



Aus dem Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration

Direktor: Prof. Dr. med. Arndt Rolfs

**Generierung, Charakterisierung und neurale Differenzierung  
von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen –  
ein zelluläres Modell für Morbus Niemann-Pick Typ C1**

Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizinwissenschaften (doctor rerum humanarum)  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von Michaela Trilck  
aus Rostock

Rostock, 2014-07-01

## **Gutachter**

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Arndt Rolfs

Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration  
Universitätsmedizin Rostock  
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree

Institut für Anatomie  
Universitätsmedizin Rostock  
Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Alexander Storch

Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus  
Technische Universität Dresden

**Datum der Einreichung:** 04. Juli 2014

**Datum der Verteidigung:** 17. Dezember 2014

Für meine Eltern, die mir all das ermöglicht haben und mich immer unterstützen.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	8
1.1	Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS).....	8
1.1.1	Neuronale Krankheitsmodelle basierend auf iPS .....	8
1.2	Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) .....	10
1.2.1	Klinische Symptome und Einteilung.....	11
1.2.2	Ursache der Erkrankung .....	12
1.2.3	Zelluläre Manifestation und Biochemie .....	13
1.2.4	Diagnostik und Behandlungsmöglichkeiten.....	14
1.2.5	Tier- und Zellmodelle zur Erforschung von NPC1 .....	15
2	Zielstellung der Arbeit.....	19
3	Material und Methoden .....	20
3.1	Material.....	20
3.2	Zellkultivierung .....	21
3.2.1	Kultivierung von HEK293FT .....	22
3.2.2	Kultivierung von Fibroblasten.....	22
3.2.3	Kultivierung von Feederzellen .....	22
3.2.4	Kultivierung von iPS auf Feederzellen.....	22
3.2.5	Kultivierung von iPS auf Matrikel .....	23
3.2.6	Kultivierung von neuralen Progenitorzellen und neuronalen Zellen.....	23
3.2.7	Kryopräparation .....	24
3.3	Plasmidproduktion zur Virusgenerierung.....	25
3.4	Virusgenerierung und Titerbestimmung.....	25
3.5	Reprogrammierung der Fibroblasten in iPS .....	26
3.6	Karyotypisierung von iPS.....	26
3.7	„Embryoid Body“ (EB)-Bildung .....	26
3.8	Teratominduktion in immundefizienten Mäusen .....	27
3.9	Induktion neuraler Progenitorzellen und neuronale Differenzierung.....	27
3.10	Wachstumskurven .....	28
3.11	Färbungen .....	28
3.11.1	Alkalische Phosphatase-Färbung.....	28
3.11.2	Fixierung der Zellen für immunzytochemische Färbungen .....	28
3.11.3	Immunzytochemische Färbung von iPS .....	28

INHALTSVERZEICHNIS

---

3.11.4 Immunzytochemische Färbung von „Embryoid Bodies“ .....	29
3.11.5 Immunzytochemische Färbung von NPZ und NDZ .....	29
3.11.6 Nachweis von freiem Cholesterol mittels Filipin-Färbung .....	29
3.11.7 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Teratompräparaten .....	30
3.12 Durchflusszytometrie .....	30
3.12.1 Zellernte und Fixierung für durchflusszytometrische Analysen .....	30
3.12.2 Durchflusszytometrische Analysen neuronaler und glialer Marker .....	30
3.13 Elektrophysiologische Messungen .....	31
3.14 Bestimmung von Protein- und Cholesterolgehalt .....	31
3.14.1 Zellaussaat, -ernte und -aufschluss .....	31
3.14.2 Protein- und Cholesterolbestimmung .....	32
3.15 Statistische Analysen .....	32
4 Ergebnisse .....	33
4.1 Charakterisierung der verwendeten Fibroblasten .....	33
4.2 Retrovirale Reprogrammierung der Fibroblasten in iPS .....	35
4.3 Charakterisierung der generierten iPS-Linien .....	36
4.3.1 Analyse des Karyogramms .....	38
4.3.2 Nachweis der Pluripotenz <i>in vitro</i> mittels spezifischer Markerexpression .....	39
4.3.3 Nachweis der Pluripotenz <i>in vitro</i> mittels Differenzierungsfähigkeit .....	42
4.3.4 Nachweis der Pluripotenz <i>in vivo</i> mittels Differenzierungsfähigkeit .....	45
4.3.5 Darstellung des NPC1-Phänotyps in iPS .....	47
4.3.6 Analyse des Cholesterolgehaltes in iPS .....	49
4.4 Differenzierung der iPS in neurale Progenitorzellen .....	50
4.4.1 Bestimmung der Zellwachstumsraten .....	51
4.4.2 Charakterisierung der neuralen Progenitorzellen .....	52
4.4.3 Darstellung des NPC1-Phänotyps in NPZ .....	52
4.4.4 Analyse des Cholesterolgehaltes in NPZ .....	53
4.5 Differenzierung der neuralen Progenitorzellen in neuronale Zellen .....	54
4.5.1 Untersuchung der Morphologie .....	54
4.5.2 Analyse der Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie .....	57
4.5.3 Analyse neuronaler und glialer Marker mittels Immunzytochemie .....	59
4.5.4 Elektrophysiologische Untersuchungen der NDZ .....	67
4.5.5 Darstellung des NPC1-Phänotyps in 2 und 6 Wochen differenzierten Zellen .....	68

INHALTSVERZEICHNIS

---

4.5.6 Analyse des Cholesterolgehaltes in 2 und 6 Wochen differenzierten Zellen .....	69
4.6 Behandlung der unterschiedlichen Zelltypen mit LDL .....	70
4.6.1 Darstellung des NPC1-Phänotyps nach LDL-Behandlung in iPS .....	70
4.6.2 Analyse des Cholesterolgehaltes nach LDL-Behandlung in iPS .....	74
4.6.3 Darstellung des NPC1-Phänotyps nach LDL-Behandlung in NPZ .....	76
4.6.4 Analyse des Cholesterolgehaltes nach LDL Behandlung in NPZ .....	77
4.6.5 Darstellung des NPC1-Phänotyps nach LDL-Behandlung in 2 und 6 Wochen differenzierten Zellen .....	78
4.6.6 Analyse des Cholesterolsgehaltes nach LDL-Behandlung in 2 und 6 Wochen differenzierten Zellen sowie vergleichsweise in Fibroblasten .....	80
4.7 Nachweis von GM2 in NPZ und NDZ .....	81
4.7.1 Nachweis von GM2 in NPZ .....	82
4.7.2 Nachweis von GM2 in NDZ .....	82
5 Diskussion .....	86
5.1 Generierung der ersten NPC1-patientenspezifischen iPS .....	86
5.2 Differenzierung der iPS in NPZ und NDZ zur Generierung des ersten iPS-basierten neuronalen <i>in vitro</i> -Modells für NPC1 .....	87
5.3 NPC1-Phänotyp .....	90
5.3.1 Cholesterolakkumulationen in Fibroblasten .....	90
5.3.2 Cholesterolakkumulationen in iPS .....	90
5.3.3 Cholesterolakkumulationen in NPZ .....	90
5.3.4 Cholesterolakkumulationen in NDZ .....	91
5.3.5 Cholesterolakkumulationen nach LDL-Behandlung .....	92
5.3.6 Cholesterolwerte in anderen NPC1-Modellen .....	93
5.3.7 GM2-Akkumulation .....	94
5.3.8 Zusammenfassung NPC1-Phänotyp .....	95
5.4 Vergleich des generierten humanen neuronalen NPC1-Modells mit bereits bestehenden neuronalen NPC1-Modellen .....	96
5.5 Ausblick .....	98
6 Zusammenfassung .....	101
7 Referenzen .....	103
8 Abkürzungen .....	116
9 Anhang .....	117
Danksagung .....	128

INHALTSVERZEICHNIS

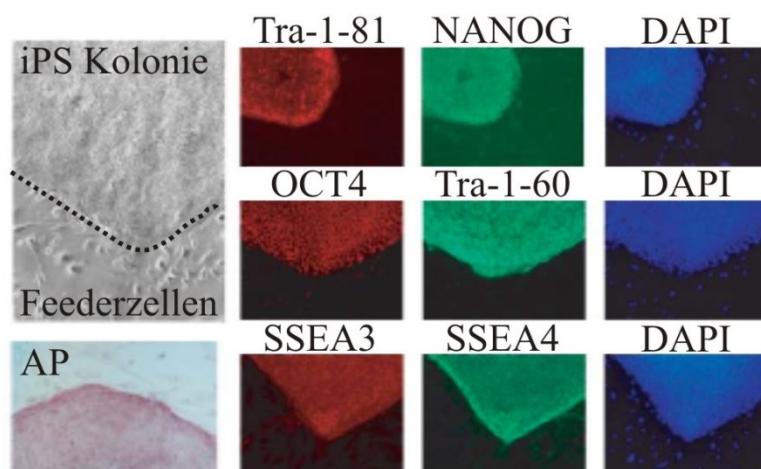
---

Eidesstattliche Erklärung.....	129
--------------------------------	-----

## 1 Einleitung

### 1.1 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)

Die Methodik der Reprogrammierung somatischer Zellen in den Zustand pluripotenter Stammzellen (Takahashi *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008b) stellte 2007 einen Meilenstein in der Humanforschung dar und wurde 2012 mit der Verleihung des Nobelpreises an Sir John B. Gurdon und Professor Shinya Yamanaka gewürdigt. Die ethische Kontroverse der bis dahin aus Embryonen gewonnenen Stammzellen kann umgangen werden, weil die iPS die gleichen Charakteristika wie die embryonalen Stammzellen aufweisen. So wachsen sie in runden bis ovalen Kolonien mit scharf begrenztem Rand, exprimieren gewebeunspezifisch alkalische Phosphatase sowie stammzellspezifische Oberflächenmarker und Transkriptionsfaktoren (Park *et al.*, 2008b; Abb. 1).



**Abb. 1: iPS wachsend in Kolonien**

iPS-Kolonie auf Feederzellen (links oben) zeigt eine ovale Morphologie und einen scharf begrenzten Rand (gestrichelte Linie). iPS exprimieren im Allgemeinen alkalische Phosphatase (AP, links unten) sowie die Transkriptionsfaktoren NANOG und OCT4 und die Oberflächenmarker Tra-1-81, Tra-1-60, SSEA3, SSEA4 – Zellkerne gefärbt mit DAPI (modifiziert aus Park *et al.*, 2008b).

Des Weiteren können sie durch ihr pluripotentes Potential in verschiedenste Zellen der drei Keimblätter differenzieren, wie z. B. in Kardiomyozyten (Gai *et al.*, 2009), Motoneurone (Karumbayaram *et al.*, 2009) und Insulin-produzierende Pankreaszellen (Zhang *et al.*, 2009). Dabei bleiben die genetischen Informationen der Ursprungszellen erhalten und führen zu patientenspezifischen Zelllinien. Diese Eigenschaften werden vor allem genutzt, um Krankheiten *in vitro* zu modellieren.

#### 1.1.1 Neuronale Krankheitsmodelle basierend auf iPS

Die Pluripotenz der iPS eröffnet Zugang zu Zellen, die bisher in der Forschung nur sehr begrenzt oder gar nicht verfügbar waren, was insbesondere für humane neuronale Zellen

## EINLEITUNG

---

gilt. Die zu Grunde liegenden patientenspezifischen somatischen Zellen sind unter anderem kommerziell verfügbar und ermöglichen somit die Reprogrammierung in iPS. Park und Kollegen beschrieben bereits 2008 die ersten patientenspezifischen iPS für verschiedene Erkrankungen (Park *et al.*, 2008a). Die sich anschließende Differenzierung in einen neuronalen Zelltyp ist auf unterschiedliche Weise möglich (Chambers *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Mohamad *et al.*, 2013) und führt zu humanen neuronalen Zellen mit krankheitsspezifischem Phänotyp. Neben dem Nachteil der langen Generierungsdauer überwiegen die Vorteile der Langzeitlagerung, massiven Expansionsfähigkeit sowie der Zugang zur biologischen Vielfalt der krankheitsbedingenden humanen Mutationen. Die iPS basierten *in vitro*-Krankheitsmodelle werden im Allgemeinen für folgende Zwecke genutzt:

- Untersuchung der Erkrankung zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen,
- Genotyp-Phänotyp-Korrelationen,
- Biomarkeridentifikation zur Prädiktion und Diagnostik,
- Identifikation von therapeutisch adressierbaren Zielstrukturen oder Signalwegen,
- Tests von chemischen Substanzen als mögliche Medikamente sowie ihre Toxizitätslevel,
- Zuordnung bestimmter Genotypen zu Medikamentenrespondergruppen sowie
- Studien zur autologen Zellersatztherapie.

Es sind für verschiedene neuronale Erkrankungen bereits patientenspezifische iPS sowie deren neuronale *in vitro*-Modelle generiert worden. Die am häufigsten auftretende neurodegenerative Erkrankung ist der Morbus Alzheimer und affektiert Neurone im Kortex (Reitz & Mayeux, 2014). Die ersten patientenspezifischen iPS wurden 2011 generiert, charakterisiert und weiter in Neurone differenziert (Yagi *et al.*, 2012). Sie präsentierte den Alzheimer-Phänotyp durch erhöhte Amyloid-beta 42-Sekretion, die mittels Gammasekretase-Inhibitoren beeinflusst werden konnte. Das generierte neuronale *in vitro*-Modell erfüllte dadurch alle Anforderungen zum Substanzscreening. 2012 nutzte eine andere Arbeitsgruppe iPS von verschiedenen Alzheimer-Patienten zur neuronalen Differenzierung und stellte erhöhte Level an Phosphotau, aktiverter Glykogensynthasekinase-3 beta und Amyloid-beta 1 bis 40 sowie RAB5-positive frühe Endosomen in Abhängigkeit zu einzelnen Alzheimer-Klassifizierungen fest (Israel *et al.*, 2012). Des Weiteren konnten Phosphotau und aktivierte Glykogensynthasekinase-3 beta nach Behandlung mit Betasekretase-Inhibitoren reduziert werden. Dieses iPS-basierte neuronale Modell lieferte Ansatzpunkte zu Phänotypassoziationsstudien sowie Analysen des Pathomechanismus in Neuronen von Alzheimer-Patienten. In den letzten drei Jahren konnte der Pathomechanismus von Alzheimer mit Hilfe der iPS-basierten neuronalen *in vitro*-Systeme weiter untersucht werden und gab Aufschluss über eine mutationsassoziierte partielle Gammasekretase-Inaktivierung (Koch *et al.*, 2012), Amyloid-beta-assoziierten endoplasmatischen und oxidativen Stress (Kondo *et al.*, 2013) und ermöglichte außerdem die verbesserte Modellierung des Morbus Alzheimer in einer 3D-Zellkultur (Zhang *et al.*, 2014).

## EINLEITUNG

---

Für den Morbus Parkinson, die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung in der Bevölkerung, bedingt durch den Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia Nigra (Surmeier & Sulzer, 2013), sind bereits 2008 die ersten patientenspezifischen iPS generiert worden (Park *et al.*, 2008a). Diese wurden jedoch nur charakterisiert und erst 2011 wurde ein neuronales Modell, basierend auf patientenspezifischen viral reprogrammierten iPS, beschrieben (Nguyen *et al.*, 2011). Die generierten dopaminergen Neurone exprimierten sowohl mehr alpha-Synuclein als auch mehr oxidativer Stress-assoziierte Gene. In einer anderen Studien wurden ebenfalls patientenspezifische iPS in dopaminerger Neurone differenziert und exprimierten doppelt so viel alpha-Synuclein wie die gesunden Vergleichszellen eines Verwandten ersten Grades (Devine *et al.*, 2011). In beiden Studien wurden die generierten iPS in den gleichen neuronalen Subtyp differenziert und modellierten den Parkinsonphänotyp *in vitro* vergleichbar mit dem im menschlichen Gehirn. Eine andere Studie konnte unter Verwendung des iPS-basierten neuronalen Parkinson-Modells eine veränderte Translokation der Ligase Parkin aus dem Zytosol zu geschädigten Mitochondrien in Abhängigkeit zum Parkinson-Risikoprotein PINK nachweisen (Seibler *et al.*, 2011). Dadurch konnten frühere Ergebnisse erstmals im humanen neuronalen *in vitro*-System bestätigt werden. Das *in vitro*-Modell wurde des Weiteren genutzt, um mögliche Pharmaka zu testen, wie z.B. Koenzym Q10, Rapamycin oder der LRRK2-Kinaseinhibitor GW5074, welche mitochondrial bedingte Defizite ausgleichen konnten (Cooper *et al.*, 2012).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass iPS-basierte neuronale Zellmodelle vermehrt genutzt werden, um neurodegenerative Erkrankungen *in vitro* zu modellieren. Für häufig auftretende neurodegenerative Erkrankungen sind iPS bereits vor mehreren Jahren generiert und charakterisiert worden. In ihren neuronalen Derivaten wird der Krankheitsphänotyp nachgewiesen, bisherige Erkenntnisse auf neuronaler Ebene überprüft, neue Erkenntnisse der zugrunde liegenden pathologischen Zellaktivitäten gewonnen sowie intensive Pharmaforschung betrieben.

Im Gegensatz dazu sind für viele seltene neuronale Erkrankungen bisher keine iPS generiert worden und es fehlt demnach ein humanes neuronales Modell, um die oben genannten Punkte untersuchen zu können. Eine dieser Erkrankungen ist der Morbus Niemann-Pick Typ C1.

### 1.2 Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1)

Niemann-Pick Typ C1 ist eine panethnische neurodegenerative autosomal rezessiv vererbte lysosomale Stoffwechselkrankheit und zählt mit einer Prävalenz von 1:120.000 Lebendgeburten zu den seltenen Erkrankungen (Patterson *et al.*, 2012). Verursacht wird diese lysosomale Speichererkrankung durch Mutationen im NPC1-Gen und führt häufig innerhalb der ersten zwei bis drei Lebensdekaden zum Tod des Patienten. Nach ihrer Entdeckung von Albert Niemann und Ludwig Pick in den 1920er Jahren wird sie heute knapp 100 Jahre später auf Grund des breiten klinischen Spektrums von vielen Ärzten nicht oder erst sehr spät diagnostiziert (Vanier, 2010).

## EINLEITUNG

### 1.2.1 Klinische Symptome und Einteilung

Die klinischen Symptome für NPC1 lassen sich in systemische und neurologische unterscheiden. Zu den Systemischen zählen vor allem neonataler Ikterus, Hepatomegalie, Splenomegalie und damit assoziierte gastrointestinale Störungen (Patterson *et al.*, 2013). Aktuell wird ebenfalls ein assoziiert Morbus Crohn diskutiert (persönliche Korrespondenz mit Dr. T. Schwerd, Oxford, UK). Die neurologischen Symptome sind mannigfaltig und umfassen folgende Manifestationen: vertikale Blickparese, Dysarthrie, Dysphagie, progressive Demenz, zerebellare Ataxie, Lachen-induzierte Kataplexie, Dystonie und Krampfanfälle (Vanier, 2010). Diese schwere neurologische Manifestation ist mit einer progressiven Neurodegeneration assoziiert und bedingt den schweren klinischen Phänotyp.

NPC1 wird anhand des Beginns neurologischer Symptome und deren Ausprägung unterteilt in eine frühe infantile, späte infantile, juvenile und adulte Form. In Abb. 2 sind diese Formen in Kombination mit ihren systemischen und neurologischen Manifestationen dargestellt.

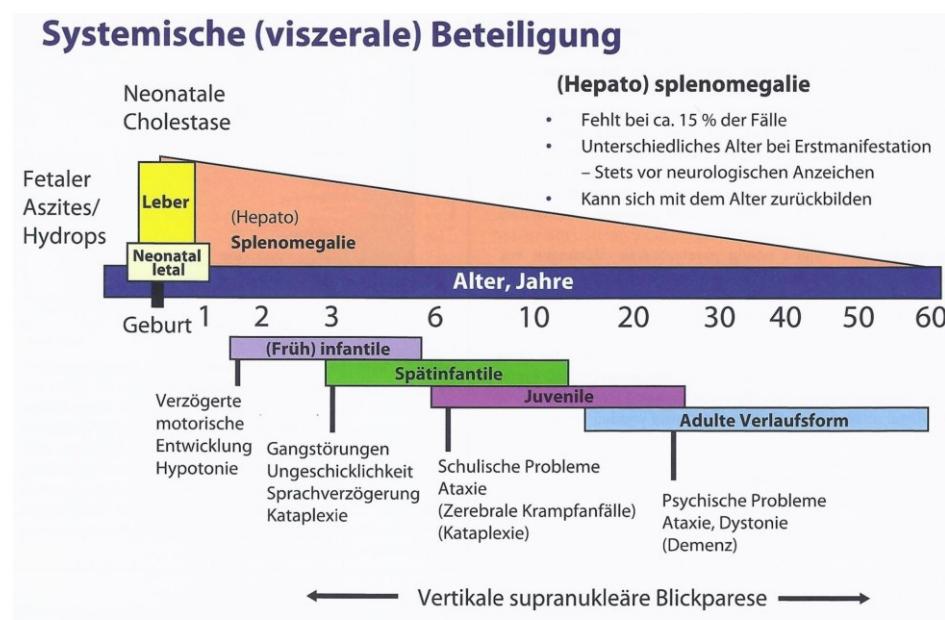


Abb. 2: Darstellung der unterschiedlichen Formen von NPC1 basierend auf ihren beginnenden neurologischen Symptomen (übersetzte Version von Vanier, 2010)

Die frühe infantile Form ist durch fehlende motorische Entwicklung und Hypotonie gekennzeichnet, wohingegen sich die späte infantile Form durch Gangstörungen, Tollpatschigkeit, Sprachstörungen und Kataplexie definiert. Mit dem Ausbruch von NPC1 im juvenilen Alter zeigen Patienten schulische Probleme, Ataxie sowie meist Kataplexie und Krampfanfälle. Die Patienten mit der adulten Form haben psychiatrische Probleme und zeigen neben Ataxie und Dystonie häufig auch Demenz. In der späten infantilen, juvenilen und adulten Form kann die typische vertikale Blickparese beobachtet werden. Die nicht zwingend auftretende, aber meist vorhandene Splenomegalie ist ab Geburt vorhanden, scheint aber mit den späteren Manifestationsformen ein geringeres Ausmaß zu

## EINLEITUNG

zeigen. Ausgehend von der infantilen und juvenilen Form verstirbt der Patient oft vor dem Erreichen des Erwachsenenalters.

### 1.2.2 Ursache der Erkrankung

Verursacht wird Morbus Niemann-Pick Typ C in 95 % der Fälle durch Mutationen in dem auf Chromosom 18q11 liegenden NPC1-Gen (Carstea *et al.*, 1997). Nur in 5 % der Fälle ist eine Mutation im NPC2-Gen vorhanden, welches auf Chromosom 14q24 lokalisiert ist (Naureckiene *et al.*, 2000). Das NPC1-Gen besteht aus rund 57.000 Basenpaaren und wurde das erste Mal 2002 vollständig von unserer Arbeitsgruppe unter Berücksichtigung aller Exons und Spleißstellen sowie der Promotorregion sequenziert (Bauer *et al.*, 2002). Es kodiert ein 1.278 Aminosäuren großes ubiquitär vorkommendes transmembranöses Protein mit 13 Transmembrandomänen, 7 luminalen und 6 zytoplasmatischen Schleifen (Davies & Ioannou, 2000; Abb. 3). Lokalisiert ist es in späten Endosomen und Lysosomen sowie im Transgolgi-Netzwerk (Higgins *et al.*, 1999), wo es an Stoffwechseltransportprozessen beteiligt ist.

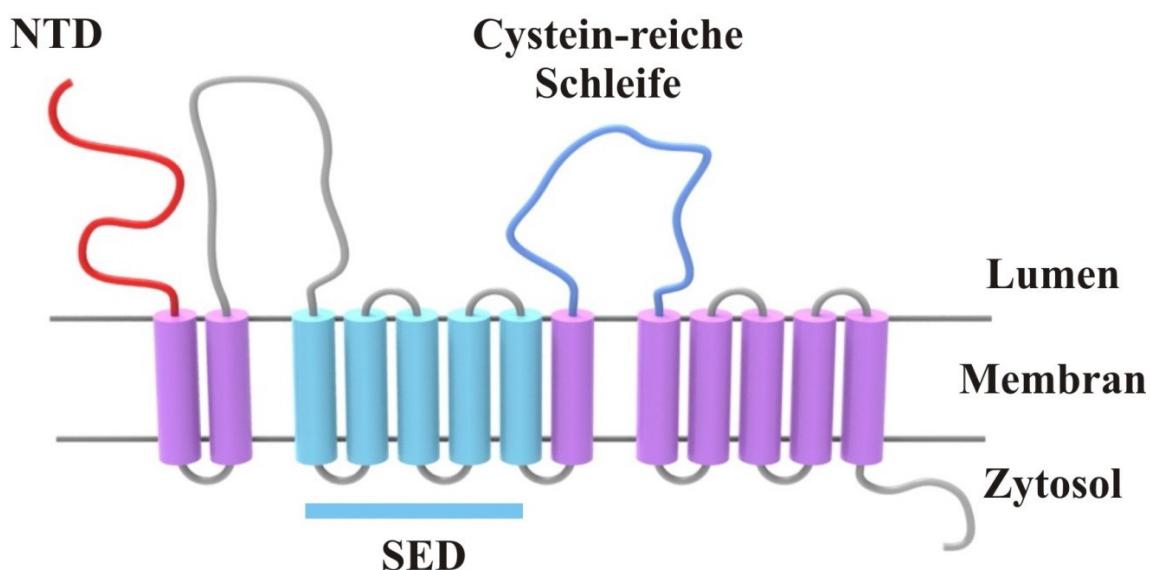


Abb. 3: Struktur des NPC1-Proteins

Das NPC1 Protein besteht aus 13 Transmembrandomänen, 7 luminalen und 6 zytoplasmatischen Schleifen. Die N-terminale Domäne (NTD) ist evolutionär stark konserviert. In der Sterol-erkennenden Domäne (SED) sowie in der luminalen Cystein-reichen Schleife treten häufig Mutationen auf (angelehnt an Lloyd-Evans & Platt, 2010).

Derzeit sind rund 300 NPC1-Mutationen in der humanen Genmutationsdatenbank HGMD (Stenson *et al.*, 2003) gelistet, wobei die Tendenz steigend ist. Es existieren keine allgemein gültigen Genotyp-Phänotyp-Korrelationen ausgehend von homozygoten und compound heterozygoten Mutationen per se. Die NPC1-Mutationen sind in allen Domänen zu finden, wobei, basierend auf der Lokalisation im NPC1-Protein, unterschiedliche Formen assoziiert sein können. So geht man davon aus, dass vorzeitige Stoppkodonmutationen im Allgemeinen, einige Missensmutationen in der Sterol-erkennenden Domäne im Speziellen sowie die Mutation A1054T in der Cystein-reichen

## EINLEITUNG

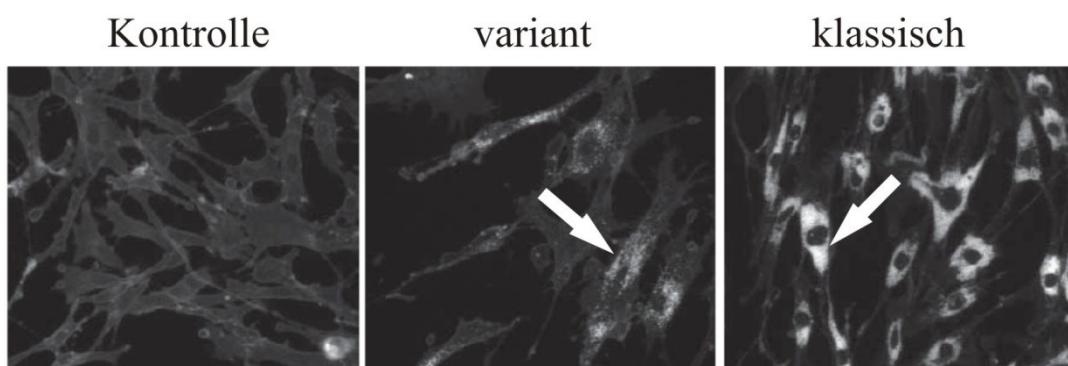
luminalen Schleife zu einer infantilen Form von NPC1 führen. Dagegen führen Missensmutationen in der Cystein-reichen luminalen Schleife zu völlig unterschiedlichen Krankheitsformen (Millat *et al.*, 2001). Die Mutationen im NPC1-Gen bedingen aber alle eine gestörte Funktionsweise des NPC1-Proteins, was letztendlich zu Veränderungen des Cholesteroltransportes führt.

### 1.2.3 Zelluläre Manifestation und Biochemie

Wie genau der intrazelluläre Lipidtransport durch das NPC1-Protein vermittelt wird, ist derzeit noch ungeklärt. Vermutet wird ein NPC1-vermittelter vesikulärer Transport von Cholesterol und Glykolipiden (Neufeld *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001) oder aber die Funktionsweise von NPC1 als transmembranöse Effluxpumpe (Davies *et al.*, 2000). Es wird weiterhin angenommen, dass essentielle Interaktionen mit dem NPC2-Protein statt finden (Sleat *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2008; Deffieu & Pfeffer, 2011), welches ubiquitär intrazellulär in den Lysosomen lokalisiert ist (Naureckiene *et al.*, 2000). Andere Studien sprechen sich jedoch dagegen aus (Zhang *et al.*, 2003; Goldman & Krise, 2010; Kennedy *et al.*, 2012).

Unabhängig von der Funktionsweise resultieren NPC1-Mutationen vornehmlich in Akkumulationen von freiem Cholesterol in den späten Endosomen und Lysosomen. Systemisch treten zusätzlich vor allem in Leber und Milz Anreicherungen von Sphingomyelin, Glykosphingolipiden sowie Bis(monoacylglycerophosphat auf (Vanier, 1983). Im Gehirn dagegen akkumulieren neben dem freien Cholesterol besonders Glykosylzeramide, Laktosylzeramide sowie die Glykosphingolipide GM2 und GM3 (Vanier, 1999).

Die ubiquitäre Akkumulation von freiem, nicht verestertem Cholesterol wird genutzt, um NPC1-Defizienzen nachzuweisen. Dazu wird mit dem fluoreszierendem Polyen-Makrolid Filipin, isoliert aus *Streptomyces filipinensis*, gefärbt (Norman *et al.*, 1972). Mit seiner hohen Affinität zu nicht verestertem Cholesterol resultiert eine Filipin-Färbung in NPC1-defizienten Zellen in einem stark fluoreszierenden Muster um den Zellkern (Abb. 4). Genutzt wird diese Methode unter anderem in der Diagnostik von NPC1.



**Abb. 4: Filipin-Färbung von Fibroblasten**

Schwarz-Weiß-Bild einer Filipin-Färbung von Fibroblasten gesunder Probanden (Kontrolle) sowie NPC1-Patienten mit variantem (wenige Cholesterolakkumulationen) und klassischem (viele Cholesterolakkumulationen) biochemischem Phänotyp. Pfeile zeigen auf angefärbte Cholesterolakkumulationen in den Zellen (modifiziert aus Tängemo *et al.*, 2011).

## EINLEITUNG

---

### 1.2.4 Diagnostik und Behandlungsmöglichkeiten

Zeigt ein Patient neuroviszerale Symptome, kann ein Punktesystem zur Prädiktion von NPC1 hinzugezogen werden (Wraith *et al.*, 2014). Zur Diagnose von NPC1 werden dann zwei kombinierte Methoden verwendet. Zum einen wird eine Hautbiopsie vorgenommen und daraus eine Fibroblastenkultur des Patienten angelegt. Die Zellen werden mit Filipin gefärbt und anhand ihres fluoreszierenden Färbemusters beurteilt. Es wird dabei zwischen einem biochemisch klassischen Phänotyp mit vielen Cholesterol-gefüllten Vesikeln und einem biochemisch varianten Phänotyp mit nur wenig nachweisbaren Cholesterolakkumulationen unterschieden (Vanier *et al.*, 1991; Abb. 4). Mitunter resultieren Filipin-Färbungen aber auch in falsch negativen Ergebnissen, so dass zusätzlich genetische Analysen durchgeführt werden. Zum anderen wird das NPC1-Gen des Patienten sequenziert, wozu die DNA aus den Fibroblasten oder aber aus Lymphozyten gewonnen wird. Die Ergebnisse beider Untersuchungen werden zusammen ausgewertet, um dann die Diagnose stellen zu können.

Es ist außerdem möglich, in Knochenmarkbiopsien von NPC1-Patienten Cholesterol-gefüllte Makrophagen, die als Schaumzellen deklariert werden, nachzuweisen (Rodrigues *et al.*, 2006). Jedoch ist die Probengewinnung stark invasiv und die Belastung mit Schaumzellen nicht grundsätzlich vorhanden oder tritt erst im späteren Krankheitsverlauf auf (Patterson *et al.*, 2012).

Um eine minimal invasive, möglichst genaue Diagnostik zu ermöglichen, wurde nach Biomarkern für NPC1 geforscht. Von einer amerikanischen Forschergruppe wurden 2010 im Plasma nachweisbare Oxysterole als Biomarker etabliert (Porter *et al.*, 2010). Dieser Biomarker wird seitdem auch in der Diagnostik eingesetzt und liefert zusammen mit den genetischen Analysen eindeutige Ergebnisse. Eine andere Forschergruppe stellte kürzlich die Verwendung von Lysotracker als einen möglichen Biomarker für Verlaufskontrollen vor (Te Vruchte *et al.*, 2014). Mit diesem kommerziellen Fluoreszenzfarbstoff zum Markieren von sauren Zellorganellen, wie z. B. Lysosomen, wird in B-Lymphozyten das relative saure Kompartimentvolumen bestimmt, welches allgemein in Patientenzellen mit lysosomalen Stoffwechselerkrankungen größer ist als in Zellen von gesunden Probanden. Unsere eigene Arbeitsgruppe wird zeitnah einen anderen Biomarker basierend auf Lysosphingomyelin vorstellen (noch unveröffentlicht).

Die möglichst frühe Diagnose von NPC1 ist sehr wichtig, da die einmal eingetretene Neurodegeneration irreversibel ist und sich der Krankheitsverlauf nicht stoppen, sondern nur durch eine Behandlung verzögern lässt. Dies wird mit der Gabe von Miglustat (N-butyldeoxyojirimycin) erreicht, welches ein Iminozucker ist und als kompetitiver Inhibitor des Enzyms Glycosylceramidsynthase wirkt (Butters *et al.*, 2000). Dadurch wird die Akkumulation der Glycosphingolipide reduziert, der Beginn neurologischer Symptome verzögert, die Lebensdauer verlängert und letztendlich die Progression verlangsamt (Pineda *et al.*, 2009). Neben der Gabe von Miglustat werden grundlegend die Symptome des Patienten behandelt z. B. durch Antidepressiva, Antiepileptika, Physiotherapie, Psychotherapie und unter Umständen Lebertransplantationen. Angehörige werden gegebenenfalls in der Pflege der Patienten geschult und finden Unterstützung in Selbsthilfegruppen.

## EINLEITUNG

---

Die Behandlung von NPC1-Patienten mit Miglustat ist bisher die einzige durch die *European Medicines Agency* zugelassene Therapieoption mit der Möglichkeit, dem Krankheitsprogress entgegenzuwirken. Jedoch ist die Neurodegeneration weder aufzuhalten noch umzukehren und daher sind weitere intensive Forschungen zur Krankheitsursache von NPC1 und möglicher therapeutischer Ziele von großem Interesse. Insbesondere sind hier Cyclodextrin (Aqul *et al.*, 2011) und Histondeacetylase-Inhibitoren (Pipalia *et al.*, 2011) zu erwähnen, die im NPC1-Mausmodell bzw. humanen Fibroblasten mit NPC1-Mutation bereits einen positiven Effekt zeigten und momentan in amerikanischen Phase I-Studien bzw. Phase II-Studien getestet werden (U.S. National Institutes of Health, [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov), URL: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01747135?term=npc1&rank=6> bzw. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02124083?term=npc1&rank=7>, 29.06.2014).

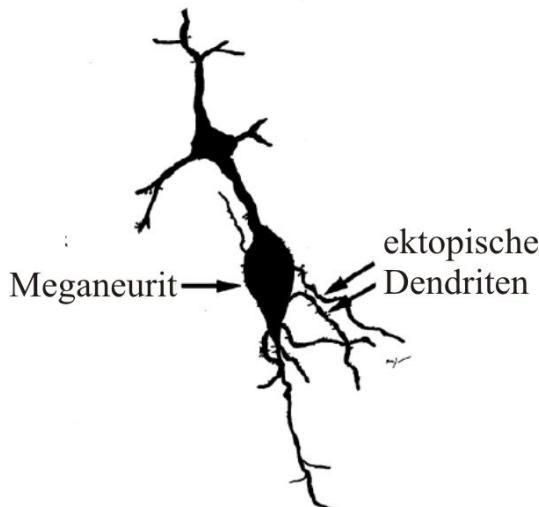
### 1.2.5 Tier- und Zellmodelle zur Erforschung von NPC1

Zur Erforschung von NPC1 werden unterschiedliche Zell- und Tiermodelle genutzt. Da die N-terminale Sequenz im NPC1-Gen evolutionär stark konserviert ist (Karten *et al.*, 2009), können für verschiedene Fragestellungen einfache Modellorganismen verwendet werden, wie z. B. der Pilz *Fusarium graminearum* (Breakspear *et al.*, 2011), der Nematode *Caenorhabditis elegans* (Sym *et al.*, 2000), der Zebrafisch *Danio rerio* (Schwend *et al.*, 2011) sowie die Fliege *Drosophila melanogaster* (Huang *et al.*, 2005). In allen diesen Modellen wird die NPC1-Defizienz durch genetische Manipulation induziert. Sie sind auf Grund ihrer einfachen Haltung und schnellen Reproduktionsrate sehr beliebt und werden vorwiegend für Entwicklungs- und Homologiestudien sowie genetische Heilungsversuche und Substanzscreenings genutzt.

Neben diesen sehr einfachen Systemen existieren verschiedene Säugetiermodelle, die die neuroviszeralen Symptome im Menschen besser darstellen können. Das weitverbreitetste Tiermodell ist das Mausmodell aus dem BALB/c-Stamm mit einer Leserastermutation im NPC1-Gen (Pentchev *et al.*, 1980; Morris *et al.*, 1982), welche einen kompletten Verlust des NPC1-Proteins bedingt. Vor kurzem wurde ein neues Mausmodell vorgestellt, das die D1005G-Mutation trägt, welche auch im NPC1-Patienten beschrieben ist und einen späten Krankheitsbeginn bedingt (Maue *et al.*, 2012). Es ist außerdem ein Katzenmodell für NPC1 verfügbar (Lowenthal *et al.*, 1990). Die Säugetiermodelle modellieren die neurologischen Gesichtspunkte der Krankheit wesentlich besser als die einfachen Systeme. Im Menschen treten neuronale Ablagerungen von Cholesterin, GM2 und GM3, Bildung von Meganeuriten und ektopischer Dendriten (Abb. 5), axonale Schwellungen sowie Fragmentierungen des Golgi-Apparates in zerebellaren Purkinjezellen und zerebralen kortikalen Neuronen und eine damit einhergehende Neurodegeneration auf (Vanier, 1999; Zervas *et al.*, 2001; Walkley & Suzuki, 2004).

## EINLEITUNG

---



**Abb. 5: NPC1-Neurone mit morphologischen Unterschieden**

Neurone im NPC1-Gehirn zeigen morphologische Änderungen hinsichtlich der Bildung von Meganeuriten und ektopischer Dendriten (modifiziert aus Zervas *et al.*, 2001).

Gleches konnte auch im felinen (Lowenthal *et al.*, 1990; March *et al.*, 1997; Zervas *et al.*, 2001) und/oder murinen System (Higashi *et al.*, 1993; Sarna *et al.*, 2003; Zervas *et al.*, 2001) beobachtet werden. Unterschiede ergeben sich dabei in der jeweilig affektierten Hirnregion bzw. im Zelltyp. So wurde z. B. die Ablagerung von Cholesterin und GM2 vor allem in Neuronen des humanen zerebralen Kortex, Zerebellum und Hippocampus beobachtet (Zervas *et al.*, 2001), während in der Maus die pyramidalen Neurone, Purkinjezellen sowie Neurone des Hirnstamms und des Thalamus betroffen sind (Walkley & Suzuki, 2004).

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe oder in Kooperation wurde bisher das BALB/c-Mausmodell für die NPC1-Forschung genutzt. Im gesamten NPC1-Maushirn sowie im NPC1-Mausrückenmark konnte eine Demyelinisierung nachgewiesen werden (Yan *et al.*, 2011). Die in der Studie ebenfalls präsentierte Analyse der Proteine Sox10, Yin Yang 1 sowie Myelin-Gen-regulierender-Faktor zeigte, dass NPC1 keinen Einfluss auf Sox10 und Yin Yang 1 aufwies, wohl aber zu einem reduzierten Gehalt des Myelin-Gen regulierenden Faktors in Oligodendrozyten führte. Es wurde auf diesen Ergebnissen basierend spekuliert, dass die NPC1-bedingte Neurodegeneration wahrscheinlich doch nicht allein auf einem zellautonomen Prozess in den Neuronen zurückzuführen ist. Des Weiteren wurden in einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit verschiedene Protocadherine im NPC1-Maushirn untersucht (Yan *et al.*, 2014a). Die Analyse zeigte eine veränderte Verteilung einiger Protocadherine im zerebralen Kortex junger Mäuse. In älteren NPC1-Mäusen wurde im Vergleich zu gesunden Wildtypen eine stark reduzierte Protocadherinexpression in Oligodendrozyten des Corpus Callosum sowie in Purkinje- und Granularzellen des Zerebellums festgestellt. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde gemutmaßt, dass die unterschiedliche Expression der Protocadherine im Hirn NPC1-bedingt ist und in Verbindung steht zu neurodegenerativen Effekten. In einer anderen Studie wurde das

## EINLEITUNG

---

Rückenmark von NPC1-Mäusen näher untersucht und festgestellt, dass die Astrozyten- und Mikrogliaaktivität sich ab postnatalem Tag 10 erhöhte (Yan *et al.*, 2014b). Es konnte diesbezüglich eine erhöhte Expression von Interleukin-1 beta und Apolipoprotein E sowie eine verstärkte Aktivität von p36-Mitogen aktiverter Proteinkinase festgestellt werden, was zu axonalen Schwellungen und präsynaptischen Aggregaten im Rückenmark der NPC1-Mäuse ab postnatalem Tag 35 führte. Untersuchungen des olfaktorischen Systems zeigten ebenfalls eine erhöhte Astrozyten- und Mikrogliaaktivität im Riechkolben und im olfaktorischen Kortex (Hovakimyan *et al.*, 2013b). Myelin-ähnliche Ablagerung konnten in fast allen Zellen des zentralen und peripheren olfaktorischen Systems gefunden werden, wobei eine erhöhte Expression von Galectin-3, Cathepsin D und GFAP in den kortikalen Schichten des Riechkolbens festgestellt wurde. Es wird vermutet, dass damit sensorische Defizite einhergehen. Eine Arbeit zu motorischen und kognitiven Fähigkeiten von NPC1-Mäusen nach Dreifachtherapie mit Cyclodextrin, Miglustat und Allopregnanolon zeigte, dass durch die Behandlung die motorischen Dysfunktionen wesentlich verbessert werden konnten (Hovakimyan *et al.*, 2013a). Auf zellulärer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass elektronendichte Einschlüsse in den zerebralen Purkinjezellen sich während der Dreifachtherapie verminderten. Allerdings konnten die kognitiven Leistungen der NPC1-Mäuse nicht von der Therapie profitieren. Es wurde gemutmaßt, dass dieses Phänomen auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Hirnregionen auf die Behandlung zurückzuführen ist.

Es werden bis heute viele Erkenntnisse aus den NPC1-Tiernodellen gewonnen, jedoch können auch die Wirbeltiermodelle nicht alle Krankheitsaspekte widerspiegeln. So lassen sich zum Beispiel die im menschlichen Gehirn auftretende ektopische Bildung von Dendriten nur teilweise in Katzen- bzw. sporadisch in Mäusehirnen nachweisen (Zervas *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu zeigen NPC1-Patienten keine visuellen Symptome, während in Mäusen NPC1-bedingte Veränderungen der Cornea nachgewiesenen werden konnten (Hovakimyan *et al.*, 2011). Außerdem sind die im menschlichen Gehirn vorkommenden neurofibrillären Bündel (ähnlich wie bei Morbus Alzheimer; Suzuki *et al.*, 1995) im NPC1-Mäusehirn nicht nachzuweisen (German *et al.*, 2001). Des Weiteren sind die Zulassung, Haltung, Pflege und Reproduktion der Wirbeltiermodelle sehr zeit- und kostenintensiv.

Deswegen sind neben *in vivo*-Studien natürlich *in vitro*-Studien weit verbreitet. Als einfache *in vitro*-Modelle werden die chinesische Hamsterovarienzelllinie CHO (Watari *et al.*, 1999) oder, um dem menschlichen System näher zu kommen, die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y genutzt (Rodríguez-Pascual *et al.*, 2012). In beiden Zelllinien wird der NPC1-Phänotyp entweder über die Behandlung mit dem Cholesterolsynthaseinhibitor U18666A oder genetisch durch Knockdown des NPC1-Gens induziert, um die Auswirkungen von NPC1 in der Zelle untersuchen zu können. Um jedoch den Einfluss der menschlichen NPC1-Mutationen zu untersuchen, werden für viele Studien Patientenfibroblasten genutzt (Pentchev *et al.*, 1986; Carstea *et al.*, 1997). Ein großer Nachteil ist dabei jedoch, dass sich die Hautzellen grundlegend anders verhalten als die degenerierenden Neurone im Gehirn eines NPC1-Patienten und somit nur partielle Rückschlüsse auf die Pathogenese zulassen.

## EINLEITUNG

---

Der Notwendigkeit eines humanen neuronalen NPC1-Modells wurde versucht gerecht zu werden, indem humane embryonale Stammzellen neuronal differenziert wurden und dann ein Knockdown des NPC1-Gens vorgenommen wurde (Ordonez *et al.*, 2012). Als ein Modell für schwere infantile Formen von NPC1 ist dieses Modell sehr gut geeignet, jedoch kann es nicht den Einfluss verschiedener Mutationen widerspiegeln. 2013 stellte daraufhin eine andere Arbeitsgruppe ein neuronales Modell basierend auf multipotenten adulten Stammzellen (MAS) aus NPC1-Patientenfibroblasten vor (Bergamin *et al.*, 2013). Es ist jedoch durch die Verwendung sehr früher Zellpassagen zur Generierung der MAS stark limitiert.

Keine Arbeitsgruppe hatte bis dahin das Potential patientenspezifischer iPS für die Generierung eines zellulären NPC1-Modells genutzt. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, patientenspezifische NPC1-iPS zu generieren und weiter neuronal zu differenzieren, um ein humanes neuronales *in vitro*-Modell für NPC1 zu erschaffen.

## ZIELSTELLUNG

---

### 2 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein humanes neuronales *in vitro*-Modell für Morbus Niemann-Pick Typ C1 zu generieren.

Die primäre Teilaufgabe bestand darin, die ersten NPC1-iPS zu generieren. Dazu wurden humane Fibroblasten von NPC1-Patienten und gesunden Kontrollpatienten mittels der vier klassischen Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC retroviral reprogrammiert, wobei ferner die Generierung der verwendeten Retroviren in die Aufgabenstellung mit einfloss. Es schloss sich zielführend eine umfassende Charakterisierung der patientenspezifischen iPS an hinsichtlich:

- Analyse der Morphologie,
- Karyotypisierung,
- Expression von verschiedenen Pluripotenzmarkern,
- pluripotentem Differenzierungspotential *in vitro* via „Embryoid Body“-Bildung,
- pluripotentem Differenzierungspotential *in vivo* via Teratominduktion sowie
- Nachweis des NPC1-Phänotyps hinsichtlich der Cholesterolakkumulation in den Zellen.

Darauf basierend war es die Idee, die charakterisierten iPS weiter neural zu differenzieren. Die dabei entstehenden neuralen Progenitorzellen wurden beschrieben bezüglich:

- Morphologie,
- Proliferation,
- Expression von neuralen Progenitormarkern sowie
- Nachweis von Cholesterolakkumulationen als NPC1-Phänotyp.

Schließlich war es das Ziel, die neuralen Progenitorzellen zu terminalen neuronalen Zellen zu differenzieren, um den humanen neuronalen NPC1-Phänotyp *in vitro* zu modellieren. Dazu wurden die generierten Zellen unter folgenden Gesichtspunkten analysiert:

- Morphologie,
- Expression neuronaler Marker,
- neuronale Funktionalität sowie
- Darstellung des NPC1-Phänotyps hinsichtlich Cholesterol- und GM2-Akkumulationen.

Mit der Generierung aller drei Zellarten und ihrer eingehenden Charakterisierung war es die Intention, sowohl die patientenspezifischen NPC1-iPS als auch das darauf basierende humane neuronale *in vitro*-Modell für NPC1 im Rahmen dieser Arbeit zu entwickeln, um es für weiterführende Forschungen nutzen zu können.

MATERIAL UND METHODEN

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

In Tab. 1 sind die verwendeten Zelllinien aufgelistet und in Tab. 2 die benutzen Medien zusammengestellt.

**Tab. 1: Zelllinien**

Zellart	Zelllinie	Zweck	Ursprung
HEK-Zellen (Humane embryonale Nierenzellen)	HEK293FT	Virusgenerierung	Invitrogen, DE-Darmstadt
Humane Fibroblasten (ohne Mutation im NPC1-Gen)	GM05659 [im Text Fibro 1-Kontrolle]	Reprogrammierung	Coriell Institut, US-Camden
	#2062 [im Text Fibro 2-Kontrolle]	Reprogrammierung	Albrecht-Kossel-Institut, DE-Rostock
Humane Fibroblasten (mit Mutation im NPC1-Gen)	A113011 mit homozygoter NPC1-Mutation (c.1180T>C) [im Text Fibro 3-Mutation]	Reprogrammierung	Centogene AG, DE-Rostock
	GM18436 mit heterozygoter NPC1-Mutation (Allel 1 c.1836A>C, Allel 2 c.1628delC) [im Text Fibro 4-Mutation]	Reprogrammierung	Coriell Institut, US-Camden
Embryonale Mausfibroblasten	CF-1 embryonale Mausfibroblasten mit Gammastrahlung inaktiviert	Feederzellen zur iPS Kultivierung	Amsbio, UK-Abingdon

**Tab. 2: Medien**

Name des Mediums	Zusammensetzung des Mediums
Basalmedium	DMEM 10 % Fetales Kälberserum (FKS) 1 % Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep)

MATERIAL UND METHODEN

Name des Mediums	Zusammensetzung des Mediums
Differenzierungsmedium	DMEM 40 % DMEM/F-12 1X B27 0,5 % Pen/Strep
EB-Medium	Knockout DMEM 20 % FKS 1X MEM NEAA 1X GlutaMAX 1X 2-Mercaptoethanol 0,25 % Pen/Strep
LB-Agar	40 g LB-Agar (Luria/Miller) 1 l Reinstwasser 100 µg/ml Ampicillin
LB-Medium	25 g LB-Medium (Luria/Miller) 1 l Reinstwasser 100 µg/ml Ampicillin
mTESR1 Komplettmedium	mTESR1 0,25 % Pen/Strep
Proliferationsmedium	DMEM 40 % DMEM/F-12 1X B27 0,5 % Pen/Strep 20 ng/ml FGF2 20 ng/ml EGF
Stammzellmedium	Knockout DMEM 20 % Knockout Serum Replacement 1X MEM NEAA 1X GlutaMAX 2X 2-Mercaptoethanol 0,25 % Pen/Strep 12,5 ng/ml FGF2

Im Anhang A sind des Weiteren die verwendeten Grundmedien und Zusätze (ggf. mit Konzentrationsangabe und Lösungsmittel, Tab. A.1), Plasmide (Tab. A.2), Bakterien und Tiere (Tab. A.3), Lösungen zum Färben und für Analysen (ggf. mit Konzentrationsangabe und Lösungsmittel, Tab. A.4), Antikörper (mit angewandter Verdünnung, Tab. A.5), Kits und Partikel (Tab. A.6), Software (Tab. A.7), Geräte (Tab. A.8) sowie Verbrauchsmaterialien (Tab. A.9) aufgelistet.

### 3.2 Zellkultivierung

Die Kultivierung aller Zelllinien fand bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> sowie angefeuchteter Luft in Inkubatoren statt.

Es wurden die in Tab. 1 aufgelisteten Zellen für die Generierung der iPS und ihrer neuralen Derivate verwendet.

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 3.2.1 Kultivierung von HEK293FT

Die HEK293FT-Zellen wurden in T75 Kulturflaschen mit einer Zellzahl von  $35 \times 10^3/\text{cm}^2$  in Basalmedium kultiviert und bei einer Zellrasendichte von 80 % passagiert. Nach dem Waschen mit PBS ohne Kalzium und Magnesium (PBS -/-) wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,05 %) enzymatisch vom Flaschenboden bei 37 °C für 3 bis 5 min abgelöst. Die enzymatische Reaktion ist mit Basalmedium gestoppt worden und die Zellen wurden im Anschluss 5 min bei 420 xg zentrifugiert. Nach dem Lösen des Zellpellets in Basalmedium ohne Pen/Strep und der Zellzahlbestimmung mittels CASY-Zellzähler wurden für die Virusgenerierung  $3 \times 10^6$  Zellen/10 cm-Kulturschale ausgesät. Zur Virustiterbestimmung wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/12-well (1 well entspricht einer Kavität in jeweiliger Zellkulturplatte) in Basalmedium ohne Pen/Strep ausgesät.

### 3.2.2 Kultivierung von Fibroblasten

Die in T25 Kulturflaschen wachsenden Fibroblasten wurden in Basalmedium mit einer Dichte von  $28 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> kultiviert. Nach Erreichen einer 95 %igen Dichte wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Fibroblasten mit PBS -/- gewaschen und mit Trypsin-EDTA (0,25 %) bei 37 °C im Inkubator zwischen 5 und 10 Minuten inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen ist die enzymatische Reaktion mit Basalmedium gestoppt worden und die Zellsuspension wurde 5 min bei 420 xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Basalmedium gelöst und mittels CASY-Zellzähler wurden Zellzahl und Vitalität bestimmt. Für die unterschiedlichen Versuche wurde wie folgt ausgesät:  $1 \times 10^5$  Zellen/3,5 cm-Kulturschale zur Reprogrammierung,  $3 \times 10^5$  Zellen/6-well zur Bestimmung des Cholesterolgehaltes sowie  $6 \times 10^4$  Zellen/Deckglas zur Filipin-Färbung.

### 3.2.3 Kultivierung von Feederzellen

Die als Feederzellen dienenden und mitotisch inaktiven embryonalen Mausfibroblasten wurden für jede Stammzellpassage neu vorbereitet. Hierzu wurden die Feederzellen kurz bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und tropfenweise zum Basalmedium in einem 15 ml-Zentrifugenrörchen gegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 300 xg wurde das Zellpellet in Basalmedium erneut aufgenommen, die Zellzahl mit CASY bestimmt und die Zellen in einer Dichte von  $32,5 \times 10^3/\text{cm}^2$  ausgesät. Für eine bessere Zellhaftung wurden die Kulturgefäße vorher mit Gelatine (0,1 %, in Reinstwasser) für 30 min im Inkubator beschichtet. Die Feederzellen wurden für 24 h inkubiert und konnten anschließend verwendet werden.

### 3.2.4 Kultivierung von iPS auf Feederzellen

Die iPS wachsend auf Feederzellen erhielten täglich einen Mediumwechsel mit Stammzellmedium und wurden alle 5 Tage passagiert. Dazu wurden die vorbereiteten Feederzellen mindestens zwei Stunden vor dem Passagieren mit DMEM/F-12 dreimal gewaschen, um Serumreste des Basalmediums zu entfernen. Durch den anschließenden

## MATERIAL UND METHODEN

---

Mediumwechsel zum Stammzellmedium waren die Feederzellen zum Zeitpunkt des Splitten bereits an das neue serumfreie Medium adaptiert.

Direkt vor dem Splitten wurde auch das Medium der iPS erneuert und mit Y27632 (10  $\mu$ M) versetzt, was die Anhaftung und das Überleben der Zellklumpen verbesserte (Watanabe *et al.*, 2007; Claassen *et al.*, 2009). Das mechanische Splitten wurde mit gebogenen Glashaken durchgeführt, die zuvor aus Glaspasteurpipetten über einer Flamme präpariert worden waren. Mittels dieser Glashaken wurden die Stammzellkolonien in kleinere Stücke gerissen und vom Plattenboden gelöst. Nach dem Zerkleinern von etwa 30 Kolonien wurde von den vorbereiteten Feederzellen das Medium entfernt, das Koloniestücke enthaltende Stammzellmedium mit einer 1000  $\mu$ l-Pipettenspitze mit extra großer Öffnung komplett aufgenommen und auf die frischen Feederzellen übertragen. Um die Koloniestücke gleichmäßig zu verteilen, wurden die Kulturgefäße im Inkubator kurz vorwärts und seitwärts bewegt und daraufhin 24 h nicht bewegt, bis die Koloniestücke angehaftet waren und den ersten Mediumwechsel erhielten.

### 3.2.5 Kultivierung von iPS auf Matrikel

Zur Feederzell-freien Kultivierung der iPS wurden diese auf Matrikel beschichteten Kulturgefäßen in mTESR1 Komplettmedium ausgesät. Nach 7-tägiger Proliferation wurden differenzierte Bereiche entfernt und die iPS dreimal mit DMEM/F-12 gewaschen. Die iPS-Kolonien wurden enzymatisch mit Dispase (1 mg/ml) für 8 min bei 37 °C vom Plattenboden leicht gelöst und anschließend wiederum dreimal mit DMEM/F-12 zur Entfernung aller Enzymreste und Einzelzellen gewaschen. Mit einem Schaber wurden die Zellen vom Plattenboden geschabt und mittels einer 1000  $\mu$ l-Pipettenspitze mit extra großer Öffnung in ein 15 ml-Zentrifugenrörchen überführt. Die Kolonien wurden so lange auf- und abpipettiert bis sie homogen zerkleinert waren, aber nicht als Einzelzellsuspension vorlagen. Nach dem Absetzen der Zellhaufen im Zentrifugenrörchen wurde das überschüssige Medium entfernt, frisches Medium hinzugefügt und die zerkleinerten iPS-Kolonien in gewünschter Dichte in Zellkulturplatten mit 12- oder 6-wells ausgesät. Zur optimalen Verteilung der Koloniestücke wurden die Kulturgefäße im Inkubator schnell vorwärts und seitwärts bewegt. Nach 12 h waren die Kolonien erneut angehaftet und konnten mit frischem Medium versorgt werden.

### 3.2.6 Kultivierung von neuralen Progenitorzellen und neuronalen Zellen

Zur Kultivierung der neuralen Progenitorzellen (NPZ) wurden die Kulturgefäße doppelt beschichtet. Zuerst erfolgte eine Beschichtung mit Poly-L-Ornithin (15  $\mu$ g/ml) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) und dreimaligem Waschen mit PBS -/. Anschließend wurde mit Laminin (10  $\mu$ g/ml) überschichtet und ebenfalls mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Vor Aussaat der Zellen wurde mit warmem DMEM/F-12 noch einmal gewaschen.

Die einschichtig wachsenden Progenitorzellen wurden bei einer Zellrasendichte von 100 % passagiert. Dafür wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit Accutase bei 37 °C für 10 bis 20 min vom Flaschenboden gelöst. Nach Aufnahme der Zellsuspension in

## MATERIAL UND METHODEN

Proliferationsmedium wurden die Zellen bei 300 xg für 5 min zentrifugiert und das Pellet erneut in Proliferationsmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels CASY-Zellzähler wurden  $100-112,5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und 3 bis 4 Tage proliferiert.

Zur Differenzierung der NPZ in neuronale Zellen (NDZ) wurde nach der Zellzählung erneut zentrifugiert, die Zellen im Differenzierungsmedium aufgenommen und mit einer Dichte von  $40-45 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Differenzierung fand über einen Zeitraum von 6 Wochen statt und ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage mit frischem Differenzierungsmedium.

### 3.2.7 Kryopräparation

Zur Langzeitlagerung der Zellen wurden diese nach der Zellzählung beim Passagieren erneut zentrifugiert, im entsprechenden Gefriermedium (siehe Tab. 3) aufgenommen und in für Kryopräparation geeignete Kulturgefäße (Kryovials) überführt. Diese wurden daraufhin 12 h bei -80 °C in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter zur konstanten Temperaturabsenkung zwischengelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff zur Langzeitlagerung aufbewahrt.

Tab. 3: Zelllinien-spezifische Gefriermedien und Zellzahlen pro Kryovial

Zell-linien	HEK293FT	Fibro-blasten	iPS (Feeder)	iPS (Matrikel)	NPZ
<b>Gefrier-medium</b>	Basalmedium + 10 % DMSO		50 % Stammzell-medium + 50 % Mix (1:4) aus DMSO und FKS	mFreSR (Stemcell Technologies)	Proliferationsmedium + 10 % DMSO
<b>Zellzahl/ Kryovial</b>	$2 \times 10^6$		~70 Koloniestückchen		$2 \times 10^6$
<b>Kulturgefäß zur Wieder-aussaat</b>	T25 (unbeschichtet)		6-well (Feeder)	6-well (Matrikel)	6-well (PLO/ Laminin)

Um die Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurde das Kryovial schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Dichteausgleich des DMSO enthaltenden Gefriermediums wurde tropfenweise frisches Zelllinien spezifisches Medium dazu gegeben und die Zellen unter den jeweiligen Standardbedingungen für 5 min zentrifugiert. Nach Lösen des Zellpellets im entsprechendem Medium und Ermittlung der Zellzahl sowie Vitalität wurden die Zellen auf den vorbereiteten Kulturgefäßen (siehe Tab. 3) ausgesät und für 18 bis 24 h inkubiert.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Nach einem anschließenden Mediumwechsel wurden die Zellen bei der jeweiligen spezifischen Zelldichte passagiert und nach 2 Passagen erneut für Experimente verwendet.

### 3.3 Plasmidproduktion zur Virusgenerierung

Zur Generierung der Viren wurden folgende Plasmide benötigt: Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC sowie virale Proteine bzw. Enzyme *gag/pol* und vesikuläres Stromatitisvirusglykoprotein VSV-G (siehe Tab. A.2).

Zur Herstellung einer ausreichenden Plasmidmenge wurden je 50 µl kompetenter *Escherichia coli* (JM109) mit jeweils 1 µl Plasmid-DNA vermischt und zur Retransformation 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde daraufhin auf LB-Agarplatten (10 cm, mit 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion) ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden Klone von jeder Platte isoliert und je 200 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Die Inkubation erfolgte für mindestens 14 h bei 37 °C auf einem Schüttler bei 500 U/min. Die Bakterienkulturen wurden bei 5000 xg für 15 min zentrifugiert und die Plasmid-DNA mit dem „Endofree Plasmid Maxi Kit“ laut Herstellerangaben aus dem Zellpellet isoliert. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 250 µl TE-Puffer (im Kit enthalten) aufgenommen und die Menge an DNA photometrisch bestimmt. Die Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

### 3.4 Virusgenerierung und Titerbestimmung

Zur Generierung der retroviralen Partikel mit dem jeweiligen Transkriptionsfaktor (OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC) wurden pro Virus in zehn 10 cm-Kulturschalen je  $3 \times 10^6$  HEK293FT-Zellen in Basalmedium ohne Pen/Strep ausgesät. Nach 20 bis 24 h wurden pro 10 cm-Kulturschale 20 µl Fugene9 mit 300 µl DMEM gemischt und mit 2,5 µg des jeweiligen Transkriptionsfaktor sowie mit 0,25 µg VSV-G und 2,25 µg *gag/pol* versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation wurde das Gemisch tropfenweise zu den HEK293FT-Zellen gegeben und 18 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium durch 7 ml frisches Basalmedium ohne Pen/Strep ersetzt und weitere 30 h inkubiert, in denen die gebildeten Viren ins Medium abgegeben wurden. Der virale Überstand wurde daraufhin von allen 10 cm-Kulturschalen gesammelt, filtriert (Porengröße 0,45 µm), aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Nur bei einer Transduktionseffizienz von 70 bis 80 % bei OCT4, SOX2 und KLF4 sowie 40 bis 50 % bei c-MYC ist eine erfolgreiche Reprogrammierung der Zellen beschrieben (Park *et al.*, 2008b). Der Titer wurde deshalb für jeden Virus separat bestimmt mittels Expression des im Vektor integrierten Gens für das grün fluoreszierende Protein (GFP).

Zur Bestimmung der Effizienz wurden  $1 \times 10^5$  HEK293FT-Zellen/12-well in Basalmedium ohne Pen/Strep ausgesät und sofort mit Protaminsulfat (5 µg/ml) sowie entsprechenden Mengen an Virus versetzt, wobei die Negativkontrolle mit der äquivalenten Mediummenge versetzt wurde. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen, wie unter 3.2.1 beschrieben, abgelöst und die einzelnen Zellpellets in Paraformaldehyd (2 %, in PBS -/-) für 15 min fixiert. Durch eine anschließende durchflusszytometrische Messung mit dem FACS Calibur-Durchflusszytometer und dessen Software „CellQuest Pro“ wurde für jede

## MATERIAL UND METHODEN

---

eingesetzte Virusmenge die Transduktionseffizienz anhand des Anteils der GFP-positiven Zellen an der gemessen Gesamtzellzahl bestimmt. Gegebenenfalls wurde der Versuch für kleinere oder größere Virusmengen wiederholt, bis die gewünschte Viruseffizienz ermittelt war.

### 3.5 Reprogrammierung der Fibroblasten in iPS

Zur Reprogrammierung wurden  $1 \times 10^5$  Fibroblasten/3,5 cm-Kulturschale in Basalmedium ohne Pen/Strep ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Basalmedium durch Virus enthaltendes Medium ersetzt und Protaminsulfat (5 µg/ml) zugefügt. Die Transduktionseffizienz betrug 70-80 % für OCT4, SOX2 und KLF4 sowie 40-50 % für c-MYC. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS mit Kalzium und Magnesium (PBS +++) gewaschen und mit Trypsin-EDTA (0,05 %) abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde mit Basalmedium gestoppt, die transduzierten Fibroblasten unter Standardbedingungen zentrifugiert und dann auf einer mit Gelatine (0,1 %; in Reinstwasser) beschichteten 6 cm-Kulturschale in Basalmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Basalmedium durch Stammzellmedium ersetzt und mit dem Histondeacetylaseinhibitor Valproinsäure (0,5 mM) angereichert. Der Mediumwechsel fand täglich für 7 Tage statt und wurde danach ohne Verwendung von Valproinsäure weitergeführt. 14 bis 35 Tage nach Virusinfektion wurden Stammzellkolonien sichtbar. Für die weitere Kultivierung wurden nur GFP-negative Kolonien mit typischer Morphologie (runde bis ovale Kolonien, scharf begrenzter Kolonierand, homogene Zellverteilung innerhalb der Kolonie) selektiert und auf Feederzellen weiter expandiert. Aus jeder einzelnen Kolonie wurde eine neue Stammzelllinie heran gezogen, so dass alle daraus entstehenden iPS die gleiche genetische Information enthielten.

### 3.6 Karyotypisierung von iPS

Zur Erstellung der Karyogramme wurden die iPS auf Matrikel kultiviert und, wie in 3.2.5 beschrieben, abgelöst. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 µl-Pipette wurden die Kolonien zu einer Zellsuspension vereinzelt. Die weitere Aufarbeitung der Zellen und die Erstellung der Karyogramme mittels R/C-Banding erfolgten durch die Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin der Universität Rostock.

### 3.7 „Embryoid Body“ (EB)-Bildung

Um das pluripotente Potential der iPS *in vitro* nachzuweisen, wurde die EB-Bildung genutzt. Dazu wurden die auf Feederzellen wachsenden iPS-Kolonien nicht zerteilt, sondern im Ganzen mittels gebogenem Glashaken abgelöst und in ein 15 ml-Zentrifugenrörchen überführt. Nach dem Absetzen der Kolonien wurde das Medium abgesaugt und durch EB-Medium ersetzt. Die Kolonien wurden möglichst unzerkleinert in eine Zellkulturplatte mit sehr geringem Anhaftungspotential überführt und im Inkubator für fünf Tage kultiviert. Nach drei Tagen hatten sich die Kolonien bereits eingekugelt und Sphären, so genannte „Embryoid Bodies“, gebildet, die mit frischem Medium versorgt

## MATERIAL UND METHODEN

---

wurden. Die gebildeten EBs wurden dann auf Gelatine (0,1 %, in Reinstwasser) beschichteten Deckgläschen in EB-Medium ausgesät und alle drei Tage wurde das Medium gewechselt. Nach neun weiteren Tagen Differenzierung wurden die angehafteten und ausgebreiteten EBs fixiert (siehe 3.11.2) und gegen folgende Marker exemplarisch für das jeweilige Keimblatt immunzytochemisch gefärbt (siehe 3.11.4): Nestin als Marker des Ektoderms, Muskelaktin als Marker des Mesoderms und alpha-Fetoprotein als Marker des Entoderms (Takahashi *et al.*, 2007; Rodin *et al.*, 2010).

### 3.8 Teratominduktion in immundefizienten Mäusen

Für den Nachweis der Pluripotenz *in vivo* wurden weiblichen, 8 Wochen alten immundefizienten Mäusen Teratome induziert. Zur Teratominduktion wurden iPS-Kolonien wachsend auf Feederzellen aus drei 6-wells geerntet (siehe 3.2.4) und in ein 15 ml-Zentrifugenröhren überführt. Nach 2 min Zentrifugation bei 200 xg wurden die abgesetzten iPS-Kolonien in Trypsin-EDTA (0,25 %) resuspendiert und für eine Minute im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion zur Vereinzelung der iPS wurde mit Basalmedium gestoppt und die Zellen erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM/F-12 gelöst und gewaschen und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 140 µl kalten DMEM/F-12 gelöst und auf Eis gelagert. Direkt vor der Injektion wurde die Zellsuspension mit 60 µl Matrikel gemischt, die Suspension über eine 27G Nadel in eine 1 ml Spritze aufgenommen und der immundefizienten Maus subkutan auf den rechten Oberschenkel appliziert. Die Mäuse wurden nach 12 Wochen bzw. bei Bildung eines 1 cm großen Tumors getötet. Der präparierte Tumor wurde 12 h in Formafix fixiert, paraffiniert und in einen Paraffinblock eingebettet. Mittels eines Mikrotoms wurden 4 µm dicke Schnitte des Tumors angefertigt, in einem 40 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger gezogen. Über Nacht trockneten die Schnitte im Wärmeschrank bei 60 °C und wurden zur Analyse anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (siehe 3.11.7). Die tierexperimentellen Arbeiten waren durch die zuständige Behörde Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V) genehmigt worden und wurden gemäß des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### 3.9 Induktion neuraler Progenitorzellen und neuronale Differenzierung

Für die Induktion neuraler Progenitorzellen wurden iPS nach dem Passagieren auf Matrikel in hoher Dichte ausgesät und nicht weiter passagiert. Durch die einsetzende spontane Differenzierung bildeten sich unter anderem auch neurale Rosetten (Elkabetz *et al.*, 2008). Nach 10 bis 12 Tagen Proliferation wurden die Kolonien mit DMEM/F-12 mehrfach gewaschen und mit Accutase abgelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde daraufhin mit magnetischen Partikeln, an die PSA-NCAM gekoppelt war (siehe Tab. A.6), laut Herstellerangaben sortiert, da PSA-NCAM als Marker neuraler Progenitorzellen gilt (Pennartz *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012) gilt. Die gewonnenen NPZ wurden in Proliferationsmedium auf PLO/Laminin beschichteten (siehe 3.2.6) 12-wells ausgesät und täglich mit frischem Medium versorgt, bis sich ein 100 % dichter Zellrasen gebildet hatte. Während der ersten 5 Passagen wurden die Zellen expandiert und die PSA-NCAM-

## MATERIAL UND METHODEN

---

Selektion wiederholt, um den Reinheitsgrad der Kulturen zu gewährleisten. Für die neuronale Differenzierung wurden die NPZ in Differenzierungsmedium in einer geringen Dichte (siehe 3.2.6) kultiviert und ab da an als NDZ gekennzeichnet.

### 3.10 Wachstumskurven

Zur Analyse der Verdopplungszeit wurden die neuralen Progenitorzellen mit  $12 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 48-wells ausgesät. Nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen wurden aus jeweils drei unabhängigen wells die Zellen, wie in 3.2.6 beschrieben, abgelöst und mittels CASY-Zellzähler analysiert.

### 3.11 Färbungen

#### 3.11.1 Alkalische Phosphatase-Färbung

Die iPS wurden innerhalb der ersten 10 Passagen auf die charakteristische hohe Expression der alkalischen Phosphatase (Takahashi *et al.*, 2007) untersucht. Dazu wurden die Kolonien nach 6 bis 7 Tagen Proliferation mit PBS -/- zweimal gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 10 min bei -20 °C fixiert. Nach einem anschließenden Waschschritt wurden die Kolonien mit der Färbelösung (75 % Reinstwasser, 10 % 1 M Natriumchloridlösung, 10 % 1 M TRIS-Lösung mit pH = 9,8, 5 % 1 M Magnesiumchloridlösung, 1:50 NBT/BCIP Stammlösung) 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zum Abbrechen der kontinuierlichen Färbereaktion wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen mit Reinstwasser bedeckt. Die Färbungen wurden mit Hilfe des inversen Nikon Eclipse TS100-Phasenkontrastmikroskops und der dazugehörigen Software „NIS-Elements F 2.20“ dokumentiert.

#### 3.11.2 Fixierung der Zellen für immunzytochemische Färbungen

Die auf Deckglässchen kultivierten Zellen wurden mit PBS -/- (Fibroblasten, iPS) oder mit PBS +/+ (neurale Progenitorzellen und neuronale Zellen) gewaschen und bei RT für 15 min mit PFA (4 %, in PBS -/-) fixiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Zellen entweder direkt gefärbt oder mit Natriumazid (0,02 %, in PBS -/-) überdeckt und bei 4 °C gelagert.

#### 3.11.3 Immunzytochemische Färbung von iPS

Die fixierten iPS wurden zweimal mit Waschpuffer (PBS -/-, 20 mM TRIS-Hydrochloridlösung pH = 8,5, 0,15 M Natriumchloridlösung, 0,05 % Tween 20) gewaschen und anschließend für 45 min bei RT mit einer Lösung für die Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen und zur Membranpermeabilisierung (PBS -/-, 10 % normales Ziegenserum, 0,1 % Triton-X-100, 1 % BSA) behandelt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proben mit dem ersten Antikörper verdünnt in Erstantikörperlösung (PBS -/-, 0,1 % Triton-X-100, 1 % BSA) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben dreimal gewaschen und mit dem Zweitantikörper verdünnt in PBS -/-

## MATERIAL UND METHODEN

---

für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben mit DAPI (250 ng/ml) zur Darstellung der Zellkerne ebenfalls im Dunkeln für 5 min bei RT überschichtet. Nach erneutem mehrfachem Waschen wurden die Deckgläschen mit Mowileindeckmedium (6 g Glycerol gemischt mit 2,4 g Mowiol 4-88 in 6 ml Reinstwasser, verdünnt in 12 ml 0,2 M Tris-Hydrochloridlösung pH = 8,5 unter Zugabe von 25 mg/ml DABCO) auf Objektträger überführt. Die Präparate wurden über Nacht bei RT im Dunkeln zur Aushärtung gelagert und so dauerhaft konserviert. Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit einem Keyence Biozero 8000-Mikroskop und der dazu gehörigen Software „BZ observation application“.

### 3.11.4 Immunzytochemische Färbung von „Embryoid Bodies“

Zur Analyse des Differenzierungspotentials der iPS *in vitro* wurden die aus den EBs ausgewachsenen Zellen nach der Fixierung (siehe 3.11.2) mit exemplarischen Markern der drei Keimblätter gefärbt: Nestin = Ektoderm, Muskelaktin = Mesoderm, alpha-Fetoprotein = Entoderm (siehe Tab. A.5). Dazu wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (siehe 3.11.3) für 15 min bei RT mit Triton-X-100 (0,1 %, in PBS -/-) permeabilisiert. Nach wiederholtem Waschen wurde daraufhin für 30 min bei RT mit normalem Ziegenserum (4 %, in PBS -/-) geblockt und die Zellen über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper verdünnt in PBS -/- inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter 3.11.3 beschrieben.

### 3.11.5 Immunzytochemische Färbung von NPZ und NDZ

Die fixierten Zellen (siehe 3.11.2) wurden mit PBS +/- gewaschen und mit Blocklösung (PBS +/-, 0,3 % Triton-X-100, 5 % normales Ziegenserum) für 30 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde dreimal gewaschen und der erste Antikörper verdünnt in Antikörperlösung (PBS +/-, 1 % normales Ziegenserum) für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem mehrmaligen Waschen wurden die Proben mit dem Zweitantikörper verdünnt in PBS +/- für 1 h bei RT im Dunkeln gefärbt. Ungebundener Antikörper wurde durch erneutes Waschen entfernt und, wie unter 3.11.3 ausgeführt, weiter verfahren.

Alle Analysen basierend auf Fluoreszenzfärbungen wurden mittels der Software „BZ image analysis application“ durchgeführt. Speziell für die Doppelfärbungen von GM2 mit beta III-Tubulin wurden mindestens 3 verschiedene Fluoreszenzaufnahmen der Färbungen hinsichtlich relativer Fluoreszenzintensität des roten und grünen Kanals analysiert. Der Koeffizient aus beiden Werten wurde als relative Fluoreszenzeinheit dargestellt.

### 3.11.6 Nachweis von freiem Cholesterol mittels Filipin-Färbung

Zur Analyse des Verteilungsmusters von freiem, nicht verestertem Cholesterol in den Zellen wurde die Filipin-Färbung genutzt (Vanier *et al.*, 1991). Dazu wurde die Filipinstammlösung (50 mg/ml) auf 10 mg/ml in DMSO verdünnt und mit PBS -/- zur gebrauchsfertigen Filipinfärbelösung (0,1 mg/ml) weiter verdünnt.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Die bereits fixierten Zellen (siehe 3.11.2) wurden mit PBS -/- gewaschen und anschließend 45 min mit der Filipinfärbelösung bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und mit Mowieleindeckmedium (siehe 3.11.3) eingebettet. Die Objektträger härteten über Nacht im Dunkeln bei RT aus. Aufnahmen wurden mit einem Keyence Biozero 8000-Mikroskop und der dazu gehörigen Software „BZ observation application“ gemacht.

### 3.11.7 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Teratompräparaten

Zur Färbung der Tumorschnitte wurden diese zweimal für 5 min in Xylol deparaffiniert und je 5 min in 96, 90, 80 und 70 %igem Alkohol und anschließendem Reinstwasser hydriert. Zum Färben der Kerne wurden die Objektträger 30 s in Mayer's Hämatoxylin Lösung inkubiert und anschließend mit Leitungswasser geblätzt. Das Spülen mit Leitungswasser wurde zweimal wiederholt, bevor die Schnitte zur Färbung von basischen Strukturen in EosinY Lösung für 1 min inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen in Reinstwasser wurde den Schnitten über die aufsteigende Alkoholreihe das Wasser entzogen und sie wurden anschließend mit Eindeckmedium dauerhaft eingebettet.

Die gefärbten Teratomschnitte wurden unter dem Keyence Biozero 8000-Mikroskop im Durchlicht auf Gewebestrukturen aus allen drei Keimblättern untersucht.

## 3.12 Durchflusszytometrie

### 3.12.1 Zellernte und Fixierung für durchflusszytometrische Analysen

Nach 1, 2, 3, 4 und 5 Wochen Differenzierung wurden die neuronalen Zellen hinsichtlich verschiedener Marker analysiert. Dazu wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und 2 bis 5 min mit Trypsin/Benzonase (0,05 % Trypsin-EDTA, 25 U/ml Benzonase) abgelöst. Gestoppt wurde die Reaktion mit Trypsininhibitor/Benzonase (DMEM/F-12, 1 % HSA, 0,55 mg/ml Trypsininhibitor, 25 U/ml Benzonase) und die Zellsuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Ermittlung der Zellzahl mittels CASY wurde für 5 min bei 600 xg und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PFA (1 %) aufgenommen und 15 min bei RT und schüttelnd bei 400 U/min fixiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die fixierten Zellen in FACS Puffer (PBS -/-, 0,5 % BSA, 0,02 % Natriumazid) aufgenommen und bei 4 °C bis zur Färbung gelagert.

### 3.12.2 Durchflusszytometrische Analysen neuronaler und glialer Marker

Die fixierten Zellen (siehe 3.12.1) wurden für zeitabhängige Expressionsanalysen der neuronalen Marker HuC/D und beta III-Tubulin sowie der glialen Marker S100 und GFAP genutzt (siehe Tab. A.5). Dazu wurden die Zellen bei 600 xg und 4 °C für 5 min zentrifugiert und das Pellet anschließend mit dem jeweiligen Antikörper gelöst in Saponinpuffer (PBS -/-, 0,5 % Saponin, 0,5 % BSA, 0,02 % Natriumazid) resuspendiert. Für die Negativkontrolle wurde nur Saponinpuffer verwendet. Die Zellen wurden 2 h bei RT und schüttelnd bei 400 U/min inkubiert und anschließend mit Saponinpuffer gewaschen sowie zentrifugiert. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in Saponinpuffer

## MATERIAL UND METHODEN

---

gelöst und 1 h bei RT im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Nach einem weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in FACS Puffer aufgenommen und mit dem FACS Calibur-Durchflusszytometer und dessen Software „CellQuest Pro“ gemessen und ausgewertet.

### 3.13 Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologischen Untersuchungen der NDZ erfolgten mittels der Patch-Clamp-Technik in der Ganzzell-Konfiguration. Es wurden Messungen sowohl in der Spannungsklemme als auch in der Stromklemme durchgeführt. In der Spannungsklemme wurden die Zellen auf ein Haltepotential von -60 oder -80 mV eingestellt. Ausgehend von diesen Haltepotentialen wurden Spannungssprungfamilien mit einem Inkrement von 10 mV durchgeführt. Zudem wurden ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV eventuell vorhandene spontane postsynaptische Ströme registriert. In der Stromklemme wurde ein Membranpotential von -60 mV eingestellt. Davon ausgehend erfolgte eine schrittweise Strominjektion bis die Schwelle für die Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle erreicht wurde. Dadurch wurde überprüft, ob die Zellen in der Lage waren, Aktionspotentiale zu generieren. Sämtliche Messungen entstanden unter Verwendung einer intrazellulären Lösung (140 mM Kaliumchlorid, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA, 1 mM Magnesiumchloridhexahydrat, 1 mM Kalziumchloridmonohydrat, 2 mM Magnesium-ATP, alles in Reinstwasser, pH = 7,2 mittels Kaliumhydroxidlösung), während die ständige Superfusion der Präparate mit einer separaten physiologischen extrazellulären Lösung (125 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 2 mM Kalziumchloridmonohydrat, 1 mM Magnesiumchloridhexahydrat, 26 mM Natriumhydrogenkarbonat, 1,25 mM Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat, 10 mM Glukosemonohydrat, alles in Reinstwasser, pH = 7,4 durch Begasung mit Carbogen) erfolgte. Alle Messungen wurden mit einem Patch-Clamp-Verstärker durchgeführt und die Analyse der Daten erfolgte mit der dazu gehörigen Software „Pulse/Pulse-Fit“. Postsynaptischen Ströme wurden mit der Software „MiniAnalysis“ analysiert. Die Durchführung sowie die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte durch M. Sc. Michael Rabenstein und Dr. Moritz Frech.

### 3.14 Bestimmung von Protein- und Cholesterolgehalt

#### 3.14.1 Zellaussaat, -ernte und -aufschluss

Der Protein- und Cholesterolgehalt wurde für iPS, neurale Progenitorzellen und neuronale Zellen unter Standardkultivierung sowie 24-stündiger „Low Density Lipoprotein“ (LDL)-Behandlung vor Zellernte bestimmt. Dabei diente das LDL als externe Cholesterolquelle in den serumfreien Medien. Für die ebenfalls analysierten Fibroblasten wurde auf Grund des serumhaltigen Standardkulturmediums auf die LDL-Behandlung verzichtet. Die Zellen wurden wie folgt kultiviert:

- a) Proliferation der iPS (circa 20 Kolonien im 12-well) in mTESR1 für 6 Tage -/+ 10 µg/ml LDL 24 h,

## MATERIAL UND METHODEN

---

- b) Proliferation NPZ ( $100-112,5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in neuralem Proliferationsmedium für 3 bzw. 4 Tage -/+ 10 µg/ml LDL 24 h,
- c) Differenzierung neuronaler Zellen ( $40-45 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in neuralem Differenzierungsmedium für 2 Wochen -/+ 10 µg/ml LDL 24 h,
- d) Differenzierung neuronaler Zellen ( $40-45 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in neuralem Differenzierungsmedium für 6 Wochen -/+ 10 µg/ml LDL 24 h und
- e) Proliferation Fibroblasten ( $30 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in Basalmedium für 4 Tage.

Zur Zellernte wurden die iPS, neuralen Progenitorzellen bzw. differenzierten neuronalen Zellen mit DMEM/F-12 gewaschen und mit Accutase bei 37 °C für 5 bis 15 Minuten abgelöst und die Zellsuspension in DMEM/F-12 aufgenommen. Die Fibroblasten wurden mit PBS -/- gewaschen und mit Trypsin-EDTA (0,25 %) ebenfalls bei 37 °C für 5 bis 10 min abgelöst. Gestoppt wurde die enzymatische Reaktion mit Basalmedium. Nach der Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mittels CASY wurden die Zellen für 5 min bei 600 xg zentrifugiert und das Pellet nach Absaugen des Überstandes bei -80 °C gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die Zellpellets mit einer SDS-Lösung (0,1 %, in Reinstwasser) resuspendiert und durch mehrfaches Frieren und Tauen und den daraus resultierenden großen Scherkräften aufgeschlossen. Die Zellsuspensionen wurden dafür 10 bis 15 s in flüssigem Stickstoff gefroren und 5 min in einem 20 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Proben 30 s gründlich durchmischt. Diese Arbeitsschritte wurden viermal wiederholt.

### 3.14.2 Protein- und Cholesterolbestimmung

Die Proteinkonzentration der Zellsuspensionen wurde mit dem Kit „Pierce BCA Protein Assay“ ermittelt. Mit den vorbereiteten Proben wurde laut Herstellerangaben verfahren. Nach 1 h Inkubation im Thermoschüttler in Dunkelheit, bei 37 °C und 300 U/min wurde die Absorption bei  $560 \pm 10$  nm im Plattenleser mit der Software „Magellan 6.6“ gemessen und die Werte auf die mitgeführte Proteinstandardkurve bezogen. Zur Bestimmung des Gesamtcholesterolgehaltes wurde das Kit „Amplex Red Cholesterol Assay“ genutzt. Mit den Proben wurde laut Herstellerangaben verfahren. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Thermoschüttler wurden die Proben im Plattenleser bei einer Anregungswellenlänge von  $530 \pm 10$  nm und bei einer Emissionswellenlänge von  $590 \pm 10$  nm mittels Plattenleser gemessen. Die Werte wurden auf die mitgeführte Cholesterolstandardkurve bezogen. Im Anschluss wurde der Cholesterolgehalt auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen, so dass sich für alle Proben ein Wert für Gesamtcholesterol in µg pro mg Protein ergab.

### 3.15 Statistische Analysen

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die Mittelwerte wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Für statistische Analysen wurde der ungepaarte Students t-Test verwendet. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für  $p \leq 0,05$  angenommen, wobei folgendermaßen gekennzeichnet wurde:  $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$ ,  $p \leq 0,001 = ***$ .

## 4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, das erste iPS-basierte humane neuronale Modell für die Erkrankung NPC1 zu generieren. Das setzte wiederum voraus, die ersten patientenspezifischen iPS für NPC1 zu generieren und charakterisieren. Zur Reprogrammierung in iPS wurden humane dermale Fibroblasten verwendet, welche nun im Folgenden beschrieben werden.

### 4.1 Charakterisierung der verwendeten Fibroblasten

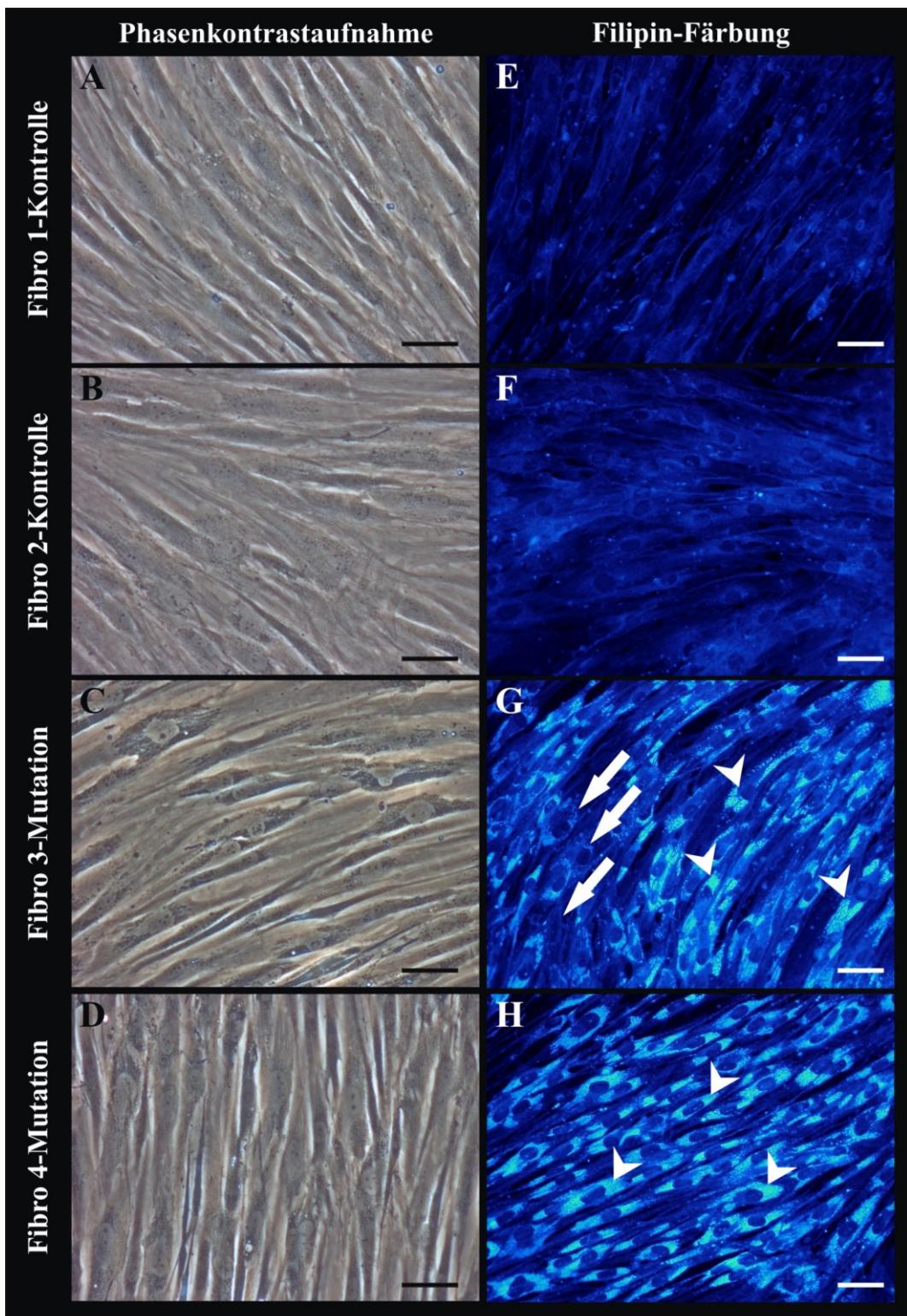
Zur Generierung von iPS wurden in dieser Arbeit vier unterschiedliche Fibroblastenlinien (Tab. 1 in Material und Methoden) von männlichen Spendern genutzt. Um später linienspezifische Effekte ausschließen zu können, stammten zwei Linien von gesunden Probanden sowie zwei von NPC1-Patienten:

- (1) Fibroblasten ohne Mutation im NPC1-Gen (Fibro 1-Kontrolle),
- (2) Fibroblasten ohne Mutation im NPC1-Gen (Fibro 2-Kontrolle),
- (3) NPC1-Fibroblasten (Fibro 3-Mutation) mit einer homozygoten Mutation, die bisher unbeschrieben ist,
- (4) NPC1-Fibroblasten (Fibro 4-Mutation) mit einer compound heterozygoten Mutation.

Vor der Reprogrammierung wurden diese Zelllinien hinsichtlich Morphologie und Cholesterolakkumulation analysiert, um den Zustand der Zellen zu dokumentieren.

Alle vier Fibroblastenlinien zeigten eine typische langgestreckte spindelförmige Morphologie (Abb. 6 A – D). Es zeigten sich weder zwischen gesunden und NPC1-Zellen noch zwischen den Zellen mit unterschiedlichen NPC1-Mutationen morphologische Unterschiede. Zum Nachweis der NPC1-typischen Akkumulationen von Cholesterol, wurde mit Filipin gefärbt (Abb. 6 E – H). Die gesunden Fibroblasten (Abb. 6 E, F) zeigten eine gleichmäßige schwache blaue Färbung ihrer Zellkörper, wohingegen die Fibroblasten von NPC1-Patienten (Abb. 6 G, H) eine deutliche Cholesterolakkumulation in Form von hellblau leuchtenden Arealen um den Zellkern aufwiesen (Pfeilspitzen). Die Fibroblasten mit der homozygoten NPC1-Mutation zeigten dabei auch Areale mit nur wenig gefärbtem Cholesterol (Abb. 6 G, Pfeile) im Vergleich zur compound heterozygoten Mutation (Abb. 6 H), die eine gleichmäßige Cholesterolakkumulation (Pfeilspitzen) in allen Zellen zeigte. Beide Fibroblastenlinien mit NPC1-Mutation zeigten den klassischen Phänotyp hinsichtlich der Cholesterolakkumulation. Die eindeutige Unterscheidung zu den Kontrollfibroblastenlinien war mittels Filipin-Färbung gegeben.

Die analysierten Fibroblasten wurden im Anschluss zur Generierung von iPS verwendet.

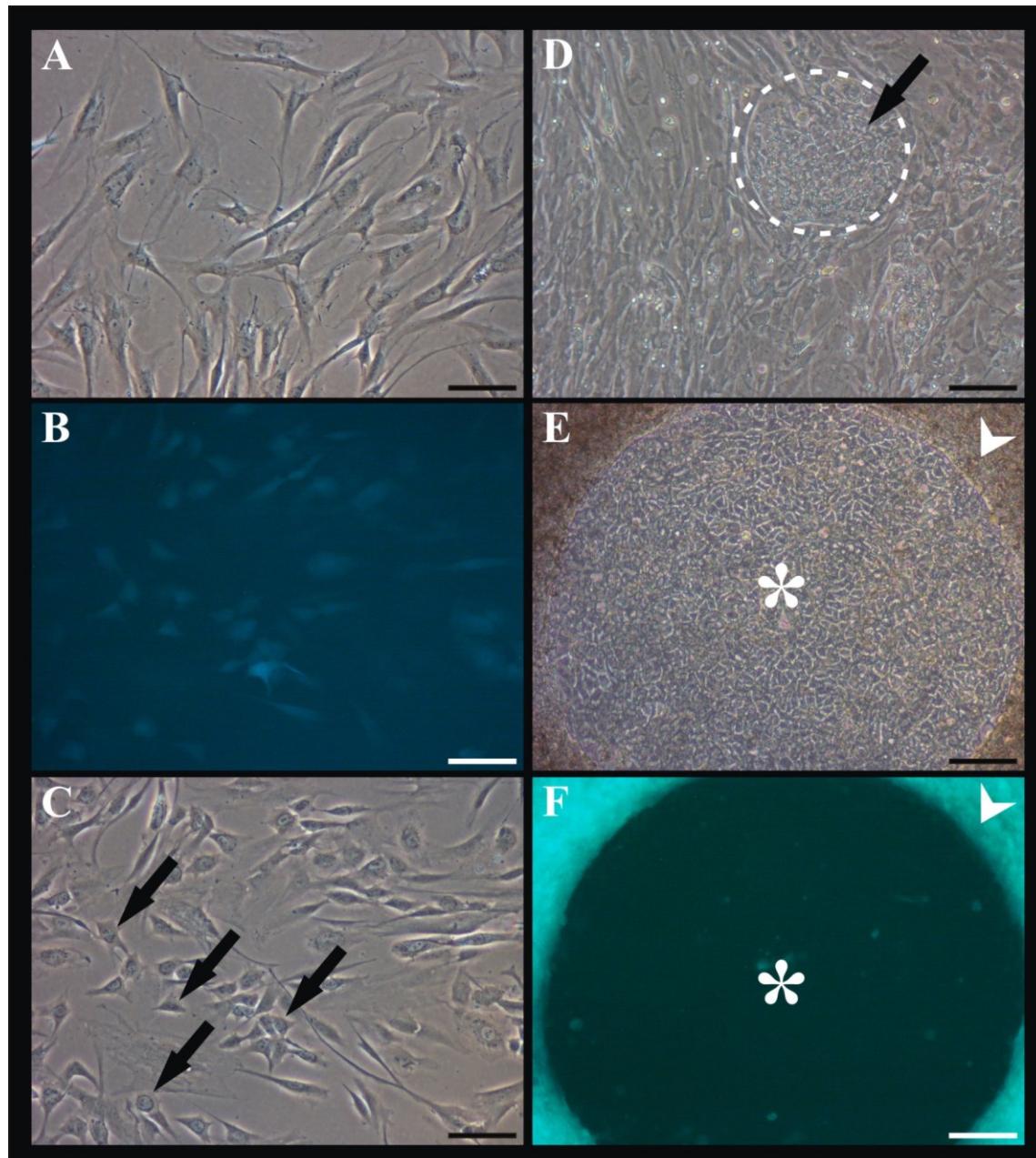


**Abb. 6: Fibroblastenmorphologie im Phasenkontrastbild und Filipin-Färbung**

Im Phasenkontrastbild (A – D) zeigten Kontroll-Fibroblasten (Fibro-Kontrolle, A, B) keine morphologischen Unterschiede zu den Fibroblasten mit NPC1-Mutation (Fibro-Mutation, C, D). Die Filipin-Färbung (E – H) färbte die Kontroll-Fibroblasten (E, F) gleichmäßig blau, wohingegen die NPC1-Fibroblasten eine deutliche Cholesterolakkumulation in Form von hellen Arealen um den Zellkern zeigten (Pfeilspitzen). In der Zelllinie Fibro 3-Mutation zeigten einige Zellen eine schwächere Färbung (Pfeile) im Gegensatz zur gleichmäßigen Färbung aller Zellen in der Linie Fibro 4-Mutation. Maßstab 50  $\mu$ m

## 4.2 Retrovirale Reprogrammierung der Fibroblasten in iPS

Zur Generierung von iPS wurden die beschriebenen Fibroblasten (ein Beispiel in Abb. 7 A) mit selbst hergestellten Retroviren transduziert und mittels der klassischen vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC reprogrammiert. Die retroviralen Vektoren verfügten neben dem jeweiligen Transkriptionsfaktor außerdem über eine GFP-Sequenz, die den Nachweis der erfolgreichen Transduktion ermöglichte (ein Beispiel in Abb. 7 B). Bereits eine Woche nach Transduktion veränderten die Fibroblasten ihre Morphologie von der oben beschriebenen langgestreckten Zellform hin zu kompakten Zellkörpern (ein Beispiel in Abb. 7 C, Pfeile). Nach weiteren ein bis zwei Wochen bildeten sich die ersten frühen iPS-Kolonien in mitten der nicht- oder unvollständig reprogrammierten Fibroblasten (ein Beispiel in Abb. 7 D, Pfeil zeigt auf frühe iPS-Kolonie, eingekreist). Die wachsenden Kolonien wurden anhand ihrer Stammzellmorphologie beurteilt, d. h. eine ovale bis runde Form der Kolonie mit einer homogenen Zellverteilung sowie ein scharf begrenzter Kolonierand ohne differenzierte Bereiche. Des Weiteren wurde die Unterdrückung des GFP-Signals unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert, da nach vollständiger Reprogrammierung die Expression der viralen Gene über Genstilllegungsprozesse gestoppt wurde. Das Phasenkontrastbild (ein Beispiel in Abb. 7 E) spiegelte erneut sehr gut die oben beschriebene Stammzellkoloniemorphologie wieder und in der Fluoreszenzaufnahme (ein Beispiel in Abb. 7 F) zeigte sich deutlich, dass nur noch von den umgebenden unvollständig bzw. nicht reprogrammierten Fibroblasten (Pfeilspitze) ein GFP-Signal abgegeben wurde und die Kolonie selbst (Stern) nun ohne aktive Expression der viralen Gene vorlag. Auf Feederzellen wurden nur die vollständig reprogrammierten Stammzell-typischen Kolonien ohne GFP-Signal umgesetzt und expandiert, so dass aus jeder einzelnen Kolonie eine eigene iPS-Linie entstand.



**Abb. 7: Ablauf der retroviralen Reprogrammierung von Fibroblasten zur Generierung von iPS**  
Fibroblasten mit typischer langgestreckter Morphologie (A) wurden retroviral reprogrammiert, was durch die Expression der viralen GFP-Sequenz überprüft wurde (B). Nach einer Woche änderte sich die Morphologie der langgestreckten Fibroblasten zu kompakteren Zellen (C, Pfeile) bis sich nach 2 bis 3 Wochen frühe iPS-Kolonien bildeten (D, eingekreist, Pfeil). Vollständig reprogrammierte iPS wuchsen in runden Kolonien (E, Stern) inmitten von nicht bzw. unvollständig reprogrammierten Fibroblasten (Pfeilspitze). Nach vollständiger Reprogrammierung wurde die Expression der viralen Gene in den iPS-Kolonien gestoppt und das GFP-Signal verschwand (F, Stern) im Gegensatz zu den umgebenden Fibroblasten (Pfeilspitze). Maßstab 100 µm

#### 4.3 Charakterisierung der generierten iPS-Linien

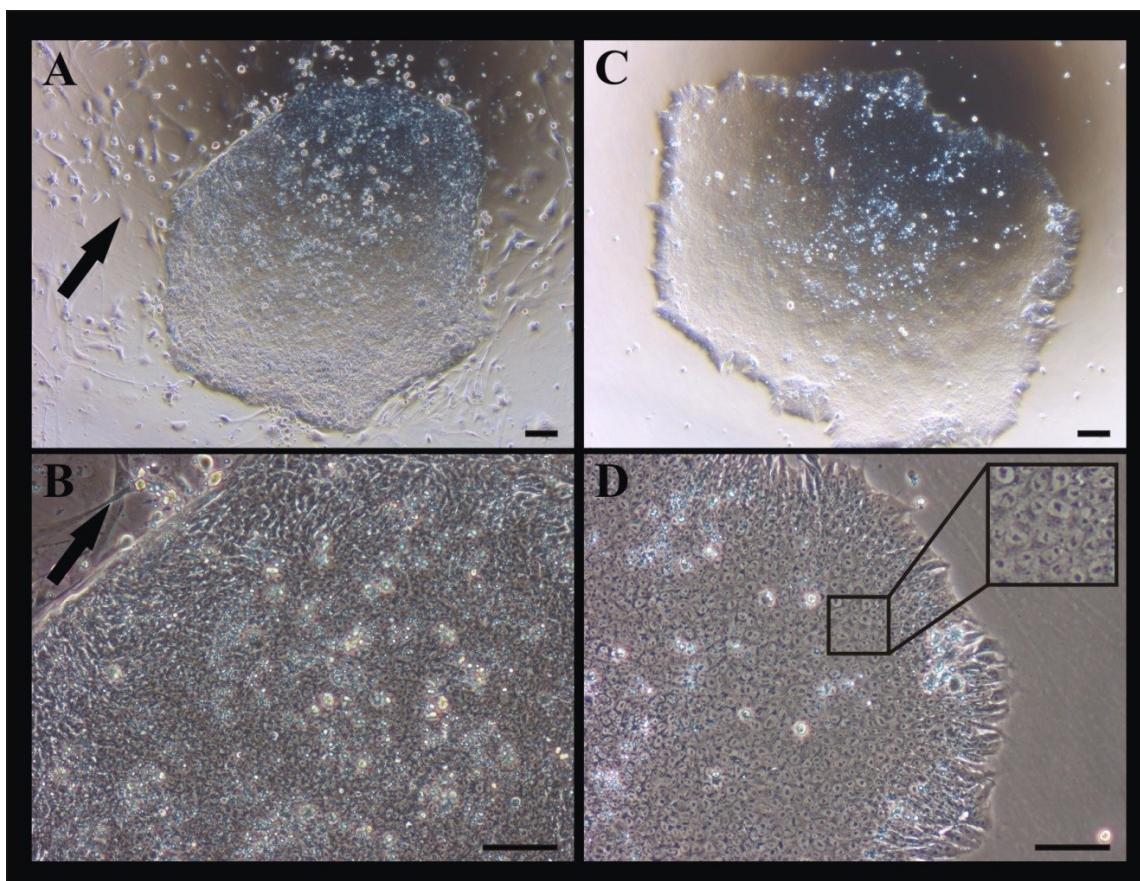
Es wurden circa 5 expandierbare iPS-Kolonien pro Fibroblastenlinie generiert. Für die vorliegende Arbeit wurden dann jeweils 2 zufällig gewählte iPS-Linien pro reprogrammierter Fibroblastenlinie analysiert. Die Nummer der iPS-Linie bezieht sich

ERGEBNISSE

immer auf die zur Reprogrammierung genutzte Fibroblastenlinie und a bzw. b kennzeichnen die beiden unabhängigen Klone, die zu iPS-Linien expandiert wurden.

Die Kultivierung aller acht gewählten iPS-Linien fand zunächst auf Feederzellen statt (ein Beispiel in Abb. 8 A und B, Pfeil zeigt auf Feederzellen). Für einige Experimente war jedoch die Feeder-freie Kultivierung auf Matrikel (ein Beispiel in Abb. 8 C und D) nötig, um der Verfälschung der Ergebnisse durch tierische Fremdzellen vorzubeugen. In beiden Kultivierungssystemen blieb die runde bis ovale Form der Stammzellkolonien erhalten (Abb. 8 A und C). Auch die Homogenität der Kolonien war gegeben auf Grund der gleichmäßigen hellen Koloniefarbe. Abb. 8 B und D stellen durch ihre Vergrößerung sehr gut die klare Koloniegrenze ohne differenzierte Areale dar. Des Weiteren sind deutlich die großen runden einzelnen iPS in der Kolonie zu erkennen (Abb. 8 D, vergrößert im Kasten), deren allgemeines Charakteristikum das große Verhältnis vom Zellkern zum Zytoplasma ist. Beide Systeme ermöglichten eine stabile Kultivierung der iPS.

Die generierten iPS-Linien wurden eingehend hinsichtlich chromosomaler Stabilität, pluripotenter Markerexpression sowie pluripotenten Differenzierungspotentials weiter charakterisiert.



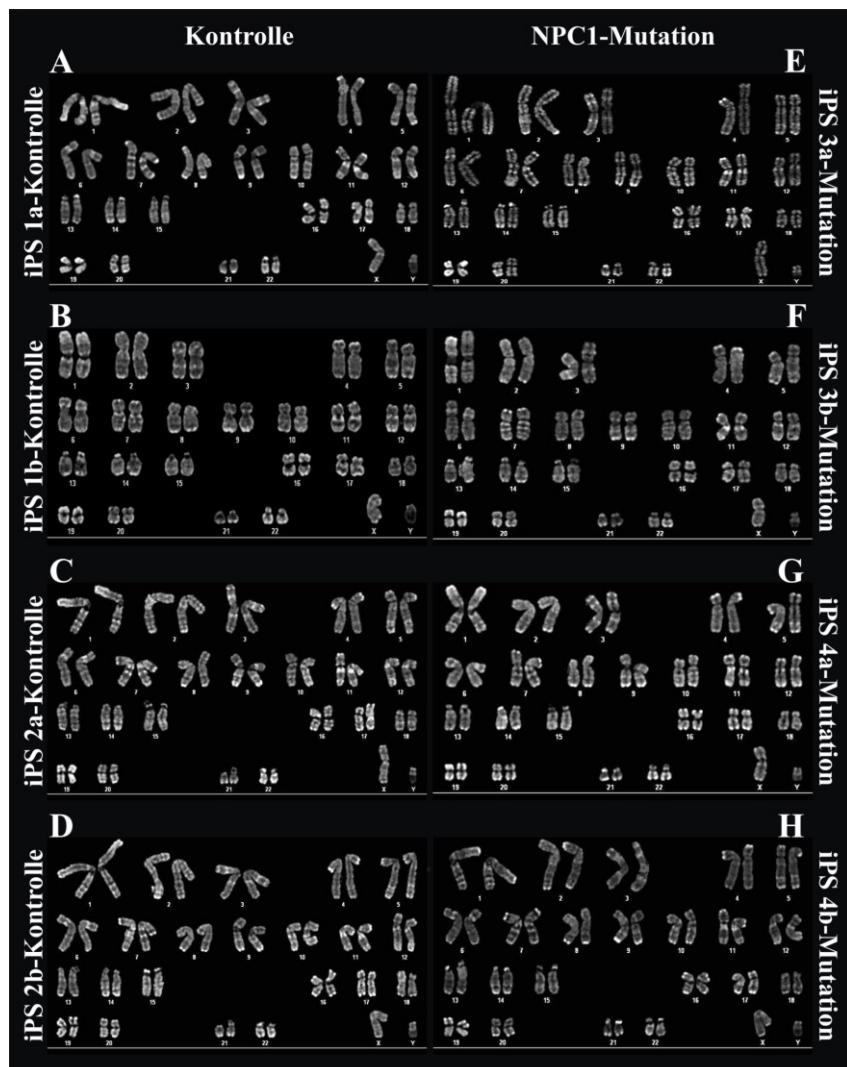
**Abb. 8: iPS wachsend in Kolonien in zwei unterschiedlichen Kultivierungssystemen**

iPS-Kolonien wachsend auf Feederzellschicht (A, B, Pfeil zeigt auf Feederzellen) und Matrikel (C, D) zeigten in beiden Kultursystemen die ovale bis runde Kolonieform (A, C) sowie den scharf begrenzten Kolonierand (B, D). Kolonie-bildende iPS waren rund mit großem Verhältnis vom Zellkern zum Zytoplasma (Kasten in D). Maßstab 100 µm

#### 4.3.1 Analyse des Karyogramms

Die Erzeugung von iPS mittels retroviraler Reprogrammierung ist mit dem Risiko verbunden, dass chromosomal Abnormalitäten auftreten können. Für die Generierung des NPC1-Krankheitsmodells war es jedoch Voraussetzung, dass die genetischen Informationen nicht weiter verändert wurden. Um zu prüfen, ob die generierten iPS unauffällig waren, wurde mit Hilfe der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin an der Universität Rostock der Karyotyp jeder einzelnen Linie bestimmt. In Abb. 9 sind die Karyogramme aller acht iPS-Linien mittels R-Banding dargestellt. Die untersuchten Linien zeigten weder numerische noch strukturelle Chromosomenaberrationen und bestätigten den Ursprung von männlichen Spendern durch das jeweilige X- und Y-Chromosom.

Mit dem Nachweis des stabilen Karyotyps jeder einzelnen iPS-Linie konnte mit den Pluripotenzanalysen fortgefahren werden.



**Abb. 9: R-Banding der Karyogramme aller iPS-Linien**

Untersuchung aller iPS-Kontrollen (A – D) und iPS-Mutationen (E – H) auf strukturelle oder numerische Chromosomenabberationen mit dem Ergebnis eines unauffälligem Karyotyps samt Abstammungsnachweis von männlichen Spendern.

#### **4.3.2 Nachweis der Pluripotenz *in vitro* mittels spezifischer Markerexpression**

Ein Merkmal pluripotenter Stammzellen ist der hohe Gehalt an alkalischer Phosphatase in der Zellmembran, wohingegen differenzierte Zellen dies nicht mehr aufweisen. Mit Hilfe der schnellen und sensitiven alkalische Phosphatase-Färbung konnten pluripotente Stammzellkolonien nachgewiesen werden (Abb. 10). Alle iPS-Kolonien waren purpur gefärbt und zeigten eine typische runde bis ovale Morphologie. Die iPS-Kultivierung fand für diese Färbung auf Feederzellen (Pfeile) statt, die als Negativkontrolle dienten. Hierdurch ließen sich purpur gefärbte pluripotente Stammzellen von ungefärbten, bereits terminal differenzierten Feederzellen diskriminieren. Zwischen den gesunden iPS-Linien (Abb. 10 A – D) und den iPS-Linien mit NPC1-Mutation (Abb. 10 E – H) waren keine Unterschiede in Farbumschlag und Intensität zu erkennen.

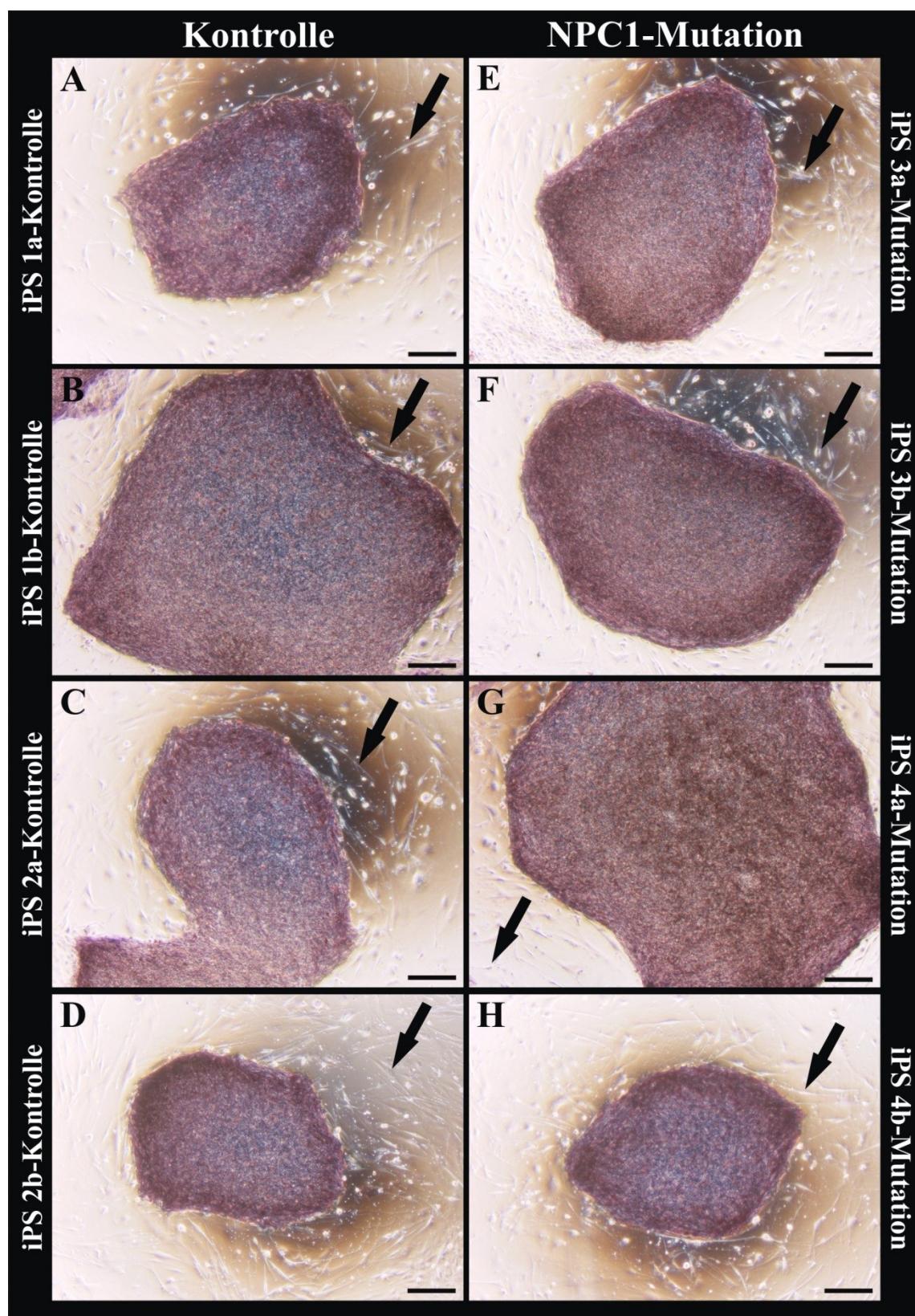


Abb. 10: Nachweis alkalischer Phosphatase in iPS-Kolonien auf Feederzellschicht

Die alkalische Phosphatase-Färbung zeigte eine gleichmäßige purpurne Färbung in den iPS-Kontrolllinien 1a, 1b, 2a und 2b (A – D) sowie in den iPS-Linien 3a, 3b, 4a und 4b mit NPC1-Mutation (E – H). Es wurden keine Unterschiede in der Farbintensität und Farbumschlag festgestellt. Die Feederzellschicht (Pfeile), auf denen die iPS-Kolonien wuchsen, diente als Negativkontrolle (ungefärbt). Maßstab 200 µm

## ERGEBNISSE

---

Neben der alkalischen Phosphatase wurden noch andere Marker untersucht, deren Expression den pluripotenten Status von iPS beschreiben.

In Abb. 11 wurden die immunzytochemischen Färbungen aller 8 iPS-Linien (Zeilen) gegen 6 unterschiedliche Pluripotenzmarker (Spalten) dargestellt. Es wurde die Expression der 2 Transkriptionsfaktoren Nanog (A – H) sowie Oct4 (I – P) untersucht. Beide Färbungen wurden in rot dargestellt und ließen in weniger kompakten Kolonien (z. B. B, E, K, O) die auf den Zellkern beschränkte Expression durch den Abstand zwischen den Zellen erkennen. Einige Kolonien erschienen stärker gefärbt als andere (z. B. A gegen K), was verursacht wurde durch die unterschiedliche iPS-Anzahl, aus denen die Kolonien bestanden.

Neben Transkriptionsfaktoren wurde auch die Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern analysiert. Dazu zählten SSEA3 (Q – X) und SSEA4 (Y – f) sowie Tra-1-60 (g – n) und Tra-1-81 (o – v). Diese Färbungen wurden in grün dargestellt und ergaben durch die Bindung des Antikörpers an den Oberflächenmarkern zwar eine gleichmäßige, aber eher diffusere Färbung.

Alle iPS-Linien wiesen für die Färbung gegen die Transkriptionsfaktoren eine homogene rote Färbung und zur Darstellung der Oberflächenmarker eine gleichmäßige grüne Färbung auf. Die Färbungen beschränkten sich auf die Kolonien und veranschaulichten erneut die typische runde bis ovale Kolonieform. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen iPS-Kontrollen und iPS-Mutationen erkennbar. Für alle Zelllinien wurde somit die Pluripotenz *in vitro* anhand der Expression verschiedener Stammzellmarker nachgewiesen.

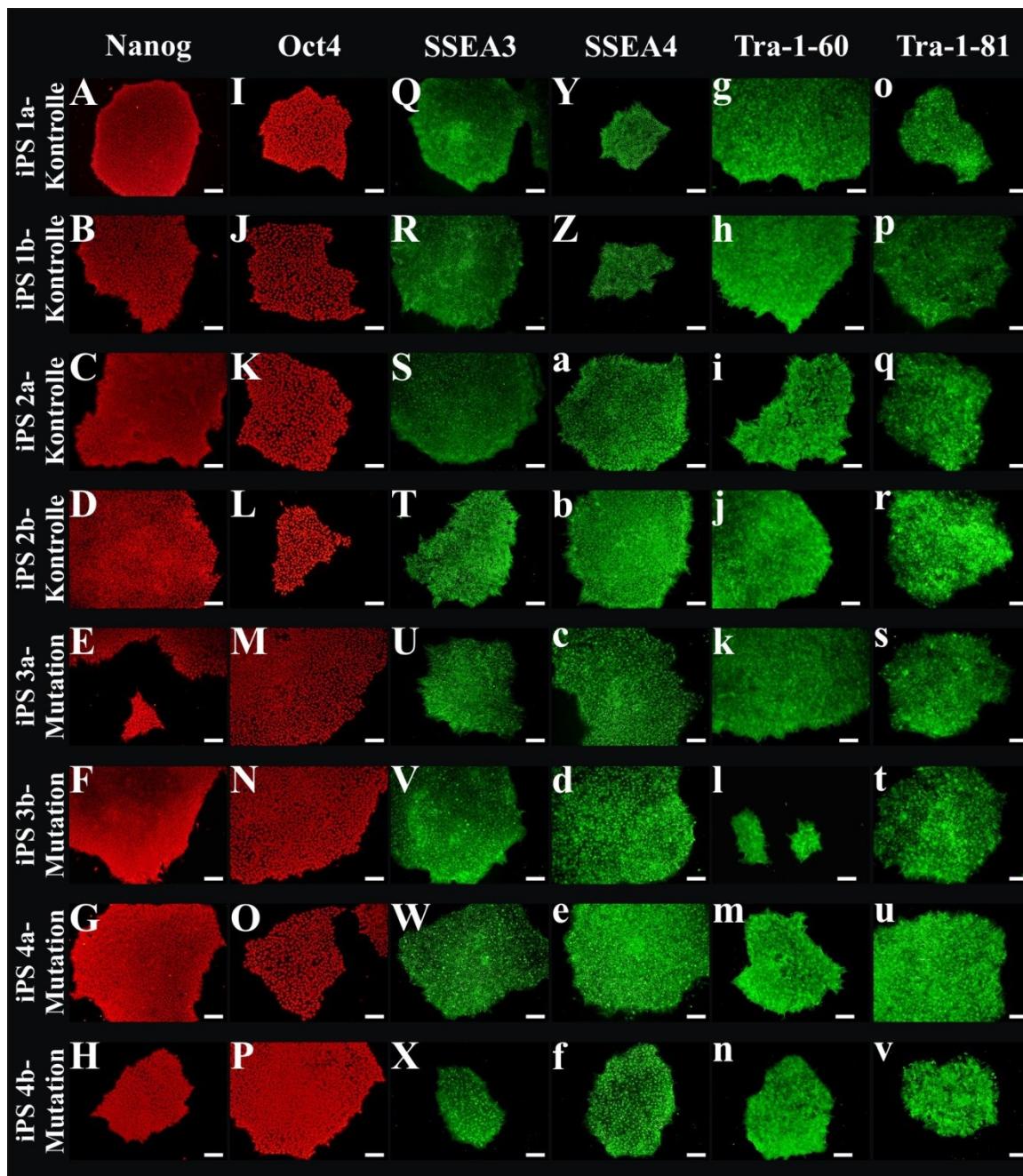


Abb. 11: Nachweis des pluripotenten Status aller iPS-Linien durch Färbung gegen die Pluripotenzmarker Nanog, Oct4, SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 und Tra-1-81

Färbungen gegen die Transkriptionsfaktoren Nanog (A - H) und Oct4 (I - P) zeigten eine gleichmäßige rote Färbung der Kolonien. Die grün gefärbten Oberflächenmarker SSEA3 (Q - X), SSEA4 (Y - f), Tra-1-60 (g - n) und Tra-1-81 (o - v) waren ebenfalls gleichmäßig in allen Kolonien nachweisbar. Alle iPS-Kontrolllinien (iPS-Kontrolle) und iPS-Linien mit NPC1-Mutation (iPS-Mutation) waren positiv für die untersuchten Marker und zeigten keinerlei Unterschiede im Färbemuster. Maßstab 100 µm

#### 4.3.3 Nachweis der Pluripotenz *in vitro* mittels Differenzierungsfähigkeit

Nach der Analyse der Pluripotenzmarker wurde untersucht, ob die iPS *in vitro* in der Lage waren, in Zellen jedes Keimblattes zu differenzieren. Unter Verwendung der EB-Bildung wurden die spontan differenzierten Zellen gegen Nestin als Marker des Ektoderms (Abb. 12 A – H), Muskelaktin (MA, Abb. 12 I – P) als Marker des Mesoderms sowie alpha-

ERGEBNISSE

---

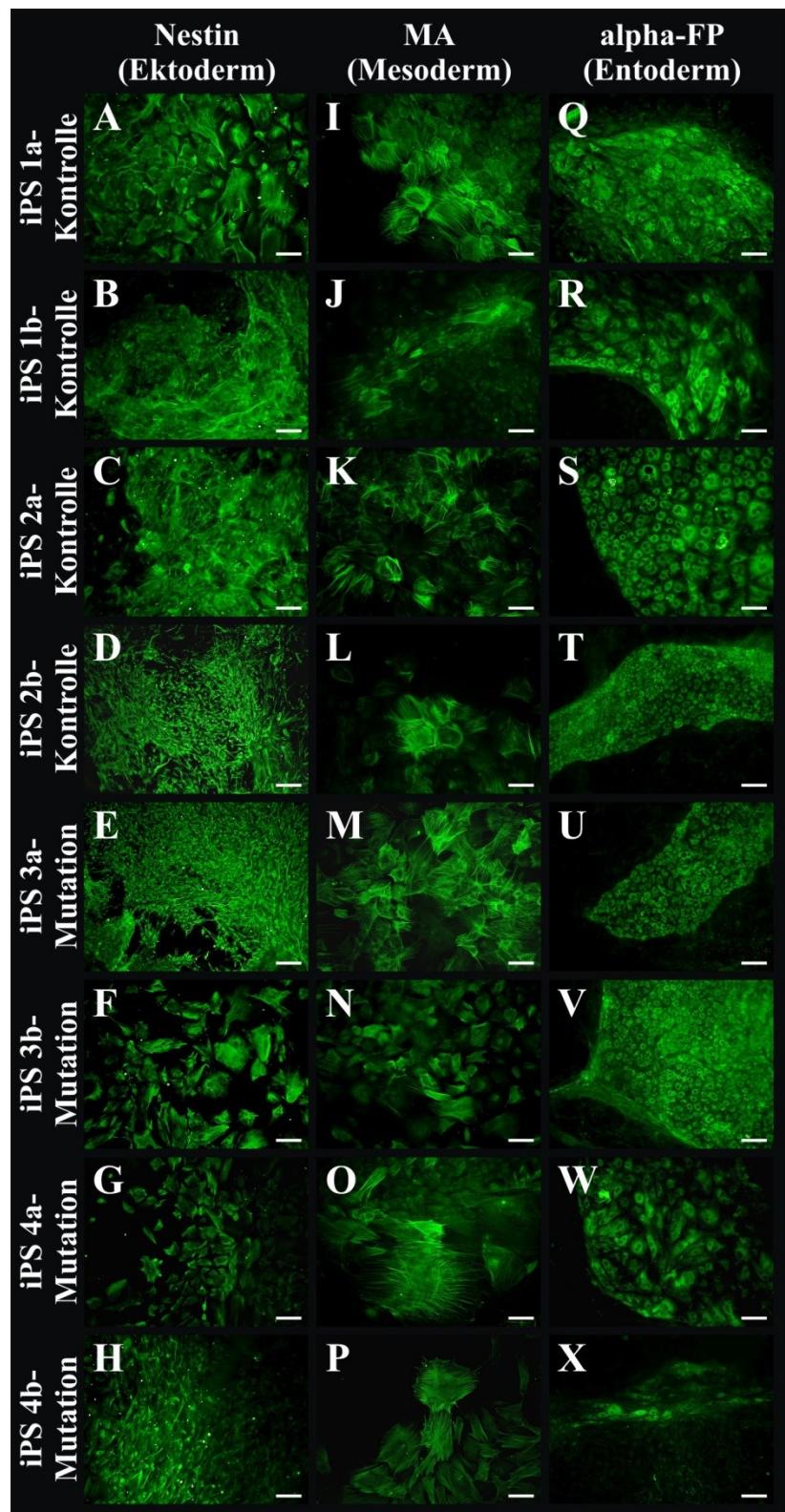
Fetoprotein (alpha-FP, Abb. 12 Q – X) als Marker des Entoderms gefärbt. Die Nestin-positiven Zellen zeigten auf Grund der spontanen Differenzierung und deren erreichtes Ausmaß unterschiedliche Morphologien. So variierte diese zwischen großen ausgebreiteten Zellen (Abb. 12 A, F, G) und kleineren Zellen mit Ausläufern (Abb. 12 D, E, H) sowie deren Mischformen (Abb. 12 B und C).

Die gegen Muskelaktin gefärbten Zellen waren groß und flächig und es waren einzelne Aktinstränge im Zytoskelett der Zellen erkennbar (Abb. 12 I, K, O). Dabei sahen die gefärbten Zellen weitestgehend identisch aus.

Die gegen alpha-Fetoprotein gefärbten Zellen waren kleiner als die bisher für Nestin oder Muskelaktin beschriebenen und zeigten klare Begrenzungen auf ein bestimmtes Areal, was die spontane Differenzierung in unterschiedlichste Zelltypen veranschaulichte und die Spezifität der Färbung dokumentierte.

Das pluripotente Potential *in vitro* war mit diesen Keimblatt-spezifischen Markern nachgewiesen worden und es ließen sich keine Unterschiede im Differenzierungspotential von iPS-Kontrollen und iPS-Mutationen feststellen.

ERGEBNISSE



**Abb. 12: Nachweis des pluripotenten Potentials der iPS *in vitro***

Nachweis der pluripotenten *in vitro*-Differenzierung der iPS in Zellen aus dem Ekto-, Meso- und Entoderm mittels Färbung gegen Nestin (A – H), Muskelaktin (MA, I - P) und alpha-Fetoprotein (alpha-FP, Q - X). iPS-Kontrollen und iPS-Mutationen konnten gleichermaßen in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. Maßstab 100  $\mu$ m

ERGEBNISSE

---

#### 4.3.4 Nachweis der Pluripotenz *in vivo* mittels Differenzierungsfähigkeit

Um die pluripotente Differenzierung auch *in vivo* nachzuweisen, wurde immundefizienten Mäusen ein Teratom induziert und die Tumorschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Abb. 13). Zum Nachweis der ektodermalen Differenzierung wurden einfache (Abb. 13 A, C, D, E, G, H) oder pigmentierte Epithelien (Abb. 13 B, F) dargestellt. Mesodermale Gewebe wurde durch Knorpel (Abb. 13 I, J, K, L), mesenchymales Bindegewebe (Abb. 13 M) und kollagene Fasern (Abb. 13 N, O, P) veranschaulicht. Die Bildung entodermaler Strukturen wurde durch intestinale Epithelien (Abb. 13 Q, T, V) sowie Drüsen (Abb. 13 R, S, U, W, X) belegt. Alle iPS-Linien differenzierten auch *in vivo* in Strukturen aller drei Keimblätter. Es ließ sich kein Unterschied im Differenzierungspotential der Wildtyp- und NPC1-Linien feststellen. Mit dem Nachweis der Pluripotenz *in vivo* waren die Pluripotenzanalysen der generierten iPS abgeschlossen.

ERGEBNISSE

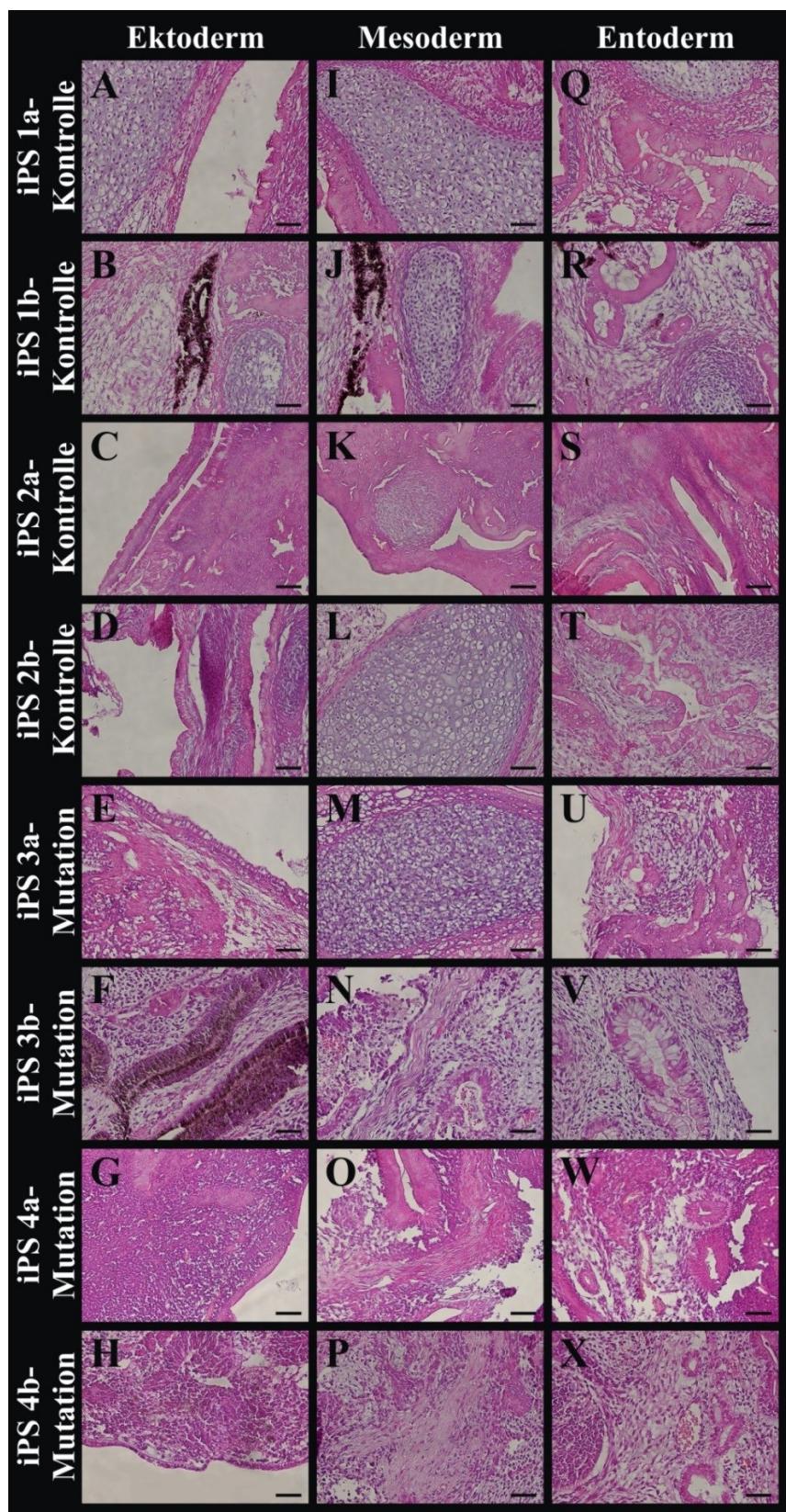


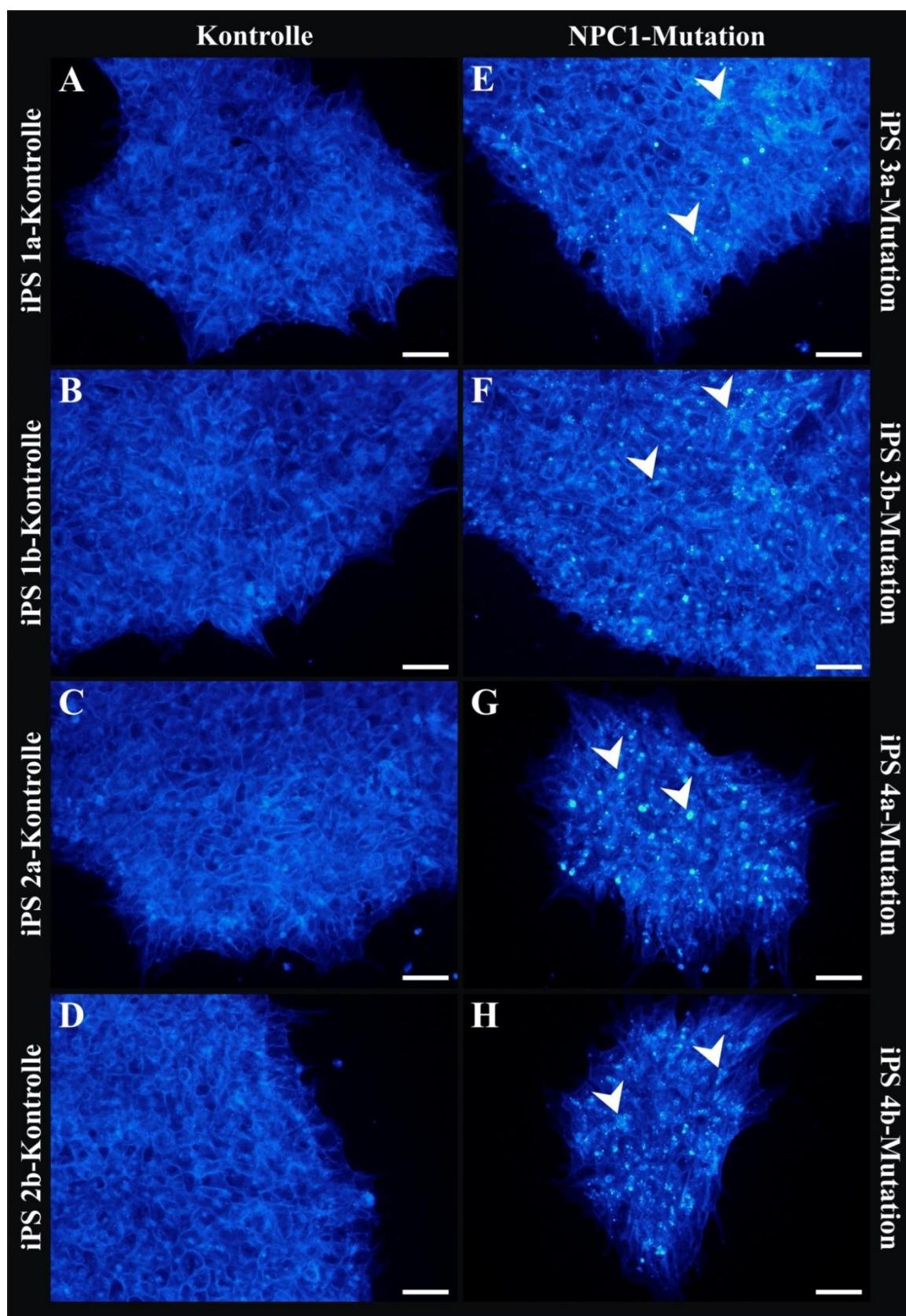
Abb. 13: Hämatoxylin- und Eosin-Färbung entstandener Teratome nach Injektion von iPS in immundefiziente Mäusen

Nachweis der pluripotenten *in vivo*-Differenzierung der iPS in Strukturen aus dem Ekto-, Meso- und Entoderm. iPS-Kontrollen und iPS-Mutationen konnten gleichermaßen in Strukturen aller drei Keimblätter differenzieren. Maßstab 50 µm

#### 4.3.5 Darstellung des NPC1-Phänotyps in iPS

Die generierten iPS wurden im Anschluss auf die Darstellung des NPC1-Phänotyps untersucht. Dazu wurde die für NPC1 beschriebene Cholesterolakkumulation als Hauptkriterium ausgewählt und die Zellen mit Filipin gefärbt (Abb. 14). Die iPS-Kolonien ohne NPC1-Mutation (Abb. 14 A – D) zeigten eine gleichmäßige blaue Färbung, wohingegen die iPS-Kolonien mit NPC1-Mutation (Abb. 14 E – H) hell leuchtende Punkte (Pfeilspitzen) aufwiesen. Diese Punkte lokalisierten die Cholesterolakkumulation in jeder einzelnen Stammzelle und unterschieden sich auf Grund von Zellgröße und Koloniebildung vom Färbemuster der Fibroblasten (siehe 4.1). Zwischen den verschiedenen iPS-Mutationen waren, wie auch schon in deren Ursprungsfibroblasten, Unterschiede zu erkennen. So schienen die Linien mit der homozygoten NPC1-Mutation (Abb. 14 E, F) weniger und kleinere punktuelle Färbungen zu zeigen als die Linien mit der compound heterozygoten NPC1-Mutation (Abb. 14 G, H).

Grundsätzlich blieb der NPC1-Phänotyp in Bezug auf die Cholesterolakkumulationen auch nach der Reprogrammierung in iPS erhalten und konnte mittels Filipin-Färbung visuell eindeutig dargestellt werden.



**Abb. 14: Visualisierung von Cholesterin in iPS-Kolonien**

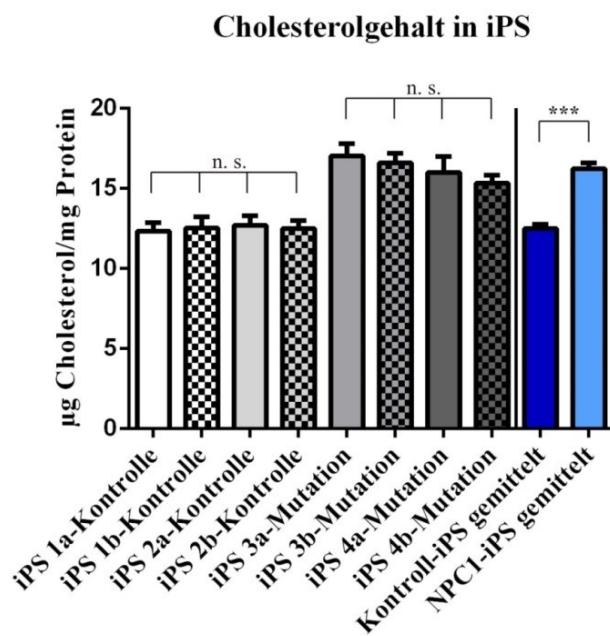
Filipin-Färbung erzielte gleichmäßig blaue Färbung in iPS-Kontrollen (A – D) gegenüber der partiell hell gepunkteten Färbung in den NPC1-iPS (iPS-Mutation, E – H). Pfeilspitzen zeigen beispielhaft auf helle Areale, die die Cholesterolakkumulation bedingt durch NPC1-Mutation veranschaulichen. Maßstab 50  $\mu$ m

ERGEBNISSE

#### 4.3.6 Analyse des Cholesterolgehaltes in iPS

Um den Cholesterolgehalt zusätzlich zu quantifizieren, wurde die Menge an Gesamtcholesterol pro Proteinmenge bestimmt und graphisch dargestellt (Abb. 15). Alle Kontroll-iPS-Linien besaßen etwa den gleichen Gehalt an Cholesterol: iPS 1a-Kontrolle =  $12,32 \pm 0,55$  µg/mg Protein, iPS 1b-Kontrolle =  $12,53 \pm 0,70$  µg/mg Protein, iPS 2a-Kontrolle =  $12,69 \pm 0,60$  µg/mg Protein sowie iPS 2b-Kontrolle =  $12,50 \pm 0,52$  µg/mg Protein. Gemittelt ergab sich ein Wert von  $12,50 \pm 0,29$  µg Cholesterol/mg Protein (dunkelblauer Balken).

Die iPS-Linien mit einer NPC1-Mutation wiesen folgende höhere Cholesterolwerte auf: iPS 3a-Mutation =  $17,02 \pm 0,77$  µg/mg Protein, iPS 3b-Mutation =  $16,61 \pm 0,59$  µg/mg Protein, iPS 4a-Mutation =  $15,99 \pm 0,99$  µg/mg Protein und iPS 4b-Mutation =  $15,33 \pm 0,49$  µg/mg Protein. Untereinander waren auch diese Cholesterolwerte nicht signifikant unterschiedlich. Beim Mitteln der Cholesterolgehalte der NPC1-iPS-Linien ergab sich ein Wert von  $16,23 \pm 0,36$  µg Cholesterol/mg Protein (hellblauer Balken). Dieser Wert unterschied sich signifikant vom gemittelten Wert aller Kontroll-iPS-Linien und veranschaulichte den höheren Cholesterolwert der NPC1-iPS im Gegensatz zu den gesunden Kontroll-iPS.



**Abb. 15: Cholesterolgehalt in verschiedenen iPS-Linien**

Kontroll-iPS (iPS 1a, 1b, 2a, 2b) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Cholesterolgehalt und hatten im Mittel (dunkelblauer Balken)  $12,50 \pm 0,286$  µg Cholesterol/mg Protein. Die NPC1-iPS-Linien (iPS 3a, 3b, 4a, 4b) zeigten höhere Cholesterolwerte als die Kontroll-iPS, waren aber untereinander auch nicht signifikant unterschiedlich. Gemittelt ergab sich für die NPC1-iPS (hellblauer Balken) ein Cholesterolwert von  $16,23 \pm 0,357$  µg Cholesterol/mg Protein, der signifikant höher war als der gemittelten Cholesterolwert der Kontroll-iPS.

n (iPS-Kontrolle bzw. iPS-Mutation) = 10 – 13, n (Kontroll-iPS gemittelt) = 43, n (NPC1-iPS gemittelt) = 49

#### 4.4 Differenzierung der iPS in neurale Progenitorzellen

Um ein neuronales Krankheitsmodell zu generieren, wurden die iPS in die neurale Richtung differenziert. Dabei entstanden neurale Rosetten (ein Beispiel in Abb. 16), die sich meist mehrfach zusammen lagerten (Abb. 16 A). Die Rosettenstrukturen waren gut erkennbar durch die radiale Ausrichtung der Zellen (Abb. 16 B, Pfeilspitzen) unter Bildung einer Neuralrohr-ähnlichen Öffnung (Abb. 16 B, Pfeil). Die neuralen Rosetten bestanden aus neuralen Progenitorzellen, die über ihren Oberflächenmarker PSA-NCAM magnetisch aus dem Zellgemisch selektiert wurden. Die sortierten Zellen wuchsen einschichtig und zeigten beim Erreichen einer bestimmten Zelldichte eine Pflasterstein-artige Morphologie (Abb. 16 C). Die mitotische Aktivität der generierten NPZ veranschaulichte die rote Färbung gegen den Proliferationsmarker Ki67 in der Überlagerung der mittels DAPI blau gefärbten Zellkerne (Abb. 16 D). Dabei befanden sich die hell rot leuchtenden Zellkerne (Pfeil) in der Interphase zwischen zwei Mitosen und die schwächer, nur punktuell rot gefärbten Zellkerne (Pfeilspitze) direkt in der Mitose.

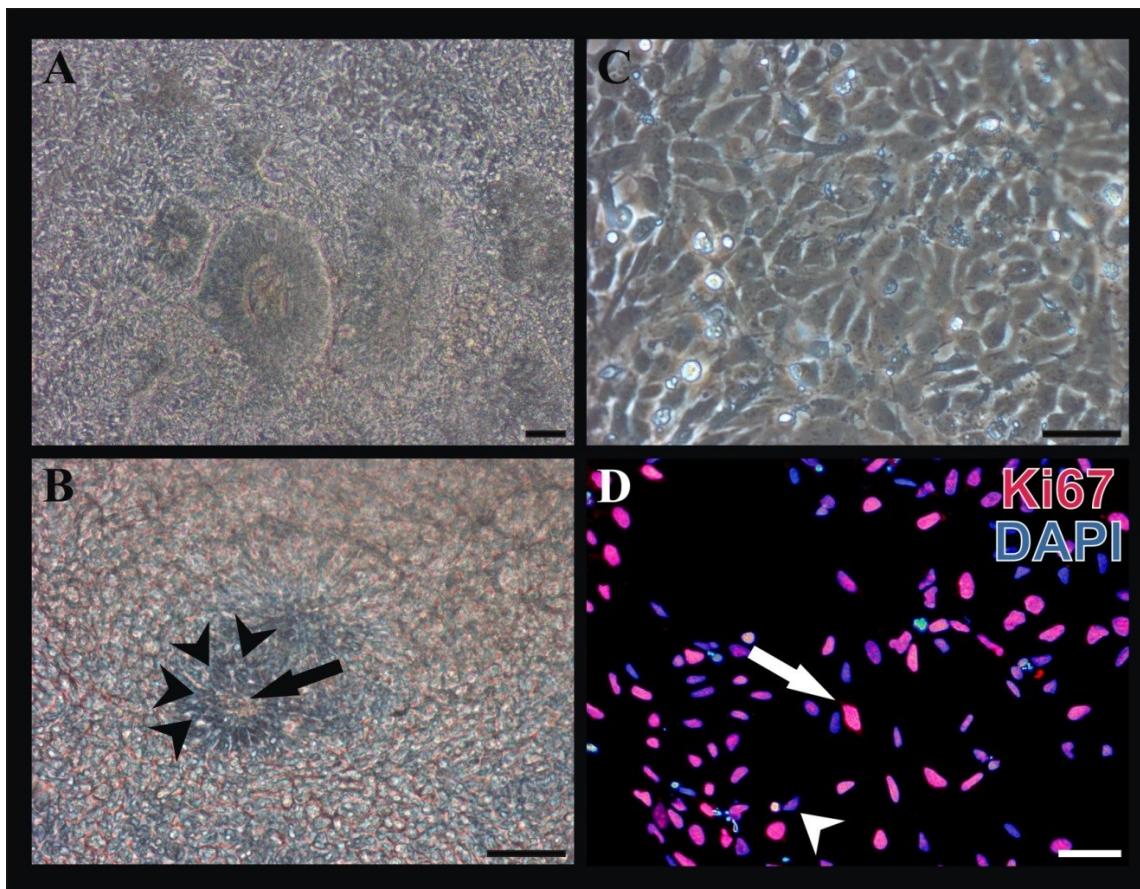


Abb. 16: Neurale Induktion und Generierung von NPZ

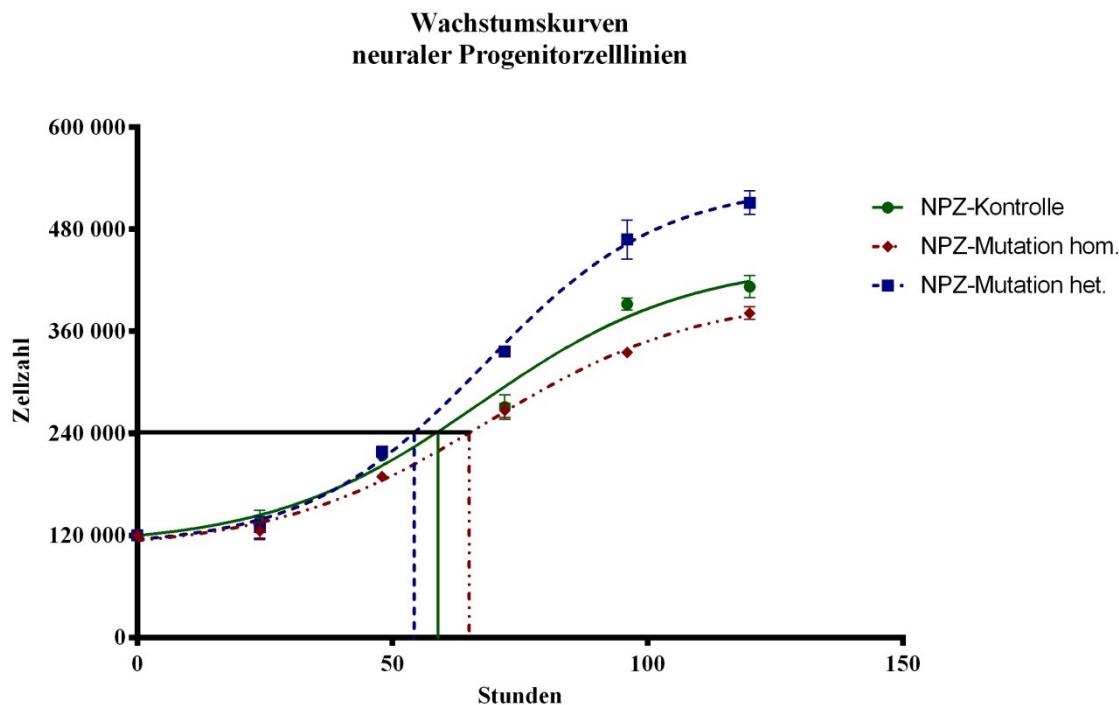
Spontane Differenzierung der iPS in neurale Rosetten (A) bestehend aus radial angeordneten Zellen (B Pfeilspitzen) unter Bildung einer Neuralrohr-ähnlichen Öffnung (B Pfeil). Die mittels magnetischer PSA-NCAM-Sortierung generierten NPZ-Linien zeigten eine Pflasterstein-artige Morphologie (C) mit mitotischer Aktivität. Diese wurde über eine Färbung gegen den Proliferationsmarker Ki67 mit der Überlagerung der DAPI-gefärbten Zellkerne (D) nachgewiesen, wobei hellrote Kerne (Pfeil) sich in der Interphase und punktuell rot gefärbte Zellkerne (Pfeilspitze) sich in der Mitose befanden. Maßstab 50 µm

## ERGEBNISSE

Für die folgenden vergleichenden Analysen wurde willkürlich eine iPS-Linie der Wildtypen (iPS 2b-Kontrolle) mittels PSA-NCAM selektiert sowie je eine iPS-Linie mit homozygoter (iPS 3a-Mutation) und compound heterozygoter NPC1-Mutation (iPS 4a-Mutation). Zur Vereinfachung wurden die Linien fortlaufend mit NPZ-Kontrolle, NPZ-Mutation hom. und NPZ-Mutation het. benannt.

### 4.4.1 Bestimmung der Zellwachstumsraten

Um die Teilungsfähigkeit der generierten NPZ weiter zu untersuchen, wurde ihre Verdopplungszeit mittels Wachstumskurven bestimmt. Das Diagramm der Wachstumskurven (Abb. 17) zeigte auf der y-Achse die Zellzahlen mit einem Startpunkt von 120.000 Zellen und auf der x-Achse die Anzahl der Stunden im proliferierenden Zustand. Die Steigung aller Kurven verlief relativ flach und ergab eine Verdopplungszeit von 59 Stunden für die NPZ-Kontrolle (grüne Kurve), 65 Stunden für die NPZ-Mutation hom. (rote Kurve) sowie 54 Stunden für die NPZ-Mutation het (blaue Kurve). Auffällig war, dass die Messungen eine massiv kürzere Verdopplungszeit für NPZ-Mutation het. gegenüber NPZ-Mutation hom. ergaben, was sich jedoch an Hand des Erreichens der Passagierdichte während der Zellkultivierung nicht nachstellen ließ.



**Abb. 17: Wachstumskurven der NPZ-Linien**

Bestimmung der Verdopplungszeiten aller NPZ-Linien über Erstellung einer Wachstumskurve mit einer Startzellzahl von 120 000 Zellen. Der flache Kurvenverlauf bedingte bis zum Erreichen der 240 000 Zellen eine Verdopplungszeit von 59 Stunden für die NPZ-Kontrolle (grüne Kurve), 65 Stunden für die NPZ-Mutation hom. (rote Kurve) sowie 54 Stunden für die NPZ-Mutation het (blaue Kurve). n = 3 pro Messpunkt

#### 4.4.2 Charakterisierung der neuralen Progenitorzellen

Die generierten NPZ-Linien wurden hinsichtlich ihrer neuralen multipotenten Identität auf die Expression spezifischer neuraler Progenitormarker untersucht: Nestin, Pax6 und Sox2 (Abb. 18). Die Nestin-Färbung (Abb. 18 A, B, C) war in allen Zellen nachweisbar und färbte als Intermediärfilament das gesamte Zellsoma grün. Die Färbung gegen den Transkriptionsfaktor Pax6 (Abb. 18 D, E, F) färbte Zellkern sowie Zytosol rot und war gleichermaßen in allen Zellen sichtbar. Fast alle Zellen waren zudem Sox2-positiv (Abb. 18 G, H, I). Hinsichtlich des Färbemusters waren keine Unterschiede zwischen der NPZ-Kontrolle und den NPZ-Mutationen erkennbar. Mit dem Nachweis dieser drei Marker definierten sich die Zelllinien als neurale multipotente Progenitorzellen mit dem Potential weiter neuronal oder glial zu differenzieren.

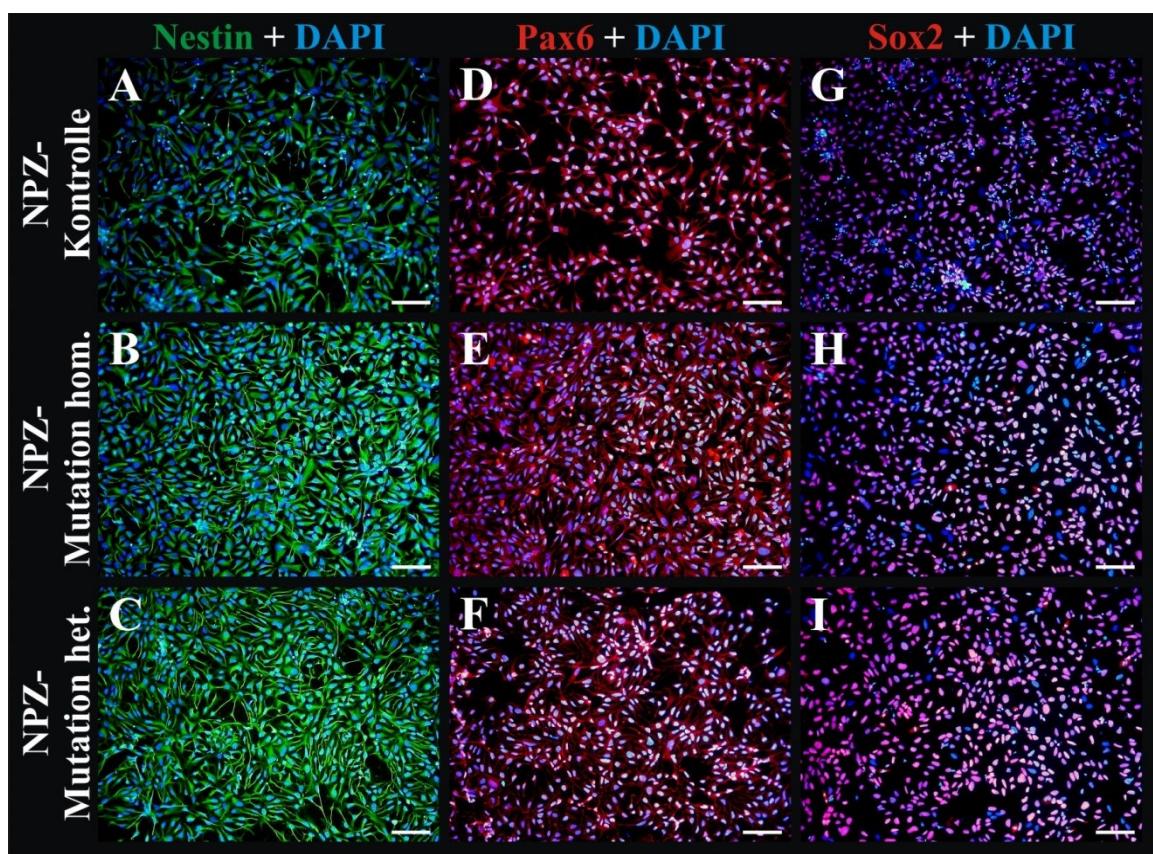


Abb. 18: Nachweis der neuralen Marker Nestin, Pax6 und Sox2 in NPZ

Nachweis der neuralen Progenitormarker Nestin (A – C), Pax6 (D – F) und Sox2 (G – I) in NPZ-Kontrolle, NPZ-Mutation hom. sowie NPZ-Mutation het. ohne sichtbare Unterschiede in ihrer Expression. Maßstab 100  $\mu$ m

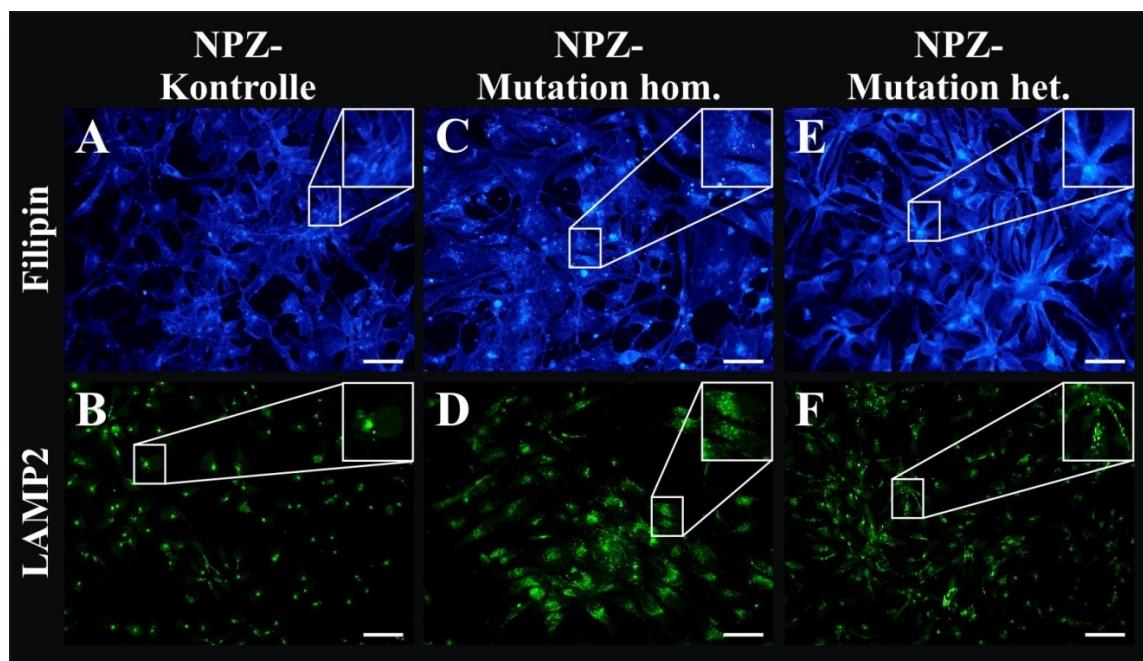
#### 4.4.3 Darstellung des NPC1-Phänotyps in NPZ

Der NPC1-Phänotyp sollte mittels Filipin-Färbung auch in den proliferierenden NPZ dargestellt werden (Abb. 19). Die NPZ-Kontrolle (Abb. 19 A) zeigte eine weitgehend homogene blaue Färbung, wobei durch dichtgelagerte Zellen auch hellere Areale sichtbar waren (vergrößert im Kasten). Die Linie NPZ-Mutation hom. (Abb. 19 C) zeigte deutlich hell leuchtende Punkte, die das akkumulierte Cholesterin lokalisierten (vergrößert im

ERGEBNISSE

Kasten). Im Vergleich dazu zeigte NPZ-Mutation het. (Abb. 19 E) jedoch kaum die typische Punktmusterung, sondern war vermehrt flächig heller gefärbt (vergrößert im Kasten). Eine deutliche Unterscheidung zwischen den Zelllinien gestaltete sich schwierig. Daher wurde neben der NPC1-bedingten Cholesterolakkumulation auch die Lokalisation der Cholesterol-gefüllten Lysosomen durch die Färbung gegen den Lysosomenmarker LAMP2 analysiert. Dabei fiel auf, dass sich das Filipin-Färbemuster in der Lokalisation der Lysosomen wiederspiegeln. NPZ-Kontrolle (Abb. 19 B) zeigte nur kleine Bereiche in der Zelle, in denen sich die Lysosomen befanden. In der NPZ-Mutation hom. (Abb. 19 D) nahm die Menge der gefärbten Lysosomen drastisch zu, wobei sich diese zentral sammelten. Im Gegensatz dazu waren die Lysosomen in NPZ-Mutation het. (Abb. 19 F) in den Zellen großzügig verteilt. Dabei schienen auch in dieser Linie mehr Lysosomen vorhanden zu sein als in der NPZ-Kontrolle.

Zusammengefasst zeigte die lysosomale Färbung ein ähnliches Muster wie die Filipin-Färbung auf Grund der durch die NPC1-Mutationen bedingten Akkumulation von Cholesterol in den Lysosomen.



**Abb. 19: Visualisierung von Cholesterol sowie Analyse des Verteilungsmusters von Lysosomen in NPZ**

NPZ zeigten in der Filipin-Färbung (A, C, E) gleiches Verteilungsmuster von Cholesterol wie in der Verteilung von LAMP2-positiven Lysosomen (B, D, F). NPZ-Kontrolle (A, B) zeigte minimale Färbungen im Gegensatz zur massiven zentrierten Färbung in NPZ-Mutation hom. (C, D) und der mehr flächigen Färbung in NPZ-Mutation het. (E, F). Maßstab 50  $\mu$ m

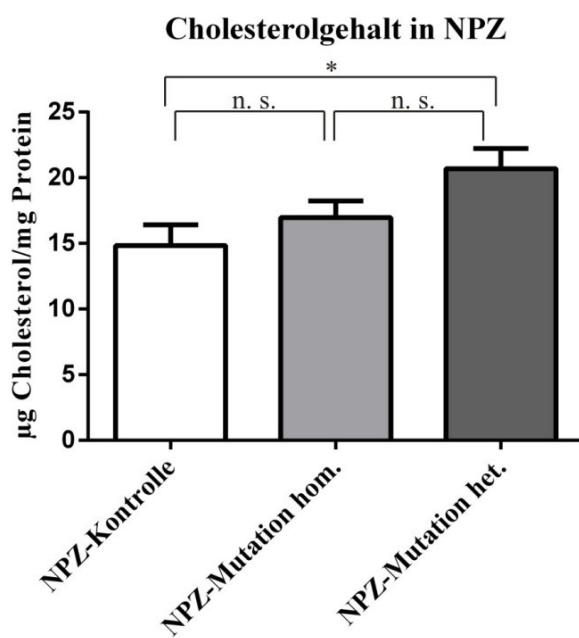
#### 4.4.4 Analyse des Cholesterolgehaltes in NPZ

Die sich anschließende Quantifizierung des Cholesterolgehaltes in den proliferierenden NPZ (Abb. 20) zeigte, dass die NPZ-Kontrolle einen Wert von  $14,83 \pm 1,60 \mu\text{g}$  Cholesterol/mg Protein aufwiesen. Der Cholesterolgehalt der homozygoten NPC1-Linie war mit  $16,96 \pm 1,29 \mu\text{g}$  Cholesterol/mg Protein zwar höher als in der Kontrolle, jedoch

## ERGEBNISSE

war der Unterschied nicht signifikant. Im Gegensatz dazu war die compound heterozygote NPC1-Linie mit  $20,70 \pm 1,53 \mu\text{g Cholesterol/mg Protein}$  signifikant höher im Cholesterolgehalt im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die beiden NPC1-Linien variierten untereinander im Cholesterolgehalt um etwa  $4 \mu\text{g Cholesterol/mg Protein}$ , was jedoch nicht signifikant war.

Die Quantifizierung des Cholesterolgehaltes ergab keine eindeutige Unterscheidung der Linie NPZ-Mutation hom. von den anderen beiden Linien, jedoch war eine Tendenz erkennbar.



**Abb. 20: Cholesterolgehalt in NPZ-Linien nach 3 bis 4 Tagen Proliferation**

Der Cholesterolgehalt der NPZ-Kontrolle war niedriger als der Cholesterolgehalt in beiden NPZ-Mutationen. Dabei war jedoch nur der Cholesterolgehalt zwischen NPZ-Kontrolle und NPZ-Mutation het. signifikant erhöht.  $n = 11 - 13$

## 4.5 Differenzierung der neuralen Progenitorzellen in neuronale Zellen

Die NPZ wurden nach ihrer Charakterisierung weiter in die neuronale Richtung differenziert und ab da an als NDZ bezeichnet. Für die vorliegende Arbeit wurden die differenzierten Zellen nach 2 und 6 Wochen analysiert hinsichtlich ihrer Morphologie, Anteil neuronaler und glialer Zellen an der Gesamtpopulation, Expression von neuronalen und glialen Markern sowie Darstellung und Quantifizierung der NPC1-bedingten Cholesterolakkumulation.

### 4.5.1 Untersuchung der Morphologie

Die NDZ repräsentierten keine homogene Kultur, sondern ein Gemisch aus unterschiedlichen Zelltypen. Im Phasenkontrastbild (Abb. 21 A – F) zeigten sich

ERGEBNISSE

---

Neuronen-artige Zellen mit langen Ausläufern (Pfeile) sowie flächigere Glia-artige Zellen (Pfeilspitzen), meist darunter liegend. Dabei gab es zwischen den genannten Zelltypen weitere Unterschiede. So variierten die Neuronen-artige Zellen z. B. zwischen bipolaren (Abb. 21 C) und triangulären (Abb. 21 D) Formen.

Um ein detaillierteres Bild der Zellmorphologie zu erhalten wurde gegen das Mikrotubuliprotein alpha-Tubulin gefärbt (Abb. 21 G – R). Die Unterschiede zwischen den breiten flachen Zellen und den Neuronen-artigen Zellen war deutlich zu erkennen. Die Überlagerung mit der DAPI-Färbung der Kerne (Abb. 21 M – R) zeigte, dass sich nach 2 Wochen Differenzierung einige Zellen entlang von Ausläufern ansammelten (Abb. 21 M, O, Q, Dreieck) und in Zellhaufen zusammen lagerten (Abb. 21 O, Q, R, Stern). Es fiel weiterhin auf, dass die Zellkerne der flachen Zellen doppelt so groß waren wie die der Zellen mit langen axonalen Ausläufern. Während der Differenzierung nahm die Anzahl dieser großkernigen Zellart außerdem zu.

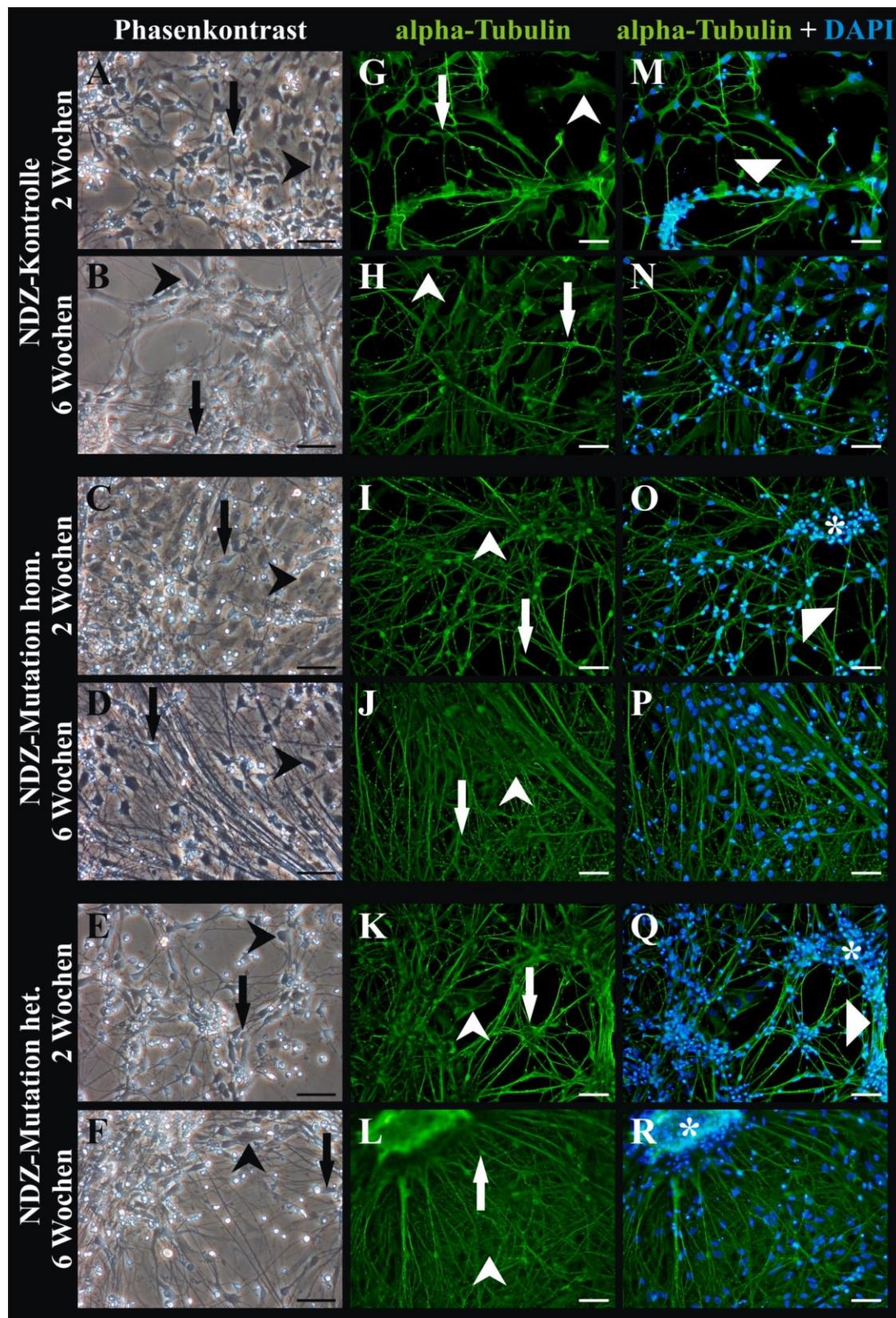


Abb. 21: Morphologische Analysen der NDZ nach 2 und 6 Wochen

2 und 6 Wochen alte NDZ dargestellt im Phasenkontrast (A – F) und nach alpha-Tubulin-Färbung (G – L) sowie in der Überlagerung mit der Kernfärbung DAPI (M – R). Pfeile markieren Neuronen-artige Zellen mit langen Ausläufern und Pfeilspitzen deuten auf flächigere Glia-artige Zellen (A – L). Dreiecke markieren Zellkerne entlang von Axonen und Sterne verweisen auf Ansammlung von Zellen. Maßstab 50 µm

## ERGEBNISSE

---

Zum Nachweis neuronaler und glialer Zellen in der Kultur sowie deren anschließende Quantifizierung wurde die Methodik der Durchflusszytometrie genutzt.

### 4.5.2 Analyse der Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie

Zur Identifikation der während der Differenzierung entstandenen unterschiedlichen neuralen Zellarten wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Dazu wurde die Expression zweier neuronaler Marker (HuC/D und beta III-Tubulin) sowie die Expression zweier glialer Marker (S100 und GFAP) über 5 Wochen in den Zellen untersucht (Abb. 22).

Der frühe neuronale Marker HuC/D (Abb. 22 A) wurde in der NDZ-Kontrolllinie nach einer Woche Differenzierung von  $18,48 \pm 0,54$  % der Zellen exprimiert und erhöhte sich nach zwei Wochen Differenzierung signifikant auf  $21,58 \pm 1,37$  %. Nach 3 und 4 Wochen nahm der Anteil HuC/D-positiver Zellen signifikant ab und nach 5 Wochen Differenzierung wurden nur noch  $2,94 \pm 0,37$  % der Zellen positiv detektiert.

Vergleichend dazu konnten in der homozygoten NPC1-Linie nach einer Woche Differenzierung  $19,70 \pm 1,98$  % HuC/D-positive Zellen detektiert werden, deren Anteil sich nach zwei Wochen signifikant auf  $28,12 \pm 1,93$  % erhöhte. Nach drei Wochen Differenzierung fiel dieser Wert leicht ab bis er sich nach vier Wochen signifikant auf  $13,44 \pm 1,02$  % verringerte und nach fünf Wochen nur noch in  $5,08 \pm 0,65$  % Zellen detektiert werden konnte.

Die compound heterozygote NPC1-Linie zeigte nach einer Woche Differenzierung  $19,73 \pm 1,60$  % HuC/D-positive Zellen, die nach zwei Wochen auf einen Anteil von  $25,78 \pm 3,80$  anstiegen. Nach einer weiteren Woche Differenzierung war ein signifikanter Abfall auf  $6,26 \pm 2,37$  % positiver Zellen zu verzeichnen, welche sich nach fünf Wochen auf  $2,32 \pm 1,68$  % minimierten.

Mittels des Markers beta III-Tubulin (Abb. 22 B) wurde in der Kontrolle nach einer Woche Differenzierung  $22,88 \pm 2,68$  % der Zellen als Neurone detektiert. Der Anteil stieg nach zwei Wochen signifikant auf  $32,41 \pm 3,24$  % an, um nach drei Wochen Differenzierung wiederum signifikant auf  $15,69 \pm 1,79$  % abzufallen. Dieser Wert fiel weiterhin leicht ab bis nach fünf Wochen noch  $7,34 \pm 1,34$  % neuronale Zellen in der Kultur vorlagen.

Die homozygote NPC1-Linie verzeichnete nach einer Woche Differenzierung  $24,95 \pm 3,46$  % beta III-Tubulin-positive Zellen und fiel nach zwei und drei Wochen leicht auf  $21,35 \pm 2,05$  % ab. Nach vier Wochen war eine signifikante Reduzierung auf  $11,62 \pm 1,76$  % zu verzeichnen. Der Anteil beta III-Tubulin-positiver Zellen reduzierte sich nach fünf Wochen Differenzierung weiter signifikant auf  $6,62 \pm 1,20$  %.

In der compound heterozygoten NPC1-Linie waren nach einer Woche Differenzierung  $19,92 \pm 2,71$  % Zellen beta III-Tubulin-positiv. Nach zwei Wochen nahm der Anteil leicht zu bis er sich nach drei Wochen auf  $31,23 \pm 3,66$  % erhöhte. Dieser Anteil wurde auch nach vier Wochen Differenzierung ungefähr erreicht bis nach fünf Wochen Differenzierung der Anteil neuronaler Zellen auf  $10,25 \pm 2,68$  % signifikant abfiel.

ERGEBNISSE

---

Zur Analyse glialer Zellen wurde der Anteil S100-positiver Zellen in den Kulturen analysiert (Abb. 22 C), wobei S100 speziell in früh differenzierten glialen Zellen exprimiert wird. Die NDZ-Kontrolle wies nach einer Woche Differenzierung einen Anteil von  $74,41 \pm 2,39$  % S100-positiver Zellen auf, der nach einer weiteren Woche signifikant auf  $47,08 \pm 2,41$  % abfiel. Dieser Anteil an der Gesamtpopulation änderte sich nur minimal nach drei und vier Wochen und lag nach fünf Wochen mit  $49,23 \pm 6,77$  % vor.

Vergleichend existierten in der homozygoten NPC1-Linie schon nach einer Woche Differenzierung  $83,80 \pm 1,68$  % gliale Zellen, deren Anteil sich nach zwei Wochen Differenzierung signifikant auf  $74,44 \pm 2,65$  % reduzierte. Dieser Wert nahm über die Wochen weiterhin leicht ab und nach fünf Wochen Differenzierung konnten noch  $63,70 \pm 4,10$  % der Zellen positiv für S100 getestet werden.

In der NPC1-Linie mit compound heterozygoter Mutation wurden  $78,16 \pm 2,65$  % S100-positive Zellen nach einer Woche detektiert. Dieser Wert fiel nach zwei Wochen Differenzierung signifikant auf  $51,11 \pm 2,99$  % ab. Ein leichter Anstieg war jeweils nach drei, vier und fünf Wochen zu detektieren, wonach sich der Anteil S100-positiver Zellen bei letztgenanntem auf  $62,46 \pm 7,15$  % belief. Diese Änderungen waren jedoch auf Grund der großen Varianzen nicht signifikant.

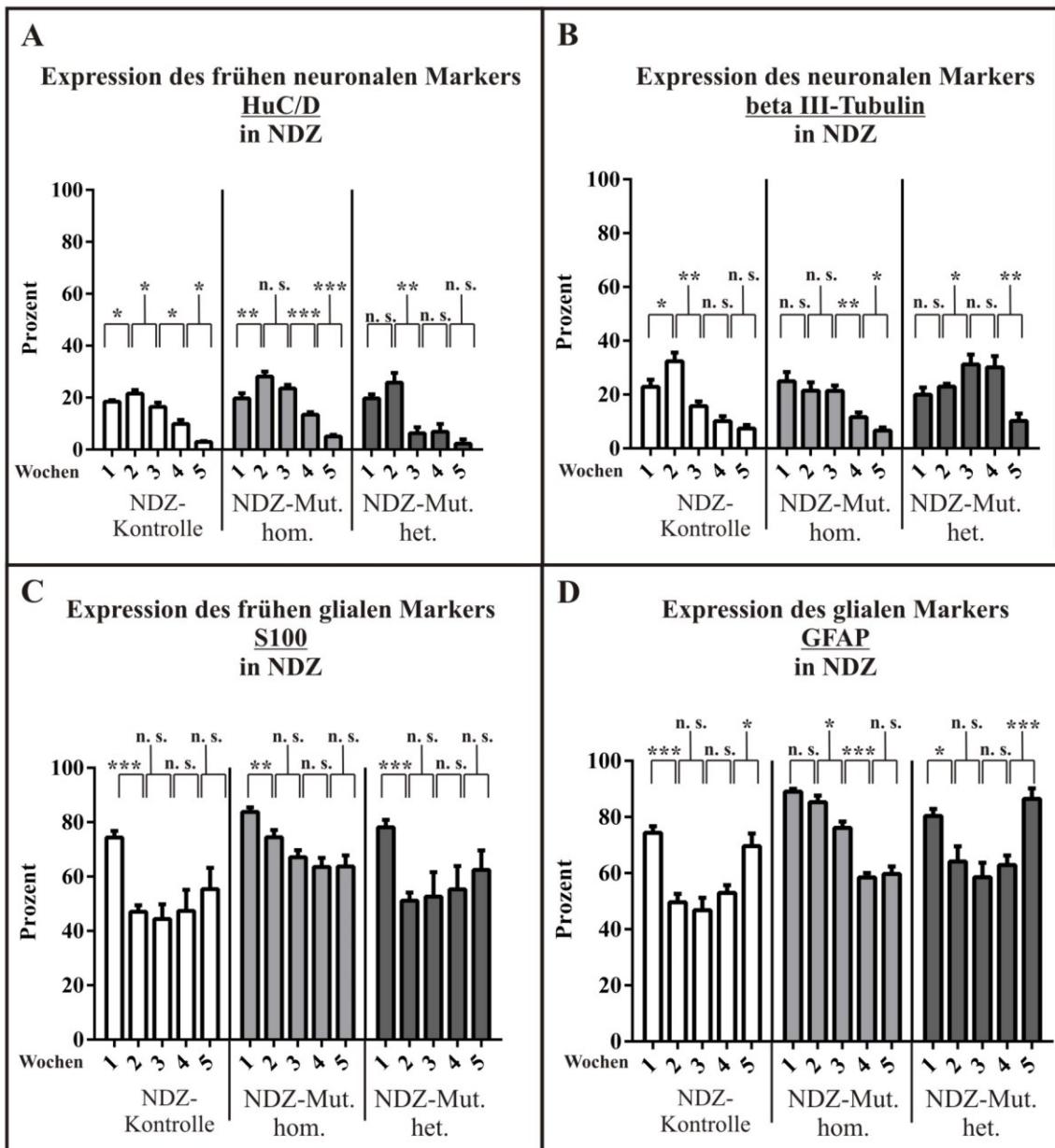
Die Analyse der GFAP-positiven Zellen (Abb. 22 D) in der Kontroll-Kultur ergab nach einer Woche Differenzierung einen Anteil von  $74,35 \pm 2,37$  %, der sich nach zwei Wochen signifikant auf  $49,63 \pm 2,95$  % verringerte. Nach drei und vier Wochen Differenzierung änderte sich der Wert nicht wesentlich bis er nach fünf Wochen erneut signifikant auf  $69,59 \pm 4,56$  % anstieg.

Die homozygote NPC1-Linie verzeichnete nach einer Woche Differenzierung  $89,05 \pm 1,03$  % GFAP-positive Zellen, deren Anteil sich nur leicht nach zwei Wochen verringerte um nach drei Wochen signifikant auf  $76,10 \pm 2,31$  % abzufallen. Nach vier Wochen Differenzierung reduzierte sich der Anteil weiter signifikant auf  $58,42 \pm 1,66$  % und stagnierte nach fünf Wochen Differenzierung bei diesem Anteil mit  $59,72 \pm 2,64$  %.

Die compound heterozygote NPC1-Linie wies nach einer Woche Differenzierung  $80,35 \pm 2,50$  % GFAP-positive Zellen auf, deren Anteil sich nach zwei Wochen signifikant auf  $64,16 \pm 5,41$  % verringerte. Dieser Anteil schwankte nach drei und vier Wochen um rund 6 % und stieg nach fünf Wochen Differenzierung signifikant auf  $86,43 \pm 3,79$  % an.

Zusammengefasst zeigte der frühe neuronale Marker HuC/D in allen NDZ-Kulturen nach zwei Wochen die höchste Expression, die sich dann nach fünf Wochen auf ein Minimum abschwächte. Korrespondierend dazu zeigte die NDZ-Kontrolle auch nach zwei Wochen den höchsten Wert der beta III-Tubulin-positiven Zellen, die in NDZ-Mutation hom. bereits nach einer Woche und in NDZ-Mutation het. erst nach drei Wochen auftrat. Nach fünf Wochen Differenzierung lagen zwischen 5 – 10 % Neurone in den Kulturen vor. Die glialen Marker S100 und GFAP zeigten ähnliche Expressionsmuster mit unterschiedlicher Ausprägung. Alle NDZ-Kulturen zeigten nach einer Woche Differenzierung ein Maximum an glialen Zellen, dass sich nach zwei Wochen mehr oder weniger stark reduzierte, um nach fünf Wochen in NDZ-Kontrolle und NDZ-Mutation het. erneut stark anzusteigen. Alle Kulturen zeigten einen deutlich höheren Anteil glialer Zellen als neuronale Zellen.

ERGEBNISSE



**Abb. 22: Expressionsanalysen neuronaler und glialer Marker**

Analyse der Expression der neuronalen Marker HuC/D (A) und beta III-Tubulin (B) sowie der glialen Marker S100 (C) und GFAP (D) über einen Differenzierungszeitraum von 5 Wochen in NDZ-Kontrolle, NDZ-Mutation hom. (NDZ-Mut. hom.) sowie NDZ-Mutation het. (NDZ-Mut. het.). n = 3 - 11

#### 4.5.3 Analyse neuronaler und glialer Marker mittels Immunzytochemie

Als Ergänzung zu den FACS-Daten wurde nach 2 und 6 Wochen Differenzierung gegen die neuronalen Marker HuC/D und beta III-Tubulin sowie gegen die glialen Marker S100 und GFAP erneut gefärbt (Abb. 23 und 24).

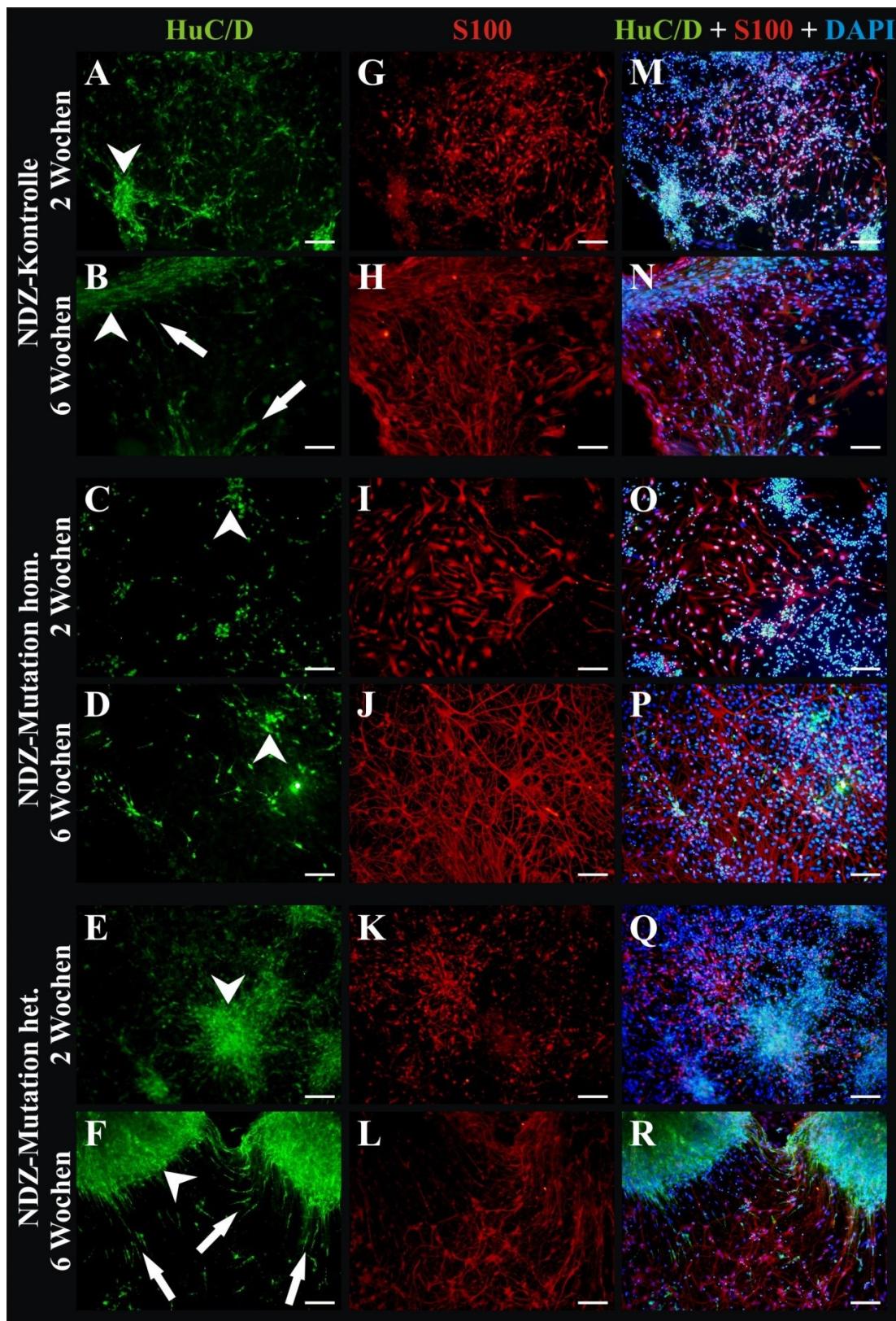
Die Färbung gegen den sehr früh exprimierten neuronalen Marker HuC/D (Abb. 23 A – F) zeigte, dass sich die positiven Zellen nach 2 Wochen Differenzierung in Gruppen bzw. Haufen zusammenlagerten (Pfeilspitzen). Nach 6 Wochen Differenzierung schienen einzelne HuC/D-positive Zellen weiter zu den Zellzusammenlagerungen hin zu wandern (Abb. 23 B, F, Pfeile). Die gegen S100-gefärbten frühen glialen Zellen (Abb. 23 G – L)

ERGEBNISSE

---

zeigten nach 2 Wochen Differenzierung in der NDZ-Kontrolle (Abb. 23 G) eher die Morphologie von NPZ und erst nach 6 Wochen (Abb. 23 H) die gliale sternenförmige Zellmorphologie unter Bildung eines Netzwerkes. Im Gegensatz dazu zeigten die S100-positiven Zellen der NDZ-Mutation hom. bereits nach 2 Wochen (Abb. 23 I) deutlich flächige gliale Strukturen und nach 6 Wochen (Abb. 23 J) ein sehr dichtes Netzwerk mit vielen langen Ausläufern. Die Zellen der NDZ-Mutation het. zeigten morphologisch eine Mischform aus beiden oben beschriebenen Zelltypen. Nach 2 Wochen Differenzierung (Abb. 23 K) waren die S100-positiven Zellen den NPZ ähnlich, aber einige Zellen bildeten auch lange Ausläufer. Nach 6 Wochen Differenzierung (Abb. 23 L) bildeten diese Zellen auch ein Netzwerk. In der Überlagerung der Färbungen mit der Kernfärbung DAPI (Abb. 23 M – R) wurde deutlich, dass die S100-positiven Gliazellen als Schicht weitestgehend unter bzw. um die HuC/D-positiven Zellen lagen.

ERGEBNISSE



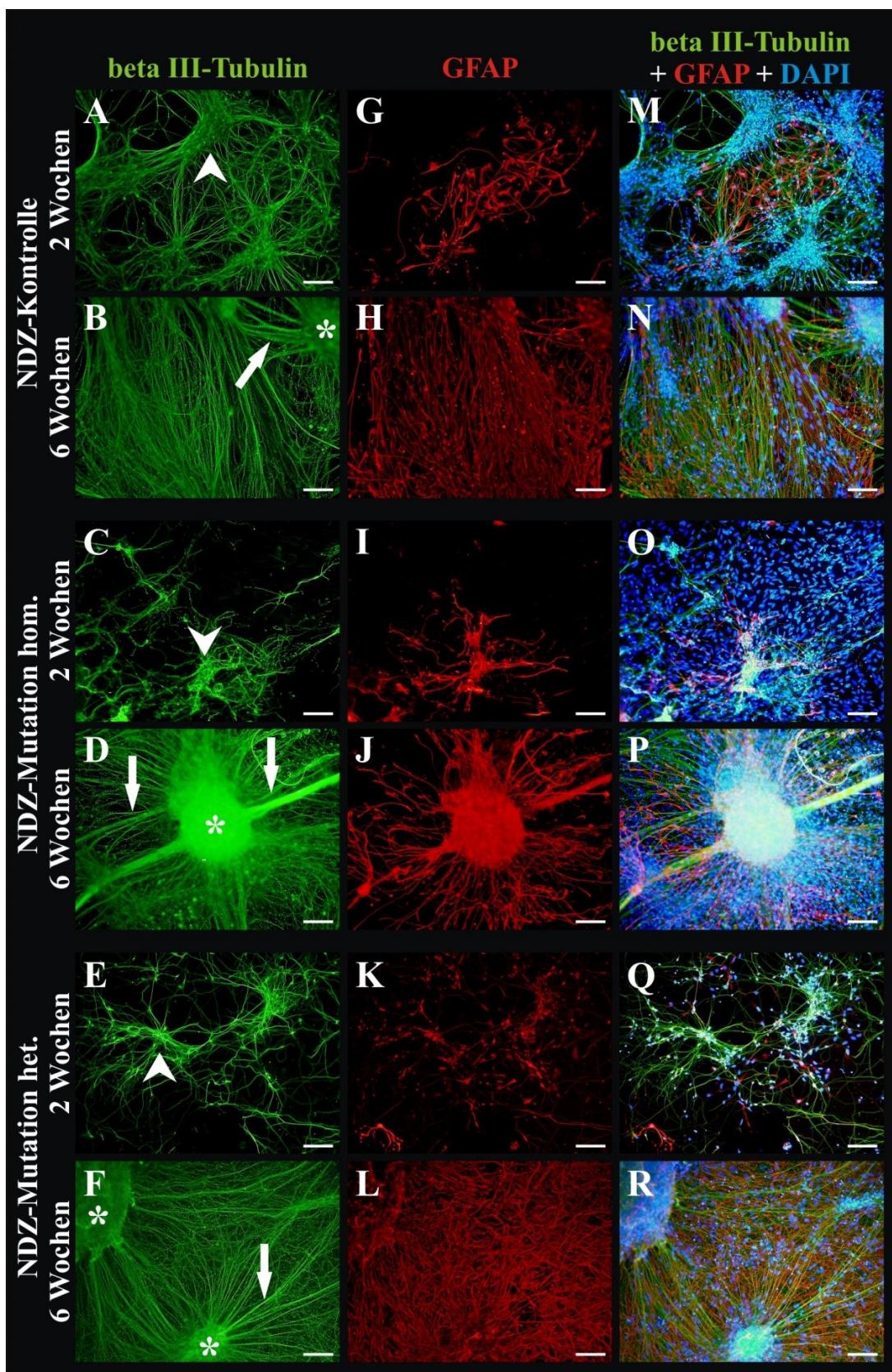
**Abb. 23: Nachweis früher neuronaler und glialer Marker in NDZ-Kulturen**

2 und 6 Wochen alte NDZ gefärbt gegen den frühen neuronalen Marker HuC/D (A – F) und den frühen glialen Marker S100 (G – L) sowie in der Überlagerung mit der Zellkernfärbung DAPI (M – R) dargestellt. Die HuC/D-positiven Zellen lagerten sich nach 2 Wochen Differenzierung zu Gruppen und Haufen zusammen (Pfeilspitzen) und wanderten nach 6 Wochen Differenzierung teilweise weiterhin darauf zu (Pfeile). Maßstab 100 µm

ERGEBNISSE

---

Im Vergleich dazu wurden die heranreifenden neuronalen und reifen glialen Zellen mittels beta III-Tubulin- beziehungsweise GFAP-Färbung analysiert (Abb. 24). Die Färbung gegen beta III-Tubulin zeigte, dass alle Zelllinien nach 2 Wochen Differenzierung (Abb. 24 A, C, E) bereits ein flächiges Netzwerk aus neuronalen Zellen mit langen Ausläufern gebildet hatten und sich dieses nach 6 Wochen (Abb. 24 B, D, F) weiter stark verdichtete. Die nach 2 Wochen erneut beobachtbare Zusammenlagerung von Zellen (Abb. 24 A, C, E, Pfeilspitzen) resultierte nach 6 Wochen Differenzierung in der Bildung von neuronalen Zellklumpen (Abb. 24 B, D, F, Sterne), aus denen Axone ausstrahlten. Dabei lagerten sich viele Axone zusammen und bildeten axonale Bündel (Pfeile). Die Darstellung reifer Gliazellen durch die Färbung gegen GFAP (Abb. 24 G – L) zeigte in allen 2 Wochen differenzierten Linien (Abb. 24 G, I, K) nur wenig positive Zellen. Diese unterschieden sich dann auch morphologisch stark hinsichtlich flächiger Zellen mit langen Ausläufern in der NDZ-Kontrolle (Abb. 24 G), sehr langgestreckten Gliazellen in der Linie NDZ-Mutation hom. (Abb. 24 I) sowie einer Mischform aus NPZ-Morphologie samt langen Ausläufern in der Linie NDZ-Mutation het. (Abb. 24 K). Nach 6 Wochen Differenzierung waren sehr viel mehr Zellen GFAP-positiv. Die gliale Zellschicht wurde dadurch sehr viel dichter und die GFAP-positiven Zellen in der NDZ-Kontrolle veränderten sich zu flächigen und langgestreckten Zellen (Abb. 24 H). Wie schon aus der Färbung der frühen neuronalen und glialen Marker hervorging, zeigte die Überlagerung der Bilder mit der Kernfärbung DAPI (Abb. 24 M – R), dass sich die neuronalen Zellen auf den glialen Zellen ansiedelten.



**Abb. 24: Nachweis neuronaler und glialer Marker in NDZ-Kulturen**

2 und 6 Wochen alte NDZ gefärbt gegen beta III-Tubulin (A – F) und GFAP (G – L) sowie in der Überlagerung mit der Zellkernfärbung DAPI (M – R) dargestellt. Beta III-Tubulin positive Zellen lagerten sich nach 2 Wochen zu Zellgruppen zusammen (Pfeilspitzen), die sich nach 6 Wochen zu Zellklumpen verdichteten (Sterne), aus denen axonale Bündel ausstrahlten (Pfeile). Maßstab 100 µm

ERGEBNISSE

---

Um die neuronalen Zellen noch eingehender zu untersuchen, wurde gegen MAP2 (in grün) als Marker ausgereifter Neurone (Abb. 25 A – F) und beta III-Tubulin (in rot) als Marker für reifende Neurone (Abb. 25 G – L) gefärbt. In der Überlagerung beider Färbungen mit der blauen Kernfärbung DAPI (Abb. 25 M – R) zeigte sich in allen NDZ-Linien, dass von den vielen beta III-Tubulin-positiven Zellen nach 2 Wochen Differenzierung nur wenige auch MAP2-positiv waren. Nach 6 Wochen Differenzierung nahm der Anteil der MAP2-positiven Neurone zwar zu, jedoch nicht so drastisch wie das dichte Netzwerk beta III-Tubulin-positiver Zellen und deren Ausläufer. Es fiel auf, dass sich die MAP2-positiven Neurone in den bereits beschriebenen Zellzusammenlagerungen anreicherten.

Summarisch nahm die Reifung der Neurone mit der Differenzierungsdauer zu, wobei das Netzwerk MAP2-positiver Zellen nicht so stark ausgeprägt war wie das der III-Tubulin-positiven Zellen.

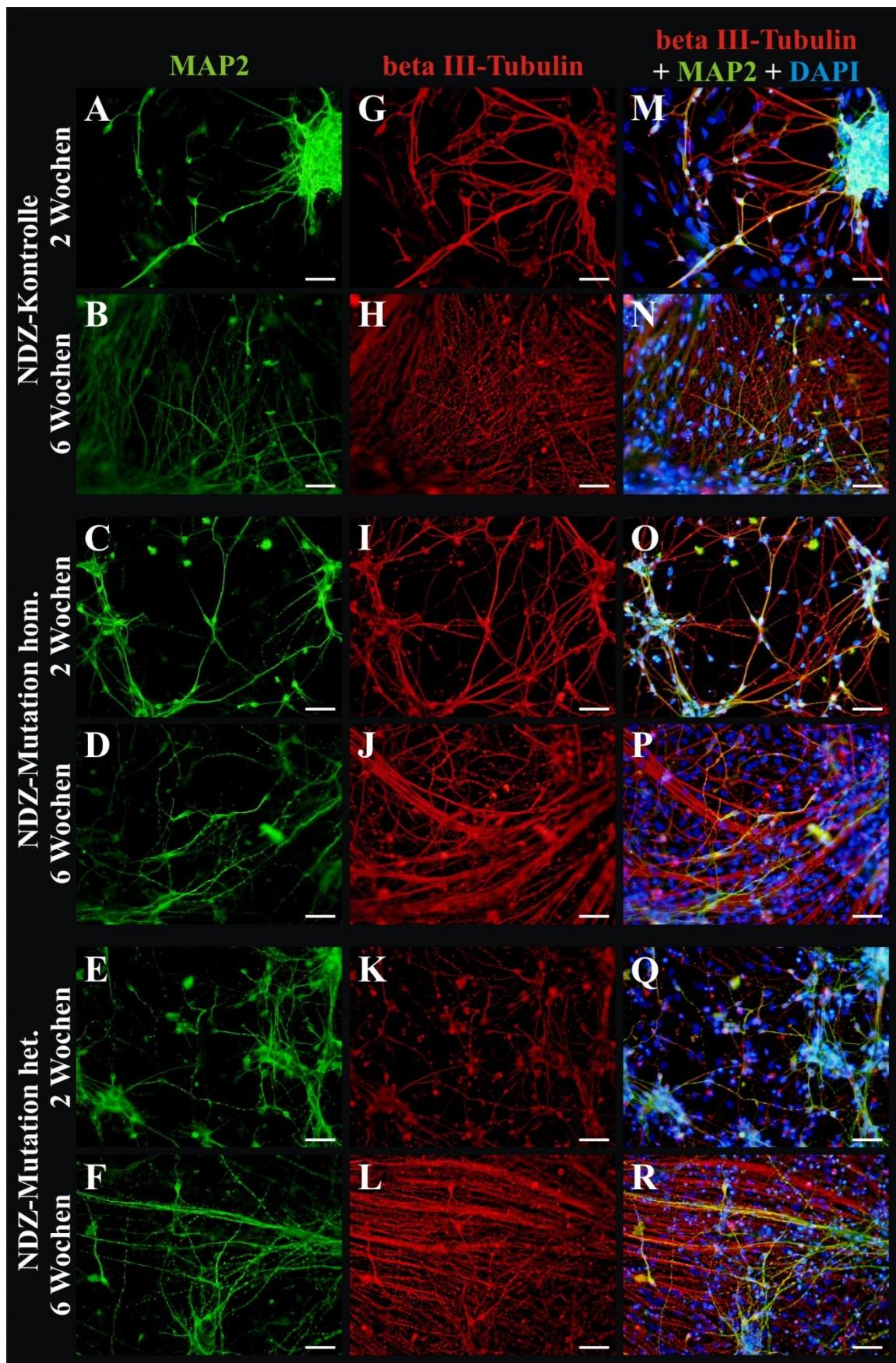
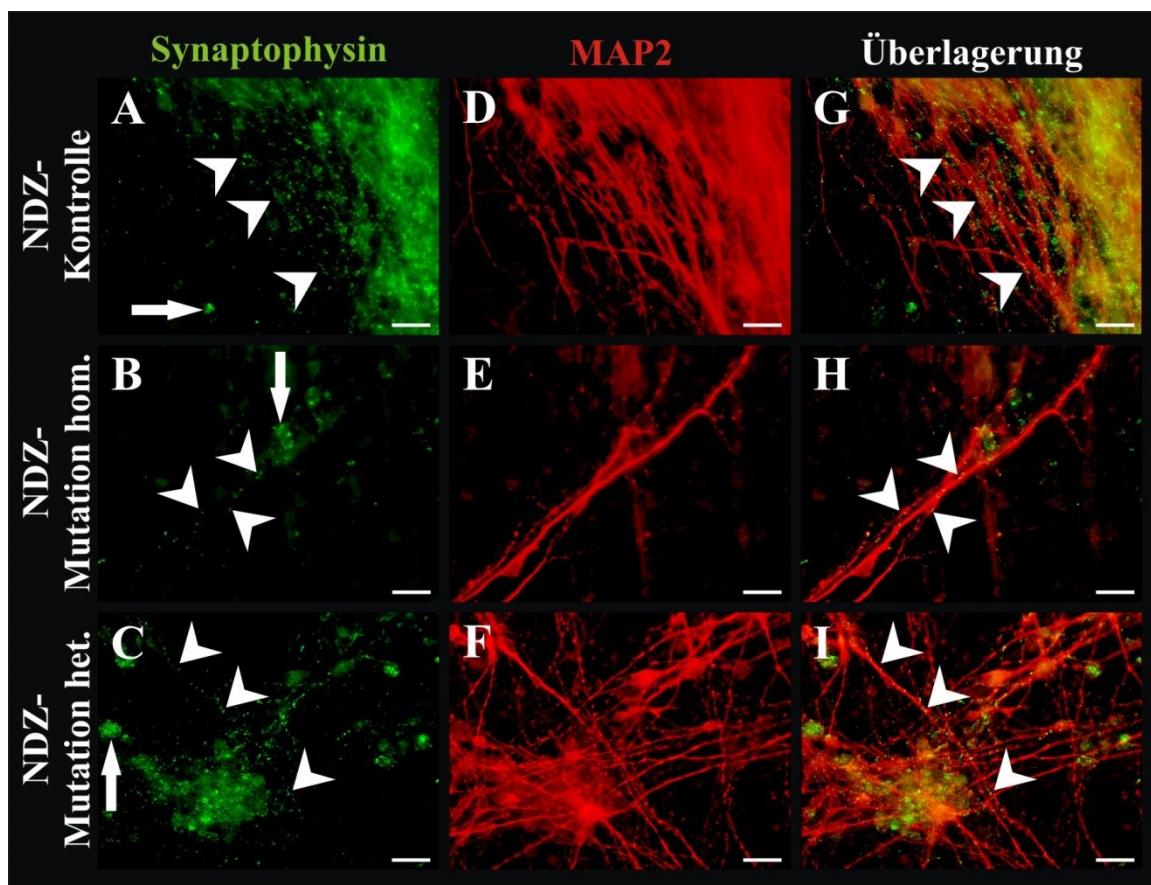


Abb. 25: Nachweis heranreifender und reifer Neurone in NDZ-Kulturen

2 und 6 Wochen alte NDZ gefärbt gegen MAP2 (A – F) und beta III-Tubulin (G – L) sowie in der Überlagerung mit der Zellkernfärbung DAPI (M – R) dargestellt. Maßstab 50  $\mu$ m

ERGEBNISSE

Es wurde, im Hinblick auf eine mögliche elektrophysiologische Aktivität der Neurone, die Bildung präsynaptischer Vesikel in den MAP2-positiven reifen Neuronen untersucht (Abb. 26). Dazu wurden 6 Wochen differenzierten Zellen gegen Synaptophysin (Abb. 26 A – C) und MAP2 (Abb. 26 D – F) gefärbt. Die punktuelle grüne Färbung von Synaptophysin lokalisierte präsynaptische Vesikel auf den Axonen (Pfeilspitzen) und in den Somata (Pfeile) der Neurone. Die Anzahl der präsynaptischen Vesikel nahm in den Zellzusammenlagerungen stark zu, was mit der bereits gezeigten Häufung reifer Neurone in den neuronalen Zellklumpen korrelierte. Die Synaptophysin-Färbung war nicht ausschließlich auf die MAP2-positiven Zellen beschränkt, sondern höchstwahrscheinlich auch auf dem dichteren Netzwerk beta III-Tubulin-positiver Zellen lokalisiert. Die Intensität der präsynaptischen Färbung war jedoch auf den MAP2-positiven Strukturen am größten. Der Nachweis präsynaptischer Vesikel erfüllte eine Grundvoraussetzung für eine mögliche elektrophysiologische Aktivität der Neurone.



**Abb. 26: Nachweis präsynaptischer Vesikel in 6 Wochen alten NDZ-Kulturen**

6 Wochen alte NDZ gefärbt gegen Synaptophysin (A – C) und MAP2 (D – F) sowie in der Überlagerung beider Färbungen (G – I) dargestellt. Die Synaptophysin-positiven präsynaptischen Vesikel waren auf Axonen reifer MAP2-positiver Neurone (Pfeilspitzen) und in Zellsomata (Pfeile) lokalisiert. Maßstab 25 µm

ERGEBNISSE

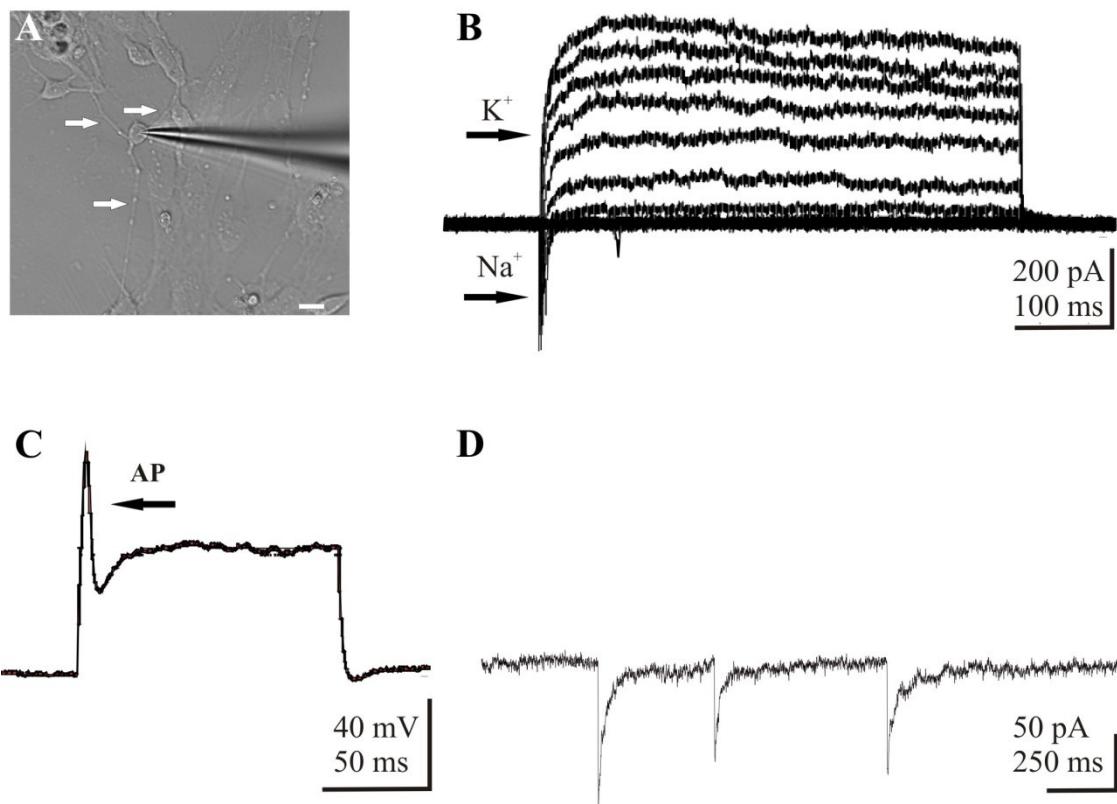
---

#### 4.5.4 Elektrophysiologische Untersuchungen der NDZ

Neben einer morphologischen Charakterisierung der NDZ erfolgte eine erste funktionelle Untersuchung dieser Zellen mittels der Patch-Clamp-Technik. Die Messungen wurden am Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration von M. Sc. Michael Rabenstein und Dr. Moritz Frech durchgeführt und die hier dargestellten Ergebnisse wurden von Ihnen zur Verfügung gestellt. In den 8 bis 11 Tage sowie über 50 Tage alten NDZ wurden die für Neurone typischen spannungsaktivierten Natrium- und Kaliumkanäle untersucht und exemplarische Messungen hier dargestellt.

In Abb. 27 A saß in einem Ausschnitt der untersuchten NDZ die von rechts kommende Messelektrode einer ovalen Zelle mit drei Ausläufern (Pfeile) auf. Das durch eine Spannungsfamilie ausgelöste Strommuster in Abb. 27 B ist typisch für neuronale Zellen und stellt die einzelnen Ströme in der Überlagerung dar. Zu Beginn waren schnelle, transiente, einwärtsgerichtete Natriumströme (gekennzeichnet mit  $\text{Na}^+$ ) zu erkennen, denen sich lang anhaltende auswärtsgerichtete Kaliumströme (gekennzeichnet mit  $\text{K}^+$ ) anschlossen. Abb. 27 C zeigt eine Messung, die in der Stromklemme durchgeführt wurde. In dieser Zelle konnte durch Strominjektion ein Aktionspotential ausgelöst werden, welches als schnelle und transiente Änderung des Membranpotentials zu Beginn der Strominjektion zu erkennen ist (gekennzeichnet mit AP). Der Ausschnitt einer Messung in der Spannungsklemme bei einem Haltepotential von -60 mV wurde in Abb. 27 D dargestellt. In dieser Stromspur sind drei spontan auftretende, einwärtsgerichtete, transiente Ströme zu erkennen, wobei es sich um spontane postsynaptische Ströme handelte.

Die exemplarisch dargestellten Ergebnisse zeigten auf, dass die NDZ funktionelle spannungs- und ligandenaktivierte Ionenkanäle exprimierten und somit elektrophysiologisch aktiv waren.



**Abb. 27: Exemplarische Darstellung von elektrophysiologischen Untersuchungen an NDZ**  
 Darstellung einer NDZ-Kultur mit von rechts kommender Messelektrode, die einer Zelle mit drei Ausläufern aufsitzt (A, Pfeile zeigen auf Zellausläufer). Ein durch eine Spannungsfamilie ausgelöstes Strommuster mit überlagerten Strömen (B) zeigt schnelle einwärtsgerichtete Natriumströme ( $\text{Na}^+$ ) sowie langandauernde auswärtsgerichtete Kaliumströme ( $\text{K}^+$ ). Eine Strominjektion während der Stromklemme induzierte ein Aktionspotential (AP) und wurde durch Veränderungen des Membranpotentials dargestellt (C). Eine in der Spannungsklemme gemessene Stromspur zeigte spontane transiente einwärtsgerichtete postsynaptische Ströme (D). Messung A – C: 8 bis 11 Tage alte NDZ. Messung D: über 50 Tage alte NDZ.

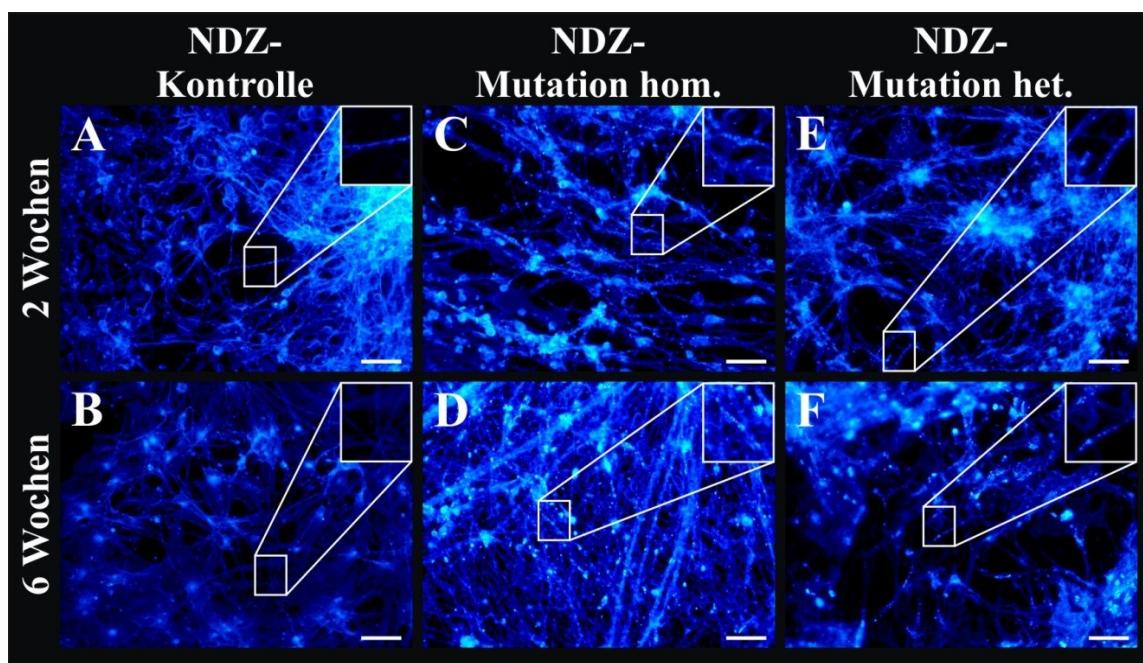
#### 4.5.5 Darstellung des NPC1-Phänotyps in 2 und 6 Wochen differenzierten Zellen

Nach 2 und 6 Wochen Differenzierung wurde die Cholesterolverteilung in allen NDZ-Linien visualisiert (Abb. 28). Die NDZ-Kontrolle zeigte zu beiden Zeitpunkten (Abb. 28 A, B) eine gleichmäßige blaue Färbung, die nur in wenigen Bereichen durch die Zusammenlagerungen von Zellen heller erschien. Zu keinem Zeitpunkt war in den Ausläufern von Neuronen Cholesterin in Form von punktuellen Färbungen nachweisbar. (Abb. 28 A, B, Kasten). NDZ-Mutation hom. zeigte nach 2 Wochen Differenzierung (Abb. 28 C) eine deutlich gepunktete Färbung, die sich auch auf die Axone beziehungsweise Dendriten einiger Neurone verteilte (Kasten). Nach 6 Wochen Differenzierung (Abb. 28 D) erschien die gesamte Färbung auf Grund des dichten Zellrasens noch heller und die typische punktuelle Färbung des akkumulierten Cholesterols blieb in den neuronalen Ausläufern erhalten. Bei der Linie NDZ-Mutation het. waren nach 2 Wochen Differenzierung (Abb. 28 E) wenige Akkumulationen in den Zellkörpern und minimale punktuelle Färbungen in den neuronalen Ausläufern (Kasten) sichtbar, die nach 6 Wochen

ERGEBNISSE

Differenzierung (Abb. 28 F) stark zunahmen und dann auch in den Axonen respektive Dendriten deutlich erkennbar waren (Kasten).

Zusammengefasst ließ sich der NPC1-Phänotyp mittels Filipin-Färbung mit zunehmender Differenzierungsdauer deutlich nachweisen – insbesondere auch in neuronalen Ausläufern.



**Abb. 28: Visualisierung von Cholesterin in NDZ-Kulturen nach 2 und 6 Wochen**

Filipin-Färbung in 2 (A, C, E) und 6 Wochen (B, D, F) alten NDZ zeigte eine gleichmäßige blaue Färbung der NDZ-Kontrolle (A, B) unterbrochen von helleren Arealen dichter Zellzusammenlagerungen. Hell gepunktete Färbung des Cholesterols in NDZ-Mutation hom. (C, D) nahm über die Zeit zu und konnte in Axonen respektive Dendriten von Neuronen nachgewiesen werden. Die schwach gepunktete NDZ-Mutation het. (E, F) zeigte kaum Cholesterolakkumulationen nach 2 Wochen. Nach 6 Wochen nahmen diese stark zu und konnten wie in NDZ-Mutation hom. auch in den Ausläufern einiger Neurone nachgewiesen werden. Maßstab 50  $\mu$ m

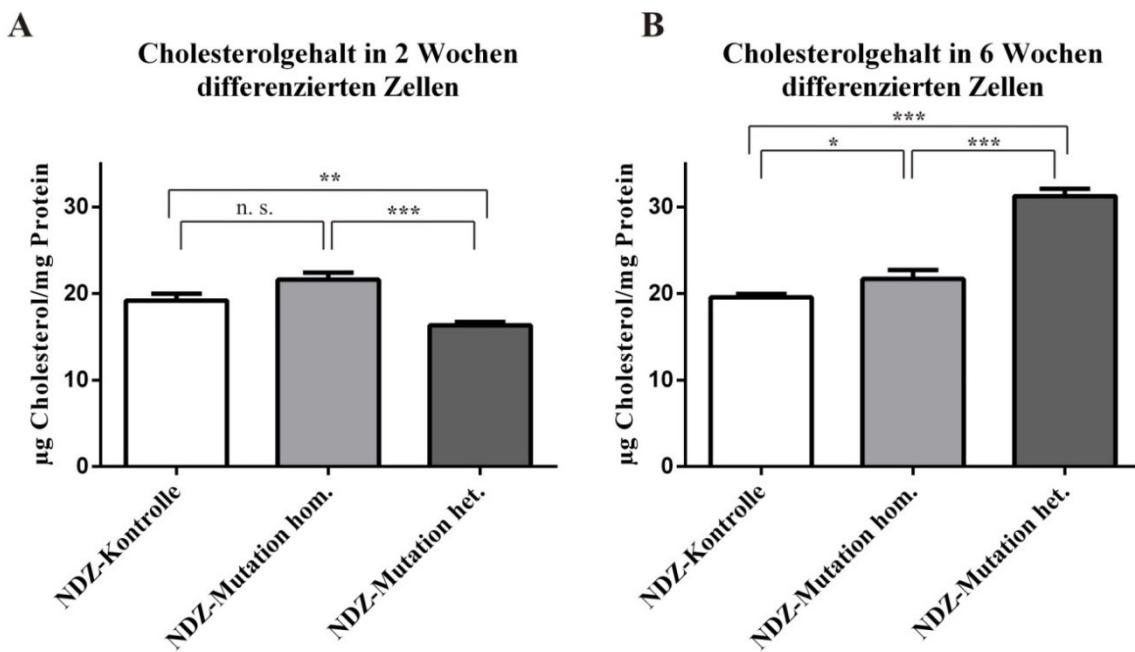
#### 4.5.6 Analyse des Cholesterolgehaltes in 2 und 6 Wochen differenzierten Zellen

Die Analyse des Cholesterolgehaltes zeigte, dass nach 2 Wochen Differenzierung (Abb. 29 A) kein signifikanter Unterschied zwischen NDZ-Kontrolle mit  $19,17 \pm 0,80 \mu\text{g}$  Cholesterol/mg Protein und NDZ-Mutation hom. mit einem Wert von  $21,60 \pm 0,83 \mu\text{g}$  Cholesterol/mg Protein vorlag, der Cholesterolgehalt der NDZ-Mutation het von  $16,32 \mu\text{g}$  Cholesterol/mg Protein jedoch signifikant niedriger war als in der Kontrolle. Auch zwischen den Linien mit NPC1-Mutation ließ sich ein signifikanter Unterschied detektieren, wobei die homozygote NPC1-Linie mehr Cholesterol enthielt.

Im Vergleich zu den 6 Wochen differenzierten Zellen (Abb. 29 B) zeigte sich, dass der Cholesterolgehalt sowohl in der homozygoten ( $21,69 \pm 1,01 \mu\text{g}$  Cholesterol/mg Protein) als auch in der compound heterozygoten NPC1-Linie ( $31,24 \pm 0,85 \mu\text{g}$  Cholesterol/mg Protein) signifikant höher war als in der NDZ-Kontrolle mit  $19,56 \pm 0,37 \mu\text{g}$  Cholesterol/mg Protein. Jedoch war im Vergleich zur zweiwöchigen Differenzierung nun der Cholesterolgehalt in der compound heterozygoten NPC1-Linie gegenüber der compound homozygoten NPC1-Linie signifikant erhöht.

ERGEBNISSE

Über die Zeit nahm der Cholesterolgehalt in den NDZ-Mutation het. zu, während die Werte in der NDZ-Kontrolle und NDZ-Mutation hom. nahezu gleich blieben. Die Quantifizierung des Cholesterolgehaltes ließ wie schon in den NPZ nicht für alle Linien eine eindeutige Diskriminierung zwischen gesund und NPC1-Mutation zu.



**Abb. 29: Cholesterolgehalt in NDZ-Kulturen nach 2 (A) und 6 Wochen (B) Differenzierung**

In 2 Wochen alten NDZ (A) zeigte die NDZ-Kontrolle einen geringeren Cholesterolwert gegenüber der NDZ-Mutation hom., aber einen signifikant höheren Cholesterolwert im Vergleich zur NDZ-Mutation het. Der Unterschied zwischen den NPC1-Linien war ebenfalls signifikant unterschiedlich. In 6 Wochen alten NDZ (B) hatte NDZ-Kontrolle einen signifikant geringeren Cholesterolwert als beide NDZ-Mutationen, wobei sich auch NDZ-Mutation hom. vom höheren Cholesterolwert in NDZ-Mutation het. signifikant unterschied.  $n = 6 – 12$

#### 4.6 Behandlung der unterschiedlichen Zelltypen mit LDL

Bis auf die Fibroblasten wurden alle patientenspezifischen Zelltypen in serumfreien Medium kultiviert. Um den ausgeprägten NPC1-Phänotyp der Fibroblasten auch in den neuronalen Zellen nachzustellen, wurde die Cholesterolakkumulation durch die 24-stündige Behandlung der Zellen mit 10 µg/ml LDL als externe Cholesterolquelle forciert. Anschließend wurden die Zellen hinsichtlich Veränderungen im Färbemuster der Cholesterolakkumulationen und im Cholesterolgehalt untersucht.

##### 4.6.1 Darstellung des NPC1-Phänotyps nach LDL-Behandlung in iPS

Für die vergleichenden Analysen wurde die Filipin-Färbung der iPS unter Standardkultivierung (Abb. 30 bzw. 31 A – D) und nach 24-stündiger LDL-Behandlung (Abb. 30 bzw. 31 E – H) gegenüber gestellt.

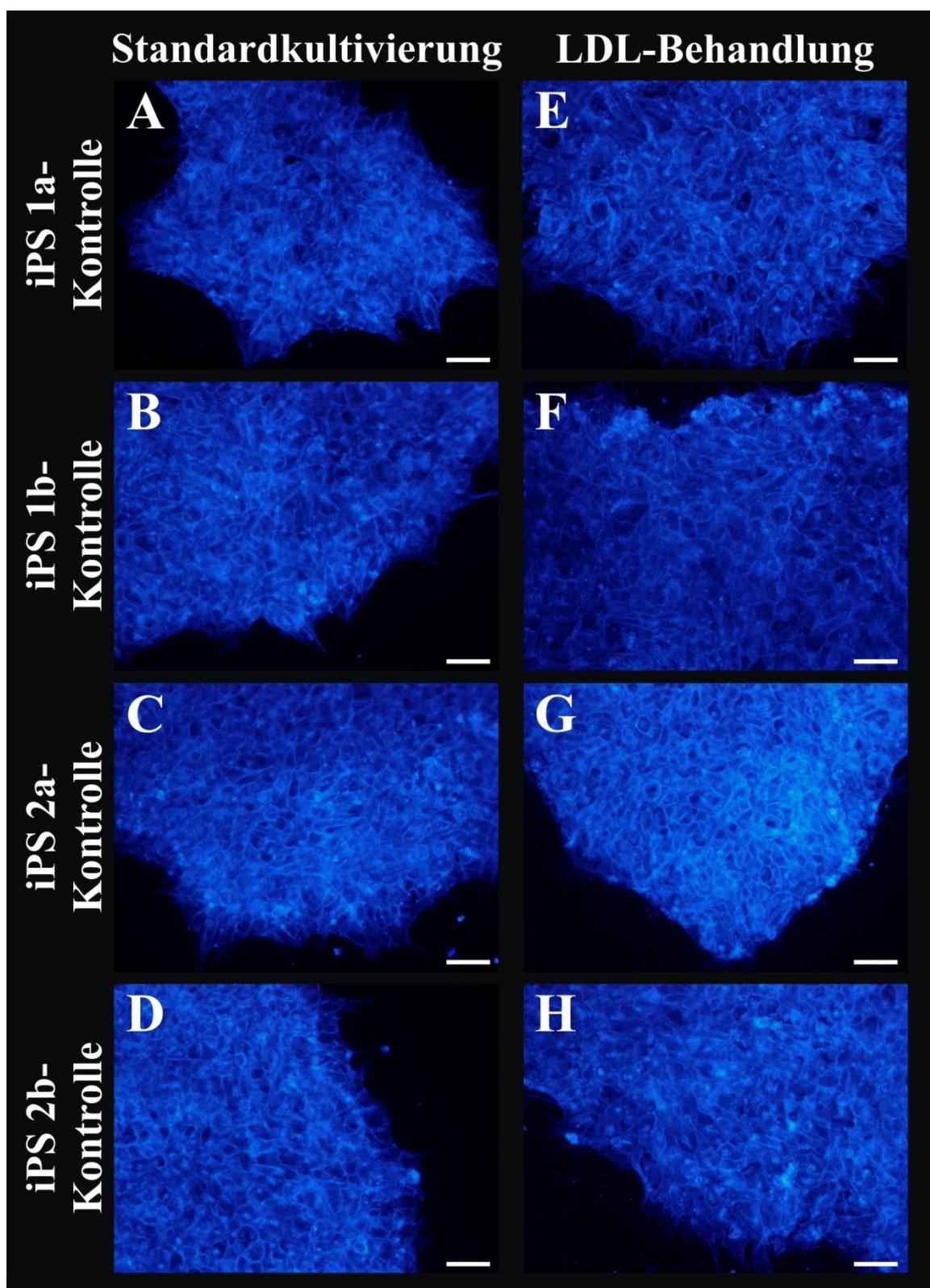
Bei den iPS-Kontrollen (Abb. 30) waren nach der LDL-Behandlung keinerlei Änderungen in der bläulichen Färbung oder Intensität zu erkennen. Das gefärbte Cholesterol verteilte sich gleichmäßig in Zellmembranen und Plasma.

ERGEBNISSE

---

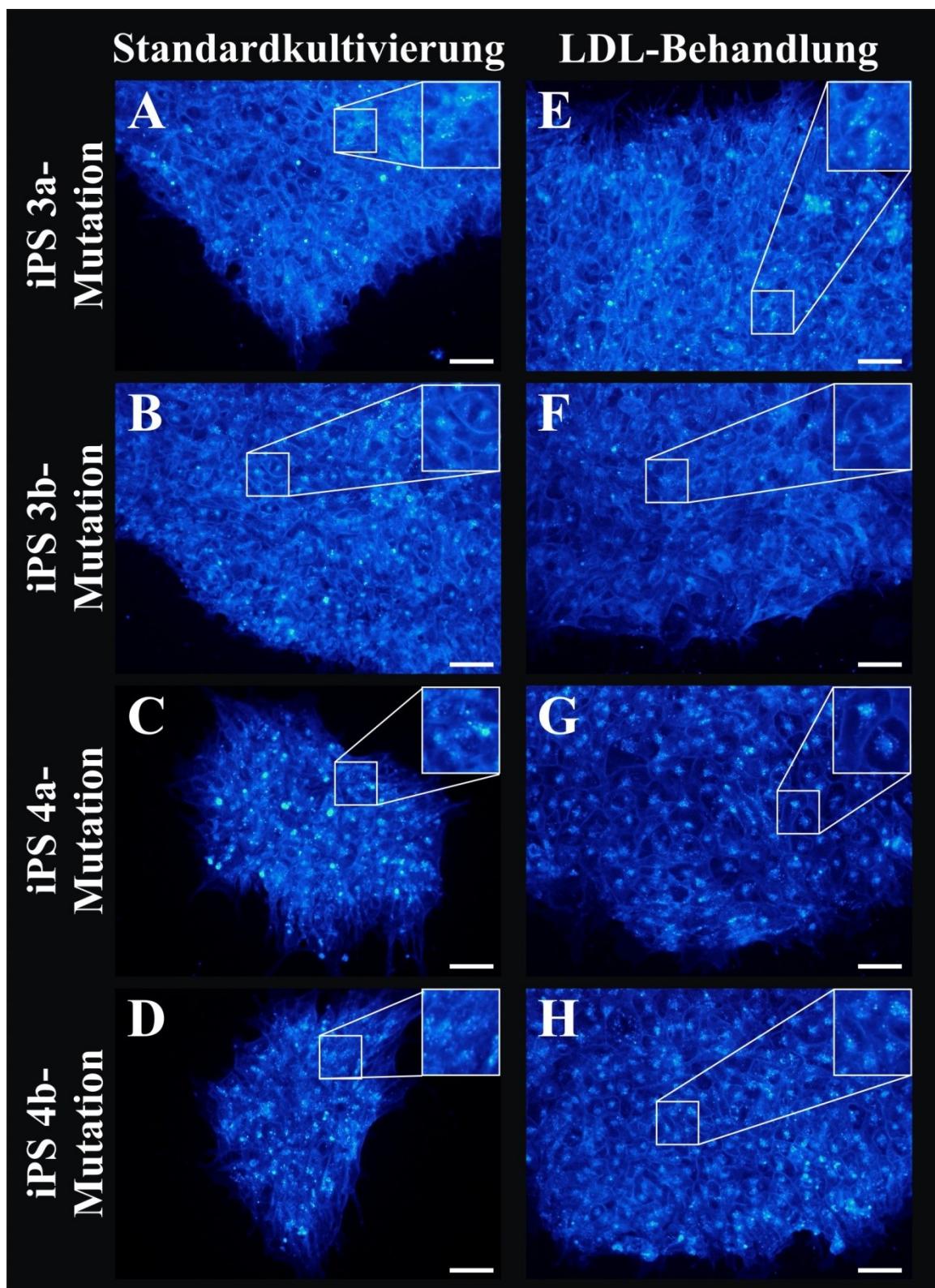
Im Gegensatz dazu war in einigen iPS-Kolonien mit NPC1-Mutation zu erkennen (Abb. 31), dass sich nach LDL-Behandlung (Abb. 31 E – H) das Färbemuster änderte. So zentrierten sich die hell leuchtenden Cholesterolakkumulationen in iPS 4a-Mutation und iPS 4b-Mutation deutlich im Zellinneren um den Zellkern im Vergleich zur verstreuten punktuellen Färbung im gesamten Zellsoma unter Standardkulturbedingungen. In iPS 3a-Mutation war der Effekt im Ansatz auch nachweisbar, wobei dort die Zentralisierung des akkumulierten Cholesterols jedoch nicht so absolut war. Die Linie iPS 3b-Mutation zeigte als einzige bereits unter Standardkultivierung eine solche Zusammenballung des Cholesterols im Zellinneren. Nach LDL-Behandlung schien die Gesamtfärbung jedoch etwas schwächer in ihrer Intensität.

Um Veränderungen unabhängig von Farbintensität und Verteilungsmuster nachzuweisen, wurde der Cholesterolgehalt der LDL-behandelten Kulturen ebenfalls quantifiziert und mit den bereits beschriebenen Werten unter Standardkulturbedingungen verglichen.



**Abb. 30: Visualisierung von Cholesterin in iPS-Kontrollen unter Standardkulturbedingungen und nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µg/ml LDL**

Unbehandelte (A – D) und LDL-behandelte (E – H) Kolonien der iPS-Kontrollen zeigten keinerlei Unterschiede in Intensität und Muster der Filipin-Färbung. Maßstab 50 µm



**Abb. 31: Visualisierung von Cholesterin in iPS-Mutationen unter Standardkulturbedingungen und nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µg/ml LDL**

Die Filipin-gefärbten Kolonien von iPS 3a-Mutation, iPS 4a-Mutation sowie iPS 4b-Mutation zeigten nach LDL-Behandlung (E, G, H) eine Zentralisierung ihrer Cholesterolkonzentration im Zellinneren gegenüber der zellweiten punktuellen Färbung unter Standardkulturbedingungen (A, C, D). Die gefärbte iPS 3b-Mutation wies die Konzentrierung bereits unter Standardkultivierung auf (B) und schien nach LDL-Behandlung eher an Intensität zu verlieren (F). Maßstab 50 µm

ERGEBNISSE

---

#### 4.6.2 Analyse des Cholesterolgehaltes nach LDL-Behandlung in iPS

Die Analyse des Cholesterolgehaltes ergab für alle Kontroll-iPS (Abb. 32 A) unter Standardkulturbedingungen und nach 24-stündiger LDL-Behandlung folgende Werte: iPS 1a-Kontrolle  $12,32 \pm 0,55$  und  $12,26 \pm 0,74$  µg Cholesterol/mg Protein, iPS 1b-Kontrolle  $12,53 \pm 0,70$  und  $14,50 \pm 0,42$  µg Cholesterol/mg Protein, iPS 2a-Kontrolle  $12,69 \pm 0,60$  und  $12,82 \pm 1,24$  µg Cholesterol/mg Protein sowie iPS 2b-Kontrolle  $12,50 \pm 0,52$  und  $12,11 \pm 0,58$  µg Cholesterol/mg Protein. Die Cholesterolwerte aller Linien waren unter beiden Bedingungen nicht signifikant unterschiedlich, trotz der leichten Erhöhung des Cholesterolgehaltes in der iPS 1b-Kontrolllinie nach LDL-Behandlung.

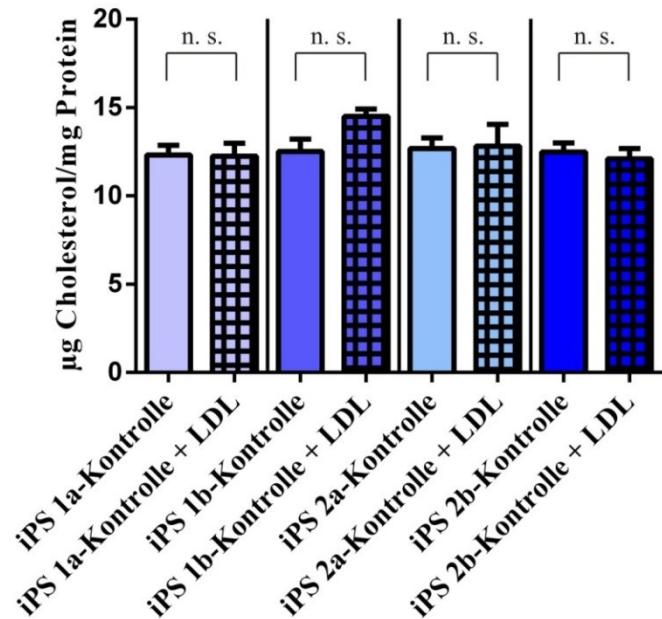
In den iPS-Linien mit NPC1-Mutation (Abb. 32 B) wurden für beide Kultivierungsbedingungen folgende Cholesterolwerte detektiert: iPS 3a-Mutation  $17,02 \pm 0,77$  und  $15,56 \pm 0,55$  µg Cholesterol/mg Protein, iPS 3b-Mutation  $16,61 \pm 0,59$  und  $15,27 \pm 0,81$  µg Cholesterol/mg Protein, iPS 4a-Mutation  $15,99 \pm 0,99$  und  $15,85 \pm 0,73$  µg Cholesterol/mg Protein sowie iPS 4b-Mutation  $15,33 \pm 0,49$  und  $14,65 \pm 0,64$  µg Cholesterol/mg Protein. In allen NPC1-Linien waren die Cholesterolwerte sehr ähnlich und zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Die Behandlung der iPS mit LDL erzielte nach 24 Stunden keine Erhöhung des Gesamtcholesterolwertes.

ERGEBNISSE

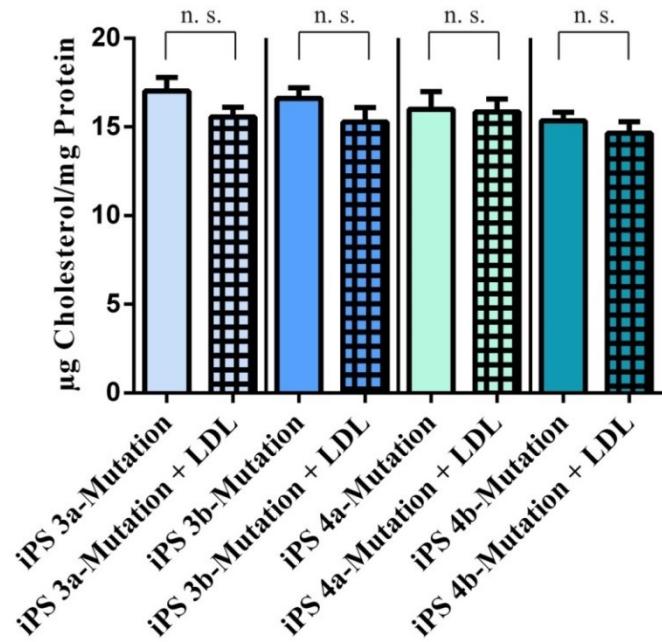
A

**Cholesterolgehalt in Kontroll-iPS ohne und mit LDL-Behandlung**



B

**Cholesterolgehalt in NPC1-iPS ohne und mit LDL-Behandlung**

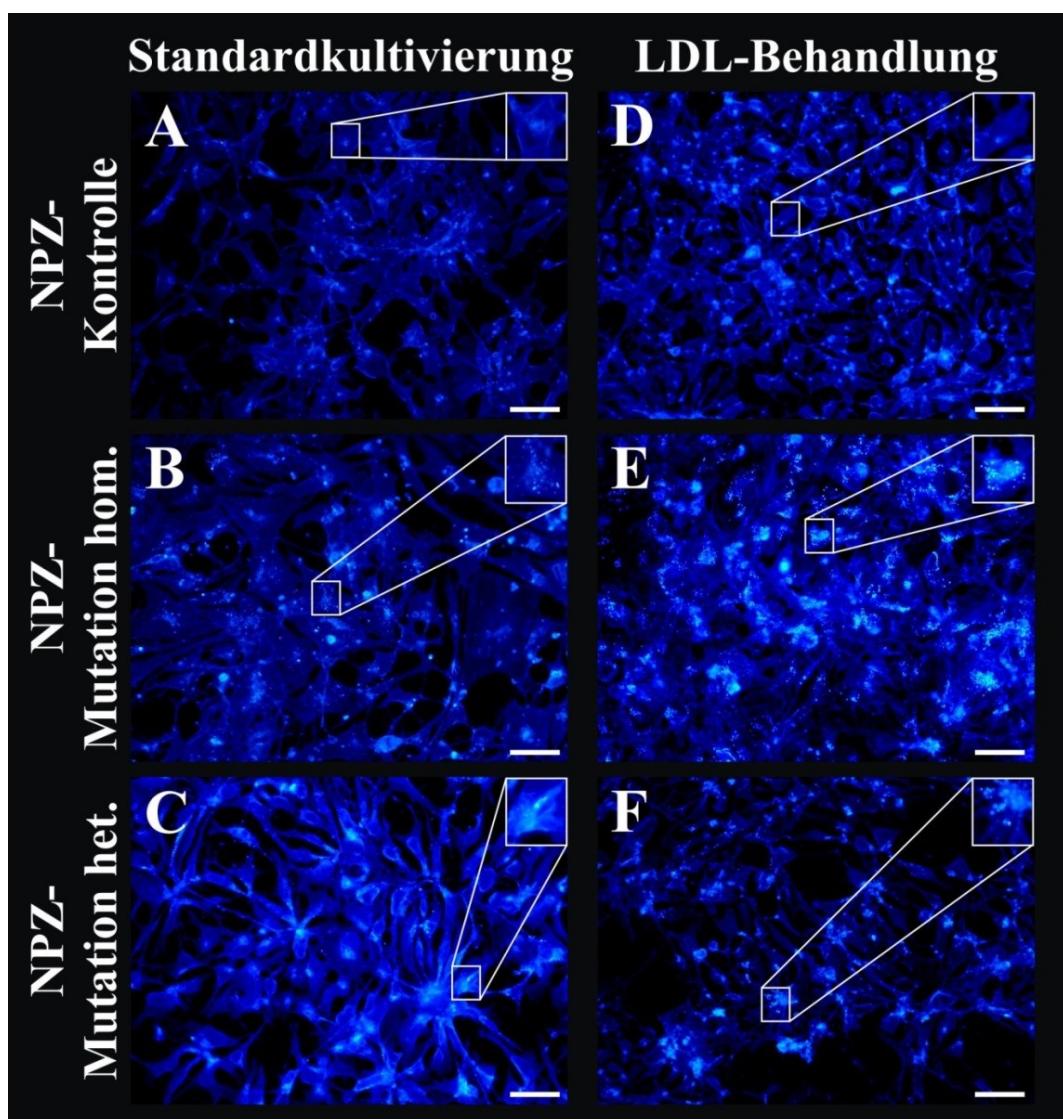


**Abb. 32: Cholesterolgehalt in iPS-Kontrollen (A) und iPS-Mutationen (B) unter Standardkultivierung und nach 24-stündiger Behandlung mit 10 μg/ml LDL**

Weder in den iPS-Kontrollen noch in den iPS-Mutationen waren signifikante Änderungen im Cholesterolgehalt nach Behandlung mit LDL zu detektieren. n = 6 - 13

#### 4.6.3 Darstellung des NPC1-Phänotyps nach LDL-Behandlung in NPZ

Nach den iPS sollte der Einfluss einer LDL-Behandlung auch in NPZ getestet werden. Dabei zeigte die NPZ-Kontrolle unter Standardkulturbedingungen (Abb. 33 A) und nach LDL-Behandlung (Abb. 33 D) keine Änderungen in der Filipin-Färbung. Die in den Zellen verteilte punktuelle Färbung in NPZ-Mutation hom. (Abb. 33 B) nahm nach LDL-Behandlung (Abb. 33 E) deutlich zu und sammelte sich weitestgehend in strahlend hellen Arealen. Die NPZ-Mutation het. zeigte nach der LDL-Behandlung (Abb. 33 F) ebenfalls eine vermehrt zentrierte Cholesterolakkumulation im Vergleich zur flächigen hellen Cholesterolfärbung unter Standardkultivierung (Abb. 33 C). Gemessen an der Farbintensität der Filipinfärbung erhöhte sich der Cholesterolgehalt nach LDL-Behandlung in beiden NPZ-Mutationen vergleichend zur NPZ-Kontrolle.



**Abb. 33: Visualisierung von Cholesterin in NPZ unter Standardkulturbedingungen und nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µg/ml LDL**

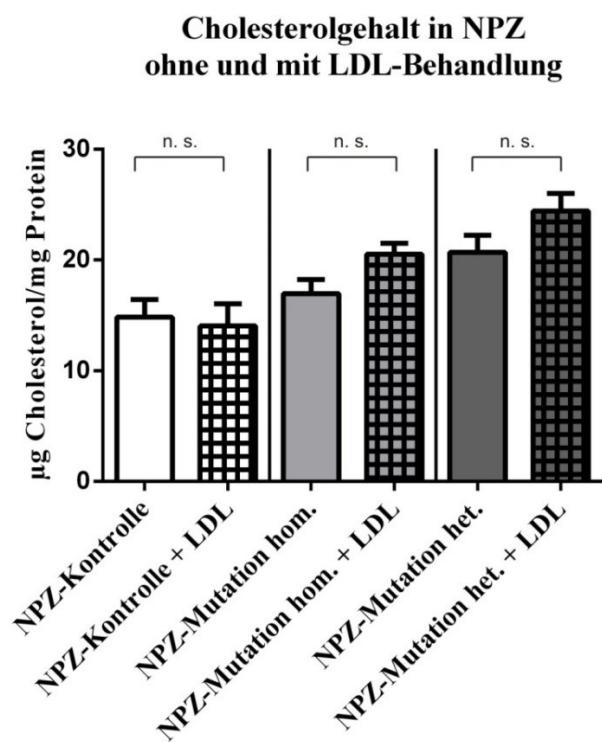
NPZ-Kontrolle zeigte unter Standardkultivierung (A) und nach LDL-Behandlung (D) keine Änderungen im Cholesterolfärbemuster. Im Gegensatz dazu zeigten NPZ-Mutation hom. und het. nach LDL-Behandlung (E, F) eine massive Zunahme in Farbintensität und Punktmuster gegenüber der Cholesterolfärbung nach Standardkultivierung (B, C). Maßstab 50 µm

ERGEBNISSE

#### 4.6.4 Analyse des Cholesterolgehaltes nach LDL Behandlung in NPZ

Die Quantifizierung des Cholesterolgehaltes (Abb. 34) zeigte, dass die NPZ-Kontrolle unter Standardkultivierung ( $14,83 \pm 1,60 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ) und nach LDL-Behandlung ( $14,03 \pm 2,01 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$ ) einen sehr ähnlichen Cholesterolgehalt aufwies, wohingegen die NPZ beider NPC1-Linien nach LDL-Behandlung einen deutlich höheren Cholesterolwert zeigten. Die NPZ-Mutation hom. hatte unter Standardkulturbedingungen einen Wert von  $16,96 \pm 1,29 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$  und nach 24-stündiger LDL-Behandlung  $20,52 \pm 0,10 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$ . Ähnlich war der Unterschied auch in der NPZ-Mutation het., die unter Normalbedingungen einen Cholesterolgehalt von  $20,70 \pm 1,53 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  und nach LDL-Behandlung  $24,42 \pm 1,60 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$  aufwies.

Die Erhöhung der Cholesterolwerte in den NPC1-Linien nach LDL-Behandlung war zwar deutlich, jedoch nicht signifikant.



**Abb. 34: Cholesterolgehalt in NPZ nach 3 bis 4 Tagen Proliferation unter Standardkultivierung und nach 24-stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LDL**

In der NPZ-Kontrolle konnten keinerlei Änderungen im Cholesterolgehalt nach LDL-Behandlung detektiert werden. Jedoch waren in beiden NPZ-Linien mit NPC1-Mutation nicht-signifikante Erhöhungen im Cholesterolwert zu verzeichnen.  $n = 9 - 13$

ERGEBNISSE

---

#### **4.6.5 Darstellung des NPC1-Phänotyps nach LDL-Behandlung in 2 und 6 Wochen differenzierten Zellen**

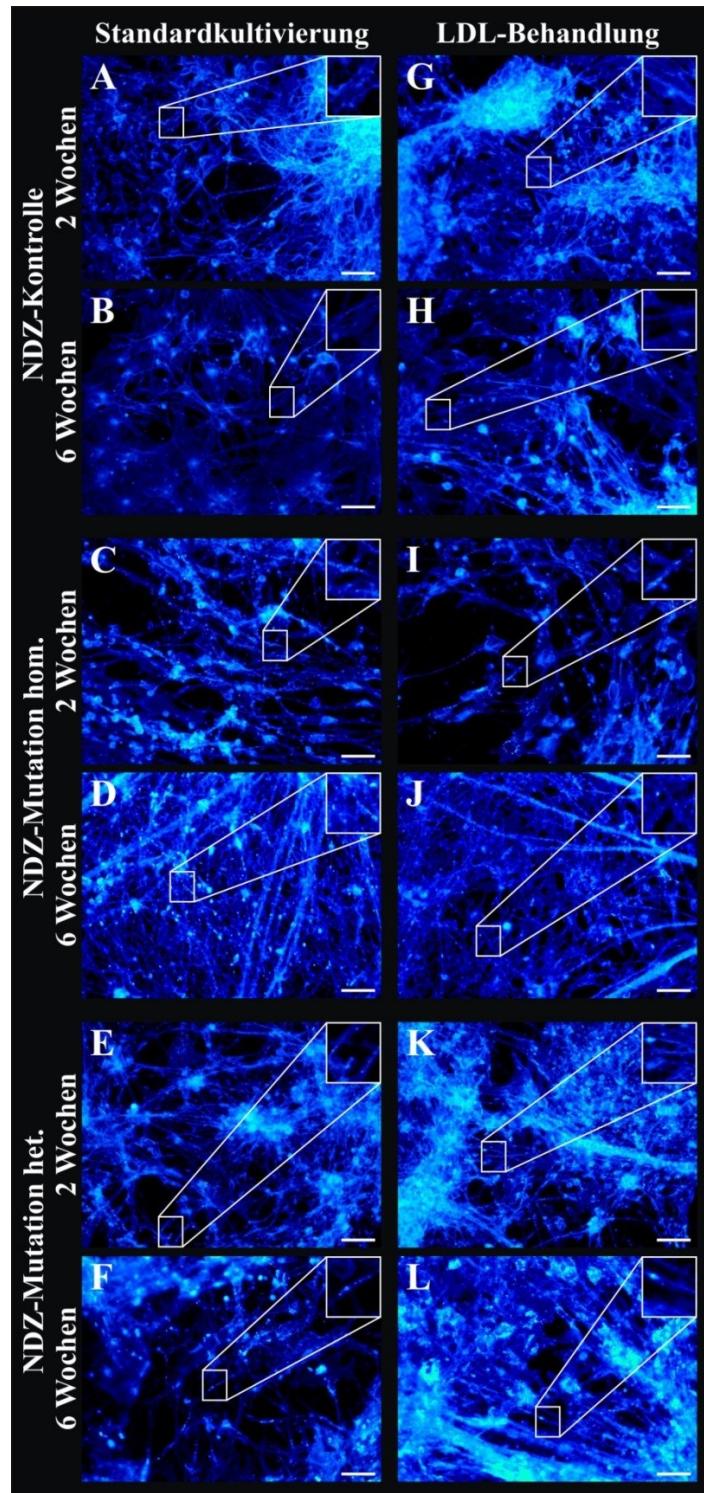
Die 2 Wochen alte NDZ-Kontrolle (Abb. 35 A) zeigte nach LDL-Behandlung (Abb. 35 G) keine Veränderung hinsichtlich Filipin-Färbung oder Intensität. Nach 6 Wochen Differenzierung (Abb. 35 B) waren vereinzelt punktuelle Färbungen sichtbar, die aber nach LDL-Behandlung (Abb. 35 H) nicht zunahmen. Die vereinzelten hellen Färbungen waren auf die dichte Zusammenlagerung bzw. Überlagerung von Zellen zurückzuführen.

NDZ-Mutation hom. zeigte nach 2 Wochen Differenzierung (Abb. 35 C) eine Cholesterolakkumulation in Form von vereinzelten punktuellen Färbungen, die sich auch in den neuronalen Ausläufern wiederfand (vergrößert im Kasten). Diese nahm nach LDL-Behandlung (Abb. 35 I) zu und in den glialen Zellen zentrierten sie sich vermehrt. Nach 6 Wochen (Abb. 35 D) zeigten die Somata und Ausläufer ebenfalls punktuelle Cholesterolakkumulationen. Diese nahmen nach LDL-Behandlung nicht zu, aber lagerten sich dichter zusammen wie auch schon nach 2 Wochen.

Es waren nur wenige Cholesterolakkumulationen in NDZ-Mutation het. nach 2 Wochen Differenzierung (Abbildung 29 E) nachzuweisen. Diese nahmen aber nach LDL-Behandlung (Abb. 35 K) deutlich zu. Nach 6 Wochen Differenzierung (Abb. 35 F) waren mehr Akkumulationen erkennbar, die sich nach LDL-Behandlung (Abb. 35 L) mehr zentrierten.

Insgesamt führte die LDL-Behandlung zu vermehrten Cholesterolakkumulationen in den NDZ mit NPC1-Mutation nach zwei Wochen Differenzierung.

ERGEBNISSE



**Abb. 35: Visualisierung von Cholesterin in 2 und 6 Wochen alten NDZ unter Standardkulturbedingungen und nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µg/ml LDL**

NDZ-Kontrolle zeigte nach 2 und 6 Wochen keine Änderungen in der Cholesterolverteilung unter Standardkultivierung (A, B) und nach LDL-Behandlung (G, H). 2 Wochen alte NDZ-Mutation hom. und het. (C, E) zeigten nach LDL-Behandlung (I, K) eine deutliche Zunahme der punktuellen Färbung. Die deutlichen Akkumulationen in 6 Wochen alten NDZ-Mutation hom. und het. (D, F) nahmen mit LDL-Behandlung nicht zu. Maßstab 50 µm

ERGEBNISSE

---

#### **4.6.6 Analyse des Cholesterolsgehaltes nach LDL-Behandlung in 2 und 6 Wochen differenzierten Zellen sowie vergleichsweise in Fibroblasten**

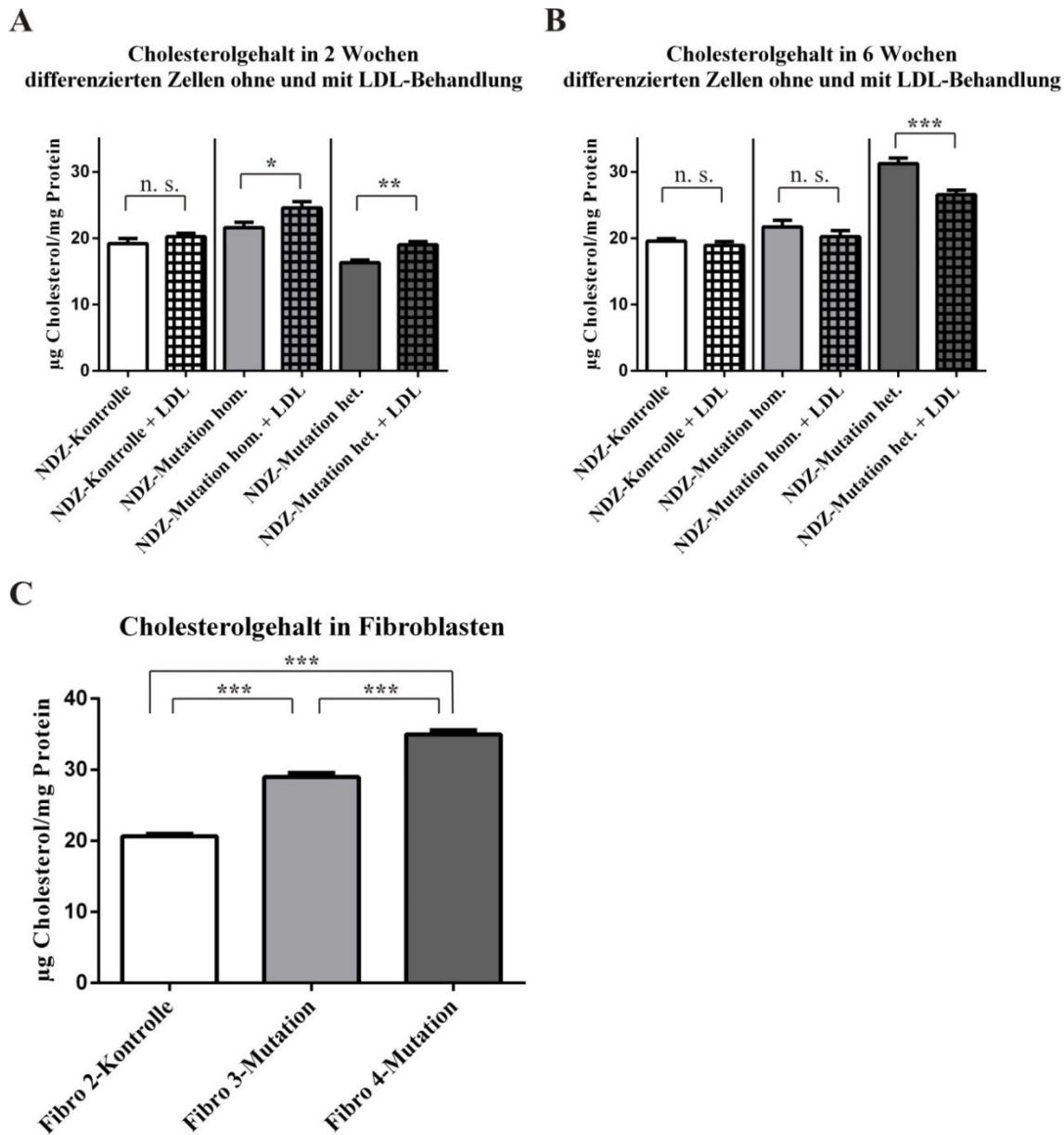
Der Cholesterolwert in 2 Wochen differenzierten Zellen (Abb. 36 A) betrug in der NDZ-Kontrolle unter Standardkulturbedingungen  $19,17 \pm 0,80 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  und änderte sich nach LDL-Behandlung nicht wesentlich ( $20,22 \pm 0,49 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$ ). Im Gegensatz dazu traten in beiden NPC1-Linien vergleichbare signifikante Änderungen auf. So erhöhte sich der Cholesterolwert in NDZ-Mutation hom. um  $3 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  (von  $21,60 \pm 0,83$  auf  $24,58 \pm 0,91 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ) und in NDZ-Mutation het. um  $2,7 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  (von  $16,32 \pm 0,39$  auf  $19,00 \pm 0,50 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ).

In den 6 Wochen differenzierten (Abb. 36 B) Kontrollzellen blieb der Cholesterolgehalt mit  $19,56 \pm 0,37 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  auch nach LDL-Behandlung mit  $18,92 \pm 0,57 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  stabil. Ähnliches war in NDZ-Mutation hom. beobachtbar, in der die unbehandelten Zellen  $21,69 \pm 1,01 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$  und nach LDL-Behandlung  $20,22 \pm 0,94 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$  aufwiesen. Auffällig war der signifikante Abfall des Cholesterolwertes in NDZ-Mutation het. von  $31,24 \pm 0,85$  auf  $26,56 \pm 0,67 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ .

Vergleichende Analysen der terminal differenzierten patientenspezifischen Ursprungsfibroblasten (Abb. 36 C) wiesen signifikante Unterschiede zwischen allen Linien auf. Die Kontrolllinie Fibro 2 zeigte mit  $20,66 \pm 0,32 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$  einen signifikant geringeren Wert als beide NPC1-Linien. Die homozygote NPC1-Linie Fibro 3-Mutation unterschied sich signifikant mit  $28,99 \pm 0,55 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$  von der compound heterozygoten NPC1-Linie Fibro 4-Mutation mit  $34,98 \pm 0,61 \mu\text{g Cholesterol}/\text{mg Protein}$ .

Zusammengefasst ist ein Cholesterolgehalt-steigernder Effekt der LDL-Behandlung nur in 2 Wochen alten NDZ mit NPC1-Mutation beobachtbar. Nach 6 Wochen führt Cholesterol zumindest in einer NPC1-Linie zu einem massiven Verlust an Cholesterol. Als Referenz blieb der Cholesterolgehalt der Kontrolllinie zu beiden Zeitpunkten nach LDL-Behandlung unverändert und war dem Cholesterolwert der korrespondierenden Ursprungsfibroblasten sehr ähnlich.

ERGEBNISSE



**Abb. 36: Cholesterolgehalt in 2 und 6 Wochen alten NDZ unter Standardkultivierung und nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µg/ml LDL sowie in Fibroblasten**

In 2 Wochen alten NDZ (A) veränderte sich der Cholesterolgehalt in NDZ-Kontrolle nach LDL-Behandlung nicht, wohingegen der Cholesterolgehalt in NDZ-Mutation hom. und het. signifikant zunahm. Nach 6 Wochen (B) blieb nach LDL-Behandlung der Cholesterolwert in NDZ-Kontrolle und NDZ-Mutation hom. unverändert. Der Cholesterolgehalt in NDZ-Mutation het. verringerte sich nach LDL-Behandlung signifikant. Die terminal differenzierten Fibroblasten (C) mit NPC1-Mutation zeigten einen signifikant höheren Cholesterolwert als die Kontrolle, wobei Fibro 4-Mutation auch signifikant mehr Cholesterol besaß als Fibro 3-Mutation. n = 6 – 12

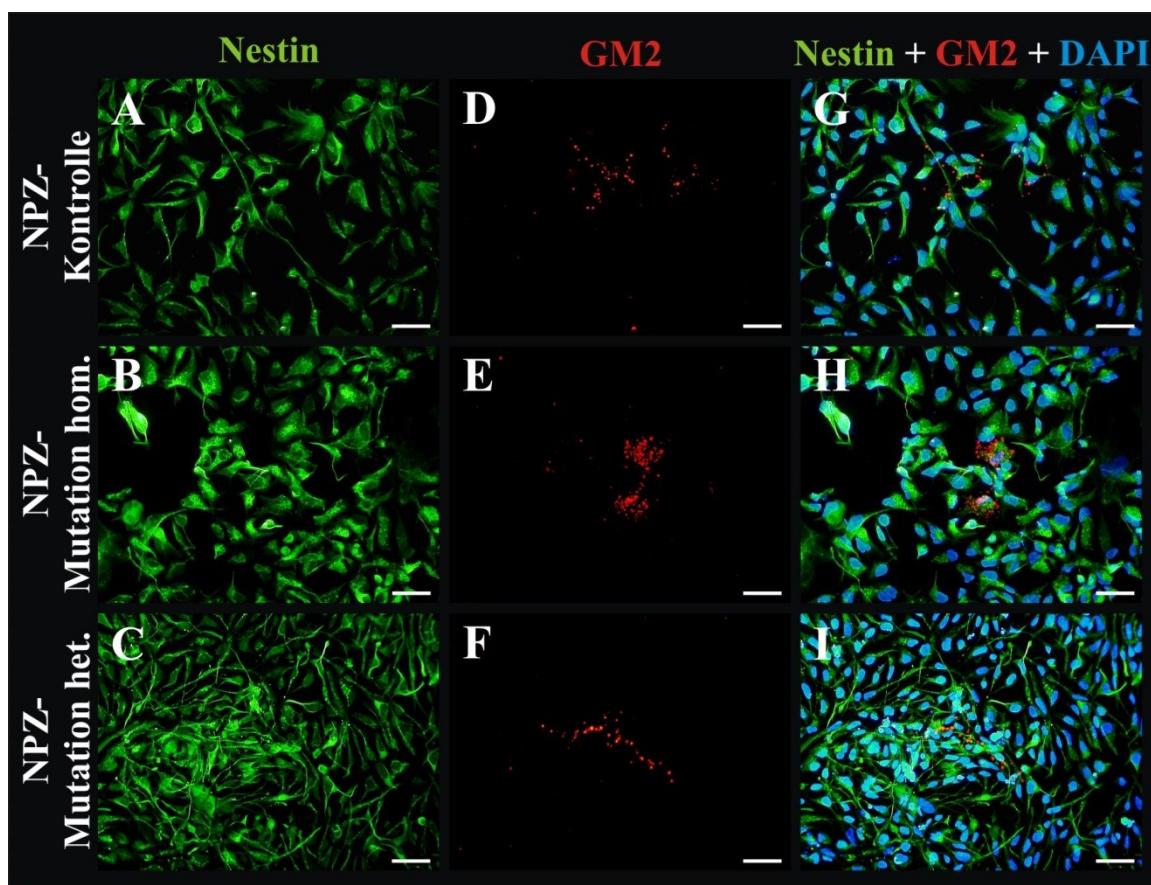
#### 4.7 Nachweis von GM2 in NPZ und NDZ

Ein weiteres Merkmal von NPC1 ist die Akkumulation des Glykosphingolipids GM2 in neuronalen Zellen. Um zu überprüfen, ob die neuronalen und neuronalen Zellen des in der vorliegenden Arbeit generierten *in vitro*-Modells auch diesen NPC1-Phänotyp zeigten, wurde gegen GM2 gefärbt.

#### 4.7.1 Nachweis von GM2 in NPZ

In den NPZ (Abbildung 37) zeigten sich nur wenige Nestin-positive Zellen (Abb. 37 A – C) ebenfalls positiv für GM2 (Abb. 37 D – F). Dabei war das punktuelle Muster sehr kompakt in NPZ-Mutation hom. (Abb. 37 E) verglichen zu NPZ-Kontrolle (Abb. 37 D) sowie NPZ-Mutation het. (Abb. 37 F). In der Überlagerung mit der Kernfärbung DAPI (Abb. 37 G – I) zeigte sich, dass das punktuelle Muster nur schlecht einzelnen Zellen zugeordnet werden konnte.

Es konnte also GM2 in einzelnen proliferierenden neuralen Progenitorzellen nachgewiesen werden, jedoch nur in geringen Mengen und ohne deutliche Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Zellen mit NPC1-Mutation.



**Abb. 37: GM2-Expression in NPZ**

Einige Nestin-positive NPZ (A – C) zeigten positive GM2-Färbungen (D – F). In der Überlagerung mit DAPI (G – I) war die Zuordnung der GM2-Färbung zu einzelnen Zellen nicht möglich. Maßstab 50 µm

#### 4.7.2 Nachweis von GM2 in NDZ

In den NDZ (Abb. 38) dagegen konnte nach 2 und 6 Wochen Differenzierung deutlich mehr GM2 (Abb. 38 G – L) nachgewiesen werden. Zur Kolokalisation wurden die in der Kultur vorhandenen Neurone mittels Färbung gegen beta III-Tubulin (Abb. 38 A – F) sichtbar gemacht. In der Überlagerung mit der Zellkernfärbung DAPI (Abb. 38 M – R) zeigte sich daraufhin, dass GM2 überwiegend auf den neuronalen Ausläufern

ERGEBNISSE

---

nachgewiesen werden konnte. In der unmittelbaren Umgebung der großkernigen ungefärbten Gliazellen waren keine bzw. nur sehr vereinzelte GM2-Färbungen erkennbar. In den 2 Wochen alten NDZ unterschieden sich NDZ-Kontrolle und NDZ-Mutation hom. (Abb. 38 G, I) im Nachweis von GM2 kaum voneinander im Gegensatz zur NDZ-Mutation het. (Abb. 38 K), die viel mehr punktuelle Färbungen aufwies. Allerdings war in dieser Linie das neuronale Netzwerk etwas dichter und bedingte gegebenenfalls diesen Unterschied.

Nach 6 Wochen Differenzierung zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede. NDZ-Kontrolle (Abb. 38 H) wies eine verbreitete gepunktete GM2-Färbung auf, allerdings waren bei vergleichsweise identischer Dichte des neuronalen Netzwerkes (Abb. 38 B, D, F) viel mehr punktuelle Färbungen für GM2 in beiden NDZ-Mutationen (Abb. 38 J, L) sichtbar.

Um die Unterschiede zwischen 2 und 6 Wochen alten NDZ besser auszuwerten, wurden die Färbungen anhand des Verhältnisses ihrer Fluoreszenzintensitäten quantifiziert.

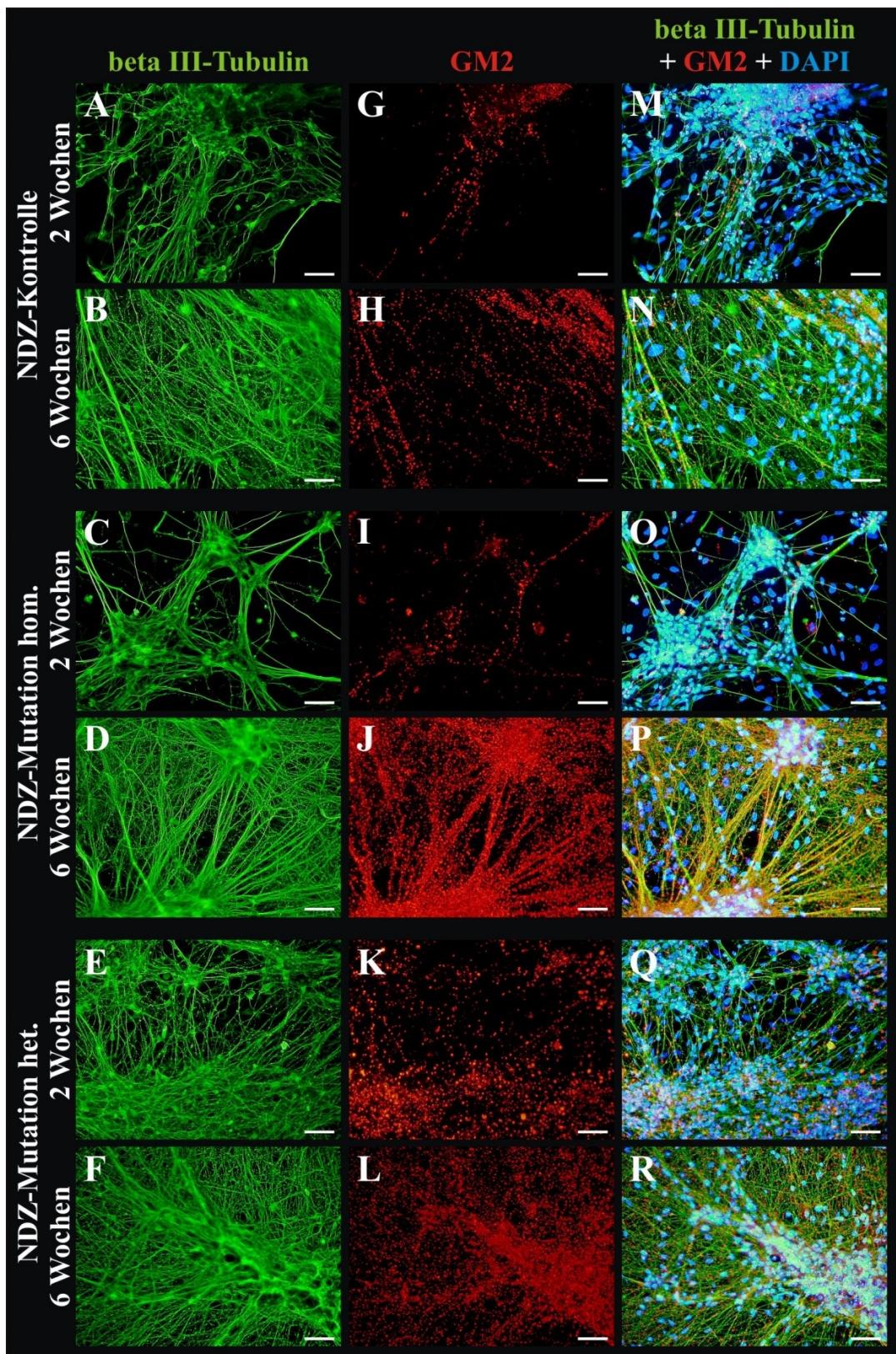


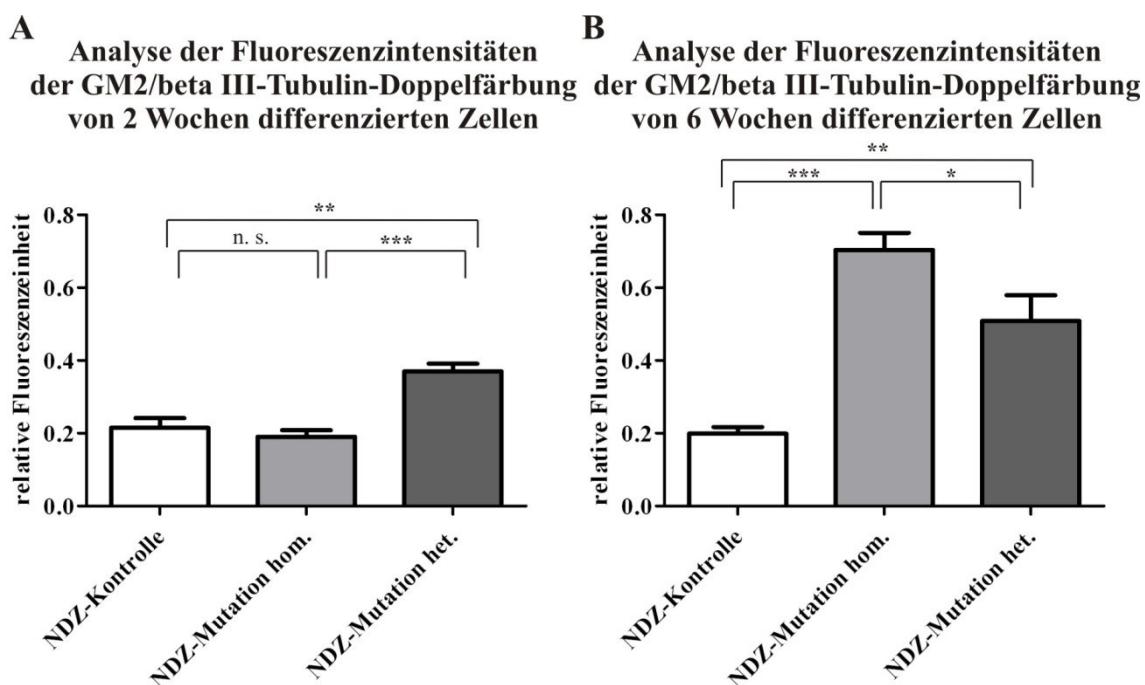
Abb. 38: GM2 in 2 und 6 Wochen alten NDZ

Beta III-Tubulin-positive (A – F) NDZ-Kulturen zeigten eine Zunahme der GM2-Expression (G – L) in 6 Wochen alten NDZ (H, J, L) gegenüber 2 Wochen alten NDZ (G, I, K), wobei deutlich mehr GM2 in den NDZ-Mutationen im Vergleich zur NDZ-Kontrolle nachweisbar war. In der Überlagerung mit DAPI (M – R) zeigte sich eine überwiegende Kolokalisation von GM2 auf beta III-Tubulin-positiven neuronalen Ausläufern. Maßstab 50  $\mu$ m

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der quantifizierten Färbungen wurden in Abb. 39 dargestellt. Die 2 Wochen alten NDZ (A) zeigten folgende Werte: NDZ-Kontrolle  $0,22 \pm 0,03$ ; NDZ-Mutation hom.  $0,19 \pm 0,02$  und NDZ-Mutation het.  $0,37 \pm 0,02$ . Es lagen keine Unterschiede zwischen NDZ-Kontrolle und NDZ-Mutation hom. vor, jedoch unterschieden sich beide Linien signifikant von NDZ-Mutation het. Es waren demnach keine allgemein gültigen Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Zellen mit NPC1-Mutation nach 2 Wochen Differenzierung aufzuzeigen. Damit bestätigte die Quantifizierung den aus der Färbung gewonnenen Eindruck.

Im Gegensatz dazu zeigte die Quantifizierung der 6 Wochen alten NDZ (B) folgende Werte: NDZ-Kontrolle  $0,20 \pm 0,02$ ; NDZ-Mutation hom.  $0,70 \pm 0,05$  und NDZ-Mutation het.  $0,51 \pm 0,07$ . Die NDZ-Mutationen unterschieden sich in ihrer relativen Fluoreszenzeinheit signifikant von der NDZ-Kontrolle, wobei die NDZ-Kontrolle einen vergleichbaren Wert wie nach 2 Wochen Differenzierung zeigte. Daraus konnte abgeleitet werden, dass mit zunehmender Differenzierungsdauer neuronale Zellen mit NPC1-Mutation mehr GM2 aufweisen als gesunde Kontrollzellen.



**Abb. 39: Analyse der relativen Fluoreszenzintensitäten der GM2/beta III-Tubulin Doppelfärbung**  
Auswertung verschiedener Fluoreszenzaufnahmen der GM2/beta III-Tubulin-Doppelfärbung von 2 Wochen (A) und 6 Wochen (B) differenzierten Zellen. Bildung eines Koeffizienten aus relativer roter (GM2) und relativer grüner (beta III-Tubulin) Fluoreszenzintensität werden dargestellt als relative Fluoreszenzeinheiten.  $n = 3 - 6$

## 5 Diskussion

2007 eröffnete sich mittels der Reprogrammierung humaner somatischer Zellen in iPS (Takahashi *et al.*, 2007) die Chance, patientenspezifische iPS für viele verschiedene Erkrankungen zu generieren. Auf dem Gebiet der humanen Neurowissenschaften sind dabei vor allem die auf iPS basierenden humanen neuronalen *in vitro*-Modellsysteme für die zwei häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Alzheimer (Yagi *et al.*, 2012) und Morbus Parkinson (Seibler *et al.*, 2011) hervorzuheben. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die ersten patientenspezifischen iPS für die seltene Erkrankung Morbus Niemann-Pick Typ C1 generiert und charakterisiert werden. Weiterführend war es das Ziel, die iPS in neurale Progenitorzellen und letztendlich terminal in neuronale Zellen zu differenzieren. Eine umfassende Charakterisierung aller drei Zelltypen sowie der Nachweis von Cholesterolakkumulationen als Phänotyp von NPC1 waren die Voraussetzungen, um das erste humane neuronale *in vitro*-Modell für NPC1 vorstellen zu können (Trilck *et al.*, 2013).

### 5.1 Generierung der ersten NPC1-patientenspezifischen iPS

Die Generierung der NPC1- und Kontroll-iPS erfolgte durch die Reprogrammierung von dermalen Fibroblasten mittels der klassischen 4 Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC (Takahashi *et al.*, 2007; Lowry *et al.*, 2008). Die hierzu verwendeten retroviralen Partikel vermittelten die ektopische Expression der 4 Transkriptionsfaktoren und wurden nach vollständiger Reprogrammierung in ihrer Aktivität unterdrückt, was für die verwendeten retroviralen Partikel bereits in einer früheren Studie nachgewiesen wurde (Seibler *et al.*, 2011). Die generierten iPS Kolonien zeigten eine runde bis ovale Kolonieform mit scharf begrenztem Rand sowie ein großes Verhältnis von Zellkern zu Zytosplasma und waren damit embryonalen Stammzellen morphologisch sehr ähnlich (Thomson, 1998). Der Karyotyp der generierten iPS blieb durch die retrovirale Reprogrammierung unverändert trotz des beschriebenen Risikos für chromosomal Veränderungen durch das integrierende Virusgenom (Taapken *et al.*, 2011). Die Charakterisierung des pluripotenten Potentials der 8 generierten iPS-Linien erfolgte direkt über den immunzytochemischen Nachweis folgender Pluripotenzmarker: alkalische Phosphatase, Nanog, Oct3, SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 sowie Tra-1-81. Die Expression dieser Proteine wurde ebenfalls von Park und Kollegen in ihren generierten iPS nachgewiesen (Park *et al.*, 2008b) und belegten damit Ähnlichkeiten zum pluripotenten Status von embryonalen Stammzellen (Adewumi *et al.*, 2007).

Neben der Expression von verschiedenen Markern wurde die Pluripotenz der iPS auch indirekt über das Differenzierungspotential *in vitro* und *in vivo* untersucht. *In vitro* wurden die iPS mittels EB-Bildung (Sheridan *et al.*, 2012) spontan in Zellen aller drei Keimblätter differenziert, die durch immunzytochemische Färbungen gegen Nestin als Marker des Ektoderms, Muskelaktin als Marker des Mesoderms und alpha-Fetoprotein als Marker des Entoderms nachgewiesen werden konnten. In einer kürzlich erschienenen Studie (Yamasaki *et al.*, 2014) wurden ebenfalls Nestin, glattes Muskelzellaktin sowie alpha-Fetoprotein als

## DISKUSSION

---

Markerproteine genutzt und präsentierten vergleichbare Färbemuster in den mittels EBs differenzierten Zellen. Um auch *in vivo* das pluripotente Potential nachzuweisen, wurde die Teratominduktion als sogenannter Goldstandard verwendet (Lensch *et al.*, 2007; Daley *et al.*, 2009), wobei es den einzigen *in vivo*-Nachweis für humane iPS darstellt. Eine Chimärenbildung mit humanen iPS ist im Gegensatz zur Chimärenbildung aus murinen iPS (Wernig *et al.*, 2007) ausgeschlossen. Die iPS induzierten in immundefizienten Mäusen gut abgekapselte Teratome, deren Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Schnitte Strukturen aus allen drei Keimblättern präsentierten. Diese Methode zum Pluripotenznachweis wurde bereits von Takahashi (Takahashi *et al.*, 2007) und Park (Park *et al.*, 2008b) genutzt und ist bis heute eine Standardmethode für neu generierte iPS-Linien (Luo *et al.*, 2014).

Für alle 8 in dieser Arbeit generierten iPS-Linien konnte zweifelsfrei die Pluripotenz direkt über die Pluripotenzmarkerexpression sowie indirekt über das pluripotente Differenzierungsverhalten *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Dabei waren keinerlei Unterschiede zwischen NPC1-iPS und Kontroll-iPS festzustellen. Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass zwischen gesunden iPS und iPS mit Erkrankung im Genotyp keine Unterschiede in der Pluripotenz nachzuweisen sind (Park *et al.*, 2008a; Seibler *et al.*, 2011).

Zusammengefasst ist die Reprogrammierung von dermalen Fibroblasten in iPS unabhängig vom Genotyp möglich und wurde hier erfolgreich für Patientenfibroblasten ohne und mit NPC1-Mutation umgesetzt.

### 5.2 Differenzierung der iPS in NPZ und NDZ zur Generierung des ersten iPS-basierten neuronalen *in vitro*-Modells für NPC1

Zur Generierung eines neuronalen NPC1-Modells wurden aus den iPS neurale Progenitorzellen gebildet. Dazu wurden die iPS in neurale Rosetten differenziert und über den neuralen Progenitormarker PSA-NCAM (Nguyen *et al.*, 2003) magnetisch sortiert. Die gleiche Selektionsmethode wurde für murine embryonale Stammzellen (Barral *et al.*, 2013) sowie für humane embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen (Kim *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012) bereits verwendet. Die selektierten Zellen werden in dieser Arbeit als neurale Progenitorzellen klassifiziert, wobei andere Studien für ihre aus neuralen Rosetten gewonnenen, aber unsortierten Zellen den Begriff neurale Stammzellen verwenden (Koch *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2011; Falk *et al.*, 2012). Die in der vorliegenden Arbeit generierten NPZ zeigten an Hand des Proliferationsmarkers Ki67 eine starke mitotische Aktivität, die auch Kim und Kollegen in ihren PSA-NCAM-positiven Zellen nachwiesen (Kim *et al.*, 2012). Beim anschließenden Erstellen einer Wachstumskurve ließ sich eine tatsächliche Verdopplungszeit zwischen 54 und 65 Stunden für die drei verschiedenen NPZ-Linien feststellen. Im Vergleich dazu zeigten neurale Stammzellen aus iPS eine Verdopplungszeit von 24 bis 30 Stunden (Falk *et al.*, 2012) beziehungsweise von 38 Stunden abstammend von ES (Koch *et al.*, 2009). Dabei könnte die in beiden Studien beschriebene kürzere Verdopplungsdauer an der Datengenerierung liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Wachstumskurve mittels Zellzählung alle 24 Stunden erstellt, wohingegen die vergleichenden Studien eine bildbasierte Auswertung

## DISKUSSION

---

zellbewachsener Fläche heranzogen und keine Zellzahlen in ihre Analysen einfließen ließen. Als weiterer Unterschied wurde in den vergleichenden Studien Passagierraten von 1:3 angewandt, wohingegen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten  $12 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> als Startdichte zur Erstellung der Wachstumskurve immer gleich waren. Eventuell war die gewählte Startdichte zu gering und die Messungen könnten mit  $15 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> wiederholt werden. Es kann basierend auf den gegenübergestellten Studien spekuliert werden, dass neurale Progenitorzellen eine dichteabhängige Verdopplungszeit zwischen 1 und 3 Tagen zeigen. Eine vergleichbare Verdopplungszeit von 2 bis 3 Tagen zeigten dagegen fetale neurale Vorläuferzellen aus dem Kortex (Sun *et al.*, 2008), was zusätzlich auf eventuelle Wachstumsunterschiede basierend auf der Zellidentität schließen lässt. Die NPZ in der vorliegenden Arbeit wurden auf die Expression neuraler Progenitormarker untersucht und exprimierten Nestin, Pax6 und Sox2. Die in anderen Studien auch über PSA-NCAM-sortierten Zelllinien (Kim *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012) zeigten sich ebenfalls positiv für Nestin und Sox2, wobei auch dort nicht 100 % der Zellen Sox2-positiv waren. Die Ursache dafür blieb jedoch unkommentiert. In anderen Studien wurde gezeigt, dass nur hoch proliferative NPZ Sox2-positiv sind (Kim *et al.*, 2011) bzw. die kombinierte Expression von Nestin und Sox2 als Nachweis neuraler Stammzellen gilt (Elkabetz *et al.*, 2008). Es kann daher vermutet werden, dass die wenigen Sox2-negativen Zellen in den NPZ-Kulturen der vorliegenden Arbeit mit der unterschiedlichen Reife bzw. dem Differenzierungszustand der aus den neuralen Rosetten gewonnenen Zellen in Zusammenhang stehen. Ferner ist es möglich, dass bei der Aufreinigung PSA-NCAM-negative Zellen an den PSA-NCAM-positiven Zellen hafteten und ebenfalls sortiert wurden, so dass eine minimale Verunreinigung der Kultur entstand. Durch die erneute Aufreinigung der Kulturen während der frühen Passagen sollte der prozentuale Anteil dieser Zellen jedoch gegen Null streben. In einer Studie von Yuan und Kollegen zeigten sich die neuralen Stammzellen vergleichbar positiv für alle drei Progenitormarker (Yuan *et al.*, 2011). Die nachgewiesenen Marker klassifizierten die generierten PSA-NCAM-selektierten Zellen in der vorliegenden Arbeit als NPZ. Dabei ließen sich wie schon bei den iPS keinerlei Unterschiede zwischen NPZ-Linien ohne und mit NPC1-Mutation feststellen.

Die sich anschließende Differenzierung der NPZ in NDZ führte zu HuC/D-, beta III-Tubulin- und MAP2-positiven Neuronen, die mit zunehmender Reifung auch Synaptophysin exprimierten. Es konnten keine Expressionsunterschiede bezüglich des präsynaptischen Markers zwischen den NDZ ohne und mit NPC1-Mutation festgestellt werden, was mit Daten aus dem Mausmodell konform ist (Xu *et al.*, 2011). Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit S100- und GFAP-positive Gliazellen nachgewiesen. In anderen Studien wurde ebenfalls die Differenzierung der PSA-NCAM-positiven NPZ in TuJ1-positive Neurone und GFAP-positive Gliazellen nach 10 Tagen (Zhao *et al.*, 2012) und 3 Wochen (Kim *et al.*, 2012) nachgewiesen. Die Differenzierung der NPZ in die neuronale als auch in die gliale Richtung bestätigte ihr neurogenes multipotentes Potential, welches durch den NPC1-Genotyp in der vorliegenden Arbeit nicht eingeschränkt wurde. Gleichermaßen wurde für das neuronale iPS-basierte Modell für Morbus Parkinson beschrieben (Seibler *et al.*, 2011). Die in der vorliegenden Arbeit zusätzlich gezeigten zeitabhängigen Expressionsanalysen von neuronalen und glialen Markern sind nach aktuellem

## DISKUSSION

---

Kenntnisstand die einzigen vergleichbaren Analysen für PSA-NCAM-sortierte und neuronal differenzierende Zellen generiert aus patientenspezifischen iPS. Die nach 5 Wochen Differenzierung beschriebenen hohen Anteile der glialen Population an der Gesamtpopulation erklärten sich nach der immunzytochemischen Färbung als eine Art unterstützende Grundschicht für die sich entwickelnden Neurone. Eine Studie von 2012 zeigte vergleichbare Kokultivierungen von iPS-abstammenden Neuronen auf einer fetalnen kortikalen Rattenprimärkultur, die der Bildung eines intakten neuronalen Netzwerkes binnen zweier Tagen diente, wobei aber nach 7 Tagen alle humanen Neurone abstarben (Braun *et al.*, 2012). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Bildung von Gliazellen während der Neurogenese scheint demnach unterstützend zu wirken und sichert damit das Langzeitüberleben der Neurone *in vitro*. Hinsichtlich des massiv erhöhten GFAP-Anteils der NDZ-Linie mit homozygoter NPC1-Mutation sowie des leicht erhöhten GFAP-Anteils der compound heterozygoten NPC1-Linie gegenüber der Kontrolle kann nur spekuliert werden, ob es an einer NPC1-bedingten erhöhten Gliose liegt, wie sie bereits im Mausmodell beschrieben wurde (German *et al.*, 2002; Pressey, Sarah N R *et al.*, 2012), oder ob es auf dem beschriebenen unterschiedlichen Differenzierungspotential einzelner iPS-Linien basiert (Hu *et al.*, 2010). Die Aufklärung dieser Beobachtung bedarf weiterer Analysen.

Die NDZ wurden bezüglich ihrer Funktionalität auch elektrophysiologisch untersucht und zeigten unabhängig von ihrem Genotyp strominduzierte Aktionspotentiale sowie spannungsabhängige Natrium- und Kaliumströme bereits nach ein bis zwei Wochen Differenzierung. Diese Ströme wurden sehr wahrscheinlich durch spannungsgesteuerte Natrium- und Kaliumkanäle vermittelt und sind, neben der Fähigkeit Aktionspotentiale zu bilden, typische Charakteristika von Neuronen. Gleiche Ergebnisse konnten auch in einer Studie für iPS-abstammende humane Neurone nach 2-monatiger Differenzierung auf Mausastrozyten präsentiert werden (Falk *et al.*, 2012). Dort wurde der Nachweis spannungsaktivierter Natriumkanäle bzw. Kaliumkanäle durch die selektive Kanalblockade mittels Tetrodotoxin bzw. 4-Aminopyridin erbracht. Auch Aktionspotentiale konnten nach Strominjektion gemessen werden und unterstützen damit die elektrophysiologische Funktionalität der generierten Neurone. Des Weiteren konnten auch in kommerziell verfügbaren iPS-abstammenden humanen Neuronen mit unreifem Vorderhirnphänotyp spannungssensitive Natriumkanäle nach rund einer Woche Zellkultivierung nachgewiesen werden (Dage *et al.*, 2014). In einer anderen Studie zeigten humane hippocampale Neurone, die aus iPS generiert worden waren, in Kokultivierung mit kommerziellen humanen hippocampalen Astrozyten ebenfalls Natrium- und Kaliumströme sowie strominjizierte Aktionspotentiale nach 4 Wochen Differenzierung (Yu *et al.*, 2014). Die in der vorliegenden Arbeit generierten NDZ zeigten außerdem nach einer Differenzierungsdauer von über 50 Tagen spontane postsynaptische Ströme. Diese konnten in den vergleichenden Studien bereits nach 4 (Yu *et al.*, 2014) und 8 Wochen (Falk *et al.*, 2012) gezeigt werden. Zusammengefasst lassen die in der vorliegenden Arbeit elektrophysiologischen Untersuchungen auf funktionale neuronale Zellen schließen und unterstützen damit die Eignung der generierten NDZ als neuronales *in vitro*-Modell. Umfassende elektrophysiologische Analysen bezüglich exprimierter spannungsabhängiger Ionenkanäle wie Natrium-, Kalzium- und Kaliumkanäle oder ligandenaktivierter GABA-

## DISKUSSION

---

oder Glutamatkanäle stehen noch aus. Auch der Neuronentyp muss noch definiert werden hinsichtlich GABAerger, glutamaterger bzw. cholinriger Identität. Von besonderem Interesse sind Untersuchungen in Bezug auf beschriebene NPC1-bedingte Unterschiede in der synaptischen Vesikelfreisetzung (Xu *et al.*, 2010) und Kalziumhomöostase (Lloyd-Evans *et al.*, 2008).

### 5.3 NPC1-Phänotyp

Das Hauptcharakteristikum von NPC1 ist die Akkumulation von freiem nicht verestertem Cholesterol in den Zellen, was mittels Filipin-Färbung visualisiert werden kann. Dabei ergibt sich für NPC1-Fibroblasten mit klassischer Biochemie ein stark fluoreszierendes Färbemuster um den Zellkern (Vanier *et al.*, 1991).

#### 5.3.1 Cholesterolakkumulationen in Fibroblasten

In der vorliegenden Arbeit konnte der NPC1-Phänotyp in den verwendeten Patientenfibroblasten eindeutig nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Fibroblasten mit der noch unbeschriebenen homozygoten NPC1-Mutation einen klassischen Phänotyp in den meisten Zellen, wohingegen die Fibroblasten mit bereits beschriebener compound heterozygoter NPC1-Mutation diesen gleichermaßen in allen Zellen aufwies.

#### 5.3.2 Cholesterolakkumulationen in iPS

Nach Generierung der patientenspezifischen iPS wurde in ihnen der NPC1-Phänotyp überprüft und ermöglichte die zweifelsfreie Unterscheidung zwischen gesunden und NPC1-iPS. Dabei unterschied sich das Färbemuster in den iPS grundlegend von dem in Fibroblasten auf Grund der Zellgröße. Während in Fibroblasten flächige fluoreszierende Areale um den Zellkern deutlich zu erkennen waren, findet man in iPS nur fluoreszierende Punkte stellvertretend für das in den späten Endosomen/Lysosomen eingeschlossene Cholesterol. Die Quantifizierung des Cholesterolgehaltes ergab für die gesunden iPS einen Wert zwischen 12 und 13 µg/mg Protein und für die iPS mit NPC1-Mutation einen Wert von rund 16 µg Cholesterol/mg Protein. Dieser signifikante Unterschied war unabhängig von der vorliegenden homozygoten oder compound heterozygoten Mutation. Der Phänotyp blieb also mit der Reprogrammierung erhalten und wurde nach derzeitigem Kenntnisstand das erste Mal überhaupt in Stammzellen mit NPC1-Defizienz nachgewiesen.

#### 5.3.3 Cholesterolakkumulationen in NPZ

Die generierten NPZ wurden ebenfalls mit Filipin gefärbt und zeigten in den NPC1-Linien zum einen ein gepunktetes und zum anderen ein flächig helles Färbemuster. Dadurch war die Unterscheidung der Linien nicht eindeutig gegeben und wurde nachfolgend mit einer Lysosomenfärbung besser veranschaulicht, die die Häufung saurer Kompartimente verteilt in den NPC1-NPZ zeigte. Die anschließende Quantifizierung des Gesamtcholesterols ergab für die Zellen ohne NPC1-Mutation rund 15 µg Cholesterol/mg Protein und für die Linien mit NPC1-Mutation Werte von rund 17 und 21 µg Cholesterol/mg Protein. Ein

## DISKUSSION

---

Unterschied zu den Kontrollzellen war vorhanden, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung. Die Werte waren insgesamt höher als in den zuvor untersuchten iPS, was eventuell mit der höheren Entwicklungsstufe der NPZ in Zusammenhang stehen kann. Des Weiteren proliferierten die iPS langsamer und wurden nur einmal pro Woche passagiert, wohingegen die NPZ schneller proliferierten und dadurch eventuell auf mehr Cholesterol entwicklungsbedingt angewiesen waren. Auch die Visualisierung sowie Quantifizierung von Cholesterol in humanen NPZ ist nach derzeitigem Kenntnisstand das erste Mal vorgenommen worden, da sich nichts Vergleichbares in der Literatur finden lässt.

### 5.3.4 Cholesterolakkumulationen in NDZ

Im Gegensatz zu den NPZ zeigten die NDZ mit NPC1-Mutation einheitlich eine Cholesterolakkumulation in Form von fluoreszierenden Punkten nach Filipin-Färbung, die mit zunehmender Differenzierungsdauer an Deutlichkeit gewann. Auch andere Arbeitsgruppen wiesen Cholesterol in NPC1-defizienten humanen Neuronen nach (Bergamin *et al.*, 2013; Ordonez *et al.*, 2012). Daneben wurden auch in tierischen Zellmodellen Cholesterolakkumulationen in Neuronen als NPC1-Phänotyp belegt. So zeigten sowohl primäre Rattenneurone aus dem Hippocampus (Tashiro *et al.*, 2004) als auch primäre murine Zervikalganglien (Karten *et al.*, 2002) nach Induktion des NPC1-Phänotyps mit der Substanz U18666A intrazelluläre Filipin-Färbungen. Gleichermaßen wurde in primären Neuronen aus dem Zerebellum von NPC1-Mäusen (Peake & Vance, 2012) sowie in primären neonatalen Neuronen aus dem Kortex von NPC1-Mäusen (Meske *et al.*, 2014) nachgewiesen. Hirnschnitte eines NPC1-Mausmodells zeigten eindeutig Cholesterolakkumulationen (Reid *et al.*, 2004), insbesondere im Hippocampus (Lopez *et al.*, 2011) sowie in Purkinjezellen (Liao *et al.*, 2007). Reid und Kollegen konnten dabei im gesamten Hirn mit steigender Entwicklungszeit eine Zunahme von Filipin-positiven Cholesterolakkumulationen feststellen (Reid *et al.*, 2004) genau so wie in der hier vorliegenden Arbeit. Karten und Kollegen untersuchten in ihrer 2002 erschienenen Studie basierend auf dem NPC1-Mausmodell obere Zervikalganglien (Karten *et al.*, 2002). Dabei konnten sie Filipin-gefärbte Vesikel in den Nervenzellen unabhängig von einer heterozygot oder homozygot vorliegenden Mutation detektieren, genau so wie in den hier dargestellten Ergebnissen. Des Weiteren waren für Karten und Kollegen keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede der gesunden und NPC1-Neurone beim Mikroskopieren zu erkennen, was mit Beobachtungen der in dieser Arbeit generierten NDZ übereinstimmt. Während jedoch in der vorliegenden Arbeit eindeutig Cholesterolakkumulationen in einigen neuronalen Ausläufern der NDZ gezeigt werden konnten, sprechen sich Karten und Kollegen für eine Akkumulation des Cholesterols in den Zellkörpern und einer Cholesterolverarmung in den Axonen aus. Gegebenenfalls mag dieser Unterschied auf dem Vergleich von murinen und humanen Zellen bzw. auf unterschiedlichen Zellidentitäten basieren. Fakt ist jedoch, dass bisher keine Cholesterolakkumulationen in neuronalen Ausläufern beschrieben worden sind. Es sollte daher in Betracht gezogen werden, dass solche Akkumulationen in humanen Neuronen zur Beeinträchtigungen von Transportprozessen vom Perikaryon hin zu distalen Axonen führen können. Diese neu beschriebene „Verstopfung“ einiger Axone respektive Dendriten könnte mit dem bisher

## DISKUSSION

---

unaufgeklärtem Neuronensterben im menschlichen Hirn in Verbindung stehen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Quantifizierung ergab für die gesunden NDZ, NDZ mit homozygoter NPC1-Mutation sowie NDZ mit compound heterozygoter NPC1-Mutation nach zwei Wochen etwa 19, 22 und 16 µg Cholesterol/mg Protein und nach 6 Wochen 20, 22 und 31 µg Cholesterol/mg. Im Vergleich zu den NPZ fiel auf, dass sich der Cholesterolgehalt der gesunden Zelllinie mit zunehmender Entwicklungsstufe weiter erhöhte, aber über die Differenzierungszeit nahezu unverändert blieb. Der Cholesterolgehalt blieb in den NDZ mit homozygoter NPC1-Mutation überraschenderweise unverändert verglichen mit ihren NPZ und erhöhte sich auch nicht mit steigender Differenzierungsdauer. Der Cholesterolwert der compound heterozygoten NPC1-Linie dagegen nahm in den NDZ verglichen mit ihren NPZ ab, um dann aber mit zunehmender Differenzierungsdauer stark anzusteigen. Ob diese nach 2 Wochen Differenzierung gemessenen Werte tatsächlich auf einem biologischen Effekt beruhen, ist fraglich und sollte durch weitere Messungen validiert werden.

Um einen Vergleich zu ebenfalls ausdifferenzierten Zellen zu ziehen, wurde der Cholesterolgehalt auch in den Ursprungsfibroblasten untersucht. In oben genannter Reihenfolge wurden in etwa folgende Cholesterolwerte ermittelt: 21, 29 und 35 µg/mg Protein. Daraus ergab sich, dass die Werte der Kontroll-NDZ und NDZ mit compound heterozygoter NPC1-Mutation ähnlich zu ihren korrespondierenden Ursprungsfibroblasten waren. Einzig die Linie mit der neu beschriebenen homozygoten NPC1-Mutation zeigte in 6 Wochen differenzierten NDZ einen weit geringeren Wert im Vergleich zu ihrer Ursprungsfibroblastenlinie.

### 5.3.5 Cholesterolakkumulationen nach LDL-Behandlung

Es wurde gemutmaßt, dass dieser unterschiedliche Cholesterolgehalt in NDZ und Fibroblasten auf die Kultivierungsmethoden zurückzuführen sein könnte. Im Unterschied zu den humanen NPC1-Fibroblasten wurden die iPS und humanen neuralen Zellen in serumfreiem Medium kultiviert. Da Serum jedoch eine externe Cholesterolquelle darstellt, wurden zur Vergleichbarkeit die Cholesterolfärbung und -quantifizierung in iPS, NPZ und NDZ nach 24-stündiger Zugabe von 10 µg/ml LDL wiederholt. LDL gilt dabei als externer Baustein für Cholesterol (Brown & Goldstein, 1986). Für die iPS ergaben sich nach Cholesterolbehandlung zwar keine Änderungen der bereits zuvor gemessenen Werte, jedoch zentralisierte sich das Filipin-Färbemuster vermehrt in den NPC1-iPS. Es könnte sein, dass die externe Cholesterolquelle innerhalb der 24 Stunden keine große Wirkung auf die iPS erzielte, auf Grund der, wie bereits oben beschrieben, langsamen Proliferation und dem damit wahrscheinlich verbundenen langsamen Zellstoffwechsel.

Für die untersuchten NPZ mit NPC1-Mutation konnte ebenfalls eine verstärkte punktuelle Filipin-Färbung festgestellt werden, deren Quantifizierung zwar keine signifikanten Unterschiede zu den unbehandelten NPZ ergab, jedoch mit 4 µg Cholesterol/mg Protein deutlich erhöht waren. Im Vergleich dazu blieb der Wert der gesunden NPZ-Linie nach LDL-Behandlung unverändert.

Ein unveränderter Cholesterolwert wurde ebenfalls in den gesunden NDZ festgestellt unabhängig von Differenzierungsdauer und LDL-Behandlung. Die zwei Wochen alten

## DISKUSSION

---

NDZ mit NPC1-Mutation zeigten nach LDL-Behandlung eine signifikante Erhöhung des Cholesterolwertes um rund 3 µg/mg Protein. Nach 6 Wochen Differenzierung hatte die LDL-Behandlung keinen Einfluss auf den Cholesterolgehalt der NDZ mit homozygoter NPC1-Mutation, wohingegen der Cholesterolwert der NDZ mit compound heterozygoter NPC1-Mutation signifikant abnahm. Hier kann man nur spekulieren, ob eventuell schon myelinisierende Vorgänge in der Kultur statt gefunden hatten und durch die Zugabe von LDL ein massiver Neuronenverlust induziert wurde, der verbunden mit dem Verlust des cholesterolreichen Myelins zu einer Abnahme des Gesamtcholesterolgehaltes führte. Yu und Lieberman zeigten erst kürzlich in der Maus, dass NPC1-defiziente Oligodendrozyten mit einem massiven Myelinzerfall korrelieren (Yu & Lieberman, 2013). Ob dieses Phänomen tatsächlich die Ursache für den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen massiven Cholesterolverlust nach LDL-Behandlung in der compound heterozygoten NPC1-Linie darstellt, oder ob es sich eventuell um gar keinen biologischen Effekt handelt, muss mit weiteren Experimenten untersucht werden.

### 5.3.6 Cholesterolwerte in anderen NPC1-Modellen

Die ermittelten Cholesterolwerte können mit denen aus anderen Studien verglichen werden und zeigen Übereinstimmungen. So ergaben Analysen von SH-SYS5-Neuroblastomzellen (Rodríguez-Pascual *et al.*, 2012) einen Wert von 16,2 µg Cholesterol/mg Protein, was in etwa dem in der hier vorliegenden Arbeit gemessenen Wert in den Kontroll-NPZ entspricht. Nach anschließendem NPC1-Knockdown in den SH-SYS5-Zellen wurde ein Wert von 35,3 µg Cholesterol/mg Protein festgestellt. Dieser Wert ist noch höher als der in der vorliegenden Arbeit detektierte Wert für die NDZ-Linie mit compound heterozygoter NPC1-Mutation nach 6 Wochen Differenzierung. Das könnte abgesehen von den unterschiedlichen Zellmodellen auf dem Knockdown von NPC1 in den SH-SYS5-Zellen basieren.

In den oberen Zervikalganglien von NPC1-defizienten Mäusen wurden für Wildtyp-, heterozygote NPC1- und homozygote NPC1-Zellen Werte von rund 21, 23 und 26 µg Cholesterol/mg Protein gemessen (Karten *et al.*, 2002). Diese sind vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werten für die NDZ nach 6 Wochen Differenzierung, wobei jedoch hier die Werte der homozygoten NPC1-Linie nicht die höchsten waren. Zurückzuführen ist das auf die vielfältigen pathologischen humanen Mutationen im Gegensatz zur verfügbaren pathologischen homozygoten NPC1-Mutation im hier angewandten Mausmodell. Des Weiteren postulierten Karten und Kollegen, dass die Cholesterolakkumulationen durch endogene Cholesterolsynthese bedingt sind und nicht durch Lipoproteine im Medium. Durch die Experimente in der vorliegenden Arbeit kann bestätigt werden, dass die Cholesterolakkumulationen in den Neuronen unabhängig von einer externen Cholesterolquelle vorhanden sind. Die Zugabe einer externen Cholesterolquelle in Form von LDL hat zwar einen Effekt auf die Zellen, jedoch nur in einem geringen Maße und führt zu keiner massiven Änderungen der Cholesterolwerte nach 24 Stunden. Ob jedoch die Akkumulationen primär durch endogene Cholesterolsynthese in den Neuronen bedingt sind, wie Karten und Kollegen mutmaßen, ist fraglich. Es wurde in Mausstudien gezeigt, dass postmitotische Neurone nur in sehr geringem Maß

## DISKUSSION

---

Cholesterolsynthese betreiben können und auf die Unterstützung von Gliazellen und deren synthetisierten Lipoproteine angewiesen sind (Quan *et al.*, 2003; Pfrieger & Ungerer, 2011). Es deutet also eher auf ein Zusammenspiel von intern synthetisiertem und extern neu aufgenommenem Cholesterol hin, das letztendlich akkumuliert.

Die separate Analyse von NPC1-defizienten murinen Gliazellen unter serumfreien Kulturbedingungen (Karten *et al.*, 2005) ergab Cholesterolwerte für Wildtyp-, heterozygote NPC1- und homozygote NPC1-Zellen von 23, 24 und 29 µg/mg Protein. Diese Werte sind mit denen in der vorliegenden Arbeit von 6 Wochen alten NDZ vergleichbar und zeigen sich nur leicht erhöht gegenüber den von der gleichen Gruppe geschilderten Cholesterolwerten der bereits beschriebenen Zervikalganglien. Erklärt werden können diese leicht höheren Werte sicherlich damit, dass Gliazellen im Gegensatz zu postmitotischen Neuronen eine aktive Cholesterolsynthese betreiben.

Analysen in humanen NPC1-Fibroblasten ergaben sehr unterschiedliche Werte. In Fibroblasten von gesunden Patienten wurden Werte zwischen 37 und 54 µg Cholesterol/mg Protein detektiert und in Fibroblasten von NPC1-Patienten schwankten die Werte zwischen 67,5 und 199 µg Cholesterol/mg Protein (Harzer & Kustermann-Kuhn, 2001). In diesem Bereich lagen auch die von Xu und Kollegen gemessenen Werte mit rund 38 µg Gesamtcholesterol/mg Protein in gesunden Fibroblasten gegenüber 85 µg Cholesterol/mg Protein in NPC1-Fibroblasten (Xu *et al.*, 2012). Yu und Kollegen hingegen wiesen rund 22 µg Cholesterol/mg Protein in gesunden Fibroblasten gegenüber rund 30 µg Cholesterol/mg Protein in NPC1-Fibroblasten nach (Yu *et al.*, 2012). Diese Werte sind nahezu identisch mit den gemessenen Werten aus der Gruppe um Daniel S. Ory (Frolov *et al.*, 2003) und sind vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte.

Cholesterolanalysen in chinesischen Hamsterovarienzellen (Kosicek *et al.*, 2010) zeigten neben einer positiven Filipin-Färbung ebenfalls einen erhöhten Cholesterolgehalt in Knockout-Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen. Allerdings wurde nur ein Cholesterolgehalt von rund 2 µg/mg Cholesterol in der Mutante gemessen gegenüber 1 µg Cholesterol/mg Protein in den Wildtyp-Zellen. Der NPC1-Phänotyp ließ sich also in diesem Modellsystem zwar nachstellen, jedoch ist er nicht vergleichbar mit dem in der vorliegenden Arbeit und bietet auch auf Grund des Zelltyps kein geeignetes Modell zur Analyse neuronaler Pathomechanismen von NPC1.

Insgesamt sind die analysierten Cholesterolwerte in den humanen neuralen Zellen ähnlich zu denen aus anderen Studien. Ob jedoch die breiten Schwankungen in den Cholesterolwerten der Fibroblasten in anderen Studien messbedingt sind, oder tatsächlich auf der spezifischen Mutation beruhen, bleibt offen. Es wäre dabei interessant zu analysieren, ob auch der Cholesterolgehalt in den daraus generierten NPZ bzw. NDZ ebenfalls so stark erhöht ist.

### 5.3.7 GM2-Akkumulation

Die Anhäufung des Sphingolipids GM2 ist ein weiterer Phänotyp von NPC1 (Vanier, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde GM2 in einem sehr geringen Maße in proliferierenden NPZ unabhängig ihres Genotyps nachgewiesen. In NDZ nahmen die GM2-Färbungen über die Zeit zu und unterschieden sich in 6 Wochen alten NDZ mit

## DISKUSSION

---

NPC1-Mutation signifikant von den Kontroll-NDZ in einer stärkeren punktuellen Färbung. GM2 wurde ebenfalls von Bergamin und Kollegen in ihren aus MAS gewonnenen neuronalen Zellen analysiert (Bergamin *et al.*, 2013). Sie konnten ebenso kaum GM2 in proliferierenden Zellen detektieren, wohingegen rund 20 % der differenzierten Zellen eine GM2-positive Färbung ähnlich zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit zeigten. Allerdings lokalisierte sich die GM2-Färbung in den MAS-abstammenden Neuronen ausschließlich in den Perikarya, wohingegen die GM2-Färbung in der hier vorliegenden Arbeit auf dem gesamten neuronalen Netzwerk lokalisiert war. In ähnlicher Form wurde das auch in humanen Hirnschnitten gezeigt (Zervas *et al.*, 2001) und unterstützte damit das in der vorliegenden Arbeit generierte Modell hinsichtlich der Nähe zum *in vivo*-System. In der vorliegenden Arbeit unterschied sich das GM2-Färbemuster stark vom Filipin-Färbemuster. Demnach ist eine Kolokalisation unwahrscheinlich. In Mausstudien wurde bereits gezeigt, dass keine signifikante Kolokalisation von Cholesterol und GM2 nachzuweisen ist (Zhou *et al.*, 2011), bzw. dass Cholesterol und GM2 nur partiell in den späten Endoyomen/Lysosomen kolokalisieren (Zervas *et al.*, 2001). Als Bestandteil von Membranmikrodomainen (Simons & Vaz, Winchil L C, 2004) könnte GM2 diese durch ihre gepunktete Färbung lokalisieren. Es wurden aber für NPC1-Neurone auch die vermehrte ektopische Dendritenbildung beschrieben (Zervas *et al.*, 2001) und gemutmaßt, dass sie zur Ausscheidung von überschüssigem GM2 dienen (Walkley & Suzuki, 2004), wobei das noch mit Experimenten zu belegen ist. Eine Mausstudie von 2003 beschreibt ein für NPC1 und GM2/GD2-Synthase doppelt defizientes Tiermodell und beobachtet neben der nicht vorhandenen GM2-Akkumulation in den Neuronen, bedingt durch den Knockdown des Synthaseenzyms, eine nicht vorhandene Cholesterolakkumulation (Gondré-Lewis *et al.*, 2003). Diese Studie führt zu der Annahme, dass Cholesterolakkumulationen nur als Folge von GM2-Akkumulationen auftreten. Die in der vorliegenden Arbeit generierten NPZ widerlegen jedoch diese Annahme. Es kann nur spekuliert werden, ob sich eventuell mit zunehmendem Reifegrad der Neurone die GM2- und Cholesterolakkumulationen gegenseitig bedingen.

Zusammengefasst ist die in der vorliegenden Arbeit gezeigte GM2-Färbung ein weiteres NPC1-typisches Charakteristikum, wodurch das vorgestellte humane neuronale *in vitro*-Modell noch vergleichbarer mit dem humanen *in vivo*-System wird.

### 5.3.8 Zusammenfassung NPC1-Phänotyp

Es ergeben sich aus den Analysen des NPC1-Phänotyps in iPS, NPZ und NDZ folgende Schlussfolgerungen:

- (1) Pluripotente Stammzellen mit NPC1-Mutation zeigen einen höheren Cholesterolwert als Kontroll-iPS, wobei sich dieser nicht zwischen einzelnen Mutationen und Klonen unterscheidet.
- (2) iPS können kurzzeitige Cholesterolexpositionen, wahrscheinlich auf Grund ihrer langsamen Stoffwechselaktivität, ohne Änderungen ihres Cholesterolgehaltes überstehen.

## DISKUSSION

---

- (3) Mit zunehmender Differenzierung steigt der Cholesterolgehalt in den neuralen Progenitorzellen an. Klare Unterschiede im Cholesterolgehalt zwischen Zellen mit und ohne NPC1-Mutation scheinen mutationsabhängig zu sein.
- (4) Neurale Progenitorzellen mit NPC1-Mutation antworten auf eine kurzzeitige Cholesterolexposition mit einer tendenziellen Erhöhung ihres Cholesterolgehaltes.
- (5) Neuronale differenzierte Zellen mit NPC1-Mutation zeigen erst nach 6 Wochen Differenzierung einen signifikant höheren Cholesterolgehalt als die Kontrollzellen, was auf eine zeitabhängige Cholesterolakkumulation hinweist. Außerdem unterscheiden sich die Linien mit verschiedenen NPC1-Mutationen ebenfalls signifikant von einander, was eventuell auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation schließen lässt.
- (6) Kurzzeitige Cholesterolexpositionen führen nur in zwei Wochen differenzierten neuronalen Zellen mit NPC1-Mutation zu einer Erhöhung des Cholesterolgehaltes, wohingegen nach 6 Wochen mutationsabhängig eine mehr oder weniger starke Erniedrigung des Cholesterolgehaltes auftritt.
- (7) Vermehrte GM2-positive Färbungen sind ausschließlich in terminal differenzierten neuronalen NPC1-Zellen nachweisbar. Nach 6 Wochen Differenzierung unterscheiden sich die neuronalen Zellen mit NPC1-Mutation signifikant von den Kontrollzellen und ebenfalls untereinander, was erneut auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation schließen lässt.
- (8) Während die 6 Wochen differenzierten neuronalen Zellen mit compound heterozygoter NPC1-Mutation den höheren Cholesterolgehalt zeigen und dafür den niedrigeren Wert nach der GM2-Färbung, verhalten sich die neuronalen Zellen mit homozygoter NPC1-Mutation genau reziprok. Neben einer eventuellen Genotyp-Phänotyp-Korrelation könnte das auf eine mögliche Abhängigkeit von Cholesterolakkumulation und GM2-Expression in humanen neuronalen NPC1-Zellen hinweisen.

### 5.4 Vergleich des generierten humanen neuronalen NPC1-Modells mit bereits bestehenden neuronalen NPC1-Modellen

Das während dieser Arbeit entstandene iPS-basierte humane neuronale Modell für eine noch unbeschriebene homozygote und eine heterozygote NPC1-Mutation (Trilck *et al.*, 2013) ist das erste seiner Art und zeigt zwei große Vorteile auf: (1) die Generierung NPC1-patientenspezifischer iPS eröffnet den Zugang zu einem breiten Spektrum an Zellen mit unterschiedlichen NPC1-Genotypen und deren nicht korrelierenden Phänotypen und (2) die terminale Differenzierung der patientenspezifischen iPS in NDZ macht die Forschung an humanen neuronalen Zellen mit typischem NPC1-Phänotyp möglich, was 2012 noch ein unerschlossenes Forschungsgebiet war (Swaroop *et al.*, 2012).

Im Vergleich dazu wurde in einer ebenfalls 2013 erschienenen Studie ein humanes neuronales NPC1-Modell aus patientenspezifischen multipotenten adulten Stammzellen vorgestellt (Bergamin *et al.*, 2013). Gewonnen wurden die MAS aus primären oder kommerziellen Fibroblastenkulturen mit einem klassischen Phänotyp für NPC1 ähnlich wie in der hier vorliegenden Studie, jedoch wurden keine integrierenden Faktoren und nur Fibroblasten bis zur dritten Passage verwendet. Die gewonnenen MAS zeigten keinerlei

## DISKUSSION

---

Unterschiede zwischen NPC1- und Kontroll-Zellen hinsichtlich Morphologie und Expression ausgewählter Stammzellmarker. Das Gleiche konnte auch für die in der vorliegenden Arbeit generierten iPS beobachtet werden, allerdings waren diese morphologisch völlig unterschiedlich zu den MAS. Die aus MAS generierten neuronalen Zellen zeigten nach 7 Tagen Differenzierung kaum neuronale Ausläufer, aber präsentierte einen neuronalen Phänotyp hinsichtlich Expression von NeuN und MAP2. Dabei wiesen NPC1-Zellen eine geringere Expression von NeuN auf im Gegensatz zu den Kontrollzellen. Vergleichend wurde in der vorliegenden Arbeit der neuronale Phänotyp in den iPS-abstammenden Neuronen (mit langen Ausläufern und dichter Netzwerkbildung) über beta III-Tubulin und MAP2 nachgewiesen und es waren keine Ungleichheiten zwischen NPC1- und Kontrollneuronen erkennbar. Die Unterschiede in den beiden Arbeiten mögen neben den zugrunde liegenden unterschiedlichen Stammzellarten eventuell auch auf der spezifisch entwickelten Neuronenart im jeweiligen System basieren. Während in der vorliegenden Arbeit die Neurone nicht klassifiziert wurden, sprechen sich Bergamin und Kollegen für einen cholinergen Neuronentyp aus, der mit NPC1-Genotyp längere Neuriten sowie vermehrte Neuritenausläufer und -knotenpunkte zeigt. Das wurde in der vorliegenden Arbeit in den von iPS abstammenden Neuronen nicht weiter untersucht und bietet einen Ansatzpunkt für weiterführende Analysen. Ein anderer Unterschied zwischen beiden Systemen ergab sich in der Entstehung glialer Zellen. Es konnte in den von Bergamin und Kollegen generierten MAS keine Differenzierung in Gliazellen nachgewiesen werden, was entweder am sehr effektiven neuronalen Differenzierungsprotokoll liegen kann oder aber an mangelnder Potenz der Zellen. Die mit NPC1 einhergehende Akkumulation von nicht verestertem Cholesterin und GM2 konnte in beiden neuronalen Modellen detektiert werden, wenn auch mit unterschiedlicher Ausprägung. Zusammengefasst ist das MAS-basierte neuronale Modell eine Chance, um viele unterschiedliche patientenspezifische NPC1-Mutationen und deren neuronale Auswirkungen zu untersuchen. Jedoch bringt es neben den Vorteilen der schnellen transgenfreien Generierung und Nutzung bestehender Zelllinien auch Nachteile hinsichtlich früher Passagenverwendung, untypischer Neuronenmorphologie sowie mangelnder Nachweise multipotenter neuraler Differenzierungsfähigkeit mit sich. Dahingegen scheint das in der vorliegenden Arbeit beschriebene neuronale Modell basierend auf patientenspezifischen iPS vielversprechender, wenn auch noch ausbaufähig hinsichtlich Klärung der Neuronenidentität und Separation der Neurone von den glialen Zellen.

Ein anderes humanes neuronales NPC1-Modell wurde 2012 vorgestellt und basiert auf humanen ES (Ordonez *et al.*, 2012). In den ES wurde das NPC1-Gen mittels shRNA ausgeschaltet und stellte damit einen Knockdown dar. Es ist demnach nur ein *in vitro*-Modell für die NPC1-Mutationen mit schwerem infantilem Verlauf, da ein komplett unfunktionales NPC1-Protein in den meisten Patienten nicht vorhanden ist. Das stellt neben der kontroversen Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen insofern einen Nachteil in der Erforschung von NPC1 dar, als dass der in den Zellen herbeigeführte schwere Phänotyp bei Substanzscreenings mögliche Treffer maskieren könnte. Ähnlich zu den in der vorliegenden Arbeit generierten NPC1-iPS zeigten die ES mit NPC1-Knockdown keinerlei Unterschiede zu den Kontrollzellen hinsichtlich Morphologie,

## DISKUSSION

---

Pluripotenzmarkerexpression sowie pluripotentem Differenzierungsverhalten *in vitro*. Jedoch konnten Ordonez und Kollegen keine neuralen Stammzellen nach dem Protokoll von Yuan und Kollegen (Yuan *et al.*, 2011) aus der NPC1-Knockdown-ES-Linie generieren im Kontrast zur Ursprungs-ES-Linie. Umgangen wurde dieses Problem mit dem NPC1-Knockdown der generierten neuralen Stammzellen aus der Ursprungs-ES-Linie. Die generierten NPC1-Zellen zeigten sich unauffällig in Proliferation, neuraler Markerexpression und Differenzierung sowie untersuchter Überlebensdauer, was sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit deckt. Allerdings wurden von Ordonez und Kollegen keine charakterisierenden Färbungen der differenzierten Neurone gezeigt und keine Aussagen über gliale Subpopulationen getroffen, was die Beurteilung und den Vergleich der neuralen Differenzierung unmöglich macht. Jedoch fanden die Forscher eine erhöhte Autophagie in den NPC1-Neuronen, was eventuell den Pathomechanismus der Neurodegeneration im menschlichen Hirn erklären könnte. Summarisch ist das von Ordonez und Kollegen vorgestellte humane neuronale Modell gut, um grundlegend veränderte Mechanismen in NPC1-Neuronen mittels des induzierten schweren Genotyps zu detektieren. Jedoch können die Ergebnisse nicht an NPC1-Mutationen mit milderem Phänotyp überprüft werden, was nur das iPS-basierte patientenspezifische neuronale NPC1-Modell der vorliegenden Arbeit möglich macht.

Ein weiteres humanes neuronales Modell basierte auf einem stabilen NPC1-Knockdown in der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (Rodríguez-Pascual *et al.*, 2012). Mittels shRNA wurde ähnlich wie bei Ordonez und Kollegen das NPC1-Gen zu 90 % inhibiert. Erhöhte Cholesterol- und GM2-Werte konnten als typische NPC1-Phänotypen in den Knockout-Zellen festgestellt werden.

Ein transienter NPC1-Knockdown in der gleichen Zelllinie aber vermittelt durch siRNA wurde bereits 2009 beschrieben (Zampieri *et al.*, 2009). Auch dort zeigten die Zellen einen NPC1-Phänotyp in Form von massiven Cholesterolakkumulationen sowie erhöhte reaktive Sauerstoffspezies. Da in keiner von beiden Studien die Neuroblastomzelllinie weiter neuronal differenziert wurde und die Krebszelllinie mit hoher mitotischer Aktivität vorliegt, ist die Bezeichnung eines humanen neuronalen NPC1-Modells nur im weitesten Sinne zutreffend. Es stellt ausschließlich eine Möglichkeit dar, prinzipielle Hypothesen zum NPC1-Pathomechanismus zu überprüfen und Parallelen zu den meist genutzten NPC1-Fibroblasten zu ziehen. Der NPC1-Knockdown in SH-SY5Y ist jedoch nur sehr eingeschränkt zur Erforschung des neuronalen NPC1-Phänotyps hinsichtlich Neurodegeneration geeignet.

## 5.5 Ausblick

Zusammengefasst ist das generierte NPC1-Modell der vorliegenden Arbeit das derzeit am besten beschriebene humane neuronale *in vitro*-Modell für NPC1, das den Phänotyp von angereichertem Cholesterol und GM2 sowie entwicklungsbedingte Veränderungen elektrophysiologischer Neuroneneigenschaften präsentiert. Die Charakterisierung des Modellsystems wurde in der vorliegenden Arbeit der Aufgabenstellung entsprechend sehr umfangreich gestaltet, wobei natürlich aber nicht alle Aspekte der NPC1-Pathologie beleuchtet werden konnten. So sind beispielsweise in Hirnen von NPC1-Patienten

## DISKUSSION

---

neurofibrilläre Bündel gefunden worden (Suzuki *et al.*, 1995). Der Nachweis ihrer Existenz in dem hier generierten *in vitro*-Zellmodell würde dem *in vivo*-Zustand eines NPC1-Patienten noch näher kommen und dadurch die NPC1-Pathologie noch detaillierter simulieren. Ein weiterer Gesichtspunkt, der noch analysiert werden muss, ist die Auflösung des NPC1-Phänotyps durch die Behandlung mit Cyclodextrin. Die Cholesterol-reduzierende Wirkung von Cyclodextrin wurde bereits im Mausmodell (Davidson *et al.*, 2009) sowie in NPC1-induzierten humanen Neuronen beschrieben (Swaroop *et al.*, 2012) und führt derzeit zur Erprobung des Medikaments in einer klinischen Studie Phase I (Ottinger *et al.*, 2014). Es ist zwar sehr wahrscheinlich, dass auch im vorliegenden Zellmodell durch Cyclodextrinbehandlung eine Auflösung der Cholesterol- und GM2-Anhäufungen beobachtbar ist, jedoch muss der Nachweis noch erbracht werden.

Elegant wäre weiterhin die Generierung eines stabilen NPC1-Knockdowns aus den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Kontroll-NPZ, die dann als Positivkontrolle in weiteren Experimenten mitgeführt werden könnte. Des Weiteren ist der Neuronentyp noch uncharakterisiert hinsichtlich glutamaterg, GABAerg oder cholinerg im Gegensatz zu den als cholinerg charakterisierten Neuronen von Bergamin und Kollegen (Bergamin *et al.*, 2013).

Trotz der noch offenen Fragestellungen, zeigt das hier beschriebene humane neuronale Modell großes Potential für die Erforschung NPC1-bedingter neurodegenerativer Pathomechanismen. Dahingehend wäre interessant, ob der in NPC1-defizienten Zellen beschriebene reduzierte Kalziumgehalt im sauren Kompartiment und die damit verbundene gestörte Kalziumhomöostase (Lloyd-Evans *et al.*, 2008) ebenfalls im vorliegenden NPC1-Modell nachzuweisen sind und ob die Aufhebung dieses Phänotyps zu einer verminderten Cholesterol- bzw. GM2-Akkumulation führt.

Mit dem vorhandenen Zellsystem könnten ebenfalls die Ergebnisse von Ordonez und Kollegen zur Autophagie überprüft werden. Sie postulierten 2012, dass Autophagie vermehrt in den Zellen mit NPC1-Knockdown aktiviert ist, aber der abtransportierende autophagische Flux gestört ist (Ordonez *et al.*, 2012). Sie haben weiterhin beschrieben, dass damit eine mitochondriale Fragmentierung verbundenen ist, die zur Akkumulation von degradierten Mitochondrien in der Zelle führt und speziell in Neuronen einen schweren Phänotyp hervorruft. Dieser könnte mit der NPC1-bedingten neuronalen Degeneration in Verbindung stehen, wobei sich jedoch in ihrem zellulären Modell keinerlei Veränderungen in der Zellvitalität zeigten. Im Gegensatz zu den auf humanen Neuronen basierenden Ergebnissen von Ordonez und Kollegen veröffentlichten kürzlich deutsche Forscher kontroverse Ergebnisse im NPC1-Mausmodell. Meske und Kollegen sprechen sich darin gegen eine Induktion der Autophagie aus und verweisen auf eine ledigliche Akkumulation von autophagischen Vesikeln im sauren Kompartiment (Meske *et al.*, 2014). Es bleibt also zu überprüfen, ob die Mausdaten auf humane Zellen im Allgemeinen übertragbar sind, oder ob dort im Speziellen andere Stoffwechselvorgänge ablaufen.

Des Weiteren wurden NPC1-bedingte Veränderungen des Intermediärfilaments Vimentin gezeigt. Dessen Hypophosphorylierung führt zur Aggregation in NPC1-defizienten Fibroblasten und bewirkt Störungen in Lipidtransport bzw. Lipidfreisetzung aus Endosomen (Walter *et al.*, 2009). Diese Störungen können durch die erneute

## DISKUSSION

---

Phosphorylierung des Vimentins mittels Proteinkinase C aufgehoben werden, wobei sich die Aktivierung der Epsilon-Isoform der Proteinkinase C am effektivsten zeigte (Tamari *et al.*, 2013). Sollten diese Ergebnisse tatsächlich in den in der vorliegenden Arbeit generierten humanen NPC1-Neuronen reproduzierbar sein, so stellt die medikamentöse selektive Aktivierung der Proteinkinase C ein mögliches therapeutisches Ziel dar.

Ebenfalls in Patientenfibroblasten wurde die vermehrte Freisetzung cholesterolgefüllter Exosomen gezeigt im Vergleich zu gesunden Kontrollfibroblasten (Strauss *et al.*, 2010). Das könnte auf einen möglichen zellautonomen Rettungsversuch zum Ausschleusen von überschüssigem Cholesterol hinweisen. Bisher ist es unbekannt, ob humane NPC1-Neurone ebenfalls über diesen Mechanismus verfügen und basierend darauf eventuell Unterschiede im Krankheitsprogress entstehen. Vor kurzem wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass Neurone die Exosomenfreisetzung aus Oligodendrozyten auslösen und die von den Neuronen aufgenommen Exosomen ihre Vitalität unterstützen (Frühbeis *et al.*, 2013). Es ist daher fraglich, ob die Neurodegeneration in NPC1-Patienten tatsächlich allein auf autonomen Zellprozessen beruhen oder doch in Verbindung stehen mit einer Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen. Um diese Glia-Neuron-Kommunikation im NPC1-Kontext mit dem in der vorliegenden Arbeit generierten Zellmodell nachzustellen, müsste die Mischkultur selektiert werden bzw. die NPZ zusätzlich speziell in Oligodendrozyten differenziert werden, um eine Kokultivierung zu ermöglichen. Auch für andere Experimente wäre das wahrscheinlich von Vorteil und sollte als zukünftige Maßnahme in Betracht gezogen werden.

Zusammengefasst ergeben sich mit dem hier generierten humanen neuronalen NPC1-Modell viele wichtige Fragestellungen, die es in der Zukunft zu untersuchen gilt. Erweiterte Kenntnisse der NPC1-Pathologie und damit verbundener möglicher therapeutischer Ziele können den NPC1-Patienten weltweit helfen und stellten die größte Motivation zur Generierung dieses Modells dar.

## ZUSAMMENFASSUNG

### 6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) von Patienten mit Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) zu generieren und neuronal zu differenzieren, um ein humanes neuronales *in vitro*-Modell für NPC1 zu entwickeln.

Morbus Niemann-Pick Typ C1 ist eine seltene, rezessive, lysosomale Stoffwechselkrankung und wird durch Mutationen im NPC1-Gen verursacht. Diese resultieren in einem gestörten Lipidtransport, wodurch in den somatischen Zellen von NPC1-Patienten Cholesterol akkumuliert. Neben diesem typischen diagnostizierbaren zellulären NPC1-Phänotyp gilt als weitere phänotypische Ausprägung die Anreicherungen der Glykosphingolipide GM2 und GM3 in neuronalen Zellen. Die Patienten zeigen vielfältige viszerale und neurologische Symptome, wobei die auftretende massive Neurodegeneration bisher nicht erklärt werden kann. Zur Aufklärung des zu Grunde liegenden Pathomechanismus wäre ein humanes neuronales *in vitro*-Modell, wie es schon für andere neurodegenerative Erkrankungen existiert, daher von Vorteil. Gegenwärtig bieten iPS, die auf Grund ihrer Pluripotenz in theoretisch alle Zellen der drei Keimblätter differenzieren können, die Möglichkeit, an humane neuronale Zellen zu gelangen, die bisher nicht zugänglich waren.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Generierung der patientenspezifischen iPS durch retrovirale Reprogrammierung dermaler Fibroblasten mit zwei unterschiedlichen NPC1-Mutationen, wobei die vier klassischen Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC verwendet wurden. Der pluripotente Status der iPS konnte anhand von Morphologiestudien, Expression spezifischer Stammzellmarker sowie ihres pluripotenten Differenzierungspotentials *in vitro* und *in vivo* belegt werden. Sie präsentierten außerdem die NPC1-typischen Cholesterolakkumulationen, wobei der Gesamtcholesterolgehalt signifikant höher war als jener der Kontroll-iPS von gesunden Individuen. Es waren jedoch keine Unterschiede der Cholesterolwerte zwischen unterschiedlichen NPC1-iPS-Linien detektierbar, was eventuell auf das frühe Entwicklungsstadium der Zellen zurückzuführen ist.

Die neurale Differenzierung der iPS und die anschließende Sortierung der Zellen über den Oberflächenmarker PSA-NCAM führten zur Generierung neuraler Progenitorzellen. Sie wurden als multipotente neurale Zellen über die Expression von Nestin, Pax6 und Sox2 definiert und zeigten ebenfalls die typischen Cholesterolakkumulationen. Die Analyse des Gesamtcholesterolgehaltes ergab zwar keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Linien, jedoch war eine Tendenz bezüglich höherer Werte in den Linien mit NPC1-Mutation per se sowie zwischen den NPC1-Linien ersichtlich.

Schließlich wurden die neuralen Progenitorzellen terminal neuronal differenziert und zeigten sich positiv für die neuronalen Marker HuC/D, beta III-Tubulin und MAP2 sowie für die glialen Marker S100 und GFAP. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zelllinien mit NPC1-Mutation einen höheren Anteil GFAP-positiver Zellen zeigten als die Kontrollzelllinien, was möglicherweise auf eine im Mausmodell bereits beschriebene NPC1-bedingte Gliose schließen lassen könnte. Mit dem Nachweis der Expression des

#### ZUSAMMENFASSUNG

---

präsynaptischen Markers Synaptophysin und den sich daraufhin anschließenden elektrophysiologischen Untersuchungen konnte auch die Funktionalität der neuronalen Zellen belegt werden. Die Visualisierung von Cholesterin in den Zellen zeigte nicht nur Cholesterolakkumulationen im Soma, sondern auch deutlich in den Ausläufern der Neurone, was im Kontrast zu existierenden Daten aus dem NPC1-Mausmodell steht und daher eventuell ein Anhaltspunkt zur Aufklärung der degenerativen Prozesse sein könnte. Die Analyse des Cholesterolgehaltes zeigte in 6 Wochen differenzierten neuronalen Zellen sowohl einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollzellen und Zellen mit NPC1-Mutation als auch zwischen den untersuchten NPC1-Linien, was auf spezifische Genotyp-Phänotyp-Korrelationen hinweist. Des Weiteren konnte in 6 Wochen differenzierten neuronalen Zellen mit NPC1-Mutation deutlich mehr GM2 nachgewiesen werden als im Vergleich zur Kontrolle. Dabei war auffällig, dass NPC1-Zellen mit hohem Cholesterolgehalt einen geringeren GM2-Wert und reziprok dazu die NPC1-Zellen mit geringerem Cholesterolgehalt einen höheren Wert für GM2 präsentierte. Das weist zum einen erneut auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation hin und zum anderen liegt die Vermutung nahe, dass eine Abhängigkeit zwischen Cholesterol- und GM2-Akkumulationen besteht.

Der 24-stündige Einfluss einer externen Cholesterolquelle in Form von Low Density Lipoprotein (LDL) wurde ebenfalls in den drei Zelltypen untersucht und führte zu einer verstärkten Cholesterolfärbung in den Zellen mit teilweiser Zentrierung des Färbemusters in iPS und neuronalen Progenitorzellen. Die Analyse der Gesamtcholesterolmenge zeigte jedoch keine Änderungen in den iPS und eine tendenzielle Erhöhung in den neuronalen Progenitorzellen. In den neuronalen Zellen hatte die LDL-Behandlung einen signifikanten Anstieg des Gesamtcholesterols in den 2 Wochen differenzierten Zellen zur Folge, wobei sich dieser Effekt in 6 Wochen differenzierten Zellen umkehrte.

Zusammengefasst wurden in der vorliegenden Arbeit nicht nur patientenspezifische NPC1-iPS, sondern auch das darauf basierende erste humane neuronale *in vitro*-Modell für NPC1 generiert. Es präsentiert den NPC1-Phänotyp hinsichtlich Cholesterol- und GM2-Akkumulationen und bietet dadurch viele Möglichkeiten für weiterführende Forschungen, wie z. B. Analyse des Pathomechanismus, Identifikation therapeutisch adressierbarer Zielstrukturen und Substanzscreenings.

## 7 Referenzen

- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K.G., Choo, Andre B H, Churchill, G.A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J.S., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, R.A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P.J., Hamilton, R.S., Hampl, A., Healy, L.E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M.P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J.L., Jones, M., Kee, K., King, B.L., Knowles, B.B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B.S., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, Ronald D G, Michalska, A.E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S.L., Moore, H.D., Mummery, C.L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C.M., Oh, Steve K W, Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K.-Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M.F., Piekarczyk, M.S., Pera, Renee A Reijo, Reubinoff, B.E., Robins, A.J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T.C., Semb, H., Sherrer, E.S., Siemen, H., Stacey, G.N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., van den Brink, Steineke, Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T.A., Young, L.A. & Zhang, W. (2007) *Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative*. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 803–816.
- Aqul, A., Liu, B., Ramirez, C.M., Pieper, A.A., Estill, S.J., Burns, D.K., Liu, B., Repa, J.J., Turley, S.D. & Dietschy, J.M. (2011) *Unesterified cholesterol accumulation in late endosomes/lysosomes causes neurodegeneration and is prevented by driving cholesterol export from this compartment*. *J. Neurosci.*, **31**, 9404–9413.
- Barral, S., Ecklebe, J., Tomiuk, S., Tiveron, M.-C., Desoeuvre, A., Eckardt, D., Cremer, H. & Bosio, A. (2013) *Efficient neuronal in vitro and in vivo differentiation after immunomagnetic purification of mESC derived neuronal precursors*. *Stem Cell Res.*, **10**, 133–146.
- Bauer, P., Knoblich, R., Bauer, C., Finckh, U., Hufen, A., Kropp, J., Braun, S., Kustermann-Kuhn, B., Schmidt, D., Harzer, K. & Rolfs, A. (2002) *NPC1: Complete genomic sequence, mutation analysis, and characterization of haplotypes*. *Hum. Mutat.*, **19**, 30–38.
- 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.
- Braun, H., Günther-Kern, A., Reymann, K. & Onteniente, B. (2012) *Neuronal differentiation of human iPS-cells in a rat cortical primary culture*. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **72**, 219–229.
- Breakspear, A., Pasquali, M., Broz, K., Dong, Y. & Kistler, H.C. (2011) *Npc1 is involved in sterol trafficking in the filamentous fungus Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.*, **48**, 725–730.
- Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1986) *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. *Science*, **232**, 34–47.

REFERENZEN

---

- Butters, T.D., Dwek, R.A. & Platt, F.M. (2000) *Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis: application to lysosomal storage disorders*. *Chem. Rev.*, **100**, 4683–4696.
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., Nagle, J., Polymeropoulos, M.H., Sturley, S.L., Ioannou, Y.A., Higgins, M.E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneski, C.R., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Neufeld, E.B., Chang, T.Y., Liscum, L., Strauss, J.F., Ohno, K., Zeigler, M., Carmi, R., Sokol, J., Markie, D., O'Neill, R.R., van Diggelen, O P, Elleder, M., Patterson, M.C., Brady, R.O., Vanier, M.T., Pentchev, P.G. & Tagle, D.A. (1997) *Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis*. *Science*, **277**, 228–231.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M. & Studer, L. (2009) *Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling*. *Nat Biotechnol*, **27**, 275–280.
- Claassen, D.A., Desler, M.M. & Rizzino, A. (2009) *ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells*. *Mol. Reprod. Dev.*, **76**, 722–732.
- Cooper, O., Seo, H., Andrabi, S., Guardia-Laguarta, C., Graziotto, J., Sundberg, M., McLean, J.R., Carrillo-Reid, L., Xie, Z., Osborn, T., Hargus, G., Deleidi, M., Lawson, T., Bogetofte, H., Perez-Torres, E., Clark, L., Moskowitz, C., Mazzulli, J., Chen, L., Volpicelli-Daley, L., Romero, N., Jiang, H., Uitti, R.J., Huang, Z., Opala, G., Scarffe, L.A., Dawson, V.L., Klein, C., Feng, J., Ross, O.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Marder, K., Surmeier, D.J., Wszolek, Z.K., Przedborski, S., Krainc, D., Dawson, T.M. & Isacson, O. (2012) *Pharmacological rescue of mitochondrial deficits in iPSC-derived neural cells from patients with familial Parkinson's disease*. *Sci Transl Med*, **4**, 141ra90.
- Dage, J.L., Colvin, E.M., Fouillet, A., Langron, E., Roell, W.C., Li, J., Mathur, S.X., Mogg, A.J., Schmitt, M.G., Felder, C.C., Merchant, K.M., Isaac, J., Broad, L.M., Sher, E. & Ursu, D. (2014) *Pharmacological characterisation of ligand- and voltage-gated ion channels expressed in human iPSC-derived forebrain neurons*. *Psychopharmacology (Berl.)*, **231**, 1105–1124.
- Daley, G.Q., Lensch, M.W., Jaenisch, R., Meissner, A., Plath, K. & Yamanaka, S. (2009) *Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs*. *Cell Stem Cell*, **4**, 200–1; author reply 202.
- Davidson, C.D., Ali, N.F., Micsenyi, M.C., Stephney, G., Renault, S., Dobrenis, K., Ory, D.S., Vanier, M.T. & Walkley, S.U. (2009) *Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression*. *PLoS ONE*, **4**, e6951.
- Davies, J.P., Chen, F.W. & Ioannou, Y.A. (2000) *Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein*. *Science*, **290**, 2295–2298.

REFERENZEN

---

- Davies, J.P. & Ioannou, Y.A. (2000) *Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 24367–24374.
- Deffieu, M.S. & Pfeffer, S.R. (2011) *Niemann-Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 18932–18936.
- Devine, M.J., Ryten, M., Vodicka, P., Thomson, A.J., Burdon, T., Houlden, H., Cavalieri, F., Nagano, M., Drummond, N.J., Taanman, J.-W., Schapira, A.H., Gwinn, K., Hardy, J., Lewis, P.A. & Kunath, T. (2011) *Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the  $\alpha$ -synuclein locus*. *Nat Commun*, **2**, 440.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Soccia, N.D., Tabar, V. & Studer, L. (2008) *Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage*. *Genes Dev.*, **22**, 152–165.
- Falk, A., Koch, P., Kesavan, J., Takashima, Y., Ladewig, J., Alexander, M., Wiskow, O., Tailor, J., Trotter, M., Pollard, S., Smith, A. & Brüstle, O. (2012) *Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons*. *PLoS ONE*, **7**, e29597.
- Frolov, A., Zielinski, S.E., Crowley, J.R., Dudley-Rucker, N., Schaffer, J.E. & Ory, D.S. (2003) *NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25517–25525.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W.P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A.S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebbel, S., Nave, K.-A., Schneider, A., Simons, M., Klugmann, M., Trotter, J. & Krämer-Albers, E.-M. (2013) *Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication*. *PLoS Biol.*, **11**, e1001604.
- Gai, H., Leung, E.L.-H., Costantino, P.D., Aguila, J.R., Nguyen, D.M., Fink, L.M., Ward, D.C. & Ma, Y. (2009) *Generation and characterization of functional cardiomyocytes using induced pluripotent stem cells derived from human fibroblasts*. *Cell Biol. Int.*, **33**, 1184–1193.
- 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.
- German, D.C., Quintero, E.M., Liang, C.L., Ng, B., Punia, S., Xie, C. & Dietschy, J.M. (2001) *Selective neurodegeneration, without neurofibrillary tangles, in a mouse model of Niemann-Pick C disease*. *J. Comp. Neurol.*, **433**, 415–425.
- Goldman, S.D.B. & Krise, J.P. (2010) *Niemann-Pick C1 functions independently of Niemann-Pick C2 in the initial stage of retrograde transport of membrane-impermeable lysosomal cargo*. *J. Biol. Chem.*, **285**, 4983–4994.

REFERENZEN

---

- Gondré-Lewis, M.C., McGlynn, R. & Walkley, S.U. (2003) *Cholesterol accumulation in NPC1-deficient neurons is ganglioside dependent*. *Curr. Biol.*, **13**, 1324–1329.
- Harzer, K. & Kustermann-Kuhn, B. (2001) *Quantified increases of cholesterol, total lipid and globotriaosylceramide in filipin-positive Niemann-Pick type C fibroblasts*. *Clin. Chim. Acta*, **305**, 65–73.
- Higashi, Y., Murayama, S., Pentchev, P.G. & Suzuki, K. (1993) *Cerebellar degeneration in the Niemann-Pick type C mouse*. *Acta Neuropathol.*, **85**, 175–184.
- Higgins, M.E., Davies, J.P., Chen, F.W. & Ioannou, Y.A. (1999) *Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network*. *Mol. Genet. Metab.*, **68**, 1–13.
- Hovakimyan, M., Stachs, O., Reichard, M., Mascher, H., Lukas, J., Frech, M.J., Guthoff, R., Witt, M., Rolfs, A. & Wree, A. (2011) *Morphological alterations of the cornea in the mouse model of niemann-pick disease type c1*. *Cornea*, **30**, 796–803.
- Hovakimyan, M., Maass, F., Petersen, J., Holzmann, C., Witt, M., Lukas, J., Frech, M.J., Hübner, R., Rolfs, A. & Wree, A. (2013a) *Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann-Pick Type C1 mice*. *Neuroscience*, **252**, 201–211.
- Hovakimyan, M., Meyer, A., Lukas, J., Luo, J., Gudziol, V., Hummel, T., Rolfs, A., Wree, A. & Witt, M. (2013b) *Olfactory deficits in Niemann-Pick type C1 (NPC1) disease*. *PLoS ONE*, **8**, e82216.
- Hu, B.-Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J.A. & Zhang, S.-C. (2010) *Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 4335–4340.
- 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: dnpc1a is required for molting and sterol homeostasis*. *Development*, **132**, 5115–5124.
- 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.
- Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., Carson, C.T., Laurent, L.C., Marsala, M., Gage, F.H., Remes, A.M., Koo, E.H. & Goldstein, Lawrence S B (2012) *Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells*. *Nature*, **482**, 216–220.
- 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**, 1154–1163.

REFERENZEN

---

- Karten, B., Hayashi, H., Francis, G.A., Campenot, R.B., Vance, D.E. & Vance, J.E. (2005) *Generation and function of astroglial lipoproteins from Niemann-Pick type C1-deficient mice*. *Biochem. J.*, **387**, 779–788.
- Karten, B., Peake, K.B. & Vance, J.E. (2009) *Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 659–670.
- Karumbayaram, S., Novitch, B.G., Patterson, M., Umbach, J.A., Richter, L., Lindgren, A., Conway, A.E., Clark, A.T., Goldman, S.A., Plath, K., Wiedau-Pazos, M., Kornblum, H.I. & Lowry, W.E. (2009) *Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons*. *Stem Cells*, **27**, 806–811.
- 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**, 2632–2642.
- Kim, D.-S., Lee, D.R., Kim, H.-S., Yoo, J.-E., Jung, S.J., Lim, B.Y., Jang, J., Kang, H.-C., You, S., Hwang, D.-Y., Leem, J.W., Nam, T.S., Cho, S.-R., Kim, D.-W. & Kerkis, I. (2012) *Highly Pure and Expandable PSA-NCAM-Positive Neural Precursors from Human ESC and iPSC-Derived Neural Rosettes*. *PLoS ONE*, **7**, e39715.
- Kim, J.-E., O'Sullivan, M.L., Sanchez, C.A., Hwang, M., Israel, M.A., Brennand, K., Deerinck, T.J., Goldstein, Lawrence S B, Gage, F.H., Ellisman, M.H. & Ghosh, A. (2011) *Investigating synapse formation and function using human pluripotent stem cell-derived neurons*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 3005–3010.
- Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J.A., Ladewig, J. & Brüstle, O. (2009) *A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 3225–3230.
- Koch, P., Tamboli, I.Y., Mertens, J., Wunderlich, P., Ladewig, J., Stüber, K., Esselmann, H., Wiltfang, J., Brüstle, O. & Walter, J. (2012) *Presenilin-1 L166P mutant human pluripotent stem cell-derived neurons exhibit partial loss of γ-secretase activity in endogenous amyloid-β generation*. *Am. J. Pathol.*, **180**, 2404–2416.
- Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, K., Takahashi, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Watanabe, K., Kadoya, C., Nakano, R., Watanabe, D., Maruyama, K., Hori, O., Hibino, S., Choshi, T., Nakahata, T., Hioki, H., Kaneko, T., Naitoh, M., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Hata, R., Ueno, S.-I., Seki, T., Kobayashi, K., Toda, T., Murakami, K., Irie, K., Klein, W.L., Mori, H., Asada, T., Takahashi, R., Iwata, N., Yamanaka, S. & Inoue, H. (2013) *Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Aβ and differential drug responsiveness*. *Cell Stem Cell*, **12**, 487–496.
- Kosicek, M., Malnar, M., Goate, A. & Hecimovic, S. (2010) *Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 404–409.

REFERENZEN

---

- Lensch, M.W., Schlaeger, T.M., Zon, L.I. & Daley, G.Q. (2007) *Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera*. *Cell Stem Cell*, **1**, 253–258.
- Liao, G., Yao, Y., Liu, J., Yu, Z., Cheung, S., Xie, A., Liang, X. & Bi, X. (2007) *Cholesterol accumulation is associated with lysosomal dysfunction and autophagic stress in Npc1 -/- mouse brain*. *Am. J. Pathol.*, **171**, 962–975.
- 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**, 1247–1255.
- Lloyd-Evans, E. & Platt, F.M. (2010) *Lipids on trial: the search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease*. *Traffic*, **11**, 419–428.
- 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.
- Lowenthal, A.C., Cummings, J.F., Wenger, D.A., Thrall, M.A., Wood, P.A. & Lahunta, A. de (1990) *Feline sphingolipidosis resembling Niemann-Pick disease type C*. *Acta Neuropathol.*, **81**, 189–197.
- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T. & Plath, K. (2008) *Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 2883–2888.
- Luo, Y., Fan, Y., Chen, X., Yue, L., Yu, B., Li, Q., Chen, Y. & Sun, X. (2014) *Modeling induced pluripotent stem cells from fibroblasts of Duchenne muscular dystrophy patients*. *Int. J. Neurosci.*, **124**, 12–21.
- March, P.A., Thrall, M.A., Brown, D.E., Mitchell, T.W., Lowenthal, A.C. & Walkley, S.U. (1997) *GABAergic neuroaxonal dystrophy and other cytopathological alterations in feline Niemann-Pick disease type C*. *Acta Neuropathol.*, **94**, 164–172.
- 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., Gruber, D.J., Penatti, Carlos 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.
- Meske, V., Erz, J., Priesnitz, T. & Ohm, T.-G. (2014) *The autophagic defect in Niemann-Pick disease type C neurons differs from somatic cells and reduces neuronal viability*. *Neurobiol. Dis.*, **64**, 88–97.

REFERENZEN

---

- Millat, G., Marçais, C., Tomasetto, C., Chikh, K., Fensom, A.H., Harzer, K., Wenger, D.A., Ohno, K. & Vanier, M.T. (2001) *Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop*. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 1373–1385.
- Mohamad, O., Yu, S.P., Chen, D., Ogle, M., Song, M. & Wei, L. (2013) *Efficient neuronal differentiation of mouse ES and iPS cells using a rotary cell culture protocol*. *Differentiation*, **86**, 149–158.
- Morris, M.D., Bhuvaneswaran, C., Shio, H. & Fowler, S. (1982) *Lysosome lipid storage disorder in NCTR-BALB/c mice. I. Description of the disease and genetics*. *Am. J. Pathol.*, **108**, 140–149.
- Naureckiene, S., Sleat, D.E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M.T., Wattiaux, R., Jadot, M. & Lobel, P. (2000) *Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease*. *Science*, **290**, 2298–2301.
- Neufeld, E.B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A.M., Dwyer, N.K., Roff, C.F., Ohno, K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Incardona, J.P., Strauss, J.F., Vanier, M.T., Patterson, M.C., Brady, R.O., Pentchev, P.G. & Blanchette-Mackie, E.J. (1999) *The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 9627–9635.
- Nguyen, H.N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., Kee, K., Schüle, B., Dolmetsch, R.E., Langston, W., Palmer, T.D. & Pera, R.R. (2011) *LRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress*. *Cell Stem Cell*, **8**, 267–280.
- Nguyen, L., Rigo, J.-M., Malgrange, B., Moonen, G. & Belachew, S. (2003) *Untangling the functional potential of PSA-NCAM-expressing cells in CNS development and brain repair strategies*. *Curr. Med. Chem.*, **10**, 2185–2196.
- Norman, A.W., Demel, R.A., Kruyff, B. de & van Deenen, L L (1972) *Studies on the biological properties of polyene antibiotics. Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol*. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1918–1929.
- Ordonez, M.P., Roberts, E.A., Kidwell, C.U., Yuan, S.H., Plaisted, W.C. & Goldstein, Lawrence 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.
- Ottinger, E.A., Kao, M.L., Carrillo-Carrasco, N., Yanjanin, N., Shankar, R.K., Janssen, M., Brewster, M., Scott, I., Xu, X., Cradock, J., Terse, P., Dehdashti, S.J., Marugan, J., Zheng, W., Portilla, L., Hubbs, A., Pavan, W.J., Heiss, J., H Vite, C., Walkley, S.U., Ory, D.S., Silber, S.A., Porter, F.D., Austin, C.P. & McKew, J.C. (2014) *Collaborative development of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin for the treatment of Niemann-Pick type C1 disease*. *Curr Top Med Chem*, **14**, 330–339.

REFERENZEN

---

- 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**, 877–886.
- 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.
- Patterson, M.C., Hendriksz, C.J., Walterfang, M., Sedel, F., Vanier, M.T. & Wijburg, F. (2012) *Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update*. *Mol. Genet. Metab.*, **106**, 330–344.
- Patterson, M.C., Mengel, E., Wijburg, F.A., Muller, A., Schwierin, B., Drevon, H., Vanier, M.T. & Pineda, M. (2013) *Disease and patient characteristics in NP-C patients: findings from an international disease registry*. *Orphanet J Rare Dis*, **8**, 12.
- Peake, K.B. & Vance, J.E. (2012) *Normalization of cholesterol homeostasis by 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in neurons and glia from Niemann-Pick C1 (NPC1)-deficient mice*. *J. Biol. Chem.*, **287**, 9290–9298.
- Pennartz, S., Belvindrah, R., Tomiuk, S., Zimmer, C., Hofmann, K., Conradt, M., Bosio, A. & Cremer, H. (2004) *Purification of neuronal precursors from the adult mouse brain: comprehensive gene expression analysis provides new insights into the control of cell migration, differentiation, and homeostasis*. *Mol. Cell. Neurosci.*, **25**, 692–706.
- Pentchev, P.G., Gal, A.E., Booth, A.D., Omodeo-Sale, F., Fouks, 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*, **619**, 669–679.
- Pentchev, P.G., Kruth, H.S., Comly, M.E., Butler, J.D., Vanier, M.T., Wenger, D.A. & Patel, S. (1986) *Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein-derived cholesterol in cultured fibroblasts*. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16775–16780.
- Pfrieger, F.W. & Ungerer, N. (2011) *Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes*. *Prog. Lipid Res.*, **50**, 357–371.
- Pineda, M., Wraith, J.E., Mengel, E., Sedel, F., Hwu, W.-L., Rohrbach, M., Bembi, B., Walterfang, M., Korenke, G.C., Marquardt, T., Luzy, C., Giorgino, R. & Patterson, M.C. (2009) *Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study*. *Mol. Genet. Metab.*, **98**, 243–249.
- Pipalia, N.H., Cosner, C.C., Huang, A., Chatterjee, A., Bourbon, P., Farley, N., Helquist, P., Wiest, O. & Maxfield, F.R. (2011) *Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 5620–5625.

REFERENZEN

---

- Porter, F.D., Scherrer, D.E., Lanier, M.H., Langmade, S.J., Molugu, V., Gale, S.E., Olzeski, D., Sidhu, R., Dietzen, D.J., Fu, R., Wassif, C.A., Yanjanin, N.M., Marso, S.P., House, J., Vite, C., Schaffer, J.E. & Ory, D.S. (2010) *Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease*. *Sci Transl Med*, **2**, 56ra81.
- Pressey, Sarah N R, Smith, D.A., Wong, Andrew 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**, 1086–1100.
- Quan, G., Xie, C., Dietschy, J.M. & Turley, S.D. (2003) *Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse*. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **146**, 87–98.
- 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**, 582–591.
- Reitz, C. & Mayeux, R. (2014) *Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers*. *Biochem. Pharmacol.*, **88**, 640–651.
- Rodin, S., Domogatskaya, A., Ström, S., Hansson, E.M., Chien, K.R., Inzunza, J., Hovatta, O. & Tryggvason, K. (2010) *Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511*. *Nat Biotechnol*, **28**, 611–615.
- Rodrigues, A.F., Gray, R.G., Preece, M.A., Brown, R., Hill, F.G., Baumann, U. & McKiernan, P.J. (2006) *The usefulness of bone marrow aspiration in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C in infantile liver disease*. *Arch. Dis. Child.*, **91**, 841–844.
- Rodríguez-Pascual, 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*. *JIMD Rep*, **4**, 29–37.
- Sarna, J.R., Larouche, M., Marzban, H., Sillitoe, R.V., Rancourt, D.E. & Hawkes, R. (2003) *Patterned Purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease*. *J. Comp. Neurol.*, **456**, 279–291.
- Schwend, T., Loucks, E.J., Snyder, D. & Ahlgren, S.C. (2011) *Requirement of Npc1 and availability of cholesterol for early embryonic cell movements in zebrafish*. *J. Lipid Res.*, **52**, 1328–1344.
- Seibler, P., Graziotto, J., Jeong, H., Simunovic, F., Klein, C. & Krainc, D. (2011) *Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells*. *J. Neurosci.*, **31**, 5970–5976.
- Sheridan, S.D., Surampudi, V. & Rao, R.R. (2012) *Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency*. *Stem Cells Int*, **2012**, 738910.

REFERENZEN

---

- Simons, K. & Vaz, Winchil L C (2004) *Model systems, lipid rafts, and cell membranes*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 269–295.
- 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. U.S.A.*, **101**, 5886–5891.
- Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., Thomas, Nick S T, Abeysinghe, S., Krawczak, M. & Cooper, D.N. (2003) *Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update*. *Hum. Mutat.*, **21**, 577–581.
- Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Möbius, W., Weiss, S., Feussner, I., Simons, M. & Schneider, A. (2010) *Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease*. *J. Biol. Chem.*, **285**, 26279–26288.
- Sun, Y., Pollard, S., Conti, L., Toselli, M., Biella, G., Parkin, G., Willatt, L., Falk, A., Cattaneo, E. & Smith, A. (2008) *Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture*. *Mol. Cell. Neurosci.*, **38**, 245–258.
- Surmeier, D.J. & Sulzer, D. (2013) *The pathology roadmap in Parkinson disease*. *Prion*, **7**, 85–91.
- Suzuki, K., Parker, C.C., Pentchev, P.G., Katz, D., Ghetti, B., D'Agostino, A.N. & Carstea, E.D. (1995) *Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C*. *Acta Neuropathol.*, **89**, 227–238.
- Swaroop, M., Thorne, N., Rao, M.S., Austin, C.P., McKew, J.C. & Zheng, W. (2012) *Evaluation of cholesterol reduction activity of methyl- $\beta$ -cyclodextrin using differentiated human neurons and astrocytes*. *J Biomol Screen*, **17**, 1243–1251.
- Sym, M., Basson, M. & Johnson, C. (2000) *A model for niemann-pick type C disease in the nematode Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, **10**, 527–530.
- Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsell-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M. & Montgomery, K.D. (2011) *Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells*. *Nat. Biotechnol.*, **29**, 313–314.
- 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.
- 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.
- Tängemo, C., Weber, D., Theiss, S., Mengel, E. & Runz, H. (2011) *Niemann-Pick Type C disease: characterizing lipid levels in patients with variant lysosomal cholesterol storage*. *J. Lipid Res.*, **52**, 813–825.

REFERENZEN

---

- Tashiro, Y., Yamazaki, T., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y. & Okamoto, K. (2004) *Axon-dominant localization of cell-surface cholesterol in cultured hippocampal neurons and its disappearance in Niemann-Pick type C model cells*. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2015–2021.
- Te Vruchte, D., Speak, A.O., Wallom, K.L., Al Eisa, N., Smith, D.A., Hendriksz, C.J., Simmons, L., Lachmann, R.H., Cousins, A., Hartung, R., Mengel, E., Runz, H., Beck, M., Amraoui, Y., Imrie, J., Jacklin, E., Riddick, K., Yanjanin, N.M., Wassif, C.A., Rolfs, A., Rimmele, F., Wright, N., Taylor, C., Ramaswami, U., Cox, T.M., Hastings, C., Jiang, X., Sidhu, R., Ory, D.S., Arias, B., Jeyakumar, M., Sillence, D.J., Wraith, J.E., Porter, F.D., Cortina-Borja, M. & Platt, F.M. (2014) *Relative acidic compartment volume as a lysosomal storage disorder-associated biomarker*. *J. Clin. Invest.*, **124**, 1320–1328.
- Thomson, J.A. (1998) *Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts*. *Science*, **282**, 1145–1147.
- 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.
- Vanier, M.T. (1983) *Biochemical studies in Niemann-Pick disease. I. Major sphingolipids of liver and spleen*. *Biochim. Biophys. Acta*, **750**, 178–184.
- Vanier, M.T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Gazzah, N., Juge, M.C., Pentchev, P.G., Revol, A. & Louisot, P. (1991) *Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1096**, 328–337.
- Vanier, M.T. (1999) *Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature*. *Neurochem. Res.*, **24**, 481–489.
- Vanier, M.T. (2010) *Niemann-Pick disease type C*. *Orphanet J Rare Dis*, **5**, 16.
- Walkley, S.U. & Suzuki, K. (2004) *Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1685**, 48–62.
- 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**, 141–152.
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S.-i., Muguruma, K. & Sasai, Y. (2007) *A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells*. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 681–686.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Glick, J.M., Patel, S., Neufeld, E.B., Brady, R.O., Pentchev, P.G. & Strauss, J.F. (1999) *Niemann-Pick C1 protein: obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 805–810.

REFERENZEN

---

- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E. & Jaenisch, R. (2007) *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. *Nature*, **448**, 318–324.
- Wraith, J.E., Sedel, F., Pineda, M., Wijburg, F.A., Hendriksz, C.J., Fahey, M., Walterfang, M., Patterson, M.C., Chadha-Boreham, H. & Kolb, S.A. (2014) *Niemann-Pick type C Suspicion Index tool: analyses by age and association of manifestations*. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **37**, 93–101.
- Xu, M., Liu, K., Swaroop, M., Porter, F.D., Sidhu, R., Firnkes, S., 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.
- Xu, S., Zhou, S., Xia, D., Xia, J., Chen, G., Duan, S. & Luo, J. (2010) *Defects of synaptic vesicle turnover at excitatory and inhibitory synapses in Niemann-Pick C1-deficient neurons*. *Neuroscience*, **167**, 608–620.
- Xu, S., Chen, X., Wei, X., Liu, G. & Wang, Q. (2011) *Presynaptic impairment in Niemann-Pick C1-deficient neurons: not dependent on presence of glial cells*. *Neurosci. Lett.*, **496**, 54–59.
- Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Okano, H. & Suzuki, N. (2012) *Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells*. *Rinsho Shinkeigaku*, **52**, 1134–1136.
- Yamasaki, S., Taguchi, Y., Shimamoto, A., Mukasa, H., Tahara, H. & Okamoto, T. (2014) *Generation of human induced pluripotent stem (ips) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF-B1 regulation of pluripotency*. *PLoS ONE*, **9**, e87151.
- Yan, X., Lukas, J., Witt, M., Wree, A., Hübner, R., Frech, M., Köhling, R., Rolfs, A. & Luo, J. (2011) *Decreased expression of myelin gene regulatory factor in Niemann-Pick type C1 mouse*. *Metab Brain Dis*, **26**, 299–306.
- Yan, X., Lukas, J., Lin, J., Ernst, M., Koczan, D., Witt, M., Fuellen, G., Wree, A., Rolfs, A. & Luo, J. (2014a) *Aberrant expressions of delta-protocadherins in the brain of Npc1 mutant mice*. *Histol. Histopathol.* Epub ahead of print.
- Yan, X., Yang, F., Lukas, J., Witt, M., Wree, A., Rolfs, A. & Luo, J. (2014b) *Hyperactive glial cells contribute to axonal pathologies in the spinal cord of Npc1 mutant mice*. *Glia*, **62**, 1024–1040.
- Yu, D.X., Di Giorgio, Francesco Paolo, Yao, J., Marchetto, M.C., Brennand, K., Wright, R., Mei, A., McHenry, L., Lisuk, D., Grasmick, J.M., Silberman, P., Silberman, G., Jappelli, R. & Gage, F.H. (2014) *Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells*. *Stem Cell Reports*, **2**, 295–310.

REFERENZEN

---

- Yu, T., Chung, C., Shen, D., Xu, H. & Lieberman, A.P. (2012) *Ryanodine receptor antagonists adapt NPC1 proteostasis to ameliorate lipid storage in Niemann-Pick type C disease fibroblasts*. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 3205–3214.
- 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.
- Yuan, S.H., Martin, J., Elia, J., Flippin, J., Paramban, R.I., Hefferan, M.P., Vidal, J.G., Mu, Y., Killian, R.L., Israel, M.A., Emre, N., Marsala, S., Marsala, M., Gage, F.H., Goldstein, Lawrence S B & Carson, C.T. (2011) *Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells*. *PLoS ONE*, **6**, e17540.
- Zampieri, S., Mellon, S.H., Butters, T.D., Nevyjel, M., Covey, D.F., Bembi, B. & Dardis, A. (2009) *Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone*. *J. Cell. Mol. Med.*, **13**, 3786–3796.
- Zervas, M., Dobrenis, K. & Walkley, S.U. (2001) *Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **60**, 49–64.
- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., Shi, Y. & Deng, H. (2009) *Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells*. *Cell Res.*, **19**, 429–438.
- Zhang, D., Pekkanen-Mattila, M., Shahsavani, M., Falk, A., Teixeira, A.I. & Herland, A. (2014) *A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of P21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons*. *Biomaterials*, **35**, 1420–1428.
- Zhang, M., Dwyer, N.K., Love, D.C., Cooney, A., Comly, M., Neufeld, E., Pentchev, P.G., Blanchette-Mackie, E.J. & Hanover, J.A. (2001) *Cessation of rapid late endosomal tubulovesicular trafficking in Niemann-Pick type C1 disease*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 4466–4471.
- Zhang, M., Sun, M., Dwyer, N.K., Comly, M.E., Patel, S.C., Sundaram, R., Hanover, J.A. & Blanchette-Mackie, E.J. (2003) *Differential trafficking of the Niemann-Pick C1 and 2 proteins highlights distinct roles in late endocytic lipid trafficking*. *Acta Paediatr Suppl*, **92**, 63-73; discussion 45.
- Zhao, W.-N., Cheng, C., Theriault, K.M., Sheridan, S.D., Tsai, L.-H. & Haggarty, S.J. (2012) *A high-throughput screen for Wnt/β-catenin signaling pathway modulators in human iPSC-derived neural progenitors*. *J Biomol Screen*, **17**, 1252–1263.
- Zhou, S., Davidson, C., McGlynn, R., Stephney, G., Dobrenis, K., Vanier, M.T. & Walkley, S.U. (2011) *Endosomal/lysosomal processing of gangliosides affects neuronal cholesterol sequestration in Niemann-Pick disease type C*. *Am. J. Pathol.*, **179**, 890–902.

## 8 Abkürzungen

*/**/**	statistisch signifikanter Unterschied $p \leq 0,05/0,01/0,001$
°C	Grad Celsius
µ	Mikro ( $10^{-6}$ )
A	Ampere
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti ( $10^{-2}$ )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
EB	(englisch) Embryoid Body
et al.	(lateinisch (et alii)) und andere
FKS	fetales Kälberserum
h	Stunde
iPS	induzierte pluripotente Stammzell/e/n
K <sup>+</sup>	Kalium
l	Liter
LDL	(englisch) Low Density Lipoprotein
min	Minute
m	Meter
m	Milli ( $10^{-3}$ )
MAS	multipotente adulte Stammzell/e/n
n	Gruppengröße
n	Nano ( $10^{-9}$ )
Na <sup>+</sup>	Natrium
NDZ	neuronal differenzierte Zell/e/n
NPC1	Niemann-Pick Typ C1
NPZ	neurale Progenitorzell/e/n
p	Piko ( $10^{-12}$ )
p	Signifikanzwert
PBS +/+	PBS mit Kalzium und Magnesium
PBS -/-	PBS ohne Kalzium und Magnesium
Pen/Strep	Penizillin/Streptomycin
pH	(lateinisch (potentia Hydrogenii)) negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
shRNA	(englisch) small hairpin RNA
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
xg	Zentrifugalkraft
z. B.	zum Beispiel

## 9 Anhang

**Tab. A.1: Zellkulturmedien und Zusätze**

Medien und Zusätze	Bestell- nummer	Firma	Firmsitz
Accutase	07920	Stemcell Technologies	FR-Grenoble
Ampicillin-Natriumsalz [100 mg/ml, gelöst in Reinstwasser]	K029.2	Roth	DE-Karlsruhe
Benzonase	1.01654.0001	Merck	DE-Darmstadt
B-27 serumfreies Supplement (50x)	17504-044	Gibco	DE-Darmstadt
Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Hybri-MAX	D2650	Sigma	DE-Seelze
Dispase 5mg/ml (in Hanks' Balanced Salt Solution) [1 mg/ml, in DMEM/F-12]	07913	Stemcell Technologies	FR-Grenoble
DMEM (1X) + GlutaMAX-I (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	31966-021	Gibco	DE-Darmstadt
DMEM/F-12 (1:1) (1X) (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (HAM))	21331-020	Gibco	DE-Darmstadt
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), human rekombinant [gelöst in 10 mM Essigsäure in Reinstwasser, 0,1 % HSA]	AF-100-15	Peprotech	DE-Hamburg
Essigsäure	A6283-100ML	Sigma	DE-Seelze
fetales Kälberserum	10106-169	Gibco	DE-Darmstadt
FGF2 (Fibroblastenwachstumsfaktor), human rekombinant [10 µg/ml, gelöst in PBS -/-, 0,1 % HSA]	GSR-2001	Amsbio	UK-Abingdon
Fugene9	06365787001	Roche	DE-Mannheim
Gelatine aus der Schweinehaut Typ A [0,1 %, gelöst in Reinstwasser]	G1890-100G	Sigma	DE-Seelze
GlutaMAX (100X)	35050-038	Gibco	DE-Darmstadt
HBSS (1X) (Hanks' Balanced Salt Solution)	14170-088	Gibco	DE-Darmstadt

ANHANG

Medien und Zusätze	Bestell- nummer	Firma	Firmensitz
HSA (Humanes Albumin „Behring“) 20 %	E0044411F	CSL Behring GmbH	DE-Marburg
Isopropanol (2-Propanol)	WAL11609 1000	Walter CMP GmbH	DE-Kiel
Knockout DMEM	10829-018	Gibco	DE-Darmstadt
Knockout Serum Replacement	10828028	Invitrogen	DE-Darmstadt
Laminin I (mouse) 1 mg/ml [10 µg/ml, in eiskaltem DMEM/F- 12]	3400-010-01	Trevigen	US- Gaithersburg
LB-Agar (Luria/Miller)	X969.3	Roth	DE-Karlsruhe
LB-Medium (Luria/Miller)	X968.3	Roth	DE-Karlsruhe
LDL (Low Density Lipoprotein) aus humanem Plasma	L 7914	Sigma	DE-Seelze
Matrigel	354277	Corning	NL- Amsterdam
MEM NEAA (100X) (Minimum Essential Medium Non- Essential Amino Acids)	11140-035	Gibco	DE-Darmstadt
2-Mercaptoethanol	21985-023	Gibco	DE-Darmstadt
mFreSR	05854	Stemcell Technologies	FR-Grenoble
mTESR1 Komplettmedium	05850	Stemcell Technologies	FR-Grenoble
PBS Dulbecco ohne Kalzium und Magnesium (PBS -/-)	L 1825	Biochrom	DE-Berlin
PBS Dulbecco mit Kalzium und Magnesium (PBS +/+)	L 1815	Biochrom	DE-Berlin
Penizillin/Streptomycin 10000U/ml / 10000 µg/ml	A2213	Biochrom	DE-Berlin
PLO (Poly-L-Ornithin- Hydrobromid) [15 mg/ml, gelöst in Reinstwasser]	P3655-50MG	Sigma	DE-Seelze
Protaminsulfatsalz [500 µg/ml, gelöst in Reinstwasser]	P4020-1G	Sigma	DE-Seelze
0,05 % Trypsin-EDTA (1X)	25300-054	Gibco	DE-Darmstadt
0,25 % Trypsin-EDTA (1X)	25200-056	Gibco	DE-Darmstadt
Trypsininhibitor [0,55 mg/ml, gelöst in DMEM/F-12]	T6522-25MG	Sigma	DE-Seelze

ANHANG

Medien und Zusätze	Bestell- nummer	Firma	Firmensitz
Valproinsäure-Natriumsalz [25 µg/ml, gelöst in Reinstwasser]	P4543-10G	Sigma	DE-Seelze
Y27632, 2 mg [10 mM, gelöst in PBS -/-]	130-095-563	Miltenyi Biotec	DE-Bergisch Gladbach

Tab. A.2: verwendete Plasmide

Plasmid	Insert	Backbone	Bestellnummer	Firma	Firmensitz
c-MYC	1858	MSCV IRES GFP	Plasmid 18119	Addgene	US- Cambridge
gag/pol	unbekannt	MSCV	Plasmid 14887		
KLF4	1413	pMIG	Plasmid 17227		
OCT4	1083	pMIG	Plasmid 17225		
SOX2	954	pMIG	Plasmid 17226		
VSV-G	6363	pCMV	Plasmid 8454		

Tab. A.3: Bakterien und Tiere

Bakterien und Tiere	Stamm	Bestellnummer	Firma	Firmensitz
<i>Escherichia coli</i>	JM109	T3005	Zymo Research	US-Irvine
Immundefiziente Mäuse, weiblich, 8 Wochen alt	SHO	474	Charles River	DE-Köln

Tab. A.4: Pulver und Lösungen zum Färben und für Analysen

Lösungen zum Färben und für Analysen	Bestell- nummer	Firma	Firmensitz
BSA (Albumin Fraktion V) [10 %, gelöst in PBS -/-]	8076.4	Roth	DE-Karlsruhe
Carbogen	-	Airliquid	DE-Düsseldorf
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]-oktan)	D27802-500G	Sigma	DE-Seelze

ANHANG

<b>Lösungen zum Färben und für Analysen</b>	<b>Bestell-nummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenyl-indole) [250 ng/ml, gelöst in PBS -/-]	D1306	Life Technologies	DE-Darmstadt
EGTA (Ethyleneglycol-bis(amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	E4378	Sigma	DE-Seelze
Eindeckmedium CV-Mount	14046430011	Leica	DE-Nussloch
Eosin-Y	3800	J. T. Baker	NL-Deventer
Ethanol	-	Zentral-apotheke	DE-Rostock
Formafix 4 %	F10010G	Walter CMP	DE-Kiel
Filipin [50 mg/ml, gelöst in DMSO]	08707	Polyscience Europe GmbH	DE-Eppelheim
Glukose-Monohydrat	1.08342.1000	Merck	DE-Darmstadt
Glycerol	1.04094.2500	Merck	DE-Darmstadt
Hämatoxylin MAYER	41-5131-00	Medite	DE-Burgdorf
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	H3375	Sigma	DE-Seelze
Kaliumchlorid	1.04936.1000	Merck	DE-Darmstadt
Kaliumhydroxidlösung	1.09918	Merck	DE-Darmstadt
Kalziumchlorid-Dihydrat	1.02392.0500	Merck	DE-Darmstadt
Magnesium-ATP	A9187	Sigma	DE-Seelze
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	63068-250G	Fluka	DE-Seelze
Methanol	4627.2	Roth	DE-Karlsruhe
Mowiol 4-88	81381-250G	Sigma	DE-Seelze
Natriumazid [2 %, gelöst in PBS -/-]	1.06688.0100	VWR	DE-Hannover
Natriumchlorid	3957.2	Roth	DE-Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	1.06346.1000	Merck	DE-Darmstadt
Natriumhydrogenkarbonat	1.06329.1000	Merck	DE-Darmstadt
NBT/BCIP	11681451001	Roche	DE-Mannheim
Normales Ziegenserum	X0907	Dako	DE-Hamburg

ANHANG

<b>Lösungen zum Färben und für Analysen</b>	<b>Bestell-nummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
PFA (Paraformaldehyd) [4 %, gelöst in PBS -/-]	16005-1KG-R	Sigma	DE-Seelze
Salzsäure	K025.1	Roth	DE-Karlsruhe
Saponin [0,5 %, gelöst in PBS -/-]	558255-100GM	Merck	DE-Darmstadt
SDS, ultra pure [20 %, gelöst in Reinstwasser]	2326.1	Roth	DE-Karlsruhe
TRIS	4855.2	Roth	DE-Karlsruhe
TRIS-hydrochlorid	9090.3	Roth	DE-Karlsruhe
Triton-X-100	37240.01	Serva	DE-Heidelberg
Tween 20	37470.01	Serva	DE-Heidelberg
Waschlösung für PSA-NCAM-Sortierung	130-091-221	Miltenyi Biotec	DE-Bergisch Gladbach
Xylol	9713.3	Roth	DE-Karlsruhe

Tab. A.5: Antikörper und die eingesetzte Verdünnung

<b>Antikörper</b>	<b>Bestell-num-mer</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>	<b>Verdünnung</b>
Alexa Fluor 488 (Ziege gegen Maus IgG)	A11029	Molecular Probes	DE-Darmstadt	1:500 bzw. 1:1000 (FACS)
Alexa Fluor 488 (Ziege gegen Maus IgM)	A21042	Molecular Probes	DE-Darmstadt	1:500
Alexa Fluor 488 (Ziege gegen Ratten IgM)	A21212	Molecular Probes	DE-Darmstadt	1:500
Alexa Fluor 568 (Ziege gegen Kaninchen IgG)	A11036	Molecular Probes	DE-Darmstadt	1:500
Alexa Fluor 568 (Ziege gegen Maus IgM)	A21043	Molecular Probes	DE-Darmstadt	1:500
Alexa Fluor 647 (Ziege gegen Kaninchen IgG)	A21245	Molecular Probes	DE-Darmstadt	1:1000 (FACS)
alpha-Fetoprotein (Maus IgG, monoklonal)	A8452	Sigma	DE-Hamburg	1:500
alpha-Tubulin (Maus IgG, monoklonal)	T5168-.2ML	Sigma	DE-Hamburg	1:2000

ANHANG

Antikörper	Bestell-num-mer	Firma	Firmensitz	Verdünnung
beta III-Tubulin (Kaninchen IgG, polyklonal)	ab18207	Abcam	UK-Cambridge	1:100
beta-III-Tubulin (Maus IgG, monoklonal)	sc-51670	Santa Cruz	DE-Heidelberg	1:100
GFAP (Gliales Fibrilläres Saures Protein, Kaninchen Ig, polyklonal)	Z0334	Dako	DE-Hamburg	1:500
GM2	Ge-schenk	Dr. K. Dobrenis	US-New York	1:10
HuC/D (Maus IgG, monoklonal)	A21271	Invitrogen	DE-Darmstadt	1:100
Ki67 (Kaninchen IgG, polyklonal)	sc15402	Santa Cruz	DE-Heidelberg	1:100
LAMP2 (Maus IgG, monoklonal)	ab25631	Abcam	UK-Cambridge	1:100
MAP2ab (Mikrotubuli assoziiertes Protein 2a und b, Maus IgG, monoklonal)	MAB378	Millipore	DE-Darmstadt	1:100
MAP2 (Mikrotubuli assoziiertes Protein 2, Kaninchen IgG, polyklonal)	AB5622	Millipore	DE-Darmstadt	1:500
Muskelaktin (Maus IgG, monoklonal)	M0635	Dako	DE-Hamburg	1:50
Nanog (Kaninchen IgG, polyklonal)	09-0020	Stemgent	US-Cambridge	1:100
Nestin (Maus IgG, monoklonal)	MAB1259	R&D	US-Minneapolis	1:50
Oct4 (Kaninchen IgG, polyklonal)	09-0023	Stemgent	US-Cambridge	1:100
Pax6 (Kaninchen IgG, polyklonal)	ab5790	Abcam	UK-Cambridge	1:200
S100 (Kaninchen IgG, polyklonal)	Z0311	Dako	DE-Hamburg	1:500

ANHANG

Antikörper	Bestell-nummer	Firma	Firmensitz	Verdünnung
Sox2 (Kaninchen IgG, monoklonal)	ab9249 4	Abcam	UK-Cambridge	1:100
SSEA3 (Ratte IgM, monoklonal)	09-0014	Stemgent	US-Cambridge	1:100
SSEA4 (Maus IgG, monoklonal)	09-0006	Stemgent	US-Cambridge	1:100
Synaptophysin (Maus IgG, monoklonal)	S5768	Sigma	DE-Hamburg	1:100
Tra-1-60 (Maus IgM, monoklonal)	09-0010	Stemgent	US-Cambridge	1:100
Tra-1-81 (Maus IgM, monoklonal)	09-0011	Stemgent	US-Cambridge	1:100

Tab. A.6: Kits und Partikel

Kits und Partikel	Anwendung	Bestell-nummer	Firma	Firmensitz
Amplex Red Cholesterol Assay	Bestimmung der Cholesterol-menge	A12216	Life Technologies	DE-Darmstadt
Endofree Plasmid Maxi Kit	DNA-Isolierung aus Bakterien	12362	Qiagen	DE-Hilden
Pierce BCA Protein Assay	Bestimmung der Proteinmenge	23225	Pierce	US-Rockford
Blockingreagenz für Mikropartikel	Vorbereitung auf Selektion neuraler Zellen	130-059-901	Miltenyi Biotec	DE-Bergisch Gladbach
Anti-PSA-NCAM magnetische Partikel	Selektion neuraler Zellen	130-092-966	Miltenyi Biotec	DE-Bergisch Gladbach

Tab. A.7: Software

Software	Zweck	Firma	Firmensitz
BZ image analysis application	Bildanalysen am Keyenzemikroskop	Keyence	JP-Osaka
BZ observation application	Bildaufnahmen am Keyenzemikroskop	Keyence	JP-Osaka
CellQuest Pro	FACS Messung und Auswertung	BD	DE-Heidelberg

ANHANG

Software	Zweck	Firma	Firmensitz
Corel Draw 11.633	Erstellung von Abbildungen	Corel	CA-Ottawa
Magellan 6.6	Messungen mit Plattenleser und Auswertung	Tecan	CH-Männedorf
MiniAnalysis 6.07	Auswertung elektrophysiologischer Messungen	Synapto-soft	US-Decatur
NIS-Elements F 2.20	Bildaufnahmen am Nikonmikroskop	Nikon	JP-Tokio
Prism 5.04	Erstellen von Diagrammen sowie statistische Analysen	Graph Pad	US-La Jolla
Pulse/Pulse-Fit v.8.80	Auswertung elektrophysiologischer Messungen	HEKA	DE-Lambrecht

Tab. A.8: Geräte

Gerätbezeichnung	Typ	Hersteller	Firmensitz
CASY (System zur Zellzählung)	TT 150 µm	Innovatis	CH-Rotkreuz
Dampfsterilisator	300	Varioklav	DE-Oberschleißheim
Display	SM-1, SM-5	Luigs und Neumann Feinmechanik & Elektrotechnik GmbH	DE-Ratingen
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD	DE-Heidelberg
Elektrodenhalter	EPC10	HEKA	DE-Lambrecht
Flockeneisbereiter	AF-80	Scotsman	IT-Mailand
Gefrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Scientific	DE-Schwerte
Gefrierschrank -20 °C	Comfort	Liebherr	DE-Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C	Profiline	National Lab	DE-Mölln
Geschirrspüler	G7883	Miele Professional	DE-Gütersloh
Gewebeprozessierer	TP1020	Leica	DE-Wetzlar
Hitzesterilisator	T6	Heraeus	DE-Hanau

ANHANG

Gerätbezeichnung	Typ	Hersteller	Firmensitz
Inkubator	CB.150	Binder	DE-Tuttlingen
Inkubator	Revco	Thermo Fisher Scientific	DE-Schwerte
Inkubator	RMI 3000S-9-V	Thermo Fisher Scientific	DE-Schwerte
Inkubator	T6	Heraeus	DE-Hanau
IVF Workstation	L224	K Systems	DK-Birkerød
Kontroller	SM-1, SM-5	Luigs und Neumann Feinmechanik & Elektrotechnik GmbH	DE-Ratingen
Kühlplatte	EG1150C	Leica	DE-Wetzlar
Kühlschrank	Comfort	Siemens	DE-München
Magnetrührer mit integrierter Heizplatte	MSH-20A	iDL	DE-Nidderau
Minigasbrenner	GB-2001	Blazer	US-Farmingdale
Mikroskop	Axioskop2 FS mot	Carl Zeiss AG	DE-Göttingen
Mikroskop	Biozero 8000	Keyence	JP-Osaka
Mikroskop	Eclipse TS100	Nikon	JP-Tokio
Mikrotom	RM2265	Leica	DE-Wetzlar
Minishaker	MS2	IKA	DE-Staufsen
Paraffineinbettmodul	EG1150H	Leica	DE-Wetzlar
Paraffinstreckbad	25900	Medax	DE-Neumünster
Patch-Clamp-Verstärker	EPC10	HEKA	DE-Lambrecht
Patchelektrodenabzieher	DMZ-Puller	Zeitz Instruments GmbH	DE-Martinsried
pH Meter	Seven Easy	Mettler Toledo	DE-Gießen
Photometer	Ultrospec 3100 PRO	Amersham Biosciences	DE-Freiburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte	DE-Eberstadt
Plattenleser	GENios	Tecan	CH-Männedorf
Pumpe	PM20405-86	VWR	DE-Darmstadt

ANHANG

Gerätbezeichnung	Typ	Hersteller	Firmensitz
Reinstwasser-aufbereitungsanlage	81.103	TKA	DE-Niederelbert
Schüttler	KH2/500	Noctua	AT-Wien
Schüttler	Titramax 100	Heidolph	DE-Schwabach
Stickstofftank	RS Series 1575	Taylor Wharton	DE-Mildstedt
Thermoshaker	PST-60HL-4	Lab4you GmbH	AT-Wien
Trockenschrank	ED115	Binder	DE-Tuttlingen
Waage	AX224	Sartorius	DE-Göttingen
Wasserbad	AL12	Lauda	DE-Lauda-Königshofen
Wärmehaube	IH-50	Noctua	AT-Wien
Wärmeschrank	Ecocell	MMM	DE-Planegg
Zentrifuge	Z233 MK2	Hermle Labortechnik	DE-Wehingen
Zentrifuge	Z383K	Hermle Labortechnik	DE-Wehingen
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckman Coulter	DE-Krefeld

Tab. A.9: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bestell-nummer	Firma	Firmensitz
Deckgläser	1173003	Krumpholz	DE-Selters
Filter 0,2 µm	1902520	Nunc	DE-Schwerte
Filter 0,45 µm	16555 K	Sartorius	DE-Göttingen
Glaskapillaren	GB 150 F-10	Science Products	DE-Hofheim
Glaspasteurpipetten	FB50253	Fisher Scientific	DE-Schwerte
Injecti onsnadel 27G	4657705	Braun	DE-Melsungen
Kryovials	72.380.007	Sarstedt	DE-Nümbrecht
Kulturflaschen T25	690175	Greiner Bio-One	DE-Frickenhausen
Kulturflaschen T75	690175	Greiner Bio-One	DE-Frickenhausen
Kulturplatten 4-well	176740	Nunc	DE-Schwerte
Kulturplatten 6-well	83.1839	Sarstedt	DE-Nümbrecht

ANHANG

Verbrauchsmaterialien	Bestell-nummer	Firma	Firmensitz
Kulturplatten 6-well mit sehr geringem Anhaftungspotential	27145	Stemcell Technologies	FR-Grenoble
Kulturplatten 12-well	665180	Greiner	DE-Frickenhausen
Kulturplatten 24-well	83.1836	Sarstedt	DE-Nümbrecht
Kulturplatten 48-well	677180	Greiner Bio-One	DE-Frickenhausen
Kulturplatten 96-well	655185	Greiner Bio-One	DE-Frickenhausen
Kulturschale 3,5 cm	83.1800	Sarstedt	DE-Nümbrecht
Kulturschale 6 cm	P93600	Biochrom	DE-Berlin
Kulturschale 10 cm	P93100	Biochrom	DE-Berlin
Objekträger	631-0367	VWR	DE-Hannover
Pipetten 5 ml	606180	Greiner Bio-One	DE-Frickenhausen
Pipetten 10 ml	607180	Greiner Bio-One	DE-Frickenhausen
Pipetten 25 ml	760180	Greiner Bio-One	DE-Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl	70.1130	Sarstedt	DE-Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µl	70.760.002	Sarstedt	DE-Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl	70.762	Sarstedt	DE-Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl mit extra großer Öffnung	HR-1000WS	Mettler Toledo	DE-Gießen
Reagiergefäß 1,5 ml	72.706	Sarstedt	DE-Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 ml	72.695.004	Sarstedt	DE-Nümbrecht
Spritze 1 ml	9166017V	Braun	DE-Melsungen
Zellschaber	P99003	Biochrom	DE-Berlin
Zentrifugenrörchen 15 ml	62.554.502	Sarstedt	DE-Nümbrecht
Zentrifugenrörchen 50 ml	62.547.254	Sarstedt	DE-Nümbrecht

---

DANKSAGUNG

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich die letzten Jahre auf diesem anstrengenden Weg begleitet und unterstützt haben.

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Rolfs bedanken, für die Bereitstellung meines Themas und für die Möglichkeit am Albrecht-Kossel-Institut zu promovieren.

Im Zuge dessen möchte ich natürlich auch der Firma Centogene für die Zurverfügungstellung der Zelllinie danken. Des Weiteren danke ich Prof. Junghanß und Saskia Krohn für die Erstellung der Karyogramme, Dr. Philip Seibler für die fachliche Unterstützung sowie Dr. Mix und seiner Abteilung für die Nutzung der Geräte.

Mein größter Dank gilt Dr. Moritz J. Frech, der mich betreut und in meiner Forschung ständig unterstützt hat, immer mit Rat und Ideen zur Seite stand, mich viel motiviert und aufgebaut hat und einfach immer da war, wenn man ein offenes Ohr brauchte.

Auch bei Dr. Stefanie Frech möchte ich mich für das rege Interesse an meiner Arbeit, die Unterstützung („No worries mate“) und Korrekturarbeiten bedanken.

Ihr seid beide sehr wichtig für mich gewesen auf diesem steinigen Weg!

Ellen Ewald, Norman Krüger und insbesondere meinem Lieblingslaboranten Sebastian Rost möchte ich für die Unterstützung und Zuarbeit während der drei pflegeintensiven Stammzelljahre danken. Ohne euch wäre es noch schwerer gewesen.

Natürlich dürfen auch alle ehemaligen und derzeitigen AKos-Mitarbeiter nicht fehlen, insbesondere Dr. Anne-Katrin Giese, Dr. Rayk Hübner und Carolin Mußmann. Danke euch für die weitergegebenen Methoden, vielen Tipps, Gespräche, lustigen Pausen und Kuchengelage.

Selbstverständlich gebührt auch großer Dank meinen Freunden Sani und Ralf, Tortie, Nici und Torsten, Arne und Jule, Doreen und Chrischi, Holger, Schrödi und Lars, Frieda, Susi und Schultzi sowie Mandy. Ich danke euch für die vielen Unterhaltungen, Ablenkungsmanöver, die beständige Unterstützung und vor allem das Verständnis. Ihr seid die Besten!

Und am Ende möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben, nämlich meinen Eltern Karin und Günter Trilck, meiner Schwester Andrea Schramm und meinem Freund Armin Winkler, für die Liebe, Geduld und Unterstützung sowie das Verständnis für wenig gemeinsame Freizeit, Besuche und Familienzeit danken. Ohne euch hätte ich das alles nicht schaffen können! Ich liebe euch.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

---

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Michaela Trilck, versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

„Generierung, Charakterisierung und neurale Differenzierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen – ein zelluläres Modell für Morbus Niemann-Pick Typ C1“

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt 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, 2014-07-01