1	8.4	6.3	6.6	7.7	N/A	N/A	N/A
1700009P17RIK	6.1	6.7	8.4	7.3	10	7.7	6.7	6.7	6.5	7.2	7.1
1700027A23RIK	N/A	N/A	8.4	7.8	9.9	6.4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1700027N10RIK	N/A	6.2	7.5	7.1	9	7.2	N/A	N/A	6	6.2	6.5
1700040I03RIK	7.5	7.1	7.9	7.6	9.1	7.6	7.1	7.3	7.2	6.6	7
1700088E04RIK	6.7	6.7	9.5	8.3	10.78.4	6.3	7.4	7.3	7.2	7.8	
2310007A19RIK	6	6.8	7.8	7.6	8.9	6.5	6.8	6.4	6.6	6.9	6.9
2310010M24RIK	6.6	N/A	8	7.2	8.7	7	6.4	6.1	6	6.1	N/A
2310016C16RIK	9	8.5	10	9.3	10.7	10.89.4	9.3	10.29.9	10.1		
2310047D13RIK	8.1	7.7	8.5	8.6	9.8	9.6	8.1	8.7	9.4	9.2	9.3
3110032G18RIK	N/A	N/A	6.8	6.9	9.2	9.7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5033414D02RIK	10.4	10.2	11.2	10.3	11.3	11.1	10.3	10.9	10.8	10.5	10.8
6030429G01RIK	6.4	7.2	8.4	7.1	8.6	8	6.5	7.5	5.9	6.5	7.4
6230427J02RIK	N/A	6	7	6.7	8.3	9.7	N/A	8.5	7.6	8.1	9
6330403K07RIK	7.8	7.8	9	9.2	10.4	10.48.3	9.4	10.1	10.2	10.8	
6330505N24RIK	6.8	7.2	7.8	8.9	9.9	8.6	7.1	7.6	8.2	8.7	9.7

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
6430537H07RIK	5.7	6	6.9	N/A	7.3	6.2	N/A	6	5.7	5.8	6
6430573F11RIK	7	7.1	7.9	7.7	9.5	9.3	7.1	6.8	7.4	7.5	7.7
9430028L06RIK	7.3	N/A	8.1	6.5	8	6.7	8	7.7	6	N/A	N/A
ADAMTS15	6.2	N/A	7.4	7	8.2	8.4	6.2	6.5	6.4	N/A	6.4
ADCK4	6.8	7.6	7.9	7.7	9	7.6	7.4	7.3	7.4	7.4	7.6
ADRA2A	7	6.1	9.9	7.6	10.39.5	6.4	8.8	7	7.8	8.8	
ADSSL1	6.8	7.7	8.6	7.8	8.9	9.4	8.2	9.6	10.2	10.5	10
AEBP1	7.3	6.6	7	6.9	8.1	7.9	7.6	7.3	8.9	8.9	8.9
AGTRL1	N/A	N/A	10.39.1	12.2	12.5	N/A	11.5	10.5	11	11.6	
ALDH1A2	N/A	N/A	N/A	6.1	7.7	9.6	N/A	N/A	5.9	6.5	7.9
AMIGO2	7.1	6.5	8.2	7.5	8.5	8.2	6.8	7.7	8.3	8.1	8.4
ANG	6.4	6.6	6.7	7.2	8.4	7	6.4	6.4	6.8	6.2	6.3
ANKS6	N/A	N/A	6.3	6.1	7.1	7.1	6.1	6.6	5.9	6.5	6.3
ARFGAP3	6.8	7.2	6.9	7.4	9.3	8.5	6.8	6.9	7.5	7.1	7
ARG1	N/A	N/A	8.7	7.8	10.4	11.6	N/A	6.8	N/A	6.4	7.5
ARHGAP24	6.7	N/A	6.5	7.5	8.5	N/A	6.8	6.4	N/A	N/A	6.8
ARID3A	8.7	8.5	9.5	9.3	10.3	10.68.9	9.4	10.6	10.6	10.2	
ARID3B	10.6	10.5	11.9	10.8	11.9	12	10.6	11.9	11.4	11.9	11.8
ART5	6.5	7.3	7	7.6	8.6	8.2	6	6.8	6.7	6.8	7.5
ATP1A2	N/A	N/A	6.7	6.4	9	8.3	N/A	N/A	N/A	6.1	6.5
B230339H12RIK	N/A	6.2	6.2	6.4	7.4	7.1	N/A	6.4	7.3	6.7	6.4
BC023829	8.6	7.2	10.37.9	8.9	8.8	8.9	10.19.2	9.5	9.8		
BC039093	9.6	9.9	10.6	10.8	12	13	9.9	11.5	11.6	11.6	11.6
BGN	6.3	6.5	7	6.8	8.1	9.6	6.9	7.5	7.7	7.6	7.9
BICC1	6.4	6	9.2	8.1	10.7	10	6.2	7.4	6.8	7.3	7.9
BMP3	N/A	N/A	N/A	6.4	8.1	7.5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BMP4	7.8	8.4	10.19.2	10.3	11	7.4	10.3	13.6	13.8	13.6	
BMP7	8.7	9.7	9.7	9.5	10.9	10.18.5	9.2	9.8	10.2	10.6	
BTD	6	6	6.2	N/A	7.1	6.7	6	6.4	7.2	6.8	6.4
BVES	6.7	6	7.1	N/A	7.2	7.3	6.6	7.4	7.6	8.2	7.7
C330001K17RIK	N/A	6.1	7	N/A	7.9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CADPS	N/A	6.1	6.6	6.8	8.7	7.6	N/A	N/A	N/A	6.2	6.6
CALCA	8.3	8	9.7	9.4	10.78.2	8.5	6.6	6	N/A	N/A	
CAPN2	7.3	6.8	7.7	7.5	8.6	9	7.9	8	8.9	8.2	8.1
CASP6	8.3	8.2	9.7	9	9.9	10.28.8	9.7	9.6	9.6	10	
CCDC114	8.6	8.6	9.1	8.5	9.8	8.5	8.7	7.8	7.7	7.9	7.9
CCDC65	N/A	N/A	7.6	7.1	8.2	6.9	N/A	N/A	6.6	6.9	6.9
CCNG2	6.6	6	6.3	N/A	7.1	7	6.4	6.8	7.2	7.1	7.1
CCNO	9.5	8.3	10.98.1	9.3	8.5	7.7	9.3	6	7.2	7.7	
CD82	N/A	N/A	6.8	7.3	9.4	8.7	N/A	N/A	7	6.5	6.9
CDKN1C	11.5	11.2	13.5	13.1	14.8	13.5	11.4	12.1	13.6	13.2	12.7
CDX2	7.7	6.7	10.99.1	11.6	10	7.4	9.4	11.9	11.8	12.4	
CER1	N/A	N/A	8.4	6.6	8	8.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CHRD	6.9	6.6	10.89.8	12.2	11	6.4	6.7	6.2	6.5	7.2	
CHST7	7.4	N/A	9.2	7.5	9.4	11.16.9	10.97.2	8.7	10.5		
CITED2	7	7	8.1	7.2	8.2	8.9	7.1	7.6	8.4	8.4	8.3
CNTNAP2	6.5	6.2	7.4	7.3	8.2	7.6	6.3	7.5	N/A	6.1	6.5
COL16A1	6.8	6	8.4	7.4	8.7	8.4	6.4	6.5	6.9	6.6	7.1
COL2A1	6.8	6	6.7	8.3	9.4	7.7	6.9	5.7	5.8	5.7	5.9
COL5A1	9.6	8.6	9.8	9.3	10.3	11.29.9	9.7	11.1	10.6	10.8	
CPNE2	7.1	6.8	6.9	6.7	7.7	7.5	7.6	7	7	6.8	7
CSN3	7	N/A	7.3	6.7	7.7	7.8	5.9	N/A	N/A	N/A	N/A
CTXN1	7.7	7.8	8.6	8.3	9.3	9.1	7.9	8	8.5	8.5	8.4
CX3CL1	6.8	6.3	7.3	N/A	7.9	7.7	6.7	8.6	6.8	7.1	7.9
CXX1C	7.5	6.7	9.8	7.3	8.6	9.1	7.7	9.2	7.1	7.7	8.7
D12ERTD647E	N/A	N/A	7.3	6.1	8	8.4	N/A	6.7	5.9	6.4	7.8
DAP	7.2	7.4	8.2	7.8	8.8	8.1	7.1	7.9	7.6	7.8	7.8
DGKK	7	N/A	10.17.8	9.7	8.7	6.6	9	6.6	7.3	7.6	
DISP1	7.8	7.5	8.6	8	9.3	9.1	7.8	8.5	8.6	8.8	9
DLL1	6.2	6.8	N/A	6.6	7.8	6.9	N/A	7.6	N/A	6.1	7.3
DNAJB13	N/A	6	7.7	7.2	9.7	6.9	N/A	N/A	N/A	N/A	6.1

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
EMP1	7.1	6.7	6.5	7.8	8.8	7.4	7.1	N/A	9.6	6.9	N/A
EMP2	7.9	7.9	8.2	8.2	9.5	7.4	8	6.1	9.6	8.9	7.6
EMP3	7.7	7.1	7.2	7.1	8.3	8.8	7	8	8.8	8.7	8.7
ENSMUSG00000043795	6.3	N/A	N/A	6.5	7.5	8.2	6.2	6.6	9.8	9.3	8.6
EPHB1	N/A	N/A	6.7	8	9.3	8.2	N/A	N/A	N/A	N/A	6.9
ERO1LB	N/A	6.3	N/A	N/A	7.8	6.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
ETS2	10	9.7	10.7	10.3	11.2	12.1	19.9	10.2	10.4	10.1	10.6
EVX1	9.3	7.1	10.5	6.7	8.7	8.8	10.2	12.6	10.2	11	11.9
FCGRT	N/A	6	N/A	N/A	7.7	7.3	N/A	N/A	N/A	N/A	6.2
FGF10	5.6	5.6	6.3	6.3	7.3	8.8	N/A	10.6	9.1	9.5	10
FGF8	9.9	8.1	12.4	9.3	11.1	11.8	10.5	12.6	8.8	10.1	11.7
FGFRL1	6.2	6.6	6.8	7	8.3	8	6.6	7.6	8	7.8	8.2
FGG	6.1	6	N/A	N/A	7.2	6.2	N/A	6.3	5.9	6.1	N/A
FKBP14	6.9	6.2	8.1	7.1	9	8.3	6.7	8.1	7.7	7.5	7.9
FLRT3	8.2	8.5	9.1	9.5	11.1	10.4	8.2	7.7	9.6	8.7	7.6
FNDC3B	8.5	8.5	8.4	8.9	9.9	9	8.7	8.2	10.3	9.5	9.4
FOXA1	5	5.1	8.4	7	8.5	6.7	4.9	5.9	4.8	N/A	4.8
FOXC1	N/A	N/A	6.5	7.4	9.5	11.2	6.4	8.2	6.5	7.5	9.4
FOXD4	N/A	N/A	8.1	10.2	12.3	10.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
FURIN	N/A	9.4	10	N/A	10.6	N/A	N/A	N/A	10.7	10.9	10.7
FZD2	6.3	6.3	7.5	8.2	9.2	9.3	6.8	7	7.8	7.6	7.5
FZD6	7.7	7.5	8.4	8	9.1	8.1	7.8	7	7.3	6.5	7.1
GAL	8.2	6.7	8.2	7	8.9	7.8	6.6	6.8	6.1	6.1	6.8
GAMT	N/A	6.1	6.9	7.1	8.4	8.5	6.2	6.5	8.5	8.6	8.4
GBP3	6.1	N/A	8.6	6.3	7.9	8.5	N/A	7.3	6	6.2	7.7
GHR	8.9	N/A	9.4	7.5	8.9	8.9	9.1	8.5	8	8.2	8.5
GM1673	7.3	7.1	8.5	8.6	10.2	9.7	7.1	7.8	8.3	8.7	8.7
GPC3	9.8	10.1	11.1	11.4	13	14.1	10.5	12.5	13.1	13.1	13.6
GPR177	9.1	9.1	9.8	9.6	10.6	10.5	9.8	10.4	11.1	11	11
GPRC5C	N/A	N/A	N/A	6.1	7.3	7.2	N/A	N/A	6.9	6.8	6.3
GPX3	9.5	9.4	9.4	9.7	10.7	10.7	10.1	9.4	10.9	10.8	10.6
GPX7	8.5	8.4	8.7	8.5	9.6	9.2	8.7	9.4	8.3	8.7	9.3
GRCC10	10.4	11	10.9	11	12	11.9	10.1	11	11.3	11.7	11.8
GREB1	7.5	6.8	8.6	8.7	10.2	10.8	7.8	10.5	9.9	10.1	10.5
GSC	7.3	6.5	11.1	8.3	9.4	9.5	6.3	11.4	7	7.5	8.5
GSTM5	8.2	7.8	9.2	8.1	9.8	10	8.3	8.4	8.3	8.1	9.2
GZMM	7.1	8.3	8	8.5	10.5	7.4	7.1	7.3	7.2	7	7
H2-M3	7.2	6.4	8.6	6.5	7.7	7.3	7.4	8.1	6	6	7.3
HDAC11	6.4	6.8	6.9	7.2	8.6	7.4	6.7	6.5	6.7	7.1	7.1
HDC	N/A	6.4	6.7	6.5	9	N/A	5.9	N/A	6.1	N/A	N/A
HES1	9.4	9.2	10.7	9.4	10.4	9.8	10.1	11	10.1	10.4	10.4
HOXA2	N/A	N/A	6.4	6.4	7.9	9.3	N/A	N/A	5.6	6.6	7.9
HOXA5	N/A	N/A	7.7	7.6	9.9	10.4	N/A	N/A	6.2	6.9	8.5
HOXB1	N/A	N/A	8.7	7.3	9.9	11.3	N/A	8.6	9	10.1	10.8
HOXB2	6.1	6.1	7.8	7.9	9.6	10.9	N/A	8.4	10.4	10.8	10.7
HOXB5	N/A	N/A	N/A	6.8	8.2	9.6	N/A	N/A	10.1	10.1	8.9
HOXB7	N/A	6.1	N/A	N/A	7.3	6.4	N/A	N/A	8.7	7.7	8
HSD11B2	N/A	N/A	N/A	7.5	9.1	8.6	N/A	N/A	8.2	7.8	7.2
HTRA1	7.2	7.5	8.4	7.6	9.4	9.7	6.8	7.6	8	7.8	8.7
IGFBP3	8.2	7	10.5	7.6	8.8	8.1	8.9	9.2	6.7	7.1	7.1
IGFBP4	7	7.1	8.3	9.3	10.9	12.5	7.4	11.3	12.2	12.1	12.3
IGFBP5	6.6	6.8	8.8	12.3	13.6	12.2	6.8	N/A	8.1	7.6	6.4
IGSF4A	9.9	9.7	10.3	10.3	11.3	11	10.6	10.2	9.4	9.1	9.3
IGTP	7.5	7.6	10.7	8.1	10.3	9.8	7.6	9.4	7.4	7.6	9
IIGP2	7.2	7.4	10.7	8.4	10.7	10.8	7	9.9	7.2	8	9.6
IL13RA1	6.1	6.1	7.3	6.5	8.3	7.4	6.4	7.4	N/A	N/A	6.5
IL17RC	6	6.3	7.7	6.5	7.7	7.7	5.9	7	6.3	6.5	7.5
KANK1	9.7	10.3	9.8	10.4	11.4	11.1	19.8	10.7	10.3	10	10.6
KIF26B	N/A	N/A	6.5	7.3	8.7	8.5	N/A	N/A	7.1	7.6	8.3
KIF27	6.1	6	6.5	6.1	7.1	6.3	N/A	6	5.7	N/A	5.7
KLHDC9	N/A	N/A	7.1	6.5	7.9	7	N/A	6.7	6.9	6.8	7
KRT19	9.3	8.2	10.1	9.3	11.3	9.3	8.8	8.4	9.1	8.3	8
LBH	7.1	7.2	9.9	9.2	10.6	10	7	8.6	8.1	8.6	8.7
LHFPL2	8.6	8.9	9.6	9.8	11.5	12.1	9.6	11.5	11.6	12.1	12.1
LHX1	N/A	6.2	9.9	7	9	9.1	N/A	12	7.3	8.6	8.8
LMO2	7.1	7.3	9.6	8.4	10	11.5	7.3	7.7	9	9.4	9.2

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
LOC100038882	6.9	N/A	9.9	7.1	8.9	8.8	N/A	8.3	6.3	6.8	8.1
LOC100046056	7.8	7.8	8.2	8.1	9	8.5	8.1	7.9	9	8.9	8.5
LOC100046120	10.4	9.6	10.5	10.5	12.7	13.7	10.6	9.6	9.2	11.1	11.1
LOC100048346	N/A	N/A	8.2	6.8	9.2	9.5	N/A	9.5	7.3	7.9	8.9
LOC100048721	N/A	N/A	N/A	8.8	10.4	9.8	N/A	7.2	N/A	N/A	N/A
LOC212390	7.3	6.8	9.3	6.9	9.1	8.7	6.5	7.8	6.5	6.8	7.9
LOC621823	7	6.6	8.8	7.5	8.6	8.5	7	8.8	7.3	7.4	8.1
LPAR3	N/A	N/A	7.7	6.6	9	8.2	N/A	N/A	6.3	N/A	N/A
LRIG1	7.8	8.2	10.1	9.5	11.4	11.4	7.4	8.9	7.3	7.7	8.4
LRIG3	10.5	10.5	12	11.2	12.6	12.7	10.6	11.4	9.4	9.8	11
LRRC50	N/A	5.8	N/A	N/A	6.9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
LTB	7.5	6.3	8.1	6.8	7.8	6.4	6.1	6.6	6.2	N/A	N/A
MAGED2	10.8	11	11.8	11.5	12.6	12.7	10.9	11.8	12.4	12.1	12.2
MAGEE1	7.4	6.9	6.9	7.6	8.6	9.2	7.1	7.5	8.7	8.3	8
MAN2A1	9.3	9.4	10	9.5	10.5	10.2	9.6	10	9.9	9.8	9.7
MCC	10.1	9	9.6	10.7	9.7	9.7	9.2	9	8.8	8.9	8.9
MEIS1	6.4	6.5	N/A	7.8	9.1	10.5	6.5	7.4	10	10.6	10.3
MEIS2	8.1	8.2	10	10.3	11.6	12.6	7.9	11	11.5	11.8	11.9
MEOX1	N/A	N/A	N/A	9.3	11.6	13.2	N/A	N/A	N/A	6.6	8.2
METRN	10.8	10	10.9	11	12	11.9	10.8	10.8	11.1	11.6	11.3
MFAP4	6.5	6.5	7.1	7.3	9.2	10.2	7	8.1	7.7	7.6	9
MLF1	N/A	N/A	9.4	8.3	10.1	N/A	8.1	N/A	7.7	7.7	7.7
MMD	9.3	9.4	10.5	9.5	10.5	11	9.8	10.5	10.4	10.3	10.9
MMP15	8.1	8.2	9	9.1	10.4	8.9	8.1	8.2	10.4	10.4	10.2
MMP2	9.5	9.2	10.7	10.4	11.9	12.8	10.3	11	12.2	12.3	12.8
MOCS1	10	9.4	11.6	10.2	11.1	10.7	9.7	10.9	11.5	11.7	12.1
MOGAT2	6.6	7	7.9	7.5	9	9.1	N/A	8.8	9.9	10.4	10.3
MORN3	N/A	5.6	N/A	N/A	6.7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MOXD1	7.5	6.2	8.8	7.7	9.5	6.7	8	7	N/A	N/A	N/A
MRPS6	10.7	10.4	10.8	10.7	11.7	11.5	10.6	11.8	11.1	11	11.3
MSX1	6.3	N/A	7	6.7	7.8	8.5	7.4	11.1	12.5	12.6	12.1
MYCBPAP	N/A	6.2	6.3	N/A	7.2	6.7	6.8	N/A	6.6	6.5	6.6
NDRG3	7.8	7.2	9.7	7.4	8.6	8.7	7.6	9.2	7.6	7.7	8.6
NEDD9	8	7.6	9.2	9.2	10.4	8.3	7.9	8.7	9.1	8.5	7.4
NKX3-1	6	6.2	6.4	7.4	8.6	9.7	6.5	6.6	N/A	6	6.6
NME5	6.5	N/A	9.9	7.7	10.8	8.4	6.7	7.7	N/A	6.3	7.1
NOG	6.1	N/A	7.7	7	9.3	7.6	6	N/A	6.9	6.9	6.9
NOTCH1	6.7	6.6	7	7.3	8.7	9.7	6.7	8	7.1	7.2	8.1
NPTX2	9.2	9.5	8.8	9.9	11	9.6	8.9	10	6.4	7.3	8.2
NRARP	8.5	8.4	9.4	8.8	9.9	11	9.2	10.1	8.2	8.7	9.6
NUDT9	9.6	9.4	10.6	9.7	10.7	10.9	9.6	10	10	10.1	10.1
ODZ4	6.7	7.5	6.8	7.6	8.7	9.6	7.5	9.3	8.4	9	9.3
OLFM1	7.9	7.6	8.7	8	9.4	9	8.4	9.8	8.4	8.7	9.3
OLFM3	N/A	N/A	7.5	8	9.6	8.8	N/A	N/A	9.4	9.4	9.2
PACRG	6.1	6.3	8.5	7.6	9.8	7.7	6.5	6.8	6	6.9	7.5
PARP14	6.1	N/A	9.3	7.2	8.3	8.3	6.4	8.3	6.4	7.3	8
PCDH8	6.7	N/A	6.7	6.5	7.9	8.3	5.9	6.7	7.2	7.4	7.3
PDGFRA	6.6	6.7	6.5	8.3	9.5	11.4	N/A	11.5	10.8	10.7	11
PDLM4	7.3	8.1	9.9	9.2	11	11.6	7.6	11.1	11.8	12.3	12.5
PEG10	6.8	6.4	6.8	6.4	7.6	7.8	7.1	7.6	8.8	8.8	8.4
PIK3R3	7.7	7.6	8.4	9.4	10.5	9.8	7.8	8.3	8.6	8.1	8.2
PLXNA2	6.1	6.2	9.1	8	9.6	10.7	6.7	10.7	9.8	9.9	10.5
PON2	9.7	9.4	10	9.9	11.1	10.5	9.5	9	10.7	10.1	9.9
POU6F1	8.6	7.6	10.3	7.6	8.9	7.7	8.2	9.1	6.3	6.4	6.7
PPM1E	5.8	N/A	6.3	6.1	7.1	6.1	6	N/A	N/A	N/A	5.6
PPP1R1A	9.9										

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
RAB38	6.5	6.1	7.9	7.4	9.5	7.3	5.9	6.6	6.1	5.9	5.8
RAB8B	9.9	9.5	11.2	10.4	11.4	11.8	10.2	11.4	10.9	11.1	11.3
RABL5	6.9	6.7	7.8	7.8	9	8.8	6.9	7.8	7.6	7.6	7.9
RAMP2	8.2	8.1	9.5	10	11.4	11.8	8.2	8.6	9	8.7	
RASGRP3	N/A	N/A	N/A	6.4	7.8	9.3	N/A	8.4	6.9	7.6	8.8
RGMA	N/A	N/A	7	6.8	8.5	8.3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
RGS17	7.2	N/A	8.5	7	8.5	7.9	7.5	7.6	N/A	6.6	6.9
RNASE4	6.2	6.2	6.4	6.8	8	6.7	N/A	6	N/A	N/A	6.4
RSPO3	6.9	6.4	10.18	5	11.2	11.9	6.4	10.39	2	9.8	11.5
SCARA3	6.5	6.3	8.6	8.5	11.3	11.2	7.2	6.7	7.4	8.4	10.2
SEMA5A	6.7	6.3	7.5	7.4	9.2	9.2	6.9	7.8	9.2	9.5	9.1
SHH	N/A	N/A	7.5	8.7	11.8	8.9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SHISA2	7.2	7.5	8.5	9.1	10	9.6	7.7	6.4	7.3	7.5	8.4
SIX1	6.2	6.5	N/A	7.6	8.6	9.4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SLC35A2	7.1	6.8	7.4	7.2	8.3	7.7	7	7	7.8	7.7	7.6
SLIT2	6.6	7.6	9.8	8.9	11.7	9.8	N/A	7.2	8.6	7.8	7.1
SMAD3	8.8	9	9.3	9.8	10.8	10.5	9.1	10.1	10.1	9.7	
SMOC1	9	9	9.9	10.3	12.6	12.8	8.3	7.3	7.4	8	9.2
SNAI1	N/A	6.7	N/A	N/A	8.2	9.7	N/A	10.28	8.6	9.6	
SP5	11.59	5	12.3	10.4	12.2	12.1	10.4	12.99	10	10.7	
SP8	7.3	N/A	8.1	6.4	7.5	6.7	7.7	8.3	N/A	6.4	6.7
SPSB4	7.5	7.2	8.6	8.8	9.9	9.7	7.6	7.6	8.3	8.6	8
ST3GAL5	7.6	7.7	8.1	7.8	8.8	9.4	8.1	7.4	10.9	10.9	9.9
STBD1	7.7	7.1	7.7	7.8	8.8	8.1	7.9	8.2	8.5	8.3	8.3
STK36	7.8	8.3	8.3	8.1	9.3	7.7	7.4	7.2	7.5	7.3	7.3
STRA6	N/A	N/A	N/A	6.6	8.4	9.8	N/A	N/A	N/A	N/A	6.6
SULF1	9	8.1	9.9	9	10.5	10.5	8.7	9.3	8.4	8.8	9.5
T	11.79	5	14.1	11	13.8	12.8	11.4	13.69	1	10.1	11.4
TAP2	6.8	6.9	9.4	7	8.6	8.3	7.2	8.6	6.4	7.2	8.4
TAPBP	6.1	5.9	7.7	6.2	7.2	7.3	N/A	6.6	6.3	6.1	6.6
TAX1BP3	N/A	9.5	N/A	N/A	10.6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TBC1D9B	6	6.2	6.6	N/A	7.1	7.4	6.4	6.9	7.7	7.5	7.3
TCEAL1	6.2	5.8	7.2	6.4	7.4	7.3	6.3	7.8	7.6	7.7	6
TCF15	8.4	7.7	8.2	8.6	10.6	12	8	7.5	N/A	6.3	7.3
TEKT1	N/A	5.6	6.7	6.2	8.5	5.8	N/A	N/A	N/A	5.8	5.9
TGFB1	7.2	6.5	8.5	7	8	8.3	6.9	9.9	9.5	10	10.2
TIMP2	8	7.8	8.3	8.5	9.4	8.7	8.1	8.4	10.39	9.2	
TMEM108	6.1	N/A	7.5	7.7	9.4	8.3	6.1	N/A	10	10	8.5
TMEM119	N/A	N/A	7	6.8	8.9	9.1	N/A	8.6	8.2	7.8	8.3
TMEM132C	N/A	N/A	N/A	6.6	8.5	9.8	N/A	N/A	8.1	7.9	7.9
TMEM176B	N/A	N/A	7.7	6.6	8.3	7.9	N/A	7.2	7.8	8	7.9
TPD52L1	8.7	7.8	9.4	8.1	9.1	8.9	8.4	8.8	8.5	8.8	8.8
TPH1	N/A	N/A	N/A	6.5	7.5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TRIM56	6.4	6.2	7.7	N/A	7.2	6.3	7	7	6.8	6.5	6.3
TRP53I11	N/A	N/A	8	7.7	8.9	9.5	6.3	6.3	N/A	N/A	7.1
TSC22D3	N/A	8	N/A	N/A	9.4	9.4	8	9.8	9	8.9	N/A
TSPAN12	6.3	N/A	6.8	7.2	8.3	8.2	6.4	6.7	8.1	7.8	7.5
TSPAN2	7.2	6.5	7.5	7	8.4	8.3	7.5	7.1	8.8	8.7	8.7
TSPAN3	7.2	7.2	7.7	7.6	8.7	6.7	7.5	N/A	6.4	N/A	N/A
TSPAN6	9.8	N/A	10.5	10	11.2	11.2	9.9	10.4	10.1	10.1	10.8
TWIST1	7.4	6.5	8.3	8.2	9.7	10.7	7.4	9.3	9	9.2	9.8
TXNDC13	9.2	8.8	9.6	9.1	10.29	9.1	9.4	9.7	9.2	9.3	
USP18	N/A	N/A	8.5	7.1	9.3	9.5	N/A	9.9	7.5	8	9.1
VASN	8.5	8.1	9.4	9.6	10.8	10.8	8.8	9.5	12.1	12.1	11.6
VIM	9.8	8.6	11.59	6	11	11	8.7	11.2	12.1	11.9	11.8
VSTM2B	N/A	N/A	6.4	7.2	8.2	8.5	7.2	10.4	10.3	10.7	11
VTN	N/A	N/A	6.6	7.8	10.5	7.9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
WBP1	8.1	8	9.2	9	10	9.9	8.4	9.4	9.5	9.6	9.7
WDR78	N/A	6.1	7.1	6.4	8.3	7.3	6.7	6.2	6.1	6.6	6.5
WIPF1	6.6	6.5	6.8	N/A	7.6	7.8	6.5	7.2	7.2	7.3	7.4
WNT3A	7.2	6.2	10.46	7	9.3	8.5	N/A	9.8	N/A	6.6	7.5
WNT5A	N/A	N/A	7.9	7.8	9.4	10.5	N/A	10.9	10.4	10.6	11.3
WNT5B	7.9	6.9	9	6.6	8.1	7.1	7.8	8.9	7.4	7.5	8
YIPF2	6.8	6.9	7.3	6.9	8.1	7.4	6.7	6.9	6.9	7.2	7.4
ZADH2	7.7	7.6	8.4	7.7	9.3	9.6	7.7	8.5	8.5	8.2	8.6
ZEB1	7.9	7.5	7	8.1	9.3	10.6	7.4	8.7	10.3	10.2	10

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
ZFP810	6.6	6.3	6.5	N/A	7.3	7.4	6.9	7.3	7.2	7.1	7.7

### WNT3a/Noggin, 96Std, T, deaktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
1190005106RIK	8.5	8.8	6.5	7.7	6.2	6.2	8.3	N/A	6.1	N/A	6.2
1700012H05RIK	10.8	11.2	7.8	10.2	6.6	N/A	10	7.1	6.4	N/A	N/A
1700013B16RIK	6.5	7	N/A	N/A	6.1	N/A	5.9	N/A	N/A	N/A	N/A
1700019D03RIK	11.2	11.1	1.99	10.3	8.1	N/A	11.39	8.1	7.1	6.4	
1810014F10RIK	8.2	8.3	7.6	8.1	6.7	6.3	8	7.4	6.7	6.4	6.5
1810015A11RIK	11	10.8	9.9	10.4	8.9	8.7	10.99	9.8	10.2	10	
2010111101RIK	8	8	7.5	8.1	6.4	N/A	8.3	6.9	6.4	6	N/A
2410008K03RIK	10.4	11	10.3	10.3	9.3	9.6	10.3	10.39	2	9.3	9.5
2410081M15RIK	8.4	8.8	7.5	8.5	7.2	6.1	7.6	6.5	6.2	5.8	5.9
2410116G06RIK	11.1	12	8.4	10.9	7.7	6.2	9.4	7.6	6.8	N/A	N/A
2410146L05RIK	12.2	13.2	7.4	11.6	7.2	N/A	10.36	4	7.1	N/A	N/A
2610305D13RIK	10.4	10	8.4	9.1	7.5	7.4	10.18	6	7.9	7.6	7.7
2610528J11RIK	6.9	8	N/A	7.5	5.9	N/A	7.2	N/A	6	N/A	N/A
4930572J05RIK	9.7	9.3	9.5	9.1	8	N/A	9.7	8.3	6.9	N/A	6.7
6430527G18RIK	N/A	9.4	N/A	N/A	8.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
9530058B02RIK	7.8	7.5	8	7.6	6.4	6.7	8.1	7.7	7.6	7.9	7.7
A930010I20RIK	10	10.5	9.6	9.3	8.1	8.3	9.7	10.78	1	7.5	8.9
AA467197	8.6	9.7	7.1	8.7	6.1	N/A	9	7.8	6.3	N/A	N/A
ABCB1B	9.7	9.4	8.8	9	7.9	7.6	10.27	8	9.1	7.7	7.3
ACTA1	7.9	8.5	N/A	7.9	6.1	N/A	7.9	N/A	7.7	N/A	N/A
ADAM23	9.1	9	6.3	8.3	6.3	6.5	8.3	6.6	N/A	N/A	6.6
ADRB3	6.7	7	N/A	N/A	6	N/A	6.5	N/A	N/A	N/A	N/A
AHNAK2	9	9.7	7.9	8.8	7.9	7.3	8.8	6.9	8.6	6.7	6.3
AI467606	8.1	8.6	N/A	7.3	6.2	N/A	6.7	N/A	N/A	N/A	N/A
AKAP12	13	13.2	11.6	12.1	10.7	10.1	12.9	11	12.6	11.9	11.2
AKP2	8.8	10.3	7.4	9.1	7.8	8.6	7.7	8.3	8.4	8.9	9.4
AKR1B8	7.5	7.6	6.4	7.9	6.6	6.9	6.8	6.2	8.1	7.4	7.1
AMN	9.1	8.3	N/A	8.6	6	N/A	9	6.6	7	6.4	N/A
ANGPTL4	8.6	8.8	6.9	8.3	6.4	N/A	8.2	7.5	6.4	6.2	6.6
AOAH	9.1	9.4	6.6	8.6	6	N/A	8.2	6.2	N/A	N/A	N/A
AP1M2	9.4	9.7	9.1	9.1	8	6.7	9.8	8.7	7.9	6.5	6.5
APOA2	9.4	9.6	8.3	8.8	7.8	7.2	8.6	7.1	6.4	N/A	N/A
APOC1	9.9	10.6	8.9	9.9	8	7.3	9.5	8.1	8.3	7.5	7.6
ARHGFE3	10.2	10	7.2	9.4	7.2	6.7	9.3	6.6	8.9	8.6	8.1
ARHGFE4	8.7	9.2	7.6	8.2	7.1	6.8	9.3	8.3	8.1	8.1	8.1
ASAH3L	7.7	8.2	6.2	7.4	6.5	6.5	7.2	6.2	6.6	N/A	N/A
ASS1	11.3	11.9	10.4	10.8	9.6	8.9	11.5	10.5	10.59	1	8.4
ATAD4	7.5	8.8	6.1	8.1	5.9	N/A	7.8	N/A	6.4	N/A	N/A
ATF3	8	7.3	7.1	7.5	6.1	N/A	7.7	6.6	7.1	N/A	N/A
ATG9B	9.3	10	7.7	9.6	7.5	6.2	8.8	7.6	8.8	7.2	6.3
ATP1B1	11.6	11.8	10.5	11.2	9.5	7.6	11.99	1	9.7	7.9	6.9
AVP1	10.3	10.1	9.2	9.4	8.4	8	10.18	8.5	8.2	8	
AXUD1	11	10.7	10	10.7	9.4	8.9	10.58	9.8	9.2	8.9	
BC066107	6.4	6.9	N/A	N/A	6	6.6	6.9	6.2	6.4	7	6.8
BLVRB	12.5	12.5	11.8	11.8	10.6	10.2	12.4	11.9	11	11	10.8
BSPRY	7.6	7.5	7.2	7.3	6.1	N/A	7.7	6.1	N/A	N/A	N/A
BTBD11	9	10.28	3	9.7	8.4	7.5	8.2	6.7	7.4	6.8	6.9
C2	8.2	9.8	6.6	8.5	6.9	N/A	8.7	6.2	8.2	6.4	N/A
CAPN5	8.3	9.5	7.3	8.7	7.7	6.6	8.6	7.4	10.4	10.6	9.5
CBS	8.2	8.1	7.8	7.7	6.3	5.6	8.5	6.9	5.7	N/A	5.6
CBX7	10.5	10.7	9.3	9.9	8.2	7.2	10.27	8	8.2	7.9	7.6
CCDC92	10.1	10.1	9.3	10.19	8.1	9.8	7.8	8.2	7		

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
CLDN4	13.3	13.8	12.9	13.3	12.3	10.8	12.7	11.1	11.9	9.7	8.7
COL18A1	11.6	11.8	10.3	11.3	10	9.9	11.4	N/A	11.2	10.9	10
CTGF	12.4	11.9	11.5	11	10.1	18.8	12.1	19.9	11.4	9.9	9.6
CXCL16	9.7	9.3	7.9	8.6	7.4	N/A	9.6	6.9	8.7	N/A	N/A
CYB5R1	9.7	9.2	9.5	9.1	7.9	8.7	9.7	9	8.1	8.2	8.7
D030074E01RIK	7.5	8.9	6.7	7.9	6.6	6.8	7.5	7	7.9	7.1	6.7
D14ERTD668E	7.3	8.6	N/A	7.4	5.8	N/A	6	N/A	N/A	N/A	N/A
D930005D10RIK	8.8	8	7.7	7.2	6.2	6.5	9.6	8.3	8.3	8.5	8.1
DGKA	9.5	10.3	8.6	9.6	8.5	7.9	9.4	7.9	9.3	8.1	7.8
DIDO1	8.5	8.4	N/A	N/A	7	7.5	8.4	N/A	7.7	N/A	N/A
DNAJC6	9.2	10.6	6.2	9.6	5.8	N/A	8.4	N/A	5.9	N/A	N/A
DNMT3L	12.8	13.3	12.3	13.7	N/A	11	N/A	7.7	6	N/A	N/A
DOT1L	8.5	8.6	8.1	8.5	7.5	8	8.8	8.6	8	8.2	8.3
DPPA5	15.4	16.1	12.3	15	11.8	9.2	14.2	11.1	10.8	8.5	9.1
DUSP1	11.8	11.8	10.5	11.3	9.9	9.1	11.4	10.2	10.2	9.4	9.4
EG434197	7.9	8.9	7.1	8.1	6.7	N/A	7.3	6.5	5.9	5.9	N/A
ELAVL2	9.1	9.8	9	9.4	8.4	7.9	8.8	7.7	N/A	7	7
ELF3	7.3	8.3	6.9	7.7	6.6	5.7	6.9	6.4	6.7	6.7	6.4
ENOX1	8.6	9	N/A	8.6	6.4	N/A	7	N/A	5.9	N/A	N/A
ENPP2	8.8	8.3	8.1	7.8	6.6	N/A	8.8	6.4	N/A	N/A	N/A
EPHX1	8.5	9.5	7.4	8	6.8	6.9	8.8	7.2	7.2	6.2	6.2
ESRRB	12.5	13.9	8.9	12.6	8.9	N/A	10.9	7.1	8.3	7.1	N/A
ETV5	9.4	9.6	9.1	9.5	8.5	8.5	9.4	9.5	7.7	7.9	8.6
EXOC3L	8	7.9	7.2	7.4	6.2	N/A	6.8	7	N/A	6	N/A
FABP3	12.3	13.3	10.1	11.2	9.4	7.5	12.5	9.1	11.5	9.1	8.1
FANCI	6.8	7.5	7	7.2	6.3	7.1	7.5	7.1	7.8	7.8	7.4
FBXO15	10.5	11.7	8.5	10.6	7.5	6.4	8.9	7.2	6.6	5.9	6.2
FBXO2	9.1	8.6	8.2	8.8	7.6	7.3	9.5	7.7	7.7	6.9	7
FGF17	8.5	7.9	8.4	N/A	6.9	N/A	8.3	7.1	5.8	N/A	N/A
FOLR1	8.6	8.8	6	7.8	5.8	N/A	7.7	N/A	6.6	N/A	N/A
FOXQ1	7.8	7.6	7.2	7.7	6.1	6.6	7.1	6.9	7.6	6.2	N/A
FPGS	10.8	10.7	10.2	10.4	9.4	9.7	10.9	10.2	10.5	10.5	10.6
GAB1	12.8	13.2	11.5	12.5	11.3	11.3	12.5	10.5	11.6	11	10.9
GADD45A	10.4	10.5	8.9	10	8.9	8.9	9.9	8.1	8.2	8	8.4
GADD45G	9.4	9.7	7	9.8	8.6	9.7	8.8	N/A	11.4	10.5	9.1
GCLM	11.8	11.4	11.1	11.1	11.2	9.6	8.7	11.5	10.2	10.1	9.3
GDF3	11.2	11.3	11.3	10.6	10.2	6.5	N/A	10.3	6.5	N/A	N/A
GJB3	10.3	11.7	9.4	10.8	9.7	9.9	9.2	9.9	9.6	9.4	9.4
GLDC	12.7	13	12.4	12.8	11.7	9.3	12.8	11.9	10.6	10.1	9.8
GLS2	8.7	9.2	8.2	8.5	7.2	6.3	9.4	7.3	7.3	6.8	6.6
GM129	9.3	9	7.3	8.7	7.3	6.9	8.7	7.7	7.4	7.5	7.9
GNA15	7.7	8.4	6.9	7.8	6	N/A	6.8	6.9	6.5	N/A	N/A
GPRC5A	8.9	8.8	7.6	8.6	7.6	6.3	8.5	N/A	9.1	6.6	N/A
GRAMD1B	7.3	7.8	6.2	7.2	6.2	6.4	7	N/A	6.3	N/A	N/A
GSTM2	11.3	12.3	9.9	11.3	10.3	9.9	10.7	9.1	8.8	8.9	9.3
GSTP2	9.6	10.8	6.5	9.8	6.6	N/A	8.3	N/A	N/A	N/A	N/A
GSTT2	9.5	10.2	8.3	8.9	7.9	7.5	9.6	7.8	7.5	7.7	7.4
GTSF1L	9.1	9.8	6.9	8.9	6.4	N/A	7.6	6.3	N/A	N/A	N/A
H2-BL	7.2	7.2	6.6	N/A	5.9	N/A	7	N/A	N/A	N/A	N/A
HECA	6.2	7.1	N/A	N/A	6.1	6.2	6.7	6.2	6.7	6.3	6.6
HELB	N/A	10.29	N/A	8.8	N/A	N/A	N/A	N/A	9.1	9.2	9.2
HIP1R	7	7.3	6.8	7.1	6.1	6.1	7.1	6.4	6.2	6	N/A
HMGB2L1	11.8	11.2	11	N/A	10.1	N/A	11.4	10.7	10.6	10.4	10.4
HSPB1	11.1	11.4	10.3	11.1	10.8	8.8	10.8	10.3	10.3	8.3	8.3
HSPBAP1	12.2	12.2	11.7	11.8	10.7	10.6	12	11.4	11	11	11
IER3	10.1	9.8	9.1	9.4	8.2	7.2	9.8	8.2	9.7	7.8	7.4
ILDR1	6.5	7	5.7	6.6	5.7	N/A	6.3	N/A	5.8	N/A	N/A
IMPA2	8.8	9.3	8.6	9	7.6	7.7	8.7	8.7	8.2	8.4	8.4
INA	8.3	8.3	7.4	8	6.9	6.3	7.8	6.4	N/A	N/A	N/A
ITGB4	8.1	9.2	7.3	8.4	7.1	N/A	8.3	6.3	8.1	6	5.6
ITPK1	10.3	10.5	9.7	10.1	9.6	10.2	9.9	9.3	9.5	9.8	9.8
JMJD2C	8.6	8.2	7.3	8	6.9	6.2	8.4	7	6.8	6.8	6.8
KLF2	10.9	11.9	7.8	11.1	8.4	6.1	8.6	N/A	7.3	7.1	6.3
KLF5	11.3	11.8	10.4	10.5	9.4	8.8	10.6	9.4	9.8	9	8.5
KLF9	11.4	11.7	9.8	10.5	8.6	8.4	11.3	10	9.4	8.4	8.3
KNDC1	10	11.1	7.8	10.1	8.6	6.3	9.6	6.5	7.7	6	N/A

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
L1TD1	12.6	12.1	12.3	12.2	12	10	8.1	12.6	11.9	8.8	8.5
LAD1	7.7	8	7.3	8.1	6.8	6.7	8	7.2	7.8	7.7	7
LAPTM5	10.7	11.9	9.6	10.5	7.9	6.8	9.7	N/A	8.6	6.8	6.6
LIPH	7.6	8.3	6.7	7.4	6.4	N/A	6.6	N/A	5.9	N/A	N/A
LOC100044257	6.9	7	6.6	7.1	5.9	6.1	7	6.2	N/A	N/A	N/A
LOC100046049	7.8	8.7	N/A	8.1	6	N/A	6	N/A	N/A	N/A	N/A
LOC100047619	13.8	13.4	13.3	13.4	12.4	12.4	13.7	13.5	13.1	13.3	13.4
LOC100047762	7.4	7	7.2	7.1	6.1	6.6	7.3	7.5	6.4	7.1	6.9
LOC216963	6.4	7	6.7	N/A	6.1	6.1	6.5	6.6	7.1	6.8	7
LPL	9	9.5	8.7	9.9	7.7	7	10.1	8.1	8.9	8.5	8.3
LRRC8	6.2	7	N/A	N/A	6.1	6.2	6.7	N/A	6.3	6	6.1
LRRFIP1	7.5	7.8	6.8	N/A	6.6	7.1	7.7	6.6	8.9	8.6	8.2
LTBR1	8.6	9.4	7.8	8.7	7.4	7.1	8.4	7.5	7.6	6.8	6.8
MANBA	10	11.1	7.9	9.9	8.3	7.7	8.8	6.8	7.6	6.6	6.9
MAPK13	8.3	9.2	7.9	8.6	7.6	6.4	8.7	6.8	6.7	6.5	N/A
MAPK8IP2	7.7	8	6.9	8.4	6.4	N/A	8.2	7	8.3	8.7	8.2
MAPKAPK3	11.1	11.2	10.3	10.4	9.4	9.2	11.2	10.3	9.8	9	9.3
MEF2B	8.3	8.3	6.8	7.5	6.2	N/A	8.4	6.6	6.7	6.6	6.6
MKRN1	9.4	9.3	8	8.6	7	6.1	8.9	6.5	6.5	6.6	6.6
MREG	10.2	11.2	8.2	10	8.1	6.8	9.8	8	8	6.6	7
MSRB2	8.5	9	7.6	8.7	7.8	7.1	7.7	7.6	7.3	6.8	6.7
MT2	8.9	9.7	8.7	9.3	7.9	6.5	8.1	7.1	6.1	6.5	N/A
MTA3	11.3	11.9	10.5	11.3	10.1	10	10.9	10.6	11.2	11.1	10.7
MTHFD1	12.7	12.6	12.8	12.5	11.5	11.5	12.9	12.3	11.5	11.6	11.5
MTHFD2	10.3	9.7	9.5	9.5	8.5	8.7	10.2	9.9	9.3	9.5	9.7
MVP	9.4	10	8.2	9.6	8.5	8.3	9.1	7.5	9.5	8.8	8.1
MYBL2	10.1	10.9	8.4	10	8.1	N/A	9.2	8.6	9.1	9.2	8.9
MYD116	9.7	10	8.9	9.7	8.8	8.5	9.7	8.9	9.7	9.4	9.1
MYLPF	10.6	11.7	6.7	10.2	7.3	N/A	7.5	N/A	6.8	6.9	6.6
NANOG	11	11.8	10.6	10.5	8.4	7	11.1	10.6	6.7	6.7	7.2
NDG2	13.5	14	12	13	10.9	9.6	12.9	11.5	10.4	10	8.9
NDP52	7.4	9	N/A	8.3	6.3	N/A	6.2	N/A	N/A	N/A	N/A
NFATC2IP	8.2	8.8	7.1	7.8	6.3	6.5	7.5	6.9	6.1	N/A	7
NOD1	9.4	9	7.9	8.3	6.8	N/A	8.1	6.5	N/A	N/A	N/A
NPAL2	8.4	8.4	8.4	8	6.7	N/A	8.6	7.4	7.3	N/A	N/A
NR2C2AP	9.9	9.9	9.3	9.8	8.6	8.8	9.7	9.1	8.9	8.8	8.8
NUPR1	11.1	10.9	7.3	9.3	7.9	7.8	10.4	6.6	7.1	6.1	6.4
OSTF1	10.4	10.9	9.5	10.1	9.1	8.5	10.5	9.4	9.5	8.7	8.4
OXC1	10.8	10.9	10.5	10	9	8.6	11.1	10.7	9.6	9.1	8.9
PCGF5	10.7	10.9	10	10.3	9.2	8.6	11.2	10.2	11.9	11.4	10.6
PDK1	9.9	10.6	9.2	9.8	8.6	8.2	9.3	9	9.2	9.3	9.5
PDLM1	12.2	12.7	10.9	12.4	10.7	10.3	11.9	10.6	12.4	11.7	10.7
PDYN	6.6	7.4	N/A	6.6	5.7	N/A	5.9	N/A	N/A	5.9	N/A
PHC1	11.9	11.8	11.8	11.7	10.7	10.1	11.8	10.8	10.2	10.5	10.3
PHF17	11.4	N/A	10.1	10.7	9.7	N/A	N/A	9	9.9	N/A	9.3
PHF19	7	7.6	6.4	7.3	6.1	N/A	6.2	N/A	6.2	6	6.1
PKP3	7.6	7.9	6.6	7.4	6.4	N/A	7.4	N/A	7.4	5.9	N/A
PLA2G1B	11.9	12.1	10.8	7.5	N/A	11.1	11.8	11.1	6.2	N/A	N/A
PLAC8	9.5	9.3	8	9.3	8.1	7.5	9.4	9.4	9.8	8.8	8.4
PLCG2	9.9	10.1	10	9.8	8.8	8.6	10.2	9.1	7.7	8	7.9
PLCH2	6.7	7.9	N/A	7.4	6.1	N/A	6.5	N/A	N/A	N/A	N/A
PLEKHG5	8.5	9.7	7.4	8.8	7.6	7	8.5	6.8	7.5	7.1	6.9
PMM1	11.8	12	10.5	11.2	9.8	9.6	11.2	10.1	10	9.7	9.7
POU5F1	12.9	12.6	12.4	12.2	10.3	9.2	12.8	11.9	8.5	8.6	9.3
PPAN	8.1										

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
RPP25	11.2	11.892	11	8.4	7.3	10.58	8.8	8.1	8.2		
RRAGB	10.3	10.497	10.49	9.1	10.291	8.9	9.3	9.5			
RRAGD	8.8	9.2	7.8	8.7	7.7	8.1	8.9	8.8	8.6	8.3	8
SDC4	10.4	11	9.3	10.6	9.3	7.8	9.9	8.3	9.3	8.6	8.1
SEMA4A	8.2	7.9	6.9	8	6.7	6.5	8.5	7	7	6.8	6.8
SEMA4B	11.1	11.8	10.1	11.1	10.2	10.294	10.8	9.6	10.1	10	9.9
SERPINB6C	6.9	7.9	N/A	8.1	6.7	N/A	6.1	N/A	N/A	N/A	N/A
SH3TC1	7.3	8	7.1	7.8	6.9	N/A	7.5	N/A	7	N/A	N/A
SLC25A12	7.5	7.7	6.8	7.4	6.2	7.1	6.5	6.2	7.1	6.7	6.8
SLC29A2	7.8	7.7	7.8	7.8	6.7	7.4	7.7	7.7	7	7.2	7.8
SLC35F2	7.2	7.6	6.8	7.6	6.2	N/A	8.1	6.2	6.1	N/A	N/A
SLC7A3	12.6	12	N/A	12.3	9.6	7.6	12.3	9.7	9.8	10.1	9.8
SMPDL3B	10.6	11.2	8.8	10.3	7.8	7.6	9.8	7.7	8.2	7.4	7.8
SNAI3	10.4	10.2	8.9	9.2	7.7	N/A	10.6	7.5	7.4	6.6	N/A
SNX30	8.6	9.5	7.7	8.5	7.3	7.4	8.9	7.5	8.4	8	7.9
SORD	9	9.5	7.7	8.2	6.9	7	9	8.1	7.4	7.2	7.1
SOX2	6.3	7	N/A	6.7	5.7	N/A	5.6	N/A	N/A	N/A	N/A
SP1	6.5	7	N/A	N/A	6	6.3	6.4	6.3	5.9	6.1	6.1
STAG3	8.2	9.3	7	8.3	6.9	6.9	8.2	7.2	7.3	8.2	8
STC2	9.3	8.1	7.7	8.2	7.1	7.1	9.3	7.4	7.4	7.4	7.5
STX3	10.2	10.3	9.4	N/A	9.2	8.1	10.3	9.1	8.5	8	8.3
SULT2B1	6.3	6.6	5.9	6.6	5.7	5.5	6.1	N/A	5.4	5.5	5.4
SYN1	8.2	8.2	7.4	7.6	6.6	N/A	7.8	6.8	6.6	5.7	6.1
SYNGR3	8.7	8.6	7.5	8.6	7.7	7	8.9	6.8	7	6.9	N/A
SYT9	9	9.3	8.1	8.6	6.4	6.4	8.8	6.8	6.6	6	N/A
TBX3	7.1	8.2	N/A	6.6	5.5	N/A	7.5	8.6	9.4	9.3	9
TCFAP2C	10.5	12.2	9.3	11	8.8	7.9	9.1	10	9.1	8.6	7.9
TCFE3	9.4	8.8	8.8	9.2	7.9	8.1	9.1	8.2	8.2	7.9	7.9
TDRD12	10.5	11.5	6.4	10.2	7.1	N/A	8.3	N/A	6.6	6	N/A
TEX19	10.3	10.7	6.9	10.1	6.4	N/A	8.7	6.3	6.8	N/A	N/A
THY1	9.2	9.1	7.4	9.2	7.2	6.6	9.8	7.3	8.1	7.4	6.8
TIMP1	10.2	10.4	9.3	10	8.9	9.2	10.2	8.9	9.2	8.6	9
TJP3	6.6	7.9	5.8	7.4	5.8	N/A	7.4	N/A	6.1	N/A	N/A
TMEM16J	7.8	8.6	6.5	7.5	6	N/A	8	N/A	N/A	N/A	N/A
TMEM54	9.3	7.9	7.9	8.3	6.8	N/A	8.9	6.7	7.7	N/A	N/A
TMPRSS13	7.6	8	6.5	7.3	6.3	N/A	7.3	5.7	6.8	5.6	N/A
UBD	7.8	9.3	6.3	7.6	6	N/A	7	N/A	N/A	N/A	N/A
USP28	9.7	10.3	8.6	10	8.7	8.8	9.7	9.1	8.5	8.8	8.9
UTF1	11.3	11.7	9.7	11.1	7.8	N/A	10.9	7.1	6.9	N/A	N/A
WHDC1	8.1	8.5	7.4	7.6	6.5	6.4	8.1	7.2	7.4	7.3	6.6
WNT7B	7.8	7.9	N/A	7.6	6.1	N/A	7.9	N/A	8	N/A	N/A
WWC1	8.4	7.9	7.7	7.9	7	6.3	8.6	7	6.9	6.5	N/A
ZFP296	8.9	9.7	7.2	9	6.3	N/A	7.9	6.8	6.5	6.3	6.3
ZFP42	8.5	9	N/A	8.3	6.2	N/A	7.9	6.2	5.9	N/A	6.1
ZFP750	7.9	8.9	N/A	8	6.1	N/A	7.3	N/A	6.4	N/A	N/A
ZSCAN10	11.3	11.3	10.8	11.1	10.2	9.8	10.9	11.1	9.6	9.8	10.4
ZSWIM1	10.2	10.9	9.7	10.3	9.2	9.2	9.7	9.7	9.1	8.9	9.2

### WNT3a/Noggin, 96Std, Msgn1, aktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
6230427J02RIK	N/A	6	7	6.7	8.3	9.7	N/A	8.5	7.6	8.1	9
ALDH1A2	N/A	N/A	N/A	6.1	7.7	9.6	N/A	N/A	5.9	6.5	7.9
ANPEP	6.6	6.3	N/A	N/A	7.2	8.4	7.1	9.5	8.5	8.7	9.3
APH1B	N/A	N/A	N/A	N/A	6.4	7.4	N/A	6.4	6.7	6.3	6.6
ARG1	N/A	N/A	8.7	7.8	10.4	11.6	N/A	6.8	N/A	6.4	7.5
ATP2A1	6.1	6.4	6.9	N/A	6.9	8.2	N/A	6.8	7.3	7.8	8
BC039093	9.6	9.9	10.6	10.8	12	13	9.9	11.5	11.6	11.6	11.6
BC089491	N/A	N/A	6.4	6.6	6.5	7.6	N/A	6.9	N/A	N/A	6.8
BGN	6.3	6.5	7	6.8	8.1	9.6	6.9	7.5	7.7	7.6	7.9
CD248	N/A	N/A	N/A	N/A	8.2	9.3	N/A	N/A	8.3	N/A	N/A

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
CHRNA3	N/A	N/A	N/A	N/A	6	7.9	N/A	N/A	N/A	N/A	7.5
CHST2	7.1	6.7	6.9	6.6	7.5	9	7	10	7.7	7.8	8.4
CHST7	7.4	N/A	9.2	7.5	9.4	11.1	6.9	10.9	7.2	8.7	10.5
CITED1	6.9	6.5	7.1	7.6	7.7	8.7	6.5	7.1	7.1	6.8	8.3
COL23A1	N/A	N/A	N/A	N/A	7.8	9.2	N/A	8.1	7.1	7.5	8.2
COL5A1	9.6	8.6	9.8	9.3	10.3	11.2	9.9	9.7	11.1	10.6	10.8
CRABP1	N/A	N/A	N/A	6.8	7.6	9.3	6.3	7.7	8.2	9.1	9.7
CYP4F15	N/A	N/A	6.7	N/A	7.2	8.7	N/A	7.5	N/A	7.1	8
DGKG	N/A	N/A	N/A	N/A	6	7.7	N/A	6.3	N/A	N/A	7
DLL1	6.2	6.8	N/A	6.6	7.8	9.7	N/A	7.6	N/A	6.1	7.3
DLL3	N/A	N/A	N/A	N/A	6.1	7.2	N/A	6.4	N/A	N/A	N/A
EDNRA	N/A	N/A	6.9	7.5	9.2	10.2	6	7.4	9.2	8.8	8.6
EMID2	N/A	6.1	N/A	7.1	9	10.6	N/A	6.6	9.4	9.3	9.2
EMILIN2	N/A	N/A	N/A	N/A	6.2	7.4	6.6	6.9	7.9	7.4	7
FBN1	6.2	6	6.7	6.5	7.4	8.4	6.6	6.8	8.4	8.4	7.6
FGF10	5.6	5.6	6.3	6.3	7.3	8.8	N/A	10.6	9.1	9.5	10
FOXC1	N/A	N/A	6.5	7.4	9.5	11.2	6.4	8.2	6.5	7.5	9.4
FOXC2	N/A	N/A	N/A	N/A	6.8	8.3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
HOXA2	N/A	N/A	6.4	6.4	7.9	9.3	N/A	N/A	5.6	6.6	7.9
HOXB1	N/A	N/A	8.7	7.3	9.9	11.3	N/A	8.6	9	10.1	10.8
HOXB2	6.1	6.1	7.8	7.9	9.6	10.9	N/A	8.4	10.4	10.8	10.7
HOXB5	N/A	N/A	N/A	6.8	8.2	9.6	N/A	N/A	10.1	10.1	8.9
HOXD3	N/A	N/A	N/A	N/A	6.6	8.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
HOXD4	N/A	N/A	N/A	N/A	6.2	7.8	N/A	N/A	N/A	6.7	6.9
HOXD9	N/A	N/A	N/A	N/A	6.4	7.6	N/A	N/A	8.7	8.9	10.3
HS3ST3A1	N/A	N/A	N/A	N/A	8.1	9.5	N/A	7.2	8.3	8.5	9.1
IGFBP4	7	7.1	8.3	9.3	10.9	12.5	7.4	11.3	12.2	12.1	12.3
IGSF21	N/A	N/A	N/A	N/A	6.5	7.4	N/A	N/A	8.3	8.1	6.8
LHFP	6.5	N/A	6.7	6.1	N/A	7.8	6.7	8	7.3	7.2	7.6
LMO2	7.1	7.3	9.6	8.4	10	11.5	7.3	7.7	9	9.4	9.2
LOC100045484	N/A	N/A	N/A	N/A	6.9	8.7	N/A	7.6	N/A	7.4	9.2
LOC100046120	10.4	9.6	10.5	10.5	12.7	13.7	10.6	9.6	9.2	11.1	
LOC100047651	9.8	9.8	10	10.1	10.4	11.6	10.6	12.2	12.2	12.7	12.6
MAP3K6	6.3	6.6	N/A	6.9	7.4	8.7	6.4	7	6.7	6.9	7.5
MEIS1	6.4	6.5	N/A	7.8	9.1	10.5	6.5	7.4	10	10.6	10.3
MEIS2	8.1	8.2	10	10.3	11.6	12.6	7.9	11	11.5	11.8	11.9
MEOX1	N/A	N/A	N/A	9.3	11.6	13.2	N/A	N/A	6.6	8.2	
MESP1	N/A	N/A	N/A	N/A	7.8	9.5	N/A	12.1	7.8	9.7	11.1
MFAP4	6.5	6.5	7.1	7.3	9.2	10.2	8.1	7.7	7.6	9	
MMP2	9.5	9.2	10.7	10.4	11.9	12.8	10.3	11.1	12.2	12.3	12.8
NBL1	7.1	6.2	6.3	N/A	6.7	7.7	7.1	N/A	6.9	N/A	N/A
NGFR	7.5	7.3	6.4	7.5	7.3	8.6	6.7	6.3	6.3	6.5	7.6
NKD2	6.9	6.5	7	6.8	7.4	9.3	7.3	8.1	6.4	6.8	8
NKX3-1	6	6.2	6.4	7.4	8.6	9.7	6.5	6.6	N/A	6	6.6
NOTCH1	6.7	6.6	7	7.3	8.7	9.7	6.7	8	7.1	7.2	8.1
NRARP	8.5	8.4	9.4	8.8	9.9	11	9.2	10.1	8.2	8.7	9.6
PCOLCE	7.5	7.4	7	6.9	7.3	8.7	7.9	6.8	8.4	7.2	7.2
PDGFRA	6.6	6.7	6.5	8.3	9.5	11.4	N/A	11.5	10.8	10.7	11
PLXNA2	6.1	6.2	9.1	8	9.6	10.7	6.7	10.7	9.8	9.9	10.5
PNLIPRP2	N/A	N/A	5.7	N/A	7	8.2	5.9	6.6	7	7.8	9.1
PTGES	5.9	5.9	5.9	5.8	6	7.2	5.8	N/A	7.3	6	6.3
PTHR1	5.4	5.6	N/A	6.7	6.5	7.7	N/A	6	6.3	6.5	6.2
RASGRP3	N/A	N/A	N/A	6.4	7.8	9.3	N/A	8.4	6.9	7.6	8.8
RELN	7.3	6.4	6.8	7.1	7.8	9	7.6	7.5	7.4	7.3	7.8
RFTN1	N/A	N/A	7	N/A	7.6	9.2	6.3	10.2	8.3	9.2	10.1
SFRP5	N/A	N/A	N/A	N/A	6.1	7.3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
SLCO2B1	N/A	N/A	N/A	N/A	6.2	7.8	N/A	N/A	6.5	N/A	6.8
SNAI1	N/A	6.7	N/A	N/A	8.2	9.7	N/A	10.2	8	8.6	9.6
ST6GALNAC4	N/A	5.9	6.4	5.8	6.4	7.7	6.1	8.8	7.1	7.5	8.3
STRA6	N/A	N/A	N/A	6.6	8.4	9.8	N/A	N/A	N/A	N/A	6.6
TBX1	N/A	N/A	N/A	6.6	7.3	8.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TBX6	N/A	N/A	N/A	N/A	7.5	9.6	N/A	8.2	N/A	6.6	8.4
TCF15	8.4	7.7	8.2	8.6	10.6	12	8	7.5	N/A	6.3	7.3
TGFB1	N/A	N/A	N/A	N/A	7.7	8.7	N/A	N/A	8.4	N/A	7
TMEM132C	N/A	N/A	N/A	6.6	8.5	9.8	N/A	N/A	8.1	7.9	7.9

Gensymbol	48Std_WN	nt_72StdWN	T_72StdWN	nt_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nt_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
TNS4	N/A	N/A	N/A	6.4	6.6	8.4	5.9	8.2	7.5	7.2	7.3
TWIST1	7.4	6.5	8.3	8.2	9.7	10.7	7.4	9.3	9	9.2	9.8
UNC5C	N/A	N/A	N/A	N/A	6.7	8	N/A	6.3	12.4	12.5	12
UNCX	N/A	N/A	N/A	N/A	6.4	8.4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
WNT5A	N/A	N/A	7.9	7.8	9.4	10.5	N/A	10.9	10.4	10.6	11.3
ZEB1	7.9	7.5	7	8.1	9.3	10.6	7.4	8.7	10.3	10.2	10

### WNT3a/Noggin, 96Std, Msgn1, deaktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nt_72StdWN	T_72StdWN	nt_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nt_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
1700027A23RIK	N/A	N/A	8.4	7.8	9.9	6.4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2410081M15RIK	8.4	8.8	7.5	8.5	7.2	6.1	7.6	6.5	6.2	5.8	5.9
2410116G06RIK	11.1	12	8.4	10.9	7.7	6.2	9.4	7.6	6.8	N/A	N/A
3110043J09RIK	9.2	8.6	9.1	8.7	8.5	7.1	9.4	N/A	9.1	8	6.9
4732456N10RIK	6.1	N/A	N/A	8.1	8.7	6.3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6430550H21RIK	N/A	N/A	N/A	N/A	7.7	6.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
A030007L17RIK	9.5	8.5	9.1	8.8	8.5	7.1	9	8.6	6.8	7.1	7
AES	8.3	8.6	8.4	8.7	8.8	7.3	8.9	8	7.6	6.9	6.4
AIM1	N/A	N/A	7.3	N/A	7.3	6.2	6.5	N/A	6.3	N/A	N/A
ANGPTL2	N/A	N/A	N/A	N/A	7.5	6.2	N/A	N/A	6.8	6.7	6.4
ANKRD56	9.1	9.5	8.2	8.9	8.3	6.9	9.6	6.7	9.7	9.2	9
AP1M2	9.4	9.7	9.1	9.1	8	6.7	9.8	8.7	7.9	6.5	6.5
ARL4C	9.9	8.7	10.1	9.4	8.4	7.2	10.3	8.3	9.9	9.6	8.3
ATG9B	9.3	10	7.7	9.6	7.5	6.2	8.8	7.6	8.8	7.2	6.3
ATP1B1	11.6	11.8	10.5	11.2	9.5	7.6	11.9	9.1	9.7	7.9	6.9
B3GNT7	8.9	8.9	9.4	8.8	9.1	7.4	8.8	8.4	7.8	7.6	7.7
BCAM	8.2	7.9	8	7.8	7.5	6.5	8.6	6.8	8.1	7.3	6.4
BEX4	13.7	13.2	13.5	13.5	13.1	11.8	13.7	13	13.1	12.8	12
BIK	8.6	7.9	8.5	8.1	8.2	7	8.4	7.2	6.6	6.4	6.8
BST2	9.4	9.6	9.5	9.1	9.1	7.6	9.3	8.1	7.6	7.6	7.4
CAMK2B	8.5	9.1	8.2	8.6	7.7	6.6	8.6	6.6	N/A	6	N/A
CBX7	10.5	10.7	9.3	9.9	8.2	7.2	10.2	7.8	8.2	7.9	7.6
CDH1	11	10.8	10.9	10.8	10.6	9.2	10.8	10	9.3	8.2	8
CDKL2	N/A	N/A	6.6	N/A	7.2	5.6	6.7	N/A	6	N/A	N/A
CDS1	9.7	10.7	8.7	9.2	8	6.9	9.4	8.7	8.2	7.6	7.2
CHRN1	9.8	9.1	9	8.9	8.6	7.3	9.5	7	8.4	7.1	N/A
CKMT1	9.7	10.6	9.1	9.9	8.5	7.3	10	8.6	9.1	6.8	6.7
CLDN4	13.3	13.8	12.9	13.3	12.3	10.8	12.7	11.1	11.9	9.7	8.7
CLDN6	12.9	12.6	12.9	13.1	13.4	11	12.9	10.7	11.5	9.3	8.5
CLIC6	8.4	9	8.2	9.3	8.8	7.3	8.8	7.1	8.5	7.9	6.5
CORIN	N/A	N/A	N/A	N/A	8.2	6.6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CRIP2	11.9	11.7	11.8	11.5	11.2	10.1	12.2	10.5	11.6	11	9.8
CTGF	12.4	11.9	11.5	11	10.1	18.8	12.1	19.9	11.4	9.9	9.6
CYB561	10.2	10.1	10.8	10.2	11	9	10.5	9.6	9.3	8.9	9
DEDD2	9.1	9.6	9.1	9.4	8.9	7.7	8.8	8.2	8.2	7.9	7.8
DENND3	8	7.7	8.1	7.8	7.4	6.2	8.3	7.1	6.9	6.9	6.9
DHX32	9.8	10.4	9.5	9.9	9.5	8.5	9.9	9.2	9.2	9	8.4
DND1	9.3	10.2	10.8	9.3	9	7.7	9	10	8.3	8.7	8.7
DOC2B	N/A	N/A	N/A	N/A	7.2	5.7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DPPA5	15.4	16.1	12.3	15	11.8	9.2	14.2	11.1	10.8	8.5	9.1
ELF3	7.3	8.3	6.9	7.7	6.6	5.7	6.9	6.4	6.7	6.7	6.4
ELL3	9.6	9.5	9.7	9.6	9.1	7.7	10.2	8.4	8.2	7.3	7.2
ERAS	9.4	9	9.5	10.2	9.3	7.1	9.2	7.5	N/A	N/A	N/A
ERCC2	7.7	N/A	7.6	7.8	7.4	6.2	7.9	6.5	6.7	6.7	6.3
ESPN	7	7.4	7.2	7.6	7.6	6.3	7.4	6.5	7.1	6.8	6.1
F2RL1	10.7	10.4	11.2	10.2	10.19	10.4	10	9.1	7.9	8.3	
FABP3	12.3	13.3	10.1	12	9.4	7.5	12.5	9.1	11.5	9.1	8.1
FBXO15	10.5	11.7	8.5	10.6	7.5	6.4	8.9	7.2	6.6	5.9	6.2
FCHO1	8.3	8.6	9	8.7	8.7	7.5	8.3	7.8	7.4	7.2	7.2
FOXA3	8.5	8.3	8.2	8.7	8.5	6.8	8.8	7.3	6.9	7.3	7
FOXJ1	6.2	N/A	7.4	N/A	7.5	6.3	6	N/A	6.2	6	N/A

Gensymbol	48Std_WN	nt_72StdWN	T_72StdWN	nt_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nt_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
GADD45B	9.1	8.6	9.1	8.1	7.3	6.1	9.3	7.6	8.8	7.2	6.9
GAL3ST1	7.4	7.3	7.3	7.3	7.7	6	7.4	6.6	7.5	6.8	6.9
GAS6	8.3	8.7	7.9	8.2	7.7	6.3	8.6	7.7	9.3	9	8.1
GJB3	10.3	11.7	9.4	10.8	9	7.7	9.9	9.2	9.9	9.6	9.4
GLDC	12.7	13	12.4	12.8	11.7	9.3	12.8	11.9	10.6	10.1	19.8
GNAZ	7	7.7	7.6	7.4	7.6	6.5	7.1	6.2	6.7	6.8	6.3
GNG4	N/A	N/A	N/A	N/A	7.6	6.7	N/A	N/A	N/A	N/A	6.5
GP38	12.5	12.4	12.1	12.2	11.5	10	12.3	11.6	11.7	10.8	10.3
GPRC5A	8.9	8.8	7.6	8.6	7.6	6.3	8.5	N/A	9.1	6.6	N/A
GPX2	10	10.3	9.5	10.9	11.5	7.5	7.6	7.1	6.1	6.5	N/A
GRB7	12	11.9	12	12.3	11.6	9.8	12	10.3	10.9	10.9	10.7
GRHL2	9.8	9.2	8.6	8.8	8	6.3	9.3	7.1	7.9	6.3	N/A
GYLTL1B	N/A	8.8	8.6	8.7	8.4	7.2	9.1	7.5	8	7.7	7.8
HSPB1	11.1	11.4	10.3	11.1	9.8	8.8	10.8	10.3	8.3	8.3	
IER3	10.1	9.8	9.1	9.4	8.2	7.2	9.8	8.2	9.7	7.8	7.4
IGFBP2	11	10.9	11.4	11.4	11.1	9.1	11.3	10.2	10.8	9.1	7.8
IL18	N/A	N/A	N/A	N/A	7.2	6.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
IL28RA	6.9	7.3	6.4	6.9	6.6	5.4	7	5.7	6.4	N/A	N/A
ITGA3	10.7	9.7	10	9.9	9.4	7.9	10.9	8.1	10.1	8.1	7.2
KCNAB2	N/A	N/A	N/A	N/A	7.2	6.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
KIF21A	7.8	7.7	7.8	7.9	7.4	6.3	8.2	7.3	6.3	6.4	6.3
KLF2	10.9	11.9	7.8	11.1	8.4	6.1	8.6	N/A	7.3	7.1	6.3
KNDC1	10	11.1	7.8	10.1	8.6	6.3	9.6	6.5	7.7	6	N/A
KRT18	11.3	11.2	11.3	11.8	12.3	9.9	11.3	9.5	12.8	12.2	10.6
KRT7	7.6	8	8.1	8.8	8.9	6.4	7.7	N/A	8.7	6.4	N/A
L1TD1	12.6	12.1	12.3	12.2	10	8.1	12.6	11.9	9.8	8.5	8.6
LOC100044177	10	10.2	10.4	10.4	10	8.5	10	9.7	10	9.3	8.3
LOC620807	10.6	10.5	10.3	9.7	9	6.4	9.8	9.6	6.9	6.9	7.1
LRRC48	5.9	N/A	N/A	N/A	7.7	6.1	6.1	N/A	N/A	N/A	6.5
LRRC8D	11.7	11.8	11.5	11.2	11.1	9.9	11.8	10.1	10.2	9.8	10
MAPK13	8.3	9.2	7.9	8.6	7.6	6.4	8.7	6.8	6.7	6.5	N/A
MCF2L	7.5	8.3	7.2	7.8	7.3	6.2	7.5	6.2	6.4	6.4	6.3
MREG	10.2	11.2	8.2	10	8.1	6.8	9.8	8	8	6.6	7
MT1	15.3	15.9	15.3	15.4	15.2	14.1	14.8	14.3	13.5	13	12.8
MT2	8.9	9.7	8.7	9.3	7.9	6.5	8.1	7.1	6.1	6.5	N/A
MYL4	7	8.1	N/A	7.8	N/A	6.6	6.9	7.9	9.6	9.9	9.5
NANOG	11	11.8	10.6	10.5	8.4	7	11.1	10.6	6.7	6.7	7.2
NDG2	13.5	14	12	13	10.9	9.6	12.9	11.5	10.4	10	8.9
NRCAM	9.1	8	9.3	8.2	7.7	6.5	9.7	8.8	N/A	N/A	N/A
NUP210	11.9	12.1	11.9	11.9	11.1	9.6	11.9	10.7	10.1	10.2	9.7
OLIG1	11.8	10.9	13.1	10.4	10.1	8.4	12.2	12	7.6	7.9	7.9
PCDH1	7.7	7	8.1	8.5	7.3	5.9	7.7	6.5	6.8	6.2	N/A
PCSK9	10.7	9	9.8	8.3	7.3	10.1	7.3	7.8	6.6	6.5	
PGA5	9.3	8.7	8.2	9.4	8.1	6.2	7.6	N/A	N/A	N/A	N/A
PHOX2A	8.2	7.6	7.8	7.5	7.2	6.2	8.5	7.2	6.8	6.9	7.1
PIK3CB	10.1	10.2	9.3	9.8	9	8	9.7	8.1	9.5	8.6	7.7
PKP2	10.6	10.4	10.5								

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
ST14	9.1	9.2	8.7	8.8	8.4	7.1	9.4	7.8	8.4	6.6	6.2
STMN2	10.9	10.2	10.3	10.9	8.8	8.9	10.6	9.3	9.4	7.7	7
STX3	10.2	10.3	9.4	N/A	9.2	8.1	10.3	9.1	8.5	8	8.3
TACSTD2	10.4	10.1	9.1	10.4	9.4	7	10.5	8.3	11.4	8.5	6.9
TGM1	9.1	8.4	8	8.4	7.5	6.5	8.5	6.4	8.6	6.2	N/A
TMEM79	8.7	8.3	7.9	8.1	7.4	6.5	8	6.8	7.8	6.2	N/A
TNFRSF12A	10.6	9.8	10.2	10	10.5	8.3	10.5	8.5	9.3	7.5	6.8
UNC13B	9.2	9	9.1	9.1	8.9	7.7	9.3	8.5	8	7.9	7.4
WFDC2	12.9	13.1	12.8	13.4	12.7	11.4	13.4	12.1	13.5	13.2	11.9

### BMP4/DKK1, 72Std, T, aktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
1110002B05RIK	8.2	7.9	8.4	8.3	8.5	8.7	7.9	9.2	8.9	9	8.7
1110012D08RIK	8.9	9	9.9	9.6	10.5	10.2	9.1	10	9.6	9.7	10
1300007L22RIK	6.4	N/A	N/A	N/A	N/A	6.3	6.5	7.4	7.2	7.6	7.5
1700007G11RIK	6.8	6.1	8.5	7.1	8.4	6.3	6.6	7.7	N/A	N/A	N/A
1700088E04RIK	6.7	6.7	9.5	8.3	10.7	8.4	6.3	7.4	7.3	7.2	7.8
2010301N04RIK	6.4	6.1	6.6	6.9	6.9	7.2	6.2	7.2	7.5	7.8	7.5
4732471D19RIK	8.2	7.6	8.5	8	8.2	8.5	8.7	9.9	8.5	8.7	8.9
4921528G01RIK	8.6	8.9	8.7	8.8	8.7	9.2	8.4	9.5	8.2	8.4	8.7
4930511J11RIK	6.3	N/A	N/A	N/A	N/A	6.6	6.3	8.4	N/A	7	8.4
4930583H14RIK	8.4	9	9.2	9.4	9.2	9.2	8.8	10.1	11.1	11.3	10.3
5133401N09RIK	9.1	8.9	10.8	9.3	10.1	9.6	9.1	10.2	9.1	9.5	9.7
6030429G01RIK	6.4	7.2	8.4	7.1	8.6	8	6.5	7.5	5.9	6.5	7.4
6330403K07RIK	7.8	7.8	9	9.2	10.4	10.4	8.3	9.4	10.1	10.2	10.8
6332401O19RIK	6.4	6.1	6.4	N/A	6.7	6.8	6.4	7.6	N/A	N/A	N/A
7420416P09RIK	9.4	8.3	9.8	9.4	9	8.6	9.6	11.2	10.1	10.2	10.7
A930010I20RIK	10	10.5	9.6	9.3	8.1	8.3	9.7	10.7	8.1	7.5	8.9
ABCD4	7	7.9	7.2	7	6.9	7.3	7.2	8.3	8.6	9	8.5
ABHD14B	8.3	9	8.4	8.5	8.6	8.8	8.4	9.7	8.9	9.1	9.3
ADRA2A	7	6.1	9.9	7.6	10.3	9.5	6.4	8.8	7	7.8	8.8
ADSSL1	6.8	7.7	8.6	7.8	8.9	9.4	8.2	9.6	10.2	10.5	10
AGTRAP	8.1	8.4	8.4	8.2	8.2	8.7	7.9	9.3	8.1	7.9	8.3
AMHR2	6.5	6.8	N/A	N/A	6.3	7	6.1	7.8	7.4	7.9	8
ANKRD37	6.6	6.7	7.1	7.3	6.9	6.7	6.4	7.5	7.4	7.7	7.6
ANPEP	6.6	6.3	N/A	N/A	7.2	8.4	7.1	9.5	8.5	8.7	9.3
APCDD1	N/A	N/A	N/A	6.7	6.7	7.1	6	7.4	9.8	9.7	9.2
ARID3B	10.6	10.5	11.9	10.8	11.9	12	10.6	11.9	11.4	11.9	11.8
ATP1B2	7.2	7	8.4	8	8.2	8.4	7.7	9	8.1	8.4	8.8
BAG3	11.4	11.4	11.4	11.5	11.9	12	11.4	12.7	12.8	12.8	12.7
BBS12	6.9	6.5	7.2	7.1	7.2	7.8	6.9	7.8	7.1	7.4	7.5
BC023829	8.6	7.2	10.3	7.9	8.9	8.8	8.9	10.1	9.2	9.5	9.8
BC039093	9.6	9.9	10.6	10.8	12	13	9.9	11.5	11.6	11.6	11.6
BC067047	6.2	6.7	7.3	7.3	8.1	8.2	7.1	9.1	7.7	8.3	8.7
BCL6	6.9	6.7	N/A	N/A	7.1	6.7	6.8	8.7	6.5	6.1	6.9
BICC1	6.4	6	9.2	8.1	10.7	10	6.2	7.4	6.8	7.3	7.9
BMP4	7.8	8.4	10.1	9.2	10.3	11	7.4	10.3	13.6	13.8	13.6
BNIP3L	10.9	11	11.7	11.7	12.1	12	10.8	12	12.4	12.4	12.4
CAR14	7.3	7.7	8.6	10.5	10.2	9.7	8.9	10.9	9.9	10.5	10.7
CASP6	8.3	8.2	9.7	9	9.9	10.2	8.8	9.7	9.6	9.6	10
CBX2	8.1	7.7	8.7	9.2	9.4	9.7	8.2	9.2	9.5	9.6	9.6
CCDC134	8.8	8.5	8.9	8.9	9.1	9.4	8.7	10	9.5	9.6	9.3
CCDC3	7.3	7.4	8.1	7.1	7.5	6.7	6.6	7.8	8.3	8.8	9.5
CCND3	10.2	10.7	10.7	11	11	11.3	10.1	11.1	11.7	11.4	11.2
CCNO	9.5	8.3	10.9	8.1	9.3	8.5	7.7	9.3	6	7.2	7.7
CD40	6.8	6.8	7.7	7.1	7.5	8.3	7.3	8.3	7.4	7.7	8.6
CD59A	7.1	7.6	6.9	8.2	7.4	6.5	6.6	7.9	8.3	8.3	8.1
CDC42EP4	10.2	10.3	10.8	10.7	11.4	12	10.1	11.1	11.4	11.4	11.8
CDX1	6.4	N/A	7.3	6.7	7.1	7.1	5.7	7	5.6	N/A	5.7
CDX2	7.7	6.7	10.9	9.1	11.6	10	7.4	9.4	11.9	11.8	12.4

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
CHST2	7.1	6.7	6.9	6.6	7.5	9	7	10	7.7	7.8	8.4
CHST7	7.4	N/A	9.2	7.5	9.4	11.1	6.9	10.9	7.2	8.7	10.5
CLDND1	8.3	7.9	8.8	8.3	8.8	9.2	8.3	9.5	9	8.8	9
CMTM6	10.1	10.4	11.3	10.2	10.4	10	10.1	11.2	10.5	10.6	10.8
CNTNAP2	6.5	6.2	7.4	7.3	8.2	7.6	6.3	7.5	N/A	6.1	6.5
CPLX1	7.2	6.7	6.9	7.4	N/A	6.6	7.5	8.8	7	7.4	7.2
CRABP1	N/A	N/A	N/A	6.8	7.6	9.3	6.3	7.7	8.2	9.1	9.7
CX3CL1	6.8	6.3	7.3	N/A	7.9	7.7	6.7	8.6	6.8	7.1	7.9
CXX1C	7.5	6.7	9.8	7.3	8.6	9.1	7.7	9.2	7.1	7.7	8.7
CYB5	8.8	8.2	10.3	8.4	9	9.1	8.6	9.8	7.9	7.9	8.4
D030028O16RIK	6.7	6.2	6.8	6.5	7	7.3	6.2	7.3	6.6	6.6	6.7
DGKK	7	N/A	10.1	7.8	9.7	8.7	6.6	9	6.6	7.3	7.6
DLK1	6.2	N/A	N/A	7	7.8	8.6	6.7	8.3	11.5	11.7	11.8
DND1	9.3	10.2	10.8	9.3	9	7.7	9	10	8.3	8.7	8.7
DPYSL5	8.7	8.1	8.2	9	8.7	9.8	8.3	10.1	8.6	9	9.7
DSP	7	6.6	7.7	7.6	8.6	7.6	7.2	8.3	8.6	8.3	7.7
DUSP2	6.9	6.1	7.1	5.9	6.4	7.5	6.5	7.7	6.8	7.4	8.2
EDNRA	N/A	N/A	6.9	7.5	9.2	10.2	7.4	9.2	8.8	8.6	
EFEMP2	8.9	8.2	9.5	9	10	10.1	8.7	9.8	10.4	10.4	10.3
EFNA4	8.8	8.7	9.1	9.2	9.5	9.6	8.8	9.7	9.3	9.4	9.5
EFNB1	7.4	7.5	9.3	8.6	9.2	9.4	7.4	8.6	10.2	10.1	9.3
EHD3	6.2	N/A	6.6	N/A	6.9	7.4	6.1	7.2	6.9	7	
EMP3	7.7	7.1	7.2	7.1	8.3	8.8	7	8	8.8	8.7	8.7
EOMES	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	5.9	9.2	N/A	N/A	6.1
ETSRP71	9.3	8.6	9.5	9.1	8.6	9.3	9	10.8	10.5	11.1	11.2
EVX1	9.3	7.1	10.5	6.7	8.7	8.8	10.2	12.6	10.2	11	11.9
FGF15	7.5	6.6	N/A	7.7	6.7	7.3	7	7.9	10	10.1	10.1
FGF8	9.9	8.1	12.4	9.3	11.1	11.8	10.5	12.6	8.8	10.1	11.7
FGFR1	6.2	6.6	6.8	7	8.3	8	6.6	7.6	8	7.8	8.2
FKBP14	6.9	6.2	8.1	7.1	9	8.3	6.7	8.1	7.7	7.5	7.9
FOS	6.1	6.3	6.6	6.5	7	6.5	6	7.2	7.6	6.9	6.7
FOXC1	N/A	N/A	6.5	7.4	9.5	11.2	6.4	8.2	6.5	7.5	9.4
FOXH1	8.5	8.2	8.7	8.3	8	8.7	8.6	9.6	9.7	9.8	9.7
FRAT2	8.5	9.2	8.8	9.2	9.3	8.7	8.3	9.7	9	9.3	9.5
FSCN1	12.3	12.4	12.7	12.7	13.1	13.4	12.3	13.4	13.5	13.4	13.4
FST	9	6.9	10.4	7.5	8.2	9.3	8.7	10.3	N/A	6.3	7.5
FUT10	7.3	7	8.3	7.6	8.3	8.6	7.7	9.1	8.7	9	9.2
FZD7	10.7	10.9	9.9	11.1	11.1	11.8	10.6	11.9	10	11.2	
GALNT1	7.6	7.5	8.7	7.7	8.5	8.4	7.9	9	8.9	8.6	8.9
GATA6	7.9	8.2	9.6	9	9.1	9.5	6.5	11.9	11.6	12	11.6
GBX2	8.7	8.9	10.7	11.6	11.8	12.5	7.3	9.6	8.3	9.9	11.3
GFPT2	9.4	9.6	9.8	10.1	9.9	9.4	9.1	10.3	10.8	11	10.5
GJA7	7.6	7.8	8.1	7.8	7.4	8.1	7.3	8.2	7.4	7.9	8.2
GLIS1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	6.3	6.2	8.1	7.4	7.7	8.1
GLRX	8.5	9	9.1	9.7	9.7	9.1	7.8	8.7	9.1	8.6	8.5
GPC3	9.8	10.1	11	11.4	13	13.4	10.5	12.5	13.1	13.1	13.6
GREB1	7.5	6.8	8.6	8.7	10.2	10.8	7.8	10.5	9.9	10.1	10.5
GRHRP	10.4	10.7	11	11	11.2	10.8	10.5	11.5	11.5	11.6	11.5
GSC	7.3	6.5	11.8	9.4	9.5	6.3	11.4	7.5	8.5		
H1FO	N/A	N/A	6.8	6.6	7.2	7.7	5.9	7.2	6.8	7	
H2AFY	9.6	10.9	10.7	10.3	10.7	11	9.4	10.5	10.9	11	10.8
HDAC7	7.3	6.9	7.5	7.6	8.5	9.1	7.7	8.7	9.2	9.1	9.3
HES1	9.4	9.2	10.7	9.4	10.4	9.8	10.1	11	10.1	10.4	10.4
HEY1	8.2	8.8	9	9.5	10.3	10.5	7.8	11.2	9.4	9.9	10.3
ID1	6.7	6.4	8.2	9.1	9.6	9.3	10	11	10.8	11.1	11.7
IFI27	N/A	N/A	7.9	6.7	7.3	7.1	6.4	7.3	6.1	5.9	6.7
IFI35	6.4	N/A	8	N/A	7.4	7.7	6.1	7.7	6.3	6	7
IGF2BP2	11.2	12.3	11.8	12.6	12.5	12.8	11.3	12.3	13.1	13.4	13.2
IGFBP4	7	7.1	8.3	9.3</							

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
IRX3	6.6	6.9	8.7	10.5	11	10.9	7.4	8.3	10.3	10.2	10.1
KCNIP3	6.1	6.2	6.5	N/A	6.8	7.6	6.6	7.7	7.2	7.7	7.7
KCNMB4	N/A	5.9	5.7	6	6.7	7.1	5.6	6.8	6.2	6.2	6.5
KIF3A	8	8	8.4	7.9	8.8	8.9	7.8	8.9	8.9	9.1	8.9
KT112	7.5	7	7.5	7.4	7	7.7	7.2	8.2	7.2	7.4	7.2
LBH	7.1	7.2	9.9	9.2	10.6	10	7	8.6	8.1	8.6	8.7
LEFTY2	10.3	10.5	10.98	3	9.5	10.6	9.4	11.6	6.8	7.1	9.2
LEPREL1	N/A	N/A	N/A	6.4	7	7.8	6.3	8.2	8.4	8.4	8.2
LGALS3	9.5	9.3	10.5	9.8	10.5	10.4	8.9	9.8	9.9	9	9.8
LHFP	6.5	N/A	6.7	6.1	N/A	7.8	6.7	8	7.3	7.2	7.6
LOC100044190	8.2	8.2	9.9	8.4	9.1	9.1	8.3	9.4	8.2	8.2	8.8
LOC100045780	8.7	9.9	9.3	9.6	9.5	10.2	7.8	10.7	9.5	9.8	10.8
LOC100046232	9.3	9.1	8.4	9.2	9.4	10	9.3	10.4	10	10.2	10.1
LOC100046255	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	6.5	8.3	10.8	11.1	10.4
LOC100046741	11.7	12	11.6	11.9	12.5	13.2	11.4	12.5	12.1	11.9	12.3
LOC100047200	8.6	9.7	N/A	8.1	N/A	N/A	8.9	10.2	11.2	11	10.6
LOC100047651	9.8	9.8	10	10.1	10.4	11.6	10.6	12.2	12.2	12.7	12.6
LOC100047870	6	N/A	6.6	6.9	7.2	7.5	6.5	7.5	6.9	7.3	7.1
LOC212390	7.3	6.8	9.3	6.9	9.1	8.7	6.5	7.8	6.5	6.8	7.9
LOC621823	7	6.6	8.8	7.5	8.6	8.5	7	8.8	7.3	7.4	8.1
LOC670044	6.8	6.6	7.8	7.1	7.6	7.4	7.6	8.8	10.7	10.9	10.2
LOR	7.8	N/A	7.5	6.6	6.9	7.2	7.2	9.8	6.8	7.4	8.7
LRIG1	7.8	8.2	10.19	5	11.4	11.4	7.4	8.9	7.3	7.7	8.4
LTBR	N/A	N/A	N/A	6.6	6.3	7.1	5.9	7.2	7.1	6.9	6.9
MAGED1	12.1	12	12.8	12.8	13.6	13.4	12.1	13.3	13.5	13.6	13.6
MAGED2	10.8	11	11.8	11.5	12.6	12.7	10.9	11.8	12.4	12.1	12.2
MAP2K6	N/A	N/A	6.2	6.8	7.5	8.2	5.6	6.6	7.1	7	7.3
MAP4K4	6.4	6.9	6.9	6.8	6.6	6.9	6.3	7.4	6.9	6.3	6.5
MED4	10.6	10.6	10.4	10.4	10.3	10.5	10.5	11.5	10.8	10.7	10.8
MEIS2	8.1	8.2	10	10.3	11.6	12.6	7.9	11	11.5	11.8	11.9
MEIS3	N/A	5.9	6.6	6	6.6	6.8	5.5	6.8	6.4	6.8	6.9
MFAP4	6.5	6.5	7.1	7.3	9.2	10.2	7	8.1	7.7	7.6	9
MICAL1	6.6	7	6.8	7.7	8.2	8.9	6.6	7.7	8.7	8.7	8.7
MIXL1	6.4	N/A	9.2	N/A	6.7	7.5	6.3	11.3	6.3	6.8	8.2
MOCS1	10	9.4	11.6	10.2	11.1	10.7	9.7	10.9	11.5	11.7	12.1
MRPS6	10.7	10.4	10.8	10.7	11.1	11.5	10.6	11.8	11.1	11.1	11.3
MSX1	6.3	N/A	7	6.7	7.8	8.5	7.4	11.1	12.5	12.6	12.1
MTVR2	8.2	7.7	8.7	8.7	9.6	9.6	8.1	9.3	9.6	9.5	9.3
MYCL1	10.6	10.1	11.6	10.5	11	9.7	10.6	11.7	9.3	9.3	9.7
MYL4	7	8.1	N/A	7.8	N/A	6.6	6.9	7.9	9.6	9.9	9.5
N4BP2	7.4	7.4	8	7.8	7.7	8.1	7.4	8.6	8.5	8.3	8.3
NDRG3	7.8	7.2	9.7	7.4	8.6	8.7	7.6	9.2	7.6	7.7	8.6
NDUFB9	7.2	6.9	7.3	7.2	7.3	7.1	6.7	7.7	6.8	7.4	7.1
NMB	6.8	6.6	7.9	6.8	7.3	7.3	6.8	8.2	7.2	7.5	7.8
NME5	6.5	N/A	9.9	7.7	10.8	8.4	6.7	7.7	N/A	6.3	7.1
NOTCH1	6.7	6.6	7	7.3	8.7	9.7	6.7	8	7.1	7.2	8.1
NPTX2	9.2	9.5	8.8	9.9	11	9.6	8.9	10	6.4	7.3	8.2
NRARP	8.5	8.4	9.4	8.8	9.9	11	9.2	10.1	8.2	8.7	9.6
OAT	12.2	11.9	13.4	12.2	12.4	12.3	11.7	12.7	12.4	12.5	12.7
ODZ4	6.7	7.5	6.8	7.6	8.7	9.6	7.5	9.3	8.4	9	9.3
OLFM1	7.9	7.6	8.7	8	9.4	9	8.4	9.8	8.4	8.7	9.3
OTX1	6.8	6.2	6.7	6.8	7.3	7.6	6.3	9.6	6.3	7	7.8
PARP14	6.1	N/A	9.3	7.2	8.3	8.3	6.4	8.3	6.4	7.3	8
PDLIM4	7.3	8.1	9.9	9.2	11	11.6	7.6	11.1	11.8	12.3	12.5
PDZK1	7.2	8.9	7.5	8.4	7.7	7.1	6.3	8	6	6.2	7.1
PECI	7.9	7.7	8.2	8	8.8	9.1	7.7	8.8	8.4	8.4	8.8
PEG3	7.5	6.9	8.5	7	7.8	7.3	8	9	9.2	9.3	8.6
PEX26	7.4	7.3	8.1	7.4	7.7	7.5	7.4	8.5	7.5	7.8	7.8
PGK1	6.1	N/A	8.1	N/A	7.7	6.9	6.6	7.5	6.1	6.2	6.2
PHC2	10.2	9.8	11	10.9	11.4	11.5	10	11.5	11	11	11.2
PHLDA2	11.2	11.4	10.6	11	11.1	12.1	12.1	14.1	14.9	15.4	15
PIP4K2A	8.5	8.6	8.6	9	9.4	9.5	8.6	10.1	9.8	9.7	9.6
PJA1	10.1	10.3	11.4	10.8	11.2	11.6	10.3	11.6	12.5	12.3	12
PLEKHA8	7.2	7	8.2	7.4	8.2	8.1	7.3	8.3	7.3	7.6	7.9
PLXNA2	6.1	6.2	9.1	8	9.6	10.7	6.7	10.7	9.8	9.9	10.5
PMP22	N/A	6.4	6	7.6	7.5	N/A	7.2	9.3	11.6	11.3	10.8

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
POPCDC3	N/A	N/A	6.4	N/A	N/A	N/A	6.2	7.5	6.7	7.5	7.7
PPAP2B	N/A	8.8	8.6	8.2	9.2	9	7.1	8.4	8.2	8.2	7.7
PPIC	11.6	11.8	11.1	11.2	11.1	11.5	11.6	12.8	14	14	13.6
PRTG	6.7	6.1	7.3	6.5	8.2	8.6	7.1	8.5	9.6	9.2	8.7
PSMB10	10.8	10.3	12.5	10.8	11.9	11.9	10.7	12	10.2	10.8	11.7
PTPN18	N/A	N/A	6.5	N/A	6.8	6.6	6.5	7.8	8.2	8.8	8.7
RAB8B	9.9	9.5	11.2	10.4	11.4	11.8	10.2	11.4	10.9	11.1	11.3
RBP1	9.6	9.6	10.3	10.1	10.9	10.7	8.5	9.5	8.7	9.1	10.3
RCOR2	7.2	7.4	7.2	7.6	7.7	7.9	6.4	7.8	7.4	7.7	7.8
RFTN1	N/A	N/A	7	N/A	7.6	9.2	6.3	10.2	8.3	9.2	10.1
RGS12	8.5	8.4	9.7	8.7	9.3	9.1	8.5	9.5	9.1	8.9	8.9
RHBDL7	7.4	7.6	8.2	7.7	8.4	8.3	7.3	8.2	7.8	7.7	8.3
RILPL2	8.1	7.8	8.6	8.4	9	9	7.8	8.8	9.1	9.3	9.2
RNU6	12.6	12	12.1	12	12.2	12.7	12.3	13.2	12.4	13.4	13.5
ROBO1	8.4	8.5	8	9.2	9.6	9.4	8.6	11.3	9.8	10.1	10.2
RPL22L1	6.9	6.5	6.6	6.6	6.5	6.4	6.4	7.3	6.6	6.8	6.2
RSPQ3	6.9	6.4	10.1	8.5	11.2	11.9	6.4	10.3	9.2	9.8	11.5
RXRG	N/A	N/A	7	6.8	6	N/A	6.1	7.3	N/A	N/A	6.3
S100A10	9.3	8.1	10.2	8.3	9	9.1	9.4	10.8	9.7	9.4	9
SALL1	7.8	7.9	8.5	8.7	8.8	9.4	7.6	8.6	7.8	8.1	8.7
SCLY	9.3	9.4	10.7	9.2	9.5	9.2	9.5	10.4	8.7	8.7	9
SEMA5A	6.7	6.3	7.5	7.4	9.2	9.2	6.9	7.8	9.2	9.5	9.1
SEPT8	8.3	8.2	8.9	8.9	9.6	10.39	10.7	9.9	9.9	10.5	
SGCB	7.1	7.3	7.5	7.6	8.1	8	7.3	8.5	8.1	7.8	7.9
SGK1	12.9	12.7	12.7	12.2	11.9	11.9	12	13.4	10.5	10.7	11.9
SH3PXD2B	6.9	6.3	8	8.5	9.4	9	6.8	7.9	8.1	8.6	8.7
SLC25A10	8.6	8.3	9.5	8.9	9.2	9.6	8.8	10.1	8.6	8.8	9.1
SLPI	8.3	N/A	7.8	N/A	6.6	8	8.7	11.5	N/A	6.4	8.1
SMAD1	8.2	7.8	8.2	7.9	8.2	8.8	8	10.2	8.7	8.8	9.3
SMARCE1	10.1	9.7	10.6	10.5	11.4	11.1	11.0	11	10.9	10.7	10.9
SP5	11.5	9.5	12.3	10.4	12.2	12.1	10.4	12.9	10	10.7	
SRRD	7.5	7	7.5	6.8	7.3	7.7	6.6	7.5	7.3	7.7	7.7
ST6GALNAC4	N/A	5.9	6.4	5.8	6.4	7.7	6.1	8.8	7.1	7.5	8.3
STAT1	6.2	N/A	7.8	N/A	7.4	7.8	6	7.1	6.4	6.6	7
T	11.7	9.5	14.1	11	13.8	12.8	11.4	13.6	9.1	10.1	11.4
TAP2	6.8	6.9	9.4	7	8.6	8.3	7.2	8.6	6.4	7.2	8.4
TBX3	7.1	8.2	N/A	6.6	5.5	N/A	7.5	8.6	9.4	9.3	9
TCEAL1	6.2	5.8	7.2	6.4	7.4	7.3	6.3	7.8	7.6	7.7	7.6
TGDF1	7	6.6	7.8	N/A	N/A	6.7	7.5	8.6	N/A	N/A	6.8
TGFB1	7.2	6.5	8.5	7	8	8.3	6.9	9.9	9.5	10	10.2
TGFB111	7.6	6.7	6.7	7.1	7.6	8.1	7.2	8.8	8.7	8.4	8.1
TMEM90A	N/A	N/A	6.5	N/A	N/A	N/A	6.4	7.7	6.4	7.1	7
TNFRSF1A	5.5	5.7	6.7	6.2	6.8	7.8	6.1	7.4	8	7.8	7.4
TNS4	N/A	N/A	N/A	6.4	6.6	8.4	5.9	8.2	7.5	7.2	7.3
TRPC2	6.9	7	7.3	7.3	7.9	8.2	6.4	7.4	7.8	8.2	7.9
TSC22D3	N/A	8	N/A	N/A	9.4	9.4	8	9.8	9	8.9	N/A
TWIST1	7.4	6.5	8.3	8.2	9.7	10.7	7.4	9.3	9	9.2	9.8
TXNIP	9.3	9.9	10.9	10.6	11	10.5	9.3	10.2	10.4	10.8	11
UHRF2	10.1	10.4	11	10.4	10.9	10.8	9.7	10.8	11	11.1	11.1
UPP1	10.2	10.4	12.7	10.9	11.6	11.4	8.6	11.6	8.4	9.5	10.2
USP3	8.9	8.8	9.7	9.2	9.8	10.1	8.9	10	9.8	10	10.2
VEGFC	7.3	7.9	6.4	7.2	7.1	8.6	6.6	7.6	9.1	8.5	7.1
VIM	9.8	8.6	11.5	9.6	11						

**BMP4/DKK1, 72Std, T, deaktiviert**

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD	Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
1110012J17RIK	10.7	10.6	10.4	10.6	9.8	9.8	11.1	10	9.2	9.2	9.8	ATG9B	9.3	10	7.7	9.6	7.5	6.2	8.8	7.6	8.8	7.2	6.3
1190003J15RIK	9.7	10	8.8	9.2	8.3	7.8	10	8.8	8.4	7.4	8	ATP1B1	11.6	11.8	10.5	11.2	9.5	7.6	11.9	9.1	9.7	7.9	6.9
1700012H05RIK	10.8	11.2	7.8	10.2	6.6	N/A	10	7.1	6.4	N/A	N/A	AU023871	7.2	7.4	N/A	6.8	6.2	N/A	7.4	6.2	N/A	N/A	N/A
1700019D03RIK	11.2	11.1	19.9	10.3	8.1	N/A	11.3	9	8.1	7.1	6.4	AU040829	9.1	9.1	8.8	8.9	8.9	8.8	9.4	7.8	8.1	8.1	8.2
1700029G01RIK	9.2	8.8	8.6	8.7	8.9	8.4	8.9	7.8	8.9	8	8	AVP1I	10.3	10.1	9.2	9.4	8.4	8	10.1	8.8	8.5	8.2	8
1700065O13RIK	9	9.1	8.2	8.4	8.5	8.1	8.7	7.5	8.3	7.6	7.6	AW555464	12.1	11.9	12	11.9	11.4	11	12.5	11.5	11.8	11.5	11.3
1810015A11RIK	11	10.8	9.9	10.4	8.9	8.7	10.9	9.9	9.8	10.2	10	AXL	9	9.4	8	9	8.6	8.6	9.6	7.2	9.6	8.4	8.1
2010111I01RIK	8	8	7.5	8.1	6.4	N/A	8.3	6.9	6.4	6	N/A	AXUD1	11	10.7	10	10.7	9.4	8.9	10.5	8.9	9.8	9.2	8.9
2300002D11RIK	8	7.9	N/A	7.5	6.8	6.9	8.4	6.5	7	6.8	N/A	B230373P09RIK	7	7.6	6.5	7.1	7.9	7.5	7.7	6.3	7.4	7.7	7.6
2310057J16RIK	8.5	8.9	8	8.7	7.9	N/A	8.6	7.1	7.2	6.9	6.1	BBC3	9.5	9.8	9	9.4	8.7	8.5	9.5	8.5	8.8	8.5	8.4
2400010D15RIK	10.5	10.4	10	10.2	9.5	9.3	10.5	9.6	10	10	9.7	BC017612	9.2	8.8	9.1	9.1	8.4	9	9.1	8.2	8.2	8.9	8.8
2410081M15RIK	8.4	8.8	7.5	8.5	7.2	6.1	7.6	6.5	6.2	5.8	5.9	BC057371	8	7.9	7.9	7.9	7	N/A	8.4	6.5	5.9	N/A	5.8
2410116G06RIK	11.1	12	8.4	10.9	7.7	6.2	9.4	7.6	6.8	N/A	N/A	BC066028	9.6	9.7	8.7	9.1	8.2	7.9	9.4	8.1	8.1	7.6	8
2410146L05RIK	12.2	13.2	7.4	11.6	7.2	N/A	10.3	6.4	7.1	N/A	N/A	BCAM	8.2	7.9	8	7.8	7.5	6.5	8.6	6.8	8.1	7.3	6.4
2610305D13RIK	10.4	10	8.4	9.1	7.5	7.4	10.1	8.6	7.9	7.6	7.7	BCAR1	10.2	9.6	9.6	9.8	9.2	9	10.4	9	9.7	9.5	9
2810046M22RIK	9.1	10	8.8	9.7	8.9	8.9	9.4	8.5	10.4	10.7	9.8	BCL11B	7.1	6.8	N/A	N/A	N/A	N/A	8.1	6.4	N/A	N/A	N/A
4632404H22RIK	9.4	10	8.4	9.1	8.2	8.4	9.7	8.7	9.8	9.3	9.1	BDH2	8.6	9.5	7.8	8.6	8.7	8	8.2	6.8	7	6.5	6.5
4930550C14RIK	7.1	7.5	7.2	6.7	7.2	6.8	7.5	6.4	7.2	6.6	6.9	BIK	8.6	7.9	8.5	8.1	8.2	7	8.4	7.2	6.6	6.4	6.8
4930572J05RIK	9.7	9.3	9.5	9.1	8	N/A	9.7	8.3	6.9	N/A	8.7	BOK	9.2	8.3	8.7	8.7	7.7	N/A	9.2	7.9	6.7	N/A	N/A
4933428G20RIK	9.6	9.8	8.9	9.3	8.9	8.7	9.7	8.5	9.9	9.3	6.7	BSCCL2	13.3	12.8	12.7	12.7	11.9	11.7	13.2	12.1	12.1	11.7	11.4
4933439C20RIK	11.1	11.1	10.2	10.4	10.2	10.1	11.3	10.1	10	9.7	10	BSPRY	7.6	7.5	7.2	7.3	6.1	N/A	7.7	6.1	N/A	N/A	N/A
5830467P10RIK	9.6	9.3	9.3	8.8	10.1	8.5	9.5	7.5	7.7	6.2	6.7	BST2	9.4	9.6	9.5	9.1	9.1	7.6	9.3	8.1	7.6	7.6	7.4
6330503C03RIK	7.6	6.5	7.2	8	7.2	6.5	7.8	6.5	N/A	6	6.3	BTBD11	9	10.2	8.3	9.7	8.4	7.5	8.2	6.7	7.4	6.8	6.9
9130404D14RIK	11.3	11.2	11.1	11.3	10.6	11.6	10.5	11.7	11.3	10.9	9	BTLA	8	6.6	6.8	6.6	N/A	N/A	7.3	6.1	N/A	N/A	N/A
9330186A19RIK	7.7	7.4	6.7	N/A	N/A	N/A	7.9	6.5	6.6	N/A	N/A	BZRAP1	7.8	7.6	7.5	7.6	8.4	7	8.2	6.6	6	6.2	7.1
A930034L06RIK	9.2	9.4	8.9	8.8	9.4	9.5	9.5	8.5	8.6	8.8	9.1	C2	8.2	9.8	6.6	8.5	6.9	N/A	8.7	6.2	8.2	6.4	N/A
AA467197	8.6	9.7	7.1	8.7	6.1	N/A	9	7.8	6.3	N/A	N/A	CALCA	8.3	8	9.7	9.4	10.7	8.2	8.5	6.6	6	N/A	N/A
ABCB1B	9.7	9.4	8.8	9	7.9	7.6	10.2	7.8	9.1	7.7	7.3	CAMK2B	8.5	9.1	8.2	8.6	7.7	6.6	8.6	6.6	N/A	6	N/A
ACAA1B	6.7	7.2	6.9	7.1	6.4	N/A	7.6	6.6	6.2	N/A	N/A	CAMK2N1	7.3	8.1	6.9	7.5	8.1	8.4	7.8	6.8	7.6	7.2	7.2
ACOT7	10.8	10.5	10.8	10.5	9.7	9.1	11	9.6	9.1	8.6	8.5	CAPG	8.5	N/A	N/A	N/A	8.2	N/A	8.7	7.7	N/A	N/A	N/A
ACTA2	8.8	8.8	6.2	8.4	7.9	8.5	7.6	5.5	9.4	7.5	7.4	CAPN1	7.5	8.1	7	7.7	7.1	6.9	7.7	6.7	7.5	6.9	6.7
ADAM23	9.1	9	6.3	8.3	6.3	6.5	8.3	6.6	N/A	N/A	6.6	CAPN5	8.3	9.5	7.3	8.7	7.7	6.6	8.6	7.4	10.4	10.6	9.5
ADFP	7.5	7.3	7.3	7.3	7.9	7.3	7.5	6.5	7.8	7.2	6.9	CAR11	7.4	7.1	6.9	7.3	7.6	7.7	7.7	6.7	6.8	6.8	6.9
ADRB2	8.3	8.5	7.9	8.4	8.8	9.6	8.3	6.2	9	7.6	7.2	CAR4	9.9	9.4	10.6	10.7	10.7	8.6	11.1	9.4	12.4	12.1	10.7
AES	8.3	8.6	8.4	8.7	8.8	7.3	8.9	8	7.6	6.9	6.4	CBS	8.2	8.1	7.8	7.7	6.3	5.6	8.5	6.9	5.7	N/A	5.6
AGRN	13.3	13	12.9	12.8	13.2	13.3	13.3	12.2	12.7	12.8	13	CBX7	10.5	10.7	9.3	9.9	8.2	7.2	10.2	7.8	8.2	7.9	7.6
AHDC1	9.8	9.4	9.1	9.4	9.1	9.7	9.8	8.6	9.6	9.5	9.3	CCDC120	11	10.9	10.2	10.8	10.1	9.7	10.6	9.2	10.4	9.9	9.7
AHNAK2	9	9.7	7.9	8.8	7.9	7.3	8.8	6.9	8.6	6.7	6.3	CCDC92	10.1	10.1	19.3	10.19	8.1	9.8	7.8	8.2	7.5	7.7	
AI413582	8.4	8.4	7.9	7.9	7.5	7.4	8.8	7.6	8.5	8.4	7.9	CD68	7.8	8.6	7	7.8	6.1	N/A	8.1	6.6	7.6	6.5	6.4
AI428936	9.5	9.8	9.3	9.5	9.1	9.3	9.9	8.8	9.4	9.3	9.2	CD9	11.1	11.5	10.4	11	10.6	9.7	11	10	10.9	9.7	9.6
AKAP12	13.2	11.6	12.1	10.7	10.1	12.9	11	12.6	11.9	11.2	11.2	CEBPB	11.5	11	10.6	10.6	9.9	9.1	11.2	10.1	11	9.9	9.5
AMN	9.1	8.3	N/A	8.6	6	N/A	9	6.6	7	6.4	N/A	CENTD3	9.7	9.1	9.5	9.9	9.6	9.6	10.2	8.4	9.9	9	8.9
AMOTL2	8.4	7.4	8.2	7.6	7.3	6.4	8.5	6.8	8.2	7.8	7	CHAC1	12.1	10.9	9.5	10.5	8.4	8.2	12	10.7	10.1	10.8	10.8
ANK	8.5	8.5	8.3	8.9	8.9	7.7	8.6	7.7	7	7	7.1	CHIC1	8.2	8.1	7.8	7.7	7.3	7.5	8.1	7.2	7.9	8.2	8.1
ANKRD47	8.6	9.6	7.6	8.5	7.7	7.6	8.5	7.4	7.7	7.4	7.5	CHRNB1	9.8	9.1	9	8.9	8.6	7.3	9.5	7	8.4	7.1	N/A
ANKRD56	9.1	9.5	8.2	8.9	8.3	6.9	9.6	6.7	9.7	9.2	9	CITED4	7.9	7.6	6.8	7.4	7.5	6.5	8.3	6.3	7.3	N/A	N/A
ANXA3	12.2	11.6	11.7	11.2	11.2	11.3	12.1	10.8	11.8	10.2	10.5	CKB	13.9	14.4	13.4	13.7	12.8	12	13.9	12.5	12	10.9	11.7
AOAH	9.1	9.4	6.6	8.6	6	N/A	8.2	6.2	N/A	N/A	N/A	CKMT1	9.7	10.6	9.1	9.9	8.5	7.3	10	8.6	9.1	6.8	6.7
AP1M2	9.4	9.7	9.1	9.1	8	6.7	9.8	8.7	7.9	6.5	6.5	CLDN3	8.1	9.1	8.4	9.1	8.4	N/A	8.4	6.7	7.9	N/A	N/A
APAF1	10.4	10.7	10.1	10.1	10	10.7	9.7	10.4	10.2	10.1	10.1	CLDN4	13.3	13.8	12.9	13.3	12.3	10.8	12.7	11.1	11.1	9.9	8.7
APOA2	9.4	9.6	8.3	8.8	7.8	7.2	8.6	7.1	6.4	N/A	N/A	CLDN6	12.9	12.6	12.9	13.1	13.4	11	12.9	10.7	11.5	9.3	8.5
APOC1	9.9	10.6	8.9	9.9	8	7.3	9.5	8.1	8.3	7.5	7.6	CLIC6	8.4	9	8.2	9.3	8.8	7.3	8.8	7.1	8.5	7.9	6.5
APOE	11.1	12.1	10.7	10.9	10.3	9.8	11	9.5	10.5	11	10.3	CLN3	10.2	10.3	9.3	9.7	9.5	8.9	9.9	7.7	9.5	8.9	8.3
ARHGDI8	10.2	9.5	9.7	9.5	8.7	8.2	10.5	8.9	9.4	9.5	8.7	CLN6	7.6	8.2	7.3	7.4	7.7	7.2	8.1	7	8.3	7.6	7.8
ARHGEF18	11	10.8	10.8	10.4	10.2	9.8	11.1	10	10.2	9.8	9.9	CMTM8	8.3	8.2	9.2	9.5	10.3	7.8	8.8	7.2	8	7.7	7.3
ARHGEF19	7.3	7.7	7.2	8	7.3	N/A	7.6	6.3	6.4	N/A	N/A	COL2A1	6.8	6	6.7	8.3	9.4	7.7	6.9	5.7	5.8	5.7	5.9
ARHGEF3	10.2	10	7.2	9.4	7.2	6.7	9.3	6.6	8.9	8.6	8.1	CORO1A	7.6	7.5	6.6	7.3	N/A	N/A	8.2	6.3	N/A	N/A	N/A
ARHGEF4	8.7	9.2	7.6	8.2	7.1	6.8	9.3	8.3	8.1	8.1	8.1	CPT1C	7.3	7.6	6.6	7.3	7.2	7.4	7.2	6.2	7	6.8	7.1
ARL4C	9.9	8.7	10.1	9.4	8.4	7.2	10.3	8.3	9.9	9.6	8.3	CRELD1	8.9	9.2	8.4	8.6	7.7	6.9	9.1	7.9	7.4	6.8	6.9
ASAH3L	7.7	8.2	6.2	7.4	6.5	6.5	7.2	6.2	6.6	N/A	N/A	CRIP2	11.9	11.7	11.8	11.5	11.2	10.1	12.2	10.5	11.6	11	9.8
ASPHD2	8.3	7.8	7.5	8.3																			

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msegn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msegn1_96StdBD
CXCL16	9.7	9.3	7.9	8.6	7.4	N/A	9.6	6.9	8.7	N/A	N/A
CYB561	10.2	10.1	10.8	10.2	11	9	10.5	9.6	9.3	8.9	9
CYBA	10.6	11.5	10.6	11	11.1	10.8	11.1	9.9	11	10.6	10.3
CYP27A1	6.8	7.4	6.3	6.3	6.1	7.2	7.5	6.3	6.3	6.2	6.9
CYP4F13	8.6	9.3	7.8	8.6	8.4	8.3	8.7	7.7	8.6	8.9	8.7
CYR61	7.8	6.4	8	6.5	7.2	6.1	7.8	6.2	N/A	5.9	5.6
CYSLTR1	7.7	N/A	7.6	N/A	N/A	N/A	7.9	6.3	N/A	N/A	N/A
D10BWG1379E	8.5	8	7.8	7.5	7	N/A	8.6	6.5	6.2	N/A	N/A
D430039N05RIK	8.5	8.5	7.8	8.3	8.6	7.5	8.9	6.7	7.2	6.9	6.7
D930005D10RIK	8.8	8	7.7	7.2	6.2	6.5	9.6	8.3	8.3	8.5	8.1
DCLK2	7.7	8.7	7	8	7.3	7.1	8.1	6.3	6.3	6.4	6.6
DDAH1	10.2	9.6	10.4	10.5	10.6	8.9	10.2	9.8	9.3	8.2	
DDIT3	9.7	9.8	7.7	8.5	7.6	6.8	9.7	7.1	8	7.7	6.9
DDIT4L	10	10.1	10	9.6	10	9.6	9.9	9	9.1	8.7	9.1
DDR1	9.3	N/A	N/A	9	9.2	N/A	9.7	7.8	9.1	8.1	7.5
DEF6	9.5	9.5	8.9	8.5	8	8.4	9.5	8.4	8	7.8	7.9
DENND1C	8.1	8.6	8.2	8.5	8.6	7.5	8.1	6.9	N/A	6	N/A
DENND3	8	7.7	8.1	7.8	7.4	6.2	8.3	7.1	6.9	6.9	6.9
DGKA	9.5	10.3	8.6	9.6	8.5	7.9	9.4	7.9	9.3	8.1	7.8
DLX3	7.6	8	6.9	8.1	8.1	8.4	7.8	6.6	9.8	9	8.8
DMN	6.4	6.6	5.7	5.9	6.2	7.2	6.8	5.7	5.4	5.4	6
DNAIC1	6.3	7.1	7	6.6	6.7	6.8	6.9	6	5.8	N/A	N/A
DOK2	11.5	8.9	10.4	8.4	8.4	7.8	10.4	7.9	6.8	7	7
DPP7	11.2	11.7	9.4	10.6	9.7	9.3	10.8	9.7	10.2	9.5	9.3
DPPA5	15.4	16.1	12.3	15	11.8	9.2	14.2	11.1	10.8	8.5	9.1
DSCR1L2	9.6	10.4	9.1	9.4	8.9	8.1	9.9	8.2	8.8	8.6	8.3
DUSP1	11.8	11.8	10.5	11.3	9.9	9.1	11.4	10.2	10.2	9.4	9.4
DUSP14	8.3	7.4	7.1	7.4	6.7	6.9	7.6	6.6	7	N/A	6.2
DUSP3	6.5	5.5	6.1	5.7	5.5	N/A	6.5	5.4	5.8	5.6	N/A
EFCAB4A	7.2	7.5	7.3	6.5	7	5.8	7.6	6.2	6.6	N/A	5.8
ELAVL2	9.1	9.8	9	9.4	8.4	7.9	8.8	7.7	N/A	7	7
ELL3	9.6	9.5	9.7	9.6	9.1	7.7	10.2	8.4	8.2	7.3	7.2
EMP2	7.9	7.9	8.2	8.2	9.5	7.4	8	6.1	9.6	8.9	7.6
ENC1	11.7	11.3	11	11.2	10.4	10.6	11.5	10.2	9.9	9.5	9.8
ENDOD1	9.4	9	9.1	9	9.1	9.1	9.5	8.6	9.5	8.2	8.4
ENG	7.8	8.1	N/A	6.7	N/A	6.5	7.9	6.4	6.8	6.8	6.9
ENO2	7.9	8.6	6.6	7.9	7.1	6.6	8.5	6.4	7.7	7.9	7.5
ENO3	8.5	8.4	8.6	8.8	9.4	9.2	9.1	8.1	10	9.8	9.1
ENPP2	8.8	8.3	8.1	7.8	6.6	N/A	8.8	6.4	N/A	N/A	N/A
ENPP5	7.8	8.2	7.8	7.9	8.2	7.2	8	6.9	7.5	7	6.7
ENTPD2	7.2	7.8	6.9	6.5	N/A	N/A	7.6	6.3	N/A	N/A	N/A
EPHA2	10.3	9.1	10.2	8.6	8.6	8.4	9.4	8	6.8	N/A	6.5
EPHX1	8.5	9.5	7.4	8	6.8	6.9	8.8	7.2	7.2	6.2	6.2
ERAS	9.4	9	9.5	10.2	9.3	7.1	9.2	7.5	N/A	N/A	N/A
ERCC2	7.7	N/A	7.6	7.8	7.4	6.2	7.9	6.5	6.7	6.7	6.3
ERCC5	10.6	10.7	10.2	10.1	10	10.5	11	9.9	10.6	10.3	10.4
ERRF1	11.3	11	10.6	11.1	11	10.6	11.1	10	11.7	10.6	10.1
ESRRB	12.5	13.9	8.9	12.6	8.9	N/A	10.9	7.1	8.3	7.1	N/A
FABP3	12.3	13.3	10.1	12	9.4	7.5	12.5	9.1	11.5	9.1	8.1
FBXL4	8	8.1	7.3	7.5	7.4	7.3	8.4	7	7.7	7.5	7.3
FBXO15	10.5	11.7	8.5	10.6	7.5	6.4	8.9	7.2	6.6	5.9	6.2
FBXO2	9.1	8.6	8.2	8.8	7.6	7.3	9.5	7.7	7.7	6.9	7
FEM1B	13.4	13.4	13	12.9	12.6	12.3	13.6	12.7	13	12.7	12.6
FEZ1	7.6	8.2	7.2	7.6	7.2	7.9	8	6	5.5	N/A	N/A
FGF17	8.5	7.9	8.4	N/A	6.9	N/A	8.3	7.1	5.8	N/A	N/A
FHL1	11.5	11.8	10.9	11.7	11.6	11.3	11.5	10.5	12.2	11.8	11.8
FHOD1	9.1	9.2	8.9	9.1	8.8	9.1	9.5	8.5	9.8	10	9.5
FLVCR2	8.3	8.8	6.4	8.2	7.3	6.7	8.1	6.3	8.2	6.7	N/A
FOXA3	8.5	8.3	8.2	8.7	8.5	6.8	8.8	7.3	6.9	7.3	7
FOXK1	7.1	6.6	6.2	N/A	N/A	N/A	7.5	6.2	N/A	N/A	N/A
FOXN3	8.3	9	8.4	8.6	8.2	7.8	8.9	7.8	9.4	9.1	8.4
FOXO1	10	9.4	9.5	9.5	9.2	8.4	10.2	8.7	8.4	7.7	7.9
FOXRED2	8.1	7.4	7.5	7	6.8	7	8.3	6.8	6.8	6.9	6.8
FRRS1	8.9	9.6	8.4	8.6	7.8	7.1	9.2	7.4	7.7	6.9	6.7
FSD1	8.1	8.1	7.4	8.3	7.8	7.7	8.3	6.4	7.2	7	7.4
FZD5	10	10.6	11.5	12.1	12.7	10.1	9.9	8.9	8.1	7.8	7.8

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msegn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msegn1_96StdBD
GAB1	12.8	13.2	11.5	12.5	11.3	11.3	12.5	10.5	11.6	11	10.9
GADD45A	10.4	10.5	8.9	10	8.9	8.9	9.9	8.1	8.2	8	8.4
GADD45B	9.1	8.6	9.1	8.1	7.3	6.1	9.3	7.6	8.8	7.2	6.9
GARNL3	9.4	9.9	10.4	9.9	10.8	10.6	10.2	9.3	9.8	10.2	10.4
GCA	7.2	7.2	7	6.9	6.2	N/A	7.4	6.3	5.9	N/A	N/A
GCLM	11.8	11.4	11.1	11.1	11.2	9.6	8.7	11.5	10.2	10.1	9.7
GDF3	11.2	11.3	8.6	10.2	6.5	8.7	10.3	6.5	N/A	N/A	N/A
GDPD1	7.9	7.9	8.2	8.9	9.7	8.2	8.3	6.8	7.7	8.1	7.6
GIPC2	7.5	8	7.5	7.9	7.7	6.6	8.1	6.5	8	6.7	N/A
GLIPR2	11	10.7	10.5	10.6	10.4	10.8	11	10	11.5	11	N/A
GLS2	8.7	9.2	8.2	8.5	7.2	6.3	9.4	7.3	7.3	6.8	6.6
GM129	9.3	9	7.3	8.7	7.3	6.9	8.7	7.7	7.4	7.5	7.9
GM2A	9	9.7	8.8	9.3	9.1	8.2	9.1	8.1	9.5	9	8.4
GNAZ	7	7.7	7.6	7.4	7.6	6.5	7.1	6.2	6.7	6.8	6.3
GNG13	8.9	8.5	8.2	8.2	8.6	8.4	8.9	7.3	8.9	8	8.6
GOT1L1	9	10.2	8.4	8.9	8.9	9.5	9.7	8.4	8.7	8.9	9.3
GRP19	9.9	10.3	9.5	9.9	9.3	8.9	10.1	9.1	9.4	9.7	9.2
GRB7	12	11.9	12	12.3	11.6	9.8	12	10.3	10.9	10.9	10.7
GRHL2	9.8	9.2	8.6	8.8	8	6.3	9.3	7.1	7.9	6.3	N/A
GRM6	9.2	6.9	7.7	6.6	N/A	N/A	8.9	6.2	N/A	N/A	N/A
GSTM2	11.3	12.3	9.9	11.3	10.3	9.7	10.7	9.1	9.8	8.9	9.3
GSTT2	9.5	10.2	8.3	8.9	7.9	7.5	9.6	7.8	7.5	7.7	7.4
GTSF1L	9.1	9.8	6.9	8.9	6.4	N/A	7.6	6.3	N/A	N/A	N/A
GYLTL1B	N/A	8.8	8.6	8.7	8.4	7.2	9.1	7.5	8	7.7	7.8
HBEGF	7.8	7.5	6.9	7.6	7.9	7.7	7.8	6.6	9	8.7	9
HES6	9.7	9.3	9	9	8.7	8.3	9.6	8.4	8.1	8.2	8.2
HMOX1	9.3	8.7	8.7	8.2	8	7.6	9.5	8.3	8	7.5	7.6
HSPB1	11.1	11.4	10.3	11.1	19.8	8.8	10.8	9	10.3	8.3	8.3
HSPG2	11.7	11.7	10.8	11.3	10.6	10.7	11.9	10.6	11.7	11.3	10.9
HVCN1	8.7	8.7	7.9	8.7	8.3	7.5	8.5	6.7	7.4	7.2	7.2
HYAL1	8	8.2	7	6.6	6.8	7.3	8.3	6.4	7.1	6.5	6.7
ICAM1	8.7	8.9	8.2	8.4	7.8	7.7	8.8	7.4	8.3	6.4	6.7
IER3	10.1	9.8	9.1	9.4	8.2	7.2	9.8	8.2	9.7	7.8	7.4
IFI30	9.8	10.2	9.2	9.6	8.7	8.7	10.2	8.8	9	8.5	8.8
IGF2	12.6	12.9	11.6	14.5	15.1	15.4	13.4	11.8	15.5	15.7	15.4
IGFBP2	11	10.9	11.4	11.4	11	9.1	11.3	10.2	10.8	9.1	7.8
IGSF1	7.3	7.3	7.8	7.5	7.8	7	7.7	6.8	6.4	6.4	6
IGSF9	11.7	10.9	11.2	11.8	11.6	10.7	11.5	10.1	10.3	10.1	10.7
IL28RA	6.9	7.3	6.4	6.9	6.6	5.4	7	5.7	6.4	N/A	N/A
INA	8.3	8.3	7.4	8	6.9	6.3	7.8	6.4	N/A	N/A	N/A
INSL6	9.1	9.3	9.3	9.1	9.4	8.2	9.5	8.2	8.2	7.9	7.9
IRS2	9	8.4	8.7	7.7	8	8.2	9.2	7.4	8.4	8.6	7.4
ITGA3	10.7	9.7	10	9.9	9.4	7.9	10.9	8.1	10.1	8.1	7.2
ITGB4	8.1	9.2	7.3	8.4	7.1	N/A	8.3	6.3	8.1	6	5.6
ITSN2	9.1	9.3	8.3	8.7	8.2	7.8	9.1	7.5	8.3	7.6	7.5
JDP2	7.3	6.6	N/A	6.5	N/A	6.2	7.8	6.5	9.2	9.1	8
JMJD2C	8.6	8.2	7.3	8	6.9	6.2	8.4	7	6.8	6.8	6.8
JUND1	7.2	7.1	7.3	7.1	7.1	6.4	7.4	6.4	6.4	5.9	N/A
KCNJ4	7.1	7.2	6.4	7	6.7	6.1	7.2	6.2	6.3	6	6.2
KCNK1	11.4	10.9	10.6	10.6	9.8	9.3	11.2	9.8	10	8.5	8.5
KDELRS3	8.6	9.5	8.2	9.4	9.6	9	8.4	7.2	8.8	8	7.6
KIF1A	9.1	8.7	8.4	8.2	7.3	6.7	9.9	7.3	7.8	6.7	6.7
KLF5	11.3	11.8	10.4	10.5	9.4	8.8	10.6	9.4	9.8	9	8.5
KLF7	10.1	9.7	9.3	9.5	9	8.6	10	9	9.1	9	8.8
KLF9	11.										

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
LOC100041103	8.6	9.3	8.1	8.6	7.9	7.6	8.4	6.7	8.9	8.5	7.7
LOC100044566	7.3	7.5	N/A	6.5	N/A	N/A	7.1	6.1	6.7	6.3	6.1
LOC100044934	7.7	7.8	7.3	7.6	6.8	N/A	8.3	6.9	6.7	6.4	6.4
LOC100045019	7.7	8.4	7.4	7.8	8.1	7.8	8.1	7.2	7.7	7.8	7.2
LOC100045981	9.7	9.1	8.4	10.2	9.1	8.3	9.8	7.6	8.7	8.3	8.3
LOC100046120	10.4	9.6	10.5	10.5	12.7	13.7	10.6	9.9	9.6	9.2	11.1
LOC100047173	8.8	9.3	7.9	8.4	7.6	7.5	9.2	7.3	7.6	6.2	6.3
LOC100047579	9.3	9.3	9.4	9.5	9.2	8.3	9.6	8.4	8.6	8.5	8.3
LOC100048733	8.4	8.5	8.2	8.9	8.2	7.4	8.8	7.5	8.8	8.6	7.3
LOC381801	7.2	7.1	7.6	7.1	6.7	6.6	7.7	6.6	7	6.8	6.7
LOC626152	9.8	9.5	8.7	9	8.1	N/A	9.9	7.7	8.2	5.9	N/A
LOXL1	8.6	8.4	7.7	8.2	8	8.3	8.9	6.4	10.3	9.8	8.7
LPL	9	9.5	8.7	9.9	7.7	7	10.1	8.1	8.9	8.5	8.3
LRPAP1	12.8	12.9	12.6	12.4	12	11.4	12.9	11.5	12.1	12.1	11.6
LRRC3	7.5	7.4	7.7	7.3	7.4	7	8.5	7.4	7.8	7.7	7.3
LRRC8D	11.7	11.8	11.5	11.2	11.1	10.9	11.8	10.1	10.2	9.8	10
LRRFIP1	7.5	7.8	6.8	N/A	6.6	7.1	7.7	6.6	8.9	8.6	8.2
LTBR1	8.6	9.4	7.8	8.7	7.4	7.1	8.4	7.5	7.6	6.8	6.8
LTBP4	9.9	10	8.5	9.1	N/A	N/A	9.6	7.7	7.1	6.9	7.1
MANBA	10	11.1	7.9	9.9	8.3	7.7	8.8	6.8	7.6	6.6	6.9
MAPK12	8.5	8.3	8.4	8.5	8.3	7.8	9.1	7.6	7.5	7.4	7.2
MAPK13	8.3	9.2	7.9	8.6	7.6	6.4	8.7	6.8	6.7	6.5	N/A
MAPK4	7.6	7.2	7.1	6.9	6.8	6.3	7.7	6.5	N/A	N/A	6.1
MAPK8IP2	7.7	8	6.9	8.4	6.4	N/A	8.2	7	8.3	8.7	8.2
MAPKAPK3	11.1	11.2	10.3	10.4	9.4	9.2	11.2	10.3	9.8	9	9.3
MBNL2	9.9	10	8.3	9.2	9.2	8.8	9.9	8.4	9.7	9.3	9.1
MBOAT1	8.7	7.9	8.5	8.1	7.7	6.9	8.8	7.6	7.8	7.3	6.8
MCAM	8.9	9.4	7.6	8.4	7.7	6.7	8.9	6.8	7.7	6.4	6.4
MCF2L	7.5	8.3	7.2	7.8	7.3	6.2	7.5	6.2	6.4	6.4	6.3
MEF2B	8.3	8.3	6.8	7.5	6.2	N/A	8.4	6.6	6.7	6.6	6.6
MFSD2	8.4	6.8	8	7.8	6.3	6.2	8	6.9	6	6.1	6.3
MID1IP1	10.6	10.3	9.9	10.3	10.1	10.8	10.6	10.7	10.2	9.2	
MKNK1	8	7.9	8	8.1	8.2	8.5	8.3	7.3	8.2	8	8
MKRN1	9.4	9.3	8	8.6	7	6.1	8.9	6.5	6.5	6.6	6.6
MMP11	7.5	8.1	7.2	7.5	8.3	7.8	7.7	6.4	8	6.9	6.9
MOXD1	7.5	6.2	8.8	7.7	9.5	6.7	8	7	N/A	N/A	N/A
MREG	10.2	11.2	8.2	10	8.1	6.8	9.8	8	8	6.6	7
MT2	8.9	9.7	8.7	9.3	7.9	6.5	8.1	7.1	6.1	6.5	N/A
MTAP7	7.6	8.7	7.9	8	7.6	N/A	8	6.7	6.8	N/A	N/A
MVP	9.4	10	8.2	9.6	8.5	8.3	9.1	7.5	9.5	8.8	8.1
MYO18A	8.2	8.2	8.1	8.6	7.8	7.7	8.3	7.3	8.7	8.7	7.6
MYO6	9.8	10.3	9.1	9.8	9.7	8.2	9.9	8.8	9.3	9.1	8.3
NAV1	8.9	9.3	8.4	8.9	N/A	N/A	9.2	7.6	8.9	N/A	8.7
NDG2	13.5	14	12	13	10.9	9.6	12.9	11.5	10.4	10	8.9
NEU1	10.8	11.5	10.8	10.9	10.7	10.2	11.3	10.2	10.5	10.3	10.2
NIPSNAP1	11.6	11.8	11.6	11.8	11.1	10.6	11.7	10.7	10.8	10.9	10.7
NOD1	9.4	9	7.9	8.3	6.8	N/A	8.1	6.5	N/A	N/A	N/A
NODAL	9.5	8.7	9.4	7.6	7.8	7.6	9.8	8.5	6.5	N/A	6.1
NPAL2	8.4	8.4	8.4	8	6.7	N/A	8.6	7.4	7.3	N/A	N/A
NPEPL1	10.7	10.8	10.5	10.4	10.5	10.2	10.9	9.7	10.6	10.7	10.4
NRBP2	8.1	7.9	7.9	7.9	8.4	8.3	8.6	7.6	8.4	8.7	8.5
NRCAM	9.1	8	9.3	8.2	7.7	6.5	9.7	8.8	N/A	N/A	N/A
NUAK2	9.6	9.8	9	10.1	9.8	9.7	9.6	6.8	8.9	7.3	7.2
NUDT18	9.3	8.9	8.7	8.6	8.4	7.6	9.7	7.9	8.3	6.9	7
NUP210	11.9	12.1	11.9	11.9	11.1	9.6	11.9	10.7	10.1	10.2	9.7
NUPR1	11.1	10.9	7.3	9.3	7.9	7.8	10.4	6.6	7.1	6.1	6.4
OSTF1	10.4	10.9	9.5	10.1	9.1	8.5	10.5	9.4	9.5	8.7	8.4
PARVA	8.7	8.7	8.3	8.8	9.3	8.8	8.7	7.5	9.7	9.3	8.7
PCDH1	7.7	7	8.1	8.5	7.3	5.9	7.7	6.5	6.8	6.2	N/A
PCGF5	10.7	10.9	10	10.3	9.2	8.6	11.2	10.2	11.9	11.4	10.6
PCOLCE	7.5	7.4	7	6.9	7.3	8.7	7.9	6.8	8.4	7.2	7.2
PCSK9	10.7	9	9.8	8.3	7.3	10.1	7.3	7.8	6.6	6.5	
PCYOX1L	9.1	9	8.4	8.9	8.8	9.1	9	8.1	8.9	8.3	8.4
PCYT1B	9	8.9	8.6	9.3	8.4	7.6	8.7	7.3	8.7	7.8	7.2
PDE1B	9.3	8.3	8.5	9.2	9.3	8.9	9.6	7.6	7.6	7.8	8.6
PDLIM1	12.2	12.7	10.9	12.4	10.7	10.3	11.9	10.6	12.4	11.7	10.7

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
PDLIM7	12.3	11.7	11.7	11.6	11.4	11.2	12.1	11.1	11.7	11.2	11.1
PGAM5	11.9	11.8	11.1	11.3	11.2	10.9	11.8	10	11.1	10.5	10.1
PHC1	11.9	11.8	11.8	11.7	10.7	10.1	11.8	10.8	10.2	10.5	10.3
PHGDH	9.4	8.8	9.1	9.1	8.4	8	10.1	8.8	9.7	9.5	8.7
PHLDA1	9.9	8.8	8.7	9.4	10.1	10.7	9.5	8.4	10.6	10.5	10
PHOX2A	8.2	7.6	7.8	7.5	7.2	6.2	8.5	7.2	6.8	6.9	7.1
PICK1	9.2	8.8	8.7	8.8	8.2	7.6	9.1	7.6	7.9	7.9	7.6
PIK3CB	10.1	10.2	9.3	9.8	9	8	9.7	8.1	9.5	8.6	7.7
PIM3	11	10.8	10.1	10.4	9.8	9.3	11	9.9	10.6	10.8	10.2
PKP2	10.6	10.4	10.5	10.1	9.9	7.9	10.8	9	10.9	10.5	9.5
PLA2G10	9.5	10.3	7.4	9.4	N/A	N/A	9.4	6.4	N/A	N/A	N/A
PLA2G1B	11.9	12.1	9	10.8	7.5	N/A	11.1	8.1	6.2	N/A	N/A
PLAUR	8.4	7.3	7.1	7	6.6	N/A	7.8	6.3	7.2	6.1	N/A
PLCG2	9.9	10.1	10	9.8	8.8	8.6	10.2	9.1	7.7	8	7.9
PLEKHA1	12.3	11.9	12.2	11.8	11.6	11.4	12.2	11.2	11.1	10.9	11.3
PLEKHF2	12.9	12.6	12.5	11.6	11.1	10.4	12.6	11.6	10.7	10.6	10.8
PLEKHG5	8.5	9.7	7.4	8.8	7.6	7	8.5	6.8	7.5	7.1	6.9
PLK2	9.2	8.8	7.9	8.5	8.5	8.2	9.2	7.4	8.5	7.6	7
PLK3	9.6	9.4	8.4	8.9	8	7.3	8.9	7.2	7.1	6.6	6.7
PLTP	6.5	7.2	6.7	6.9	6.5	6.3	7.5	6.4	6.9	6.3	6.2
PLVAP	8.1	8.5	8.1	7.8	7.4	6.9	8.3	6.7	6.4	6.5	6.2
PMM1	11.8	12	10.5	11.2	9.8	9.6	11.2	10.1	9.7	9.7	
PODXL	9.2	9.2	9.9	10.5	10.4	9.6	10	8.8	11.3	11.6	10.9
POLI	8.1	9	7.5	8.2	7.6	7.5	8.4	6.8	7.9	8.1	8
POLK	8.4	8	7.5	7.4	7.4	7.7	8.5	7.3	8	7.7	7.7
POU3F1	11	9.7	11	11.1	9.3	7.8	11	8.6	9.2	7.8	7.3
POU5F1	12.9	12.6	12.4	12.2	10.3	9.2	12.8	11.9	8.5	8.6	9.3
PPP1R1A	9.9	9.1	10.7	10.7	12.8	12.4	10.5	8.4	8.7	9.3	9.6
PPP1R9A	9.3	9.2	8.6	9.1	9.4	8.5	9.5	7.4	8.8	9.2	9
PQLC3	8.4	8.5	8	8.1	8.3	8.1	8.6	7.3	7.9	N/A	7.4
PRAMEF12	8.2	9	N/A	8.1	6.8	N/A	8.1	6.2	8.6	7.1	6.1
PRR7	9.3	8.6	8.9	8.9	8.5	8	9.2	7.7	7.8	8.4	8
PRSS8	10.4	10.3	10.1	10.2	10	8.2	10	8.7	9	8.2	8.2
PSEN2	7.8	7.9	7.8	7.8	7.8	7.1	8.1	7	7.6	7.4	6.8
PTP4A3	8	8.5	8	7.6	N/A	N/A	8.2	7.3	N/A	7.3	N/A
PTPN14	9.1	9.1	8.7	8.4	7.9	8.2	9.2	7.8	8.3	7.5	7.5
PTPN21	9.8	9.8	9.2	9.4	9.1	8.7	10	8.9	9.5	9.1	8.9
PTRH1	8.5	8.4	7.6	7.6	7.1	6.5	8.5	7.1	7.1	6.8	6.8
PVRL2	11	10.8	11.1	10.9	10.7	10.1	11	9.8	11	11.1	10.6
RAB15	11.3	11.7	11	12.2	12.4	11	11.4	9.9	10.9	9.3	8.9
RAB25	9.2	9.4	8.6	9.5	8.4	N/A	8.6	7.2	6.6	6	N/A
RAB3D	6.7	7.1	6.5	6.7	7.1	6.5	7.4	6.2	6.4	N/A	N/A
RAD9B	8.2	8.4	6.3	6.9	5.9	6.2	7.8	6.3	6	6.2	6.6
RAPGEF5	7.9	7.5	7.9	8.2	6.9	6.5	8	7	6.5	6.3	6.3
RARG	8	7.5	7.8	7.7	7.4	7.2	7.9	7	7.8	7.7	7.5
RB1	8.2	8.8	7.4	7.8	7.7	7.8	8.5	7.5	7.4	7.1	7.2
RBPMS2	11.7	11.6	10.8	11.4	9.9	10.2	11.9	10.9	11.2	11.3	11.2
REEP6	8.6	8.5	7.8	8.3	N/A	N/A	8.9	7.6	7.4	7.3	7.3
REV1	10	9.9	8.6	9.4	8.8	8.9	9.9	8.8	9	9.1	9.2
RFX2	9.7	11.1	8.7	10.3	9.2	8.3	8.6	7.3	7.2	7.2	7.5
RGS9BP	8.5	8.4	7.8	7.9	6.8	6.9	9.1	8	7.3	7.9	7.7
RHBDD1	8.5	8.9	8.3	8.3	8.2	8	9	7.9	8.5	8.1	8.2
RHBDF1	11.3	10.7	11.								

Gensymbol	48Std_WN	nt_72StdWN	T_72StdWN	nt_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nt_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
SDC4	10.411	9.3	10.693	7.8	9.9	8.3	9.3	8.6	8.1		
SEMA4A	8.2	7.9	6.9	8	6.7	6.5	8.5	7	7	6.8	6.8
SEMA4B	11.1	11.8	10.1	11.2	10.294	10.896	10.1	10	9.9		
SERPINE2	7.7	8	6.4	7.1	6.6	7.2	7.8	6.6	7	7.1	6.9
SERPINF1	8.8	8.9	8	8.1	9.5	10.288	7.4	8.4	8.3	9.5	
SESN2	7.9	7.5	N/A	7	6.5	N/A	8	6.9	7.1	7.1	N/A
SHISA2	7.2	7.5	8.5	9.1	10	9.6	7.7	6.4	7.3	7.5	8.4
SLC12A8	8.5	9.3	N/A	7.6	N/A	N/A	8.1	6.3	6.4	6	6.2
SLC25A33	10.5	10.7	10.2	10.194	9	10.794	8.6	8.5	8.5		
SLC29A4	8.3	8.2	7.9	8.5	7.6	7.9	9	8	7.5	7	7.6
SLC2A3	14.3	14.5	14	14.2	14.2	11.8	14.1	12.5	14.4	14	13.4
SLC35F2	7.2	7.6	6.8	7.6	6.2	N/A	8.1	6.2	6.1	N/A	N/A
SLC40A1	10.9	10.8	10.2	10.197	7.7	10.586	10.182	7.2			
SLC45A4	7.7	8.2	7.5	8.1	7.4	7.1	8.3	7.3	7	7	6.8
SLC5A5	7.2	6.3	7.7	6.7	5.9	N/A	7.6	6.2	N/A	N/A	N/A
SLC6A9	9.3	8.6	7.6	8.3	7.9	8.3	9.1	7.9	8.5	8.9	8.9
SLC7A3	12.6	12	N/A	12.396	7.6	12.397	9.8	10.198			
SMOC1	9	9	9.9	10.3	12.6	12.883	7.3	7.4	8	9.2	
SMPDL3B	10.6	11.288	10.378	7.6	9.8	7.7	8.2	7.4	7.8		
SMURF1	6.9	7.3	6.6	6.6	N/A	6.4	7.2	6.3	6.7	6.9	6.8
SNAI3	10.4	10.289	9.2	7.7	N/A	10.675	7.4	6.6	N/A		
SNX30	8.6	9.5	7.7	8.5	7.3	7.4	8.9	7.5	8.4	8	7.9
SORL1	7.7	8.3	8.1	7.9	8.1	7.8	8.3	7.4	6.8	6.4	N/A
SP6	7.4	7.1	6.8	7.2	6.6	6.3	7.5	6.5	7.4	6.5	7
SPARC	10.5	10.6	10	10.8	10.4	10	10.997	11.7	10.9	10.4	
SPINK3	10.4	10.4	11.4	13.2	13.5	10.3	10.366	9.7	9	7.4	
SPINT1	8	7.7	7.9	8	7.8	6.6	8.2	6.9	7.9	7	6.6
SPIRE2	8.3	8.3	8.4	8.3	8.5	7.4	8	7	6.8	6.6	6.8
SPNS1	8.4	8.8	8.3	8.4	7.7	7.9	8.5	7.5	7.4	7.9	7.6
SPSB1	7.8	7.5	7	7.4	7.9	8.5	7.9	6.5	7.9	6.9	6.9
ST14	9.1	9.2	8.7	8.8	8.4	7.1	9.4	7.8	8.4	6.6	6.2
STAG3	8.2	9.3	7	8.3	6.9	6.9	8.2	7.2	7.3	8.2	8
STARD10	8.2	7.9	8.4	8.6	8.5	7.4	8.3	7.3	8.1	7.1	7
STC2	9.3	8.1	7.7	8.2	7.1	7.1	9.3	7.4	7.4	7.4	7.5
STEAP2	8.8	8.3	7.6	7.2	7.4	6.9	9.1	7.1	8.5	7.6	7.2
STMN2	10.9	10.2	10.3	10.998	8.9	10.693	9.4	7.7	7		
STX3	10.2	10.394	N/A	9.2	8.1	10.391	8.5	8	8.3		
SVOP	8.6	9.5	9	8.8	8.3	8.7	9.4	8.1	8.7	7.4	7.8
SYN1	8.2	8.2	7.4	7.6	6.6	N/A	7.8	6.8	6.6	5.7	6.1
SYNGR3	8.7	8.6	7.5	8.6	7.7	7	8.9	6.8	7	6.9	N/A
SYP	8.6	8.8	7.6	7.8	7.1	7.6	8.7	7.7	7.2	6.9	7
SYT9	9	9.3	8.1	8.6	6.4	6.4	8.8	6.8	6.6	6	N/A
TACSTD2	10.4	10	9.1	10.494	7	10.583	11.485	6.9			
TEX19	10.3	10.769	10.164	N/A	8.7	6.3	6.8	N/A	N/A		
TGM1	9.1	8.4	8	8.4	7.5	6.5	8.5	6.4	8.6	6.2	N/A
THBS3	7.6	6.7	7.3	7.5	7.5	8	7.8	6.7	7.4	7.6	7.5
THY1	9.2	9.1	7.4	9.2	7.2	6.6	9.8	7.3	8.1	7.4	6.8
TIMP1	10.2	10.493	10	8.9	9.2	10.289	9.2	8.6	9		
TJP2	9.9	10	9.8	10.194	9.4	9.8	8.8	8.5	8	8.5	
TLE6	7.9	9.4	7.7	8.8	8.7	8.1	7.8	6.8	7.8	7.2	6.5
TMEM102	7.5	7.8	6.9	7.2	6.7	5.9	7.3	6.3	6.4	N/A	6.2
TMEM106C	8.9	9	9	9.2	8.8	9.4	8.4	8.6	8.7	8.6	
TMEM125	8.8	8.2	7.6	7.7	6.9	N/A	8.6	6.2	6.7	5.9	N/A
TMEM150	8.5	8.6	8	8.1	8.1	8.4	8.7	7.7	8.2	8.3	8.3
TMEM23	8.1	8.5	8.2	8	8.1	7.7	8.3	7.3	9.3	9.3	9
TMEM54	9.3	7.9	7.9	8.3	6.8	N/A	8.9	6.7	7.7	N/A	N/A
TMEM79	8.7	8.3	7.9	8.1	7.4	6.5	8	6.8	7.8	6.2	N/A
TMEM8	8.2	8.2	7.7	7.8	7.4	7	8.2	7.1	7.1	6.9	6.9
TMPRSS13	7.6	8	6.5	7.3	6.3	N/A	7.3	5.7	6.8	5.6	N/A
TMSB4X	13.1	12.8	12	12.9	13	12.9	12.7	11.2	13.5	11.8	11.3
TNFRSF12A	10.698	10.2	10	10.583	10.585	9.3	7.5	6.8			
TNFRSF21	8.7	8.4	N/A	8.6	8.5	8.9	8.8	7.6	9	8.9	8.6
TPBG	10.696	10.4	10.1	10.9	10.3	10.796	9.5	8.7	9.3		
TPD52	12.3	12.9	N/A	12.2	N/A	N/A	12.2	10.7	10.4	N/A	9.9
TPM1	13.3	12.4	13	12.8	13.3	13.3	13.2	13.7	13.2	13.2	
TRH	14.1	13.8	14.4	14	14.6	13.3	12.2	10.4	8.7	10	10.1

Gensymbol	48Std_WN	nt_72StdWN	T_72StdWN	nt_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nt_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
TRIB3	10.194	7.8	8.8	N/A	N/A	9.9	7.9	7.8	7.9	7.4	
TRIM54	8	7.3	8	7.2	7	6.7	8.3	7.2	6.4	6.9	6.8
TROVE2	8	7.4	7.5	7.3	7.5	7.1	8	6.7	7.5	7.6	7.2
TRP53INP1	11.3	11.3	10.6	10.7	11.2	10.8	11.1	10	10.7	10.1	10.3
TST	8.3	9.1	8	8.6	8.3	7.2	8.5	7.4	7.2	7	7.2
TUBB2B	11.2	11.3	10.8	11.5	11.4	10.9	10.896	11	10	9	
TUBB4	8.4	7.8	8.9	9.8	10	8.7	7.4	6.7	6.3	6.5	
UCHL1	9.4	9.5	8.4	9.8	9.1	7.7	9.1	6.5	7.2	7	7.1
UTF1	11.3	11.797	11.178	N/A	10.971	6.9	N/A	N/A			
VAT1	9.8	10.192	9.7	9.7	9.2	9.7	8.7	10.296	8.7		
VWA2	6.8	5.9	N/A	6.5	6	6.3	7.2	5.5	5.3	N/A	N/A
WFDC2	12.9	13.1	12.8	13.4	12.7	11.4	13.4	12.1	13.5	13.2	11.9
WHDC1	8.1	8.5	7.4	7.6	6.5	6.4	8.1	7.2	7.4	7.3	6.6
WHRN	8.7	8.6	8.5	8.3	8.5	8.3	8.8	7.7	7.4	7.7	8.1
WNT6	8.9	8.8	9	9.2	8.5	8.5	8.5	7.3	9	7.7	7
WSB2	11.2	11.5	10.7	10.8	10.299	11.2	10.2	10.596	9.6		
WWC1	8.4	7.9	7.7	7.9	7	6.3	8.6	7	6.9	6.5	N/A
ZDHHC21	9.3	8.6	8.4	7.9	8	8.3	9.2	7.9	7.6	7.7	7.5
ZFH3	9.7	9.7	9	9.2	8.3	8.4	10.18	9.3	9.3	8.3	
ZFP185	8.3	7.7	8.2	7.5	7.2	6.5	8.8	6.9	8	7.6	6.5
ZFP219	10.1	10.2	10	10.298	9.3	10.394	9.4	9.1	9.2		
ZFP296	8.9	9.7	7.2	9	6.3	N/A	7.9	6.8	6.5	6.3	6.3
ZFP365	10.6	10	9.4	9.1	8.9	8.9	11.191	8.9	8.9	9.1	
ZFP42	8.5	9	N/A	8.3	6.2	N/A	7.9	6.2	5.9	N/A	6.1
ZFP692	8.6	8.2	7.6	7.9	7.4	8.2	9	8	7.9	8.4	8.6

### BMP4/DKK1, 96Std, T, aktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nt_72StdWN	T_72StdWN	nt_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nt_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
A230050P20RIK	10.3	10.699	9.4	9	9.3	10.397	8	9	9.9		
BMPER	N/A	N/A	N/A	6.7	7.1	8	N/A	10.488	10	11	
CCNO	9.5	8.3	10.981	9.3	8.5	7.7	9.3	6	7.2	7.7	
CHST7	7.4	N/A	9.2	7.5	9.4	11.169	10.972	8.7	10.5		
CRABP1	N/A	N/A	N/A	6.8	7.6	9.3	6.3	7.7	8.2	9.1	9.7
FGF8	9.9	8.1	12.493	11.1	11.8	10.5	12.688	10.1	11.7		
FOXC1	N/A	N/A	6.5	7.4	9.5	11.264	8.2	6.5	7.5	9.4	
GBX2	8.7	8.9	10.7	11.6	11.8	12.573	9.6	8.3	9.9	11.3	
GNA14	6.6	7.2	7.6	7.1	8.1	8.8	N/A	8.9	6.9	7.9	9.3
HOXA2	N/A	N/A	6.4	6.4	7.9	9.3	N/A	N/A	5.6	6.6	7.9
HOXB1	N/A	N/A	8.7	7.3	9.9	11.3	N/A	8.6	9	10.1	10.8
IGFBPL1	6.1	6.6	6.8	6.4	7.2	6.6	6.4	7.4	6.2	7.4	7.6
ISL1	N/A	N/A	8.4	9.8	10	9.2	N/A	9.2	9.7	10.6	11.8
LHX1	N/A	6.2	9.9	7	9	9.1	N/A	12	7.3	8.6	8.8
MESP1	N/A	N/A	N/A	N/A	7.8	9.5	N/A	12.178	9.7	11.1	
MYL7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	7.1	6.5	7.7	7.1	
PARP14	6.1	N/A	9.3	7.2	8.3	8.3	6.4	8.3	6.4	7.3	8
RFTN1	N/A	N/A	7	N/A	7.6	9.2	6.3	10.283	9.2	10.1	
RNU6	12.6	12	12.1	12	12.2	12.7	12.3	13.2	12.4	13.4	13.5
SALL3	6.5	N/A	N/A	N/A	N/A	6.1	N/A	7.2	6	7.1	7.5
SCARA3	6.5	6.3	8.6	8.5	11.3	11.272	6.7	7.4	8.4	10.2	
SP5	11.595	12.3	10.4	12.2	12.2	11.04	12.99	10	10.7		
T	11.795	14.1	11	13.8	12.8	11.4	13.691	10.1	11.4		
TRH	14.1	13.8	14.4	14	14.6	13.3	12.2	10.4	8.7	10	10.1
UPP1	10.2	10.4	12.7	10.9	11.6	11.486	11.684	9.5	10.2		

**BMP4/DKK1, 96Std, T, deaktiviert**

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD	Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgm1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgm1_96StdBD
1190003J15RIK	9.7	10	8.8	9.2	8.3	7.8	10	8.8	8.4	7.4	8	IGFBP2	11	10.9	11.4	11.4	11	9.1	11.3	10.2	10.8	9.1	7.8
1700029G01RIK	9.2	8.8	8.6	8.7	8.9	8.4	8.9	7.8	8.9	8	8	ITGA3	10.7	9.7	10	9.9	9.4	7.9	10.9	8.1	10.1	8.1	7.2
2310046K01RIK	7	7.2	6.6	7.2	6.5	N/A	7.9	N/A	7.8	6	N/A	ITGB4	8.1	9.2	7.3	8.4	7.1	N/A	8.3	6.3	8.1	6	5.6
3110043J09RIK	9.2	8.6	9.1	8.7	8.5	7.1	9.4	N/A	9.1	8	6.9	KCNK1	11.4	10.9	10.6	10.6	9.8	9.3	11.2	9.8	10	8.5	8.5
5830467P10RIK	9.6	9.3	9.3	8.8	10.1	8.5	9.5	7.5	7.7	6.2	6.7	KIF1A	9.1	8.7	8.4	8.2	7.3	6.7	9.9	7.3	7.8	6.7	6.7
ABCB1B	9.7	9.4	8.8	9	7.9	7.6	10.2	7.8	9.1	7.7	7.3	KLF9	11.4	11.7	9.8	10.5	8.6	8.4	11.3	10	9.4	8.4	8.3
ACTA2	8.8	8.8	6.2	8.4	7.9	8.5	7.6	5.5	9.4	7.5	7.4	KNDC1	10	11.1	7.8	10.1	8.6	6.3	9.6	6.5	7.7	6	N/A
ADCY2	8.4	9	7.8	8.3	7.5	7.3	8.5	8.2	7.9	6.9	7.2	KRT7	7.6	8	8.1	8.8	8.9	6.4	7.7	N/A	8.7	6.4	N/A
ADRB2	8.3	8.5	7.9	8.4	8.8	9.6	8.3	6.2	9	7.6	7.2	LAPTM5	10.7	11.9	9.6	10.5	7.9	6.8	9.7	N/A	8.6	6.8	6.6
AHNAK2	9	9.7	7.9	8.8	7.9	7.3	8.8	6.9	8.6	6.7	6.3	LGALS1	12.1	11.9	11.7	12.2	12.1	12	11.8	11	12.9	11.7	11.1
ANXA3	12.2	11.6	11.7	11.2	11.2	11.3	12.1	10.8	11.8	10.2	10.5	LGALS3	9.5	9.3	10.5	9.8	10.5	10.4	8.9	9.8	9.9	9	9.8
AP1M2	9.4	9.7	9.1	9.1	8	6.7	9.8	8.7	7.9	6.5	6.5	LMNA	8.6	8.3	7.5	8.2	7.7	7.5	8.8	7.3	9.5	8.3	7.6
ASS1	11.3	11.9	10.4	10.8	9.6	8.9	11.5	10.5	10.5	9.1	8.4	LOC100047173	8.8	9.3	7.9	8.4	7.6	7.5	9.2	7.3	7.6	6.2	6.3
ATG9B	9.3	10	7.7	9.6	7.5	6.2	8.8	7.6	8.8	7.2	6.3	LOC626152	9.8	9.5	8.7	9	8.1	N/A	9.9	7.7	8.2	5.9	N/A
ATP1B1	11.6	11.8	10.5	11.2	9.5	7.6	11.9	9.1	9.7	7.9	6.9	LRRK1	7.9	7.6	7.8	8	8.2	8.4	8	8.2	8.8	7.8	7.9
AXL	9	9.4	8	9	8.6	8.6	9.6	7.2	9.6	8.4	8.1	MANBA	10	11.1	7.9	9.9	8.3	7.7	8.8	6.8	7.6	6.6	6.9
BMP1	8.1	7.6	7.8	8.1	8.7	9	8.3	7.6	9.2	8.1	8.2	MCAM	8.9	9.4	7.6	8.4	7.7	6.7	8.9	6.8	7.7	6.4	6.4
C2	8.2	9.8	6.6	8.5	6.9	N/A	8.7	6.2	8.2	6.4	N/A	MMP11	7.5	8.1	7.2	7.5	8.3	7.8	7.7	6.4	8	6.9	6.9
CCDC68	6.7	7.1	N/A	7.2	7.1	N/A	7.2	N/A	8.3	6.2	N/A	MREG	10.2	11.2	8.2	10	8.1	6.8	9.8	8	8	6.6	7
CD68	7.8	8.6	7	7.8	6.1	N/A	8.1	6.6	7.6	6.5	6.4	NFKBIZ	8.1	8.1	7.9	7.7	7.6	6.9	7.8	7.5	7.2	6.1	7.1
CD9	11.1	11.5	10.4	11	10.6	9.7	11	10	10.9	9.7	9.6	NID1	6.5	6.7	N/A	6.9	7.1	7.5	6.3	N/A	7.9	6.9	7.3
CDC42EP2	N/A	N/A	N/A	6.5	5.9	N/A	N/A	N/A	7.6	6.4	N/A	NUAK2	9.6	9.8	9	10.1	9.8	9.7	9.6	6.8	8.9	7.3	7.2
CDH1	11	10.8	10.9	10.8	10.6	9.2	10.8	10	9.3	8.2	8	NUDT18	9.3	8.9	8.7	8.6	8.4	7.6	9.7	7.9	8.3	6.9	7
CEBPB	11.5	11	10.6	10.6	9.9	9.1	11.2	10.1	11	9.9	9.5	NUPR1	11.1	10.9	7.3	9.3	7.9	7.8	10.4	6.6	7.1	6.1	6.4
CHRN1	9.8	9.1	9	8.9	8.6	7.3	9.5	7	8.4	7.1	N/A	PCOLCE	7.5	7.4	7	6.9	7.3	8.7	7.9	6.8	8.4	7.2	7.2
CKB	13.9	14.4	13.4	13.7	12.8	12	13.9	12.5	12	10.9	11.7	PCSK9	10.7	9	9.8	8.3	7.3	10.1	7.3	7.8	6.6	6.5	
CKMT1	9.7	10.6	9.1	9.9	8.5	7.3	10	8.6	9.1	6.8	6.7	PEA15	9.7	9.3	10.2	10.2	10.8	10.6	9.6	10	10.9	10	10.1
CLDN4	13.3	13.8	12.9	13.3	12.3	10.8	12.7	11.1	11.9	9.7	8.7	PKP3	7.6	7.9	6.6	7.4	6.4	N/A	7.4	N/A	7.4	5.9	N/A
CLDN6	12.9	12.6	12.9	13.1	13.4	11	12.9	10.7	11.5	5.9	8.5	PLAC8	9.5	9.3	8	9.3	8.1	7.5	9.4	9.4	9.8	8.8	8.4
COL4A2	10.1	10.1	18.5	10.8	10.3	10.5	9.9	9.7	11.2	10.2	9.9	PLAUR	8.4	7.3	7.1	7	6.6	N/A	7.8	6.3	7.2	6.1	N/A
COL4A5	N/A	N/A	N/A	N/A	6.9	7	N/A	N/A	7.1	6	6.1	PLD1	6.3	6.8	6.3	7.2	7.8	7.1	6.4	N/A	7.5	6.5	6.6
CRMP1	8.3	7.7	7.5	8.4	7.6	7.7	8.6	6.7	6.5	5.5	6	PLK2	9.2	8.8	7.9	8.5	8.5	8.2	9.2	7.4	8.5	7.6	7
CRYAB	8.6	8.4	7.2	9	7.7	6.5	8.4	6.4	9.6	7.2	6.4	POU3F1	11	9.7	11	11.1	9.3	7.8	11	8.6	9.2	7.8	7.3
CTGF	12.4	11.9	11.5	11	10.1	8.8	12.1	9.9	11.4	9.9	9.6	PPL	7.3	7.7	6.9	7.8	6.9	N/A	7.1	N/A	7.4	5.7	N/A
DDR1	9.3	N/A	N/A	9	9.2	N/A	9.7	7.8	9.1	8.1	7.5	PRAMEF12	8.2	9	N/A	8.1	6.8	N/A	8.1	6.2	8.6	7.1	6.1
DGKA	9.5	10.3	8.6	9.6	8.5	7.9	9.4	7.9	9.3	8.1	7.8	PRPH	7.7	7.3	N/A	6.4	N/A	N/A	8.3	N/A	7.4	6.4	N/A
DNMT3L	12.8	13.3	7	12.3	7.8	N/A	11	N/A	7.7	6	N/A	PTGES	5.9	5.9	5.9	5.8	6	7.2	5.8	N/A	7.3	6	6.3
DPPA5	15.4	16.1	12.3	15	11.8	9.2	14.2	11.1	10.8	8.5	9.1	RAB15	11.3	11.7	11	12.2	12.4	11	11.4	9.9	10.9	9.3	8.9
DUSP8	7.5	7.9	N/A	7.7	N/A	N/A	7	N/A	7.4	6.1	N/A	RELL1	7.6	8.1	7.5	7.3	7.6	7.3	7.2	6.9	7.7	6.6	6.5
EMP1	7.1	6.7	6.5	7.8	8.8	7.4	7.1	N/A	9.6	6.9	N/A	RHOX5	10.4	10.6	7.9	10.6	7.5	7.4	9.3	7.1	8.5	7.1	7
ENDOD1	9.4	9	9.1	9	9.1	9.1	9.5	8.6	9.5	8.2	8.4	RUSC2	N/A	N/A	N/A	7.5	N/A	N/A	7.8	5.9	7.4	6.2	N/A
EPHX1	8.5	9.5	7.4	8	6.8	6.9	8.8	7.2	7.2	6.2	6.2	S100A6	10.5	9.7	9.7	9.6	9.6	9.4	9.6	7.9	9.9	8.2	8.9
ERRFI1	11.3	11	10.6	11.1	11	10.6	11.1	10	11.7	10.6	10.1	SAMD10	8.8	8.7	8.8	8.8	9.2	7.7	8.7	7.2	7.2	6.2	6.7
ESRRB	12.5	13.9	8.9	12.6	8.9	N/A	10.9	7.1	8.3	7.1	N/A	SLC40A1	10.9	10.8	10.2	10.1	9.7	7.7	10.5	8.6	10.1	8.2	7.2
F11R	9.1	9.2	9.4	9.4	9.7	8.8	9.1	8.9	8.7	7.6	8.1	SLCO2A1	8	7.8	6.9	7.3	N/A	N/A	8.2	N/A	7.9	6.1	N/A
F2RL1	10.7	10.4	11.2	10.2	10.1	9	10.4	10	9.1	7.9	8.3	SPSB1	7.8	7.5	7	7.4	7.9	8.5	7.9	6.5	7.9	6.9	6.9
FABP3	12.3	13.3	10.1	12	9.4	7.5	12.5	9.1	11.5	9.1	8.1	SRXN1	8.6	8.4	8.8	8	7.8	8	8.6	8	8.3	6.8	7
FLVCR2	8.3	8.8	6.4	8.2	7.3	6.7	8.1	6.3	8.2	6.7	N/A	ST14	9.1	9.2	8.7	8.8	8.4	7.1	9.4	7.8	8.4	6.6	6.2
FOXQ1	7.8	7.6	7.2	7.7	6.1	6.6	7.1	6.9	7.6	6.2	N/A	STAR10	8.2	7.9	8.4	8.6	8.5	7.4	8.3	7.3	8.1	7.1	7
GADD45B	9.1	8.6	9.1	8.1	7.3	6.1	9.3	7.6	8.8	7.2	6.9	STMN2	10.9	10.2	10.3	10.9	9.8	8.9	10.6	9.3	9.4	7.7	7
GATA2	7.2	7.2	N/A	7.5	6.7	N/A	8.4	7.6	10	9	8.5	SVOP	8.6	9.5	9	8.8	8.3	8.7	9.4	8.1	8.7	7.4	7.8
GIPC2	7.5	8	7.5	7.9	7.7	6.6	8.1	6.5	8	6.7	N/A	SYN1	8.2	8.2	7.4	7.6	6.6	N/A	7.8	6.8	6.6	5.7	6.1
GP38	12.5	12.4	12.1	12.2	11.5	10	12.3	11.6	11.7	10.8	10.3	TACSTD2	10.4	10	9.1	10.4	9.4	7	10.5	8.3	11.4	8.5	6.9
GPRC5A	8.9	8.8	7.6	8.6	7.6	6.3	8.5	N/A	9.1	6.6	N/A	TBC1D20	6.7	6.8	6.8	7	7.2	6.9	7.6	7.2	8.2	7.2	6.7
GRHL2	9.8	9.2	8.6	8.8	8	6.3	9.3	7.1	7.9	6.3	N/A	TGM1	9.1	8.4	8	8.4	7.5	6.5	8.5	6.4	8.6	6.2	N/A
GSTM2	11.3	12.3	9.9	11.3	10.3	9.7	10.7	9.1	9.8	8.9	9.3	TINAGL	7.1	6.8	N/A	7	6.2	N/A	7	N/A	8.2	6.4	N/A
HEBP1	8.1	8.7	8	8.2	8	7.9	8.5	7.7	8.5	7.5	7.7	TMEM79	8.7	8.3	7.9	8.1	7.4	6.5	8	6.8	7.8	6.2	N/A
HOXB7	N/A	6.1	N/A	N/A	7.3	6.4	N/A	N/A	8.7	7.7	8	TMPRSS13	7.6	8	6.5	7.3	6.3	N/A	7.3	5.7	6.8	5.6	N/A
HSPB1	11.1	11.4	10.3	11.1	9.8	8.8	10.8	9	10.3	8.3	8.3	TMPRSS2	8.9	9.1	10.4	10.4	10.9	8.6	8.8	9.2	10.4	8.3	7.4
HSPB8	8.5	9	8.3	8.6	8.2	7.8	8.1	8.6	9.3	8.4	8.2	TMSB4X	13.1	12.8	12	12.9	13	12.9	12.7	11.2	13.5	11.8	11.3
HTR1D	N/A	N/A	N/A	N/A	6.1	N/A	6.4	N/A	7.3	6.1	N/A	TNFRSF12A	10.6	9.8	10.2	10	10.5	8.3	10.5	8.5	9.3	7.5	6.8
ICAM1	8.7	8.9	8.2	8.4	7.8	7.7	8.8	7.4	8.3	6.4	6.7	TRP5											

## BMP4/DKK1, 96Std, Msgn1, aktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
6330505N24RIK	6.8	7.2	7.8	8.9	9.9	8.6	7.1	7.6	8.2	8.7	9.7
ALDH1A2	N/A	N/A	N/A	6.1	7.7	9.6	N/A	N/A	5.9	6.5	7.9
CITED1	6.9	6.5	7.1	7.6	7.7	8.7	6.5	7.1	7.1	6.8	8.3
D12ERTD647E	N/A	N/A	7.3	6.1	8	8.4	N/A	6.7	5.9	6.4	7.8
DCPP1	N/A	N/A	N/A	N/A	6.9	7.4	N/A	N/A	6	7.1	
FOXC1	N/A	N/A	6.5	7.4	9.5	11.2	6.4	8.2	6.5	7.5	9.4
GBX2	8.7	8.9	10.7	11.6	11.8	12.5	7.3	9.6	8.3	9.9	11.3
HOXA2	N/A	N/A	6.4	6.4	7.9	9.3	N/A	N/A	5.6	6.6	7.9
HOXA5	N/A	N/A	7.7	7.6	9.9	10.4	N/A	N/A	6.2	6.9	8.5
HOXD8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	7.2	N/A	N/A	6.9	6.8	7.8
HOXD9	N/A	N/A	N/A	N/A	6.4	7.6	N/A	N/A	8.7	8.9	10.3
ISL1	N/A	N/A	8.4	9.8	10	9.2	N/A	9.2	9.7	10.6	11.8
LGALS3BP	N/A	N/A	7.4	N/A	8.2	8.7	N/A	7.3	7.6	7.6	8.5
LOC100045403	7.8	8.4	7.3	9.5	8.3	8.7	8.5	N/A	N/A	6.4	8
LOC100045484	N/A	N/A	N/A	N/A	6.9	8.7	N/A	7.6	N/A	7.4	9.2
LOC100046120	10.4	9.6	10.5	10.5	12.7	13.7	10.6	9	9.6	9.2	11.1
MEOX1	N/A	N/A	N/A	9.3	11.6	13.2	N/A	N/A	N/A	6.6	8.2
NGFR	7.5	7.3	6.4	7.5	7.3	8.6	6.7	6.3	6.3	6.5	7.6
PNLIPRP2	N/A	N/A	5.7	N/A	7	8.2	5.9	6.6	7	7.8	9.1
PTGDS	N/A	N/A	N/A	6.7	8.3	9.2	N/A	7	6.7	7.6	9
RSPO3	6.9	6.4	10.1	8.5	11.2	11.9	6.4	10.3	9.2	9.8	11.5
SCARA3	6.5	6.3	8.6	8.5	11.3	11.2	7.2	6.7	7.4	8.4	10.2
SERPINF1	8.8	8.9	8	8.1	9.5	10.2	8.8	7.4	8.4	8.3	9.5
SHISA2	7.2	7.5	8.5	9.1	10	9.6	7.7	6.4	7.3	7.5	8.4
SMOC1	9	9	9.9	10.3	12.6	12.8	8.3	7.3	7.4	8	9.2

## BMP4/DKK1, 96Std, Msgn1, deaktiviert

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
2310033K02RIK	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	8.8	8.8	6.8
3110043J09RIK	9.2	8.6	9.1	8.7	8.5	7.1	9.4	N/A	9.1	8	6.9
ADAMTS2	N/A	6.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	9.3	8.9	6.9
AHNAK	9.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	9.4	N/A	11.2	10.7	9
ALOX5AP	6.2	N/A	N/A	N/A	6.4	N/A	N/A	N/A	8.4	8.3	7.1

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
ASB12	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
ATP1B1	11.6	11.8	10.5	11.2	9.5	7.6	11.9	9.1	9.7	7.9	6.9
CCDC80	N/A	6.4	N/A	N/A	N/A	6.5	N/A	N/A	8.4	7.5	6.6
CLDN11	N/A	N/A	N/A	N/A	7.8	7.1	N/A	N/A	9.9	9.6	8.3
CLDN4	13.3	13.8	12.9	13.3	12.3	10.8	12.7	11.1	11.9	9.7	8.7
DACT2	8.5	8.9	7.8	8.2	7.8	8	7.9	N/A	7.6	7.5	6.4
ECE1	8.6	8.9	N/A	N/A	8.7	9.1	8.9	N/A	11.1	10.9	9.8
FHL2	6.5	N/A	N/A	7.1	7.4	6.6	N/A	N/A	8.1	7.6	6.6
GADD45G	9.4	9.7	7	9.8	8.6	9.7	8.8	N/A	11.4	10.5	9.1
GUCY1A3	N/A	N/A	N/A	N/A	5.3	N/A	N/A	N/A	7.5	7.1	6
HOXB5	N/A	N/A	N/A	6.8	8.2	9.6	N/A	N/A	10.1	10.1	8.9
HS3ST1	7.9	8.1	7.2	8.9	8.2	6.8	7.3	N/A	7.1	N/A	6.1
IGFBP2	11	10.9	11.4	11.4	11	9.1	11.3	10.2	10.8	9.1	7.8
IGFBP5	6.6	6.8	8.8	12.3	13.6	12.2	6.8	N/A	8.1	7.6	6.4
IGSF21	N/A	N/A	N/A	N/A	6.5	7.4	N/A	N/A	8.3	8.1	6.8
ITGA3	10.7	9.7	10	9.9	9.4	7.9	10.9	8.1	10.1	8.1	7.2
KCNAB1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	6.8	6.7	5.8
LOC100044177	10	10.2	10.4	10.4	10	8.5	10	9.7	10	9.3	8.3
MAPT	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	6.4	N/A	5.4
NDG2	13.5	14	12	13	10.9	9.6	12.9	11.5	10.4	10	8.9
NEDD9	8	7.6	9.2	9.2	10.4	8.3	7.9	8.7	9.1	8.5	7.4
RBMS3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	8	8.3	7
RND2	6.9	6.9	7.1	7.5	7.4	6.3	7.2	N/A	9	8.8	7.1
SIAT9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	6.4	N/A	N/A	8.2	7.9	6.6
SLC40A1	10.9	10.8	10.2	10.1	9.7	7.7	10.5	8.6	10.1	8.2	7.2
SPON2	6.5	7.6	N/A	8.7	9	7.6	6.7	N/A	9.7	9.4	7.7
SVEP1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	8.1	7.6	6.3
TACSTD2	10.4	10	9.1	10.4	9.4	7	10.5	8.3	11.4	8.5	6.9
TGFBI	N/A	N/A	N/A	N/A	7.7	8.7	N/A	N/A	8.4	N/A	7
TGM2	7.2	7.1	7	7.5	7.9	7	7.2	N/A	7.6	7.5	6.3
TMEM108	6.1	N/A	7.5	7.7	9.4	8.3	6.1	N/A	10	10	8.5
TNNI2	N/A	6	N/A	6.7	6.7	6.4	N/A	N/A	7.9	7.9	6.4

## Expression von Foxa2

Gensymbol	48Std_WN	nf_72StdWN	T_72StdWN	nf_96StdWN	T_96StdWN	Msgn1_96StdWN	48Std_BD	T_72StdBD	nf_96StdBD	T_96StdBD	Msgn1_96StdBD
FOXA2*	5	5.1	8.4	7	8.5	6.7	4.9	5.9	4.8	N/A	4.8

\*Illumina-Detection-Wert >0,5