

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

Aus dem Albrecht-Kossel Institut für Neuroregeneration

Direktor: Prof. Dr. med. Arndt Rolfs

Untersuchung zur Gliose im Morbus Niemann-Pick Typ C unter Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften (Dr. rer. hum)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Franziska Peter, geb. am 06.11.1989 in Rostock

aus Rostock

Rostock, 12.02.2018



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.

Gutachter:

Prof. Dr. med. Arndt Rolfs, Universitätsmedizin Rostock, Albrecht-Kossel-Institut für
Neuroregeneration

Prof. Dr. med. Christine Klein, Universität zu Lübeck, Institut für Neurogenetik

Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling, Universitätsmedizin Rostock, Oscar-Langendorf-Institut
für Physiologie

Jahr der Einreichung: 2018

Jahr der Verteidigung: 2018

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	iii
1. Einleitung	1
1.1 Morbus Niemann-Pick Typ C	1
1.1.1 Klinischer Phänotyp des Morbus Niemann-Pick Typ C	1
1.1.2 Struktur und Funktion der Proteine NPC1 und NPC2.....	2
1.1.3 Molekulare Mechanismen des Morbus Niemann-Pick Typ C	6
1.1.4 Diagnostik des Morbus Niemann-Pick Typ C.....	8
1.1.5 Therapieansätze des Morbus Niemann-Pick Typ C	8
1.1.6 Tier- und Zellmodelle zur Untersuchung des Morbus Niemann-Pick Typ C.....	9
1.2. induzierte Pluripotente Stammzellen.....	11
1.2.1 Methode zur Herstellung von iPS-Zellen	11
1.2.2 IPS-basierte Zellmodelle für neurodegenerative Erkrankungen.....	12
1.3. Gliose	12
1.4. Intermediärfilamente	15
1.4.1 Vimentin.....	16
1.4.2 GFAP.....	18
1.5 Zielstellung.....	19
2. Material & Methoden	20
2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Mikroorganismen und Medien	20
2.1.2 humane Zelllinie und entsprechende Medien	20
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Kultivierung humaner und muriner Zelllinien.....	23
2.2.2 Reprogrammierung humaner Fibroblasten und Herstellung von neuronalen Progenitorzellen	27
2.2.3 Charakterisierung der iPS-Zellen	31
2.2.4 Immunzytochemische Färbungen.....	32
2.2.5 Durchflusszytometrie	34
2.2.6 Western Blot.....	35
2.2.7 Bestimmung des Cholesterolgehaltes mittels Amplex Red Assay	38
2.2.8 Calcium-Assay	39
2.2.9 Quantitative Realtime-PCR	40
2.2.10 Kolokalisationsanalyse	41
2.2.11 Statistische Analysen.....	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Generierung von iPS-Zelllinien.....	42

3.1.1 Retrovirale Reprogrammierung von Fibroblasten.....	42
3.1.2 Charakterisierung der generierten iPS-Zellen	43
3.1.3 Charakterisierung der neuronalen Progenitorzellen	47
3.1.4 Charakterisierung der neuronal differenzierten Zellen.....	49
3.2 Nachweis der Gliose und des Intermediärfilament-Phänotyps im NPC1-Zellmodell.....	51
3.2.1 Erhöhter Anteil Gliazellen in NPC1-defizienten Zelllinien	51
3.2.2 Erhöhter Vimentingehalt in NPC1-defizienten Zellen	54
3.2.3 Veränderte Phosphorylierung von Vimentin und GFAP in NPC1-defizienten Zellen.....	56
3.2.4 Verbesserung des NPC1-Phänotyps über die PKC-Aktivierung mittels PMA	58
3.2.5 Verbesserung des NPC1-Phänotyps über die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels mittels Quinolinsäure	63
3.3 Induktion des Gliose- und Intermediärfilament-Phänotyps über U18666A.....	68
3.4 Nachweis des neuronalen Phänotyps im NPC1-Zellmodell.....	71
3.4.1 Erhöhter Vimentinanteil in NPC1-defizienten Neuronen.....	71
3.4.2 Nachweis von GM2-Akkumulationen in NPC1-defizienten Neuronen	73
3.4.3 Verbesserung des neuronalen Phänotyps über die Aktivierung der PKC mittels PMA.....	76
3.4.4 Verbesserung des neuronalen Phänotyps über die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels mittels Quinolinsäure	78
4. Diskussion	81
4.1 Generierung neuer iPS-Zelllinien und Differenzierung in neuronale Zelllinien.....	81
4.1.1 Vergleichbarkeit der generierten iPS- und neuronalen Zelllinien mit anderen Zellmodellen	81
4.1.2 Untersuchung verschiedener NPC-Zelllinien.....	83
4.1.3 Vorteil der neuronalen und glialen Mischkultur.....	85
4.2. Untersuchung der Gliose im neuronalen NPC1-Zellmodell.....	86
4.3 Veränderungen der Intermediärfilamente im NPC1-Zellmodell.....	90
4.3.1 Erhöhter Vimentingehalt in NPC1-defizienten Zelllinien.....	91
4.3.2 Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von Vimentin und GFAP in NPC1	92
4.4 Aktivierung der PKC als möglicher Therapieansatz in NPC	94
4.4.1 Direkte Aktivierung der PKC über PMA	94
4.4.2 Indirekte Aktivierung der PKC über eine Erhöhung des Calciumeinstroms mittels Quinolinsäure	96
5. Literaturverzeichnis.....	100
6. Anhang	A1
Abkürzungsverzeichnis	A20
Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis	A23
Danksagung	A26
Eidesstattliche Erklärung.....	A27
Wissenschaftlicher Lebenslauf.....	A28

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere patientenspezifische iPS-Zellen des Morbus Niemann-Pick Typ C herzustellen und zu charakterisieren. Des Weiteren sollte der zelluläre Mechanismus dieser neurodegenerativen Erkrankung näher untersucht werden, wobei insbesondere die Gliose und die Veränderungen der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin näher betrachtet werden sollten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 neue patientenspezifische iPS-Zelllinien hergestellt. Dabei handelte es sich um eine Kontrolle (Kontrolle A), eine NPC1-defiziente Zelllinie (Mutation: c.3182T>C; p.I1061T) und eine NPC2-defiziente Zelllinie (Mutation: c.58G>A, c.140G>T; p.E20X; C47F). Aus patientenspezifischen Fibroblasten wurden dafür zunächst iPS-Zellen hergestellt, aus denen im Folgenden neuronale Zellen differenziert wurden und eine Mischkultur aus Neuronen und Gliazellen entstand. Die hier hergestellten NPC1- und NPC2-defizienten Zelllinien zeigten keinerlei Unterschiede in Bezug auf das Ausmaß der Cholesterolakkumulationen oder den Anteil an Gliazellen, wobei die untersuchten Parameter in beiden Zelllinien gegenüber der Kontrolle erhöht waren.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit 3 verschiedene NPC1-Mutationen im Hinblick auf den zellulären Phänotyp näher untersucht. Dabei handelte es sich um eine kombinierte heterozygote Mutante mit der Mutation c.1836A>C; c.1628delC (p.E612D; F542fsX), eine homozygote Mutation c.1180 (p.Y395H) und die prävalente NPC1-Mutation c.3182T>C (p.I1061T). Angenommen wurde bei der Untersuchung der Mutationen, dass die kombinierte heterozygote Mutante einen schwerwiegenden Phänotyp aufweist, wohingegen die homozygoten Mutationen einen milderen Phänotyp zeigen. Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Mutationen einen ähnlichen zellulären Phänotyp, hinsichtlich Cholesterol- und GM2-Akkumulationen, sowie der Gliose und der Veränderungen der Intermediärfilamente aufweisen. Alle NPC1-defizienten Linien zeigten dabei eine ähnliche Tendenz auch in Bezug auf die Responsivität in Folge von Behandlungen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder Quinolinsäure (QUIN).

Zur Untersuchung des zellulären Mechanismus des Morbus Niemann-Pick Typ C sollte die Gliose näher untersucht werden. Die Gliose ist ein universeller Mechanismus, der nach Verletzungen des Gehirns auftritt. Dabei werden die Intermediärfilamente GFAP (gliale fibrilläre saure Protein) und Vimentin in den Gliazellen hochreguliert und eine erneute Proliferation der Gliazellen findet statt. Dieser Mechanismus wurde für NPC bisher im NPC1-Mausmodell (Baudry et al., 2003; Pressey et al., 2012) und in humanen post-mortem Studien

(Chiba et al., 2014; Cologna et al., 2014; Yamashita, 2012) beschrieben. In dieser Arbeit konnte der Mechanismus der Gliose ebenfalls in iPS-basierten differenzierten Gliazellen nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse korrelieren dabei mit den bekannten Daten aus dem NPC1-Mausmodell.

Neben der Gliose, die zur Erhöhung der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP führt, wurde auch der Phosphorylierungsstatus dieser Intermediärfilamente in NPC näher untersucht, da aus NPC1-defizienten Fibroblasten bekannt ist, dass es zu einer Veränderung des Phosphorylierungszyklus von Vimentin kommt (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). Dieses Phänomen sollte auch in den hier verwendeten Zellen untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass Vimentin, obwohl es nach der Differenzierung in Neuronen und Gliazellen herunterreguliert wird, wieder in differenzierten NPC-defizienten Zelllinien hochreguliert war. Des Weiteren konnte eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin festgestellt werden. Dabei war der Anteil an phosphorylierten GFAP und Vimentin im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien signifikant verringert, wodurch es zu Akkumulationen von unlöslichem GFAP und Vimentin in den NPC1-defizienten Zelllinien kam. Diese Veränderungen der Phosphorylierung von GFAP und Vimentin könnten auf eine verminderte Proteinkinase C (PKC)-Aktivität zurückgeführt werden. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob eine Aktivierung der PKC über eine direkte Aktivierung mittels PMA oder eine indirekte Aktivierung über einen erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle mittels Quinolinsäure zu einer Verbesserung des NPC1-Phänotyps führt. In der Tat zeigten sowohl die Aktivierung der PKC durch PMA als auch durch Quinolinsäure eine deutliche Verbesserung des NPC1-Phänotyps in allen NPC1-mutierten Zelllinien. Dabei kam es zu einer Verbesserung der Gliose, einer gesteigerten Phosphorylierung der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin und zu einer Reduktion der Cholesterolakkumulationen in allen NPC1-Zelllinien.

Ein hypothetischer Zusammenhang dieser beschriebenen zellulären Mechanismen wäre, dass die Akkumulationen von Cholesterin in NPC-defizienten Zelllinien zu einer verminderten Aktivität der PKC führen, woraufhin es zu einer verringerten Phosphorylierung von GFAP und Vimentin kommt sowie zu Akkumulationen der unlöslichen Formen der Intermediärfilamente in der Zelle. Dies könnte auf Grund des gesteigerten zellulären Stresses zu einer Induktion der Gliose führen. Diese Mechanismen könnten zur Neurodegeneration im Morbus Niemann-Pick Typ C beitragen.

1. EINLEITUNG

1.1 MORBUS NIEMANN-PICK TYP C

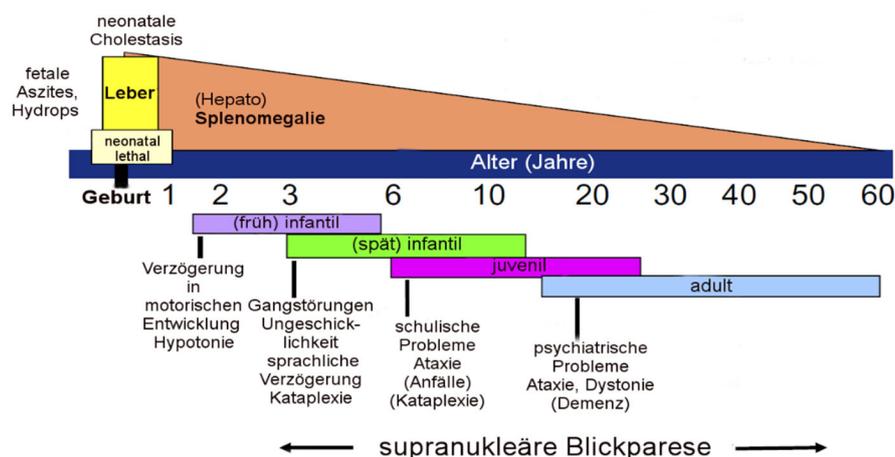
Morbus Niemann-Pick Typ C (NPC) ist eine seltene, autosomal rezessive, lysosomale Speichererkrankung, bei der es auf Grund der Dysfunktion der Proteine NPC1 oder NPC2 zur Akkumulation verschiedener Lipide, vor allem Cholesterol, in den Lysosomen kommt. Die minimale Inzidenz dieser Erkrankung liegt bei 1:120000 Geburten (Vanier, 2010), wobei neuste Studien von einer höheren Inzidenz ausgehen. Selbst diese Inzidenz könnte auf Grund der spät auftretenden Krankheitsverläufe immer noch unterschätzt sein (Wassif et al., 2016).

Benannt wurde die Erkrankung nach Albert Niemann (1880-1921) und Ludwig Pick (1868-1944) auf Grund ihrer Untersuchungen der Erkrankung in den 1920er Jahren. In den 1950er Jahren zeigten Crocker und Farber eine hohe Variabilität der Symptome des Morbus Niemann-Pick, woraufhin eine Klassifizierung vorgenommen wurde (Vanier, 2010). Die Erkrankungen Morbus Niemann-Pick Typ A und B gehen auf eine Mutation der Sphingomyelinase und damit einhergehende Akkumulationen von Sphingomyelin (Harzer et al., 2003) zurück. Dahingegen kommt es beim Typ C zu Mutationen in den Genen *NPC1* oder *NPC2*. Die Proteine NPC1 und NPC2 dienen dem Transport von Cholesterol aus dem Lysosomen, dadurch kommt es bei Fehlfunktionen dieser Proteine zu Akkumulation von Cholesterol und sekundären Lipiden im Lysosomen (Harzer et al., 2003; Walkley and Suzuki, 2004).

1.1.1 KLINISCHER PHÄNOTYP DES MORBUS NIEMANN-PICK TYP C

Die klinischen Symptome dieser seltenen Erkrankung variieren sehr stark und reichen von Hepato-Splenomegalie, motorischen Dysfunktionen, zerebralen Ataxien und Anfällen bis zur Demenz und weiteren psychiatrischen Störungen. Dabei variiert ebenso der Beginn der Krankheit von sehr frühen postnatalen über kindliche und juvenile Formen der Erkrankung bis zum späten Erwachsenenalter (siehe Abb. 1.1). Auf Grund dessen liegt auch die Lebenserwartung zwischen 6 Monaten, bei neonatalen Formen, und bis zu über 70 Jahren bei späten adulten Formen.

Systemische Beteiligung



Neurologische Beteiligung

Abbildung 1.1: Schematische Einteilung der klinischen Erscheinungsformen des Morbus Niemann-Pick Typ C. Übersicht über die Formen von NPC im Hinblick auf das Eintreten der Krankheit sowie typische systemische und neurologische Symptome (verändert nach Vanier, 2010).

Der Morbus Niemann-Pick Typ C wird als neuroviszerale Erkrankung definiert, wobei viszerale und neurologische Symptome zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten (Abb. 1.1). Beim Auftreten von systemischen Symptomen sind auch immer neurologische Symptome zu beobachten. Dahingegen fehlen bei ungefähr 15 % der Patienten mit neurologischen Symptomen jegliche systemische Symptome. Zwischen dem Auftreten dieser beiden Kategorien von Symptomen können mitunter viele Jahre liegen. Es wurde festgestellt, dass das Auftreten der neurologischen Symptome mit der Lebenserwartung der Patienten und der Schwere der Krankheit korreliert. Auf Grund der Vielfältigkeit der Symptome kommt es immer noch zu fehlerhaften und stark zeitverzögerten Diagnosen des Morbus NPC (Vanier, 2010).

1.1.2 STRUKTUR UND FUNKTION DER PROTEINE NPC1 UND NPC2

Die Ursache des Morbus Niemann-Pick Typ C liegt in den Mutationen des *NPC1*- (95 %) und des *NPC2*-Gens (5 %) (Ory, 2000; Vanier, 2010). Die Mutationen der beiden Gene führen zum einem vergleichbaren Phänotyp des Morbus Niemann-Pick Typ C, wobei Mutationen des *NPC2*-Gens häufiger zu pulmonalen Defekten führen und die Patienten häufig im Säuglingsalter versterben (Millat et al., 2001a).

Das *NPC1*-Gen ist auf Chromosom 18q11-12 lokalisiert und kodiert 25 Exons, die ein 1278 Aminosäuren umfassendes Protein bilden (Vanier, 2010). Das NPC1-Protein ist ein transmembranes Protein in der Membran von späten Endosomen und Lysosomen. Es besteht

aus 13 Transmembran-Domänen, drei großen Schlaufen im Lumen des Endosoms/Lysosoms, mehreren zytoplasmatischen Schlaufen und einem C-terminalen zytoplasmatischen Ende sowie der Sterol-sensitiven-Domäne (SSD) (Abb. 1.2). Die luminalen Schlaufen sind dabei hoch glykosyliert, um das Protein vor proteolytischem Abbau im Endosomen/Lysosomen zu schützen (Ory, 2004; Scott and Ioannou, 2004). Die Sterol-sensitive-Domäne, aber auch die N-terminale-Domäne (NTD) können laut aktuellen Studien Cholesterol binden (Infante et al., 2008; Storch and Xu, 2009).

Zur Zeit sind etwa 400 Mutationen des *NPC1*-Gens beschrieben (Bountouvi et al., 2017). Genotyp-Phänotyp Korrelationen, wie sie für andere Lysosomale Speichererkrankungen, wie Morbus Fabry (Germain et al., 2002), Morbus Gaucher (Whitfield et al., 2002) und Pompe (Kroos et al., 2012) nachgewiesen sind, konnten bislang für Morbus Niemann-Pick Typ C nicht eindeutig belegt werden. Für einige Mutationen konnten bisher dennoch Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beschrieben werden. So führen zum Beispiel Mutationen in der Cystein-reichen-Domäne, wie c.3182C>T (p.I1061T), zu einem milden bzw. variablen Phänotyp, wohingegen Mutationen in der Sterol-sensitiven-Domäne sehr schädlich sind (Millat et al., 2001b; Vanier and Millat, 2003). Dennoch konnten bisher auf Grund der großen Anzahl an kombinierten heterozygoten Mutationen keine allgemeinen Genotyp-Phänotyp-Korrelationen nachgewiesen werden (Cervera-Gaviria et al., 2016). Die prävalente Mutation des *NPC1*-Gens ist die c.3182T>C (p.I1061T) Punktmutation, die in 20 % aller NPC1-Patienten und dabei sehr häufig in Patienten aus West-Europa auftritt (Millat et al., 1999). Diese Punktmutation in der Cystein-reichen-Domäne (Millat et al., 2001b) des NPC1-Proteins führt zu einem variablen klinischen und biochemischen Phänotyp. Ein variabler Phänotyp zeigt sich in der Diagnostik durch geringe Cholesterollakkumulationen und eine leicht verringerte Cholesterolesteraseaktivität. Klinisch gesehen sind die Krankheitsverläufe eher mild (Vanier and Millat, 2003). Homoallelisch führt diese Mutation zu einem frühen systemischen Einsetzen der Krankheit, wobei die ersten neurologischen Symptome im kindlichen oder im adoleszenten Stadium der Entwicklung auftreten können (Imrie et al., 2015; Millat et al., 2001b; Yamamoto et al., 2000).

Punktmutationen im *NPC1*-Gen, wie die c.3182T>C (p.I1061T) und im *NPC2*-Gen führen in vielen Fällen zu einer Fehlfaltung des Proteins auf Grund der veränderten Aminosäuren, die zu einer Beeinträchtigung der strukturellen Faltung des Proteins führen. Das führt dazu, dass das Protein nicht über das Golgi-System zum Lysosomen transportiert wird (Gelsthorpe et al., 2008; Praggastis et al., 2015). Die Punktmutationen ziehen einen Abbau des fehlgefalteten Proteins über die endoplasmatische-Retikulum-assoziierte Degradation und das Ubiquitin-Proteasom-System nach sich. Für NPC1 konnte bisher eine Ubiquitinierung des fehlgefalteten Proteins,

sowie die Interaktion von NPC1 mit molekularen Chaperonen nachgewiesen werden, wie Hsp70, Hsp90, E3 Ubiquitin-Ligase CHIP und Calnexin, die die Faltung des Protein unterstützen sollen (Nakasone et al., 2014). Der Abbau des fehlgefalteten Proteins führt dazu, dass nur wenig funktionales Protein in der Zelle vorhanden ist. Dennoch wird ein geringer Teil des mutierten Proteins funktionsfähig zum Lysosomen transportiert (Schultz et al., 2016).

Das *NPC2*-Gen ist auf Chromosom 14q24.3 lokalisiert und kodiert 5 Exons, die ein 132 Aminosäuren umfassendes Protein bilden, das bevor es als NPC2-Protein beschrieben wurde auch als HE1 bezeichnet wurde (Vanier, 2010). Das NPC2-Protein ist ein lösliches Glykoprotein (Abb. 1.2), das vor allem in Endosomen und Lysosomen vorkommt, aber auch in sekretorischen Flüssigkeiten, wie Milch oder Plasma gefunden wurde (Storch and Xu, 2009). Für das *NPC2*-Gen sind derzeit 25 verschiedene Mutationen beschrieben (Hebbar et al., 2016), wohingegen im Gegensatz zum NPC1-Protein für die beschriebenen Mutationen eine gute Phänotyp-Genotyp-Korrelation bekannt ist (Millat et al., 2001a). Bei den meisten Niemann-Pick Typ C Erkrankungen mit Mutationen im *NPC2*-Gen treten die ersten Symptome neonatal auf, wobei es zur Ausprägung eines schweren Phänotyps kommt, der häufig letal ist. Dabei treten überwiegend respiratorische und hepatische Manifestationen sowie schwerwiegende neurologische Symptome auf. Die am häufigsten auftretenden Mutationen sind Nonsense-Mutationen oder Verschiebungen des Leserrasters sowie die Mutation p.E20X (Millat et al., 2001a; Vanier and Millat, 2003). Dabei handelt es sich um Mutationen, die zur Verkürzung des NPC2-Proteins sowie Deletionen oder Insertionen einzelner oder mehrerer Nukleotide mit dem Ergebnis der Leserasterverschiebung bei der Translation führen können. Somit kommt es zu Veränderungen der Aminosäurekette und meist nicht-funktionalen Proteinen. Diese Mutationen führen zu einer frühen und schwerwiegenden Ausprägung der Krankheit mit letalen Auswirkungen.

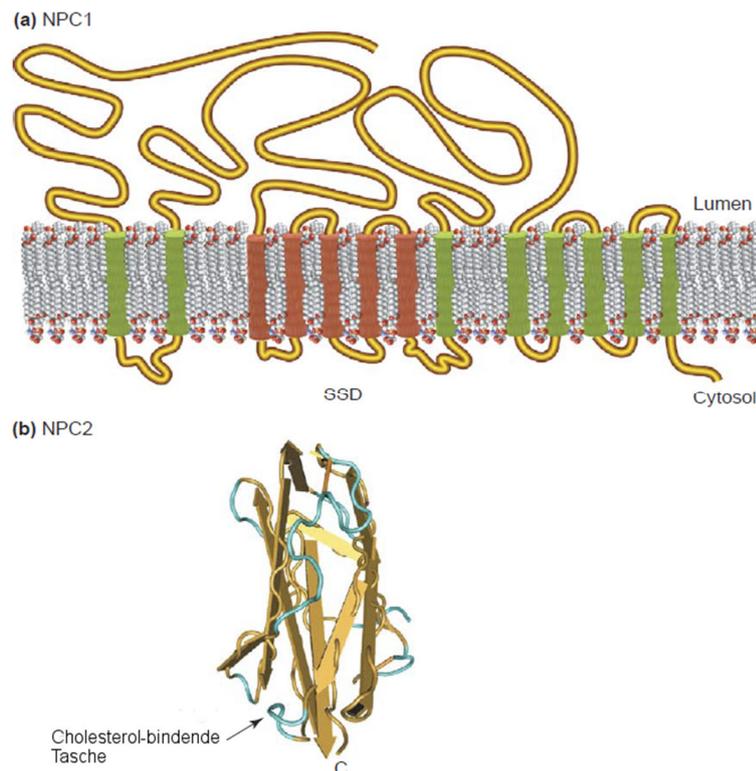


Abbildung 1.2: Struktur des NPC1- und NPC2-Proteins.

Abbildung (a) stellt das transmembrane NPC1-Protein mit der Sterol-sensitiven-Domänen (SSD) dar. In Abbildung (b) ist die Struktur des NPC2-Proteins zusammen mit der putativen Cholesterol-bindenden Tasche abgebildet (verändert nach Ioannou, 2005).

Auf Grund der Tatsache, dass Mutationen in beiden Proteinen, NPC1 und NPC2, einen vergleichbaren Phänotyp des Morbus Niemann-Pick Typ C hervorrufen, wurde eine Interaktion der beiden Proteine im Cholesteroltransport vermutet. Sowohl für die Cholesterol-bindende Tasche des NPC2-Proteins als auch für die N-terminale-Domäne des NPC1-Proteins konnte eine Cholesterol-Bindungsaffinität nachgewiesen werden. Dabei wurde eine Shuttle-Funktion von NPC2 zu NPC1 von Cholesterol festgestellt (Infante et al., 2008). Der hypothetische Transportmechanismus von Cholesterol aus den Lysosomen wird wie folgt dargestellt: Cholesterol wird in der hydrophoben Tasche des NPC2-Proteins gebunden und der NPC2/Cholesterol-Komplex wird zum NPC1-Protein in der Membran der Endosomen/Lysosomen übertragen. Daraufhin geht das NPC2-Protein eine transiente Bindung zum NPC1-Protein ein und Cholesterol wird an die N-terminale-Domäne des NPC1-Proteins übertragen. Die Membranpassage erfolgt möglicherweise über die Sterol-sensitive-Domäne. Unterstützt wird dieses Modell des Cholesterol-Transportes von Vance und Peak (2011) durch die Tatsache, dass Cholesterol an NPC1 bzw. NPC2 in entgegengesetzten Orientierungen bindet und dass Cholesterol durch den Transfer von NPC2 zu NPC1 dem wässrigen Milieu des endosomalen/lysosomalen Lumens und somit einer Kristallisation entgeht. Die Interaktion der

beiden Proteine könnte die Ähnlichkeiten im klinischen Phänotyp der Mutationen der unterschiedlichen Proteine erklären (Infante et al., 2008; Kennedy et al., 2012; Vance and Peake, 2011; Vanier, 2014).

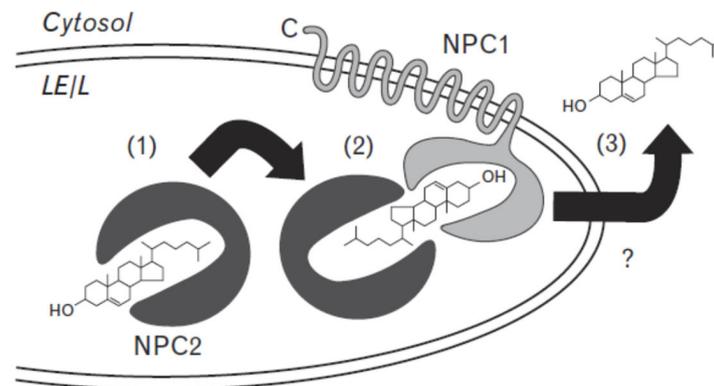


Abbildung 1.3: Möglicher Mechanismus zum Export von Cholesterol aus Endosomen/Lysosomen.

Das NPC2-Protein bindet unverestertes Cholesterol im Lumen von späten Endosomen/Lysosomen mit der Isooctyl-Gruppe in der Cholesterol-bindenden Tasche (1). Das NPC2-Protein transportiert Cholesterol zur N-terminalen Domäne von NPC1, wo Cholesterol mit der Hydroxylgruppe bindet (2). Das Cholesterol wird dann über die Membran der späten Endosomen/Lysosomen zum endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran über einen unbekannten Mechanismus transportiert (3) (nach Vance and Peake, 2011).

1.1.3 MOLEKULARE MECHANISMEN DES MORBUS NIEMANN-PICK TYP C

Auf Grund des Defektes in den Cholesterol-transportierenden Proteinen NPC1 oder NPC2 kommt es zur Akkumulation von Cholesterol und anderen sekundären Lipiden, wie Sphingomyelin, Glycolipiden, freien Sphingosinen und Sphingoninen und den Sphingolipiden GM2 und GM3 (Vanier, 2010; Zervas et al., 2001). Dabei konnten keine Unterschiede in den pathophysiologischen Lipidprofilen von NPC1- und NPC2-Patienten gefunden werden, aber Unterschiede in den Lipidprofilen von Gehirn und nicht-neuralen Organen von NPC-Patienten. Dabei wurden vor allem in Leber und Milz komplexe Lipidmuster gefunden, wobei kein spezielles Lipid vorrangig akkumulierte (Vanier, 2010). Im Gehirn dahingegen wurden im gesamten Organ keine schwerwiegenden Akkumulationen von Cholesterol und Sphingomyelin gefunden allerdings Akkumulationen von GM2 und GM3. Auf zellulärer Ebene hingegen kommt es zur Akkumulation von freiem, nicht-verestertem Cholesterol in Endosomen und Lysosomen (Ory, 2000; Vanier and Millat, 2003; Walkley and Suzuki, 2004; Zervas et al., 2001). Diese Akkumulationen wurden unter anderem in den Perikarya von murinen Neurone beobachtet. Auch in kultivierten primären murinen Neuronen mit NPC1-Defizienz konnten keine Abnormitäten im Wachstum oder der Morphologie beobachtet werden, aber eine

Akkumulation von freiem Cholesterol in Lysosomen und Endosomen in der Nähe der Zellkerne (Karten et al., 2002). Dahingegen konnten keine Veränderungen des Gesamt-Cholesterolgehaltes in diesen Zellen beschrieben werden, was auf eine Verarmung der distalen Axone an Cholesterol zurückgeführt wurde. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass der anterograde Transport von Cholesterol-transportierenden Vesikeln in NPC1 gestört ist (Karten et al., 2002). Weitere Studien zeigten dennoch einen erhöhten Cholesterolgehalt auf zellulärer Ebene (Bergamin et al., 2013; Kim et al., 2016; Ordonez et al., 2012; Ordoñez and Steele, 2017; Trilck et al., 2017), sodass von einer abnormalen primären Akkumulation von freiem Cholesterol als auch einer Erhöhung des gesamten Cholesterolgehaltes in der Zelle ausgegangen werden kann. Eine weitere Erklärung für die geringe Erhöhung des Netto-Cholesterolgehaltes im Gehirn könnte die Cholesterolbiosynthese innerhalb des ZNS selbst sein. Im Gehirn wird Cholesterol nach Bedarf synthetisiert, zum einen von Gliazellen, vorrangig von Oligodendrozyten und Astrozyten, aber auch in geringem Maße von Neuronen. Die Neurone nehmen das in Gliazellen synthetisierte Cholesterol über Endozytose auf, können aber auch zum geringen Teil exogenes Cholesterol über Lipoproteine aufnehmen (Pfrieger and Ungerer, 2011). Die Cholesterolbiosynthese ist stark an die Häufigkeit von Cholesterol gekoppelt. Im NPC1-Mausmodell wurde gezeigt, dass die Cholesterol-Synthese auf Grund der Akkumulationen im Endosomen/Lysosomen reduziert und im Gegensatz dazu die Exkretion von Cholesterol erhöht ist (Xie, 2003). Diese vor allem endogene Cholesterolbiosynthese im Gehirn sowie die Verringerung der Cholesterolbiosynthese in den Zellen könnte die Ursache für die geringe Erhöhung des Gesamt-Cholesterolgehaltes im Gehirn sein (Vanier, 2014). Für das NPC1-Mausmodell wurde zudem eine altersabhängige Demyelinisierung beschrieben, welche im zunehmendem Alter der Tiere zu einer Reduktion des Gesamt-Cholesterolgehaltes im Gehirn beitrug (Vance, 2012; Xie et al., 2000)

Frühere Studien vermuteten, dass es sich beim NPC um eine Sphingosin-Speichererkrankung handelt und nicht um eine primäre Akkumulation von Cholesterol (Lloyd-Evans et al., 2008). Da jedoch gezeigt werden konnte, dass NPC1 und NPC2 eine direkte Bindung mit Cholesterol eingehen (Infante et al., 2008; Vanier, 2014), ist es wahrscheinlicher, dass es sich beim NPC um eine primäre Cholesterolspeichererkrankung handelt (Storch and Xu, 2009). Ebenfalls bekannt ist, dass massive Cholesterolakkumulationen die Glykosylceramidase beeinflussen, was zu sekundären Akkumulation von Glykolipiden in NPC1 führt (Vanier, 2014). Somit bedingt die primäre Akkumulation von Cholesterol die darauffolgende sekundäre Akkumulation von weiteren Lipiden, Sphingolipiden und Glykolipiden (Reid et al., 2004; Storch and Xu, 2009).

1.1.4 DIAGNOSTIK DES MORBUS NIEMANN-PICK TYP C

Die Diagnose des Morbus Niemann-Pick Typ C gestaltet sich auf Grund der unspezifischen Symptome und des mangelnden Bewusstseins für seltene lysosomale Speichererkrankungen häufig als sehr schwierig und verzögert sich dadurch beträchtlich (Vanier et al., 2016). Für die gesicherte Diagnostik und Therapie stehen Leitlinien zu Leukodystrophien und hereditäre Leukencephalopathien im Erwachsenenalter, zu denen auch NPC gezählt werden kann, zur Verfügung (Schöls, 2017). Die Diagnostik kann über biochemische Tests, wie die Filipin-Färbung von Patienten-Fibroblasten und Cholesterolveresterungstests, erfolgen sowie über den Nachweis von speziellen krankheitsspezifischen Biomarkern, wobei für die finale Bestätigung ein genetischer Test unerlässlich ist (Giese et al., 2015; Vanier et al., 2016). Der bekannteste und verbreitetste Test zur Diagnostik des NPC ist die Filipin-Färbung, wobei fixierte Patienten-Fibroblasten mit dem Polyene-Antibiotikum Filipin, welches spezifisch an unverestertes Cholesterol bindet, gefärbt werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass neben dem klassischen biochemischen Phänotyp, bei dem 80-100 % der Zellen eindeutig positiv gefärbt sind, auch noch ein variabler Phänotyp möglich ist (50-80 % positive Zellen), der häufig bei der prävalenten Mutation c.3182T>C (p.I1061T) zu beobachten ist (Vanier et al., 2016; Vanier and Millat, 2003). Neben der Filipin-Färbung ist auch die Messung der Cholesterolveresterungsrate möglich. Diese liegt bei einem klassischen Phänotyp nahezu bei 0, wohingegen sie bei einem variablen Phänotyp nur leicht verringert und bei heterozygoten Patienten unverändert ist (Vanier et al., 2016). Neben den biochemischen Tests ist auch eine Bestimmung von Biomarkern aus dem Plasma von Patienten möglich. Diese befindet sich zur Zeit noch in der experimentellen Phase. Zu den Biomarkern gehören unter anderem Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol und Lyso-Sphingomyelin-509 (Lyso-SM-509), wobei Lyso-SM-509 eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 91 % aufweist und mit dem Schweregrad der Krankheit korreliert (Giese et al., 2015).

1.1.5 THERAPIEANSÄTZE DES MORBUS NIEMANN-PICK TYP C

Eine kausale Therapie des Morbus Niemann-Pick Typ C ist derzeit nicht möglich. Zurzeit gibt es für die Therapie des NPC nur ein von der Europäischen Arzneimittel-Agentur zugelassenes Medikament, Miglustat (n-Butyldeoxynorjirimycin, NB-DNJ). Miglustat ist ein reversibler Inhibitor des Glukosylceramidsynthase und wurde für die Behandlung des Morbus Gaucher Typ 1 als Substratreduktions-Therapie zugelassen. Die Wirkung auf den NPC-Phänotyp wurde nachgewiesen und basiert vermutlich auf dem gleichen Wirkprinzip. Miglustat verzögert dabei

die Progression der Erkrankung, behandelt aber nicht die Ursache (Cuisset et al., 2016; Héron et al., 2012). Weitere potentielle Therapieansätze, wie die Behandlung mit Cyclodextrin, Histondeacetylase-Inhibitoren und pharmakologischen Chaperonen, werden momentan diskutiert. Das zyklische Oligosaccharid 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (CD) ist eine Cholesterol-bindende Substanz, die sich derzeit in Phase 2b/3 der klinischen Studie befindet (Yergey et al., 2017). Der endgültige Wirkmechanismus von CD ist noch nicht abschließend geklärt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass CD über Endozytose in die Zelle gelangt und so Cholesterol aus den späten Endosomen/Lysosomen freisetzt. Dadurch steht das Cholesterol wieder der Zelle zur Verfügung (Rosenbaum et al., 2010; Vance and Peake, 2011). Im NPC1- und NPC2-Mausmodell konnte eine Reduktion der Neurodegeneration und eine um bis zu 50 % verlängerte Lebensspanne der Versuchstiere festgestellt werden, wenn CD früh in der Entwicklung der Tiere appliziert wurde (Peake and Vance, 2012; Vance and Peake, 2011). Da CD die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, wird vor allem nach intrathekaler Applikation eine Verlangsamung der Progression und eine leichte Verbesserung der Erkrankung in Patienten erzielt (Maarup et al., 2015). Histondeacetylase Inhibitoren (HDACi), wie Trichostatin A oder SAHA (Suberoylanilid-Hydroxamsäure, Vorinostat) erhöhen die Transkription verschiedener Gene, die in der Cholesterolhomöostase beteiligt sind, sowie des NPC1-Proteins. Dies führt zur Reduktion von Cholesterol in den betroffenen Zellen und zu einer Umverteilung des lysosomalen Cholesterols, wobei die bisherigen HDACi in NPC2-Zelllinien keinen Effekt zeigten (Nunes et al., 2013; Pipalia et al., 2017, 2006). Pharmakologische Chaperone unterstützen fehlgefaltete Proteine bei der korrekten Faltung, sodass dadurch eine erhöhte Menge an funktionalen NPC1/2-Proteinen in den späten Endosomen/Lysosomen vorhanden ist. Zu den bisherigen getesteten Chaperonen für NPC1 gehören verschiedene Oxysterol-Derivate, wie 25-Hydroxycholesterol, die eine Reduktion des Cholesterolgehaltes in Fibroblasten und eine Verbesserung des NPC1-Phänotyps zeigten (Ohgane et al., 2014, 2013). Auch die Expression von Wildtyp-NPC1-Proteinen über den Adeno-assoziierten Virus 9 (AAV9) im NPC1-Mausmodell zeigte eine Verbesserung des NPC1-Phänotyps über die Reduktion von Cholesterol, reduziertes Purkinjenzell-Sterben und eine verlängerte Lebensspanne (Chandler et al., 2016; Xie et al., 2017).

1.1.6 TIER- UND ZELLMODELLE ZUR UNTERSUCHUNG DES MORBUS NIEMANN-PICK TYP C

Zur Untersuchung des Morbus Niemann-Pick Typ C werden verschiedene Modellsysteme genutzt. Zu den einfacheren Modellen, die vor allem genutzt werden, um die Funktion der NPC-Proteine näher zu untersuchen, gehören *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorahbditis elegans* und

Drosophila melanogaster. Diese Krankheitsmodelle werden auch für Testung von potentiellen Medikamenten zur Behandlung des NPC verwendet (Huang et al., 2005; Ory, 2000).

Neben diesen Modellen werden auch Säugetiermodelle zur Untersuchung des Morbus Niemann-Pick Typ C verwendet. Das am häufigsten verwendete murine Modell ist das Mausmodell *Npc1^{nih}* (BALB/cNctr-NPC1^{m1N}/J), das auf eine spontane Mutation des *NPC1* Gens zurückzuführen ist. Diese spontane Mutation führt zu einem kompletten Ausfall des NPC1-Proteins in den Tieren, wodurch ein schwerwiegender NPC-Phänotyp induziert wird (Pentchev et al., 1980), der aber nicht die häufigste Form der Erkrankung widerspiegelt. Daher wurden weitere Mausmodelle mit Punktmutationen entwickelt, welche überaus hilfreich für die Erforschung der Wirkungsweise von pharmakologischen Chaperonen im NPC sind. Dazu gehören die Modelle *Npc1^{nmf164}* (C57BL/6J-Npc1^{nmf164}/J), das die Punktmutation c.3163A>G (p.D1005G) (Maue et al., 2012) und *Npc1^{tm(I1061T)Dso}* (B6.129-Npc1^{tm1.1Dso}/J), das die prävalente Mutation c.3182T>C (p.I1061T) trägt (Praggastis et al., 2015). Die NPC1-Modelle, die eine Punktmutation tragen, haben einen milderen Phänotyp als die Null-Mutante. Ebenfalls wurde ein Mausmodell mit einer hypomorphen Mutation im *NPC2*-Gen hergestellt (Sleat et al., 2004). Neben den Mausmodellen zur Untersuchung von NPC wird auch ein felines Modell, das ebenfalls eine Punktmutation trägt und einen juvenilen Phänotyp aufweist, zur Erforschung des NPC genutzt (Lowenthal et al., 1990). Vorteile dieser Säugetiermodelle sind die systemische Darstellung des NPC-Phänotyps, die weitestgehend dem humanen Phänotyp entspricht. Dabei können zum Beispiel die Akkumulationen von Cholesterol, GM2 und GM3 sowohl in murinen als auch im felinen Modell nachgewiesen werden. Auch die Demyelinisierung lässt sich mit diesen Modellen rekapitulieren, wobei die Demyelinisierung im NPC2-Mausmodell, im *Npc1^{nmf164}*-Modell und im felinen Modell weniger stark ausgeprägt ist (Vanier, 2014).

Als weit verbreitetes zelluläres Modellsystem werden neben den Tiermodellen auch Patienten-Fibroblasten zur Erforschung des Morbus Niemann-Pick Typ C genutzt (Ohgane et al., 2013; Pipalia et al., 2006; Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). In diesem Zellmodell können Cholesterollakkumulationen nachgewiesen und zelluläre Prozesse des NPC untersucht werden, wodurch dieses System auf Grund seiner einfachen Anwendungsweise vielfach verwendet wird. (Yu et al., 2014). Auch Zellen aus chinesischen Hamsteroovarien (CHO-Zellen) wurden mehrfach als Modellsystem im NPC genutzt (Blom et al., 2012; Motoyama et al., 2016). In diesem Modell wird das *NPC1*- oder *NPC2*-Gen mutiert oder entfernt. Zelluläre Modelle, die CHO-Zellen, Fibroblasten oder U18666A nutzen, reflektieren dabei nicht den pathophysiologischen Zustand der Neurone. Vor allem in Hinblick auf elektrophysiologische Untersuchungen, aber auch auf Grund der endogenen Cholesterolsynthese und Regulation

im Gehirn sind diese Modelle wenig geeignet, um den Zustand im Gehirn zu untersuchen (Vanier, 2014). Daher werden spezielle neuronale Zellmodelle zur Untersuchung des NPC genutzt, um die Neurodegeneration detaillierter zu beobachten. Dazu gehören Neurone differenziert aus NPC1-defizienten humanen embryonalen Stammzellen (Ordonez et al., 2012) sowie humane multipotente adulte Stammzellen (hMASC), die aus Patienten-Fibroblasten generiert und in Neurone differenziert wurden (Bergamin et al., 2013). Auch NPC1-defiziente Neuroblastom-Zellen, SH-SY5Y, werden als Modellsystem genutzt (Rodríguez-Pascau et al., 2012). Neben diesen neuronalen Zellmodellen ermöglichen vor allem iPS-Zellen neue Möglichkeiten zur Untersuchung des Morbus Niemann-Pick Typ C. Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe ein humanes NPC-Zellmodell entwickeln, das auf induzierten pluripotenten Stammzellen basiert (Peter et al., 2017b; Trilck et al., 2016, 2013). Dieses iPS-basierte NPC1-Zellmodell zeigt typische NPC1-Krankheitsmerkmale, wie Cholesterol- und GM2-Akkumulationen (Peter et al., 2017b; Trilck et al., 2017, 2013), welche mit anderen Studien, die ähnliche Zellmodelle nutzen, übereinstimmen (Efthymiou et al., 2015; Maetzel et al., 2014; Yu et al., 2014).

1.2. INDUZIERTE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN

1.2.1 METHODE ZUR HERSTELLUNG VON IPS-ZELLEN

Takahashi und Yamanaka generierten 2006 die ersten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) aus embryonalen und adulten Mausfibroblasten, indem die 4 Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, Klf4 und cMyc verwendet wurden (Takahashi and Yamanaka, 2006). Diese 4 Transkriptionsfaktoren wurden im Folgenden von Takahashi und Kollegen 2007 (Takahashi et al., 2007) für eine retroviral vermittelte Reprogrammierung humaner Fibroblasten verwendet. Dabei entstanden ebenfalls induzierte pluripotente Stammzellen, die embryonalen Stammzellen (ES) immens ähnelten. Ende 2007 erschienen unabhängig von Takahashi noch zwei weitere Studien, die die Herstellung von iPS-Zellen aus humanen Fibroblasten beschrieben (Park et al., 2008b; Yu et al., 2007). Wobei die Arbeitsgruppe um Park ebenfalls die klassischen Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc nutzte, verwendeten Yu und Kollegen Oct4, Sox2, Nanog und Lin28, wobei das potenzielle Protoonkogen cMyc ersetzt wurde.

Induzierte pluripotente Stammzellen stehen durch ihr nahezu unlimitiertes Wachstums in großen Mengen zu Verfügung und lassen sich auf Grund der Pluripotenz der Stammzellen in jede Zelle differenzieren. IPS-Zellen stellen damit einen Ansatzpunkt für therapeutische Anwendungen in der Klinik und für die Medikamentenentwicklung dar. Um Variabilität

innerhalb von Zelllinien und Klonen zu vermeiden ist es essentiell den pluripotenten Status der Zellen genau zu charakterisieren (Vitale et al., 2012). Des Weiteren muss bei der Verwendung von iPS-Zellen darauf geachtet werden, dass diese eher mit embryonalen Zellen als mit adulten Zellen vergleichbar sind (Robinton and Daley, 2012; Srikanth and Young-Pearse, 2015).

1.2.2 IPS-BASIERTE ZELLMODELLE FÜR NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN

Die Herstellung von iPS-Zellen ermöglichte auch die Generierung von krankheitsspezifischen iPS-Zellen aus Fibroblasten von Patienten (Park et al., 2008a). Eine Herausforderung bei der Generierung von krankheitsspezifischen iPS-Zellen war jedoch der Nachweis des typischen Krankheits-assoziierten Phänotyps. Dies gelang zuerst für die familiäre Dysautonomie, einer seltenen schwerwiegenden peripheren Neuropathie. Wobei gezeigt werden konnte, dass iPS-Zellen ebenso eine Mutation im *IKBKAP*-Gen trugen, wie die Ursprungszellen. Des Weiteren konnten die generierten Neurone genutzt werden, um potenzielle therapeutische Substanzen zu testen und den Mechanismus der Krankheit weiter zu erforschen (Lee et al., 2009). Im Anschluss an diese Arbeiten wurden verschiedene iPS-Zellen für neurodegenerative Erkrankungen generiert und als Modellsysteme charakterisiert (Srikanth and Young-Pearse, 2015). Mittlerweile sind auch verschiedene iPS-Zelllinien für seltene Lysosomale Speichererkrankungen, wie für Morbus Fabry, Morbus Gaucher, Mukopolysaccharidose I und auch Niemann-Pick-Typ C1 generiert worden (Xu et al., 2016).

Das hier verwendete, auf patientenspezifischen iPS-Zellen und daraus differenzierten neuronalen Zellen basierende NPC-Zellmodell war das erste beschriebene iPS-basierte NPC1-Zellmodell und zeigte typische NPC1-Krankheitsmerkmale, wie Cholesterol und GM2-Akkumulationen (Trilck et al., 2017, 2016, 2013). Die generierten NPC1-Zelllinien zeigen dabei starke Akkumulationen von Cholesterol sowie auch von anderen beschrieben wurde für aus iPS-Zellen abgeleitete NPC1-defizienten neuronale Zellen (Efthymiou et al., 2013; Maetzel et al., 2014; Soga et al., 2015; Yu et al., 2014).

1.3. GLIOSE

Die Gliose ist ein universelles, protektives Ereignis im zentralen Nervensystem, das nach jeder Art von Verletzung auftritt. Dabei dient die Gliose generell der Wundheilung nach Verletzungen des Gehirns (Burda and Sofroniew, 2014; Pekny and Nilsson, 2005; Pekny and Wilhelmsson, 2006). Die Astrogliose, die erneute Proliferation von Astrozyten, tritt nach Verletzungen des Gehirns, wie Traumata, Schlaganfällen, Neuroinflammation, Tumoren, oder

bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Multipler Sklerose und amyotropher lateraler Sklerose (ALS) (Beach et al., 1989; Pekny and Pekna, 2016). Das hauptsächliche Kennzeichen für die Astroglie sind eine erhöhte Anzahl an Astrozyten. Die Astrozyten sind dabei größer und besitzen längere, dickere Ausläufer und weisen eine intensivere Färbung der glialen Filamente auf (Norton et al., 1992). Bei diesen Gliazellen handelt es sich um reaktive Gliazellen, welche das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) hochregulieren sowie proliferieren und die Intermediärfilamente Vimentin und Nestin wieder exprimieren, nachdem diese in der Differenzierung und Entwicklung herunter reguliert wurden.

Die verschiedenen Funktionen der Glie im Gehirn können auf Grund der positiven und negativen Folgen unterschieden werden. Zu den positiven zählen unter anderem die Wiederaufnahme von exzitatorischem Glutamat, Schutz vor oxidativem Stress über Glutathion-Produktion, Neuroprotektion über die Freisetzung von Adenosin, Reparatur der Blut-Hirn-Schranke, Stabilisierung der extrazellulären Flüssigkeit und der Ionenkonzentrationen sowie die Hemmung der Inflammation und der Verbreitung infektiöser Stoffe. Dahingegen zählen Neurotoxizität, Inflammation sowie chronische Schmerzen und die Verschlechterung von klinischen Symptomen zu den negativen Folgen, die nach der Glie auftreten können.

In neurodegenerativen Erkrankungen ist die Rolle der Glie hoch komplex und noch nicht vollständig verstanden. Auf der einen Seite reagieren die Gliazellen auf die Degeneration der Neurone, aber zum anderen können reaktive Gliazellen die Neurodegeneration verschlimmern (Burda and Sofroniew, 2014). So wurde gezeigt, dass Mikroglia und Astrozyten dazu beitragen, die Anzahl an β -Amyloid-Plaques im Morbus Alzheimer zu verringern (Wyss-Coray et al., 2003). Aber Gliazellen können ebenso durch den krankheitsverursachenden molekularen Mechanismus betroffen und somit dysfunktional und dereguliert sein (Burda and Sofroniew, 2014). In Bezug darauf konnte für Amyotrophe Lateralsklerose gezeigt werden, dass Gliazellen zur Neurodegeneration beitragen und den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen (Yamanaka et al., 2008). Somit ist die Unterscheidung zwischen der glialen Dysfunktion, bedingt durch die Krankheit, und der reaktiven Antwort der Gliazellen auf die Neurodegeneration fließend. Einige Aspekte der Glie können zum Krankheitsverlauf beitragen, andere hingegen wirken protektiv (Burda and Sofroniew, 2014; Hu *et al.*, 2016, Sofroniew, 2010; Sofroniew and Vinters, 2010). Für den Morbus Niemann-Pick Typ C sind bisher keine besonderen Funktionen der Glie bekannt. Aber auf Grund der schwerwiegenden Neurodegeneration im Cerebellum ist es möglich, dass die Glie in diesem Fall neuroprotektiv wirkt und die entstandenen Lücken nach dem Absterben der Neurone wiederaufzufüllen (German et al., 2002; Hu et al., 2016).

Die Gliose wurde bisher auch für das NPC1-Mausmodell beschrieben (Baudry et al., 2003; Pressey et al., 2012). Auf Grund von beschriebenen Inflammationsmerkmalen im Gehirnschlussfolgerten die Autoren, dass die Inflammation auf eine Aktivierung der Mikroglia zurückzuführen ist, was zur Neurodegeneration führt und somit eine Aktivierung der Astrozyten hervorruft. Eine Aktivierung der Gliazellen konnte bereits in vier Wochen alten Mäusen festgestellt werden, wobei ebenfalls eine untypische Morphologie der Astrozyten gefunden wurde (Baudry et al., 2003). Auch im Thalamus und im Cerebellum konnte eine erhöhte Anzahl an reaktiven Astrozyten gefunden werden, die eine erhöhte Anzahl an Einschlüssen, bestehend aus akkumulierten Lipiden, wie Cholesterol, in den Zellen zeigten (German et al., 2002, 2001). Pressey und Kollegen konnten ebenfalls eine Gliose im Thalamus zeigen, wobei diese schon in drei Wochen alten Mäusen begann. Sie konnten auch feststellen, dass die Gliose dem Verlust von Neuronen vorangeht, aber erst nach dem Absterben von Neuronen immens zunimmt (Pressey et al., 2012). Gliose sowie Marker für Neuroinflammation konnten auch in humanen post mortem Gehirnbiospien in verschiedenen Gehirnarealen, wie dem Frontotemporallappen aber auch Kortex, Hirnstamm und Cerebellum von NPC1-Patienten nachgewiesen werden (Chiba et al., 2014; Cologna et al., 2014; Yamashita, 2012).

Der Einfluss der Gliose auf den Krankheitsverlauf des NPC wird noch immer kontrovers diskutiert, obwohl die Gliose in NPC1-Patienten und -Tiermodellen dargestellt werden konnte (Erickson, 2013). Zum einen wird angenommen, dass es sich bei der Gliose um einen sekundären Effekt, der auf den neuronalen Zelltod folgt, handelt und somit eine Reaktion auf das Absterben der Neurone darstellt (Lopez et al., 2011; Lopez and Scott, 2013; Yu et al., 2011). Im Gegensatz dazu wird die Gliose auch als wesentlicher Einflussfaktor im Krankheitsverlauf in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Morbus Alzheimer (Osborn et al., 2016) oder der Amyotrophen Lateralsklerose (Yamanaka et al., 2008) gesehen. Im Morbus Alzheimer kommt er auf Grund der Akkumulation von fehlgefaltetem β -Amyloid-Protein zur reaktiven Gliose. Diese führt zu massiven molekularen Veränderungen, wie den Änderungen in der GABA-, Glutamat- und Calciumsignalweiterleitung, was zu einer Störung der homöostatischen Regulation der Astrozyten führt. Die funktionalen Änderungen führen dabei zu einer Beeinträchtigung des neuronalen Mikro-Milieus und tragen so zur Neurodegeneration bei (Osborn et al., 2016). In der Amyotrophen Lateralsklerose konnte beschrieben werden, dass eine verminderte Expression des mutierten Gens in Astrozyten zu einer Verlangsamung des Krankheitsverlaufs führt (Yamanaka et al., 2008). Diese gegensätzlichen Darstellungen der Gliose, als Reaktion auf den neuronalen Zelltod oder als Ursache für diesen, zeigen deutlich,

dass beide Zellarten, Neurone und Gliazellen, nicht isoliert betrachtet werden können, sondern immer als eine systemische Einheit gesehen werden sollten.

1.4. INTERMEDIÄRFILAMENTE

Intermediärfilamente (IFs) bilden zusammen mit den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten das Zytoskelett der Zellen und sorgen somit im Allgemeinen für Stabilität und den vesikulären Transport in den Zellen. Mit einem Durchmesser von 10 nm liegen sie zwischen den Mikrotubuli (20-30 nm) und den Mikrofilamenten (7 nm), worauf der Name Intermediärfilamente gründet. IFs sind stäbchenförmig, haben keine enzymatische Aktivität und sind evolutionär hoch konserviert (Chang and Goldman, 2004; Godsel et al., 2008; Margiotta and Bucci, 2016; Snider and Omary, 2014).

Typischerweise werden die Intermediärfilamente auf der Basis der Primärstruktur, dem Aufbau und der gewebsspezifischen Expression in 5 Subtypen eingeteilt. Die Klassen I und II, die in Epithelzellen vorkommen, enthalten Keratin. Klasse III umfasst Vimentin, Desmin, GFAP und Peripherin. Wohingegen die Klasse IV die Neurofilamente und Nestin umfasst. Die Klasse V bilden die Laminine (Chang and Goldman, 2004; Godsel et al., 2008).

Intermediärfilamente haben eine einheitliche Sekundärstruktur, die aus einer zentralen α -helikalen stäbchenförmigen Domäne und nicht-helikalen Domänen auf beiden Seiten der zentralen Domäne besteht (siehe Abb. 1.4), somit weisen sie keine Polarität auf.

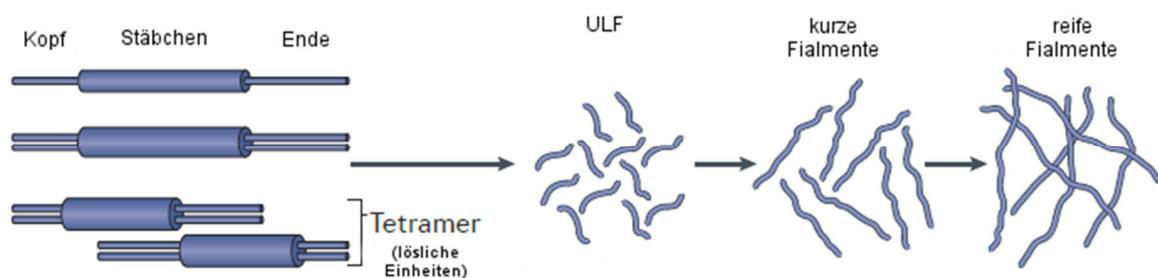


Abbildung 1.4: Aufbau und Assemblierung von Intermediärfilamenten.

Intermediärfilamente sind stäbchenförmig und bestehen aus einer zentralen, α -helikalen, stäbchenförmigen Domäne sowie nicht helikalen Kopf- und End-Domänen. Diese Monomere lagern sich zuerst zu Tetrameren zusammen, die dann ULFs (unit length filaments) bilden. Diese ULFs lagern sich im Folgenden in Längsrichtung weiter zusammen und bilden nach abschließender Kondensation kompakte, reife Filamente (nach Snider and Omary, 2014).

Der Zusammenbau der Intermediärfilamente, insbesondere der Vimentin-ähnlichen Intermediärfilamente, erfolgt in einem drei-stufigen Prozess. Dabei werden zuerst Tetramere

gebildet, die aus vier aneinandergelagerten Monomeren bestehen. Diese Tetramere bilden die kleinsten Einheiten der Intermediärfilamente im Zusammenbau, die sogenannten ULFs (unit length filaments). Im zweiten Schritt lagern sich diese ULFs in Längsrichtung aneinander und bilden längere, lose gepackte Filamente. Im finalen Schritt kommt es zur Verlängerung dieser Filamente und zur Kondensierung, wodurch kompakte Filamente entstehen (Chang and Goldman, 2004; Godsel et al., 2008). Auch nach dem Aufbau dieser Filamente handelt es sich noch um hoch dynamische Strukturen, die einem ständigen Auf- und Abbau durch posttranslationale Modifikationen unterliegen, wie die Phosphorylierung durch bestimmte Kinasen. Zu diesen Kinasen zählen die Proteinkinase C (PKC), die Proteinkinase A (PKA) oder die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) (Eriksson et al., 2004; Ivaska et al., 2005; Snider and Omary, 2014). Dabei werden lösliche Bestandteile der Intermediärfilamente dephosphoryliert, wodurch eine Assemblierung eingeleitet wird. Die Phosphorylierung hingegen führt zum Abbau der kondensierten Filamente zu löslichen Filamenten (Snider and Omary, 2014).

Die Funktionen der Intermediärfilamente sind dabei vielfältig und umfassen zum einen die Stabilisierung der Zellen, die Motilität und die zelluläre Architektur, aber auch den vesikulären Transport innerhalb der Zelle und die Signalweiterleitung (Snider and Omary, 2014).

1.4.1 VIMENTIN

Das Intermediärfilament Typ III Vimentin wird vor allem in mesenchymalen Zellen und zu Beginn der neuronalen Entwicklung auch in Neuronen und Gliazellen exprimiert. Vimentin wird während der Gehirnentwicklung herunterreguliert und im adulten Gehirn nur noch in glialen Progenitorzellen und zu einem sehr geringen Anteil in Astrozyten exprimiert (Bignami et al., 1982; Levin et al., 2009). Bereits publizierte Studien zeigen allerdings eine erneute, durch die Gliose bedingte, Expression von Vimentin in Astrozyten (Norton et al., 1992; Pekny and Pekna, 2016; Stringer, 1996).

Anstelle einer verminderten Expression von Vimentin in differenzierten Neuronen wird Vimentin in einigen neurodegenerativen Erkrankungen wieder exprimiert. Von Bauer *et al.* konnte 2012 nachgewiesen werden, dass Vimentin im Morbus Chorea Huntington an der Akkumulation von mutiertem Huntingtin in Neuronen beteiligt ist (Bauer and Hudec, 2012). Eine Herunterregulation von Vimentin führte dabei zu einer verminderten Akkumulation von Huntingtin in Neuronen. Auch im Morbus Alzheimer konnte eine erhöhte Vimentinexpression in Neuronen und Astrozyten nachgewiesen werden, wobei Vimentin am Neuritenwachstum und

der Wiederherstellung von Synapsen nach einer Schädigung beteiligt ist (Levin et al., 2009; Yamada et al., 1992). Somit wird davon ausgegangen, dass Vimentin in neurodegenerativen Erkrankungen als Reaktion auf neurale Schädigungen wieder exprimiert wird, um die Schäden zu mildern (Levin et al., 2009). Dieser Aspekt benötigt weitere Studien zur Funktion von Vimentin in neurodegenerativen Erkrankungen, um aufzuklären, ob und wie Intermediärfilamente zur Progression und Attenuation des Krankheitsverlaufes beitragen.

Die Assemblierung und der stetige Auf- und Abbau von Vimentin (siehe 1.4) wird über Kinasen und Phosphatasen reguliert. Dabei sorgt die Phosphorylierung über Kinasen für den Abbau der langen, kompakten Filamente und die Entstehung von löslichen phosphorylierten Monomeren (Abb. 1.5). Die Dephosphorylierung über Phosphatasen führt zum Aufbau der langen kompakten Filamente. Vimentin wird vor allem von der Proteinkinase C, aber auch der Proteinkinase A und der Calcium-Calmodulin-abhängigen Kinase II (CamKII) phosphoryliert (Chang and Goldman, 2004; Ivaska et al., 2005; Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). Die Dephosphorylierung erfolgt über die Proteinphosphatase 2A (PP2A) (Eriksson et al., 2004).

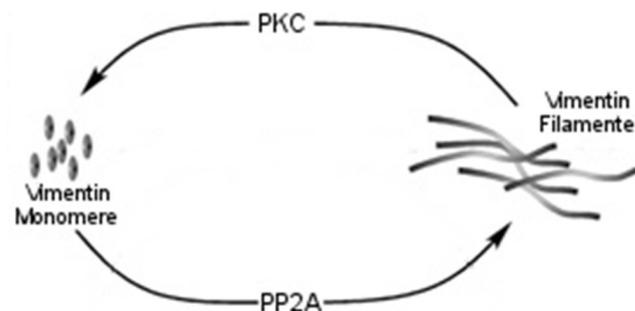


Abbildung 1.5: Auf- und Abbau von Vimentin.

Die Assemblierung von Vimentin Monomeren zu kompakten Filamenten wird vermittelt über die Dephosphorylierung der Monomere mittels Proteinphosphatase 2A (PP2A). Der Abbau hingegen erfolgt über die Phosphorylierung der Filamente durch die Proteinkinase C (PKC), wodurch phosphorylierte, lösliche Untereinheiten entstehen (nach Walter *et al.*, 2009).

Zu den allgemeinen Funktionen der Intermediärfilamente (siehe 1.4) wurde für Vimentin eine Beteiligung am intrazellulären vesikulären Transport beschrieben, wobei unter anderem endosomale Vesikel mit Hilfe von Vimentin transportiert werden (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). Daneben wurden auch der vesikuläre Membrantransport, Signaltransduktion, Zellmotilität und intrazellulärer Transport von LDL-Cholesteroll beschrieben (Evans, 1994; Ivaska et al., 2007; Kraemer et al., 2013). Der Transport von Signalmolekülen mit Hilfe von löslichem Vimentin wurde in verletzten Neuronen genauso beschrieben (Perlson et al., 2005) sowie eine Beteiligung von Vimentin an der Neuritogenese (Boyne et al., 1996). Zur weiteren Untersuchung der Vimentinfunktion wurden auch Vimentin-negative Mausmodelle generiert.

Diese VIM^{-/-}-Mäuse entwickeln und vermehren sich normal, aber es konnten eine beeinträchtigte Wundheilung sowie Defizite in Bergmann-Gliazellen und Purkinje-Zellen im Cerebellum gefunden werden, wobei vor allem verkümmerte und nekrotische Purkinje-Zellen beobachtet wurden (Colucci-Guyon et al., 1999; Eckes et al., 2000).

In vorherigen Studien konnte beschrieben werden, dass NPC1-defizienten Fibroblasten eine Veränderung im Phosphorylierungsstatus von Vimentin zeigten (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009), wodurch das Zytoskelett und damit auch der Transport innerhalb der Zelle gestört ist. Des Weiteren konnten gezeigt werden, dass akkumuliertes Sphingosin die PKC inhibiert. Dadurch wurde die Vimentin-Phosphorylierung gestört, der Pool an löslichem Vimentin weiter verringert und der vesikuläre Transport beeinträchtigt. Eine Zunahme der Cholesterolakkumulationen im endosomalen/lysosomalen System wurde daraufhin angenommen. Eine Aktivierung der PKC hingegen erhöhte den Anteil an löslichem Vimentin und die Cholesterolveresterung wurde wiederhergestellt (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009).

1.4.2 GFAP

Das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) ist das hauptsächlich vorkommende Intermediärfilament in reifen Astrozyten. Es spielt vor allem eine strukturelle Rolle in Astrozyten, ist aber auch in die Regeneration, die synaptischen Plastizität und die reaktive Gliose involviert. GFAP gehört ebenfalls zur Klasse III der Intermediärfilamente und unterliegt dem gleich Auf- und Abbau-Zyklus wie Vimentin (siehe Abb. 1.5) (Middeldorp and Hol, 2011). Eine Mutation im *GFAP*-Gen führt zum Morbus Alexander, einer letalen neurodegenerativen Erkrankung, die auf Grund von Fehlfunktionen von Astrozyten zu Megalenzephalie, progressiver Spastik und mentalen Beeinträchtigungen führt (Hagemann et al., 2013; Middeldorp and Hol, 2011).

Zu den Funktionen des GFAP wurden neben den strukturellen Funktionen der Intermediärfilamente noch weitere beschrieben. Dazu zählen der Schutz von Neuronen vor überschüssigen Neurotransmittern, synaptische Plastizität, Motilität, Proliferation und das Neuritenwachstum auch Funktionen der Blut-Hirn-Schranke, Myelinisierung, Vesikeltransport und auch Schutz des Gehirns nach Verletzungen über die Gliose, wobei GFAP in der Gliose massiv hochreguliert wird (siehe 1.3) (Hol and Pekny, 2015; Middeldorp and Hol, 2011).

1.5 ZIELSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe des etablierten Modells zur Herstellung von patientenspezifischen iPS-Zellen und der Differenzierung in neuronale Zellen (Peter et al., 2017b; Trilck et al., 2016) Zelllinien mit weiteren Mutationen der *NPC1*- und *NPC2*-Gene herzustellen und diese in Bezug auf den bisher noch ungeklärten zellulären pathophysiologischen Mechanismus des Morbus Niemann-Pick Typ C zu untersuchen.

Neben den zuvor generierten NPC1-defizienten Zelllinien sollte in dieser Arbeit die prävalente Mutation c.3182T>C (p.I1061T) hergestellt und charakterisiert werden. Die verschiedenen Mutationen wurden im Folgenden vergleichend betrachtet, um eventuell Rückschlüsse vom Schweregrad des klinischen Phänotyps zur zellulären Ausprägung des Morbus Niemann-Pick Typ C ziehen zu können. Vor allem im Hinblick auf mögliche therapeutische Ansätze, wie z.B. pharmakologische Chaperone, werden Zelllinien mit einer homozygoten Punktmutation benötigt, um den Faltungsdefekt zu revidieren.

Des Weiteren sollten in dieser Arbeit zelluläre Mechanismen des NPC aufgeklärt und darauf basierend weitere therapeutische Ansätze zur Behandlung des NPC untersucht werden. Dabei sollte insbesondere die Gliose in NPC1 untersucht werden, die bisher für das NPC1-Mausmodell beschrieben (Baudry et al., 2003; Pressey et al., 2012), aber noch nicht in humanen neuronalen Kulturen untersucht werden konnte. Die Gliose ist ein universeller Mechanismus, der nach Verletzungen des Gehirns auftritt. Dabei beginnen die Gliazellen erneut zu proliferieren und die Intermediärfilamente GFAP und Vimentin werden hochreguliert. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob in neuronalen Zellmodellen ebenfalls eine Gliose rekonstruiert werden kann und ob über die Gliose im Zellmodell eventuell Rückschlüsse auf die Schwere der Erkrankung gezogen werden können.

Auch der Intermediärfilament-Phänotyp sollte dabei genauer betrachtet werden, bei dem es zu Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von Vimentin kommt und der bis jetzt in Fibroblasten-Kulturen beschrieben wurde (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009) aber noch nicht in humanen neuronalen Zelllinien. Bei der Untersuchung des Intermediärfilament-Phänotyps sollte besonders der zugrunde liegende Mechanismus genauer erforscht werden. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen diesen beschriebenen Phänomenen in NPC besteht.

Im Folgenden sollten Substanzen getestet werden, die eine Verbesserung des Gliose- und Intermediärfilament-Phänotyps zeigen sowie eine Reduktion des Cholesterolgehaltes in NPC erzielen können und somit zur allgemeinen Verbesserung des Krankheitsbildes beitragen könnten.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 MIKROORGANISMEN UND MEDIEN

In Tabelle 2.1 ist der in dieser Arbeit verwendete Mikroorganismenstamm aufgeführt. Die zur Anzucht dieses Stammes verwendeten Medien sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Verwendeter Mikroorganismenstamm

Bezeichnung	Organismus	Genotyp	Hersteller
Mix & Go	<i>Escherichia</i>	<i>F</i> ⁺ [<i>traD36 proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15</i>]	Zymo
Competent Cells - Strain JM109	<i>coli</i>	<i>Δ(lac-proAB) glnV44 (supE44) e14- (McrA-) thi gyrA96 (NalR) endA1 hsdR17(rk- mk+) relA1 recA1</i>	Research, Freiburg, DE

Tabelle 2.2: Nährmedien für die Anzucht der verwendeten Mikroorganismen

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB_{Amp}-Agar	40 g LB-Agar (Roth) auf 1 l Aqua dest. → 20 min Autoklavieren → Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml)
LB_{Amp}-Medium	25 g LB-Medium (Roth) auf 1 l Aqua dest. → 20 min Autoklavieren → Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml)

2.1.2 HUMANE ZELLINIE UND ENTSPRECHENDE MEDIEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die in Tabelle 2.3 aufgeführte humane Zelllinie verwendet. Die verwendeten Kultivierungsmedien sind in den Tabellen 2.4 und 2.5 zusammengefasst.

Tabelle 2.3: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Zelllinie	Verwendeter Klon	Herkunft	Hersteller
HEK-Zellen (human embryonic kidney cells)	HEK-293FT		<i>Homo sapiens</i> , embryonale Niere	Invitrogen/Life Technologies Carlsbad, USA
Humane Fibroblasten (Kontrollen)	GM08398 (Kontrolle A)	GM08398-1	<i>Homo sapiens</i> , Hautbiopsie	Coriell Institute, Camden, USA
	#2062 (Kontrolle B)	#2062-2	<i>Homo sapiens</i> , Hautbiopsie	Centogene AG, Rostock, DE
Humane Fibroblasten (Mutation im NPC1/2 Gen)	A113011 (NPC1-Mutation: c.1180T>C)	A113011-3	<i>Homo sapiens</i> , Hautbiopsie	Centogene AG, Rostock, DE
	GM18436 (NPC1-Mutation: c.1836A>C; c.1628delC)	GM18436-1	<i>Homo sapiens</i> , Hautbiopsie	Coriell Institute, Camden, USA
	GM18453 (NPC1-Mutation: c.3182T>C)	GM18453-8	<i>Homo sapiens</i> , Hautbiopsie	Coriell Institute, Camden, USA
	GM18455 (NPC2-Mutation: c.58G>A; c.140G>T)	GM18455-1	<i>Homo sapiens</i> , Hautbiopsie	Coriell Institute, Camden, USA
Embryonale Maus-fibroblasten	CF1 (inaktivierte embryonale Mausfibroblasten)		<i>Mus musculus</i>	Amsbio, Abingdon, UK

Tabelle 2.4: Kultivierungsmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Basismedium	DMEM 10 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)

Stammzellmedium	Knockout DMEM 20 % Knockout Serum Replacement 1x MEM NEAA 1x GlutaMAX 2x 2-Mercaptoethanol 0,25 % Pen/Strep 12,5 ng/ml FGF2
mTESR1 Kompletmedium	mTESR1 0,25 % Pen/Strep
EB-Medium	80 % Knockout DMEM 10 % FBS 20 % MEM NEAA 1x GlutaMAX 1x 2-Mercaptoethanol 0,25 % Pen/Strep
Proliferationsmedium	60 % DMEM 40 % DMEM/F-12 1x B27 0,5 % Pen/Strep 20 ng/ml FGF2 20 ng/ml EGF
Differenzierungsmedium	60 % DMEM 40 % DMEM/F-12 1x B27 0,5 % Pen/Strep

Tabelle 2.5: Verwendete Substanzen (kommerziell erworben)

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.	Lösungsmittel
AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH Steinheim, DE	A6816	Aqua dest.

Glutamat	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH Steinheim, DE	G1626	Aqua dest.
PMA (Phorbol 12-myristat 13- actetat)	Cayman Chemicl Company, Ann Arbor, USA	10008014-5	DMSO
Quinolinsäure (2,3-Pyridinedicarboxylic acid)	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH Steinheim, DE	P63204-25	DMSO

2.2 METHODEN

2.2.1 KULTIVIERUNG HUMANER UND MURINER ZELLINIEN

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilwerkbänken mit Laminarstrom ausgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden steril filtriert und Gebrauchsgegenstände wurden vor Gebrauch entsprechend mittels 70 %igem Ethanol oder Hitzesterilisation sterilisiert. Alle zu verwendenden Lösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kultivierung der humanen Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte.

2.2.1.1 AUFTAUEN DER VERWENDETEN ZELLINIEN

Kryokonservierte Zellen (Fibroblasten, HEK293FT, Feederzellen und neuronale Progenitorzellen) wurden unter Verwendung des Wasserbades bei 37 °C schnellstmöglich aufgetaut und langsam in 8,5 ml des entsprechenden Mediums überführt. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 300 x g wurde das entstandene Zellpellet in 10 ml Medium gelöst. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe des CASY-Systems wurden CASY-Cups mit 10 ml CASY-Ton gefüllt, in die dann 50 µl der Probe pipettiert wurden.

IPS-Zellen wurden nach schnellem Auftauen im Wasserbad ebenfalls in 8,5 ml Medium überführt, sedimentiert, anschließend in 2 ml Medium resuspendiert und in ein 6-Well überführt.

Tabelle 2.6: Verwendete Zelllinien und entsprechende Kultivierungsbedingungen

Zelllinie	Medium	Zellzahl	Kulturgefäß
		Dauerkultur	Dauerkultur
Fibroblasten	Basismedium	2,0 x 10 ⁶	T75
HEK293FT	Basismedium	2,5 x 10 ⁶	T75

Feederzellen (MEF)	Basismedium	$3,3 \times 10^5$	6-Well
iPS-Zellen auf Feeder	Stammzellmedium	75 Kolonien	6-Well
iPS-Zellen auf Matrigel	mTESR1	75 Kolonien	6-Well
Neurale Progenitorzellen (NPZs)	Proliferationsmedium	$1,0 \times 10^6$	6-Well

2.2.1.2 KULTIVIERUNG VON HUMANEN FIBROBLASTEN UND HEK293FT-ZELLEN

Die Expansion der Zellen erfolgt bei Erreichen einer vollständigen Konfluenz. Dafür wurden die Zellen in einer T75-Zellkulturflasche zuerst mit 15 ml PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 2,5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA für 5 min im Brutschrank inkubiert. Nach vollständigem Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß wurde die Reaktion mit 7,5 ml Basismedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation der Fibroblasten für 5 min bei $400 \times g$ wurde das Zellpellet in 10 ml Basismedium gelöst und die Gesamtzellzahl mit Hilfe des CASY-Zellzählsystems bestimmt. Abschließend wurden $2,0 \times 10^6$ Fibroblasten in einer T75-Zellkulturflasche zur weiteren Kultivierung ausgesät. Für immunozytochemische Färbungen wurden 6×10^4 Fibroblasten auf Glasdeckgläschen und für die Reprogrammierung in 3,0 cm Kulturgefäßen $1,0 \times 10^5$ Fibroblasten ausgesät.

Für die Dauerkultur wurden $2,5 \times 10^6$ HEK293FT in einer T75-Zellkulturflasche ausgesät. Die Virusproduktion erfolgte mit $3,0 \times 10^6$ Zellen HEK293FT in einer 10-cm-Zellkulturschale und die Virustitrierung mit $1,0 \times 10^5$ in einem 12-Well.

2.2.1.3 KULTIVIERUNG VON IPS-ZELLEN AUF FEEDERZELLEN

Einen Tag vor der Passagierung (Subkultivierung) der iPS-Zellen wurden die Feederzellen aufgetaut und ausgesät. Dafür wurde ein Kryokonservierungsröhrchen Feederzellen im Wasserbad aufgetaut und zügig tropfenweise in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 9 ml Basismedium überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und das Pellet wurde in 10 ml Basismedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit dem CASY-System konnten $3,3 \times 10^5$ Feederzellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert werden.

Eine Stunde vor dem Split wurde das Medium der iPS-Zellen durch frisches Stammzellmedium ersetzt und die Feederzellen wurden dreimal mit 2 ml DMEM/F-12 gewaschen, um Reste des Serums zu entfernen. Das Expandieren der Stammzellen erfolgte mit Hilfe von Glashaken, die aus Pasteurpipetten nach Erhitzen gezogen wurden. Dabei wurden die undifferenzierten

Kolonien (siehe Abb. 3.2), die einen glatten Rand und ein dicht gepacktes Koloniezentrum aufwiesen, in kleinere Stücke, je nach Größe der Ursprungskolonie circa 4-8 Stücke, geteilt. Für eine Vertiefung einer 6-Well-Platte wurden ungefähr 50 Koloniestücke benötigt. Die Kolonieteile wurden anschließend mit einer extra weiten Pipettenspitze auf frische Feederzellen umgesetzt und mit 10 μ M ROCK-Inhibitor (Y27632) versetzt. Die Kolonien wurden vorsichtig zum Inkubator gebracht und für 24 h nicht bewegt.

2.2.1.4 KULTIVIERUNG VON IPS-ZELLEN AUF MATRIGEL

Die Kultivierung der iPS-Zellen auf Matrigel erfolgte in mTESR1 Medium. Für die Kultivierung ohne Feederzellen wurde Matrigel als Matrix gewählt. Dabei handelt es sich um einen gelatinösen Proteinkomplex, welcher der extrazellulären Matrix ähnelt. Eine Vertiefung einer 6-Well-Platte wurde einen Tag vor der Expansion der iPS-Zellen mit Matrigel beschichtet. Dafür wurde das Matrigel auf Eis aufgetaut und im Verhältnis 1:95 in kaltem DMEM/F-12 gelöst. Das Mischungsverhältnis ist dabei abhängig von der verwendeten Lotnummer Matrigel, schwankt um 1:90 und wird vom Hersteller vorgegeben. Jeweils 1 ml der Lösung wurde in eine Vertiefung pipettiert, gleichmäßig verteilt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um ein Auspolymerisieren des Matrigels zu erreichen. Die Platten wurden dann bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Für die Expansion der iPS-Zellen auf Matrigel wurden undifferenzierte Kolonien verwendet, die sich durch einen glatten Rand und ein dicht gepacktes Koloniezentrum auszeichneten. Differenzierte Kolonien und differenzierte Einzelzellen wurden unter dem Mikroskop mit Hilfe von Glashaken entfernt und durch dreimaliges Waschen mit 2 ml DMEM/F-12 aspiriert. Die iPS-Zellen wurden anschließend mit Dispase (1 mg/ml) enzymatisch gelöst und nach 7-minütiger Inkubationszeit bei 37 °C erneut dreimalig mit 2 ml DMEM/F-12 gewaschen und mechanisch mit Hilfe von Zellschabern vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die Kolonien wurden mit Pipettenspitzen mit großer Öffnung in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren verkleinert und sedimentiert. Nach der Resuspension der Kolonien in 1 ml mTESR1 wurden diese in eine mit Matrigel beschichtete Kavität überführt, vorsichtig zum Brutschrank transportiert und für 24 h nicht bewegt.

2.2.1.5 KULTIVIERUNG VON NEURALEN PROGENITORZELLEN (NPZ)

Für die Kultivierung der neuralen Progenitorzellen wurden die benötigten Zellkulturgefäße zuerst mit Poly-L-Ornithin (PLO, 15 μ g/ml) und Laminin (10 μ g/ml) beschichtet. Dafür wurde

die PLO-Stammlösung (15 mg/ml) in PBS^{-/-} verdünnt und in die entsprechenden Zellkulturgefäße pipettiert. Die Lösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimalig mit PBS^{-/-} gewaschen. Die Laminin-Stammlösung (1 mg/ml) wurde in kaltem DMEM/F-12 verdünnt und in die Gefäße gegeben. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für eine Stunde bei 37 °C. Die Gefäße wurden für maximal eine Woche bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Gefäße bei 37 °C erwärmt und mit warmen DMEM/F-12 gewaschen.

Die neuronalen Progenitorzellen wurden bei Erreichen der vollständigen Konfluenz passagiert. Dafür wurden die Zellen zunächst mit 2 ml HBSS pro Kavität gewaschen und anschließend mit 0,5 ml Accutase für 3-5 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellen abzulösen und zu vereinzeln. Die Reaktion wurde mit 1 ml Proliferationsmedium abgestoppt, die Zellen wurden in ein entsprechendes Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 10 ml Proliferationsmedium resuspendiert und die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe des CASY-Systems bestimmt. Abschließend wurden $1,0 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte in 1,5 ml Proliferationsmedium ausgesät.

2.2.1.6 KULTIVIERUNG VON NEURONAL DIFFERENZIERTEN ZELLEN (NDZs)

Neuronal differenzierte Zellen wurden aus neuronalen Progenitorzellen über spontane Differenzierung erhalten. Neuronale Progenitorzellen wurden dafür, wie oben (2.2.5) beschrieben passagiert und in geringerer Dichte in Differenzierungsmedium ausgesät. Die verwendeten Zellzahlen pro Zellkulturgefäß sind in Tabelle 2.7 zusammengefasst.

Tabelle 2.7: Aussaat neuronal differenzierter Zellen

Kulturgefäß	Zellzahl	Menge Medium [ml]
6-Well	4×10^5	1,5
12-Well	2×10^5	1
24-Well	9×10^4	0,5
Deckgläschen	9×10^4	0,5

2.2.1.7 KRYOKONSERVIERUNG DER VERWENDETEN ZELLINIEN

Die Zellen wurden nach der Passagierung, wie oben beschrieben, in entsprechender Zellzahl (siehe Tabelle 2.8) in 1,7 ml Kryokonservierungsmedium überführt und in Gefriercontainern

(Mr. Frosty, Thermo Fisher Scientific, DE) mit Isopropanol für 24 h bei -80 °C langsam gekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 2.8: Kryokonservierung von Zellen

Zelllinie	Zellzahl	Kryokonservierungsmedium
Fibroblasten	2,0 x 10 ⁶	Basismedium + 10 % DMSO
HEK293FT	2,0 x 10 ⁶	Basismedium + 10 % DMSO
iPS-Zellen (Feeder)	80-100 Koloniestücke	50 % Stammzellmedium + 40% definiertes FBS + 10 % DMSO
iPS-Zellen (Matrigel)	80-100 Koloniestücke	mFreSR
NPZ	2,0 x 10 ⁶	Proliferationsmedium + 10 % DMSO

2.2.2 REPROGRAMMIERUNG HUMANER FIBROBLASTEN UND HERSTELLUNG VON NEURONALEN PROGENITORZELLEN

Für die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) wurden primäre patientenspezifische Fibroblasten mit den Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, cMyc und Klf4 (Takahashi Cocktail, Takahashi and Yamanaka, 2006) nach dem Protokoll von Trilck et al. (2016) reprogrammiert. Dabei enthielten alle vier Vektoren eine Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP), sodass die konzentrierten Viren mittels Durchflusszytometrie getitert werden konnten. Nach ungefähr einem Monat Kultivierung wurden die iPS-Zellen auf Grund ihrer charakteristischen, den embryonalen Stammzellen ähnlichen Morphologie und der Inaktivierung des retroviralen GFP-Signals passagiert und weiterverwendet.

2.2.2.1 PRODUKTION DER VIRALEN VEKTOREN

Die retroviralen Vektoren enthalten die vier humanen Gene OCT4, SOX2, cMYC und KLF4 und wurden von Dr. P. Seibler (Institut für Neurogenetik, Universität Lübeck, DE) zur Verfügung gestellt.

Die viralen Vektoren wurden mittels Transformation von *E. coli* Zellen (siehe Tabelle 2.1) mit den vorhandenen retroviralen Vektoren vermehrt. Dafür wurden 50 µl der kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut mit 1 µl Plasmid-DNA vermischt. Die Reaktion wurde 10 min auf Eis inkubiert und die gesamte Zellsuspension (50 µl) wurde auf einer vorgewärmten LB_{Amp}

Bakterienkulturplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vorkulturen in einer geringen Menge Nährmedium, um das weitere Wachstum der Bakterienkolonien zu kontrollieren, angesetzt. Dafür wurden zwei isolierte Bakterienkolonien vorsichtig in Reagenzröhrchen mit LB_{Amp} Medium überführt und für 12 h bei 37 °C inkubiert. Bei gutem Wachstum der Kulturen wurden im Anschluss die Hauptkulturen in 200 ml LB_{Amp} Medium angesetzt, indem die Vorkulturen vollständig in die Hauptkultur überführt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 12 h bei 37 °C wurden die Bakterienzellen bei 6000 x g und 4 °C für 15 min pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung mit Hilfe des Plasmids Maxi Prep Kits (Qiagen, Hilden, DE) laut Herstellerangaben. Zusammengefasst wurden die Zellen zuerst lysiert, die genomische DNA gefällt und zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt dann die Plasmid-DNA. Diese wurde anschließend, zur Aufreinigung über eine mitgelieferte Säule gegeben und eluiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Isopropanol gefällt, zentrifugiert (15000 x g, 30 min, 4 °C) und mit Ethanol gewaschen. Das entstandene Pellet wurde dann bei Raumtemperatur getrocknet und in einer der Größe des Pellets entsprechenden Menge TE-Puffer gelöst. Die anschließende Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 pro), wobei die Proben zuvor 1:50 verdünnt wurden. Dabei wurden die Extinktionen der Wellenlängen E₂₆₀ nm und E₂₈₀ nm bestimmt und das Verhältnis beider Extinktionen gab Aufschluss über die Reinheit der Plasmid DNA, wobei nur Plasmid-DNA mit einer Reinheit von $E_{260}/E_{280} \geq 1,7$ verwendet wurde. Die viralen Vektoren wurden in 50 µl Aliquots bis zu weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 VIRUSPRODUKTION UND TITERBESTIMMUNG

Die Virusproduktion erfolgte aus dem Virusvektor, viralen Proteinen und Enzymen (gag-pol) sowie dem Glykoprotein G des Vesikular-Stomatitis-Viruses.

An Tag 0 erfolgte das Aussäen der HEK297FT-Zellen in 10-cm-Zellkulturplatten mit einer Dichte von $3,0 \times 10^6$ Zellen pro Schale. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag transfiziert. Dafür wurden pro Zellkulturschale 20 µl X-tremeGENE 9 mit 300 µl DMEM vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend jeweils mit 2,5 µg Virusvektor-DNA (Oct4, SOX2, cMyc oder KLF4) sowie 0,25 µg VSV-G DNA und 2,25 µg Gag-Pol DNA versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 18 h bei 37 °C inkubiert. An Tag 2 erfolgte ein Mediumwechsel mit Basismedium. Die Ernte der Viren

erfolgte 48 h nach der Transfektion. Dabei wurde der Überstand der Zellen mit einem 0,45 µm Filter steril-filtriert, in frische Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das Titrieren der Viren erfolgte mit Hilfe der im Vektor enthaltenen GFP-Sequenz. Die Menge an GFP-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und danach prozentual wiedergegeben.

Zur Bestimmung der Infektionseffizienz wurden zuerst $1,0 \times 10^5$ HEK293FT Zellen in 1 ml Basismedium pro Kavität einer 12-Well-Platte ausgesät und mit 5 µl/ml Protaminsulfat zur Steigerung der Infektionseffizienz, versehen. Der entsprechende Virus wurde ebenfalls in verschiedenen Volumina (0,5 ml–3,5 ml) direkt zu den Zellen gegeben. Die HEK-Zellen wurden für 48 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden mit 200 µl 0,05 % Trypsin-EDTA pro Vertiefung bei 37 °C für 5 min vereinzelt, die Reaktion wurde mit 1 ml Basismedium abgestoppt und anschließend bei 3000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl PBS gelöst und mit 100 µl 4% Paraformaldehyd (PFA) für 15 min schüttelnd fixiert. Nach abschließender Zentrifugation bei 3000 x g für 5 min wurde das Pellet in 500 µl Waschpuffer gelöst. Für die durchflusszytometrische Analyse (FACS Calibur) wurde die Anzahl der grün-fluoreszierenden Zellen im Verhältnis zur ungefärbten Kontrolle bestimmt.

2.2.2.3 VIRALE TRANSDUKTION HUMANER FIBROBLASTEN IN IPS-ZELLEN

Für die Reprogrammierung wurden zuerst $1,0 \times 10^5$ primäre patientenspezifische Fibroblasten (Passage < 5) in einer 3,5 cm Zellkulturschale ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches Basismedium ersetzt und mit den Viren versetzt, wobei eine Infektionseffizienz von 70 bis 80% für OCT4, SOX2 und KLF4 sowie eine Infektionseffizienz von 40 bis 50% für cMYC angestrebt wurde. Das Medium wurde zur Steigerung der Infektionseffizienz zusätzlich mit 5 µg/ml Protaminsulfat versetzt. Nach 48 h Inkubationszeit erfolgte das erneute Aussäen der Fibroblasten. Das Medium wurde aspiriert und die Zellen zweifach mit PBS^{+/+} gewaschen. Anschließend wurden die Fibroblasten mit 0,5 ml 0,05% Trypsin-EDTA vereinzelt und die Reaktion wurde nach 5-minütiger Inkubation mit 1 ml Basismedium abgestoppt. An die Zentrifugation für 5 min bei 400 x g und das Resuspendieren des Pellets in 2 ml Basismedium schloss sich die Bestimmung der Zellzahl mit dem CASY-Zellzählsystems an. 250.000-400.000 Zellen wurden in einer mit 0,1 % Gelatine beschichteten 6-cm-Zellkulturschale in Basismedium ausplattiert und für 24 h inkubiert. Danach wurde das Basismedium durch Stammzellmedium ersetzt und mit 0,5 mM

Valproinsäure, einem Histondeacetylaseinhibitor zur Steigerung der Reprogrammierungseffizienz, für eine Woche versetzt. Dabei wurde das Medium täglich gewechselt. Nach sieben Tagen erfolgte weiterhin ein täglicher Mediumwechsel ohne Valproinsäure. Etwa ab Tag 21 der Reprogrammierung konnten erste iPS-Kolonien auf Grund ihrer Morphologie, erkennbar durch eine runde und leicht erhabene Kolonief orm mit glatten Rändern, und dem Verlust des GFP-Signals identifiziert werden. Die Kolonien wurden mit Hilfe von Glashaken auf frische Feederzellen (embryonale Mausfibroblasten, MEF) umgesetzt und anschließend expandiert. Von jeder patientenspezifischen Fibroblastenzelllinie wurden mindestens 10 Klone umgesetzt und expandiert.

2.2.2.4 NEURALE INDUKTION UND AUFREINIGUNG DER NEURALEN PROGENITORZELLEN

Aus iPS-Zellen, die auf Matrigel kultiviert wurden, konnten durch spontane Dichte-induzierte Differenzierung neurale Rosetten gebildet werden. In diesen neuronalen Rosetten sind neurale Progenitorzellen enthalten, die über den PSA-NCAM⁺ Oberflächenmarker isoliert werden konnten.

Dafür wurden iPS-Zellen auf Matrigel mit hoher Dichte in einer Vertiefung einer mit Matrigel beschichteten 6-Well-Platte ausgesät. Auf Grund der hohen Dichte erfolgte eine spontane Differenzierung in neurale Rosetten. Die undifferenzierten Stammzellen wurden mittels Glashaken mechanisch entfernt und die neuronalen Rosetten wurden nach einem Waschschr it mit 1 ml HBSS mit 1 ml Accutase gelöst und vereinzelt. Die Reaktion wurde nach 15 min mit 1,5 ml Proliferationsmedium gestoppt und die Zellen wurden für 5 min bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und die Zellen in 10 ml Proliferationsmedium gelöst. Die Zellzahl wurde mit dem CASY-System bestimmt und die Aufreinigung der neuronalen Progenitorzellen erfolgte über magnetische Separation (MACS-System, Miltenyi Biotec, DE) laut Herstellerangaben mit maximal $1,0 \times 10^7$ Zellen. Zusammengefasst wurden die Zellen in 60 µl MACS Puffer gelöst, mit 20 µl FcR Blockierungs-Reagenz versetzt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µl Anti-PSA-NCAM MicroBeads vermischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml Puffer gewaschen, für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und in 500 µl resuspendiert. Anschließend erfolgte die magnetische Separation, indem zuerst die MS-Säule in den MACS Multi Stand bzw. den MiniMACS Separator eingesetzt und mit 500 µl Puffer equilibriert wurde. Die Zellen wurden auf die Säule gegeben und unmarkierte Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit 500 µl Puffer ausgewaschen und aufgefangen. Anschließend wurde die Säule aus dem Separator

entfernt und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen platziert. Die Zellen wurden nach der Zugabe von 1 ml Proliferationsmedium und dem zügigen Einführen des Kolbens in die Säule von der Säule gelöst und aufgefangen. Abschließend wurde die Zellzahl beider Populationen bestimmt und die Zellen der PSA-NCAM⁺-Fraktion wurden in ein entsprechendes Zellkulturgefäß ausgesät, wobei mindestens $1,0 \times 10^6$ Zellen in ein 6-Well ausgesät wurden. Die erhaltenen neuronalen Progenitorzellen wurde nach Erreichen der vollständigen Konfluenz, wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben, passagiert und weiterverwendet.

2.2.3 CHARAKTERISIERUNG DER IPS-ZELLEN

2.2.3.1 KARYOGRAMM

Für das Karyogramm wurden Metaphase iPS-Zellen auf Matrigel expandiert und nach Behandlung mit dem Spindelgift Colcemid vereinzelt. Die Herstellung der Karyogramme mittels R/C-Banding erfolgte zum einen mit freundlicher Unterstützung durch die Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin der Universitätsmedizin Rostock, zum anderen durch die Firma Cell Guidance Systems.

2.2.3.2 „EMBRYOID BODY“-GENERIERUNG

Induzierte pluripotente Stammzellen wurden, wie in 2.2.1.3 beschrieben, expandiert und im Ganzen von den Feederzellen mittels Glashaken gelöst. Die gelösten Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze mit großer Öffnung in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen und sedimentiert. Der Überstand wurde aspiriert, die Kolonien in 5 ml EB-Medium resuspendiert und in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte mit geringem Anheftungspotential (low attachment plate) übertragen und 5 Tage inkubiert, wobei nach drei Tagen ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Währenddessen bildeten sich „Embryoid Bodies“ aus, die nach der Inkubationszeit auf mit 0,1 % Gelatine beschichtete Deckgläschen übertragen wurden. Es folgte nochmals eine Inkubationszeit von neun Tagen in der sich die „Embryoid Bodies“ absetzten und ausbreiteten. Jeden dritten Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Kolonien mit 0,5 ml PBS^{+/+} gewaschen und anschließend mit 4 % PFA für 15 min fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 0,5 ml PBS^{+/+} wurden die Kolonien mit 0,2 % Natriumazid überschichtet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.3.3 ALKALISCHE PHOSPHATASE-FÄRBUNG

Mit Hilfe der alkalischen Phosphatase-Färbung wurde die Pluripotenz der Stammzellen überprüft, da undifferenzierte Zellen eine hohe alkalische Phosphatase-Aktivität aufweisen (Takahashi et al., 2007).

Am Tag der Passagierung der iPS-Zellen wurden das Medium aspiriert, die Zellen mit PBS^{-/-} gewaschen und mit eiskaltem 100 % Methanol für 10 min bei -20 °C fixiert. Währenddessen wurde die Färbelösung, bestehend aus 75 % destilliertem Wasser, 10 % NaCl 1M, 10 % Tris pH 9,8, 5 % MgCl₂ 1M und 1:50 NBT/BCIP Stammlösung, lichtgeschützt hergestellt. Das Methanol wurde aspiriert, die Zellen mit PBS^{-/-} gewaschen und die Färbelösung wurde für 20 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und mikroskopiert.

2.2.4 IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

Für die immunologischen Färbungen wurde die indirekte Färbemethode verwendet, bei der ein spezifischer Primärantikörper gegen das entsprechende Zielantigen und der Sekundärantikörper gegen die Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet ist.

Dabei wurden sowohl Doppelfärbungen, die gleichzeitig zwei verschiedene Antigene adressierten, sowie Dreifachfärbungen, die drei verschiedene Antigene lokalisiert wurden, genutzt. Durch die Verwendung von Primärantikörpern verschiedener Spezies war die eindeutige Unterscheidung der Signale möglich.

Für immunzytochemische Färbungen wurden fixierte Zellen verwendet. Dafür wurden die Zellen zunächst auf Deckgläschen kultiviert und anschließend mit 500 µl PBS^{+/+} gewaschen. An den Waschschriff schloss sich die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei Raumtemperatur an. Abschließend wurden die Zellen nochmals mit 500 µl PBS^{+/+} gewaschen, mit 500 µl 0,02% Natriumazid überschichtet und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.4.1 IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN VON IPS-ZELLEN

Der Überstand von fixierten iPS-Zellen (siehe 2.2.1.4), auf Matrigel kultiviert, wurde aspiriert und die Zellen wurden mit 500 µl Waschlösung gewaschen. Danach wurden die Antigenbindungsstellen für 45 min mit 300 µl Block-Lösung (10 % normales Ziegen Serum (NGS), 0,1 % Triton X-100 und 1 % bovines Serumalbumin (BSA)) blockiert. Die Lösung

wurde aspiriert und die Zellen zweimal mit 500 µl Waschlösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Primärantikörper (siehe Tabelle A.7) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag schlossen sich + ein erneuter Waschschrift (dreimalig mit 500 µl Waschlösung) und die Inkubation der Sekundärantikörper lichtgeschützt für 1 h bei Raumtemperatur an. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit 500 µl Waschlösung gewaschen und 300 µl DAPI-Lösung (250 ng/ml) wurden für 5 min lichtgeschützt inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte ein erneutes Waschen mit 500 µl Waschlösung und das Eindecken der Deckgläschen auf Objektträgern. Dafür wurden die Deckgläschen, mit der zellulären Seite nach unten gerichtet, in 15 µl Mowiol-DABCO-Medium gebettet über Nacht ausgehärtet und so dauerhaft konserviert, bevor sich die Mikroskopie der Proben mit dem Keyence Biozero 8000-Mikroskopie mit der Software „BZ observation application“ anschloss.

2.2.4.2 IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN VON EMBRYOID BODIES

Zur Bestimmung der Pluripotenz der hergestellten iPS-Zellen wurden „Embryoid Bodies“ hergestellt, die in Zelltypen alle drei Keimblätter differenzierten. Exemplarisch wurden die Zellen der drei Keimblätter mit den folgenden Markern immunzytochemisch nachgewiesen: α -Fetoprotein als Marker des Entoderms, Muskelaktin als Marker des Mesoderms und Nestin als Marker des Ektoderms (Takahashi et al., 2007).

Der Überstand der fixierten „Embryoid Bodies“ (siehe 2.2.3.2) wurde aspiriert und die Zellen mit 500 µl Waschlösung (20 mM Tris-HCL (pH 8,5), 0,15 M NaCl und 0,05 % Tween in PBS^{-/-}) gewaschen. Die Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer wurden die Bindungsstellen mit Block-Puffer (4 % normales Ziegen Serum in PBS^{-/-}) für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Primärantikörper wurden in PBS^{-/-} verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 500 µl Waschpuffer wurden die Sekundärantikörper in PBS^{-/-} für 1 h lichtgeschützt inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter 2.2.4.1 beschrieben.

2.2.4.3 IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN VON NEURALEN PROGENITORZELLEN UND NEURONAL DIFFERENZIERTEN ZELLEN

Fixierte neurale Progenitorzellen und differenzierte Neurone wurden aspiriert und anschließend mit Block-Lösung (5 % normales Ziegen Serum, 0,3 % Triton X-100 in PBS^{+/+}) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primärantikörper wurden in Antikörperlösung (1 % Normales

Ziegenerum in PBS^{+/+}) verdünnt und nach einmaligem Waschen der Zellen mit 500 µl mit PBS^{+/+} für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 500 µl PBS^{+/+} wurden die Sekundärantikörper (verdünnt in Antikörperlösung) für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf die Zellen gegeben. Die DAPI-Inkubation für 5 min zur Anfärbung der Zellkerne erfolgte ebenfalls nach dreimaligem Waschen der Zellen. Abschließend wurden die Zellen wiederholt mit 500 µl mit PBS^{+/+} gewaschen und mit Eindeckmedium dauerhaft fixiert. Dafür wurden die Deckgläschen mit der zellulären Seite nach unten auf 15 µl Eindeckmedium gebettet und über Nacht lichtgeschützt getrocknet. Das Mikroskopieren der Proben erfolgte mit dem Keyence Biozero 8000 oder dem konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 780 von Zeiss.

2.2.4.4 FILIPIN-FÄRBUNG

Filipin ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der freies Cholesterol in Zellen anfärbt. Für die Versuche in dieser Arbeit wurde eine 5 % Filipin-Stammlösung (50 ml/ml) in DMSO hergestellt und bei -80 °C bis zur Verwendung lichtgeschützt gelagert. Der Überstand der zuvor fixierten Zellen wurde aspiriert und 300 µl der Filipinarbeitslösung (1:100 in DMSO und 1:5 in PBS^{+/+}; 0,1 mg/ml Filipin) wurden diese für 45 min auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS^{+/+} wurden die Zellen mit Eindeckmedium fixiert, wie unter Punkt 2.2.4.3 beschrieben. Für eine quantitative Bestimmung der Filipinfluoreszenz wurden mindestens 10 zufällig ausgewählte Bildausschnitte von drei unabhängigen biologischen Replikaten mittels des Keyence Biozero 8000 und der Software „BZ observation application“ fotografiert. Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit Hilfe des Programmes ImageJ.

2.2.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Durchflusszytometrische Analysen wurden mit dem FACS Calibur Gerät und der Software Cell Quest Pro durchgeführt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden vor allem die neuronalen und glialen Population der neuronalen Mischkulturen sowie die Vimentin-positiven Fraktion analysiert.

2.2.5.1 ZELLERNTTE UND FIXIERUNG FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Der Überstand von Zellen in einer Vertiefung einer 6-Well-Platte wurde aspiriert und mit 1 ml HBSS gewaschen. Das Ablösen und Vereinzeln der Zellen erfolgte mit 500 µl Trypsin/Benzonase für 5 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde anschließend mit 1 ml des

entsprechenden Mediums abgestoppt. Die Zellen wurden bei 3000 x g für 5 min bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand verworfen. Zur Fixierung wurden die Zellen in 400 µl 1 % PFA für 15 min schüttelnd fixiert. Nach erneuter Zentrifugation der Zellen bei 3000 x g für 5 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl Waschpuffer gelöst. Die fixierten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.5.2 IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Für eine Analyse wurden $5,0 \times 10^5$ Zellen (250 µl Zellsuspension) gefärbt. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und das Pellet wurde in 25 µl Primärantikörperlösung in Saponinpuffer gelöst und für 2 h schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 500 µl Waschpuffer versetzt und bei 3000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 25 µl Sekundärantikörperlösung in Saponinpuffer gelöst und für 1 h schüttelnd und lichtgeschützt inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschriff inklusive Zentrifugation wie nach Inkubation der Primärantikörper (siehe Anhang A.7). Abschließend wurden die Zellen in 500 µl Waschpuffer gelöst und mit dem Durchflusszytometer FACS Calibur analysiert. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem Programm „CellQuest Pro“, wobei jederzeit ungefärbte Negativkontrollen mitgeführt wurden, um den Anteil unspezifisch gefärbter Zellen zu ermitteln. Der Anteil positiv gefärbter Zellen wurde normalisiert und als prozentualer Wert dargestellt.

2.2.6 WESTERN BLOT

Zur semiquantitativen Bestimmung der Proteinmenge wurde die Western Blot-Methode verwendet. Dabei wurden die Proteine aus dem Gesamtzelllysat mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Proteinmenge wurde anschließend semiquantitativ mittels Densitometrie bestimmt.

2.2.6.1 ZELLERNTTE FÜR WESTERN BLOT

Für die Gewinnung des Gesamtzelllysates wurden die Zellen mit RIPA-Puffer aufgeschlossen. Dafür wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen in einem 6-Well einer Multiwellplatte mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend mit 350 µl RIPA-Puffer (siehe Tab. A.10) versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit, wobei die Proben auf Eis inkubiert wurden, erfolgte die Überführung der Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Das Zelllysate wurde daraufhin bei 15000 x g 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert.

Für die Gewinnung der löslichen und unlöslichen Zytoskelettfractionen wurde das Phospho-/Triton-Puffer-System verwendet. Dabei wurden die Zellen in einem 6-Well einer Multiwellplatte mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber in 1 ml PBS gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurde die Vertiefung nochmals mit 0,5 ml PBS gespült und ebenfalls in das Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proben wurden bei 3000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in 200 µl Phospho-Puffer gelöst und für 20 min schüttelnd auf Eis inkubiert. Nach dem folgenden Zentrifugationsschritt (25 min 15000 x g bei 4 °C) konnte der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Das sedimentierte Zellmaterial wurde mit 200 µl Triton-Puffer versetzt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und in 3 Zyklen zu 10 Impulsen mit Hilfe der Ultraschallsonde vollständig gelöst.

2.2.6.2 PROTEINBESTIMMUNG UND PROBENVORBEREITUNG FÜR WESTERN BLOT

An die Herstellung der Zellernte schloss sich die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Proben an. Diese erfolgte nach Smith et al. (1985) mittels Bicinchoninsäure (BCA), die mit Kupferionen einen photometrisch nachweisbaren violetten Komplex bildet. Für die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc., Darmstadt, DE) laut Herstellerangaben verwendet. Für eine exakte Bestimmung des Proteingehaltes wurde das zuvor hergestellte Zelllysate 1:3 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl der Proben in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Eichreihe wurde aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml), die Bestandteil des Pierce BCA Protein Assay Kits war, absteigend in 5 Schritten in Wasser verdünnt. Die verwendeten Konzentrationen sind im Folgenden aufgeführt (mg/ml): 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1. Die Lösungen A und B des Pierce BCA Protein Assay Kits wurden in einem Verhältnis von 50 zu 1 eingesetzt. Von diesem Ansatz wurden dann 200 µl zu den vorgelegten Proben pipettiert. Daran schloss sich eine Inkubation von 30 min bei 37 °C im Dunklen an, wobei die Platten

geschüttelt wurden. Der Proteingehalt der Proben wurde über die Absorption bei 562 nm mit dem Plattenlesegerät GENios mit Hilfe der Software Magellan bestimmt. Im Folgenden wurde die Lysate zuerst, entsprechend des Proteingehaltes der Proben, mit autoklaviertem, destilliertem Wasser verdünnt, um die gleiche Proteinmenge auftragen zu können. Danach wurde zu den Lysaten 5x Laemmli-Puffer (siehe Tab. A.10) in einem Verhältnis von 5:1 hinzugefügt und die Lysate wurden für 5 min auf 95 °C zur Denaturierung der Proteine erhitzt. Daran schloss sich eine Zentrifugation der Proben für 1 min bei 15000 x g und 4 °C an.

2.2.6.3 SDS-GELELEKTROPHORESE

In der folgenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die in den Zelllysaten enthaltenen denaturierten Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Criterion Precast Gele (4-15%TRIS-HCl, 18 wells, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) wurden in den Elektrophoresekammern Criterion™Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) platziert, als Laufpuffer diente 1x SDS-Elektrophoresepuffer (siehe Tab. A.10). Von den vorbereiteten Proben wurden jeweils 25 µl in die Taschen der Gele und in die Markertaschen 2,0 µl des Markers (Precision Plus Protein Dual Xtra Standard) aufgetragen. Die unter Verwendung des PowerPac (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) zuerst angelegte Spannung von 100 V wurde nach 10 min auf 300 V für 25 min erhöht.

2.2.6.4 PROTEINTRANSFER

In diesem Schritt wurden die aufgetrennten Proteinbanden, die in der SDS-PAGE entstanden waren, mittels des *semidry* Blotverfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dafür wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, München, DE) in Kombination mit den Trans-Blot Turbo Midi Nitrocellulose Transfer Packs (Bio-Rad, München, DE) genutzt. Auf die Anode wurden nacheinander Gel-Blotting-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das SDS-Gel und weiteres Gel-Blotting-Papier gelegt. Um ein optimales Übertragen der Proteine auf die Membran zu gewährleisten, wurde das Gel mit leichtem Druck an die Membran gedrückt. Nach festem Verschluss der Kammer mit der Anode wurde für 7 min bei 2,5 A und 25 V ein elektrisches Feld angelegt.

2.2.6.5 IMMUNDETEKTION

Nach dem Übertritt der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde diese für 1 h mit 5 %iger Magermilchlösung oder 5 %iger BSA-Lösung in 1x TBST (siehe Tab A.10) geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an freie Bindungsstellen zu vermeiden. Im Anschluss wurde die Membran mit Primärantikörpern (siehe Tabelle A.7) über Nacht bei 4 °C bei leichten Bewegungen inkubiert, wobei die Antikörper in einer 3 %igen Magermilchlösung oder BSA-Lösung in 1x TBST verdünnt wurden. Anschließend wurde die Membran mit Primärantikörpern gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und β -Aktin inkubiert. GAPDH ist ein wichtiger Bestandteil der Glykolyse und β -Aktin ist ein ubiquitär vorkommendes Cytoskelettprotein. Aus diesem Grund eignen sich die Proteine als Ladekontrolle und auch zur Normierung der erhaltenen Bandenstärke. Abschließend erfolgte die Zugabe der Sekundärantikörper in 3 %iger Magermilchlösung oder BSA-Lösung und die Membran wurde für 1 h abgedunkelt inkubiert. Die Membran inkubierte dabei stets im Dunklen, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz der Sekundärantikörper zu vermeiden. Bei Wechsel der Antikörper wurde die Membran jeweils dreimal mit TBST gewaschen, um Reste der Antikörper zu entfernen. Nach Inkubation des zweiten sekundären Antikörpers wurde die Membran dreimalig mit TBST gewaschen und im letzten Waschschriff wurde 1x TBS für das Waschen der Membran verwendet. Im Anschluss wurde die Membran auf Blotting Papier getrocknet. Die Analyse der Membranen erfolgten mit dem Odyssey Infrared Imaging Scanner-System (LI-COR, Lincoln, USA), wobei die Signale der fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper visualisiert wurden. Die Bestimmung des Molekulargewichts und die Quantifizierung der einzelnen Banden erfolgte mit dem Programm Odyssey[®] Infrared Imaging System-Application Software (Version 1.2.15, LI-COR, Lincoln, USA).

2.2.7 BESTIMMUNG DES CHOLESTEROLGEHALTES MITTELS AMPLEX RED ASSAY

Für die Bestimmung des Cholesterolgehaltes wurde das Amplex Red Cholesterol Assay Kit von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, DE) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Zur sterilen Ernte der entsprechenden Proben wurde ein 6-Well zuerst mit 500 μ l HBSS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml Accutase für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde daraufhin mit 1 ml Medium abgestoppt und die Zellen bei 3000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden bis zur weiten Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Probenvorbereitung wurden die Zellpellets entsprechend der Größe des Sediments in 0,1 % SDS-Lösung vollständig resuspendiert. Die Zellen wurden in fünf Einfrier-/Auftau-Zyklen

lysiert. Dafür wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Wasserbad aufgetaut. Zwischen den einzelnen Zyklen erfolgte ein Vermischen der Proben. Anschließend folgte die Proteinbestimmung wie in Abschnitt 2.2.6.2 beschrieben. Zur Bestimmung des Gesamt-Cholesterolgehaltes wurden die Proteinmengen in mg/ml berechnet. Die Reagenzien für das Amplex Red Cholesterol Assay Kit wurden laut Herstellerangaben vorbereitet. Danach erfolgte die Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:5 mit 1x Reaktionspuffer. Von jeder verdünnten Probe wurden 50 µl im Doppelansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert. Der Cholesterolstandard (5 mM) wurde im Verhältnis 1:250 mit 1x Reaktionspuffer verdünnt und danach weiter verdünnt, bis die folgenden Konzentrationen für die Eichkurve erreicht waren: 0 µM, 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM Cholesterol. Des Weiteren wurde in jedem Experiment eine Positivkontrolle, bestehend aus 10 µM Wasserstoffperoxid, zur Überprüfung des Reaktionsansatzes, mitgeführt. Abschließend wurde der Amplex Red Reaktionsansatz bestehend aus 300 µM Amplex Red Reagenz, 2 U/ml Meerrettich Peroxidase, 2 U/ml Cholesteroloxidase und 0,2 U/ml Cholesterolsterase in 1x Reaktionspuffer vorbereitet. In jede Vertiefung wurden 50 µl des Reaktionsansatzes pipettiert und die Proben für 30 min bei 37 °C lichtgeschützt und schüttelnd inkubiert. Die Fluoreszenz der Proben konnte mit dem Plattenlesegerät Tecan GENios bestimmt werden und anhand der Eichreihe wurde die Cholesterolkonzentration berechnet, welche in Kombination mit dem Proteingehalt als µg Cholesterol pro mg Gesamtprotein dargestellt wurde.

2.2.8 CALCIUM-ASSAY

Die Bestimmung der Calciumantworten in neuronal differenzierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Calciumindikators Fluo 4 AM. Der Acetomethylester (AM) ist zellpermeabel und nicht fluoreszent. Erst nach Beladung der lebenden Zellen wird intrazellulär der Ester abgespalten und der Calciumindikator wird fluoreszent und kann bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden. Die neuronal differenzierten Zellen, für 40 Tage in einer 48-Well-Platte differenziert, wurden zuerst mit 2 µM Fluo-4 AM für 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit HEPES-Puffer (siehe A.9) wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt zur Abspaltung der Estergruppen inkubiert. Die Basis-Fluoreszenz wurde mit dem Tecan-Plattenlesegerät bestimmt, um die unspezifische Fluoreszenz der Zellen zu ermitteln. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µM Glutamat, 6 µM AMPA oder 100 µM Quinolinsäure behandelt und umgehend, zur Bestimmung der Fluoreszenzsteigerung, vermessen. Die Messung der maximalen Gesamtfluoreszenz erfolgte

mittels 2 μM Ionomycin, da Ionomycin als Calciumionophor den maximalen Calciumeinstrom in die Zellen vermittelt. Für die Berechnung der Calciumantwort wurden zuerst die Fluoreszenzwerte mittels der basalen Fluoreszenz normiert und anschließend auf die maximale Calciumantwort mittels Ionomycin bezogen. Die Calciumantworten jeder Zelllinie wurden als prozentuale Werte der Maximalantwort angegeben.

2.2.9 QUANTITATIVE REALTIME-PCR

Zur Quantifizierung der mRNA-Transkripte in verschiedenen humanen Zelllinien wurde der LightCycler Nano (Roche, Mannheim, DE) in Kombination mit der LightCycler Nano 1.1 Software genutzt. Die humanen Zellen wurden in 24-Well-Platten kultiviert. Das FastLane cDNA Kit (Qiagen, Hilden, DE) wurde laut Herstellerangaben zur Ernte und cDNA-Produktion genutzt.

Die Ernte der Zellen zur Herstellung des Fast Lane Lysates erfolgte nach abgeschlossener Kultivierung durch Waschen der Zellen mit 200 μl FCW-Puffer und anschließender Lyse der Zellen mit 100 μl FCP-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur. Zur Herstellung der cDNA wurde ein Ansatz aus 1 μl „gDNA wipeout“ und 4 μl Aqua dest. pipettiert und 5 μl wurden zu jeweils 2 μl Fast Lane Lysat pipettiert. Die Proben wurden für 10 min bei 42 °C zur Eliminierung der genomischen DNA inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die Reverse-Transkriptase-Reaktion erfolgte nach Herstellung eines Ansatzes aus 0,5 μl „RT Primer Mix“, 2 μl „Quantiscript RT Puffer“ und 0,5 μl „Quantiscript Reverse Transkriptase“. Von diesem Ansatz wurden 3 μl zu den Proben pipettiert. Die Proben wurden für 30 min bei 42 °C inkubiert und anschließend für 3 min bei 95 °C inaktiviert. Abschließend wurden die Proben 1:1 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, sodass ein Gesamtvolumen von 20 μl erreicht wurde.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde mit dem FastStart DNA SYBRGreen Plus Kit (Roche, Mannheim, DE) in folgendem Ansatz genutzt. Die verwendeten Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,4 μM eingesetzt, kommerziell erworbene Primer hingegen wurden als 10x Stammlösungen verwendet und entsprechend dem finalen Volumen verdünnt. Die Primer wurden entsprechend der zu verwendenden Konzentration mit 10 μl „2x Fast Start essential DNA Green Master“ versetzt und mit Aqua dest. auf 19 μl pro Probe aufgefüllt. Von diesem Ansatz wurden 19 μl mit 1 μl cDNA pro Probe versehen. Zu jedem Experiment wurden jeweils eine Negativkontrolle, ohne cDNA, und eine Positivkontrolle, mit Brain Lysate RNA, mitgeführt, um eine adäquate Durchführung der Experimente zu verifizieren. Für die quantitative Realtime-PCR wurden die folgenden Zyklusparameter genutzt: Initiale

Denaturierung bei 95 °C für 600 s; 40 Zyklen von 20 s bei 95 °C für die Denaturierung, 20 s bei 55 °C für Primeranlagerung und 23 s bei 72 °C für die Verlängerung der Primer. Das finale Schmelzen der DNA-Stränge erfolgte bei 65 °C für 60 s und 20 s bei 95°C. Die PCR-Produkte wurden aufgrund ihrer Größe in der Agarosegel-Elektrophorese und der Schmelzpunktanalyse verifiziert. Die beprobten mRNA-Mengen wurden über das interne Glucose-6-phosphate-dehydrogenase(G6PD)-Referenzgen normalisiert. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung beprobt. Relative Änderungen des mRNA Gehaltes wurden mit Hilfe der Pfaffel-Methode (Pfaffel, 2001) oder als ΔCt -Werte berechnet.

2.2.10 KOLOKALISATIONSANALYSE

Für die Kolokalisationsanalyse wurden die zu analysierenden digitalen Bilder in drei unabhängigen Experimenten erhalten, wobei immer zwölf Bilder von zufällig ausgewählten Bildausschnitten (N=3, n=12) mit Hilfe des Programmes Zen (Zeiss, Oberkochen, DE) aufgenommen wurden. Mit dem Programm NIH ImageJ (Schneider et al., 2012) und der Applikation JaCoP (Bolte and Cordelières, 2006) wurde die Kolokalisation analysiert und bestimmt. Dafür wurden der Manders-Koeffizient (Manders et al., 1993) und der „Costes automatic threshold“ (Costes et al., 2004) genutzt, um die Kolokalisation zu bestimmen. Der Manders-Koeffizient repräsentiert die Anzahl der überlappenden Pixel in zwei Kanälen und reicht von 0 (keine Kolokalisation) bis 1 (vollständige Kolokalisation). Dabei ist dieser Koeffizient nicht abhängig von der Signalintensität der beiden Kanäle und kann somit auch genutzt werden, wenn sich die Intensitäten in den Kanälen unterscheiden (Manders et al., 1993). Der „Costes automatic treshold“ quantifiziert automatisch den Grad der Kolokalisierung basierend auf dreidimensionalen Statistiken. Grafisch dargestellt wurden abschließend die Manders-Koeffizienten als Maß der Kolokalisierung.

2.2.11 STATISTISCHE ANALYSEN

Die Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit GraphPad Prism 6. Die Daten wurde als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Für statistische Analysen wurden der ungepaarte Studentsche T-Test und die einfaktorielle ANOVA-Analyse verwendet. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für $p \leq 0,05$ angenommen, wobei dieser folgendermaßen gekennzeichnet wurde: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

3. ERGEBNISSE

3.1 GENERIERUNG VON IPS-ZELLINIEN

3.1.1 RETROVIRALE REPROGRAMMIERUNG VON FIBROBLASTEN

Im Laufe dieser Arbeit wurden drei iPS-Zelllinien aus gesunden (Kontrolle A) sowie NPC1- (c.3182C>T) und NPC2- (c.58G>A, c.140G>T) patientenspezifischen Fibroblasten produziert und anschließend charakterisiert. Die Generierung der iPS-Zelllinien erfolgte in Anlehnung an Takahashi (2006), nach Peter *et al.*, 2017 (Peter *et al.*, 2017b; Takahashi and Yamanaka, 2006). Abbildung 3.1 zeigt die Herstellung von induzierten pluripotenten Zellen aus Fibroblasten (A). Dabei veränderte sich die Fibroblasten-Morphologie nach ungefähr 14 Tagen und kleinere, abgerundete Zellen, in denen der Nukleus einen Großteil des Zytoplasmas einnimmt (B), wurden erkennbar, die im Folgenden Kolonien ausbildeten (C). Solange diese Kolonien das grünfluoreszierende Protein (GFP) exprimierten, wie in Abbildung 3.1 D ersichtlich, wurden die viral induzierten Transkriptionsfaktoren Klf4, Oct4, Sox2 oder cMyc exprimiert und die Bildung der iPS-Zellen war noch nicht abgeschlossen. Nach 21 bis 35 Tagen waren reife iPS-Kolonien (E) zu erkennen, die kein GFP mehr exprimierten und somit ausgereift waren (F). Die Kolonien, die auf eine reprogrammierte Fibroblastenzelle zurückgeführt werden konnten, wurden anschließend bei Erreichen einer makroskopisch sichtbaren Größe einzeln auf Feederzellen umgesetzt und anschließend expandiert.

Die Expansion der iPS-Kolonien erfolgte zuerst auf inaktivierten embryonalen murinen Feederzellen und anschließend auf Matrigel zur Herstellung reiner iPS-Zellkolonien ohne Fremdzellen. Für die Generierung der iPS-Zelllinien wurden zunächst mehrere Klone umgesetzt. Von diesen Klonen wurde auf Grund der Wachstumsraten und morphologischen Aspekte ein Klon ausgewählt (siehe Tabelle 2.3). Die entstandenen Linien wurden kryokonserviert und zur weiteren Verwendung gelagert.

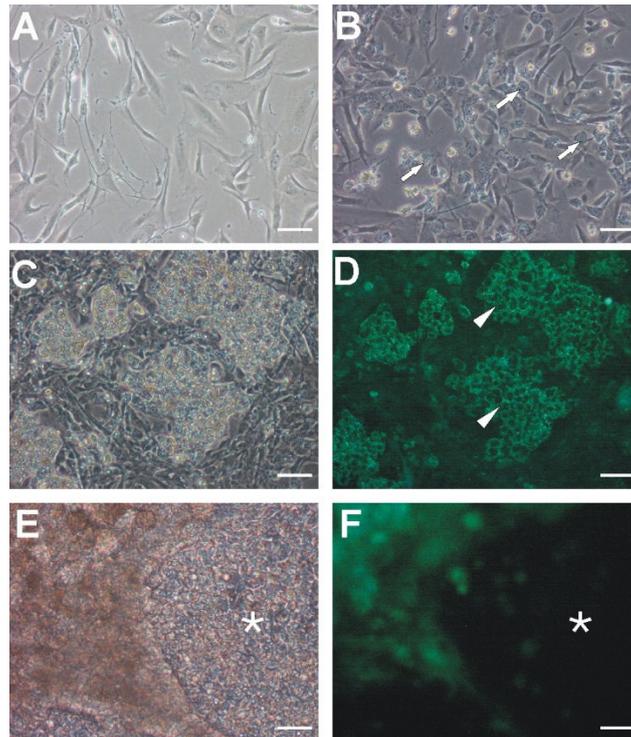


Abbildung 3.1: Reprogrammierung von Fibroblasten zur Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen. A: Fibroblasten vor der Reprogrammierung B: Fibroblasten zeigen 7 Tage nach Transduktion eine veränderte Morphologie (Pfeile) C: Fibroblasten 14 Tage nach Transduktion D: Fibroblasten 14 Tage nach Transduktion exprimieren GFP-Signal (Pfeilspitze) E: iPS-Kolonie (markiert mit *) 30 Tage nach Transduktion. Skalierung: 50 µm F: iPS-Kolonie (*) exprimiert kein GFP-Signal. Skalierung: 25 µm.

3.1.2 CHARAKTERISIERUNG DER GENERIERTEN IPS-ZELLEN

Nach der Expansion der iPS-Kolonien und erfolgreicher Liniengenerierung durch die Expansion der Kolonien erfolgte die Charakterisierung der iPS-Zelllinien. Bei den neu hergestellten iPS-Zelllinien handelte es sich um die phänotypisch gesunde Kontrolle A (GM08398, Klon 1), die prävalente NPC1-Mutation c.3182T>C (GM18453, Klon 8) und die NPC2 Mutation c.58G>A, c.140G>T (GM18455, Klon 1).

Für die Charakterisierung wurde zuerst untersucht, ob nach der Reprogrammierung Abnormitäten im Karyotyp der einzelnen Zelllinien gefunden werden konnten. In Abbildung 3.2 ist das Karyogramm der drei generierten Linien abgebildet. Dabei ist zu erkennen, dass keine Abnormitäten im Karyotyp aufgetreten sind und alle generierten Linien einen normalen männlichen Phänotyp aufweisen.

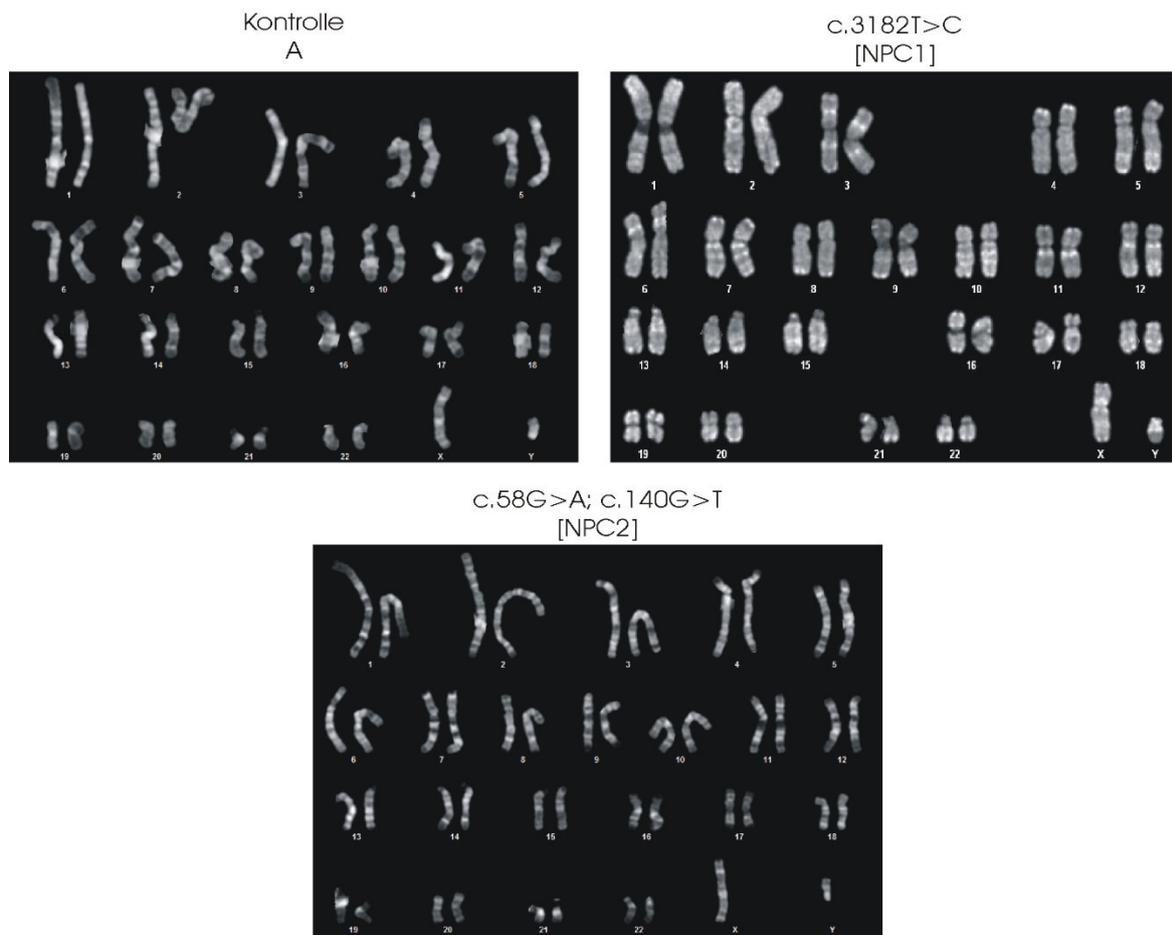


Abbildung 3.2: Karyogramm der etablierten iPS-Zelllinien.

Zur Herstellung des Karyogramms wurden die Zellen in der Metaphase auf Matrigel expandiert und nach Behandlung mit dem Spindelgift Colcemid vereinzelt. Die Herstellung der Karyogramme erfolgte mittels R/C-Banding. Die Analyse des Karyotyps der generierten iPS-Zelllinien zeigte einen normalen männlichen Phänotyp in allen Linien.

Im Folgenden wurde in den generierten iPS-Zelllinien die Expression der Pluripotenzmarker Oct4, SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 und Tra-1-81 sowie die Färbung der alkalischen Phosphatase untersucht (Abb. 3.3). Dabei sollten alle Pluripotenzmarker sowie die alkalische Phosphatase-Färbung eine positive Färbung zeigen, um nachzuweisen, dass die generierten Zelllinien einen pluripotenten Status aufweisen.

Die Alkalische Phosphatase wird in undifferenzierten Zellen exprimiert und in differenzierten Zellen herunterreguliert. Daher erscheinen undifferenzierte Zellen nach der Färbung rot bis lila und differenzierte Zellen farblos. Alle drei hergestellten iPS-Zelllinien wiesen ein deutliches positives Färbergebnis auf. Somit konnte gezeigt werden, dass alle Linien aus undifferenzierten iPS-Zellen bestehen. Ebenso zeigten die immunzytochemischen Färbungen für die Pluripotenzmarker Oct4, SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 und Tra-1-81 eine deutliche Färbung auf, wodurch die Pluripotenz der Zelllinien bestätigt werden konnte.

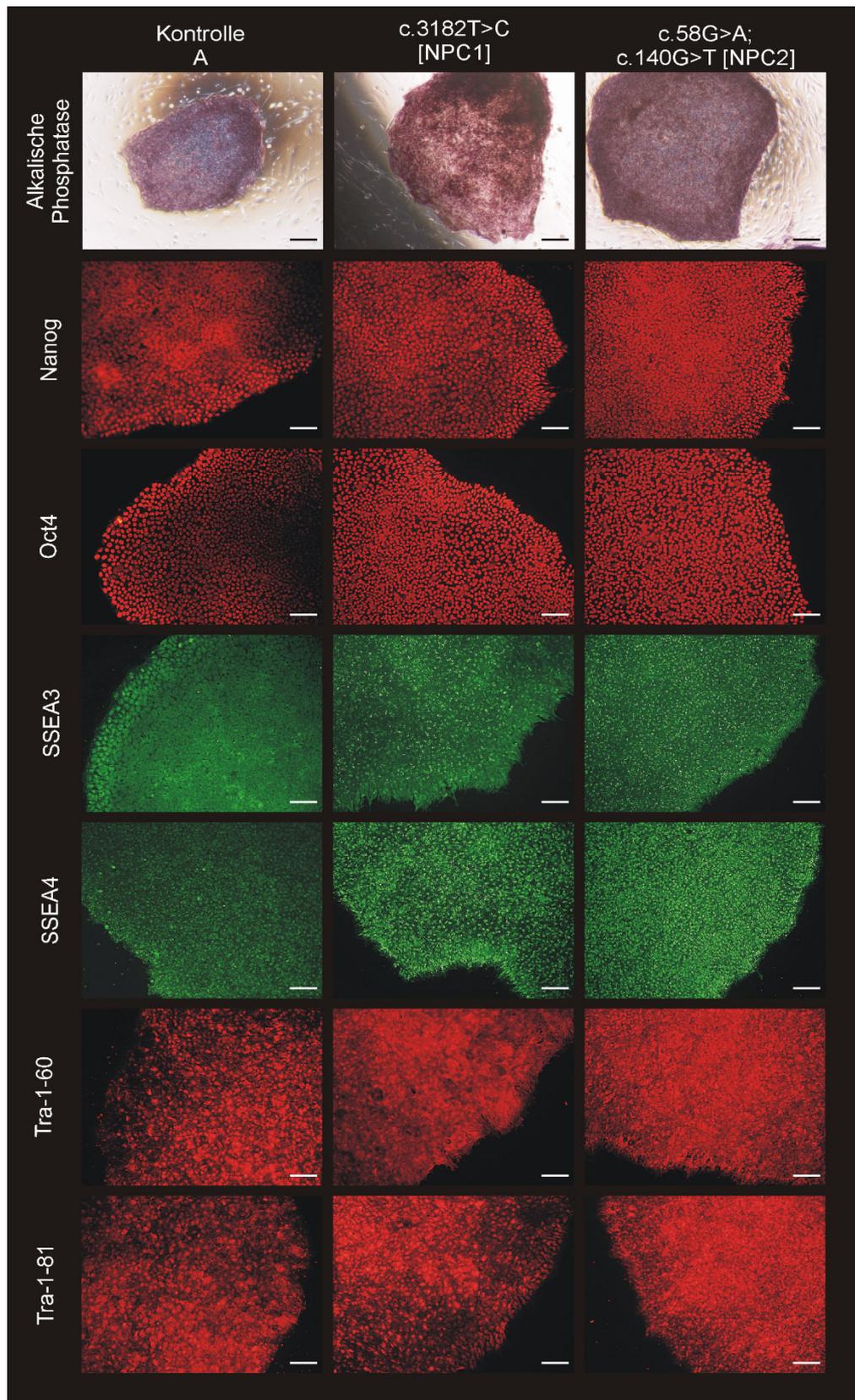


Abbildung 3.3: Nachweis der Pluripotenzmarker in den etablierten iPS-Zelllinien.

Die Färbung der alkalischen Phosphatase sowie der immunzytochemische Nachweis der Pluripotenzmarker Nanog, Oct4, SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 und Tra-1-81 zeigten eine positive Färbung. Somit konnte für alle etablierten iPS-Zelllinien die Pluripotenz nachgewiesen werden. Skalierung: 100 μ m.

Zum abschließenden Nachweis der Pluripotenz wurden „Embryoid bodies“, dreidimensionale Strukturen aus iPS-Zellen, welche die Embryonalentwicklung nachstellen, aus den iPS-Kolonien hergestellt und differenziert. Dieser Schritt diente zum Nachweis aller drei Keimblätter in den differenzierten „Embryoid bodies“. Dabei diente α -Fetoprotein als Marker des Endoderms, Muskelaktin als Marker des Mesoderms und Nestin als Marker des Ektoderms (Abb. 3.4).

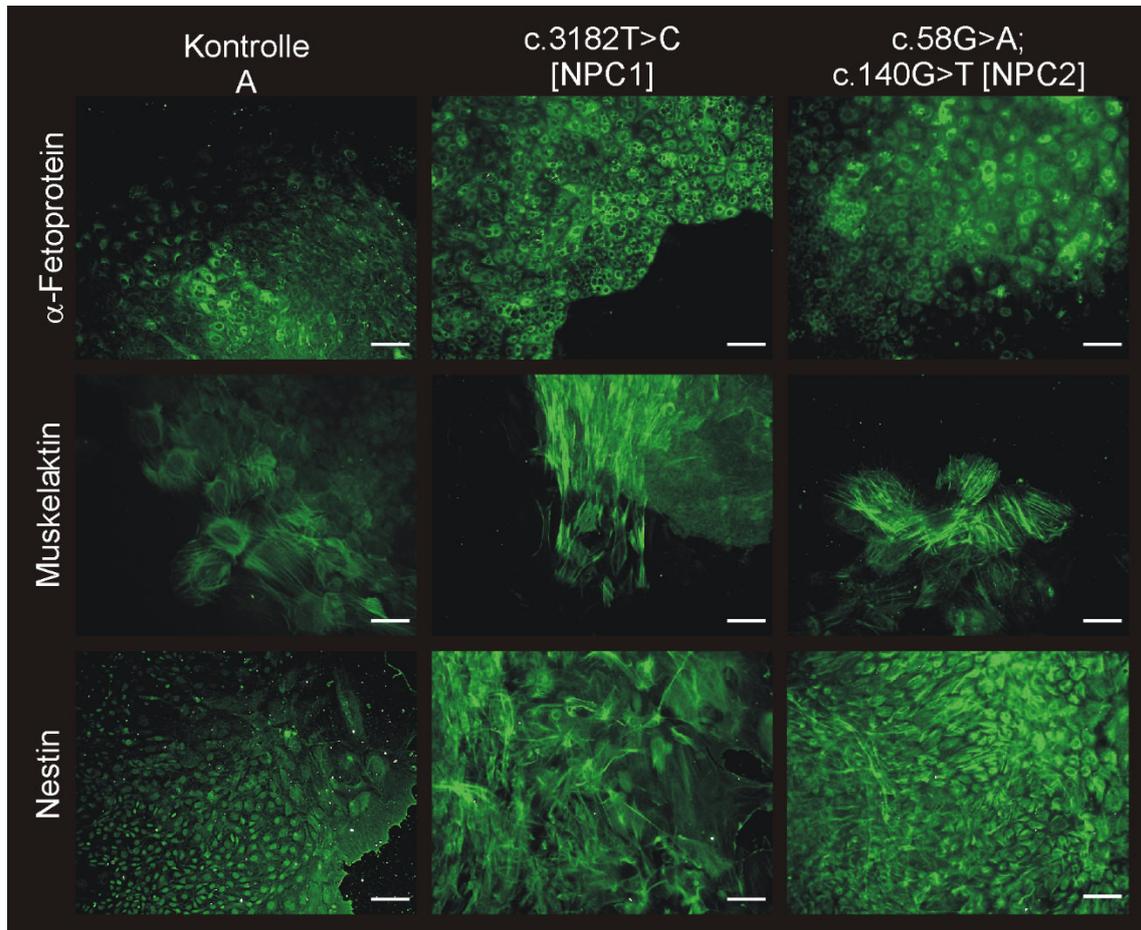


Abbildung 3.4: Nachweis der 3 Keimblätter in „Embryoid bodies“ der generierten iPS-Zelllinien.

Die „Embryoid bodies“ wurden aus iPS-Zellkolonien differenziert und mit entsprechenden Markern für die einzelnen Keimblätter angefärbt. Die immunzytochemischen Färbungen des α -Fetoproteins, Muskelaktins und Nestins zeigten eine positive Färbung für alle drei Keimblätter, wodurch die Pluripotenz der Zelllinien bewiesen werden konnte. Skalierung: 100 μ m.

Die in Abbildung 3.4 dargestellte Färbung der drei Keimblätter war für alle der generierten iPS-Zelllinien positiv, sodass die Potenz zur Ausbildung von Zelltypen der drei Keimblätter in diesen Linien nachgewiesen werden konnte.

3.1.3 CHARAKTERISIERUNG DER NEURALEN PROGENITORZELLEN

Aus den charakterisierten pluripotenten iPS-Zelllinien wurden anschließend neurale Progenitorzellen generiert. Die Differenzierung in die neuronale Linie erfolgte dabei über neurale Progenitorzellen, um eine bessere Reproduzierbarkeit der neuronalen Zellen zu erreichen. Dafür wurden die iPS-Zellen (Abb. 3.5 A) mittels Dichte-induzierter spontaner Differenzierung differenziert. Die dabei entstandenen neuronalen Rosetten (Abb. 3.5, B) enthielten neuronale Vorläuferzellen, die PSA-NCAM-positiv sind. Über magnetische Aufreinigung (MACS cell sorting) von PSA-NCAM-positiven Zellen, wie in Abbildung 3.5 C bis E zu sehen ist, konnten dann neurale Progenitorzellen (Abb. 3.5, E) isoliert werden, die anschließend expandiert sowie kryokonserviert wurden und über 20 Passagen in Kultur gehalten werden konnten (siehe 2.2.2.5).

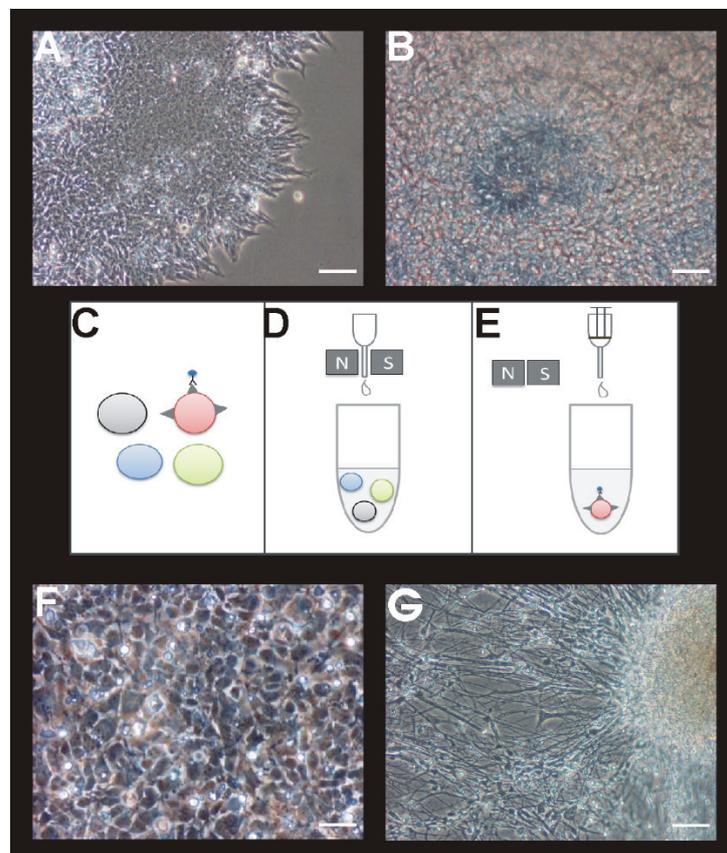


Abbildung 3.5: Herstellung von neuronalen Progenitorzellen über neurale Induktion.

In iPS-Zelllinien (A) wurden über Dichte-induzierte spontane Differenzierung neuronalen Rosetten (B) induziert. Diese enthielten PSA-NCAM-positive neuronale Progenitorzellen, die über magnetische Aufreinigung (MACS cell sorting PSA-NCAM⁺) isoliert wurden (C-E). Die neuronalen Progenitorzellen (F) wurden expandiert und für 40 Tage differenziert, sodass neuronal differenzierte Zellen erhalten wurden (G). Skalierung: 50 μ m.

Die erhaltenen neuronalen Progenitorzellen wurden über die Progenitorzell-Marker Sox2, Pax6, Nestin und Vimentin charakterisiert (Abb. 3.6).

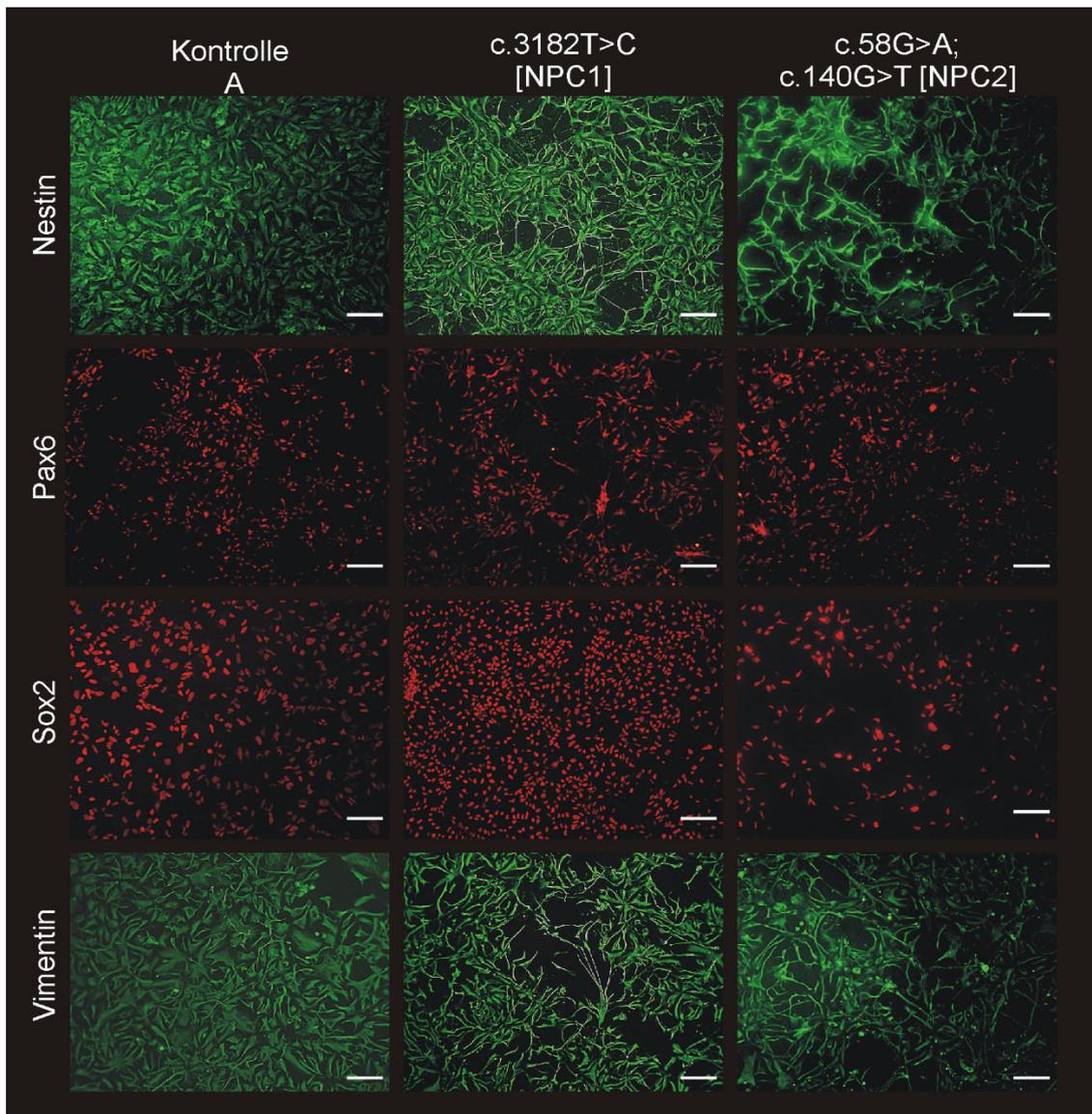


Abbildung 3.6: Nachweis von Progenitorzell-Markern in neuronalen Progenitorzellen.

Die neuronalen Progenitorzellen waren in den immunzytochemischen Färbungen der Marker Nestin, Pax6, Sox2 und Vimentin positiv. Die positive Färbung erbrachte den Nachweis, dass es sich um proliferierende Progenitorzellen handelt. Skalierung: 50 μ m.

Die Marker Sox2 und Pax6 sind Transkriptionsfaktoren, die vor allem in der Embryonalentwicklung zur Aufrechterhaltung des proliferierenden neuronalen Progenitorzellstadiums dienen. Abbildung 3.6 zeigte, dass diese Transkriptionsfaktoren in den Zellkernen der neuronalen Progenitorzellen nachgewiesen werden konnten. Nestin und Vimentin sind Intermediärfilamente, die während der Entwicklung exprimiert werden und im Laufe der Differenzierung durch Zelltyp-spezifische Intermediärfilamente ersetzt werden, wodurch sich diese Proteine ebenfalls als Marker für Progenitorzellen eignen (Li et al., 2011). In Abbildung 3.6 konnte die Pluripotenz der Progenitorzellen durch eine positive Färbung nachgewiesen

werden. Somit konnte bewiesen werden, dass es sich bei den neuronalen Progenitorzellen um proliferierende Vorläuferzellen handelt, die noch nicht ausdifferenziert sind.

3.1.4 CHARAKTERISIERUNG DER NEURONAL DIFFERENZIIERTEN ZELLEN

Die neuronalen Progenitorzellen wurden in Differenzierungsmedium für 40 Tage differenziert und anschließend charakterisiert (Abb. 3.5, F). In Abbildung 3.7 ist die Morphologie der neuronal differenzierten Zellen erkennbar.

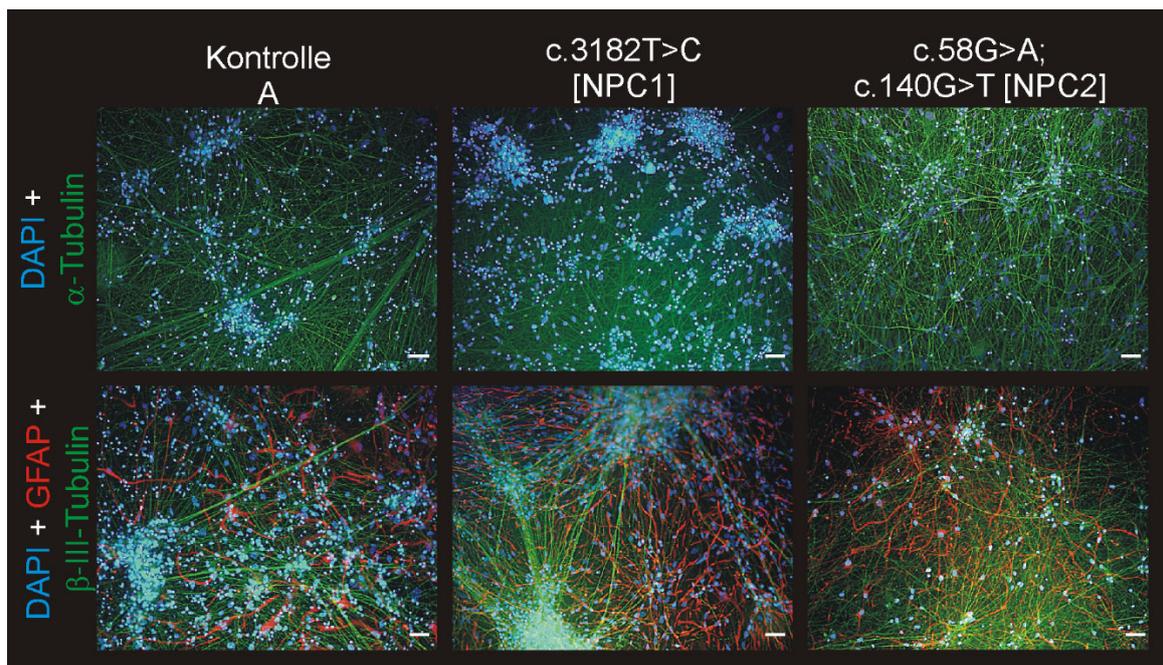


Abbildung 3.7: Morphologische Charakterisierung der neuronal differenzierten Zellen.

Die allgemeine Morphologie der neuronal differenzierten Zellen wurde mit dem Zytoskelettmarker α -Tubulin (obere Reihe, grün) visualisiert. Unter Verwendung des neuronalen Markers β -III-Tubulin (untere Reihe, grün) und des glialen Markers GFAP (untere Reihe, rot) wurden zwei Zelltypen, Neurone und Gliazellen, sichtbar. Skalierung: 50 μ m.

Wie in Peter, Trilck *et al.* (2017) beschrieben, entsteht durch die spontane Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen (siehe 2.2.1.6) eine Mischkultur aus neuronal differenzierten Zellen. Die α -Tubulin-Färbung ließ zwei verschiedene Zelltypen in den neuronal differenzierten Zellen erahnen. Diese wurden mit Hilfe der spezifischen neuronalen Färbung für β -III-Tubulin (Abb. 3.6, untere Reihe, grün) als Neurone und GFAP (Abb. 3.6, untere Reihe, rot) als Gliazellen nachgewiesen. Die Neurone zeigten dabei lange Ausläufer, wobei sich die Zellkörper der Neurone zu Sphären zusammengelagert haben. Zum anderen sind darunter Gliazellen erkennbar, die in ihrer Morphologie größer und flächiger sind als Neurone und kürzere Ausläufer ausbilden.

Die elektrophysiologische Aktivität der Neurone nach einer Differenzierungszeit von 40 Tagen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wobei die Neurone sowohl spontane Aktionspotentiale zeigten als auch postsynaptische inhibitorische und exzitatorische Ströme aufwiesen (Peter et al., 2017b).

Die Kultivierung von Neuronen zusammen mit Gliazellen, wie es in den hier gezeigten Kulturen vorkommt, ist ein entscheidender Vorteil für die Differenzierung von Neuronen, da diese auf trophische Faktoren von Gliazellen angewiesen sind, um zu differenzieren und funktionsfähige Neurone zu bilden. Um eine quantitative Analyse der Anteile an Neuronen und Gliazellen in den vorliegenden Kulturen durchzuführen, wurde die Durchflusszytometrie unter Verwendung des neuronalen Markers β -III-Tubulin und des glialen Markers GFAP angewendet. In Abbildung 3.8 sind die durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung des Verhältnisses von Neuronen und Gliazellen dargestellt.

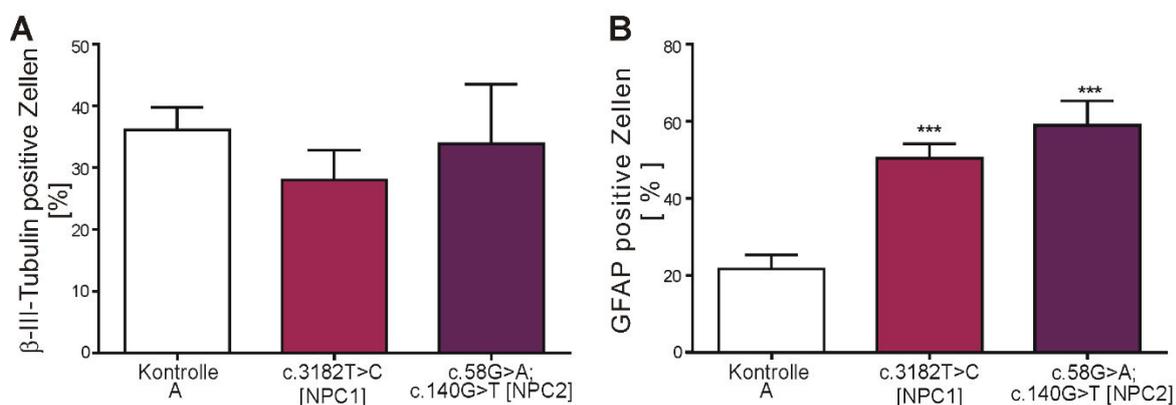


Abbildung 3.8: Durchflusszytometrische Analyse von Neuronen und Gliazellen.

In Abbildung A sind die prozentualen Anteile der Neurone (Marker: β -III-Tubulin) in den Kulturen dargestellt. Abbildung B zeigt den durchflusszytometrisch bestimmten prozentualen Anteil an Gliazellen (Marker: GFAP) in den Mischkulturen (N=4-5, n=17-24).

Die Analyse der prozentualen Anteile der beiden Zellpopulationen an der Kultur zeigten, dass in allen drei Kulturen ca. 30 % Neurone enthalten sind. Die Anteile der Gliazellen betragen in der Kontroll-Zelllinie A 22,7 % \pm 3,4 %, in der NPC1-mutierten Zelllinie 51,2 % \pm 3,7 % und in der NPC2-mutierten Zelllinie 58,9 % \pm 6,3 %, wobei der Anteil der Gliazellen in den NPC-defizienten Zelllinien gegenüber der Kontroll-Zelllinie signifikant erhöht war.

Neben dem Nachweis, dass die hier generierten neuronalen Zellen funktionsfähige Neurone und Gliazellen enthalten, wurden auch krankheitsspezifische Merkmale des Morbus Niemann-Pick Typ C, wie Cholesterollakkumulationen, analysiert. Zum Nachweis, dass die hier generierten Zelllinien dem NPC-Phänotyp entsprechen, wurde eine Filipin-Färbung durchgeführt, mit der der Cholesterolgehalt der Zellen bestimmt wurde (Abb. 3.9).

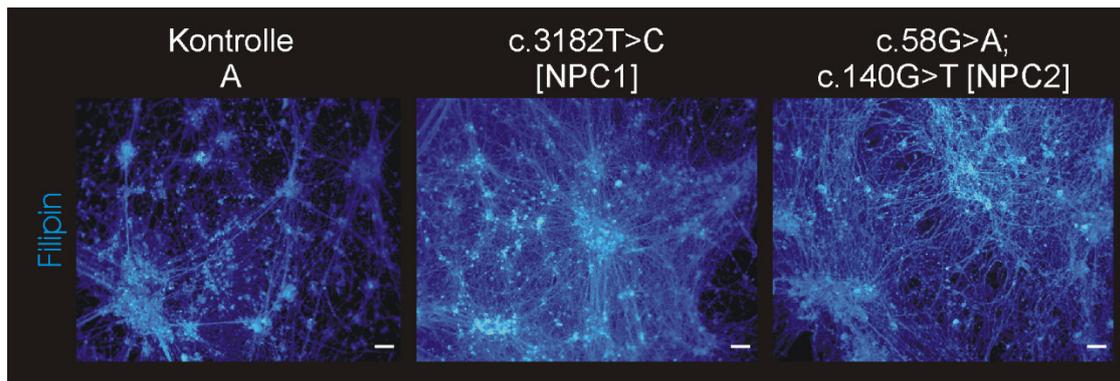


Abbildung 3.9: Filipin-Färbung der neuronal differenzierten Zellen.

Für die Filipin-Färbung wurden fixierte neuronal differenzierte Zellen mit dem Farbstoff Filipin gefärbt. Die Filipin-Färbung der Kontroll-Zelllinie zeigte eine leichte Blaufärbung (Kontrolle A). Die Färbungen der NPC-mutierte Zelllinien wiesen eine intensivere Färbung auf, was auf einen erhöhten Cholesterolgehalt zurückzuführen ist. Skalierung: 50 μm

Die Filipin-Färbung in Abbildung 3.9 zeigt durch die intensivere Blaufärbung einen deutlich erhöhten Cholesterolgehalt in den NPC-mutierte Zelllinien. Die Erhöhung des Cholesterolgehaltes ist ein typisches Merkmal des Morbus Niemann-Pick-Typ C und in den hier verwendeten generierten neuronal differenzierten Zelllinien aus patientenspezifischen iPSC-Zellen nachweisbar.

Dadurch konnte, wie in Trilck *et al.* (2016) und Peter, Trilck *et al.*, (2017), belegt werden, dass dieses Zellmodell und die daraus entstandenen neuronalen Zelllinien geeignet sind, um typische Anzeichen des Morbus NPC nachzustellen.

3.2 NACHWEIS DER GLIOSE UND DES INTERMEDIÄRFILAMENT-PHÄNOTYPS IM NPC1-ZELLMODELL

3.2.1 ERHÖHTER ANTEIL GLIAZELLEN IN NPC1-DEFIZIENTEN ZELLINIEN

Für die folgenden Versuche wurden jeweils zwei Kontroll-Zelllinien und drei beschriebene NPC1-mutierte Zelllinien verwendet. Die verwendeten Linien wurden entweder zuvor in dieser Arbeit, Kontrolle A und c.3182T>C, oder aber bereits in Trilck *et al.* (2013, 2016) und Peter, Trilck *et al.*, (2017), Kontrolle B, c.1836A>C; c.1628delC und c.1180T>C, beschrieben und sind folglich vollständig charakterisiert. Die generierten Kontroll- und NPC1-mutierte Zelllinien wurden im Folgenden genauer untersucht. Dabei sollte erforscht werden, ob in den Kulturen ebenfalls, wie bereits für das NPC1-Mausmodell (Baudry *et al.*, 2003; Pressey *et al.*, 2012) beschrieben, eine Gliose nachweisbar ist. Vor allem nach der Degeneration von Neuronen entstehen dabei vermehrt Gliazellen, unter anderem im massiv betroffenen Cerebellum.

Um eine Gliose in NPC1 nachweisen zu können, wurden zuerst immunzytochemische Färbungen von zwei Kontroll-Zelllinien und drei unterschiedlichen NPC1-defizienten Zelllinien mit verschiedenen Mutationen durchgeführt (Abb. 3.10).

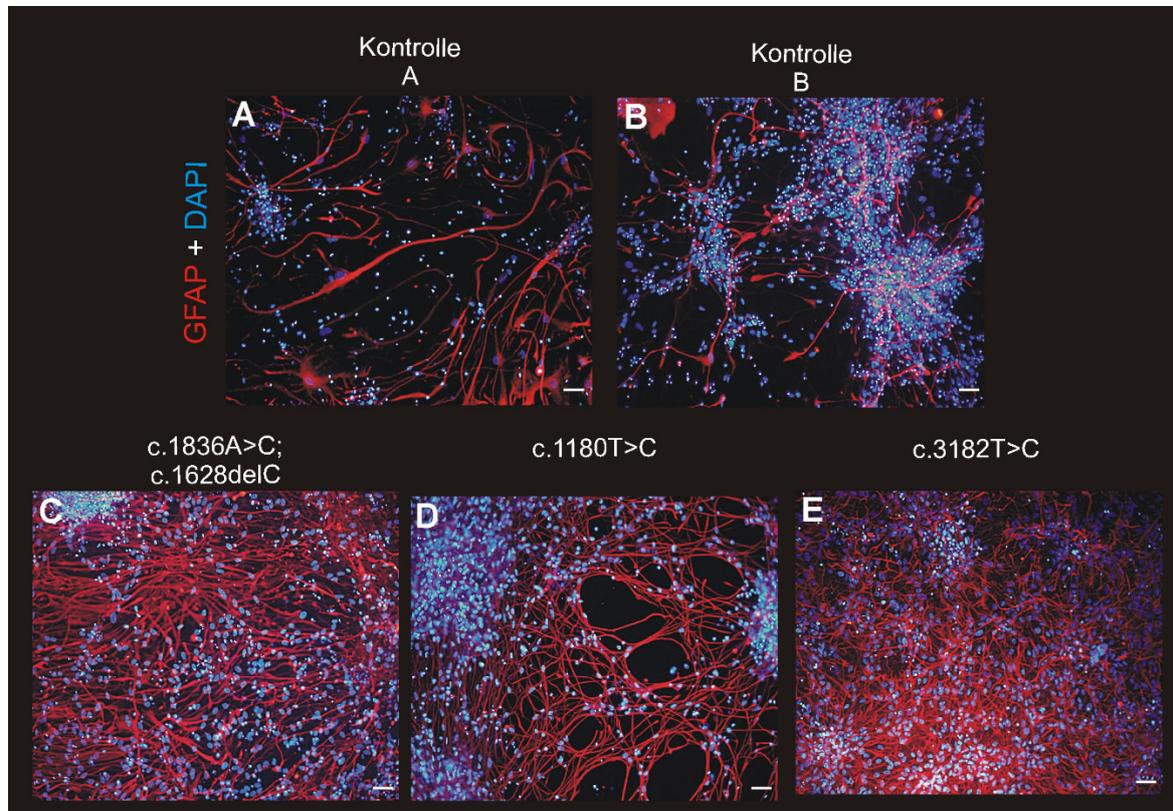


Abbildung 3.10: Immunzytochemische Färbung der Gliazellen (GFAP) in Kontroll- und NPC1-defizienten Zelllinien. Immunzytochemische Färbung des Gliazellmarkers GFAP (rot, DAPI: blau) in zwei Kontroll-Zelllinien und 3 NPC1-mutierten Zelllinien. Die Zelllinien mit Mutation im *NPC1*-Gen (C-E) wiesen visuell sichtbar eine deutlich erhöhte Zahl an GFAP-positiven Gliazellen auf, was auf eine Gliose hindeutet. Skalierung: 50 µm

Zum Nachweis der Gliose wurde eine immunzytochemische Färbung des Gliazellmarkers GFAP in den Kontroll- und NPC1-mutierten Zelllinien durchgeführt. Diese zeigte eine erhöhte Zahl an GFAP-positiven Gliazellen in Zelllinien mit NPC1-Mutation (Abb. 3.10, C-E) im Vergleich zu den Kontroll-Linien (Abb. 3.10, A-B). Die erhöhte Anzahl an GFAP-positiven Gliazellen könnte ein möglicher Hinweis auf eine Gliose in NPC1 sein. Zur Quantifizierung der Gliazellen wurden durchflusszytometrische, sowie semiquantitative Western-Blot- und Transkriptions-Analysen durchgeführt (Abb. 3.11).

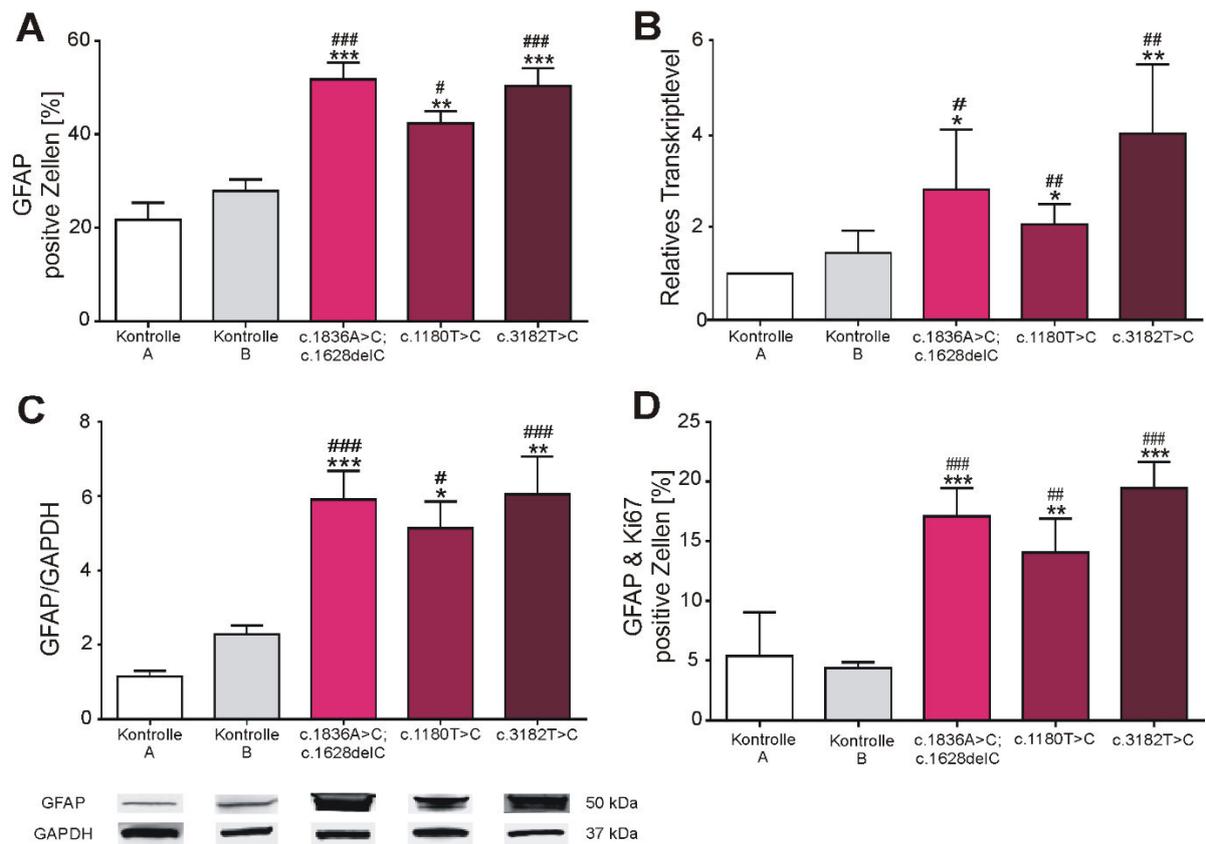


Abbildung 3.11: Quantifizierung der Gliosemarker in differenzierten Zellen.

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Anteile der Gliazellen (Marker: GFAP) erbrachte eine signifikante Erhöhung der Gliazellen in allen NPC1-defizienten Zelllinien (A; N=4-8, n=18-32). Auch das relative Transkriptionsniveau des *GFAP*-Genes war in den drei Zelllinien mit NPC1-Mutation signifikant erhöht (B; N=3, n=6). Im semiquantitativen Western-Blot konnte nachgewiesen werden, dass der Proteingehalt von GFAP im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien signifikant erhöht war (C; N=8-10, n=18-36). Als Marker für proliferierende Zellen, ein Merkmal der reaktiven Gliazellen, wurde Ki67 verwendet und der Anteil an Ki67-positiven Gliazellen (GFAP-positiv) bestimmt, wobei auch dort eine signifikante Steigerung nachgewiesen wurde (D; N=5-6, n=16-24). Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Mittels der durchflusszytometrischen Messung der GFAP-positiven Zellen konnte festgestellt werden, dass in Zelllinien mit NPC1-Mutation eine signifikante Steigerung der Gliazellen zu beobachten ist (Abb. 3.11, A). Auch das Transkriptionsniveau von GFAP war in allen NPC1-defizienten Zelllinien gegenüber den zwei Kontroll-Zelllinien signifikant erhöht (Abb. 3.11, B). Der Proteingehalt von GFAP, der mit Hilfe des semiquantitativen Western Blots bestimmt wurde, zeigte ein um das Drei- bis Sechsfache erhöhten GFAP-Gehalt in den NPC1-mutierten Zelllinien gegenüber den Kontrollen (Abb. 3.11, C). Ebenfalls war in Zelllinie mit NPC1-Mutation im Gegensatz zu den Kontroll-Zelllinien ein drei- bis vierfach erhöhter Anteil an proliferierenden Zellen messbar. Diese Experimente zeigten, dass in Zelllinien mit NPC1-

Mutation deutlich mehr Gliazellen, eine erhöhte GFAP-Transkription und ein erhöhter GFAP-Proteingehalt sowie eine Proliferation der vorhandenen Gliazellen messbar waren, wohingegen in Kontroll-Zelllinien keine Erhöhung der Gliazellen oder des GFAP-Gehaltes beobachtet werden konnte. Diese signifikanten Steigerungen im GFAP-Gehalt, der Gliazell-Anzahl und der Proliferation der Gliazellen sind ein eindeutiges Anzeichen für reaktive Gliazellen und somit einer Gliose in NPC1-mutierten Zelllinien. Folglich zeigen die vorhergehenden Experimente eine Gliose in NPC1-defizienten neuronal differenzierten Zellen.

3.2.2 ERHÖHTER VIMENTINGEHALT IN NPC1-DEFIZIENTEN ZELLEN

Als weiterer Marker für die Gliose wurde das Intermediärfilament Vimentin betrachtet. Hierzu wurden immunzytochemische Färbungen für GFAP und Vimentin in einer Doppelfärbung durchgeführt (Abb. 3.12, A-E). Diese Färbungen zeigten in Zelllinien mit NPC1-Mutation (Abb. 3.12, C-E) im Kontrast zu den Kontrollen (Abb. 3.12, A-B) visuell sichtbar ein erhöhtes Maß an Vimentin-positiven Gliazellen. Zur Verifizierung dieser visuellen Beobachtungen wurde eine Kolokalisationsanalyse durchgeführt, bei der der prozentuale Anteil an Vimentin-positiven Gliazellen bestimmt wurde. Die Analyse der Fluoreszenzbilder zeigte eine deutliche Kolokalisation von GFAP- und Vimentin-positiven Zellen in NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien (Abb. 3.12. F). Auch die Analyse der Durchflusszytometrie zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl an Vimentin- und GFAP-positiven Zellen in allen NPC1-mutierten Zelllinien (Abb. 3.12. G). Mit Hilfe dieser Analysen konnte belegt werden, dass die Gliazellen in Zelllinien mit NPC1-Mutation eine deutlich erhöhte Vimentinexpression aufweisen, was ein weiteres typisches Merkmal reaktiver Astrozyten in einer Gliose darstellt.

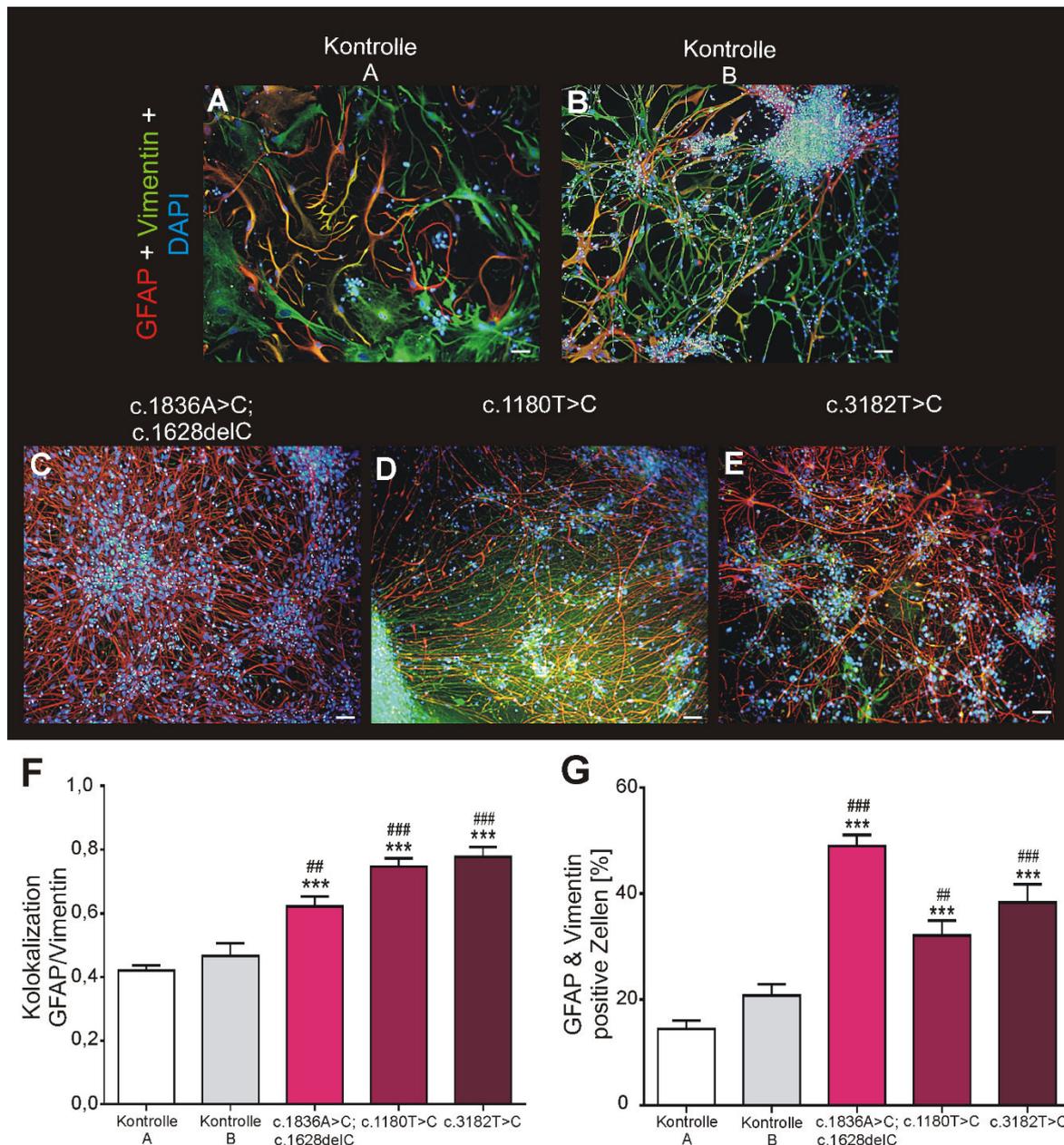


Abbildung 3.12: Analyse der Vimentinexpression in Kontroll- und NPC1-defizienten Gliazellen.

Die immunzytochemische Färbung (A-E) von Vimentin (grün) und GFAP (rot) zeigte einen erhöhten Anteil von Vimentin-positiven Gliazellen in NPC1-Mutanten (C-E). Die Kolokalisationsanalyse (F) der Fluoreszenzbilder bestätigte die signifikante Erhöhung der Vimentin-exprimierenden Gliazellen in NPC1-mutierten Zelllinien (N=3-4, n=39-54). Die Ergebnisse konnten mit der durchflusszytometrischen Analyse (G) bestätigt werden, die eine signifikante Steigerung der Vimentin- und GFAP-positiven Zellen in Zelllinien mit NPC1-Mutation zeigt (N=7-10, n=17-40). Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Mit Hilfe der in Abbildung 3.12 gezeigten Kolokalisations- und durchflusszytometrischen Analyse konnte nachgewiesen werden, dass der Gehalt an Vimentin in NPC1-defizienten Gliazellen erhöht ist. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Gesamtgehalt an Vimentin in den Kontroll- und NPC1-defizienten Zelllinien erhöht ist. Um den Gesamtgehalt an Vimentin

in den Kulturen zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen mit Gesamtzelllysaten durchgeführt (Abb. 3.13)

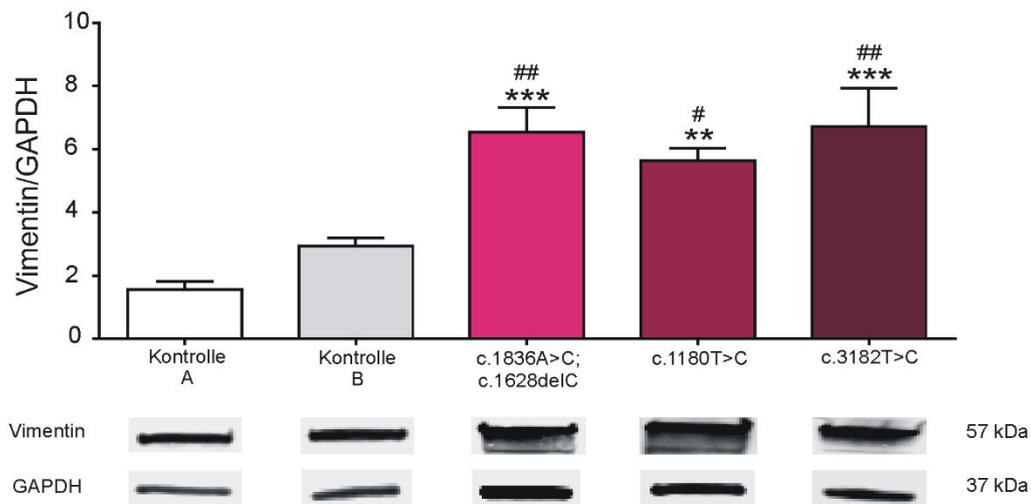


Abbildung 3.13: Analyse des Gesamtvimentingehaltes in differenzierten Zellen

Die semiquantitative Western-Blot-Analyse des gesamten Vimentingehaltes in den einzelnen Zelllinien ergab eine signifikante Steigerung des Vimentingehaltes in allen Zelllinien mit NPC1-Mutation im Vergleich zur den Kontrollen A und B (N=8-10, n=19-37). Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Der Vimentingehalt in NPC1-defizienten Zelllinien war im Vergleich zu den Kontrollen A und B signifikant erhöht (Abb. 3.13). Der Vimentinproteingehalt war dabei in NPC1-mutierten Zelllinien um das Zwei- bis Vierfache erhöht gegenüber den Kontroll-Zelllinien. Diese Erhöhung des gesamten Vimentingehaltes in Zelllinien mit NPC1-Mutation weisen auf eine Hochregulation von Vimentin in NPC1-mutierten Zelllinien hin.

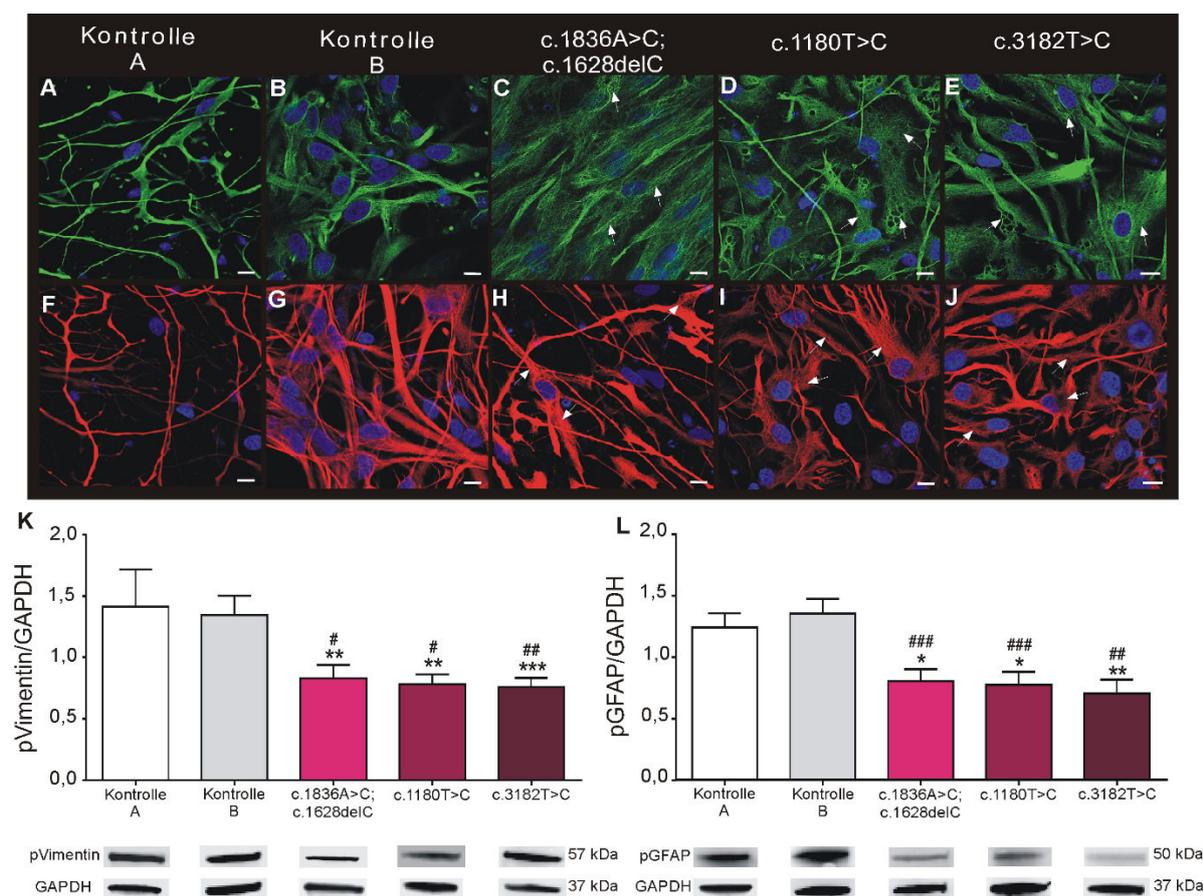
Zusammengefasst zeigen die vorangegangenen Ergebnisse eine Gliose in NPC1-patientenspezifischen iPS-zellbasierten Gliazellen. Bewiesen wurde die Gliose durch eine erhöhte Anzahl an proliferierenden Gliazellen und einer erhöhten Anzahl an GFAP- und Vimentin-positiven Zellen, wodurch die typischen Merkmale von reaktiven Astrozyten nachgewiesen werden konnten.

3.2.3 VERÄNDERTE PHOSPHORYLIERUNG VON VIMENTIN UND GFAP IN NPC1-DEFIZIENTEN ZELLEN

Da eine Hochregulation von Vimentin in dem hier verwendeten Zellmodell gezeigt werden konnte, wurde auch über eine Veränderung der Struktur von Vimentin und GFAP, die beide zur Klasse der Typ III der Intermediärfilamente gehören, nachgedacht. Dafür wurde der Phosphorylierungsstatus, der den Aufbau der Intermediärfilamente über die Proteinkinase C (PKC) bedingt, untersucht. Kürzlich wurde von Walter et al. (2009) gezeigt, dass die Struktur

von Vimentinfilamenten in NPC1-defizienten Fibroblasten verändert ist, wobei NPC1-defiziente Fibroblasten eine gestörte Anordnung von Vimentinfilamenten zeigten. Die hier genutzten iPS-zellbasierten neuronal differenzierten Zellen zeigten ein vergleichbares Bild der IF-Struktur (Abb. 3.14).

Abbildung 3.14: Analyse der Vimentin- und GFAP-Phosphorylierung in differenzierten Zellen.



Die immunzytochemische Analyse von Vimentin (A-E, grün) zeigt eine veränderte Anordnung von Vimentin in Zellen, die eine NPC1-Mutation tragen (C-E). In diesen Zellen bildet Vimentin längere und dickere Bündel, die ungeordnet in den Zellen vorkommen (Pfeile). Die gleichen Beobachtungen konnten in Zellen mit GFAP-Färbung (F-J, rot) gemacht werden, wenn auch nicht im gleichen Umfang wie für Vimentin. Zellkerne wurden mit DAPI (A-E, blau) angefärbt. Die Menge an phosphoryliertem Vimentin (K, pVimentin) und phosphoryliertem GFAP (L, pGFAP) wurde durch semiquantitative Western-Blot-Analyse bestimmt. Alle NPC1-mutierten Zelllinien zeigten eine signifikante Hypophosphorylierung beider Intermediärfilamente. (pVimentin: N=6-8, n=24-40); (pGFAP: N=5-7, n=18-31). Skalierung: 10 μ m. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Abbildung 3.14 zeigt die immunzytochemischen Färbungen für Vimentin in Kontroll- und NPC1-mutierten Zelllinien (Abb. 3.14, A-E). Im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien (Abb. 3.14, A-B), konnten in den NPC1-mutierten Zelllinien längere, dickere und ungeordnete Vimentinbündel dargestellt werden. Vergleichbare Veränderungen konnten auch für GFAP

(Abb. 3.14, F-J) demonstriert werden. Die veränderte Erscheinung steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus Fibroblasten von NPC1-Patienten (Walter et al., 2009) und weist auf einen veränderten Phosphorylierungsstatus und somit einen veränderten Auf- und Abbau von Vimentin und GFAP hin. Daher wurde als Nächstes der Phosphorylierungsstatus von Vimentin und GFAP untersucht, da der Aufbau der IFs durch die Phosphorylierung der IF Monomere reguliert wird. Für die Bestimmung der Phosphorylierung von Vimentin wurde ein Antikörper genutzt, der die Phosphorylierung an Position Serin 38 im Vimentinmolekül erkennt und die Menge über semiquantitative Western-Blot-Analyse bestimmt (Abb. 3.14, K). Die Kontroll-Zelllinien wiesen dabei die höchste Menge an phosphoryliertem Vimentin (pVimentin) auf und alle NPC1-mutierten Zelllinien zeigten eine signifikante Verringerung an phosphoryliertem Vimentin. Vergleichbare Resultate wurden für die Menge an phosphoryliertem GFAP (pGFAP) erzielt, wobei ebenfalls die Phosphorylierung an Position Serin 38 detektiert wurde. In Bezug auf pGFAP zeigten alle Zelllinien mit NPC1-Mutation einen signifikant verringerten Anteil an phosphoryliertem GFAP. Für beide Intermediärfilamente konnte somit eine Hypophosphorylierung nachgewiesen werden.

3.2.4 VERBESSERUNG DES NPC1-PHÄNOTYPS ÜBER DIE PKC-AKTIVIERUNG MITTELS PMA

Bisher konnte ein veränderter Aufbau der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin sowie ein veränderter Gehalt an pGFAP und pVimentin, beschrieben werden. GFAP und Vimentin werden von der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert, wodurch kürzere, lösliche Intermediärfilamente entstehen. Eine mögliche Ursache für die Hypophosphorylierung von GFAP und Vimentin ist eine verringerte Aktivität der PKC (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). Daher sollte als Nächstes die Frage beantwortet werden, ob eine Aktivierung der PKC zu einer Verbesserung der beschriebenen Gliose sowie der NPC1-phänotypischen Akkumulation von Cholesterin führt. Dafür wurden die Zellen mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) behandelt. PMA ist bekannt als ein Aktivator der PKC, welche Vimentin und GFAP phosphoryliert und somit den Anteil an phosphoryliertem, löslichem Vimentin im Auf- und Abbau-Kreislauf von Vimentin erhöht. Die Zellen wurden mit 10 nM PMA behandelt und anschließend wurde die Menge an Vimentin- und GFAP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

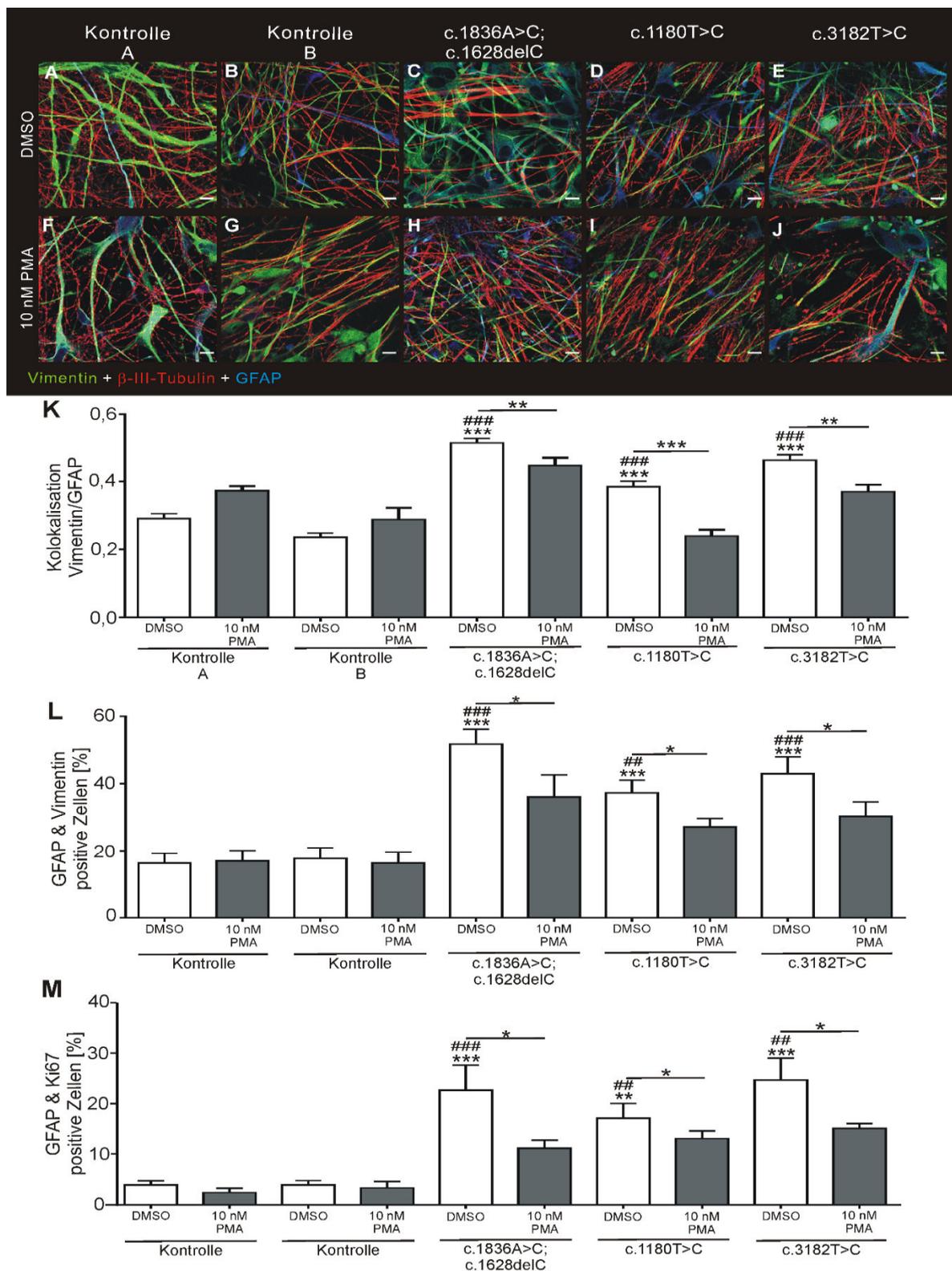


Abbildung 3.15: Analyse der Gliose in PMA behandelten differenzierten Zellen.

Die neuronal differenzierten Zellen wurden mit 10 nM PMA behandelt und immunzytochemisch gefärbt (A-J). Die konfokalen Aufnahmen wurden anschließend auf die Kolokalisation von Vimentin (grün) und GFAP (blau) untersucht (K; N=3-4, n=31-76). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gliazellen nach Behandlung mit PMA deutlich weniger Vimentin exprimierten. Dies konnte durch die durchflusszytometrische Bestimmung sowohl der Anzahl an GFAP- und Vimentin-positiven Zellen (L; N=3-5, n=6-16) als auch von GFAP- und Ki67-positiven Zellen bestätigt werden (M; N=3-5, n=7-16). Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Die Behandlung von NPC1-mutierten Zelllinien mit PMA resultierte in einer signifikanten Reduktion der Anzahl an GFAP- und Vimentin-positiven Zellen (Abb. 3.15, K, L) sowie einer signifikanten Verringerung in der Anzahl der GFAP- und Ki67-positiven Zellen (Abb. 3.15, M), was auf eine Abschwächung der Gliose in NPC1 hindeutet.

Um den Einfluss von PMA auf den Aufbau-Zyklus und die Verteilung der löslichen IF-Fraktion in NPC1 zu untersuchen, wurden zur Bestimmung der Fraktionen von GFAP und Vimentin Western-Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 3.16).

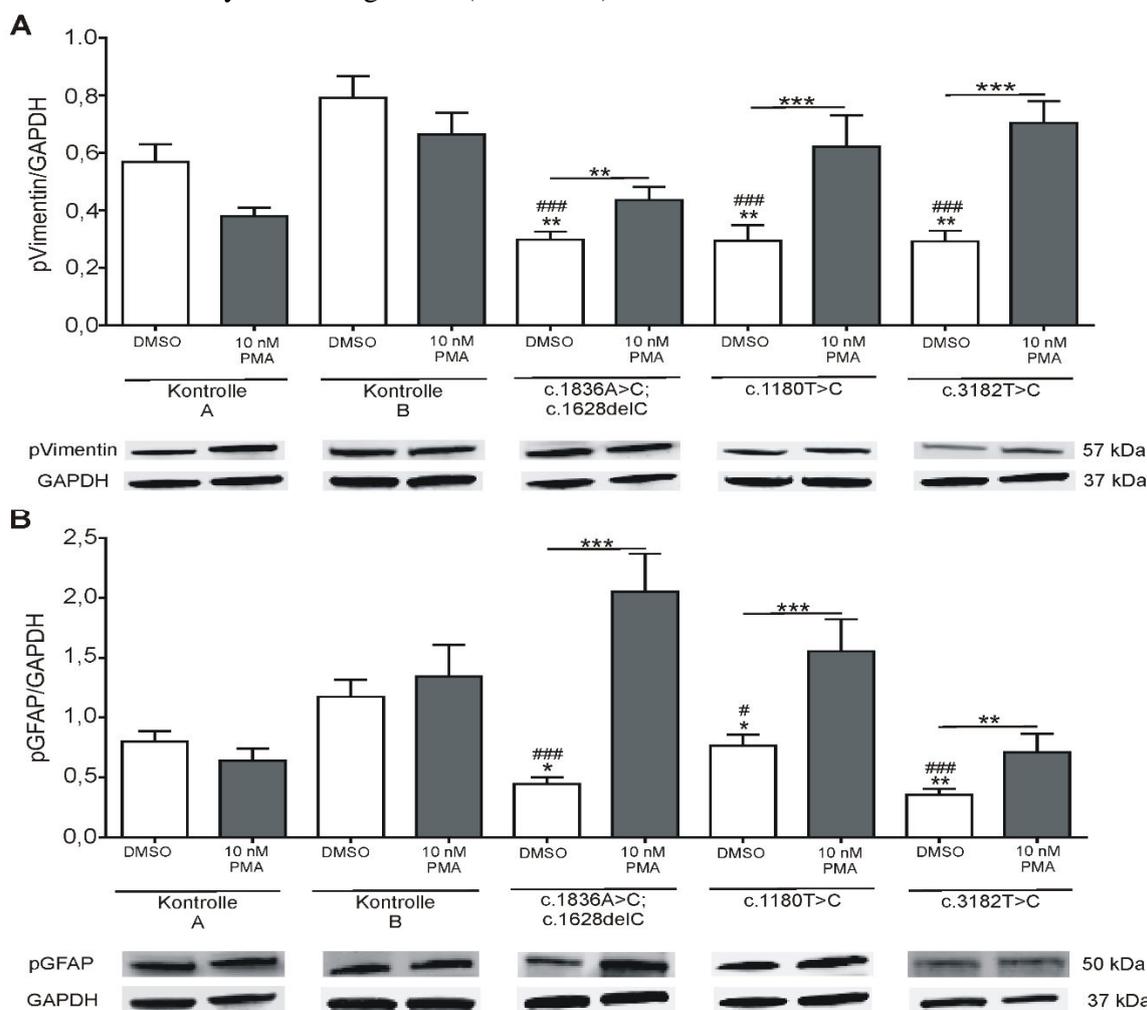


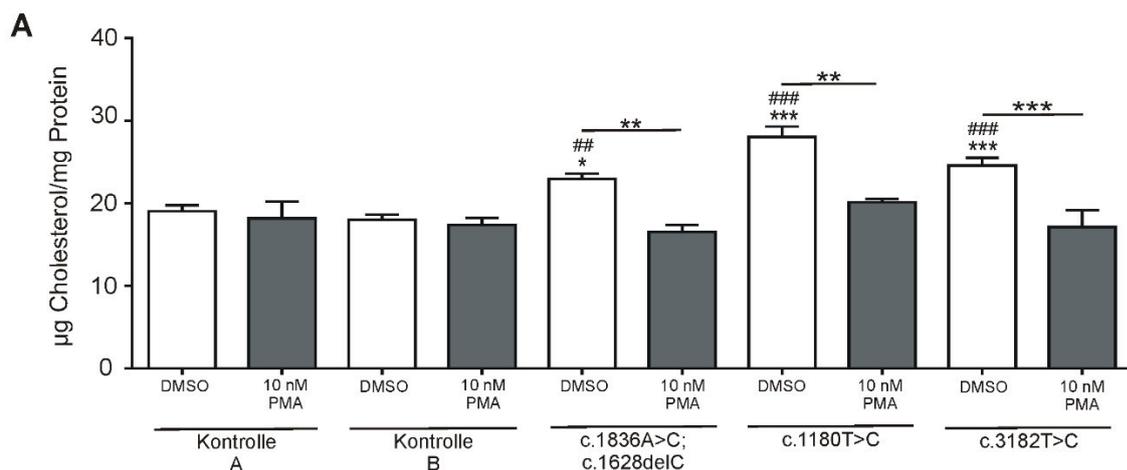
Abbildung 3.16: Phosphorylierung von Vimentin und GFAP in PMA-behandelten differenzierten Zellen.

Die neuronal differenzierten Zellen wurden mit 10 nM PMA behandelt und die Fraktion von phosphoryliertem Vimentin (A, pVimentin) und GFAP (B, pGFAP) wurde über semiquantitative Western-Blot-Analysen bestimmt. Die Behandlung mit PMA resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Fraktion an phosphoryliertem Vimentin und GFAP in allen NPC1-mutierten Zelllinien, wohingegen die Kontroll-Zelllinien keine signifikante Veränderung zeigten (pVimentin: N=4-6, n=18-50); (pGFAP: N=5-6, n=11-47). Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Konsistent zu dem Effekt von PMA auf die GFAP-, Vimentin- und Ki67-positiven Zellen stieg die Menge an phosphoryliertem Vimentin und phosphoryliertem GFAP nach der Behandlung

mit PMA signifikant in allen NPC1-mutierten Zelllinien an. Die zuvor beschriebene Hypophosphorylierung wurde somit deutlich verbessert. Über diese Steigerung der Anteile an phosphorylierten Intermediärfilamenten konnte eine Verbesserung des gestörten Intermediärfilament-Aufbauzyklus nachgewiesen werden.

Abschließend stellte sich die Frage, ob die Aktivierung der PKC und anschließender Verbesserung der Phosphorylierung von Vimentin und GFAP einen Einfluss auf die NPC1-phänotypischen Cholesterollakkumulationen hat, wie es in Trilck *et al.* (2016) für die NPC1-mutierten Zelllinien beschrieben ist. Der Effekt von PMA auf die Cholesterollakkumulationen wurde über die Quantifizierung der Filipin-Färbungen sowie der Cholesterolbestimmung mittels Amplex Red Assay bestimmt. Die typischen Cholesterollakkumulationen in Zellen mit NPC1-Mutation konnten in der Filipin-Färbung sichtbar gemacht werden (Abb. 3.17, D-F). Die Behandlung der Zellen mit PMA (Abb. 3.17, G-K) zeigte eine offensichtliche Reduktion der Intensität der Filipin-Färbung in den NPC1-mutierten Zelllinien, was auf eine reduzierte Cholesterollakkumulation hindeutet. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der Filipin-Färbung (Abb. 3.17, L) sowie durch den Amplex Red Assay zur Gesamt-Cholesterolbestimmung. (Abb. 3.17, A). Alle NPC1-mutierten Zelllinien zeigten dabei eine signifikante Reduktion des Cholesterolgehaltes auf Kontroll-Niveau. Für die Zelllinie mit der homozygoten Mutation c.3182T>C konnte sogar eine signifikante Reduktion des freien Cholesterols auf Kontroll-Niveau nachgewiesen werden.



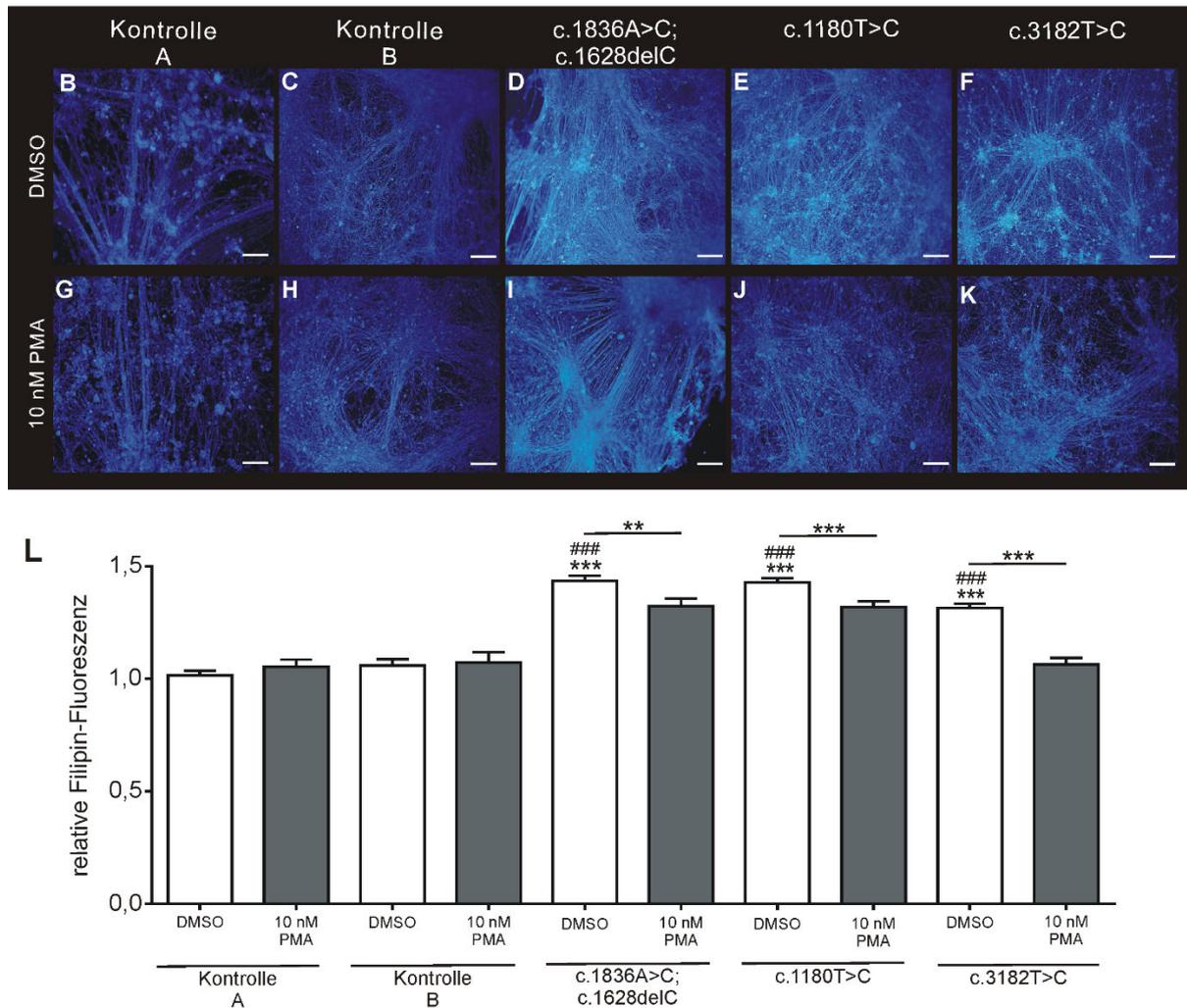


Abbildung 3.17: Cholesterolanalyse in PMA-behandelten differenzierten Zellen.

Zur Quantifizierung des Gesamt-Cholesterolgehaltes in den Zellen wurde der Amplex Red Assay verwendet (A; N=5-8, n=6-29). Die Auswertung zeigte dabei eine signifikante Reduktion des Cholesterolgehaltes in allen NPC1-mutierten Zelllinien nach Behandlung mit PMA. Die Filipin-Färbung (B-K) wurde genutzt, um den Cholesterolgehalt in den Zellen zu beurteilen, dabei zeigten sich für NPC1 typische Akkumulationen in Zelllinien mit NPC1-Mutation (D-F). Die Cholesterolakkumulationen zeigten eine deutliche Verbesserung nach PMA Behandlung (G-K). Der Effekt konnte mittels Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten nachgewiesen werden (L; N=3-6, n=29-65) Skalierung: 50 μ m. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Zusammengefasst führte die Aktivierung der PKC über PMA zur Verbesserung der Gliose in iPS-basierten NPC1-Gliazellen und zur Erhöhung der phosphorylierten Intermediärfilamente, GFAP und Vimentin, sowie zur Verbesserung der NPC1-phänotypischen Akkumulationen von Cholesterol.

3.2.5 VERBESSERUNG DES NPC1-PHÄNOTYPS ÜBER DIE ERHÖHUNG DES INTRAZELLULÄREN CALCIUMSPIEGELS MITTELS QUINOLINSÄURE

Der PKC-Aktivator PMA erhöht gezielt die Aktivität der Proteinkinase C und erzielt daher eine Steigerung der löslichen, phosphorylierten Intermediärfilament-Fraktion. Für die Aktivierung der PKC wird intrazelluläres Calcium benötigt. Bisher wurde ein niedriges Calciumlevel in intrazellulären Calciumspeichern der Zelle für NPC1 beschrieben (Lloyd-Evans et al., 2008). Daher wurde hier der Calciumeinstrom in die Zellen der einzelnen Zelllinien sowie die Calciumantwort auf die Behandlung der Zellen mit Glutamat und Quinolinsäure (QUIN), ein Agonist der Glutamatrezeptoren, untersucht (Abb. 3.18).

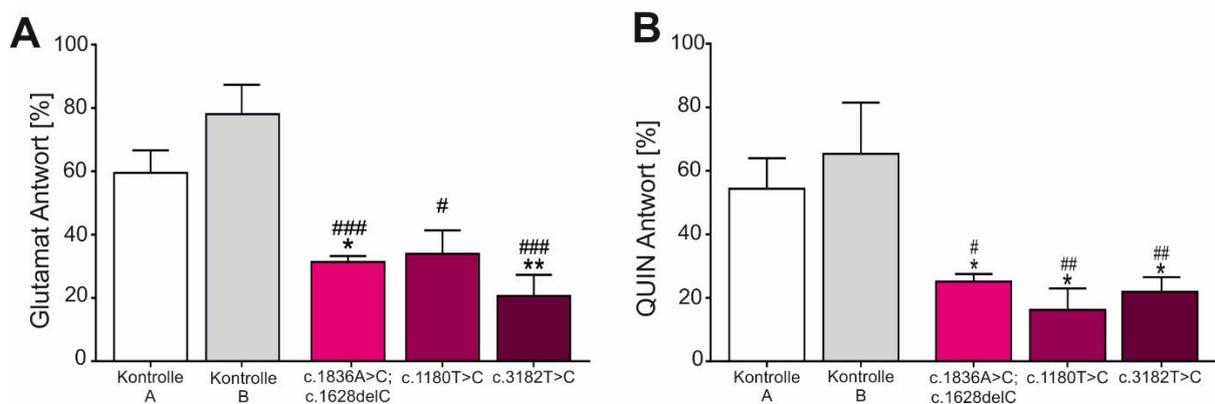


Abbildung 3.18: Calciumeinstrom in differenzierte Zellen nach Behandlung mit Glutamat und QUIN. Zur Bestimmung des Calciumeinstroms wurden die relativen Fluoreszenzen des Calciumindikators Fluo-4 mit Hilfe eines Plattenlesegerätes bestimmt. Die Calciumantwort wurde nach einer 100- μ M-Glutamat-Behandlung bestimmt und zeigte eine signifikant verringerte Antwort in allen NPC1-mutierten Zelllinien im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien (A; N=4-6, n=4-6). Ebenso konnte eine signifikant reduzierte Calciumantwort nach 100-nM-Quinolinsäure-Behandlung in den Zelllinien mit NPC1-Mutation beschrieben werden (B; N=4-6, n=4-6). Zur Normierung wurde der maximale Calciumeinstrom nach Behandlung der Zellen mit 2 μ M Ionomycin bestimmt. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Die reduzierten Calciumeinströme nach Behandlung mit Glutamat und Quinolinsäure in allen Zelllinien mit NPC1-Mutation zeigten eine reduzierte Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren in NPC1-mutierten Zelllinien, woraus ein geringerer Calciumeinstrom in die Zellen mit NPC1-Mutation resultiert. Calcium trägt, wie PMA, ebenfalls zur Aktivierung der PKC bei, die wichtig für die Phosphorylierung der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP ist und somit zum Auf- und Abbau-Zyklus der Intermediärfilamente beiträgt. Auf Grund des verringerten Calciumeinstroms in die Zellen mit NPC1-Mutation wurde im Folgenden überprüft, ob die Behandlung der NPC1-defizienten Zelllinien mit Quinolinsäure, welche zu einem erhöhten Calciumeinstrom in der Zelle führt, ebenso wie die Behandlung mit PMA einen positiven Effekt

auf die Gliose und die veränderte Zytoskelettstruktur in NPC1-mutierten Zelllinien hat. Dafür wurde der Anteil an Vimentin- und Ki67-positiven Zellen nach Behandlung mit Quinolinsäure analysiert, um Rückschlüsse auf den Gliose-Phänotyp ziehen zu können (Abb. 3.19).

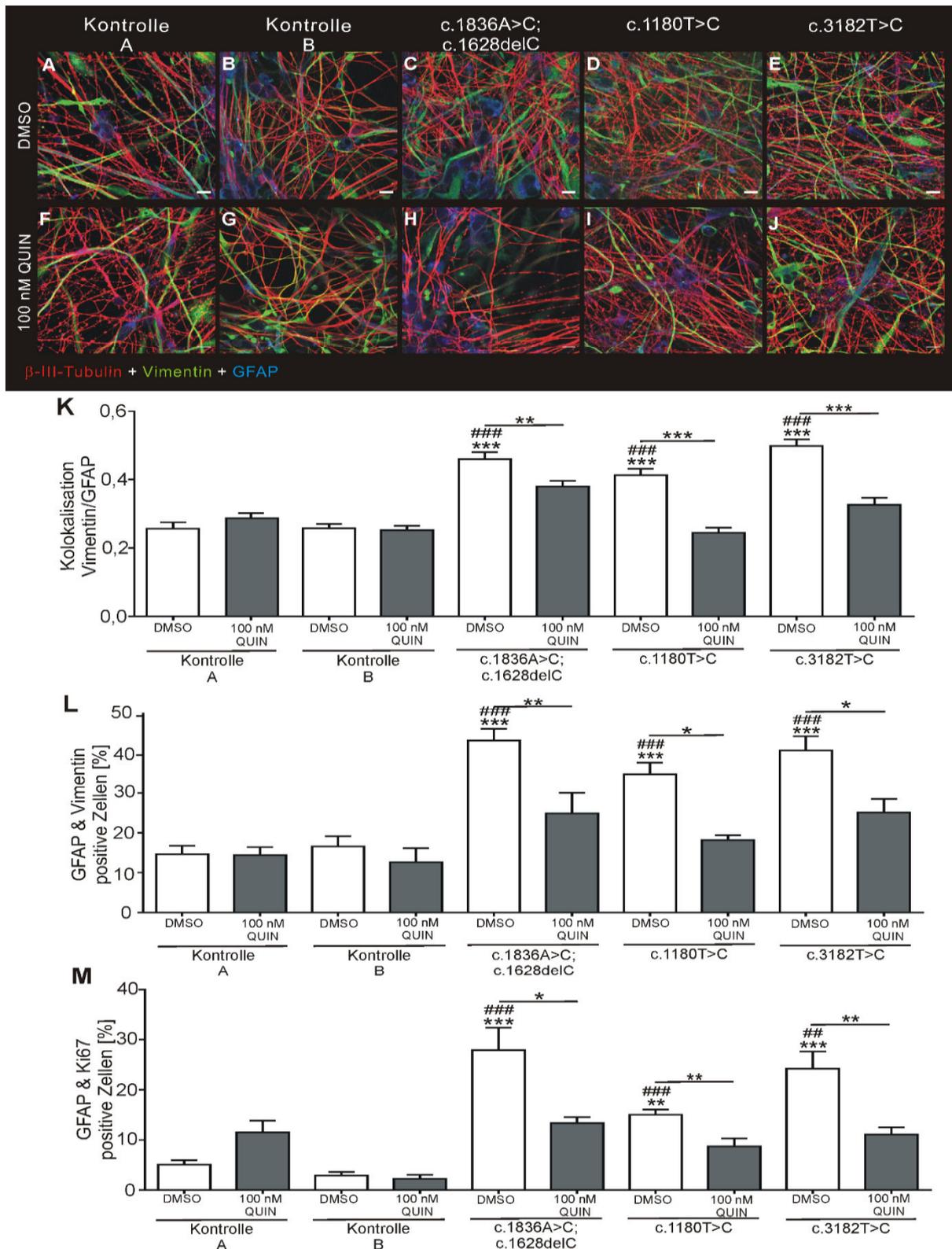


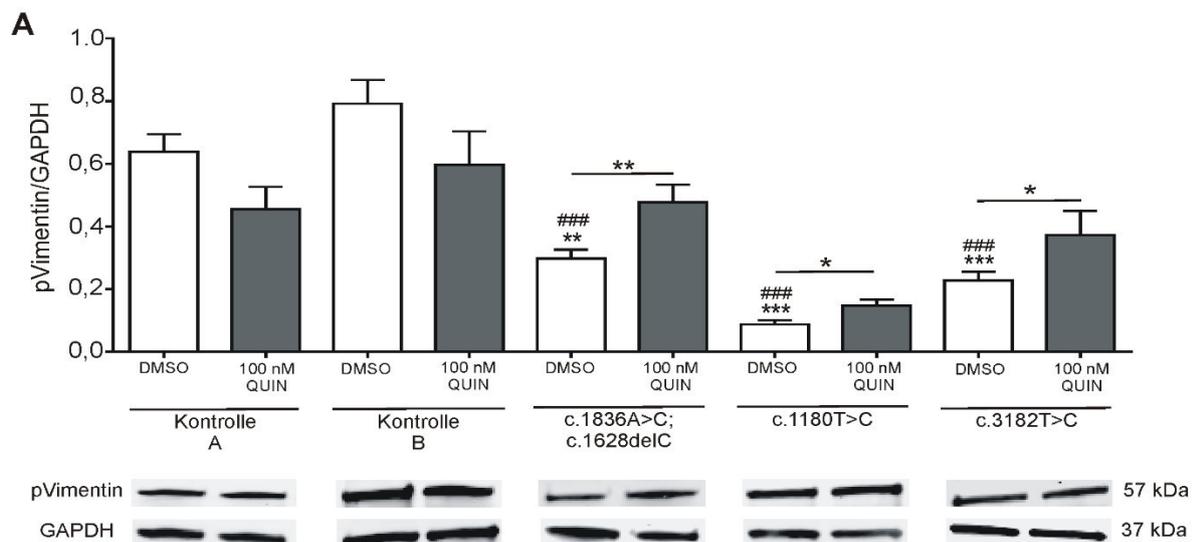
Abbildung 3.19: Analyse der Gliose in Quinolinsäure-behandelnten differenzierten Zellen

Nach der Behandlung der Zellen mit 100 nM Quinolinsäure wurden diese immunzytochemisch gefärbt (A-J). Anschließend erfolgte die Analyse der Kolokalisation von Vimentin (grün) und GFAP (blau) (K; N=3-6, n=36-

67). Die Kolokalisation zeigte dabei, dass die Gliazellen nach Behandlung mit Quinolinsäure deutlich weniger Vimentin exprimierten. Dies konnte sowohl durch die durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl an GFAP- und Vimentin-positiven Zellen (L; N=4-6, n=5-20) als auch von GFAP- und Ki67-positiven Zellen (M; N=4-6, n=6-14) bestätigt werden. Die Analyse zeigte eine signifikante Reduktion von GFAP- und Vimentin-positiven Zellen in allen NPC1-defizienten Zelllinien nach QUIN-Behandlung (L). Die Anzahl an GFAP- und Ki67-positiven Zellen (M) war ebenfalls in allen Quinolinsäure-behandelten NPC1-mutierten Zelllinien signifikant reduziert. Skalierung: 10 μ m. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-defizienten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Quinolinsäure ist ein Glutamat-Rezeptor Agonist, im Besonderen ein Agonist der NMDA-Rezeptoren und wirkt daher exzitatorisch. Durch diese Wirkung kommt es zu einem erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle. Mit Hilfe der Experimente, die in Abbildung 3.19 dargestellt sind, konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Quinolinsäure den gleichen Effekt auf die Gliose zeigt, wie die Behandlung mit PMA. Die Quinolinsäure-Behandlung der NPC1-defizienten Zelllinien führte zu einer verringerten Anzahl an Vimentin-positiven Gliazellen (Abb. 3.19, K, L) sowie proliferierenden (Ki67-positiven) Gliazellen (Abb. 3.19, M). Dieses Ergebnis deutet auf eine Verbesserung der Gliose in NPC1 nach einer Behandlung mit Quinolinsäure hin.

Da die Behandlung mit QUIN eine Verbesserung des Gliose-Phänotyps in NPC1 erzielen konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob durch den erhöhten Calciumeinstrom und die daraus resultierende Aktivierung der PKC auch eine Verbesserung des Intermediärfilament-Phänotyps erzielt werden kann. Dafür wurden die Zellen der einzelnen Zelllinien mit 100 nM Quinolinsäure behandelt und im Anschluss folgte die Bestimmung der phosphorylierten Anteile der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP (Abb. 3.20).



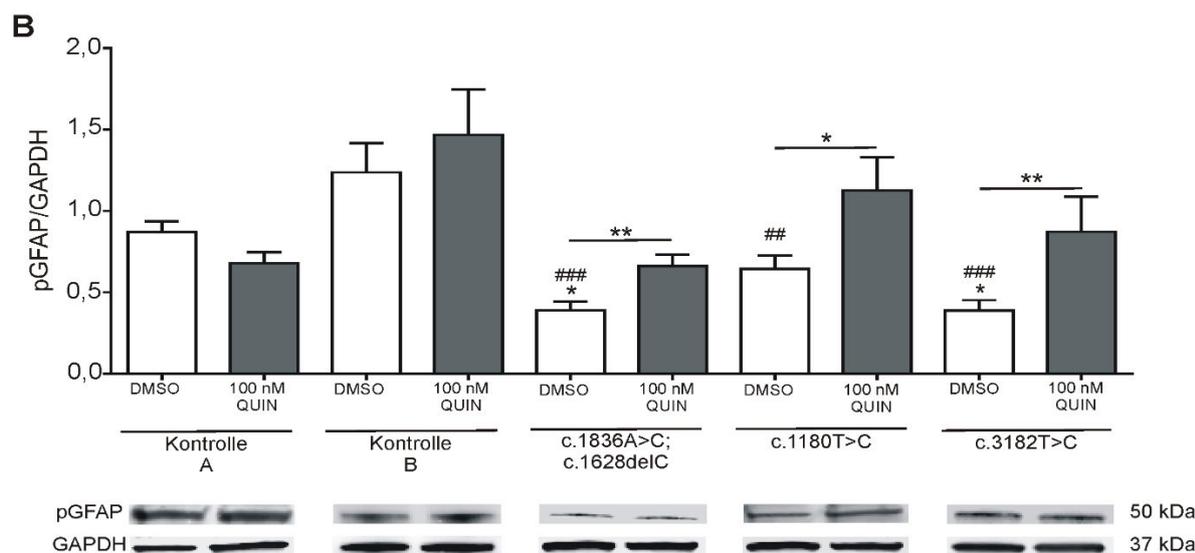


Abbildung 3.20: Phosphorylierung von Vimentin und GFAP in Quinolinsäure behandelten differenzierten Zellen.

Nach Behandlung der neuronal differenzierten Zellen mit 100 nM Quinolinsäure wurden die Fraktion von phosphoryliertem Vimentin (A, pVimentin) und GFAP (B, pGFAP) über semiquantitative Western Blot Analysen bestimmt. Die Behandlung mit QUIN resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Fraktion an phosphoryliertem Vimentin und GFAP in allen NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen (pVimentin: N=5-6, n=17-46; pGFAP: N=5-6, n=17-33). Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierte Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Die Behandlung mit 100 nM Quinolinsäure zeigte eine signifikante Erhöhung der löslichen Intermediärfilament-Fraktion in Zelllinien mit NPC1-Mutation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Somit zeigte die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels über Quinolinsäure eine deutliche Verbesserung der Intermediärfilament-Phänotyps in NPC1, ebenso wie die Aktivierung der PKC über PMA.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Behandlung mit Quinolinsäure und daraus folgend der Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels neben der Verbesserung der Gliose und des Intermediärfilament-Phänotyps auch eine Reduktion der Cholesterollakkumulationen nach sich zieht (Abb. 3.21).

Die Quinolinsäure-Behandlung führte ebenfalls zu einer Verringerung des gesamten Cholesterolgehaltes (Abb. 3.21, A) auf Kontroll-Niveau in NPC1-defizienten Zelllinien. Zur Beurteilung des freien Cholesterols wurde die Filipin-Färbung verwendet, wobei auch dabei eine Senkung des freien Cholesterols nach Quinolinsäure-Behandlung gezeigt werden konnte (Abb. 3.21, L). Für die Zelllinie mit der homozygoten Mutation im *NPC1*-Gen (c.3182T>C) konnte eine signifikante Reduktion der Cholesterolgehaltes auf Kontroll-Niveau nachgewiesen werden.

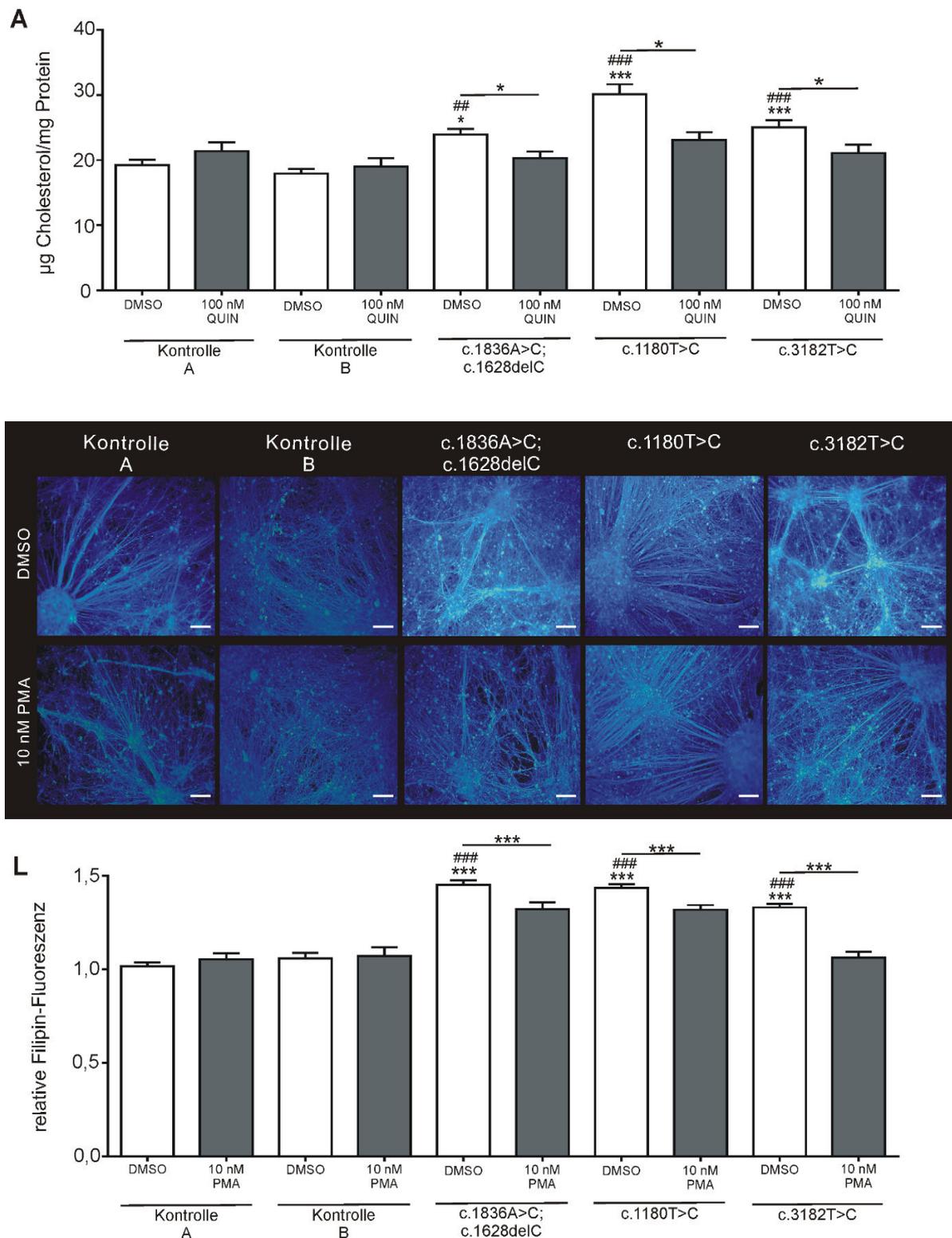


Abbildung 3.21: Cholesterolanalyse von Quinolinsäure-behandelten differenzierten Zellen.

Der Amplex Red Assay wurde zur Quantifizierung des Gesamt-Cholesterolgehaltes in den Zellen verwendet (A; N=5-8, n=6-24). Die Auswertung zeigte dabei eine signifikante Reduktion des Cholesterolgehaltes in allen NPC1-defizienten Zelllinien gegenüber den DMSO-behandelten Kontrollen nach Behandlung mit QUIN. Die charakteristischen Cholesterolakкумуляtionen in den NPC1-defizienten Zelllinien (D-F) zeigten eine deutliche Verbesserung nach QUIN-Behandlung (G-K). Die Bestätigung dieses Effekts erfolgte mittels Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten (L; N=3-6, n=35-71), Skalierung: 50 µm. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der NPC1-mutierten Zelllinien mit Quinolinsäure zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führt. Dies führt zur Aktivierung der PKC und damit zu einer Verbesserung der Gliose in NPC1-defizienten Zelllinien und zu einer Steigerung von phosphoryliertem Vimentin und GFAP sowie zur Senkung des Cholesterolgehalts in den NPC1-defizienten Zelllinien.

3.3 INDUKTION DES GLIOSE- UND INTERMEDIÄRFILAMENT-PHÄNOTYPS ÜBER U18666A

Die Substanz U18666A blockiert die Synthese von Cholesterol sowie den Transport von Cholesterol aus dem späten Endosomen/Lysosomen, wodurch eine Induktion des NPC1-Phänotyps erreicht wird (Cenedella, 2009). Hier wurde U18666A genutzt, um nachweisen zu können, dass die veränderten Intermediärfilament-Strukturen sowie die Gliose durch die Cholesterolakkumulationen in NPC1 bedingt sein könnten. Dafür wurde zuerst der Nachweis erbracht, dass die Behandlung der Kontroll-Zelllinien (A und B) mit U18666A zu einer erhöhten Cholesterolakkumulation führt (Abb. 3.22).

Die Daten in Abbildung 3.22 zeigen, dass die Verwendung von U18666A auch in dem hier verwendeten Zellmodell zu Cholesterolakkumulationen führt. Dies konnte zum einen über die Bestimmung des Cholesterolgehaltes mittels Amplex Red-Assay (Abb. 3.22, A) nachgewiesen werden und zum anderen auch über die Filipin-Färbung des freien Cholesterols (Abb. 3.22, B-E) sowie die Quantifizierung der Filipin-Färbung (Abb. 3.22, F).

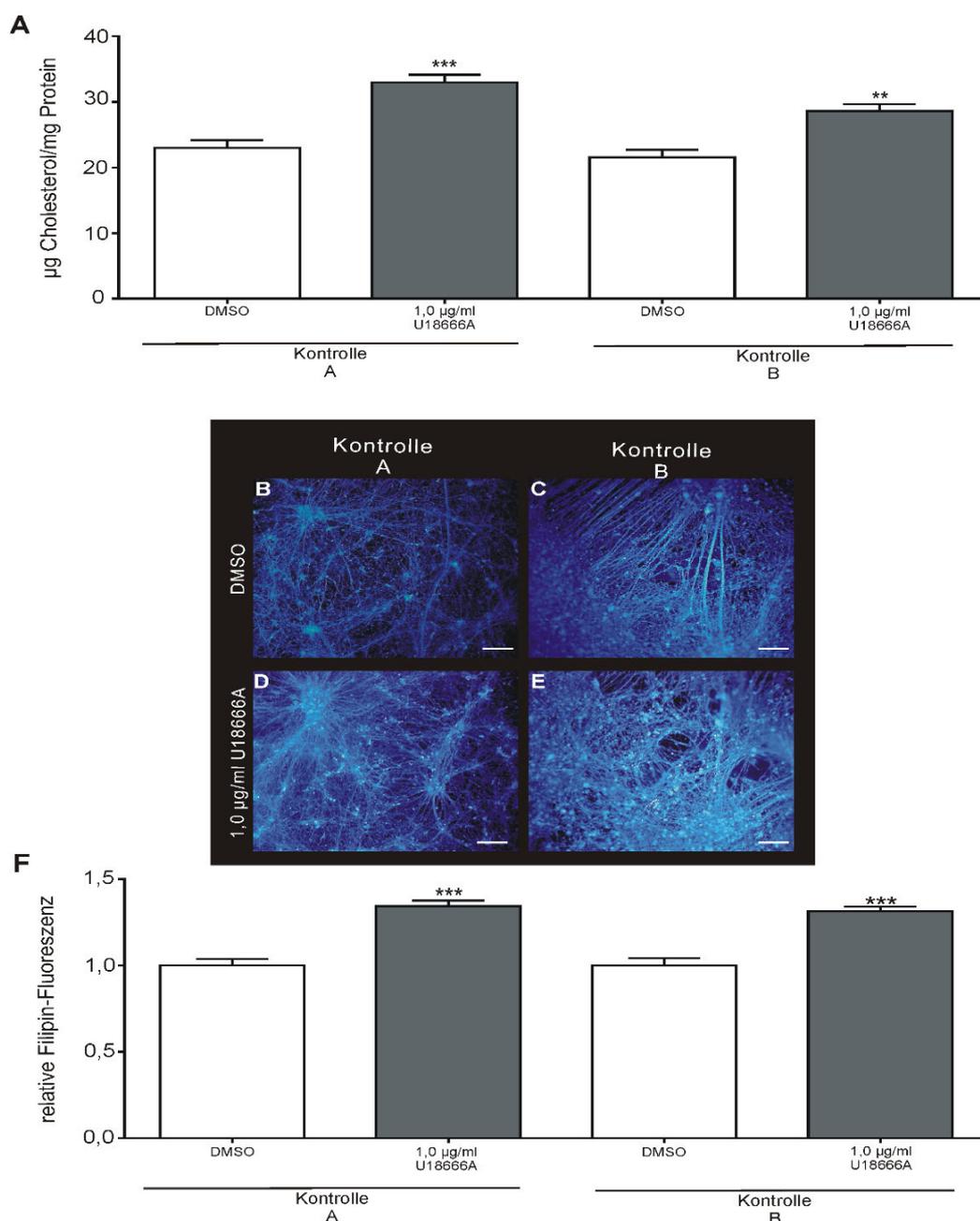


Abbildung 3.22: Analyse des Cholesterolgehaltes in Kontroll-Zelllinien nach U18666A-Behandlung.

Nach Behandlung der Kontroll-Zelllinien mit U18666A wurde zur Quantifizierung des Gesamt-Cholesterolgehaltes in den Zellen der Amplex Red Assay verwendet (A; N=4-8, n=8-25). Die Auswertung zeigte dabei eine signifikante Erhöhung des Cholesterolgehaltes in beiden Kontroll-Zelllinien nach U18666A-Behandlung im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle. Die Filipin-Färbung zeigte die für NPC1 typischen Akkumulationen in den Kontroll-Zellen nach der Behandlung mit 1 µg/ml U18666A (D-E). Der Anstieg der Cholesterolakkumulationen konnte mittels Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten nachgewiesen werden (F; N=4-8, n= 40-82). Skalierung: 50 µm (*: Signifikanz zu DMSO-Kontrolle).

Anschließend wurde überprüft, ob mittels Behandlung mit 1 µg/ml U18666A eine gezielte Induktion der Gliose erzielt werden konnte. Dafür wurden über durchflusszytometrische Analysen die prozentualen Anteile der Gliazellen vor und nach der Behandlung mit U18666A bestimmt (Abb. 3.23).

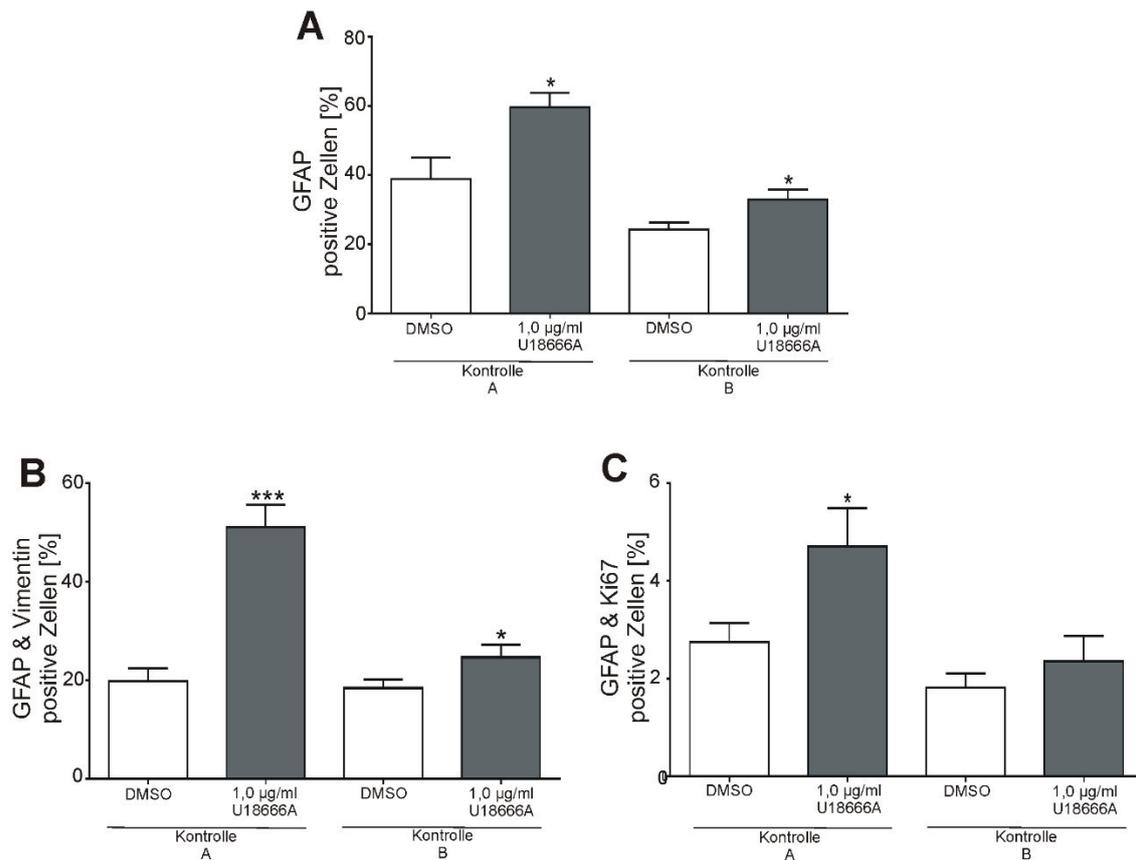


Abbildung 3.23: Bestimmung der glialen Anteile nach Behandlung mit U18666A.

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Anteile der Gliazellen (Marker: GFAP) in den differenzierten Zellen zeigte eine signifikante Erhöhung der Gliazellen in beiden Kontroll-Zelllinien nach Behandlung mit 1 µg/ml U18666A (A; N=4, n=8-16). Als Marker für die Gliose wurde ebenso die Erhöhung von Vimentin in Gliazellen genutzt (B; N=4-12, n=8-25). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Anteile an Vimentin- und GFAP-positiven Zellen nach der Behandlung mit U18666A signifikant erhöht waren. Als weiteres Merkmal für reaktive Gliazellen wurde der Anteil proliferierender Zellen mittels Ki67 überprüft, wobei auch dabei eine signifikante Steigerung der proliferierenden Zellen nach U18666A-Behandlung nachgewiesen wurde (C; N=4, n=6-13). (*: Signifikanz zur DMSO-Kontrolle).

Die Behandlung der Kontroll-Zelllinien mit U18666A zeigte eine signifikante Steigerung der Anzahl an Gliazellen im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollen (Abb. 3.23, A). Ebenfalls konnte eine signifikante Erhöhung an GFAP- und Vimentin-positiven Zellen (Abb. 3.23, B) sowie eine Steigerung der proliferierenden Zellen nach Behandlung mit U18666A festgestellt werden (Abb. 3.23, C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit U18666A zur Induktion der Gliose führt.

Des Weiteren wurde auch der Einfluss von U18666A auf die Fraktionen der Intermediärfilamente untersucht, um nachzuweisen, ob eine erhöhte Cholesterolspeicherung zu Veränderungen in den IF-Fractionen führt (Abb. 3.24).

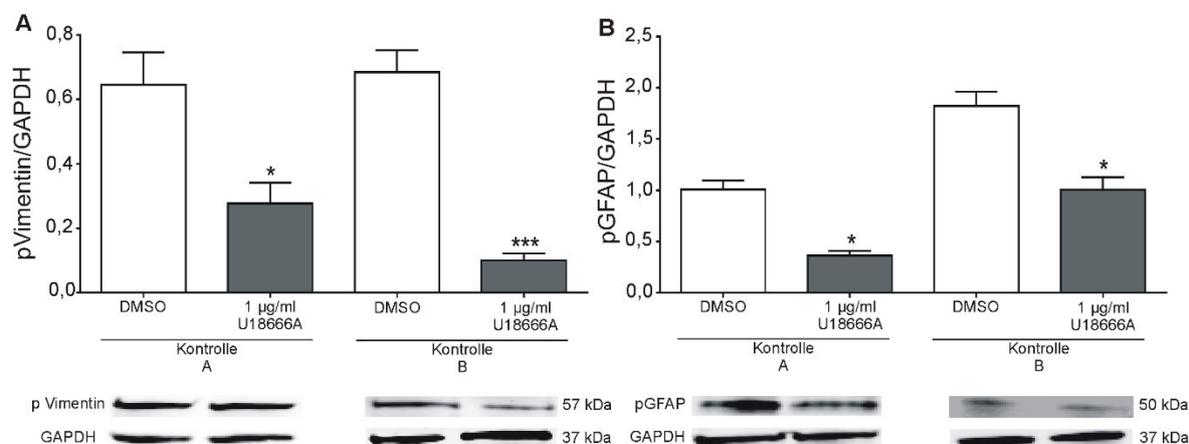


Abbildung 3.24: Bestimmung der Intermediärfilament-Fractionen nach Behandlung der Kontroll-Zelllinien mit U18666A. Die Menge an phosphoryliertem Vimentin (A, pVimentin) und phosphoryliertem GFAP (B, pGFAP) wurde durch semiquantitative Western-Blot-Analyse bestimmt. Die Kontroll-Zelllinien zeigten eine signifikante Hypophosphorylierung der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin nach Behandlung mit 1 µg/ml U18666A. (pVimentin: N=4-16, n=8-36; pGFAP: N=4-17, n=6-45). (*: Signifikanz zur DMSO-Kontrolle)

Die Bestimmung der löslichen Fraktionen der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP mittels semiquantitativen Western Blots zeigte deutlich eine signifikante Verringerung der löslichen, phosphorylierten Anteile von Vimentin und GFAP nach Behandlung der Kontroll-Zelllinien mit U18666A (Abb. 3.24 A, B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Blockierung des Cholesteroltransportes über U18666A, wodurch ein NPC1-Phänotyp induziert wird, zur Speicherung von Cholesterol in späten Endosomen und Lysosomen führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Kontroll-Zelllinien mit U18666A auch zur Induktion der Gliose und der Veränderung der Intermediärfilament-Struktur auf Grund der Hypophosphorylierung von GFAP und Vimentin führt.

3.4 NACHWEIS DES NEURONALEN PHÄNOTYPS IM NPC1-ZELLMODELL

3.4.1 ERHÖHTER VIMENTINANTEIL IN NPC1-DEFIZIENTEN NEURONEN

Während der Untersuchung des Gliose in dem hier verwendeten NPC1-Zellmodell wurde ein erhöhtes Niveau an Gesamt-Vimentin in allen Zelllinien mit NPC1-Mutation im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien festgestellt (Abb. 3.13). Daher wurde neben der Erhöhung des

Vimentingehaltes in Gliazellen in NPC1 ebenfalls die Verteilung des Vimentins in Neuronen untersucht.

Dafür wurden immunzytochemische Färbungen von Vimentin in neuronalen Zellen durchgeführt und anschließend quantitativ ausgewertet (Abb. 3.25).

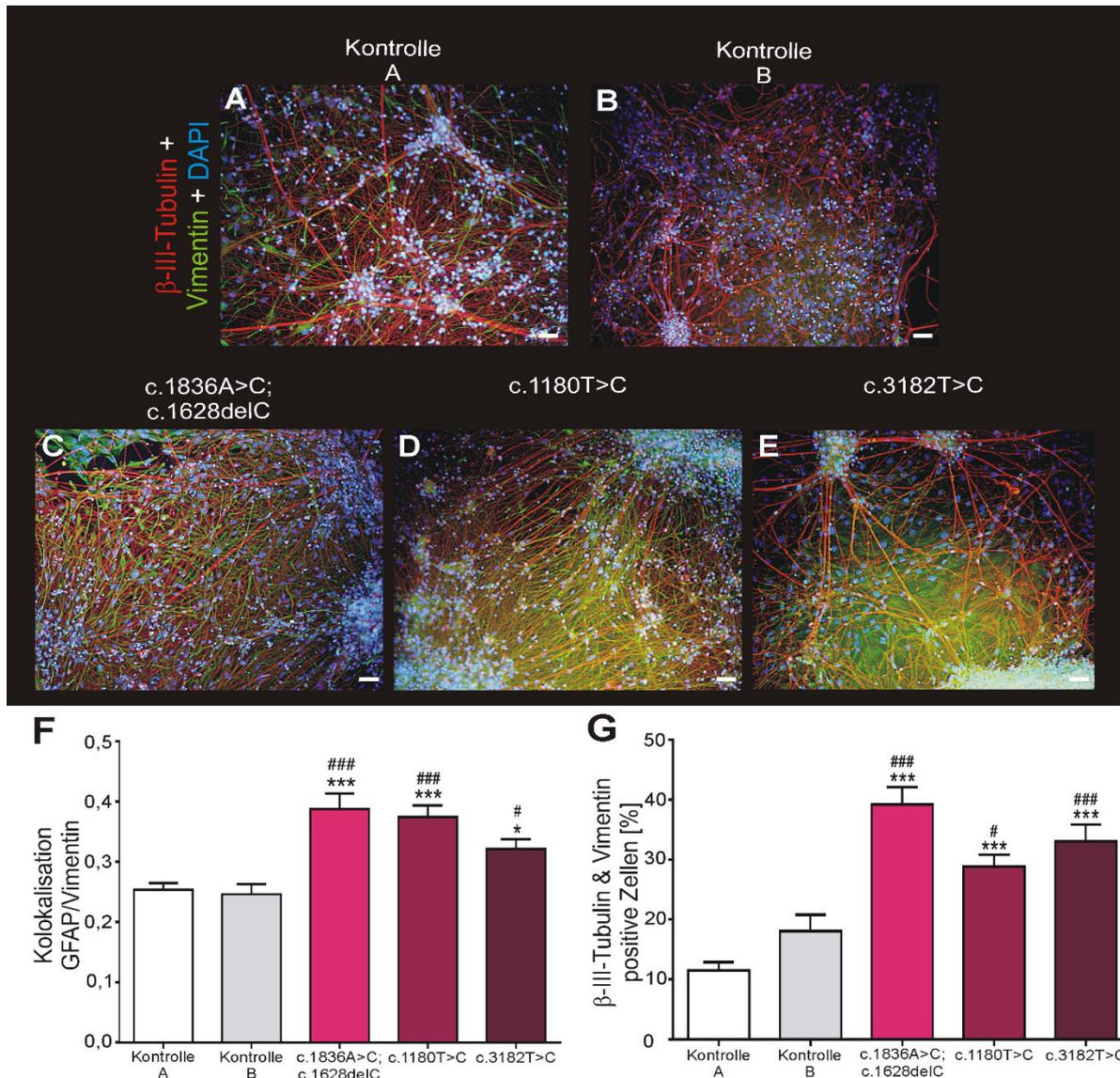


Abbildung 3.25: Nachweis der Erhöhung von Vimentin in NPC1-defizienten Neuronen.

Die immunzytochemische Färbung von Vimentin (blau) und β -III-Tubulin (rot, A-E) zeigte eine erhöhte Anzahl an Vimentin-positiven Neuronen in NPC1-defizienten Zelllinien (C-E). Zur Quantifizierung der Färbungen wurde eine Kolokalisationsanalyse (F, N=3-4, n=35-56) durchgeführt. Die Analyse bestätigte die Annahme, dass Vimentin auch in Neuronen der NPC1-defizienten Zelllinien erhöht ist. Ebenso konnte die durchflusszytometrische Analyse (G; N=7-12, n=14-24) bestätigen, dass in NPC1-mutierten Zelllinien vermehrt Vimentin-positive Neurone vorhanden sind. Skalierung: 50 μ m. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-defizienten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Die immunzytochemische Färbung des Vimentingehaltes in Neuronen ergab eine erhöhte Anzahl an Vimentin-positiven Neuronen in Zelllinien mit NPC1-Mutation (Abb. 3.25, C-E) im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien (Abb. 3.25, A-B). Diese visuelle Annahme konnte mit Hilfe der Kollisationsanalyse (Abb. 3.25, F) bestätigt werden. Diese zeigte eine signifikante Erhöhung der Vimentin-positiven Neuronen in NPC1-defizienten Zelllinien im Kontrast zu den Kontrollen. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls mittels durchflusszytometrischer Analyse bestätigt (Abb. 3.25, G), wobei auch hier eine Erhöhung der Vimentin-positiven Neurone gemessen werden konnte.

3.4.2 NACHWEIS VON GM2-AKKUMULATIONEN IN NPC1-DEFIZIENTEN NEURONEN

Neben Cholesterol akkumuliert auch das Gangliosid GM2 im Morbus Niemann-Pick Typ C. Bei der Untersuchung dieser Akkumulationen konnte festgestellt werden, dass GM2-Akkumulationen spezifisch in Neuronen vorkommen und nicht in Gliazellen. Daher wurden im Folgenden die Akkumulationen des Gangliosides GM2 in Neuronen untersucht, um eine verlässliche Aussage über spezifische Akkumulationen von Lipiden in Neuronen treffen zu können. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GM2 hauptsächlich in Neuronen akkumuliert und nur zu einem sehr geringen Teil in Gliazellen zu finden ist (Abb. 3.26).

Die immunzytochemische Färbung (Abb. 3.26, A-E) und die folgende Kollisationsanalyse von GM2 in Neuronen und Gliazellen zeigte deutlich, dass GM2 vorwiegend in Neuronen akkumuliert und nur zu einem sehr geringen Anteil in Gliazellen vorkommt (Abb. 3.26, F). Dabei zeigte sich auch eine signifikant erhöhte Akkumulation von GM2 in NPC1-defizienten Zelllinien gegenüber den Kontroll-Zelllinien. Wobei auch in Gliazellen eine erhöhte Akkumulation von GM2 im Vergleich zu Kontroll-Zelllinien beobachtet werden konnte.

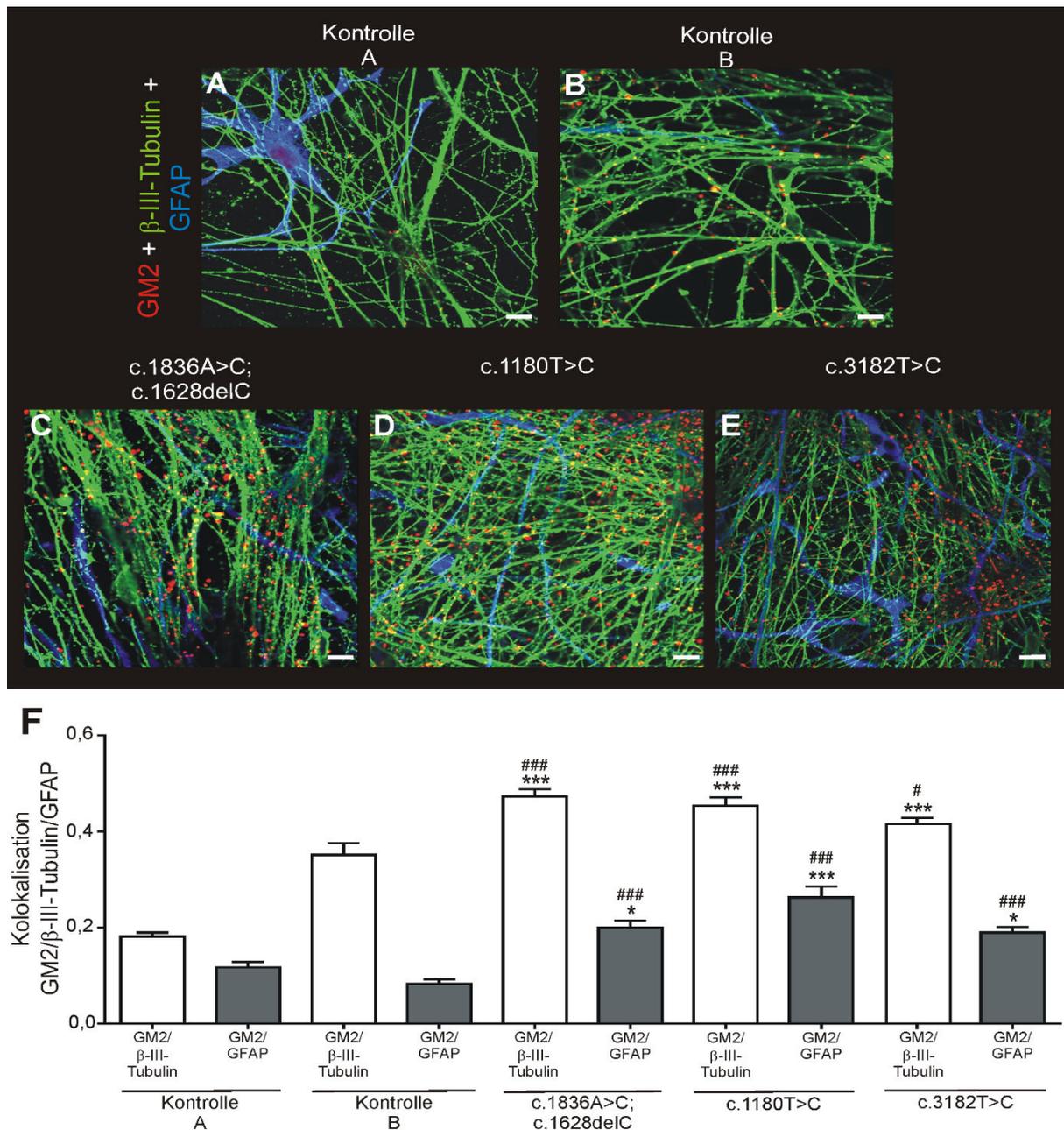


Abbildung 3.26: Akkumulationen des Gangliosids GM2 in NPC1-defizienten Neuronen.

Die immunzytochemische Färbung von β -III-Tubulin (grün), GFAP (blau) und GM2 (rot, A-E) zeigte eine erhöhte Anzahl GM2-positiver Neurone in NPC1-defizienten Zelllinien (C-E). Die Kolokalisationsanalyse (F, N=3-6, n=36-82) zur Quantifizierung der Färbungen bestätigte die Annahme, dass GM2 hauptsächlich in NPC1-Neuronen erhöht ist, wohingegen GM2 in Gliazellen nur in sehr geringem Maße vorkommt. Skalierung: 10 μ m. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob GM2 ebenfalls, wie Cholesterin, in Lysosomen der neuronal differenzierten Zellen akkumuliert. Dafür wurde eine immunzytochemische Färbung von Filipin zum Nachweis von Cholesterin und GM2 durchgeführt und anschließend über die Kolokalisationsanalyse quantitativ untersucht (Abb. 3.27).

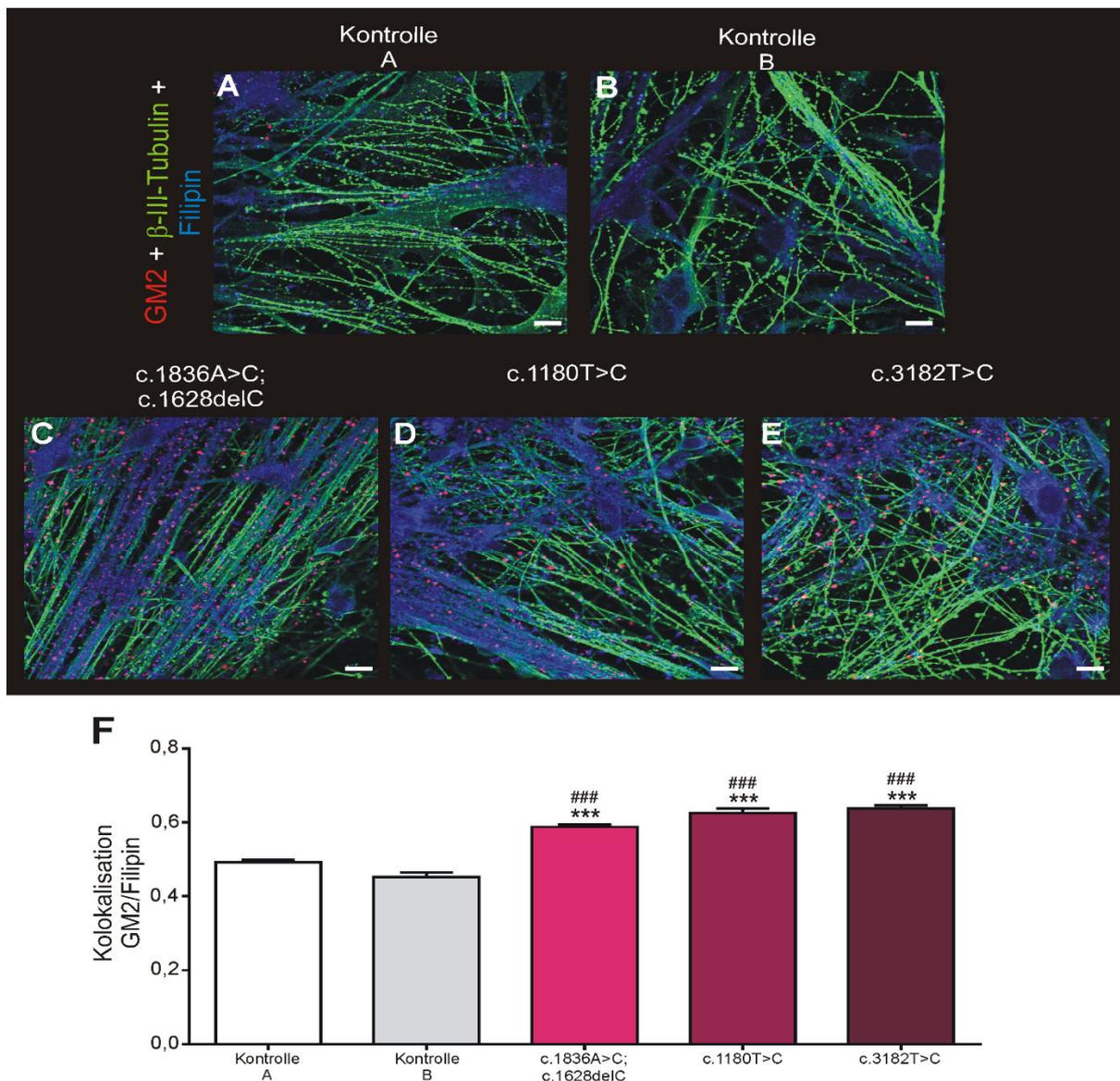


Abbildung 3.27: Kolokalisationsanalyse von Filipin und GM2 in neuronal differenzierten Zellen.

Die immunzytochemische Färbung von Filipin (blau) und GM2 (rot, A-E) zeigte eine Kolokalisation von GM2- und Filipin-positiven Zellen. Die quantitative Analyse der Kolokalisation (F; N= 6-7, n= 66-92) zeigte, dass GM2 mit Filipin kolokalisiert und somit in Lysosomen akkumuliert. Wobei auch eine Erhöhung der Kolokalisation in Zelllinien mit NPC1-Mutation beobachtet werden konnte (C-E; F). Skalierung: 10. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-defizienten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

In Abbildung 3.27 ist die Färbung und die folgende Kolokalisationsanalyse von GM2 und Filipin dargestellt. Diese Experimente zeigten Kolokalisation von GM2 und Filipin und bestätigen somit, dass GM2, ebenso wie Cholesterol, in Lysosomen von NPC1-mutierten Zelllinien akkumuliert

Die erhöhten Vimentinmengen in Neuronen, die hier dargestellt werden konnten, deuten auf eine Hochregulation von Vimentin hin. Vorangegangene Studien zeigten, dass die Hochregulation von Vimentin in Neuronen als Reaktion auf Schäden im Gehirn eingeleitet wird

(Levin, 2009). Daher wurde im Folgenden näher untersucht, welchen Einfluss Vimentin auf die Neurone in NPC1 hat und ob eine Verringerung des Vimentins in NPC1-Neuronen zur Verbesserung des NPC1-Phänotyps führt. Der Gehalt von Vimentin in NPC1-defizienten Neuronen sowie die Menge an GM2 in diesen wurde dabei als Maßstab für das Ausmaß des NPC1-Phänotyps genutzt.

3.4.3 VERBESSERUNG DES NEURONALEN PHÄNOTYPS ÜBER DIE AKTIVIERUNG DER PKC MITTELS PMA

Im Folgenden wurden die neuronalen Zellen mit den bereits getesteten effektiven Substanzen PMA und Quinolinsäure behandelt und anhand des Vimentin- und GM2-Gehaltes in Neuronen die Effektivität der Behandlung auf den neuronalen Phänotyp in NPC1 beurteilt.

Dafür wurden die Zellen der unterschiedlichen Zelllinien mit 10 nM PMA behandelt und anschließend über Kolokalisationsanalysen und Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 3.28).

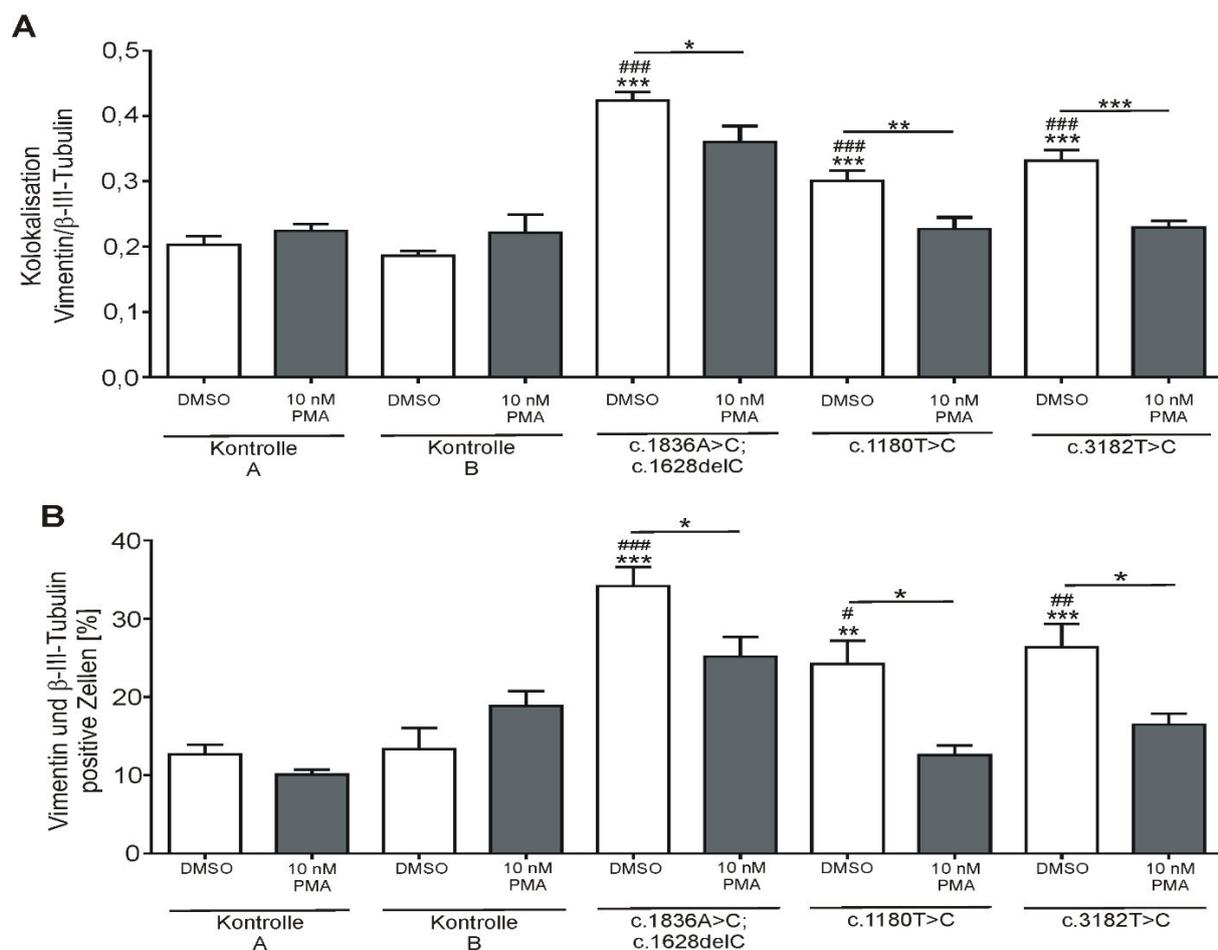


Abbildung 3.28: Analyse der Vimentin-positiven Neurone nach PMA-Behandlung.

Die neuronalen Zellen wurden mit 10 nM PMA behandelt. Anschließend wurde die Kolokalisation (A; N=3-6, n=31-61; Bilder: Abb. 3.14) berechnet und die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert (B; N=3-8, n=5-16). Dabei zeigte sich, dass die Menge an Vimentin-positiven Zellen nach Behandlung mit PMA in allen Zelllinien

mit NPC1-Mutation deutlich gesunken war. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-defizienten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Die Behandlung mit PMA zeigte in Abbildung 3.28 eine deutliche Verringerung der Vimentin-positiven Neurone in NPC1-mutierten Zelllinien im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen sowohl in der Kolokalisationsanalyse (Abb. 3.28, A; Bilder: Abb. 3.14) als auch in der Analyse der Durchflusszytometrie (Abb. 3.28, B). In den Zelllinien mit homozygoten Mutationen im *NPC1*-Gen (c.1180T>C und c3182T>C) konnte sogar eine signifikante Reduktion der Vimentin-positiven Neurone auf Kontroll-Niveau nachgewiesen werden.

Neben dem Gehalt an Vimentin wurde auch der GM2-Gehalt in den NPC1-defizienten Neuronen nach Behandlung mit PMA analysiert. Dafür wurde eine Kolokalisationsanalyse der immunzytochemischen Färbungen von GM2 und β -III-Tubulin durchgeführt (Abb. 3.29).

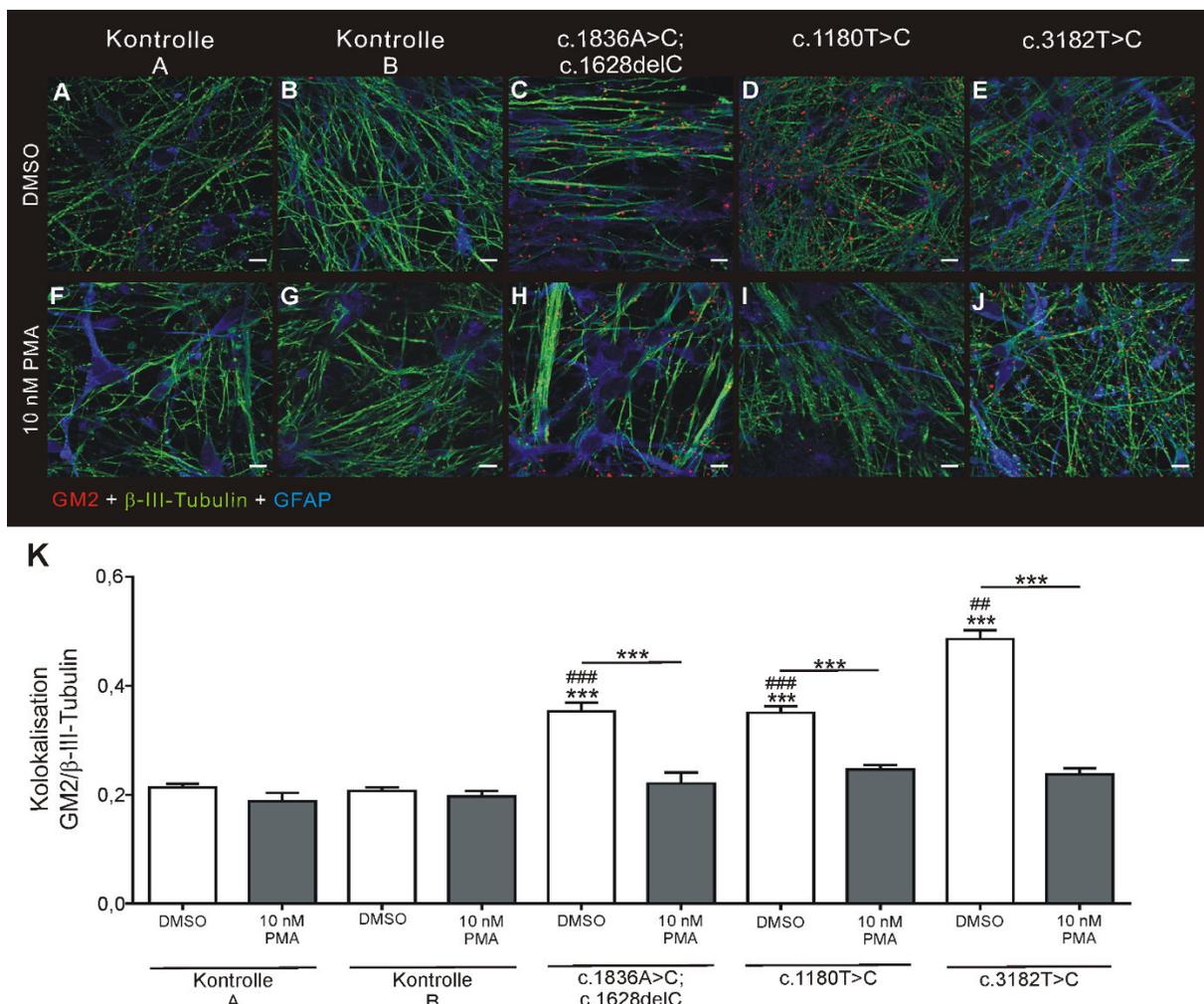


Abbildung 3.29: Analyse der GM2-positiven Neurone nach PMA-Behandlung.

Nach der Behandlung der neuronalen Zellen mit 10 nM PMA erfolgte die immunzytochemische Färbung (A-J) und die Kolokalisation von GM2 (rot) und β -III-Tubulin (grün) wurde bestimmt (K, N=3-6, n=29-66). Dabei zeigte sich, dass die Menge an GM2-positiven Neuronen nach Behandlung mit PMA in allen Zelllinien mit NPC1-

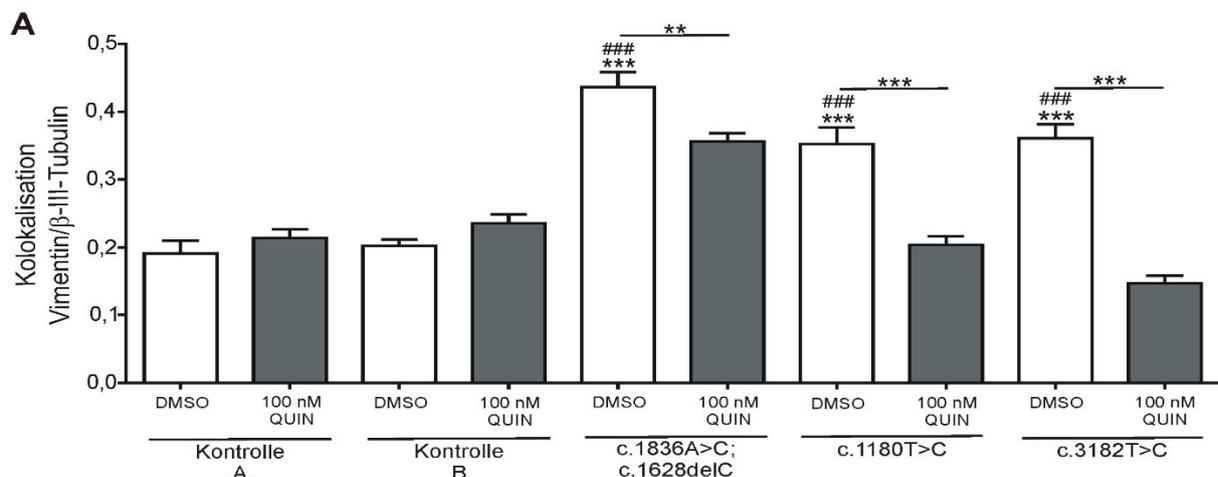
Mutation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle deutlich gesunken ist. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-defizienten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

In Abbildung 3.29 konnte gezeigt werden, dass die Menge an GM2 in Neuronen mit NPC1-Mutation nach Behandlung mit PMA signifikant abgenommen hat. Die Werte der Kolo-kalisation sanken auf Grund der PMA-Behandlung in allen NPC1-defizienten Zelllinien auf Kontroll-Niveau.

Die Analysen der neuronal differenzierten Zellen nach der PMA-Behandlung zeigten eine Verbesserung des neuronalen NPC1-Phänotyps. Die Behandlung mit PMA führte dabei zur Senkung des Vimentin- und GM2-Gehaltes in Neuronen, wodurch eine Verbesserung des neuronalen Phänotyps erzielt werden konnte. Daneben konnte, wie bereits in 3.2.4 beschrieben, eine Erhöhung der löslichen Vimentinfraktion wie auch eine Senkung des Cholesterolgehaltes in den neuronal differenzierten Zellen nach PMA-Behandlung beschrieben werden.

3.4.4 VERBESSERUNG DES NEURONALEN PHÄNOTYPS ÜBER DIE ERHÖHUNG DES INTRAZELLULÄREN CALCIUMSPIEGELS MITTELS QUINOLINSÄURE

Auf Grund der verringerten Glutamat-induzierten Calciumeinströme, die in Abbildung 3.18 dargestellt sind, stellte sich im Folgenden die Frage, ob der neuronale Phänotyp ebenfalls durch eine Behandlung mit Quinolinsäure und somit die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels verbessert werden kann. Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurde die Anzahl an Vimentin- und GM2-positiven Neuronen nach Behandlung mit Quinolinsäure mittels Kolo-kalisationsanalyse und Durchflusszytometrie (Abb. 3.30) bestimmt.



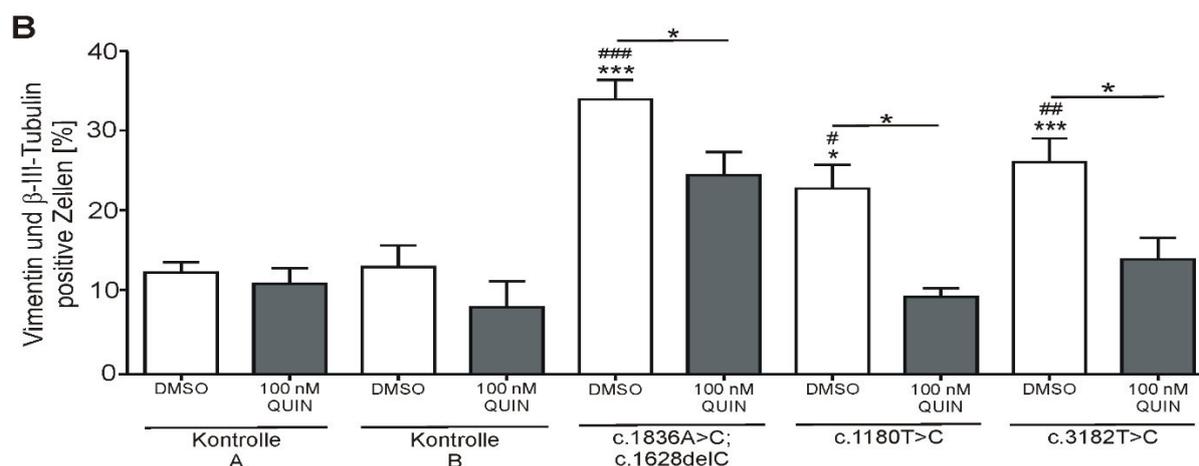


Abbildung 3.30: Senkung der Vimentin-positiven Neuronen in NPC1-defizienten Zelllinien nach QUIN-Behandlung. Die neuronalen Zellen wurden mit 100 nM Quinolinsäure behandelt. Anschließend wurde die Kolokalisation von Vimentin und β -III-Tubulin untersucht (A; N=3-6, n=36-72; Bilder: siehe Abb. 3.19) sowie eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt (B; N=3-6, n=6-16). Die Analysen zeigten, dass die Menge an Vimentin-positiven Zellen nach Behandlung mit Quinolinsäure in allen Zelllinien mit NPC1-Mutation deutlich gesunken war. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-mutierten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Die in Abbildung 3.30 dargestellten Experimente zeigten die Menge an Vimentin-positiven Neuronen nach Behandlung der Zellen mit 100 nM Quinolinsäure. Nach dieser Behandlung konnte eine Verringerung der Vimentin-positiven Neurone in NPC1 über die Kolokalisationsanalyse (Abb. 3.30, A; Bilder: siehe Abb. 3.19) und die Durchflusszytometrie (Abb. 3.30, B) nachgewiesen werden. In den Zelllinien mit homozygoten Mutationen im *NPC1*-Gen (c.1180T>C und c3182T>C) konnte sogar eine signifikante Reduktion der Vimentin-positiven Neurone auf Kontroll-Niveau nach QUIN-Behandlung nachgewiesen werden.

Im Folgenden sollte neben der Analyse des Vimentingehaltes in NPC1-defizienten Neuronen auch der Gehalt an GM2 nach Behandlung mit Quinolinsäure untersucht werden (Abb. 3.31). Die Analyse der GM2-positiven Neurone in Abbildung 3.31 zeigte, dass der Anteil an GM2 in den Neuronen aus Zelllinien mit NPC1-Mutation nach der Behandlung mit Quinolinsäure deutlich gesunken ist. Die Quinolinsäure-Behandlung wirkte sich somit positiv auf den Gehalt an GM2-positiven Neuronen aus. Die Zelllinien mit NPC1-Mutation zeigten dabei eine signifikante Reduktion der GM2-positiven Neurone, wenn auch nicht das Niveau der Kontroll-Zelllinien erreicht werden konnte.

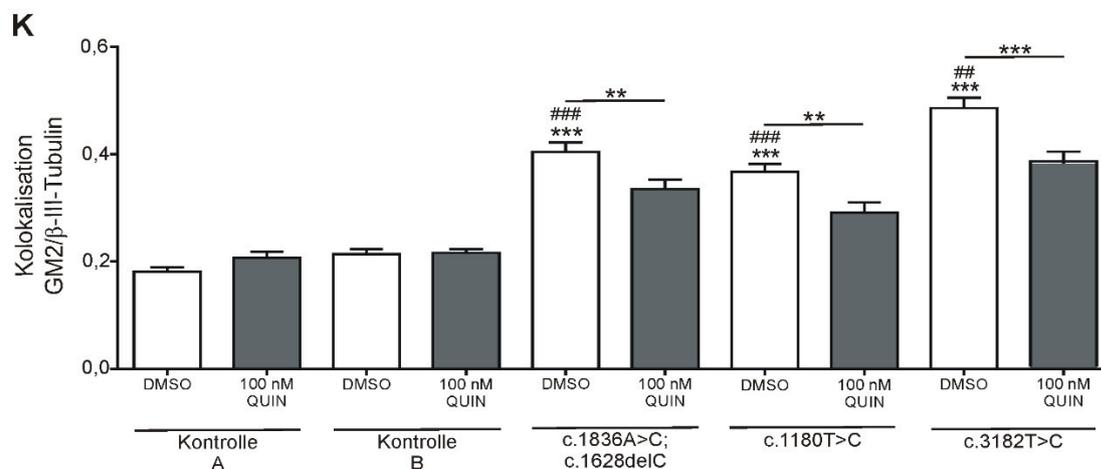
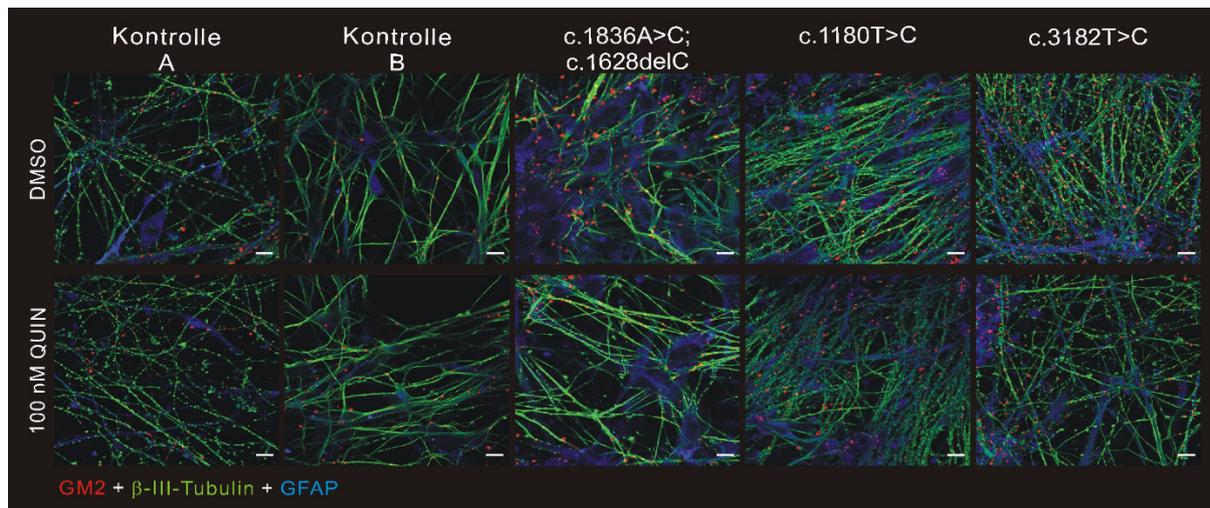


Abbildung 3.31: Analyse der GM2-positiven Neurone nach QUIN-Behandlung.

Die Zellen wurden mit 100 nM QUIN behandelt und anschließend immunzytochemisch gefärbt. Die Kolokalisationsanalyse (K, N=3-6, n=29-66) von GM2 (rot) und β-III-Tubulin (grün) ergab eine verringerte Menge an GM2-positiven Neuronen in allen Zelllinien mit NPC1-Mutation nach Behandlung mit PMA. Die Signifikanzen über den Balken der NPC1-defizienten Zelllinien wurden wie folgt dargestellt: #: Signifikanz zu Kontrolle A, *: Signifikanz zu Kontrolle B.

Die Analyse der Effektivität der Quinolinsäure-Behandlung zeigte eine deutliche Wirkung auf den neuronalen Phänotyp hinsichtlich der Vimentin-positiven als auch der GM2-positiven Neuronen. Auch konnte in Abschnitt 3.2.5 dargestellt werden, dass die Behandlung der neuronal differenzierten Zellen zur Verbesserung der Gliose und zu Verringerungen von Cholesterollakkumulationen führt. Dieser Effekt konnte auch schon für PMA beschrieben werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels durch Quinolinsäure ebenso zur Verbesserung des NPC1-Phänotyps beiträgt wie die Erhöhung der PKC-Aktivität durch PMA. Beide Behandlungen zeigten eine deutliche Verbesserung des NPC1-Phänotyps und sind somit für weitere Experimente im Hinblick auf mögliche Therapiemaßnahmen für NPC1-Patienten geeignet.

4. DISKUSSION

4.1 GENERIERUNG NEUER IPS-ZELLINIEN UND DIFFERENZIERUNG IN NEURONALE ZELLINIEN

4.1.1 VERGLEICHBARKEIT DER GENERIERTEN IPS- UND NEURONALEN ZELLINIEN MIT ANDEREN ZELLMODELLEN

In den Jahren 2006 bis 2008 wurden enorme Fortschritte auf dem Gebiet der iPS-Zellen gemacht (Park et al., 2008b; Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). Im Folgenden wurde die Reprogrammierung von iPS-Zellen allgemein zugänglich und es entstanden viele Krankheitsmodelle (Park et al., 2008a). Die Vorteile, induzierte pluripotente Stammzellen als Krankheitsmodelle zu nutzen, liegen zum einen in dem nahezu unlimitierten Wachstum und somit in einer großen Menge zur Verfügung stehender Zellen, vor allem krankheitsspezifischer Zelltypen. Zum anderen in der Pluripotenz der Stammzellen, in jede Zelle zu differenzieren. Somit bieten iPS-Zellen eine potentielle Quelle für zelltherapeutische Anwendungen und personalisierte Therapien in der Klinik sowie für die Erforschung der zu Grunde liegenden Mechanismen und der Medikamentenentwicklung. Dabei muss allerdings besonderer Wert auf eine genaue Charakterisierung des pluripotenten Status der Zellen gelegt werden, um Variabilitäten innerhalb von Zelllinien und iPS-Klonen zu vermeiden (Vitale et al., 2012). Um Variabilitäten innerhalb von Zelllinien und iPS-Klonen ausschließen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine standardisierte Methode zur Reprogrammierung von iPS-Zellen etabliert (Trilck et al., 2017, 2016, 2013). Diese Methode wurde für alle hier hergestellten Zelllinien strikt eingehalten. Des Weiteren wurden die Zelllinien nach erfolgreicher Expansion grundlegend charakterisiert, sodass Unterschiede auf Grund von verschiedenen Pluripotenzstadien ausgeschlossen werden können (Maherali and Hochedlinger, 2008; Vitale et al., 2012). Zu diesen minimalen Anforderungen nach Maherali & Hochedlinger (2008) gehören das Karyogramm (siehe Abb. 3.2), der Nachweis von Pluripotenzmarkern (Oct4, Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA3, SSEA4 und Nanog; siehe Abb. 3.3) sowie der Nachweis von Zelltypen der drei Keimblätter, was hier über den „Embryoid Body Assay“ durchgeführt wurde (siehe Abb. 3.4). Da alle generierten Zelllinien diesen Anforderungen entsprachen, kann von einer sehr geringen Variabilität innerhalb der Zelllinien und Klone ausgegangen werden (Vitale et al., 2012).

Bei der Verwendung von neuronal differenzierten Zellen sollte beachtet werden, dass diese auch nach langer Differenzierungszeit keinen adulten Status aufweisen, sondern eher mit embryonalen Zellen vergleichbar sind (Robinton and Daley, 2012; Srikanth and Young-Pearse,

2015). Die hier verwendeten iPS-Zelllinien wurden zu neuronalen Progenitorzellen und anschließend über sechs Wochen zu neuronal differenzierten Zellen differenziert. Diese neuronal differenzierten Zellen wurden im Folgenden elektrophysiologisch charakterisiert und zeigten sowohl Spannungsabhängige Ionenkanäle, Aktionspotenziale sowie spontane postsynaptische Ströme, die auf die Ausbildung eines reifen synaptischen Netzwerks schließen lassen (Peter et al., 2017b). Diese Charakteristika weisen auf reife Neurone hin. Dennoch wurde ein niedrigeres Membranpotential in allen Zelllinien gefunden, was auf noch nicht vollständig ausgereifte Neurone schließen lässt (Rabenstein et al., 2017). Das Vorhandensein nicht vollständig ausgereifter Neurone wurde mehrfach in iPS-basierten neurodegenerativen Zellmodellen beschrieben, wie in Srikanth & Young-Pearse zusammengefasst (Srikanth and Young-Pearse, 2015). Das Fehlen von vollständig ausgereiften Neuronen stellt dabei einen Nachteil der iPS-Zellmodelle dar, vor allem im Hinblick auf die Verwendung in Krankheiten mit spät einsetzenden Symptomen wie Morbus Parkinson (ca. 60 Jahre) und Morbus Alzheimer (ca. 65 Jahre) (Srikanth and Young-Pearse, 2015). Auch zur Nutzung im Morbus Niemann-Pick Typ C sollte diese Tatsache bedacht werden, da einige Patienten ein sehr frühes Einsetzen der klinischen Symptome zeigen, im Alter von wenigen Monaten, aber die prävalente Mutation erst im juvenilen Alter auftritt (Vanier, 2010). Dennoch ist es möglich, mit Hilfe der iPS-zellbasierten neuronalen Modelle zelluläre Phänotypen zu untersuchen, die noch vor Eintreten der klinischen Symptome erkennbar sind. Auf Grund der Unreife der neuronalen Zellen, die aus iPS-Zellen differenziert wurden, wird aktuell an Möglichkeiten geforscht, eine Reifung bzw. Alterung der Neurone zu erzielen. Dafür werden differenzierte Neurone unter anderem in Gehirne von Versuchstieren implantiert, um eine natürliche Umgebung zu schaffen (Srikanth and Young-Pearse, 2015). Des Weiteren wurde auch eine Überexpression des Proteins Progerin, das an der vorzeitigen Alterung beteiligt ist, untersucht. Dabei konnten im Morbus Parkinson, nach Überexpression von Progerin, spezifische spät einsetzende Phänotypen beschrieben werden, die vorher auf Grund der nicht-ausgereiften Neurone nicht beobachtet werden konnten (Miller et al., 2013).

Ein Vorteil des hier verwendete NPC1-Zellmodells, das auf patientenspezifischen iPS-Zellen und daraus differenzierten neuronalen Zellen basiert, sind die typischen NPC1-Krankheitsmerkmale, die nachgewiesen werden konnten. Dazu gehören Cholesterol- und GM2-Akkumulationen (Trilck et al., 2017, 2016, 2013), was auch mit anderen iPS-basierten NPC-Zellmodellen übereinstimmt (Efthymiou et al., 2013; Maetzel et al., 2014; Soga et al., 2015; Yu et al., 2014).

4.1.2 UNTERSUCHUNG VERSCHIEDENER NPC-ZELLINIEN

Genotyp-Phänotyp-Korrelationen, wie sie für andere lysosomale Speichererkrankungen, wie Morbus Gaucher (Whitfield et al., 2002) und Morbus Pompe (Kroos et al., 2012) beschrieben wurden, konnten bisher für Morbus Niemann-Pick Typ C, trotz einiger Hinweise, nicht belegt werden (Millat et al., 2001b; Yamamoto et al., 2000). Gerade da noch keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation bekannt ist, war es notwendig, verschiedene Mutationen des *NPC1*-Gens und deren phänotypische Auswirkungen in diesem neuronalen Zellmodell zu untersuchen. Dabei war es von entscheidender Bedeutung, die Auswirkungen der einzelnen Mutationen auf den zellulären neuronalen Phänotyp in NPC1 zu betrachten.

Die verschiedenen Mutationen, die in dieser Arbeit genutzt wurden, liegen in unterschiedlichen Bereichen des NPC1-Proteins. Die Mutation der kombinierten heterozygoten Mutante (c.1836A>C; c.1628delC; p.E612D;P543Rfs20*) befindet sich in der Sterol-sensitiven-Domäne des NPC1-Proteins. Mutationen in der Sterol-sensitiven-Domäne führen zu einem kompletten Verlust des funktionalen NPC1-Proteins, ebenso wie die Deletion, die zu einer vorzeitigen Termination des NPC1-Proteins führt (Vanier and Millat, 2003). Diese Mutationen führen dabei zu einem frühkindlichen systemischen Einsetzen der Krankheit (Park et al., 2003; Sun et al., 2001). Die homozygote Mutation c.1180T>C (p.Y395H) befindet sich, im NPC1-Protein gelegen, in direkter Nähe zur Sterol-sensitiven-Domäne und könnte diese somit beeinflussen. Auf Grund des Aminosäureaustausches von Tyrosin zu Histidin lässt sich vermuten, dass es trotz der Ähnlichkeit der Aminosäuren zu Fehlfaltungen in der Sekundärstruktur des NPC1-Proteins kommt. Diese Fehlfaltungen würden einen Abbau des fehlgefalteten Proteins über die endoplasmatische-Retikulum-assoziierte Degradation und das Ubiquitin-Proteasom-System (Nakasone et al., 2014) nach sich ziehen, wodurch weniger funktionales Protein in der Zelle vorhanden wäre. Da diese Mutation erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde, lässt sich bisher noch keine generelle Aussage über das Eintreten der Krankheitssymptome treffen (Trilck et al., 2017).

Die dritte hier genutzte NPC1-Mutation ist die prävalente Mutation des *NPC1*-Gens, c.3182T>C (p.I1061T). Diese Mutation in der Cystein-reichen-Domäne (Millat et al., 2001b) des NPC1-Proteins führt im Allgemeinen zu einem variablen klinischen und biochemischen Phänotyp (Vanier and Millat, 2003). Homoallelisch führt die Mutation zu einem frühen systemischen Einsetzen der Krankheit, wobei die ersten neurologischen Symptome im kindlichen oder im adoleszenten Stadium der Entwicklung auftreten können (Imrie et al., 2015). Auch diese Punktmutation führt zu einer Fehlfaltung des NPC1-Proteins und zum proteasomalen Abbau des mutierten Proteins (Gelsthorpe et al., 2008; Praggastis et al., 2015).

Als typisches diagnostisches Merkmal, konnten in der prävalenten Mutation (c.3182T>C) Cholesterolakkumulationen in Patienten-Fibroblasten nachgewiesen werden (Ohgane et al., 2014). Auch in den auf iPS-Zellen basierten neuronal differenzierten Zellen aller drei mutierten NPC1-Zelllinien konnten diese Akkumulationen von Cholesterol nachgewiesen werden (Trilck et al., 2017). Neben den Cholesterolakkumulationen kommt es bei einer Fehlfunktion des NPC1-Proteins auch zur Akkumulation von weiteren Lipiden, wie etwa Sphingomyelin, Glykolipide, sowie auch Sphingosine und Sphinganine. Dazu zählt auch das Glykosphingolipid bzw. Gangliosid GM2 (Vanier, 2010), was ebenfalls in dem hier verwendeten humanen neuronalen Zellmodell akkumulierte (Trilck et al., 2017).

Im Allgemeinen sind die drei untersuchten Mutationen des *NPC1*-Gens (c.1836A>C; c.1628delC; c.1180T>C und c.3182T>C) in Bezug auf den hier beschriebenen zellulären Phänotypen sehr ähnlich. Das betrifft sowohl die Cholesterol- (Abb. 3.17 und Abb. 3.21) als auch die GM2-Akkumulationen (Abb. 3.26), die verringerte Menge an phosphorylierten Intermediärfilamenten (Abb. 3.14), die Erhöhung der reaktiven Gliazellen in der Gliose (Abb. 3.11) sowie die vermehrte Vimentinexpression in Neuronen (Abb. 3.25). Dabei wiesen alle NPC1-defizienten Zelllinien die gleiche Tendenz in Bezug auf die beschriebenen Phänotypen auf. Auch die Responsivität der einzelnen NPC1-mutierten Zelllinien auf die Behandlung mit PMA (Abb. 3.15, 3.16, 3.28 und 3.2) oder Quinolinsäure (Abb. 3.19, 3.20, 3.30 und 3.31) war in der Tendenz gleich. In den Neuronen hingegen waren leicht erhöhte Vimentinwerte für die kombiniert heterozygote Mutante nachweisbar (Abb. 3.25). Dabei konnte auch die Behandlung mit PMA und Quinolinsäure den Anteil an Vimentin-positiven Neuronen in den Zelllinien mit den homozygoten Punktmutationen (c.1180T>C und c.3182T>C) stärker in Richtung Kontroll-Niveau reduzieren (siehe Abb. 3.28 und 3.30). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es bei der kombinierten heterozygoten Mutante auf dem einen Allel zu einem vorzeitigen Strangabbruch kommt und somit ein schwerwiegenderer Phänotyp verzeichnet werden kann. Im Allgemeinen wurden auf Grund der klinischen Daten für die homozygoten Punktmutationen (c.1180T>C und c.3182T>C) mildere Phänotypen erwartet. Allerdings konnte diese Annahme mit den hier untersuchten phänotypischen Merkmalen der NPC-Erkrankung nicht bestätigt werden, da sich alle Mutationen ähnlich verhielten und keine eindeutigen reproduzierbaren Unterschiede zwischen den Mutationen beschrieben werden konnten.

Mutationen im *NPC2*-Gen treten nur in 5 % aller NPC-Erkrankungen auf (Vanier, 2010). Bisher sind nur wenige Fälle von NPC2 bekannt, wobei für die beschriebenen Mutationen eine Phänotyp-Genotyp-Korrelation bekannt ist, im Gegensatz zum NPC1-Protein. Bei den meisten Niemann-Pick Typ C Erkrankungen mit Mutationen im *NPC2*-Gen treten die ersten Symptome

neonatal auf, wobei es zur Ausprägung eines schweren Phänotyps kommt, der häufig letal ist. Dabei treten überwiegend respiratorische und hepatische Manifestationen, sowie schwerwiegende neurologische Symptome auf. Die am häufigsten auftretenden Mutationen sind Nonsense-Mutationen oder Verschiebungen des Leserrasters sowie die Mutation p.E20X (Millat et al., 2001a; Vanier and Millat, 2003). Die Mutation, p.E20X, wurde auch in dieser Arbeit für die Reprogrammierung von Patienten-Fibroblasten mit der kombinierten heterozygoten Mutation c.58G>A;c.140G>T (p.E20X;C47F) in iPS-Zellen genutzt. Diese Mutationen führen zu einer frühen Termination sowie einer Missense-Mutation. Auf Grund der frühen Termination kommt es zu einer schwerwiegenden Ausprägung der Krankheit mit letalen Auswirkungen, sowohl in der kombinierten heterozygoten als auch in der homozygoten Ausprägung des Allels. Auch konnte für das NPC2-Protein eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation beschrieben werden (Millat et al., 2001a), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die hier produzierte NPC2-Zelllinie ebenfalls einen schwerwiegenden Phänotyp aufweist. In der Charakterisierung der generierten NPC2-iPS-Zelllinien (Abb. 3.3, 3.4 und 3.6) und den daraus differenzierten neuronalen Zellen (Abb. 3.7) konnten keine Unterschiede zwischen der generierten NPC1-defizienten Zelllinie mit der Mutation c.3182T>C und der NPC2-defizienten Zelllinie (c.58G>A;c.140G>T) festgestellt werden. Trotz der Erwartung des schwerwiegenden Phänotyps konnten in der hier generierten NPC2-Zelllinie keine phänotypischen Unterschiede zur ebenfalls generierten homozygoten NPC1-Mutante (c.3182T>C), die vom klinischen Phänotyp als milder beschrieben wird, beobachtet werden. In Abbildung 3.7 sind keine morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen und auch die geringfügig höhere Anzahl an Gliazellen in der NPC2-Zelllinie zeigt keinen Unterscheid zur NPC1-Zelllinie. Dies konnte ebenso in der Filipin-Färbung beobachtet werden (Abb. 3.9). Somit konnte auch diese Annahme, dass die NPC2-defiziente Zelllinie mit der schwerwiegenden Mutation auch einen schwerwiegenderen Phänotyp im Zellmodell aufweist, nicht bestätigt werden.

4.1.3 VORTEIL DER NEURONALEN UND GLIALEN MISCHKULTUR

In dem hier verwendeten humanen neuronalen Zellmodell, differenziert aus patientenspezifischen iPS-Zellen, kam es während der Differenzierung aus den neuronalen Progenitorzellen zur Bildung von Neuronen und Astrozyten in der Kultur. Dies machte die Etablierung von speziellen Methoden, wie die Kolokalisationsanalyse oder Doppel- und Dreifachfärbungen für die Immunzytochemie und die Durchflusszytometrie notwendig, um feststellen zu können, in welchem Zelltyp Veränderungen beobachtet werden. Diese

Mischkultur war aber überaus vorteilhaft für das Überleben und die Differenzierung der humanen Neuronen, die bekanntlich auf Grund ihres Stoffwechsels auf Astrozyten angewiesen sind (Sofroniew and Vinters, 2010). Daher werden in vielen neuronalen Langzeitkulturen Astrozyten zusammen mit Neuronen kultiviert, um das Überleben der Neurone zu sichern und die Differenzierung zu unterstützen. Dabei werden unter anderem Astrozyten aus der Ratte verwendet, um eine Kultivierung von primären Neuronen über 100 Tage zu gewährleisten (Lam et al., 2017). Die Kokultivierung mit Ratten Astrozyten bewirkt ebenfalls eine frühere Reifung der Neurone in Kultur, wobei der Kontakt zwischen Astrozyten und Neuronen von primärer Wichtigkeit ist (Johnson et al., 2007). Vor kurzem wurden ebenfalls humane Astrozyten für die Kokultivierung mit Neuronen genutzt. Auch dabei stellte sich heraus, dass die Astrozyten einen positiven Effekt auf die Reifung der Neurone haben und für eine langfristige Kultivierung der Neurone unerlässlich sind (Kuijlaars et al., 2016; Odawara et al., 2016).

4.2. UNTERSUCHUNG DER GLIOSE IM NEURONALEN NPC1-ZELLMODELL

Als universelles Ereignis im zentralen Nervensystem tritt die Gliose nach jeder Art von Verletzung auf. Die hauptsächlichen Kennzeichen für die Gliose sind eine erhöhte Anzahl an Gliazellen mit größeren und längeren Ausläufern sowie einer intensiveren Färbung der glialen Filamente (Norton et al., 1992). Bei diesen Gliazellen handelt es sich um reaktive Gliazellen, welche GFAP hochregulieren sowie die Intermediärfilamente Vimentin und Nestin, nach der Herunterregulation in der embryonalen Entwicklungsphase, wieder exprimieren und proliferieren (Pekny and Nilsson, 2005; Pekny and Wilhelmsson, 2006). Diese typischen Merkmale wurden auch in den hier verwendeten iPS-Zellbasierten NPC1-Gliazellen widerspiegelt. NPC1-mutierte Zelllinien zeigten dabei eine Steigerung der reaktiven Astrozyten, die auch die Vimentin-Expression erneut hochregulierten sowie nochmals proliferierten (Abb. 3.10, 3.11 und 3.12). Die Gliose, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist für das NPC1-Mausmodell bereits beschrieben (Baudry et al., 2003; Pressey et al., 2012). Dabei konnte gezeigt werden, dass einige Gehirnareale Inflammationsmarker aufwiesen. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Inflammation auf eine Aktivierung der Mikroglia zurückzuführen ist, was zur Neurodegeneration führt und somit eine Astrozyten Aktivierung hervorruft. Die Hochregulation von Gliazellen konnte bereits in vier Wochen alten Mäusen festgestellt werden, wobei ebenfalls eine untypische Astrozyten-Morphologie gefunden wurde. Die Zellen hatten weniger ausgeprägte Ausläufer und geschwollene Zellkörper (Baudry et al., 2003). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl an reaktiven Astrozyten vorlag, die eine erhöhte Anzahl an Einschlüssen in den Zellen zeigten (German et al., 2002, 2001).

Auch Pressey und Kollegen konnten eine Gliose feststellen und dass die Gliose dem Verlust von Neuronen voran geht, aber erst nach dem Absterben von Neuronen immens zunimmt (Pressey et al., 2012). Gliose, sowie Marker für Neuroinflammation, konnten auch in humanen Post-mortem-Gehirnbiopsien in verschiedenen Gehirnarealen, wie dem Frontotemporallappen, aber auch Kortex, Hirnstamm und Cerebellum, nachgewiesen werden (Chiba et al., 2014; Cologna et al., 2014; Yamashita, 2012).

Diese Entdeckungen im NPC1-Mausmodell sowie in Patienten korrelieren mit dem hier verwendeten neuronalen iPS-basierten NPC1-Zellmodell, sodass hier geschlussfolgert werden kann, dass iPS-basierte Zellmodelle eine gute Alternative für Krankheitsmodelle sind. Da bisher keine Studien an humanen In-vitro-Zellmodellen zur Gliose bekannt sind, ist das in dieser Arbeit verwendete Zellmodell das erste, in dem eine Gliose in einem iPS-basierten humanen Zellmodell nachgewiesen werden konnten. Die hier gezeigten Beobachtungen von höheren Mengen an GFAP⁺/Vimentin⁺-Zellen, einer gesteigerten Proteinmenge an GFAP und Vimentin sowie Ki67⁺-Zellen, zeigen proliferierende Zellen in NPC1-mutierten Zelllinien und stehen im Einklang mit den bisher bekannten Resultaten aus dem oben beschriebenen NPC1-Mausmodell und humanen Post-mortem-Studien. Daher konnte in dieser Arbeit geschlussfolgert werden, dass die Gliazellen, die aus NPC1 patientenspezifischen iPS-Zellen hergestellt wurden, einer Gliose unterliegen.

Der Einfluss der Gliose auf den Krankheitsverlauf des Morbus NPC wird kontrovers diskutiert (Erickson, 2013), obwohl Gliose bereits in NPC1-Patienten und Tiermodellen dargestellt werden konnte. Dabei ist die Gliose nicht nur ein universeller Mechanismus nach Verletzungen des zentralen Nervensystems, sondern wird auch als wesentlicher Einflussfaktor in anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer gesehen (Osborn et al., 2016). Die Gliose wird im Morbus Alzheimer durch Akkumulationen von fehlgefaltetem β -Amyloid-Protein ausgelöst. Dabei führt die Gliose zu massiven molekularen Veränderungen, was zu einer Störung der homöostatischen Regulation der Astrozyten und somit zur Beeinträchtigung des neuronalen Mikro-Milieus führt. Folglich trägt die Gliose über diesen Mechanismus zur Neurodegeneration bei (Osborn et al., 2016). Im Gegensatz dazu konnte in der Amyotrophen Lateralsklerose beschrieben werden, dass eine verminderte Expression des mutierten Gens in Astrozyten zu einer Verlangsamung des Krankheitsverlaufs führt und somit der Neurodegeneration entgegen wirkt (Yamanaka et al., 2008). Diese gegensätzlichen Darstellungen der Gliose, als Reaktion auf den neuronalen Zelltod oder als Ursache für diesen, zeigen deutlich, dass beide Zellarten, Neurone und Gliazellen, nicht isoliert betrachtet werden können.

Oligodendrozyten, die für die Myelinisierung der Axone verantwortlich sind, wurden im NPC1-Mausmodell als abnormal beschrieben. Ebenso konnte eine Demyelinisierung im NPC1-Mausmodell nachgewiesen werden (Lee et al., 2014; Yu and Lieberman, 2013). Der zugrunde liegende Mechanismus ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Allerdings haben Studien ergeben, dass nicht nur das Vorhandensein des funktionsfähigen NPC1-Proteins in Neuronen, sondern auch in Oligodendrozyten für die Bildung und auch die Erhaltung der Myelinscheide in NPC1 notwendig ist (Yu and Lieberman, 2013). Für Astrozyten wurde bisher eine Aktivierung und in Folge dessen die Gliose in humanen post-mortem Studien (Chiba et al., 2014; Cologna et al., 2012; Yamashita, 2012) und dem NPC1-Mausmodell beschrieben (Baudry et al., 2003; German et al., 2002, 2001; Pressey et al., 2012). Dabei wird angenommen, dass es sich bei der Gliose um einen sekundären Effekt, der auf den neuronalen Zelltod folgt, handelt (Lopez et al., 2011; Lopez and Scott, 2013; Yu et al., 2011). Wobei in diesen Studien gezeigt werden konnte, dass bedingt durch das Fehlen des NPC1-Proteins, ausschließlich in Astrozyten, keine Abnormitäten im Phänotyp und keine Gliose nachgewiesen werden konnte (Yu et al., 2011). Im Einklang mit diesen Ergebnissen re-exprimierten Lopez und Kollegen das NPC1-Protein im NPC1-Mausmodell ausschließlich in Gliazellen oder Neuronen und konnten dabei feststellen, dass die Expression von NPC1 lediglich in Gliazellen die Lebensspanne der getesteten NPC1-Mäuse nicht signifikant verlängern konnte, wobei jedoch ein geringerer Gewichtsverlust beobachtet werden konnte. Die Re-Expression des NPC1-Proteins unter einem neuronalen Promotor führte dahingegen zu einer verlängerten Lebensspanne und einer verminderten Gliose im NPC1-Mausmodell. Diese Ergebnisse veranlassten die Autoren zur der Hypothese, dass die Gliose durch das Sterben der Neurone bedingt wird und nicht durch das Fehlen des NPC1-Proteins in Gliazellen (Lopez et al., 2011; Lopez and Scott, 2013). Dennoch sollte bei diesen Ergebnissen bedacht werden, dass Gliazellen die Hauptquelle der Cholesterolsynthese im Gehirn darstellen und somit auch Neurone mit Cholesterol versorgen (Pfrieger and Ungerer, 2011), sodass es bei einer abnormalen NPC1-Funktion in Gliazellen ebenfalls zu einem gestörten Lipidtransport zwischen Gliazellen und Neuronen kommt (Ong et al., 2001). Ebenso wird durch eine NPC1-Fehlfunktion die Produktion und Abgabe trophischer Faktoren, wie GDNF oder Lactat, gestört. Des Weiteren wird eine mögliche Produktion von Toxinen durch defekte Gliazellen diskutiert (Nagai et al., 2007). Diese Aspekte legen nahe, dass Störungen des glialen Systems im zentralen Nervensystem durch nicht-funktionales NPC1- oder NPC2-Protein einen Beitrag zur Neurodegeneration im Morbus leisten können. Auch sind die Proteine NPC1 und NPC2, sowie der Transport von Cholesterol über diese Proteine, unerlässlich für die Bildung und Erhaltung des Myelins im Gehirn (Yu and

Lieberman, 2013). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lopez und Kollegen (Lopez et al., 2011; Lopez and Scott, 2013) konnte die Arbeitsgruppe um Erickson zeigen, dass die Expression von NPC1 in Astrozyten zu einer dreifach längeren Lebensdauer, verringertem Gewichtsverlust und wiederhergestellten Fertilität der NPC1-Mäuse führte. Auch eine Verringerung des Cholesterolgehaltes in Neuronen konnte beobachtet werden (Donohue et al., 2009; Zhang et al., 2008). Des Weiteren wurden auch enterische Gliazellen untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass der verringerte Gewichtsverlust in NPC1-Mäusen mit re-exprimiertem NPC1-Protein in Gliazellen wahrscheinlich auf einer Verbesserung der enterischen Neuropathologie beruht (Kapur et al., 2009). Außerdem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Expression des NPC1-Proteins in Neuronen zwar zu einer fünffachen Verlängerung der Lebensdauer der NPC1-Mäuse führt, aber auch nach sechs Monaten motorische Symptome wie Ataxie und Tremor auftraten. Dabei konnte eine komplette Verbesserung des Phänotyps nur durch die Expression des NPC1-Proteins in Neuronen und Gliazellen erzielt werden (Borbon et al., 2012). Diese widersprüchlichen Resultate könnten zum einen auf die unterschiedlichen experimentellen Aufbauten vor allem durch die verwendeten Promotoren zurückzuführen sein, zeigen aber deutlich, dass auch Gliazellen, insbesondere Astrozyten, stark in den NPC1-Phänotyp involviert sind und beide Zellarten, Neurone und Gliazellen, nicht isoliert betrachtet werden können, sondern immer als eine systemische Einheit gesehen werden sollten.

Das hier verwendete humane iPS-basierte Zellmodell ist das erste, in dem eine Gliose nachgewiesen werden konnten (Peter et al., 2017a). Für dieses Modellsystem konnte gezeigt werden, dass in den neuronal differenzierten Zellen höhere Mengen an GFAP⁺/Vimentin⁺-Zellen, eine gesteigerte Proteinmenge an GFAP und Vimentin sowie proliferierenden Zellen in NPC1-mutierten Zelllinien vorhanden sind. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisher bekannten Resultaten aus dem oben beschriebenen NPC1-Mausmodell und humanen Post-mortem-Studien. Daher konnte geschlossen werden, dass aus NPC1 patientenspezifischen iPS-Zellen differenzierte Gliazellen einer Gliose unterliegen. Somit wäre dieses Modell auch im Folgenden geeignet, den Beitrag der Gliazellen zur Neurodegeneration in NPC1 zu untersuchen. Dafür wäre die in diesem zellulären System vorliegende Mischkultur ein entscheidender Vorteil, da dadurch die Interaktion von Neuronen und Gliazellen besser untersucht werden könnte. So wäre es zum Beispiel möglich zu untersuchen, ob zuerst die Neurodegeneration auftritt und anschließend die Gliose oder aber, ob andere Faktoren die Gliose verursachen und es anschließend zum Absterben von Neuronen kommt.

Ein weiteres Modellsystem zur Untersuchung des Morbus Niemann-Pick Typ C ist der Einsatz von U18666A in zellulären Systemen, wie gesunden Fibroblasten, wodurch ein NPC-Phänotyp induziert werden kann. Die Substanz U18666A inhibiert zum einen die Cholesterolsynthese und den intrazellulären Cholesteroltransport, aber auch den Transport von Cholesterol aus den Lysosomen, wodurch diese Substanz eingesetzt wird, um den NPC-Phänotyp nachzustellen (Cenedella, 2009; Lu et al., 2015). Wie in Abbildung 3.22 gezeigt, führt die Verwendung von 1 µg/ml U18666A in dem hier verwendeten neuronalen Zellmodell zur Akkumulation von freiem Cholesterol in neuronal differenzierten Kontroll-Zelllinien. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Induktion der Cholesterolakkumulation über U18666A ebenfalls die Gliose induzieren kann. Dafür wurden die Zellpopulationen durchflusszytometrisch analysiert und es konnte festgestellt werden, dass der Anteil an GFAP-positiven Zellen schon nach 24 Stunden Behandlungszeit signifikant erhöht war. Auch der Anteil an Vimentin-positiven Gliazellen und den proliferierenden Gliazellen nahm in den Kontroll-Zelllinien zu (Abb. 3.23). Des Weiteren wurde untersucht, ob nach der Inkubation mit U18666A im neuronalen Zellmodell auch eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Vimentin und GFAP beobachtet werden konnte (Abb. 3.25). Dabei wurde gezeigt, dass die Behandlung der Kontroll-Zelllinien mit U18666A zu einer signifikanten Reduktion der löslichen Fraktionen von Vimentin und GFAP führt. Zusammenfassend konnte hiermit gezeigt werden, dass die Behandlung mit U18666A sowohl zu Cholesterolakkumulationen als auch zur Gliose und zur Verringerung der löslichen Anteile an GFAP und Vimentin führt. Dadurch kann an dieser Stelle geschlossen werden, dass die Induktion der Cholesterolakkumulation möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Gliose und die Veränderung des Phosphorylierungsstatus der Intermediärfilamente hat. Die Akkumulation von Cholesterol könnte dabei zur Veränderung der Phosphorylierung von Vimentin und GFAP führen, was im Folgenden einen Einfluss auf das Auftreten von reaktiven Astrozyten bzw. die Gliose haben könnte. Inwiefern diese beobachteten phänotypischen Merkmale zusammenhängen und welche Mediatoren dafür benötigt werden, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Somit bildet das hier verwendete Zellmodell eine gute Basis für weitere Analysen der Interaktion von Neuronen und Gliazellen, vor allem der Astrozyten, im Morbus Niemann-Pick Typ C.

4.3 VERÄNDERUNGEN DER INTERMEDIÄRFILAMENTE IM NPC1-ZELLMODELL

4.3.1 ERHÖHTER VIMENTINGEHALT IN NPC1-DEFIZIENTEN ZELLINIEN

Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, kommt es auf Grund der Gliose in NPC1 zur Erhöhung der GFAP-Expression und somit auch des GFAP-Proteinlevels in NPC1-Zelllinien. Aber nicht nur das Intermediärfilament GFAP ist im NPC1-Zellmodell verändert, sondern auch Vimentin. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass in dem hier verwendeten neuronalen Zellmodell, basierend auf patientenspezifischen iPS-Zellen, eine erneute Hochregulation von Vimentin in NPC1 vorhanden ist. Vimentin konnte sowohl in differenzierten Astrozyten (siehe 3.2.2) als auch in Neuronen (siehe 3.3) gefunden werden. In Abbildung 3.12 konnte demonstriert werden, dass in NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu Kontroll-Zelllinien eine signifikante Erhöhung des Vimentingehaltes nachgewiesen werden konnte. Auch Abbildung 3.11 zeigte einen signifikanten Anstieg von Vimentin in NPC1-Gliazellen im Vergleich zu gesunden Gliazellen. Für Neurone konnte in Abbildung 3.24 demonstriert werden, dass NPC1-afektierte Neurone einen signifikant höheren Anteil an Vimentin-positiven Neuronen haben als Kontroll-Zelllinien.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass in NPC1, ebenso wie in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, ein erhöhter Vimentingehalt im Vergleich zu nicht-afektierten Zellen zu finden ist. Für NPC1 wurde bisher in Fibroblasten eine veränderte Phosphorylierung von Vimentin beschrieben, allerdings wurde in diesem Zellmodell nicht der gesamte Vimentingehalt der Zellen überprüft (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). Daher kann an dieser Stelle keine Aussage über die Vergleichbarkeit dieser beiden Modelle getroffen werden. Vimentin wird in der Entwicklung der Neurone und Astrozyten herunterreguliert und nach abschließender Differenzierung nicht mehr oder nur in sehr geringem Maße exprimiert (Bignami et al., 1982; Pixley and Vellis, 1984). In dem hier verwendeten Zellmodell stellt sich dabei die Frage, ob Vimentin wieder exprimiert wurde oder im Laufe der Entwicklung in NPC1-defizienten Zelllinien später herunterreguliert wurde.

Für die hier durchgeführten Versuche wurden 40 Tage differenzierte neuronale Zellen verwendet. Die Neurone wiesen zu diesem Zeitpunkt elektrophysiologische Aktivität auf und zeigten über das Vorhandensein von Neurofilamenten und Synaptophysin Merkmale von reifen post-mitotischen Neuronen (Peter et al., 2017b). Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich in diesem Zellmodell um reife Neurone handelt, die kein Vimentin exprimieren (Bignami et al., 1982; Pixley and Vellis, 1984). Für die Gliazellen konnte gezeigt werden, dass diese ebenfalls S100B-positiv waren. Da S100B ein Marker für reife Astrozyten ist und erst nach GFAP exprimiert wird, kann auch für die Gliazellen davon ausgegangen werden, dass es sich um ausgereifte Zellen handelt, die kein Vimentin exprimieren (Raponi et al., 2007). Allerdings ist

hierbei zu beachten, dass Vimentin in In-vitro-Zellkulturen vermehrt exprimiert wird im Gegensatz zu In-vivo (Bignami et al., 1982; Schnitzer et al., 1981). Dennoch konnte hier gezeigt werden, dass in den NPC1-defizienten Zelllinien mehr Vimentin vorhanden war als in Kontroll-Zelllinien. Daher konnte geschlossen werden, dass trotz eines erhöhten Basis-Vimentingehaltes vermehrt Vimentin in NPC1-defizienten Zelllinien exprimiert wurde. Diese Hochregulation von Vimentin, wie sie in dem hier verwendeten Zellmodell beschrieben werden konnte, ist auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben worden. So konnte von Bauer 2012 nachgewiesen werden, dass Vimentin in der Krankheit Chorea Huntington an der Akkumulation von mutiertem Huntingtin beteiligt und ist in Neuronen auch wieder hochreguliert. Die Hochregulation von Vimentin und die damit verbundene erhöhte Akkumulation von Huntingtin führte zu einer Verschlechterung der Krankheitssymptome, sodass geschlossen wurde, dass eine Herunterregulation von Vimentin von Vorteil für einen milderen Krankheitsverlauf wäre (Bauer and Hudec, 2012). Auch im Morbus Alzheimer konnten erhöhte Vimentinexpressionen nachgewiesen werden (Levin et al., 2009; Yamada et al., 1992). Allerdings wird in diesen Studien die Hochregulation von Vimentin als Mechanismus zur Schadensbegrenzung nach Verletzungen des Gehirns beschrieben, wobei Vimentin eine essentielle Rolle in der Wiederherstellung von Synapsen und Dendriten nach einer Schädigung im Gehirn zugesprochen wird. Vimentin wird dabei in Abhängigkeit der Akkumulation von β -Amyloid wieder exprimiert (Levin et al., 2009). Da für NPC1 bisher noch keine Hochregulation von Vimentin beschrieben ist, kann hier nur über den zugrunde liegenden Mechanismus spekuliert werden. Dabei wäre es aber durchaus denkbar, dass Vimentin eine Art Rettungsmechanismus übernimmt. Vimentin könnte, in Anlehnung an Morbus Alzheimer (Levin et al., 2009), auf Grund der vermehrten Cholesterollakkumulationen wieder exprimiert werden. Diese erhöhte Expression von Vimentin könnte dazu beitragen, die Cholesterollakkumulationen zu verringern, da Vimentin im vesikulären Transport und dem Transport von Cholesterol in der Zelle beteiligt ist (Evans, 1994; Ivaska et al., 2007).

4.3.2 VERÄNDERUNGEN DES PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS VON VIMENTIN UND GFAP IN NPC1

In vorherigen Studien konnte beschrieben werden, dass in NPC1-Fibroblasten Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von Vimentin zu finden sind (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). In Anlehnung an diese Studien wurde in dieser Arbeit der Phosphorylierungsstatus von Vimentin in neuronal differenzierten Zellen, abgeleitet aus patientenspezifischen iPS-Zellen, bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Morphologie der Vimentinfilamente in NPC1-

mutierten Zelllinien verändert ist und der Gehalt an phosphoryliertem Vimentin in NPC1-Zellen signifikant reduziert ist (Abb. 3.13), was den voran gegangenen Studien entspricht (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). Da Vimentin in zellulären Prozessen wie dem vesikulären Membrantransport und der Signaltransduktion beteiligt ist (Ivaska et al., 2007), kann angenommen werden, dass eine veränderte Vimentin-Phosphorylierung die normale Zellfunktion beeinträchtigt. Vimentin und GFAP gehören zu Klasse III der Intermediärfilamente. Auf Grund dieser Ähnlichkeiten zwischen den beiden IFs wurde ebenfalls der Phosphorylierungsstatus von GFAP genauer untersucht. Dabei konnte gleichermaßen eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus zu Gunsten des unlöslichen, nicht-phosphoryliertem GFAP in NPC1-defizienten Zelllinien beschrieben werden (Abb. 3.13). Neuere Arbeiten zeigen, dass IFs, neben Mikrofilamenten und Mikrotubuli, eine große Rolle im zellulären Transport spielen. Hierbei interagieren IFs und wichtige Proteine des vesikulären Transports wie die Rab-Proteine (Margiotta and Bucci, 2016). Auch für Vimentin wurde eine direkte Interaktion mit Rab9 während des Lipidtransportes aus späten Endosomen (Walter et al., 2009) und Rab7a, welches im vesikulären Membrantransport involviert ist, beschrieben (Cogli et al., 2013). Diese Interaktion ist in NPC1 verändert, wahrscheinlich auf Grund der Lipidakkumulationen in späten Endosomen/Lysosomen, die zur Inhibition der PKC führen, was wiederum zur Hypophosphorylierung von Vimentin und endosomaler Fehlfunktion führt (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). Des Weiteren ist gezeigt worden, dass Vimentin-Aggregate, wie sie für NPC1 beschreiben wurden und auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten, den Transport von Mitochondrien zum Beispiel in der Giant Axon Neuropathie inhibieren (Lowery et al., 2015). Dies wiederum verstärkt die Hypothese, dass eine reduzierte Phosphorylierung von Intermediärfilamenten zu einem Transportdefekt in neurodegenerativen Erkrankungen führt. Diese Veränderungen im Zytoskelett könnten die lysosomale Exozytose inhibieren (Walter et al., 2009), welche ein bekannter Mechanismus für NPC1-defiziente Zellen zur Freisetzung von akkumuliertem Cholesterol ist. So konnte zum Beispiel die lysosomale Exozytose durch HPB-Cyclodextrin (Chen et al., 2010) und δ -Tocopherol (Xu et al., 2012) erhöht werden. Eine mögliche Wirkungsweise dieser Substanzen könnte der Calciumeinstrom in die Zellen sein, der gleichzeitig die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Ivaska et al., 2005), welche wiederum Intermediärfilamente phosphoryliert. Dadurch könnten der Transport von lysosomalen Vesikeln und die lysosomale Exozytose verbessert werden, sodass der Cholesterolgehalt in der Zelle abnehmen würde.

Aktuelle Studien legen nahe, dass der PKC eine zentrale Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen zukommt (Etcheberrigaray et al., 2004). Die PKC ist ein stark reguliertes Enzym

und verschiedene Moleküle, wie Calcium, sind für die Aktivierung der PKC notwendig (Liu and Heckman, 1998). Aus Untersuchungen an Fibroblasten ist bekannt, dass Sphingolipide die PKC inhibieren (Liu and Heckman, 1998; Lloyd-Evans et al., 2008; Walter et al., 2009), wobei Sphingolipide in NPC1 (Lloyd-Evans et al., 2008; Vanier, 2014) aber auch in anderen lysosomalen Speichererkrankungen, wie Morbus Krabbe oder Morbus Gaucher, akkumulieren (Vanier et al., 2016). Auch unsere Arbeitsgruppe hat bestätigt, dass es in dem hier verwendeten humanen, iPS-basierten, neuronalen Zellmodell ebenfalls zu Akkumulationen des Gangliosides GM2 kommt (Trilck et al., 2017). Somit wäre es möglich, dass Sphingolipide, wie das akkumulierte GM2 zur Inaktivierung der PKC führen und somit zu einem veränderten IF-Phosphorylierungsstatus. Die Aktivierung der PKC im Morbus Niemann-Pick Typ C ist ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung dieser neurodegenerativen Erkrankung (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009). Kürzlich wurde in diesem Zusammenhang auch Bryostain-1 als möglicher Therapieansatz zur Aktivierung der PKC in Niemann-Pick Typ C beschrieben (Alkon, 2017), wobei der Einsatz von Bryostatin-1 auch in der Krebstherapie und im Morbus Alzheimer untersucht wird (Russo et al., 2015). Weitere Hinweise zur Aktivierung der PKC als möglichen Therapieansatz werden im folgenden Abschnitt (4.4) näher beschrieben.

Wie schon unter 4.2. erwähnt, wurde in dieser Arbeit auch U18666A genutzt, um den NPC-Phänotyp in Kontroll-Zellen herzustellen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Inkubation mit 1 µg/ml U18666A für 24 Stunden schon zu deutlichen Cholesterollakkumulationen (Abb. 3.21) und auch zu einer Induktion der Gliose führte, wie über einen erhöhten Anteil von Gliazellen aber auch Vimentin-positive und proliferierende Gliazellen (Abb. 3.22) gezeigt. Des Weiteren wurde untersucht, ob nach der Inkubation mit U18666A im neuronalen Zellmodell eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Vimentin und GFAP beobachtet werden konnte. Dabei wurde gezeigt, dass die Behandlung der Kontroll-Zelllinien mit U18666A zu einer signifikanten Reduktion der löslichen Fraktionen von Vimentin und GFAP führt. Somit konnte nachgewiesen werden, dass Cholesterollakkumulationen zu einer Veränderung des Phosphorylierungsstatus der Intermediärfilamente führen. Die Veränderung der Phosphorylierung von Vimentin und GFAP könnten im Folgenden einen Einfluss auf das Auftreten von reaktiven Astrozyten bzw. die Gliose haben. Inwiefern diese beobachteten phänotypischen Merkmale zusammenhängen und welche Mediatoren dafür benötigt werden, muss Gegenstand folgender Untersuchungen sein (siehe Abb. 4.1).

4.4 AKTIVIERUNG DER PKC ALS MÖGLICHER THERAPIEANSATZ IN NPC

4.4.1 DIREKTE AKTIVIERUNG DER PKC ÜBER PMA

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass NPC1-mutierte Zelllinien einen gestörten Intermediärfilament-Phosphorylierungsstatus aufweisen, wobei die phosphorylierte, lösliche Form von GFAP und Vimentin im Vergleich zu Kontroll-Zelllinien signifikant verringert war. Infolgedessen wurde der Effekt der PKC-Aktivierung auf die Gliose und die IFs in Gliazellen und Neuronen in diesem Zellmodell näher untersucht. Für die PKC-Aktivierung wurde PMA genutzt, welches auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum natürlichen Aktivator der PKC (Diacylglycerin) ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf das Protein hat (Liu and Heckman, 1998). Vermutet wurde, dass es auf Grund der Behandlung mit PMA zu einer Erhöhung des phosphorylierten, löslichen Anteils an IFs kommt, wodurch es zu einer gesteigerten lysosomalen Exozytose kommt, die den Cholesterolgehalt in den Zellen verringert. Infolge der reduzierten Cholesterolmenge in den Zellen würde es auf Grund des reduzierten zellulären Stresslevels zu einer reduzierten Gliose kommen. In der Tat konnte die PMA-Behandlung die Gliose verbessern, wie durch eine reduzierte Proliferation und eine reduzierte Anzahl an Vimentin-positiven Gliazellen gezeigt wurde (Abb. 3.14). Ebenso konnte durch diese Behandlung der Anteil an löslichen, phosphorylierten Intermediärfilamenten erhöht werden (Abb. 3.15). Erstaunlicherweise führte die Aktivierung der PKC über PMA nicht nur zur Verbesserung der Gliose, sondern auch zur Reduktion der Cholesterolakkumulationen in NPC1-defizienten Zelllinien (Abb. 3.16). Neben den positiven Effekten auf Gliazellen konnte ebenso eine Verbesserung des Phänotyps in Neuronen erreicht werden. Der Vimentingehalt in den Neuronen nahm signifikant ab (Abb. 3.27). Darüber hinaus konnte auch die Menge des Glykosphingolipids GM2 in Neuronen signifikant reduziert werden (Abb. 3.28).

Diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Studien zu Vimentin in NPC1 überein (Tamari et al., 2013; Walter et al., 2009) und bestätigen die Hypothese, dass die Aktivierung des PKC über PMA zur Erhöhung des löslichen, phosphorylierten Anteils der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP führt. Dadurch könnte die Exozytose in den Zellen angeregt werden, wie in Kapitel 4.2.3 diskutiert, wodurch es zur Abnahme der akkumulierten Lipide, wie GM2 und Cholesterol, und letztendlich zur Verbesserung des NPC1-Phänotyps kommen könnte.

Zu den bekannten Funktionen der Intermediärfilamente zählen unter anderem der zelluläre Transport von Signalmolekülen wie Ionenkanälen (Ivaska et al., 2007). Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es in neuronal differenzierten NPC1-mutierten Zelllinien zu einem reduzierten AMPA-vermittelten Calciumeinstrom kommt. Dieser reduzierte Calciumeinstrom kann auf ein erhöhtes Level an Calcium-impermeablen GluA2-Untereinheiten in den AMPA-Rezeptoren der NPC1-mutierten Zelllinien zurückgeführt werden. Eine mögliche Ursache für den Anstieg der GluA2-Untereinheit könnten durch einen

veränderten Phosphorylierungsstatus der Intermediärfilamente bedingte Transportdefekte sein (Rabenstein et al., 2017).

Bezüglich der Interaktion von Astrozyten und Neuronen, vom Cholesterollowerstand in Astrozyten (Vance et al., 2005) bis hin zum Konzept der dreiteiligen Synapse (Araque et al., 1999; Halassa et al., 2007), könnte der gestörte Phosphorylierungsstatus der Intermediärfilamente einen enormen Einfluss auf die Kommunikation und die Interaktion von Neuronen und Astrozyten haben. So könnte zum Beispiel die Ausschüttung von Gliotransmittern, wie Glutamat oder GABA, nach neuronaler Aktivität eingeschränkt werden. Aber auch die Ausschüttung von Wachstumshormonen oder ähnlichen Proteinen, die die Aufrechterhaltung und Veränderungen von Synapsen beeinflussen, könnte gestört werden (Sofroniew and Vinters, 2010). Diese veränderte Kommunikation von Neuronen und Astrozyten könnte zur Neurodegeneration in NPC1 beitragen.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass über die Aktivierung der PKC eine deutliche Verbesserung des NPC1-Phänotyps erzielt werden kann. Die Aktivierung der PKC erfolgte hierbei über die strukturelle Ähnlichkeit von PMA zu dem natürlichen Aktivator Diacylglycerin. Gleichzeitig wird die Aktivität der PKC aber auch über den intrazellulären Calciumspiegel der Zelle reguliert (Liu and Heckman, 1998). Daher wurde ebenfalls Quinolinsäure, ein Agonist von Glutamat-Rezeptoren, verwendet und untersucht, ob Quinolinsäure zu einer Verbesserung des NPC1-Phänotyps führt.

4.4.2 INDIREKTE AKTIVIERUNG DER PKC ÜBER EINE ERHÖHUNG DES CALCIUMEINSTROMS MITTELS QUINOLINSÄURE

Die Aktivierung der PKC über PMA erfolgte zum einen über PMA, zum anderen kann die PKC auch über eine Erhöhung des intrazellulären Calciumniveaus aktiviert werden. Daher wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von Quinolinsäure auf den NPC1-Phänotyp untersucht.

Quinolinsäure (QUIN) ist ein Agonist von ionotropen Glutamat-Rezeptoren und kann somit einen Calciumeinstrom in die Zelle auslösen. QUIN ist ein natürlich vorkommender Metabolit im Zellstoffwechsel und entsteht beim Katabolismus von L-Tryptophan über den Kynureninstoffwechsel. Produziert wird QUIN von Makrophagen oder aktivierten Mikrogliazellen im Gehirn und wirkt dabei als Glutamat-Rezeptor-Agonist, im Besonderen als Agonist der NMDA-Rezeptoren, exzitatorisch. Durch diese Wirkung kommt es zu einem erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle. Im Speziellen führt die Akkumulation von QUIN zu einer erhöhten Glutamatfreisetzung durch Neurone und inhibiert die Aufnahme von Glutamat und die Glutamin-Synthese durch Astrozyten, wodurch es räumlich begrenzt zu erhöhten

Glutamatkonzentrationen kommen kann. In Studien konnte gezeigt werden, dass es in einigen neurodegenerativer Erkrankungen, wie in Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und Multipler Sklerose, zu pathologisch hohen Konzentrationen (über 500 nM) von QUIN kommt, die neurotoxisch wirken. Astrozyten wirken dabei dem neurotoxischen Effekt von QUIN entgegen, da sie zur Verminderung der QUIN-Akkumulation im Gehirn führen (Guillemin, 2012). In geringen Dosen, unter 350 nM QUIN, kommt es zu einer gesteigerten Phosphorylierung von zellulären Strukturproteinen, wie unter anderem Vimentin und GFAP (Guillemin, 2012; Pierozan et al., 2014). Ebenfalls kann es in geringen Konzentration zu einer Verbesserung der Gliose-Anzeichen, wie Senkung des Vimentin- und GFAP-Gehaltes, kommen (Guillemin, 2012).

Auf Grund schon bekannter Veränderungen im Calciumhaushalt in NPC1, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Verbesserung des NPC1-Phänotyps beiträgt. Dafür wurde die Aktivierung bestimmter Calcium-leitender Ionenkanäle über Agonisten, wie Glutamat und QUIN, verwendet. Die Applikation dieser Substanzen führte zu einem geringeren Calciumeinstrom als in den Kontroll-Zelllinien (Abb. 3.17). Der verringerte Calciumeinstrom in Zelllinien mit NPC1-Mutation wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits beschrieben (Rabenstein et al., 2017) und konnte hier reproduziert werden. Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration konnten bisher für saure Kompartimente gezeigt werden, wobei der Calciumgehalt in diesen reduziert ist und eine Blockade des Cholesteroltransportes durch U18666A zu einer Verringerung des Calciumgehaltes in diesen Kompartimenten führt. In dieser Studie konnte ebenso demonstriert werden, dass die Verringerung des intrazellulären Calciumspiegels über Chelatoren zur Ausprägung des NPC1-Phänotyps führt (Lloyd-Evans et al., 2008). Auch im NPC1-Mausmodell konnten Veränderungen der intrazellulären Calciumsignal-Weiterleitung beobachtet werden. Diese wurden durch eine veränderte Signalweiterleitung über Gap Junctions und Halbkanälen zwischen Astrozyten hervorgerufen (Sáez et al., 2013). In dieser Studie wurde der Zusammenhang von reduzierter Kommunikation von Astrozyten über Gap Junctions untersucht, da diese reduzierte Aktivität von Gap Junctions und eine erhöhte Aktivität von Halbkanälen die Verletzlichkeit gegenüber Inflammation erhöhen soll. Dabei konnte im NPC1-Mausmodell nachgewiesen werden, dass die Gap Junctions eine verringerte und Halbkanäle eine erhöhte Aktivität aufweisen und es bedingt dadurch zu veränderten Oszillationen des Calciumsignals in Astrozyten kam (Sáez et al., 2013).

Hier wurde über die Behandlung der neuronal differenzierten Zellen mit QUIN Einfluss auf den intrazellulären Calciumspiegel ausgeübt. Die Hypothese für die Verwendung von QUIN

war, dass die Anhebung des intrazellulären Calciumspiegels, wie auch die Behandlung mit PMA, zu einer Aktivierung der PKC führt (Liu and Heckman, 1998). Dadurch sollte eine Hyperphosphorylierung der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin erreicht werden (Pierozan et al., 2014), was eine Erhöhung der Exozytose in NPC1-defizienten Zellen und somit eine Reduktion des Cholesterolgehaltes in diesen Zellen nach sich ziehen könnte (Chen et al., 2010; Ivaska et al., 2007). Außerdem könnte die Hyperphosphorylierung von GFAP und Vimentin sowie die Reduktion des Cholesterolgehaltes in den Zellen zu einer Reduktion der Gliose in NPC1 führen. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten in der Tat, dass QUIN, ebenso wie PMA, einen positiven Einfluss auf den NPC1-Phänotyp hat. Eine Reduktion der Anzeichen für Gliose, Reduktion der proliferierenden Zellen sowie die Reduktion der Vimentin-positiven Astrozyten konnte beobachtet werden und ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Auch eine Hyperphosphorylierung von Vimentin und GFAP (Abb. 3.19) sowie die Reduktion des Cholesterolgehaltes in NPC1-mutierten Zelllinien (Abb. 3.20) konnte beschrieben werden. Zusätzlich dazu konnte gezeigt werden, dass sich auch der Anteil an Vimentin-positiven Neuronen und die Menge an akkumulierten GM2 nach einer Behandlung mit 100 nM QUIN verringerte (Abb. 3.30, 3.31). Somit konnte die Hypothese mit den hier verwendeten Experimenten bestätigt werden. Wobei allerdings nicht eindeutig gezeigt werden kann, wodurch die Gliose reduziert werden konnte. Allerdings konnte mit Hilfe der Behandlung von Kontroll-Zelllinien mit U18666A für 24 h eine Induktion der Gliose sowie eine Induktion der Hypophosphorylierung von Vimentin und GFAP (Abb. 3.21) nachgewiesen werden. Somit kann angenommen werden, dass die Akkumulation von Cholesterol zur Hypophosphorylierung von Intermediärfilamenten und einer Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration führt, wodurch es zur Ausprägung der Gliose kommen könnte.

Wie konkret und über welche Mediatoren diese beobachteten phänotypischen Ausprägungen des Morbus Niemann-Pick Typ C zusammenhängen, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Um die exakten Zusammenhänge von Hypophosphorylierung, Calciumkonzentration und Gliose aufzuklären, bedarf es weiterer Experimente und Untersuchungen. Dennoch konnte in dieser Arbeit eine belegbare Hypothese über den möglichen Zusammenhang aufgestellt werden, die im Folgenden weiter belegt werden sollte. Eine beeinträchtigte Signalweiterleitung in Astrozyten, aber auch in Neuronen, bedingt durch die beeinträchtigte PKC und davon abhängiger Prozesse, könnte zu einem schädlichen Kreislauf führen (Abb. 4.1), der in progressiven Zellverlust gipfelt.

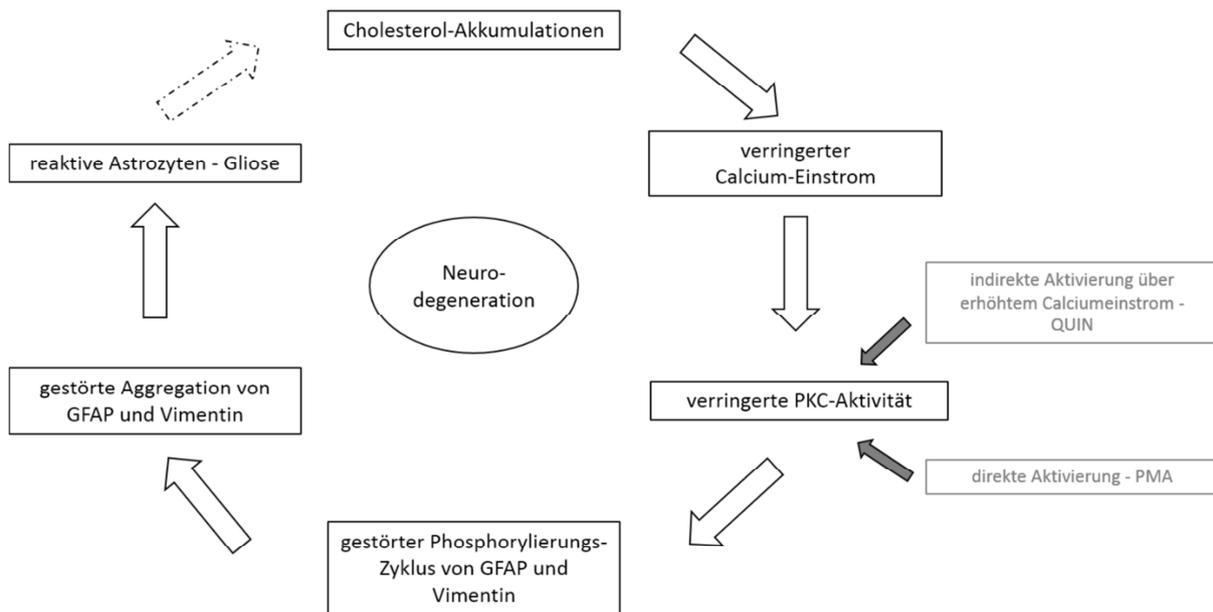


Abbildung 4.1: Hypothetischer Zusammenhang von Cholesterolakkumulationen, gestörter IF-Phosphorylierung und Gliose in NPC1. Cholesterolakkumulationen könnten zu einem verringerten Calciumeinstrom und im Folgenden zur verringerten Aktivität der PKC führen. Daraufhin könnte es zu einer verringerten Phosphorylierung der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin kommen, was die Gliose fördern könnte. Diese Mechanismen könnten zu Neurodegeneration im Morbus Niemann-Pick Typ C beitragen.

Der in Abbildung 4.1 dargestellte hypothetische Kreislauf beginnt mit steigenden Cholesterolakkumulationen in neuronalen oder glialen NPC1-mutierten Zellen. Diese Akkumulationen könnten im Folgenden zu einem verringerten Calciumeinstrom in die Zellen führen, wodurch es zu einer verringerten PKC-Aktivität kommen könnte. Diese verringerte PKC-Aktivität würde wiederum zu einer gestörten Phosphorylierung der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin und somit zur gestörten Aggregation dieser Filamente führen. Diese Veränderungen im zellulären Zytoskelett könnten die Aktivierung reaktiver Astrozyten und damit die Gliose fördern. Dieser Zyklus könnte dann zur Neurodegeneration im Morbus NPC führen.

Diese Hypothese ist jedoch hoch spekulativ und benötigt weiterführende Studien, um den Einfluss von Gliazellen, Neuronen und der Gliose auf den pathogenen Mechanismus von NPC zu beleuchten.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Alkon, D.L., 2017. Compositions and methods to treat niemann-pick disease.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215. doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6
- Baudry, M., Yao, Y., Simmons, D., Liu, J., Bi, X., 2003. Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: Immunohistochemical observations of microglia and astroglia. *Exp. Neurol.* 184, 887–903. doi:10.1016/S0014-4886(03)00345-5
- Bauer, P., Hudec, R., 2012. ROCK-phosphorylated vimentin modifies mutant huntingtin aggregation via sequestration of IRBIT. *Mol. ...* 7, 1–12. doi:10.1186/1750-1326-7-43
- Beach, T.G., Walker, R., McGeer, E.G., 1989. Patterns of gliosis in alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia* 2, 420–436. doi:10.1002/glia.440020605
- Bergamin, N., Dardis, A., Beltrami, A., Cesselli, D., Rigo, S., Zampieri, S., Domenis, R., Bembi, B., Beltrami, C.A., 2013. A human neuronal model of Niemann Pick C disease developed from stem cells isolated from patient's skin. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 34. doi:10.1186/1750-1172-8-34
- Bignami, A., Raju, T., Dahl, D., 1982. Localization of Vimentin , the Nonspecific Intermediate in Embryonal Glia and in Early Differentiating Filament Neurons Protein ., *Dev. Biol.* 295, 286–295.
- Blom, T., Li, Z., Bittman, R., Somerharju, P., Ikonen, E., 2012. Tracking sphingosine metabolism and transport in sphingolipidoses: NPC1 deficiency as a test case. *Traffic* 13, 1234–43. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01379.x
- Bolte, S., Cordelières, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–32. doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x
- Borbon, I., Totenhagen, J., Fiorenza, M.T., Canterini, S., Ke, W., Trouard, T., Erickson, R.P., 2012. Niemann-pick c1 mice, a model of “juvenile alzheimer's disease”, with normal gene expression in neurons and fibrillary astrocytes show long term survival and delayed neurodegeneration. *J. Alzheimer's Dis.* 30, 875–887. doi:10.3233/JAD-2012-120199
- Bountouvi, E., Papadopoulou, A., Vanier, M.T., Nyktari, G., Kanellakis, S., Michelakakis, H., Dinopoulos, A., 2017. Novel NPC1 mutations with different segregation in two related Greek patients with Niemann-Pick type C disease: molecular study in the extended pedigree and clinical correlations. *BMC Med. Genet.* 18, 51. doi:10.1186/s12881-017-0409-4
- Boyne, L.J., Fischer, I., Shea, T.B., 1996. Role of vimentin in early stages of neuritogenesis in cultured hippocampal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 739–48.
- Burda, J.E., Sofroniew, M. V., 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229–248. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.034
- Cenedella, R.J., 2009. Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids* 44, 477–487. doi:10.1007/s11745-009-3305-7
- Cervera-Gaviria, M., Alcántara-Ortigoza, M.A., González-del Angel, A., Moyers-Pérez, P., Legorreta-Ramírez, B.G.L., Barrera-Carmona, N., Cervera-Gaviria, J., 2016. An uncommon inheritance pattern in Niemann-Pick disease type C: identification of probable paternal germline mosaicism in a Mexican family. *BMC Neurol.* 16, 147. doi:10.1186/s12883-016-0649-5

- Chandler, R.J., Williams, I.M., Gibson, A.L., Davidson, C.D., Incao, A., Hubbard, B.T., Porter, F.D., Pavan, W.J., Charles, P., 2016. Systemic AAV9 gene therapy improves the lifespan of mice with Niemann-Pick disease , type C1. *Hum. Mol. Genet.* 1. doi:10.1093/hmg/ddw367
- Chang, L., Goldman, R.D., 2004. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 601–13. doi:10.1038/nrm1438
- Chen, F.W., Li, C., Ioannou, Y. a, 2010. Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One* 5, e15054. doi:10.1371/journal.pone.0015054
- Chiba, Y., Komori, H., Takei, S., Hasegawa-Ishii, S., Kawamura, N., Adachi, K., Nanba, E., Hosokawa, M., Enokido, Y., Kouchi, Z., Yoshida, F., Shimada, A., 2014. Niemann-Pick disease type C1 predominantly involving the frontotemporal region, with cortical and brainstem Lewy bodies: An autopsy case. *Neuropathology* 34, 49–57. doi:10.1111/neup.12047
- Cogli, L., Progida, C., Bramato, R., Bucci, C., 2013. Vimentin phosphorylation and assembly are regulated by the small GTPase Rab7a. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 1283–93. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.02.024
- Cologna, S.M., Cluzeau, C.V.M., Yanjanin, N.M., Blank, P.S., Dail, M.K., Siebel, S., Toth, C.L., Wassif, C.A., Lieberman, A.P., Porter, F.D., 2014. Human and mouse neuroinflammation markers in Niemann-Pick disease, type C1. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 83–92. doi:10.1007/s10545-013-9610-6
- Cologna, S.M., Jiang, X.-S., Backlund, P.S., Cluzeau, C.V.M., Dail, M.K., Yanjanin, N.M., Siebel, S., Toth, C.L., Jun, H., Wassif, C. a, Yergey, A.L., Porter, F.D., 2012. Quantitative proteomic analysis of Niemann-Pick disease, type C1 cerebellum identifies protein biomarkers and provides pathological insight. *PLoS One* 7, e47845. doi:10.1371/journal.pone.0047845
- Colucci-Guyon, E., Giménez Y Ribotta, M., Maurice, T., Babinet, C., Privat, a, 1999. Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia* 25, 33–43.
- Costes, S. V, Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., Lockett, S., 2004. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys. J.* 86, 3993–4003. doi:10.1529/biophysj.103.038422
- Cuisset, J.-M., Sukno, S., Trauffler, A., Latour, P., Dobbelaere, D., Michaud, L., Vallée, L., 2016. Impact of miglustat on evolution of atypical presentation of late-infantile-onset Niemann-Pick disease type C with early cognitive impairment, behavioral dysfunction, epilepsy, ophthalmoplegia, and cerebellar involvement: a case report. *J. Med. Case Rep.* 10, 241. doi:10.1186/s13256-016-1038-9
- Donohue, C., Marion, S., Erickson, R.P., 2009. Expression of Npc1 in glial cells corrects sterility in Npc1(-/-) mice. *J. Appl. Genet.* 50, 385–390. doi:10.1007/BF03195698
- Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T., Martin, P., 2000. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 1, 2455–62.
- Efthymiou, A.G., Steiner, J., Pavan, W.J., Wincovitch, S., Larson, D.M., Porter, F.D., Rao, M.S., Malik, N., 2015. Rescue of an In Vitro Neuron Phenotype Identified in Niemann-Pick Disease , Type C1 Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons by Modulating the WNT Pathway and Calcium Signaling. *Stem Cells Transl. Med.* 230–238.
- Efthymiou, a., Shaltouki, a., Steiner, J.P., Jha, B., Heman-Ackah, S.M., Swistowski, a., Zeng, X., Rao, M.S., Malik, N., 2013. Functional Screening Assays with Neurons Generated from Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells. *J. Biomol. Screen.* 19, 32–43. doi:10.1177/1087057113501869
- Erickson, R.P., 2013. Current controversies in Niemann-Pick C1 disease: steroids or gangliosides;

- neurons or neurons and glia. *J. Appl. Genet.* 54, 215–24. doi:10.1007/s13353-012-0130-0
- Eriksson, J.E., He, T., Trejo-Skalli, A. V, Härmälä-Braskén, A.-S., Hellman, J., Chou, Y.-H., Goldman, R.D., 2004. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J. Cell Sci.* 117, 919–32. doi:10.1242/jcs.00906
- Etcheberrigaray, R., Tan, M., Dewachter, I., Kuiperi, C., Van der Auwera, I., Wera, S., Qiao, L., Bank, B., Nelson, T.J., Kozikowski, A.P., Van Leuven, F., Alkon, D.L., 2004. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11141–11146. doi:10.1073/pnas.0403921101
- Evans, R.M., 1994. Intermediate filaments and lipoprotein cholesterol. *Trends Cell Biol.* 4, 149–51.
- Gelsthorpe, M.E., Baumann, N., Millard, E., Gale, S.E., Langmade, S.J., Schaffer, J.E., Ory, D.S., 2008. Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding. *J. Biol. Chem.* 283, 8229–8236. doi:10.1074/jbc.M708735200
- Germain, D.P., Shabbeer, J., Cotigny, S., Desnick, R.J., 2002. Fabry Disease: Twenty Novel α -Galactosidase A Mutations and Genotype–Phenotype Correlations in Classical and Variant Phenotypes. *Mol. Med.* 8, 306–312. doi:S1528365802603064 [pii]
- German, D.C., Liang, C.L., Song, T., Yazdani, U., Xie, C., Dietschy, J.M., 2002. Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: Glial involvement. *Neuroscience* 109, 437–450. doi:10.1016/S0306-4522(01)00517-6
- German, D.C., Quintero, E.M., Liang, C.L., Xie, C., Dietschy, J.M., 2001. Degeneration of neurons and glia in the Niemann-Pick C mouse is unrelated to the low-density lipoprotein receptor. *Neuroscience* 105, 999–1005. doi:10.1016/S0306-4522(01)00230-5
- Giese, A.-K., Mascher, H., Grittner, U., Eichler, S., Kramp, G., Lukas, J., te Vruchte, D., Al Eisa, N., Cortina-Borja, M., Porter, F.D., Platt, F.M., Rolfs, A., 2015. A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 78. doi:10.1186/s13023-015-0274-1
- Godsel, L.M., Hobbs, R.P., Green, K.J., 2008. Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol.* 18, 28–37. doi:10.1016/j.tcb.2007.11.004
- Guillemin, G.J., 2012. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* 279, 1356–65. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x
- Hagemann, T.L., Paylor, R., Messing, A., 2013. Deficits in adult neurogenesis, contextual fear conditioning, and spatial learning in a Gfap mutant mouse model of Alexander disease. *J. Neurosci.* 33, 18698–706. doi:10.1523/JNEUROSCI.3693-13.2013
- Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G., 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* 13, 54–63. doi:10.1016/j.molmed.2006.12.005
- Harzer, K., Rolfs, A., Bauer, P., Zschesche, M., Mengel, E., Backes, J., Kustermann-Kuhn, B., Bruchelt, G., Van Diggelen, O.P., Mayrhofer, H., Kr??geloh-Mann, I., 2003. Niemann-Pick Disease Type A and B are Clinically but also Enzymatically Heterogeneous: Pitfall in the Laboratory Diagnosis of Sphingomyelinase Deficiency Associated with the Mutation Q292 K. *Neuropediatrics* 34, 301–306. doi:10.1055/s-2003-44668
- Hebbar, M., Prasada L, H., Bhowmik, A. Das, Trujillano, D., Shukla, A., Chakraborti, S., Kandaswamy, K.K., Rolfs, A., Kamath, N., Dalal, A., Bielas, S., Girisha, K.M., 2016. Homozygous deletion of exons 2 and 3 of NPC2 associated with Niemann-Pick disease type C. *Am. J. Med. Genet. Part A* 170, 2486–2489. doi:10.1002/ajmg.a.37794

- Héron, B., Valayannopoulos, V., Baruteau, J., Chabrol, B., Ogier, H., Latour, P., Dobbelaere, D., Eyer, D., Labarthe, F., Maurey, H., Cuisset, J.-M., de Villemeur, T.B., Sedel, F., Vanier, M.T., 2012. Miglustat therapy in the French cohort of paediatric patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 36. doi:10.1186/1750-1172-7-36
- Hol, E.M., Pekny, M., 2015. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 32, 121–130. doi:10.1016/j.ceb.2015.02.004
- Hu, X., Yuan, Y., Wang, D., Su, Z., 2016. Heterogeneous astrocytes: Active players in CNS. *Brain Res. Bull.* 125, 1–18. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.03.017
- Huang, X., Suyama, K., Buchanan, J., Zhu, A.J., Scott, M.P., 2005. A *Drosophila* model of the Niemann-Pick type C lysosome storage disease: *dnpcl1a* is required for molting and sterol homeostasis. *Development* 132, 5115–5124. doi:10.1242/dev.02079
- Imrie, J., Heptinstall, L., Knight, S., Strong, K., 2015. Observational cohort study of the natural history of Niemann-Pick disease type C in the UK: a 5-year update from the UK clinical database. *BMC Neurol.* 15, 257. doi:10.1186/s12883-015-0511-1
- Infante, R.E., Wang, M.L., Radhakrishnan, A., Kwon, H.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2008. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15287–15292. doi:10.1073/pnas.0807328105
- Ivaska, J., Pallari, H.-M., Nevo, J., Eriksson, J.E., 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.* 313, 2050–62. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.040
- Ivaska, J., Vuoriluoto, K., Huovinen, T., Izawa, I., Inagaki, M., Parker, P.J., 2005. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J.* 24, 3834–45. doi:10.1038/sj.emboj.7600847
- Johnson, M.A., Weick, J.P., Pearce, R.A., Zhang, S.-C., 2007. Functional Neural Development from Human Embryonic Stem Cells: Accelerated Synaptic Activity via Astrocyte Coculture. *J. Neurosci.* 27, 3069–3077. doi:10.1523/JNEUROSCI.4562-06.2007
- Kapur, R., Donohue, C., Jelinek, D., Erickson, R.P., 2009. Amelioration of enteric neuropathology in a mouse model of Niemann-Pick C by *Npc1* expression in enteric glia. *J. Neurosci. Res.* 87, 2994–3001. doi:10.1002/jnr.22126
- Karten, B., Vance, D.E., Campenot, R.B., Vance, J.E., 2002. Cholesterol accumulates in cell bodies, but is decreased in distal axons, of Niemann-Pick C1-deficient neurons. *J. Neurochem.* 83, 1154–63.
- Kennedy, B.E., Charman, M., Karten, B., 2012. Niemann-Pick Type C2 protein contributes to the transport of endosomal cholesterol to mitochondria without interacting with NPC1. *J. Lipid Res.* 53, 2632–42. doi:10.1194/jlr.M029942
- Kim, H., Chun, Y., Che, L., Kim, J., Lee, S., Lee, S., 2016. Biochemical and Biophysical Research Communications The new obesity-associated protein, neuronal growth regulator 1 (NEGR1), is implicated in Niemann-Pick disease Type C (NPC2)-mediated cholesterol trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1, 1–8. doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.043
- Kraemer, F.B., Khor, V.K., Shen, W.-J., Azhar, S., 2013. Cholesterol ester droplets and steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 371, 15–9. doi:10.1016/j.mce.2012.10.012
- Kroos, M., Hoogeveen-Westerveld, M., van der Ploeg, A., Reuser, A.J.J., 2012. The genotype-phenotype correlation in Pompe disease. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 160C, 59–68. doi:10.1002/ajmg.c.31318

- Kuijlaars, J., Oyelami, T., Diels, A., Rohrbacher, J., Versweyveld, S., Meneghello, G., Tuefferd, M., Verstraelen, P., Detrez, J.R., Verschuuren, M., De Vos, W.H., Meert, T., Peeters, P.J., Cik, M., Nuydens, R., Brône, B., Verheyen, A., 2016. Sustained synchronized neuronal network activity in a human astrocyte co-culture system. *Sci. Rep.* 6, 36529. doi:10.1038/srep36529
- Lam, R.S., Töpfer, F.M., Wood, P.G., Buskamp, V., Bamberg, E., 2017. Functional Maturation of Human Stem Cell-Derived Neurons in Long-Term Cultures. *PLoS One* 12, e0169506. doi:10.1371/journal.pone.0169506
- Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., Tabar, V., Sadelain, M., Studer, L., 2009. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402–406. doi:10.1038/nature08320
- Lee, H., Lee, J.K., Bae, Y.C., Yang, S.H., Okino, N., Schuchman, E.H., Yamashita, T., Bae, J.-S., Jin, H.K., 2014. Inhibition of GM3 synthase attenuates neuropathology of Niemann-Pick disease Type C by affecting sphingolipid metabolism. *Mol. Cells* 37, 161–71. doi:10.14348/molcells.2014.2347
- Levin, E.C., Acharya, N.K., Sedeyn, J.C., Venkataraman, V., D’Andrea, M.R., Wang, H.-Y., Nagele, R.G., 2009. Neuronal expression of vimentin in the Alzheimer’s disease brain may be part of a generalized dendritic damage-response mechanism. *Brain Res.* 1298, 194–207. doi:10.1016/j.brainres.2009.08.072
- Li, W., Sun, W., Zhang, Y., Wei, W., Ambasudhan, R., Xia, P., Talantova, M., Lin, T., Kim, J., Wang, X., Kim, W.R., Lipton, S.A., Zhang, K., Ding, S., 2011. Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8299–304. doi:10.1073/pnas.1014041108
- Liu, W.S., Heckman, C.A., 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell. Signal.* 10, 529–542. doi:10.1016/S0898-6568(98)00012-6
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A.J., He, X., Smith, D. a, Elliot-Smith, E., Sillence, D.J., Churchill, G.C., Schuchman, E.H., Galione, A., Platt, F.M., 2008. Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.* 14, 1247–55. doi:10.1038/nm.1876
- Lopez, M.E., Klein, A.D., Dimbil, U.J., Scott, M.P., 2011. Anatomically defined neuron-based rescue of neurodegenerative Niemann-Pick type C disorder. *J. Neurosci.* 31, 4367–4378. doi:10.1523/JNEUROSCI.5981-10.2011
- Lopez, M.E., Scott, M.P., 2013. Genetic dissection of a cell-autonomous neurodegenerative disorder: lessons learned from mouse models of Niemann-Pick disease type C. *Dis. Model. Mech.* 6, 1089–100. doi:10.1242/dmm.012385
- Lowenthal, A.C., Cummings, J.F., Wenger, D.A., Thrall, M.A., Wood, P.A., de Lahunta, A., 1990. Feline sphingolipidosis resembling Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol.* 81, 189–197. doi:10.1007/BF00334507
- Lowery, J., Jain, N., Kuczarski, E.R., Mahammad, S., Goldman, A., Gelfand, V.I., Opal, P., Goldman, R.D., 2015. Abnormal Intermediate Filament Organization Alters Mitochondrial Motility in Giant Axonal Neuropathy Fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 1–19. doi:10.1091/mbc.E15-09-0627
- Lu, F., Liang, Q., Abi-Mosleh, L., Das, A., de Brabander, J.K., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2015. Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *Elife* 4, 1–16. doi:10.7554/eLife.12177
- Maarup, T.J., Chen, A.H., Porter, F.D., Farhat, N.Y., Ory, D.S., Sidhu, R., Jiang, X., Dickson, P.I., 2015. Intrathecal 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in a single patient with Niemann-Pick C1. *Mol. Genet. Metab.* doi:10.1016/j.ymgme.2015.07.001

- Maetzel, D., Sarkar, S., Wang, H., Abi-Mosleh, L., Xu, P., Cheng, A.W., Gao, Q., Mitalipova, M., Jaenisch, R., 2014. Genetic and Chemical Correction of Cholesterol Accumulation and Impaired Autophagy in Hepatic and Neural Cells Derived from Niemann-Pick Type C Patient-Specific iPSC Cells. *Stem cell reports* 2, 866–80. doi:10.1016/j.stemcr.2014.03.014
- Maherali, N., Hochedlinger, K., 2008. Guidelines and Techniques for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 595–605. doi:10.1016/j.stem.2008.11.008
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A., 1993. Measurement of co-localization of objects in dual colour confocal images. *J. Microsc.* doi:10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x
- Margiotta, A., Bucci, C., 2016. Role of Intermediate Filaments in Vesicular Traffic. *Cells* 5. doi:10.3390/cells5020020
- Maue, R.A., Burgess, R.W., Wang, B., Wooley, C.M., Seburn, K.L., Vanier, M.T., Rogers, M.A., Chang, C.C., Chang, T.Y., Harris, B.T., Graber, D.J., Penatti, C.A.A., Porter, D.M., Szwergold, B.S., Henderson, L.P., Totenhagen, J.W., Trouard, T.P., Borbon, I.A., Erickson, R.P., 2012. A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. *Hum. Mol. Genet.* 21, 730–750. doi:10.1093/hmg/ddr505
- Middeldorp, J., Hol, E.M., 2011. GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 93, 421–443. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005
- Millat, G., Chikh, K., Naureckiene, S., Sleat, D.E., Fensom, A.H., Higaki, K., Elleder, M., Lobel, P., Vanier, M.T., 2001a. Niemann-Pick Disease Type C: Spectrum of HE1 Mutations and Genotype/Phenotype Correlations in the NPC2 Group. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1013–1021. doi:10.1086/324068
- Millat, G., Marçais, C., Rafi, M.A., Yamamoto, T., Morris, J.A., Pentchev, P.G., Ohno, K., Wenger, D.A., Vanier, M.T., 1999. Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1321–9. doi:10.1086/302626
- Millat, G., Marçais, C., Tomasetto, C., 2001b. Niemann-Pick C1 Disease: Correlations between NPC1 Mutations, Levels of NPC1 Protein, and Phenotypes Emphasize the Functional Significance of. *Am. J. ...* 1373–1385.
- Miller, J.D., Ganat, Y.M., Kishinevsky, S., Bowman, R.L., Liu, B., Tu, E.Y., Mandal, P.K., Vera, E., Shim, J.W., Kriks, S., Taldone, T., Fusaki, N., Tomishima, M.J., Krainc, D., Milner, T.A., Rossi, D.J., Studer, L., 2013. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* 13, 691–705. doi:10.1016/j.stem.2013.11.006
- Motoyama, K., Nishiyama, R., Maeda, Y., Higashi, T., Kawaguchi, Y., Futaki, S., Ishitsuka, Y., Kondo, Y., Irie, T., Era, T., Arima, H., 2016. Cholesterol-lowering Effect of Octaarginine-appended β -Cyclodextrin in β -Npc1-trap-CHO Cells. *Biol. Pharm. Bull.* doi:10.1248/bpb.b16-00369
- Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., Przedborski, S., 2007. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci.* 10, 615–622. doi:10.1038/nn1876
- Nakasone, N., Nakamura, Y.S., Higaki, K., Oumi, N., Ohno, K., Ninomiya, H., 2014. Endoplasmic reticulum-associated degradation of Niemann-Pick C1: Evidence for the role of heat shock proteins and identification of lysine residues that accept ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 289, 19714–19725. doi:10.1074/jbc.M114.549915
- Norton, W.T., Aquino, D. a., Hozumi, I., Chiu, F.C., Brosnan, C.F., 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: A review. *Neurochem. Res.* 17, 877–885. doi:10.1007/BF00993263

- Nunes, M.J., Moutinho, M., Gama, M.J., Rodrigues, C.M.P., Rodrigues, E., 2013. Histone deacetylase inhibition decreases cholesterol levels in neuronal cells by modulating key genes in cholesterol synthesis, uptake and efflux. *PLoS One* 8, e53394. doi:10.1371/journal.pone.0053394
- Odawara, A., Katoh, H., Matsuda, N., Suzuki, I., 2016. Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture. *Sci. Rep.* 6, 26181. doi:10.1038/srep26181
- Ohgane, K., Karaki, F., Dodo, K., Hashimoto, Y., 2013. Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC1: Implication for the existence of second sterol-binding site. *Chem. Biol.* 20, 391–402. doi:10.1016/j.chembiol.2013.02.009
- Ohgane, K., Karaki, F., Noguchi-Yachide, T., Dodo, K., Hashimoto, Y., 2014. Structure-activity relationships of oxysterol-derived pharmacological chaperones for Niemann-Pick type C1 protein. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 24, 3480–3485. doi:10.1016/j.bmcl.2014.05.064
- Ong, W.-Y., Kumar, U., Switzer, R.C., Sidhu, A., Suresh, G., Hu, C.-Y., Patel, S.C., 2001. Neurodegeneration in Niemann-Pick type C disease mice. *Exp. Brain Res.* 141, 218–231. doi:10.1007/s002210100870
- Ordóñez, M.P., Roberts, E.A., Kidwell, C.U., Yuan, S.H., Plaisted, W.C., Goldstein, L.S.B., 2012. Disruption and therapeutic rescue of autophagy in a human neuronal model of Niemann Pick type C1. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2651–2662. doi:10.1093/hmg/ddc090
- Ordoñez, M.P., Steele, J.W., 2017. Modeling Niemann Pick type C1 using human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Brain Res.* 1656, 63–67. doi:10.1016/j.brainres.2016.03.007
- Ory, D.S., 2004. The niemann-pick disease genes: Regulators of cellular cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc. Med.* 14, 66–72. doi:10.1016/j.tcm.2003.12.003
- Ory, D.S., 2000. Niemann-Pick type C : A disorder of cellular cholesterol trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 331–339. doi:10.1016/S1388-1981(00)00158-X
- Osborn, L.M., Kamphuis, W., Wadman, W.J., Hol, E.M., 2016. Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 144, 121–141. doi:https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G.Q., 2008a. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 134, 877. doi:10.1016/j.cell.2008.07.041
- Park, I.-H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., Daley, G.Q., 2008b. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141–146. doi:10.1038/nature06534
- Park, W.D., O'Brien, J.F., Lundquist, P.A., Kraft, D.L., Vockley, C.W., Karnes, P.S., Patterson, M.C., Snow, K., 2003. Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: Correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum. Mutat.* 22, 313–325. doi:10.1002/humu.10255
- Peake, K.B., Vance, J.E., 2012. Normalization of cholesterol homeostasis by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in neurons and glia from Niemann-Pick C1 (NPC1)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 287, 9290–8. doi:10.1074/jbc.M111.326405
- Pekny, M., Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427–34. doi:10.1002/glia.20207
- Pekny, M., Pekna, M., 2016. Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1862, 483–491. doi:10.1016/j.bbdis.2015.11.014

- Pekny, M., Wilhelmsson, U., 2006. GFAP and astrocyte intermediate filaments. *Handb. Neurochem. Mol. Neurobiol.* 289–314.
- Pentchev, P.G., Gal, A.E., Booth, A.D., Omodeo-Sale, F., Fours, J., Neumeyer, B.A., Quirk, J.M., Dawson, G., Brady, R.O., 1980. A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 619, 669–679. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(80)90116-2
- Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R., Fainzilber, M., 2005. Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45, 715–26. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.023
- Peter, F., Rost, S., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017a. Activation of PKC triggers rescue of NPC1 patient specific iPSC derived glial cells from gliosis. *Orphanet J. Rare Dis.* 12, 145. doi:10.1186/s13023-017-0697-y
- Peter, F., Trilck, M., Rabenstein, M., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017b. Dataset in support of the generation of Niemann-Pick disease Type C1 patient-specific iPSC cell lines carrying the novel NPC1 mutation c.1180T>C or the prevalent c.3182T>C mutation – Analysis of pluripotency and neuronal differentiation. *Data Br.* 12, 123–131. doi:10.1016/j.dib.2017.03.042
- Pfrieger, F.W., Ungerer, N., 2011. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* 50, 357–71. doi:10.1016/j.plipres.2011.06.002
- Pierozan, P., Ferreira, F., Ortiz de Lima, B., Gonçalves Fernandes, C., Totarelli Monteforte, P., de Castro Medaglia, N., Bincoletto, C., Soubhi Smaili, S., Pessoa-Pureur, R., 2014. The phosphorylation status and cytoskeletal remodeling of striatal astrocytes treated with quinolinic acid. *Exp. Cell Res.* 322, 313–23. doi:10.1016/j.yexcr.2014.02.024
- Pipalia, N.H., Huang, A., Ralph, H., Rujoi, M., Maxfield, F.R., 2006. Automated microscopy screening for compounds that partially revert cholesterol accumulation in Niemann-Pick C cells 47. doi:10.1194/jlr.M500388-JLR200
- Pipalia, N.H., Subramanian, K., Mao, S., Ralph, H., Hutt, D.M., Scott, S.M., Balch, W.E., Maxfield, F.R., 2017. Histone deacetylase inhibitors correct the cholesterol storage defect in most NPC1 mutant cells. *J. Lipid Res.* 1–46. doi:10.1194/jlr.M072140
- Pixley, S.K.R., Vellis, J.D.E., 1984. Transition Between Immature Radial Glia and Mature Astrocytes Studied with a Monoclonal Antibody to Vimentin. *Dev. Brain Res.* 15, 201–209.
- Praggastis, M., Tortelli, B., Zhang, J., Fujiwara, H., Sidhu, R., Chacko, a., Chen, Z., Chung, C., Lieberman, a. P., Sikora, J., Davidson, C., Walkley, S.U., Pipalia, N.H., Maxfield, F.R., Schaffer, J.E., Ory, D.S., 2015. A Murine Niemann-Pick C1 I1061T Knock-In Model Recapitulates the Pathological Features of the Most Prevalent Human Disease Allele. *J. Neurosci.* 35, 8091–8106. doi:10.1523/JNEUROSCI.4173-14.2015
- Pressey, S.N.R., Smith, D. a, Wong, A.M.S., Platt, F.M., Cooper, J.D., 2012. Early glial activation, synaptic changes and axonal pathology in the thalamocortical system of Niemann-Pick type C1 mice. *Neurobiol. Dis.* 45, 1086–100. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.027
- Rabenstein, M., Peter, F., Joost, S., Trilck, M., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017. Decreased calcium flux in Niemann-Pick type C1 patient-specific iPSC-derived neurons due to higher amount of calcium-impermeable AMPA receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 83, 27–36. doi:10.1016/j.mcn.2017.06.007
- Rabenstein, M., Peter, F., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017. Impact of Reduced Cerebellar EAAT Expression on Purkinje Cell Firing Pattern of NPC1-deficient Mice. *Sci. Rep.* In Druck

- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., Deloulme, J.-C., 2007. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55, 165–177. doi:10.1002/glia.20445
- Reid, P.C., Sakashita, N., Sugii, S., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Hickey, W.F., Chang, T.-Y., 2004. A novel cholesterol stain reveals early neuronal cholesterol accumulation in the Niemann-Pick type C1 mouse brain. *J. Lipid Res.* 45, 582–91. doi:10.1194/jlr.D300032-JLR200
- Robinton, D.A. a., Daley, G.G.Q., 2012. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481, 295–305. doi:10.1038/nature10761.The
- Rodríguez-Pascau, L., Coll, M.J., Casas, J., Vilageliu, L., Grinberg, D., 2012. Generation of a Human Neuronal Stable Cell Model for Niemann-Pick C Disease by RNA Interference, in: *JIMD Reports - Case and Research Reports*, 2012/1. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 29–37. doi:10.1007/8904_2011_64
- Rosenbaum, A.I., Zhang, G., Warren, J.D., Maxfield, F.R., 2010. Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 5477–5482. doi:10.1073/pnas.0914309107
- Russo, P., Kisialiou, A., Lamonaca, P., Moroni, R., Prinzi, G., Fini, M., 2015. New Drugs from Marine Organisms in Alzheimer’s Disease. *Mar. Drugs* 14, 5. doi:10.3390/md14010005
- Sáez, P.J., Orellana, J.A., Vega-Riveros, N., Figueroa, V.A., Hernández, D.E., Castro, J.F., Klein, A.D., Jiang, J.X., Zanlungo, S., Sáez, J.C., 2013. Disruption in Connexin-Based Communication Is Associated with Intracellular Ca²⁺ Signal Alterations in Astrocytes from Niemann-Pick Type C Mice. *PLoS One* 8, e71361. doi:10.1371/journal.pone.0071361
- Schneider, C. a, Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Schnitzer, J., Franke, W.W., Schachner, M., 1981. Immunocytochemical Demonstration of Vimetin in Astrocytes and Ependymal Cells of Developing Adult Mouse Nervous System. *J. Cell Biol.* 90, 435–447.
- Schöls, L., 2017. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Dtsch. Gesellschaft für Neurol. 1192.
- Schultz, M.L., Krus, K.L., Lieberman, A.P., 2016. Lysosome and endoplasmic reticulum quality control pathways in Niemann-pick type C disease. *Brain Res.* doi:10.1016/j.brainres.2016.03.035
- Scott, C., Ioannou, Y. a, 2004. The NPC1 protein: structure implies function. *Biochim. Biophys. Acta* 1685, 8–13. doi:10.1016/j.bbailip.2004.08.006
- Sleat, D.E., Wiseman, J.A., El-Banna, M., Price, S.M., Verot, L., Shen, M.M., Tint, G.S., Vanier, M.T., Walkley, S.U., Lobel, P., 2004. Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 5886–5891. doi:10.1073/pnas.0308456101
- Snider, N.T., Omary, M.B., 2014. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 163–77. doi:10.1038/nrm3753
- Sofroniew, M. V., Vinters, H. V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Sofroniew, M. V., 2010. *Formation* 32, 638–647. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002.Molecular
- Soga, M., Ishitsuka, Y., Hamasaki, M., Yoneda, K., Furuya, H., Matsuo, M., Ihn, H., Fusaki, N.,

- Nakamura, K., Nakagata, N., Endo, F., Irie, T., Era, T., 2015. HPGCD Outperforms HPBCD as a Potential Treatment for Niemann-Pick Disease Type C During Disease Modeling with iPS Cells. *Stem Cells* 33, 1075–1088. doi:10.1002/stem.1917
- Srikanth, P., Young-Pearse, T.L., 2015. Stem cells on the brain: modeling neurodevelopmental and neurodegenerative diseases using human induced pluripotent stem cells. *J. Neurogenet.* 28, 5–29. doi:10.3109/01677063.2014.881358
- Storch, J., Xu, Z., 2009. Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 671–678. doi:10.1016/j.bbalip.2009.02.001
- Stringer, J.L., 1996. Repeated seizures increase GFAP and vimentin in the hippocampus. *Brain Res.* 717, 147–153. doi:0006-8993(96)00059-5 [pii]
- Sun, X., Marks, D.L., Park, W.D., Wheatley, C.L., Puri, V., O'Brien, J.F., Kraft, D.L., Lundquist, P. a, Patterson, M.C., Pagano, R.E., Snow, K., 2001. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1361–72. doi:10.1086/320599
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tamari, F., Chen, F.W., Li, C., Chaudhari, J., Ioannou, Y. a, 2013. PKC activation in Niemann pick C1 cells restores subcellular cholesterol transport. *PLoS One* 8, e74169. doi:10.1371/journal.pone.0074169
- Trilck, M., Hübner, R., Frech, M.J., 2016. Generation and Neuronal Differentiation of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Niemann-Pick Type C1 Fibroblasts, *Methods in Molecular Biology.* doi:10.1007/7651_2014_166
- Trilck, M., Hübner, R., Seibler, P., Klein, C., Rolfs, A., Frech, M.J., 2013. Niemann-Pick type C1 patient-specific induced pluripotent stem cells display disease specific hallmarks. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 144. doi:10.1186/1750-1172-8-144
- Trilck, M., Peter, F., Zheng, C., Frank, M., Dobrenis, K., Mascher, H., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017. Diversity of glycosphingolipid GM2 and cholesterol accumulation in NPC1 patient-specific iPSC-derived neurons. *Brain Res.* 1657, 52–61. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.031
- Vance, J.E., 2012. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis. Model. Mech.* 5, 746–55. doi:10.1242/dmm.010124
- Vance, J.E., Hayashi, H., Karten, B., 2005. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 193–212. doi:10.1016/j.semcdb.2005.01.005
- Vance, J.E., Peake, K.B., 2011. Function of the Niemann-Pick type C proteins and their bypass by cyclodextrin. *Curr. Opin. Lipidol.* 22, 204–209. doi:10.1097/MOL.0b013e3283453e69
- Vanier, M.T., 2014. Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 187–199. doi:10.1007/s10545-014-9794-4
- Vanier, M.T., 2010. Niemann-Pick disease type C Review. *Orphanet J. Rare Dis.* 5, 1–18.

- Vanier, M.T., Gissen, P., Bauer, P., Coll, M.J., Burlina, A., Hendriksz, C.J., Latour, P., Goizet, C., Welford, R.W.D., Marquardt, T., Kolb, S.A., 2016. Diagnostic tests for Niemann-Pick disease Type C (NPC): A critical review. *Mol. Genet. Metab.* doi:10.1016/j.ymgme.2016.06.004
- Vanier, M.T., Millat, G., 2003. Niemann-Pick disease type C. *Clin. Genet.* 64, 269–281. doi:10.1034/j.1399-0004.2003.00147.x
- Vitale, A.M., Matigian, N.A., Ravishankar, S., Bellette, B., Wood, S.A., Wolvetang, E.J., Mackay-Sim, A., 2012. Variability in the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells: Importance for Disease Modeling. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 641–650. doi:10.5966/sctm.2012-0043
- Walkley, S.U., Suzuki, K., 2004. Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1685, 48–62. doi:10.1016/j.bbailip.2004.08.011
- Walter, M., Chen, F.W., Tamari, F., Wang, R., Ioannou, Y. a., 2009. Endosomal lipid accumulation in NPC1 leads to inhibition of PKC, hypophosphorylation of vimentin and Rab9 entrapment. *Biol. Cell* 101, 141–52. doi:10.1042/BC20070171
- Wassif, C.A., Cross, J.L., Iben, J., Sanchez-pulido, L., Platt, F.M., Ory, D.S., Ponting, C.P., Bailey-wilson, J.E., 2016. Europe PMC Funders Group High Incidence of Unrecognized Visceral / Neurological Late-onset Niemann-Pick Disease , type C1 Predicted by Analysis of Massively Parallel Sequencing Data Sets. *Genet. Med.* 18, 41–48. doi:10.1038/gim.2015.25.High
- Whitfield, P.D., Nelson, P., Sharp, P.C., Bindloss, C.A., Dean, C., Ravenscroft, E.M., Fong, B.A., Fietz, M.J., Hopwood, J.J., Meikle, P.J., 2002. Correlation among genotype, phenotype, and biochemical markers in Gaucher disease: implications for the prediction of disease severity. *Mol. Genet. Metab.* 75, 46–55. doi:10.1006/mgme.2001.3269
- Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., Husemann, J., 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid- β in vitro and in situ. *Nat Med* 9, 453–457.
- Xie, C., 2003. Quantitation of two pathways for cholesterol excretion from the brain in normal mice and mice with neurodegeneration. *J. Lipid Res.* 44, 1780–1789. doi:10.1194/jlr.M300164-JLR200
- Xie, C., Burns, D.K., Turley, S.D., Dietschy, J.M., 2000. Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick type C disease but turnover is increased. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 1106–1117.
- Xie, C., Gong, X., Luo, J., Li, B., Song, B., 2017. Intracardiac injection of AAV9-NPC1 significantly ameliorates Purkinje cell death and behavioral abnormalities in mouse Niemann-Pick type C disease. *J. Lipid Res.* jlr.M071274. doi:10.1194/jlr.M071274
- Xu, M., Liu, K., Swaroop, M., Porter, F.D., Sidhu, R., Finkes, S., Ory, D.S., Marugan, J.J., Xiao, J., Southall, N., Pavan, W.J., Davidson, C., Walkley, S.U., Remaley, A.T., Baxa, U., Sun, W., McKew, J.C., Austin, C.P., Zheng, W., 2012. δ -tocopherol reduces lipid accumulation in Niemann-Pick type C1 and Wolman cholesterol storage disorders. *J. Biol. Chem.* 287, 39349–39360. doi:10.1074/jbc.M112.357707
- Xu, M., Motabar, O., Ferrer, M., Marugan, J.J., Zheng, W., Ottinger, E.A., 2016. Disease models for the development of therapies for lysosomal storage diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1371, 15–29. doi:10.1111/nyas.13052
- Yamada, T., Kawamata, T., Walker, D.G., McGeer, P.L., 1992. Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol.* 84, 157–162. doi:10.1007/BF00311389
- Yamamoto, T., Ninomiya, H., Matsumoto, M., Ohta, Y., Nanba, E., Tsutsumi, Y., Yamakawa, K., Millat, G., Vanier, M.T., Pentchev, P.G., Ohno, K., 2000. Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *J. Med. Genet.* 37, 707–712. doi:10.1136/jmg.37.9.707

- Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., Cleveland, D.W., 2008. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11, 251–253.
- Yamashita, S., 2012. A case of a girl with poor school achievement, ataxia and neurological deterioration. *Neuropathology* 32, 105–109. doi:10.1111/j.1440-1789.2011.01230.x
- Yergey, A.L., Blank, P.S., Cologna, S.M., Backlund, P.S., Porter, D., Darling, A.J., 2017. Characterization of hydroxypropyl-beta- cyclodextrins used in the treatment of Niemann-Pick Disease type C1. *PLoS One* 12, 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0175478
- Yu, D., Swaroop, M., Wang, M., Baxa, U., Yang, R., Yan, Y., Coksaygan, T., DeTolla, L., Marugan, J.J., Austin, C.P., McKew, J.C., Gong, D.-W., Zheng, W., 2014. Niemann-Pick Disease Type C: Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuronal Cells for Modeling Neural Disease and Evaluating Drug Efficacy. *J. Biomol. Screen.* doi:10.1177/1087057114537378
- Yu, J., Vodyanik, M., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I., Thomson, J., 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* (80-.). 318, 1917–1920. doi:10.1126/science.1151526
- Yu, T., Lieberman, A.P., 2013. *Npc1* acting in neurons and glia is essential for the formation and maintenance of CNS myelin. *PLoS Genet.* 9, e1003462. doi:10.1371/journal.pgen.1003462
- Yu, T., Shakkottai, V.G., Chung, C., Lieberman, A.P., 2011. Temporal and cell-specific deletion establishes that neuronal *Npc1* deficiency is sufficient to mediate neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4440–4451. doi:10.1093/hmg/ddr372
- Zervas, M., Somers, K.L., Thrall, M.A., Walkley, S.U., 2001. Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Curr. Biol.* 11, 1283–1287. doi:10.1016/S0960-9822(01)00396-7
- Zhang, M., Strnatka, D., Donohue, C., Hallows, J.L., Vincent, I., Erickson, R.P., 2008. Astrocyte-only *Npc1* reduces neuronal cholesterol and triples life span of *Npc1*^{-/-} mice. *J. Neurosci. Res.* 86, 2848–56. doi:10.1002/jnr.21730

6. ANHANG

6.1. CHEMIKALIEN

Tabelle 6.1: Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Accutase	Stemcell Technologies, Köln, DE	K029.2
Ampicillin-Natriumsalz (100 mg/ml in A.dest)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE	K029.2
Benzonase	Merck KGaA Darmstadt, DE	1.01654.0001
B27 serumfreies Supplement (50x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	17504044
Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Hybri-MAX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	D2650
Dispase (1 mg/ml in DMEM-F12)	Stemcell Technologies, Köln, DE	07913
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + GlutaMAX	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	31966-021
DMEM/F-12 (1:1) (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	21331-020
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), human rekombinant, (gelöst in 10 mM Essigsäure in A.dest., 0,1 % HSA)	Peptotech, Hamburg, DE	AF-100-15
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	A6283-100ML
FBS (fetal bovine serum)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	10106-169
FGF2 (Fibroblastenwachstumsfaktor), human rekombinant, (10 µg/ml, gelöst in PBS, 0,1 % HSA)	Amsbio, Abingdon, UK	GSR-2001

X-tremeGENE 9	Roche, Basel, CH	06365787001
Gelatine (Schweinehaut Typ A; 0,1 % gelöst in A.dest)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	G1890-100G
GlutaMAX (100x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	35050-038
HBSS (1x) (Hanks' Balanced Salt Solution)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	14170-088
HSA (Humanes Serum Albumin)	CSL Behring GmbH, Marburg, DE	E0044411F
Knockout DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	10829-018
Knockout Serum Replacement	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	10828028
Laminin I (mouse) 1 mg/ml (10 µg/ml in DMEM/F-12)	Trevigen, Gaithersburg, USA	3400-010-01
Matrigel	Corning, Wiesbaden, DE	354277
MEM NEAA (100x) (Minimum Essential Medium Non- Essential Amino Acids)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	11140-035
2-Mercaptoethanol	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	21985-023
mFreSR	Stemcell Technologies, Köln, DE	05854
mTESR1 Kompletmedium	Stemcell Technologies, Köln, DE	05850
PBS Dulbecco (PBS -/-, ohne Calcium und Magnesium)	Biochrom, Berlin, DE	L1825
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml; 10000 µg/ml)	Biochrom, Berlin, DE	A2213
PLO (Poly-L-Ornithin-Hydrobromid; 15 mg/ml gelöst in A. dest.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	P3655-50MG
Protaminsulfat (500 µg/ml, gelöst in A. dest)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	P4020-1G
Trypsin-EDTA 0,05 % (1x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	25300-054

Trypsin-EDTA 0,25 % (1x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	25300-056
Valproinsäure-Natriumsalz (25 µg/ml, gelöst in A. dest)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	P4543-10G
Y27632, 2 mg (10 mM, gelöst in PBS -/-)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, DE	130-095-563

Tabelle 6.2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien für molekularbiologische Methoden

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	K029.2
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	X969.2
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	X968.2
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.02382
Essigsäure (100 %)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	8.18755
Ethanol (100 %)	Zentralapotheke der Universitätsmedizin, Rostock, DE	
Isopropanol	Walter CMP GmbH & Co KG, Kiel, DE	WAL11601
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.04936
MgCl ₂	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE	28305
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE	3957.2
TE-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden, DE	1018499

Chemikalien für biochemische Analysen Western Blot und Färbungen

Bezeichnung	Hersteller	Katalognr.
β-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	M-7522
Human Brain Total RNA	Clontech/Takara, Saint-Germain-en-Laye, FR	636530
Bromphenolblau-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	A512.1
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	8076.4
<i>complete mini</i> Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Mannheim, DE	04693124001
DABCO (1,4-Diazobicyclo[2.2.2]-oktan)	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	D27802- 500G
DAPI (4'6-Diamidin-2-Phenylindol)	Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	D1306
EGTA (Ethyenglycol- bis(aminoethyl)-N,N,N',N'- tetraessigsäure)	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	E4378
EDTA	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	E-5134
Filipin (50 mg/ml in DMSO)	Polyscience Europe GmbH, Eppenheim, DE	08707
Fluo 4-AM	Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	F14201
Glycerol (87 % [v/v])	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.04094
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	3908.3
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.00317
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- ppperazinyl)-ethansulfonsäure)	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	H3375
Igepal CA-630	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	56741

Magermilchpulver	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	70166
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	4627.2
Mowiol 4-88	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	81381-250G
NaCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	3957.2
NaF	Merck KGaA Darmstadt, DE	1.06449.0250
NaOH	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	1.06469
NBT/BCIP	Roche, Mannheim, DE,	
Natriumazid	Merck KGaA Darmstadt, DE	1.06688
Natrium-Deoxycholat	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	D6750
Normales Ziegenserum	Dako, Hamburg, DE	X00907
PhosStop (Phosphatase Inhibitor)	Roche, Mannheim, DE	04906837001
PFA (Paraformaldehyd)	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, DE	16005-1KG- R
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe, DE	K025.1
Saponin	Merck KGaA Darmstadt, DE	558255- 100GM
SDS	Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe, DE	2326.2
TRIS	Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe, DE	4855.2
Tris HCl	Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe, DE	9090.3
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe, DE	3051.3
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg, DE	37470

Waschlösung für MACS
Sortierung

Milteyi Biotec,
Bergisch-Gladbach, DE

130-091-221

6.2. KITS

Tabelle 6.3: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.	Verwendung
AmplexRed Cholesterol Assay	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A12216	Bestimmung des Cholesterolgehaltes
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH Hilden, DE	12362	Aufreinigung rekombinant hergestellter Vektoren
<i>Pierce</i> [®] <i>BCA Protein</i> <i>Assay Kit</i>	Thermo Scientific Inc. Waltham, USA	23225	Proteinbestimmung
Magnetische Partikel Anti-PSA-NCAM ⁺	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, DE	130-092-966	Aufreinigung neuraler Progenitorzellen

6.3. GERÄTE

Tabelle 6.4: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bakterieninkubator Functionline	Heraeus Instruments Hanau, DE
Blotkammer TransBlot [®] SD Cell	Bio Rad Laboratories GmbH München, DE
CO ₂ -Inkubator CB.150	WTC Binder Labortechnik Tuttlingen, DE
CO ₂ -Inkubator Revco	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
CO ₂ -Inkubator T6	Heraeus, Hanau, DE
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD, Heidelberg, DE
Eismaschine AF80	Scotsman Ice Systems Mailand, ITA
Elektrophoresekammer Criterion [™] Cell	Bio Rad Laboratories GmbH

	München, DE
Feinwaage AX224 M-pact	Sartorius AG Göttingen, DE
Feinwaage BL610	Sartorius AG Göttingen, DE
Gefrierbehälter Mr.Frosty	Thermo Fisher Scientific, Darmstad, DE
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr International Deutschland GmbH Biberach an der Riss, DE
Gefrierschrank (-80 °C)	National Lab, Mölln, DE
Geschirrspüler G7883	Miele Professionak, Gütersloh, DE
Hitzesterilisator T6	Heraeus, Hanau, DE
Inkubationshaube IH50	Noctua GmbH Mössingen, DE
IVF Workstation L224	K Systems, Birkenrod, DK
Kühlschrank Comfort	Liebherr International Deutschland GmbH Biberach an der Riss, DE
Magnetrührer Mini MR Standard	IKA-Werke GmbH & Co KG Staufen, DE
Magnetrührer MSH-20A	Witek Labortechnik GmbH Wertheim, DE
Magnetrührer Stuart Stir CB161	Dunn Labortechnik Asbach, DE
Magnetstäbchen-Sortiment	Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe, DE
Microplate Reader GENios	Tecan Group Ltd. Männedorf, CH
Mikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon Instruments Inc. Melville USA
Mikroskop Biozero 800	Keyence, Osaka, JP
Mikroskop LSM 780	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Minizentrifuge Sprout®	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Multipette <i>plus</i> ®	Eppendorf-GmbH Wesseling-Berzdorf, DE
pH-Meter S20-SevenEasy™	Mettler-Toledo GmbH Gießen, DE
Pipettierhilfe Accurpette	VWR International GmbH

	Darmstadt, DE
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte Eberstadt, DE
Plattenleser GENios	Tecan, Männedorf, CH
Power Pac Universal/ Power Pac 200	Bio Rad Laboratories GmbH München, DE
Reinstwassersystem Typ HP5 UF	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH Niedererlberg, DE
Scanner Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences Lincoln, USA
Schüttler KH2/500	Noctua GmbH Mössingen, DE
Schüttler KM-2AKKU	Edmund Bühler GmbH Hechingen, DE
Schüttler WS5	Edmund Bühler GmbH Hechingen, DE
Spektrophotometer Ultrospec 3100 pro	GE Healthcare Europe GmbH Freiburg im Breisgau, DE
Sterilwerkbank Antares 48	Heraeus instruments Berlin, DE
Sterilwerkbank amin Air® HB2448	Heraeus instruments Berlin, DE
Stickstofftank RS Series 1575	Taylor Wharton, Wien, AT
Thermomixer compact	Eppendorf-GmbH Wesseling-Berzdorf, DE
Thermoshaker PST-60HL-4	Lab4you GmbH Berlin DE
Trockenschrank ED115	Binder, Tuttlingen, DE
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad, München, DE
Vakuumpumpe PM20405-86	VWR, Darmstadt, DE
VARIOKLAV® Dampfsterilisator Typ300	HP Medizintechnik GmbH Oberschleißheim, DE
Vortex Genie 1 Touch Mixer	Scientific Industries New York, USA
Vortex MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co KG Staufen, DE
Wasserbad WB10	Memmert GmbH & Co KG

	Schwabach, DE
Wasserbad WNB14 mit Schüttler SV 1422	Memmert GmbH & Co KG Schwabach, DE
Zellzähler CASY® Model TT	Roche, Mannheim, DE
Zentrifuge 3K10	SIGMA Laborzentrifugen GmbH Osterode am Harz, DE
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter™ Krefeld, DE
Zentrifuge Microfuge 16	Beckman Coulter™ Krefeld, DE
Zentrifuge Z333 MK-2	Hermle Labortechnik GmbH Wehingen, DE
Zentrifuge Z383K	Hermle Labortechnik GmbH Wehingen, DE

6.4. VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 6.5: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Katalog-Nr.
CASY® Cups	Roche, Mannheim, DE	05651794001
CELLSTAR® Filter Top Zellkulturflasche T25 (25cm ²)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	690175
CELLSTAR® Filter Top Zellkulturflasche T75 (75cm ²)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	658175
CELLSTAR® Suspensionskultur- Mikroplatte, 96 Vertiefungen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	655185
Criterion™ Precast Gel (4-15% TRIS-HCl)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE	345-0027
Deckgläser	Krupmholz, Delters, DE	1173003
Gel Blotting Papier	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	0048.1
Hybond™-ECL™ Nitrocellulose- Membran	GE Healthcare, Freiburg im Breisgau, DE	RPN303D

Kryovials	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	72.380.007
Parafilm®	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	H951.1
Pasteurpipetten	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE	FB50253
Petrischalen mit Nocken (94x16 mm)	Greiner bio-one GmbH ,Frickenhausen, DE	633161
Pipettenspitzen 10 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	70.1130
Pipettenspitzen 100 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	70.760
Pipettenspitzen 200 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	70.760.002
Pipettenspitzen 1000 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	70.762
Pipettenspitzen 1000 µl mit extra großer Öffnung	Mettler Toledo, Gießen, DE	HR-1000WS
Reagiergefäß " <i>Safesael</i> (2ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	72.695.004
Reagiergefäß " <i>SafeSeal</i> " (1,5 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	72.706
Rotilabo® Einmal-Wiegeschalen	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	2159.1
Rundbodenröhrchen Polystyrol (14ml)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA	352051
Serologische Pipetten 10 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	607180
Serologische Pipetten 25 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	760180
Serologische Pipetten 5 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	606180
Spatel (L-Form)	VWR, Darmstadt, DE	612-1561

Trans-Blot Turbo Nitrocellulose Transfer Packs	Bio-Rad, München, DE	1704159
Zellkulturplatten 4-well	Nunc, Schwerte, DE	176740
Zellkulturplatten 6-well	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	83.1839
Zellkulturplatte 6-well (Advanced TC)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	657960
Zellkulturplatten 6-well (low attachment)	Stemcell Technologies, Grenoble, FR	27145
Zellkulturplatten 12-well	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	665180
Zellkulturplatten 24-well	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	83.1836
Zellkulturplatte 48-well	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	677180
Zellkulturschale 6 cm	Biochrom, Berlin, DE	P96600
Zellkulturschale 10 cm	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	83.3902
Zellschaber	Biochrom, Berlin, DE	P99003
Zentrifugenröhrchen 15 ml	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	62.554.502
Zentrifugenröhrchen 50 ml	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	62.547.254

6.5. SOFTWARE

Tabelle 6.6: Software

Programm	Hersteller
BZ image analysis application	Keyence, Osaka, JP
BZ observation application	Keyence, Osaka, JP
CellQuest Pro	BD, Heidelberg, DE
Corel Draw 11.633	Corel, Ottawa, CA
Magellan 6	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
NIS-Elements F2.20	Nikon Instruments inc., New York, USA
Odyssey® Infrared Imaging System- Application Software Version 1.2.15	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mendeley Desktop, Version 1.17.9	Mendeley Ltd., New York, USA

6.6. ANTIKÖRPER

Für die Immundetektion im Western Blot und für Immunzytochemische Färbungen wurden die folgenden primären (Tab. 6.7) und sekundären (Tab. 6.8) Antikörper verwendet.

Tabelle 6.7: Primäre Antikörper

Antigen	Wirt-Spezies	Isotyp	Hersteller	Katalog-Nr.
alpha-Fetoprotein	Maus	IgG monoclonal	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH Steinheim, DE	A8452
beta-Aktin AC-15	Maus	IgG monoclonal	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH Steinheim, DE	A5441
beta-III Tubulin	Maus	IgG monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE	sc51670

beta-III Tubulin	Maus	IgG monoclonal	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH Steinheim, DE	T8660
beta-III Tubulin	Kaninchen	IgG polyclonal	Abcam Cambridge, UK	ab8207
GAPDH	Maus	IgG monoklonal	Abcam Cambridge, UK	ab8245
GFAP	Maus	IgG monoclonal	Cell Signalling Technologies, Danvers, USA	3670S
GFAP	Kaninchen	IgG polyclonal	Dako, Hamburg, DE	Z0334
GFAP	Ratte	IgG monoclonal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	13-0300
GFAP pSer38	Kaninchen	IgG polyclonal	GeneTex, Irvine, USA	GTX55065- 100
GM2	Maus	IgM polyclonal	Geschenk Dr. C. Dobrenis	
Ki67	Kaninchen	IgG polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE	sc15402
LAMP2	Kaninchen	IgG polyclonal	GeneTex, Irvine, USA	GTX103214
Pax6	Kaninchen	IgG polyclonal	Abcam Cambridge, UK	Ab5790
MAP2	Kaninchen	IgG polyclonal	Merck Millipore, Darmstadt, DE	AB5622
MAP2	Maus	IgG monoclonal	Merck Millipore, Darmstadt, DE	MAB378
Nanog	Kaninchen	IgG polyclonal	Stemgent, Cambridge, USA	09-0020
Nestin	Maus	IgG monoclonal	R&D Systems, Abingdon, UK	MAB1259
Nestin	Kaninchen	IgG polyclonal	Abcam Cambridge, UK	ab92391
Oct4	Maus	IgG polyclonal	Stemgent, Cambridge, USA	09-0023
Sox-2	Kaninchen	IgG polyclonal	Abcam Cambridge, UK	Ab92494

S100	Kaninchen	IgG polyclonal	Dako, Hamburg, DE	Z0311
SSEA-3	Ratte	IgM monoclonal	Stemgent, Cambridge, USA	09-0014
SSEA-4	Kaninchen	IgG polyclonal	Stemgent, Cambridge, USA	09-0006
Synaptophysin	Maus	IgG monoclonal	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH Steinheim, DE	S5768
TRA-1-60	Maus	IgM monoclonal	Stemgent, Cambridge, USA	09-0010
TRA-1-81	Maus	IgM monoclonal	Stemgent, Cambridge, USA	09-0011
Rab7a	Kaninchen	IgG monoclonal	GeneTex, Irvine, USA	GTX63882
Vimentin	Maus	IgG monoclonal	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	180052
Vimentin	Kaninchen	IgG polyclonal	GeneTex, Irvine, USA	GTX100619
Vimentin p38Ser	Ratte	IgG monoclonal	MBL Nagoya, JP	D094-3S

Tabelle 6.8: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Wirt-Spezies	Reaktivität	Hersteller	Katalog -Nr.
AlexaFluor 488	Ziege polyklonal	Maus IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A11029
AlexaFluor 488	Ziege polyklonal	Kaninchen IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A11034
AlexaFluor 488	Ziege polyklonal	Maus IgM	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A21042
AlexaFluor 488	Ziege polyklonal	Ratte IgM	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A21212
AlexaFluor 568	Ziege polyklonal	Maus IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A11031

AlexaFluor 568	Ziege polyklonal	Kaninchen IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A11036
AlexaFluor 568	Ziege polyklonal	Maus IgM	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A21043
AlexaFluor 647	Ziege polyklonal	Kaninchen IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A21245
Brilliant Violet 421	Ziege polyklonal	Ratte IgG	BioLegend, Fell, DE	405414
Alexa Fluor 680	Ziege polyklonal	Kaninchen IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A21076
Alexa Fluor 680	Ziege polyklonal	Ratte IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A21096
IRDye® 680LT	Ziege polyklonal	Kaninchen IgG	LI-COR, Lincoln, USA	926- 68021
IRDye800®	Ziege polyklonal	Maus IgG	Rockland Immunochemicals Inc. Gilbertsville, USA	610-132- 121

6.7. PUFFER UND LÖSUNGEN

Zum Ansetzen der verwendeten Puffer und Lösungen (Tab. A.9) wurde Reinstwasser verwendet, wenn nicht anders angegeben.

Tabelle 6.9: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für molekularbiologische und zytochemische Anwendungen

FACS Waschpuffer

	PBS
0,5 %	BSA
0,02 %	Natrium-Azid

FACS Saponinpuffer

	PBS
0,5 %	BSA
0,5 %	Saponin
0,02 %	Natrium-Azid

Phospho-Puffer	150 mM NaCl
	20 mM NaF
	20 mM Hepes
	1 % Igepal
	10 % Glycerol
Triton-Puffer	1 % SDS
	0,1 % Triton X-100

Tabelle 6.10: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für Western Blot

RIPA-Puffer	20 mM TRIS
	137 mM NaCl
	12 mM Natrium-Deoxycholat
	2 mM EDTA
	0,1 % SDS
	1 % Triton X-100
	10 % Glycerol
	→ 1 <i>complete mini</i> Protease Inhibitor-Tablette (Roche) in 10 ml RIPA-Puffer lösen
5x Laemmli-Puffer	125 mM TRIS
	20 % Glycerol
	2 % SDS
	5 % β -Mercaptoethanol
	10 % Bromphenolblau
10x SDS-Elektrophorese-Puffer	250 mM TRIS
	2 M Glycin

	0,1 % SDS
1x SDS-Elektrophorese-Puffer	1 : 9 10x SDS-Elektrophorese-Puffer : Aqua dest.
10x SDS-Transferpuffer	480 mM TRIS 390 mM Glycin 3,75 % SDS
1x SDS-Transferpuffer	1 : 2 : 7 10x SDS-Transferpuffer : Methanol : Aqua dest.
10x TBS	200 mM TRIS 1,37 M NaCl → pH 7,5 einstellen
1x TBS	1 : 9 10x TBS : Aqua dest.
1x TBST	1 : 9 10x TBS : Aqua dest. 0,1 % Tween 20

6.8. PRIMER

Tabelle 6.11: Primerliste qPCR

Primer	Ausrichtung	Sequenz	Größe Produkt [bp]
G6PD	fw	GCAAACAGAGTGAGCCCTTC	500
	rev	GGGCAAAGAAGTCCTCCAG	
GFAP	fw	CGATCAACTCACCGCCAACA	158
	rev	GTGGCTTCATCTGCTTCCTGTC	
Nestin	fw	GGCGCACCTCAAGATGTCC	124
	rev	CTTGGGGTCCTGAAAGCTG	
Vimentin		Qiagen, Hilden, DE	94

6.9. PLASMIDE

Tabelle 6.12: verwendete Plasmide

Plasmid	Insert	Backbone	Bestellnummer	Firma
c-MYC	1858	MSCV IRES GFP	Plasmid 18119	Addgene Cambridge, USA
gag/pol	unbekannt	MSCV	Plasmid 14887	Addgene Cambridge, USA
KLF4	1413	pMIG	Plasmid 17227	Addgene Cambridge, USA
SOX2	954	pMIG	Plasmid 17226	Addgene Cambridge, USA
VSV-G	6363	pCMV	Plasmid 8454	Addgene Cambridge, USA

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	mikro
A.	aqua
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
AMPA	<i>engl. α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> (Aminomethylphosphonsäure)
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
c.	cDNA-Position
CamKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II
CD	Cyclodextrin (2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin)
cDNA	<i>engl. complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cMyc	<i>engl. vian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>
Da	Dalton
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl. Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	<i>engl. embryoid body</i> (embryonale Körperchen)
EGF	<i>engl. Epidermal growth factor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
FBS	<i>engl. Fetal Bovine Serum</i> (fetales Kalberserum)
FGF2	<i>engl. Fibroblast growth factor 2</i>
g	<i>engl. gravity force</i> (Gravitationskraft)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFAP	<i>engl. Glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
GFP	<i>engl. green fluorescent protein</i> (Grün-fluoreszierendes Protein)
GM2/3	Gangliosid Monosialinsäure 2/3

h	Stunde(n)
HDACi	Histon Deacetylase Inhibitoren
HEK	<i>engl. human embryonic kidney</i> (humane embryonale Nierenzellen)
IF	Intermediärfilament
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
Klf4	<i>engl. Krueppel-like factor 4</i>
LB	<i>engl. lysogeny broth</i>
LDL	engl. Low density lipoprotein
M	molar
MACS	<i>engl. magnetic activated cell sorting</i>
MEF	<i>engl. Mouse embryonic feeder</i>
min	Minute(n)
mRNA	engl. messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NDZ	neuronal differenzierte Zellen
NPC	Morbus Niemann-Pick Typ C
NPC1	Niemann-Pick Typ C1
NPC2	Niemann-Pick Typ C2
NPZ	neurale Progenitorzellen
NTD	N-terminale-Domäne
Oct3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor $\frac{3}{4}$
p.	Position der Aminosäure auf Proteinebene
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pax6	<i>engl. paired box 6</i>
PBS	<i>engl. phosphat buffered saline</i> (phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	engl. polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pGFAP	phosphoryliertes GFAP
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PP2A	Protein Phosphatase 2A

PSA-NCAM	<i>engl. Polysialylated-neural cell adhesion molecule</i>
pVim	phosphoryliertes Vimentin
p-Werte	<i>engl. probability-value</i> (Wahrscheinlichkeitswert)
QUIN	Quinolinsäure
RFU	<i>engl. Realtive Fluorescence Units</i> (relative Fluoreszenzeinheiten)
RIPA	<i>engl. radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>engl. ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROCK	<i>engl. Rho-associated protein kinase</i>
SDS	<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i> (Sodiumdodecylsulfat)
SEM	<i>engl. standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
Sox2	<i>engl. sex determining region Y- box 2</i> (geschlechtsbestimmende Region Y- Box 2)
SSD	Sterol-sensitve-Domäne
SSEA3/4	<i>engl. stage specific embryonic antigen 3/4</i>
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TBS	<i>engl. tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	<i>engl. tris buffered saline tween 20</i> (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20)
Tryp	Trypsin
UE	Untereinheit
ULF	<i>engl. Unit length filament</i> (Einheitslängen-Filament)
UV	ultraviolett
Vim	Vimentin
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
x-Well-Platte	Zellkulturplatte mit x Vertiefungen

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1.1:** Schematische Einteilung des Morbus Niemann-Pick Typ C
- Abb. 1.2:** Struktur des NPC1- und NPC2-Proteins
- Abb. 1.3:** Möglicher Mechanismus zum Export von Cholesterol aus Endosomen/Lysosomen
- Abb. 1.4:** Aufbau und Assemblierung von Intermediärfilamenten
- Abb. 1.5:** Auf- und Abbau von Vimentin
- Abb. 3.1:** Reprogrammierung von Fibroblasten zur Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen
- Abb. 3.2:** Karyogramm der etablierten iPS-Zelllinien.
- Abb. 3.3:** Nachweis der Pluripotenzmarker in den etablierten iPS-Zelllinien.
- Abb. 3.4:** Nachweis der 3 Keimblätter in „Embryoid bodies“ der generierten iPS-Zelllinien
- Abb. 3.5:** Herstellung von neuronalen Progenitorzellen über Neurale Induktion
- Abb. 3.6:** Nachweis von Progenitorzell-Markern in neuronalen Progenitorzellen
- Abb. 3.7:** Morphologische Charakterisierung der neuronal differenzierten Zellen.
- Abb. 3.8:** Durchflusszytometrische Analyse von Neuronen und Gliazellen.
- Abb. 3.9:** Filipin-Färbung der neuronal differenzierten Zellen.
- Abb. 3.10:** Immunzytochemische Färbung der Gliazellen (GFAP) in Kontroll- und NPC1-defizienten Zelllinien
- Abb. 3.11:** Quantifizierung der Gliosemarker in neuronal differenzierten Zellen
- Abb. 3.12:** Analyse der Vimentinexpression in Kontroll- und NPC1-defizienten Gliazellen
- Abb. 3.13:** Analyse des Gesamt-Vimentingehaltes in neuronal differenzierten Zellen
- Abb. 3.14:** Analyse der Vimentinexpression in neuronal differenzierten Zellen
- Abb. 3.15:** Analyse der Gliose in PMA-behandelten Zellen
- Abb. 3.16:** Phosphorylierung von Vimentin und GFAP in PMA-behandelten Zellen
- Abb. 3.17:** Cholesterolanalyse in PMA behandelten neuronal differenzierten Zellen
- Abb. 3.18:** Calciumeinstrom in neuronal differenzierte Zellen nach Behandlung mit Glutamat und QUIN
- Abb. 3.19:** Analyse der Gliose in Quinolinsäure behandelten neuronal differenzierten Zellen
- Abb. 3.20:** Phosphorylierung von Vimentin und GFAP in Quinolinsäure behandelten neuronal differenzierten Zellen

- Abb. 3.21:** Cholesterolanalyse in Quinolinsäure behandelten neuronal differenzierten Zellen
- Abb. 3.22:** Analyse des Cholesterolgehaltes in Kontroll-Zelllinien nach U18666A-Behandlung
- Abb. 3.23:** Bestimmung der glialen Anteile nach Behandlung mit U18666A
- Abb. 3.24:** Bestimmung der Intermediärfilament-Fraktionen nach Behandlung der Kontroll-Zelllinien mit U18666A
- Abb. 3.25:** Nachweis der Erhöhung von Vimentin in NPC1-defizienten Neuronen
- Abb. 3.26:** Akkumulationen des Gangliosides GM2 in NPC1-defizienten Neuronen
- Abb. 3.27:** Kolokalisationsanalyse von Filipin und GM2 in neuronal differenzierten Zellen
- Abb. 3.28:** Analyse der Vimentin-positiven Neurone nach PMA-Behandlung
- Abb. 3.29:** Analyse der GM2-positiven Neurone nach PMA-Behandlung
- Abb. 3.30:** Senkung der Vimentin-positiven Neuronen in NPC1-defizienten Zelllinien nach QUIN-Behandlung
- Abb. 3.31:** Analyse der GM2-positiven Neurone nach QUIN-Behandlung
- Abb. 4.1:** Hypothetischer Zusammenhang von Cholesterolakkumulationen, gestörter IF-Phosphorylierung und Gliose in NPC1

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1.1:** Einteilung der Intermediärfilamente
- Tab. 2.1:** Verwendeter Mikroorganismenstamm
- Tab. 2.2:** Nährmedien für die Anzucht der verwendeten Mikroorganismen
- Tab. 2.3:** Verwendete Zelllinien
- Tab. 2.4:** Kultivierungsmedien
- Tab. 2.5:** Verwendete Substanzen (kommerziell erworben)
- Tab. 2.6:** Verwendete Zelllinien und entsprechende Kultivierungsbedingungen
- Tab. 2.7:** Aussaat Neuronal differenzierter Zellen
- Tab. 2.8:** Kryokonservierung von Zellen
- Tab. 6.1:** Zellkulturmedien und Zusätze
- Tab. 6.2:** Verwendete Chemikalien
- Tab. 6.3:** Verwendete Kits
- Tab. 6.4:** Geräte
- Tab. 6.5:** Verbrauchsmaterialien
- Tab. 6.6:** Software
- Tab. 6.7:** Primäre Antikörper
- Tab. 6.8:** Sekundäre Antikörper
- Tab. 6.9:** Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für molekular biologische und zytochemische Anwendungen
- Tab. 6.10:** Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für Western Blot
- Tab. 6.11:** Primerliste qPCR
- Tab. 6.12:** verwendete Plasmide

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Arndt Rolfs für die Möglichkeit diese Dissertation im Albrecht-Kossel Institut für Neuroregeneration anfertigen zu dürfen.

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Moritz Frech für die Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit, das geduldige Beantworten aller offenen Fragen, das Korrekturlesen und die vielen anregenden Diskussionen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Albrecht-Kossel-Instituts, besonders bei Sebastian Rost, Anne-Marie Knospe, Dr. Jan Lukas, Susanne Seemann, Frances König, Susanne Zielke, Fan Yang und Xiao Feng für das nette Miteinander, die vielen Gespräche sowie die Hilfe und Unterstützung bedanken. Ein großes Dankeschön geht auch an Anke Schneider für das Korrekturlesen, damit die Arbeit auch orthografisch ansehnlich ist.

Ein ganz besonderer Dank gilt Sebastian Rost für die Unterstützung in der Zellkultur und allen anfallenden Arbeiten sowie der immerwährenden Motivation und aufmunternden Gespräche. Anne-Marie Knospe danke ich für die Beantwortung der vielen Fragen und vor allem für die Motivation zwischendurch.

Auch meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich ganz besonders für die Unterstützung während des Studiums.

Ganz außerordentlich möchte ich mich bei meinem Ehemann, Jens Peter, unter anderem für die Unterstützung und den Rückhalt in dieser besonderen Zeit und auch während des gesamten Studiums bedanken. Danke für Alles

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Franziska Peter, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:
„Untersuchung zur Gliose im Morbus Niemann-Pick Typ C unter Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Rostock, den 08.02.2018

Franziska Peter

WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Franziska Peter
Geburtsdatum: 06.11.1989
Nationalität: deutsch

Anschrift:
Trägerstraße 13
18055 Rostock
+49 162/6080716
franziska.peter15@gmail.com

Anschrift Universität:
Albrecht-Kossel Institut für Neuroregeneration
Universitätsmedizin Rostock
Gehlsheimer Str. 20
18147 Rostock
+49 381/494 9771
franziska.peter2@uni-rostock.de

AUSBILDUNG

Seit 2014 Albrecht-Kossel Institut für Neuroregeneration, Universitätsmedizin Rostock
Prof. Dr. med. Arndt Rolfs

Doktorandin

Arbeitsgruppe: Zelluläre Neurophysiologie, Dr. Moritz Frech
“Untersuchungen zur Gliose im Morbus Niemann-Pick Typ C unter
Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen“

2011-2013 Universität Rostock
M.Sc., Master Mikrobiologie und Biochemie (Note: 1,3)

Masterarbeit:
Albrecht-Kossel-Institute für Neuroregeneration, Universitätsmedizin
Rostock, Prof Dr. med. Arndt Rolfs
Arbeitsgruppe: Molekulare Genetik, Dr. Jan Lukas
“Charakterisierung niedermolekularer Substanzen zur alternativen Therapie des
Morbus Fabry”

2008-2011 Universität Rostock
B.Sc., Bachelor Biologie (Note: 1,7)

Bachelorarbeit:
Institut für Biochemie, Universität Rostock, Prof. Dr. Birgitt Piechulla

“Isolation von Terpesynthasen aus *Nicotiana* Spezies”

2001-2008 Friderico-Francisceum Gymnasium Bad Doberan
Abitur (Note: 1,6)

1997-2001 Lessing-Grundschule Bad Doberan

QUALIFIKATIONEN

Sprachkenntnisse Englisch (verhandlungssicher, Level C.1.1 GER)
Latein (Latinum)
Spanisch (Grundkenntnisse)

EDV-Kenntnisse MS Office (sehr gute Kenntnisse)
GraphPad Prism (sehr gute Kenntnisse)

BERUFSERFAHRUNG

Seit 2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Albrecht-Kossel Institut für Neuroregeneration, Universitätsmedizin Rostock

2011-2013 Studentische Wissenschaftliche Hilfskraft
Centogene AG, Rostock

LEHRERFAHRUNG

2015 Betreuung eines DAAD/RISE Studenten für 12 weeks
Albrecht-Kossel Institut für Neuroregeneration, Universitätsmedizin Rostock
Lehre von neuen wissenschaftlichen Techniken wie Western Blot, Immunzytochemie und Zellkultur. Betreuung von wissenschaftlichen Projekten zur Charakterisierung von aus iPS-Zellen differenzierten neuronalen Zellen.

Seit 2014 Betreuung des Praktikumsurses zur Lehre von Immunzytochemie
Albrecht-Kossel Institut für Neuroregeneration, Universitätsmedizin Rostock
Kurs: M.Sc. Medizinische Biotechnologie

KONFERENZ-TEILNAHMEN

2017 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society
Göttingen, Deutschland, 22.-25. März 2017
Posterpräsentation:

- “Rescue of Gliosis in Niemann-Pick Type C1 Patient-Specific iPSC Derived Glia Cells”
- 2016 10th FENS Forum of Neuroscience
Kopenhagen, Dänemark, 2.-6. Juli 2016
Posterpräsentation:
“Gliosis in Niemann-Pick Type C1 Patient-Specific iPSC Derived Glia Cells”
- 2015 12th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease
Bilbao, Spanien, 15.-18. Juli 2015
Posterpräsentation:
“Indications for Gliosis in Niemann-Pick type C1 patient-specific iPSC derived neuronal cells.”
- 2015 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society
Göttingen, Deutschland, 18.-21. März 2015
Posterpräsentation:
“Expression of the Cytoskeleton Protein Vimentin is Altered in Niemann-Pick type C1 patient-specific iPSC derived cells”
- 2014 5th German NP-C Forum
Berlin, Deutschland, 5.-6. Dezember 2014
- 2014 6th Scientific Symposium on Niemann-Pick Type C
Frankfurt, Deutschland, 16.-18. März 2014

WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

- Peter, F., Rost, S., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017a. Activation of PKC triggers rescue of NPC1 patient specific iPSC derived glial cells from gliosis. *Orphanet J. Rare Dis.* 12, 145. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0697-y>
- Peter, F.*, Trilck, M.*, Rabenstein, M., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017b. Dataset in support of the generation of Niemann-Pick disease Type C1 patient-specific iPS cell lines carrying the novel NPC1 mutation c.1180T>C or the prevalent c.3182T>C mutation – Analysis of pluripotency and neuronal differentiation. *Data Br.* 12, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.03.042>
- Rabenstein, M*, Peter, F.*, Joost, S., Trilck, M., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017. Decreased calcium flux in Niemann-Pick type C1 patient-specific iPSC-derived neurons due to higher amount of calcium-impermeable AMPA receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 83, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.06.007>

Trilck, M.*, Peter, F.*, Zheng, C., Frank, M., Dobrenis, K., Mascher, H., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017. Diversity of glycosphingolipid GM2 and cholesterol accumulation in NPC1 patient-specific iPSC-derived neurons. *Brain Res.* 1657, 52–61. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.031>

Lukas, J., Pockrandt, A.M., Seemann, S., Sharif, M., Runge, F., Pohlers, S., Zheng, C., Gläser, A., Beller, M., Rolfs, A., Giese, A.K., 2015. Enzyme enhancers for the treatment of fabry and Pompe disease. *Mol. Ther.* 23, 456–464. doi:10.1038/mt.2014.224

Rabenstein, M., Peter, F., Rolfs, A., Frech, M.J., 2017. Impact of Reduced Cerebellar EAAT Expression on Purkinje Cell Firing Pattern of NPC1-deficient Mice. *Sci. Rep.* In Druck

Peter, F., Rost, S., Rolfs, A., Frech, M.J., 2018. Generation of Niemann-Pick disease Type C2 patient-specific iPS cell – Analysis of pluripotency and neuronal differentiation. In Vorbereitung.

MITGLIEDSCHAFTEN

Seit 2014 Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. (NWG)

Seit 2011 Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM)

Rostock, 08.02.2018