

**Radialgliaähnliche Vorläuferzellen aus
pluripotenten Stammzellen:
ein stabiles Intermediat zur effizienten Generierung
humaner Oligodendrozyten**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Raphaela Gorris, geb. Lünskens

aus

Oberhausen

Bonn, 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. O. Brüstle
 2. Gutachter: Prof. Dr. D. O. Fürst
- Tag der Promotion: 07. Juni 2016
Erscheinungsjahr: 2017

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen	IV
Abbildungen	VI
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Pluripotente Stammzellen	1
1.1.1 Embryonale Stammzellen	1
1.1.2 Induziert pluripotente Stammzellen.....	3
1.2 Direkte Konversion	5
1.3 Leukodystrophien	6
Tiermodelle.....	7
1.4 Oligodendrozyten	8
1.4.1 Regionaler Ursprung der Oligodendrozyten.....	10
1.4.2 Transkriptionelle Kontrolle der Oligodendrozytenentwicklung	12
1.4.3 Regulatorische Signalwege während der Oligodendrozytenentwicklung	14
Notch.....	14
BMP.....	15
Wnt	16
SHH.....	16
microRNA	17
1.4.4 Oligodendrozytendifferenzierung <i>in vitro</i>	19
1.5 Ziel der Arbeit	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Hersteller.....	23
2.2 Geräte	23
2.3 Material	24
2.3.1 Verbrauchsmaterial	24
2.3.2 Chemikalien und Reagenzien	24
2.3.3 Kits	25
2.3.4 Zelllinien.....	25
2.3.5 Mausstämme	25
2.3.6 Primärantikörper	26
2.3.7 Sekundärantikörper.....	26
2.3.8 RNA	27
2.4 Oligonukleotide	27
2.4.1 RT-PCR.....	27
2.4.2 Quantitative PCR.....	29
2.5 Zellkultur.....	30
2.5.1 Medien	30
2.5.2 Reagenzien	31
2.5.3 Zellkultur-Stocklösungen.....	31
2.5.4 Beschichtungen von Zellkulturschalen.....	32
2.5.5 Gewinnung primärer embryonaler muriner Fibroblasten	32
2.5.6 Mitotische Inaktivierung primärer muriner Fibroblasten.....	33
2.5.7 Präparation primärer Astrozyten.....	33
2.5.8 Kultur humaner embryonaler und humaner induziert pluripotenter Stammzellen.....	34
2.5.9 Kultur der neuralen Stammzellen.....	35
2.5.10 Differenzierungsprotokolle.....	35
Neurale Differenzierung.....	35

Neuronale Differenzierung	36
Astrogliale Differenzierung	36
Oligodendrogliale Differenzierung	36
2.5.11 Durchflusszytometrie	37
2.5.12 Elektrophysiologie	37
2.6 Molekularbiologie	38
2.6.1 Puffer und Lösungen	38
2.6.2 Immunzytochemie	38
2.6.3 Immunhistochemie	39
2.6.4 Isolation von RNA	39
Gesamt-RNA	39
MicroRNA	39
2.6.5 Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion	40
2.6.6 Quantitative Echtzeit-PCR	40
mRNA	41
microRNA	41
2.6.7 Genomweite Expressionsanalyse	42
2.7 Tiere, Transplantationen und Gewebeprozessierung	42
2.7.1 Generierung immundefizienter Shiverer-Mäuse	42
Genotypisierung der Shiverer-Mäuse	42
Identifikation homozygoter rag2 ^{-/-} Mäuse	44
2.7.2 Transplantation und Gewebeaufarbeitung	44
3 Ergebnisse	45
3.1 CD133-positive neurale Vorläuferzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen	46
3.2 Charakterisierung der RGL-NPC	47
3.2.1 RGL-NPC exprimieren Marker neuraler Stammzellen und Radialglia	49
3.2.2 RGL-NPC zeigen ein stabiles Wachstumsverhalten	52
3.2.3 Bestimmung der regionalen Identität der RGL-NPC entlang der anterior-posterior- sowie dorso-ventral-Achse	52
3.2.4 RGL-NPC exprimieren Marker früher und später NSC-Populationen	56
3.3 Differenzierungsverhalten der RGL-NPC	57
3.3.1 RGL-NPC differenzieren tripotent in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten	57
3.3.2 Neuronale Differenzierung	58
Neuronale Subtypen	59
Funktionelle Neurone aus RGL-NPC	62
3.3.3 Differenzierung oligodendroglialer Zellen aus RGL-NPC	63
RGL-NPC lassen sich <i>in vitro</i> effizient in Oligodendrozyten und ihre Vorläufer differenzieren	64
Das oligodendrogliale Differenzierungspotenzial der RGL-NPC bleibt während der Langzeitkultur stabil	67
Das oligodendrogliale Differenzierungsprotokoll lässt sich auf hiPSC-RGL-NPC übertragen ...	68
<i>In vivo</i> differenzieren RGL-NPC tripotent	69
RGL-NPC bilden myelinisierende Oligodendrozyten	71
Analyse des microRNA-Expressionsprofils während der oligodendroglialen Differenzierung	72
Einfluss von SHH auf die oligodendrogliale Differenzierung	74
3.3.4 RGL-NPC zeigen Selbsterneuerung und Tripotenz auf Einzelzellebene	78
4 Diskussion	79
RGL-NPC als Quelle humaner Oligodendrozyten	79
4.1 Generierung von multipotenten, radialgliaähnlichen Vorläuferzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen	80
Einfluss von Retinsäure auf die Generierung von RGL-NPC	80

Neurale Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen zu RGL-NPC unter dem Einfluss von EGF	82
Tripotentes Differenzierungsverhalten und Selbsterneuerung der RGL-NPC	83
RGL-NPC im Licht etablierter neuraler Stammzellpopulationen	84
4.2 RGL-NPC als direkte und robuste Quelle humaner Oligodendrozyten.....	87
Protokoll zur effizienten Generierung von Oligodendrozyten aus RGL-NPC	87
Oligodendrogliale Entwicklung der RGL-NPC	90
Kontrolle der Oligodendrozytendifferenzierung durch microRNA	93
Einfluss regulatorischer Signalwege auf die oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPC ..	95
4.3 RGL-NPC als Alternative zu etablierten oligodendroglialen	
Differenzierungsprotokollen für pluripotente Stammzellen?	99
4.4 Perspektiven.....	101
5 Literaturverzeichnis.....	103
6 Erklärung.....	125

Verwendete Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin	GLAST	Glutamat und Aspartat Transporter
AA	Ascorbinsäure (<i>ascorbic acid</i>)	GPM	Glykoprotein M
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>	HES	<i>hairy and enhancer of split</i>
ALDP	Adrenoleukodystrophieprotein	hESC	humane embryonale Stammzellen (<i>human embryonic stem cells</i>)
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose	HET	Haus für experimentelle Therapie
AP-Achse	anterior-posterior-Achse	HEY	<i>Hes-related with YRPM motif</i>
AQP	Aquaporin	hiPSC	humane induziert pluripotente Stammzellen (<i>human induced pluripotent stem cells</i>)
ASCL	<i>achaete-scute complex homolog</i>	hNuc	Humane Nuclei
ATP	Adenosintriphosphat	HOP	<i>homeodomain-only protein</i>
ATRA	Retinsäure (<i>all-trans retinoic acid</i>)	HOX	Homeobox
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>	hPSC	humane pluripotente Stammzellen (<i>human pluripotent stem cells</i>)
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>	ICM	innere Zellmasse (<i>inner cell mass</i>)
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>	Id	Inhibitor der Differenzierung
BLBP	<i>brain lipid binding protein</i>	Ig	Immunglobulin
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>	IRX	<i>iroquois homeobox</i>
BMPR	BMP Rezeptor	iN	induzierte Neurone
BSA	Rinderserum (<i>bovine serum albumine</i>)	iPSC	induziert pluripotente Stammzellen (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat	ISL	<i>Islet</i>
CASPR	Contactin-assoziiertes Protein	KLF	<i>Kruppel-like factor</i>
CCND	Cyclin D1	Ln	Laminin
cDNA	copy-DNA	lt-NES	<i>long-term neuroepithelial-like stem cell</i>
CNPase	2',3'-cyclische Nukleotid 3' Phosphodiesterase	mAB	monoklonaler Antikörper (<i>antibody</i>)
CSPG	Chondroitin Sulfat Proteoglykan	MAG	myelinassoziertes Glykoprotein
CXCR	Chemokin (C-X-C Motif) Rezeptor	MAL	<i>Myelin and lymphocyte protein</i>
DACH	Dachshundhomolog	MAP	mikrotubuliassoziertes Protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	MBP	Myelin basisches Protein
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	MD	myelindefizient
DEPC	Diethylpyrocarbonat	MEF	murine embryonale Fibroblasten
diff	differenzierte Zellen	mESC	murine embryonale Stammzellen (<i>mouse embryonic stem cells</i>)
D-MEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	MG	Matrigel
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid	miRNA	microRNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MLD	metachromatische Leukodystrophie
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
DV-Achse	dorso-ventral Achse	MNX	Motoneuron und Pancreas Homeobox
EB	Embryoidkörper (<i>embryoid body</i>)	MOBP	myelinassoziertes Oligodendrozyten-basisches Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MOG	Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	Mrf	<i>myelin gene regulatory factor</i>
EGFR	EGF Rezeptor	mRNA	<i>messenger RNA</i>
EMX	<i>empty spiracles homeobox</i>	MYT	myelinassoziierter Transkriptionsfaktor
EN1	<i>engrailed 1</i>	NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acids</i>)
ESC	embryonale Stammzellen (<i>embryonic stem cells</i>)	NF	Neurofilament
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)	NGS	Ziegen Serum (<i>normal goat serum</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)		
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2</i>		
FGFR	FGF Rezeptor		
FH	fetales Hirn		
FOX	<i>forkhead box protein</i>		
GABA	gamma-Aminobuttersäure		
GAD1	Glutamat Decarboxylase		
GalC	Galactocerebrosidase		
GBX	<i>gastrulation brain homeobox</i>		
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>		

Verwendete Abkürzungen

NHS	Pferdeserum (<i>normal horse serum</i>)	qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
NKX	NK-Homeobox	RA	Retinsäure (<i>retinoic acid</i>)
NPC	neurale Vorläuferzellen (<i>neural precursor cells</i>)	RFX	<i>regulatory factor X</i>
NSC	neurale Stammzellen (<i>neural stem cells</i>)	RGL-NPC	<i>radial glia-like NPC</i>
NSC ^{EGF/FGF}	späte neurale Vorläuferzellen	RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
OCT	Octamer	RM	Rückenmark
OL	Oligodendrozyten	RNA	Ribonukleinsäure
OLIG	<i>oligodendrocyte lineage transcription factor</i>	R-NSC	Rosetten-NSC
OPC	Oligodendrozyten- Vorläuferzellen (<i>oligodendrocyte progenitor cells</i>)	ROCK	Rho-Kinase
Orf	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)	RT	Raumtemperatur
OTX	<i>orthodenticle homeobox</i>	RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
PAX	<i>paired box</i>	SAG	<i>smoothed agonist</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	SCA3	spinocerebelläre Ataxie Typ 3
PDGF-AA	<i>platelet-derived growth factor</i> Homodimer A	SHH	<i>sonic hedgehog</i>
PDGFR α	α -Untereinheit des PDGF	Shi	<i>Shiverer</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin	SIP	SMAD-interagierendes Protein
PI	Propidiumiodid	SOX	<i>sex-determining region Y-related HMG box</i>
PKA	Proteinkinase A	SPG2	spastische Paraplegie Typ 2
PLP	Proteolipid Protein	SSEA	<i>stage-specific embryonic antigen</i>
PLZF	<i>promyelocytic leukaemia zinc finger protein</i>	T3	Trijod-L-thyronin
PMD	Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung	TAE	Tris/Acetat/EDTA
pMN	Motoneuron-Domäne	TE	Trypsin/EDTA
PMP	peripheres Myelinprotein	TGF	<i>transforming-growth factor</i>
PO	Poly-Ornithin	TH	Tyrosin-Hydroxylase
PO/Ln	Poly-Ornithin/Laminin	TI	Trypsin Inhibitor
prol	proliferierende Zellen	TRA	<i>tumor rejection antigen</i>
PSA-NCAM	<i>polysialic acid neural cell adhesion molecule</i>	TTX	Tetrodotoxin
PSC	pluripotente Stammzellen (<i>pluripotent stem cells</i>)	TUBB	Tubulin β -Isotyp
PTCH	<i>patched</i>	vGLUT	vesikuläres Glutamat
		VIM	Vimentin
		Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>
		WT	Wildtyp
		X-ALD	X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie
		ZFP	Zinkfingerprotein
		ZNS	Zentralnervensystem
		γ -MEF	γ -bestrahlte MEF

Abbildungen

Abbildung 1:	Generierung pluripotenter humaner embryonaler Stammzelllinien	2
Abbildung 2:	Medizinische Anwendung patientenspezifischer hiPSC.....	5
Abbildung 3:	Morphologische Charakteristika und Markerexpression während der Oligodendrozytendifferenzierung.....	9
Abbildung 4:	Neurale Vorläuferdomänen im Rückenmark	11
Abbildung 5:	Transkriptionelle Kontrolle der Oligodendrozytenentwicklung.....	12
Abbildung 6:	MicroRNA-vermittelte Kontrolle der Oligodendrozytendifferenzierung.....	18
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Generierung der RGL-NPC.....	35
Abbildung 8:	Schematische Darstellung des oligodendroglialen Differenzierungsprotokolles	36
Abbildung 9:	Generierung humaner neuronaler Vorläuferzellen aus pluripotenten Stammzellen	47
Abbildung 10:	Verlust der Expression von Pluripotenzmarkern während der neuronalen Differenzierung.....	48
Abbildung 11:	Neurosphärenassay.....	49
Abbildung 12:	Expressionsprofil der RGL-NPC auf Protein- und Transkriptebe.....	50
Abbildung 13:	Zelllinienübertragbarkeit des neuronalen Differenzierungsprotokolls	51
Abbildung 14:	Proliferationsverhalten der RGL-NPC	52
Abbildung 15:	Regionale Identität der RGL-NPC	54
Abbildung 16:	Expressionsprofil regionaler Marker sowie CD133 während der Langzeitkultur der RGL-NPC.....	55
Abbildung 17:	Vergleich der hESC-RGL-NPC zu Rosettenzellen sowie langzeitkultivierten NSC	56
Abbildung 18:	Tripotentes Differenzierungsverhalten der hESC-RGL-NPC.....	58
Abbildung 19:	Analyse der Subtypenzusammensetzung RGL-NPC-abgeleiteter neuronaler Kulturen.....	59
Abbildung 20:	Neuronales Differenzierungsverhalten der RGL-NPC während der Langzeitkultur	60
Abbildung 21:	Gerichtete Differenzierung der RGL-NPC in neuronale Subtypen.....	61
Abbildung 22:	Funktionelle Analyse RGL-NPC-abgeleiteter Neurone.....	63
Abbildung 23:	Effiziente Differenzierung hESC-RGL-NPC-abgeleiteter Oligodendrozyten.....	65
Abbildung 24:	Oligodendrogliale Differenzierungsfähigkeit der hESC-RGL-NPC während der Langzeitkultur.....	67
Abbildung 25:	Oligodendrogliale Differenzierung der hiPSC-RGL-NPC	68
Abbildung 26:	Analyse des Differenzierungspotenzials der RGL-NPC im Tiermodell der Shiverer-Maus	70
Abbildung 27:	Myelinisierungspotenzial der RGL-NPC <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	71
Abbildung 28:	MicroRNA-Expression während der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC.....	73
Abbildung 29:	Einfluss des SHH-Signalweges auf die oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPC.....	75
Abbildung 30:	Selbsterneuerung und Tripotenz der RGL-NPC auf Einzelzellebene.....	78

Zusammenfassung

Als myelinproduzierende Zellen spielen die Oligodendrozyten eine essenzielle Rolle für die Funktionalität des Zentralnervensystems (ZNS). Sie bilden die isolierenden Myelinscheiden der Neurone und garantieren so eine einwandfreie Reizweiterleitung selbst über große Distanzen. Myelinassoziierte Erkrankungen wie beispielsweise die Multiple Sklerose oder die Metachromatische Leukodystrophie können bislang lediglich symptomatisch behandelt aber nicht geheilt werden und demonstrieren mit ihrer schwerwiegenden Symptomatik die Bedeutung der Oligodendrozyten für das Nervensystem. Ein zentrales Kriterium für die Entwicklung verbesserter Therapiestrategien stellt das grundlegende Verständnis der Entwicklung und Funktion des betroffenen Zelltyps dar. Der Zugang zu humanen Oligodendrozyten kann über die eingeschränkte Bereitstellung von Primärgewebe oder die Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen (*pluripotent stem cells*, PSC) in den gewünschten Zelltyp erfolgen. Bislang erfolgt die Gewinnung von humanen Oligodendrozyten *in vitro* über direkte, langwierige Differenzierungsstrategien, welche abhängig sind von der sensiblen Qualität der humanen PSC. Weiterhin beeinflussen lange Differenzierungszeiträume die Stabilität und Qualität der resultierenden Kulturen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun ein Zugang zu Oligodendrozyten aus humanen neuronalen Vorläuferzellen (*neural precursor cells*, NPC) ermöglicht, um die beschriebenen Komplikationen in der Generierung der Oligodendrozyten zu umgehen.

Zu diesem Zweck werden humane embryonale Stammzellen sowie induziert pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) neural differenziert und radialgliaähnliche NPC (*radial glia like NPC*, RGL-NPC) über einen Antikörper gegen den NSC-Marker CD133 immunisoliert. Die resultierenden RGL-NPC bilden eine über mindestens 40 Passagen hinweg stabil adhärent proliferierende, kryokonservierbare Kultur, welche Marker von NSC und Radialglia wie Nestin, SOX2, ASCL1, BLBP und Vimentin exprimieren. Diese Zellen lassen sich unter Entzug der Wachstumsfaktoren tripotent in die Hauptzelltypen des ZNS, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten, differenzieren. Die Entwicklung eines spezifischen oligodendroglialen Differenzierungsschemas ermöglicht die Induktion der essenziellen oligodendroglialen Transkriptionsfaktoren OLIG1/2, NKX6-2 und SOX10, wodurch NG2-positive Oligodendrozytenvorläufer generiert werden können, welche sich weiter in O4-, 4860- und MBP-positive Oligodendrozyten entwickeln. Nach Transplantation in die hypomyelinisierte Shiverer-Maus reifen die RGL-NPC zu funktionellen myelinisierenden Oligodendrozyten heran.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit die Generierung eines stabilen Intermediats zwischen humanen PSC und Oligodendrozyten. Die Gewinnung humaner Oligodendrozyten kann somit erfolgen, ohne wiederholt auf sensible PSC zurückgreifen zu müssen. Die Möglichkeit der Generierung iPSC-abgeleiteter Oligodendrozyten verschafft darüber hinaus einen Zugang zu patientenspezifischen Zellen, welche einen essenziellen Beitrag zur Untersuchung myelinassoziierter Erkrankungen sowie der Entwicklung potenzieller Therapien liefern können.

1 Einleitung

1.1 Pluripotente Stammzellen

Während der Embryogenese, einem Prozess aus Zellteilung und zellulärer Differenzierung, entwickelt sich die befruchtete Eizelle und dient als Quelle für alle Zelltypen des Organismus sowie des extraembryonalen Gewebes. Diese Eigenschaft wird als Totipotenz bezeichnet. Die erste zelluläre Spezifikation der Embryonalentwicklung findet während der Entstehung der Blastozyste statt, wobei sich zum einen der Trophoblast als Ursprung des späteren Extraembryonalgewebes, zum anderen die innere Zellmasse (*inner cell mass*, ICM) als Ausgangspunkt für die embryonale Entwicklung formieren. Die Zellen der ICM bilden die drei embryonalen Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm und sind somit in der Lage, alle Zellen des Organismus zu generieren. Aufgrund dieser Eigenschaft werden die ICM-Zellen als pluripotent bezeichnet.

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Stammzellen sind durch ihr Vermögen zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in spezifizierte Zelltypen definiert. 1981 gelang es Evans und Kaufmann erstmals, die pluripotenten Zellen der ICM aus frühen murinen Blastozysten zu isolieren und in Kultur zu nehmen (Evans & Kaufman, 1981). Diese Zellen wurden als murine embryonale Stammzellen (*mouse embryonic stem cells*, mESC) bezeichnet. *In vivo* Untersuchungen in Kombination mit der nun möglichen Forschung an mESC erlaubten ungeahnte Einblicke in die Abläufe der murinen Embryonalentwicklung. Da die *in vivo* Untersuchung der humanen Embryonalentwicklung aus ethischen Gründen nur sehr eingeschränkt möglich ist, war das Interesse an der Generierung humaner Zelllinien analog zu den mESC immens. Nach der erfolgreichen Generierung von Stammzelllinien nicht-humaner Primaten (Thomson et al, 1995) berichteten Thomson et al. 1998 von einer erfolgreichen Isolation humaner embryonaler Stammzellen (*human embryonic stem cells*, hESC) aus frühen Blastozysten (Thomson et al, 1998). Die pluripotenten Zellen wurden aus der ICM isoliert und als Zelllinien in Kultur genommen (Abbildung 1).

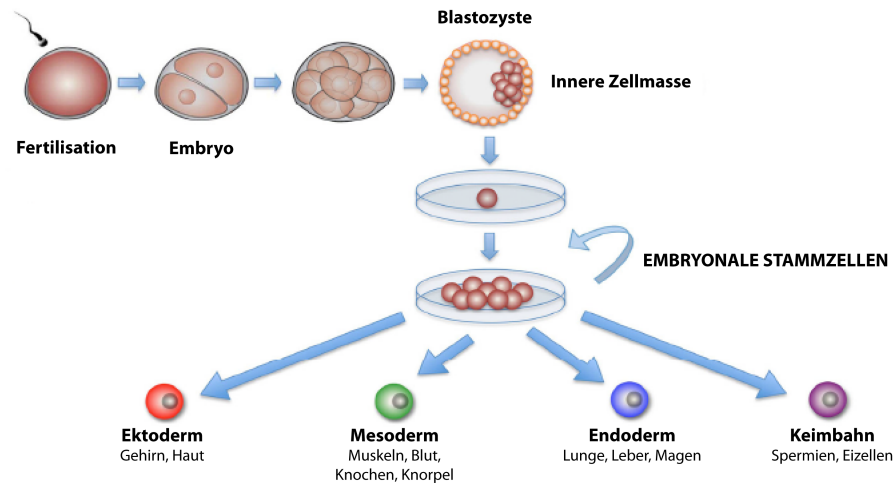


Abbildung 1: Generierung pluripotenter humaner embryonaler Stammzelllinien

Zur Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen (*human embryonic stem cells*, hESC) wird die innere Zellmasse eines frühen humanen Embryos des Blastozysten- oder Morulastadiums isoliert und in Kultur genommen. Die pluripotenten Zellen der ICM beginnen sich zu teilen und Aggregate zu bilden. Zellen aus der Peripherie der Aggregate werden isoliert und als Zelllinien propagiert, welche die Fähigkeit besitzen sich selbst zu erneuern und in alle Zellen der drei Keimblätter sowie der Keimbahn zu differenzieren (Thomson & Odorico, 2000; Winslow & Duckwall, 2001; Yabut & Bernstein, 2011).

Die so entstandenen hESC besitzen einzigartige Eigenschaften: undifferenzierte Kulturen zeigen eine gleichmäßige Morphologie kompakter Zellkolonien mit robuster Selbsterneuerung und exprimieren mit Pluripotenz assoziierte Oberflächenantigene wie *stage-specific embryonic antigen* (SSEA)-3, SSEA-4, *tumor rejection antigen* (TRA)-1-60, TRA-1-81 und weisen Aktivität der alkalische Phosphatase auf. Weiterhin besitzen embryonale Stammzellen die Fähigkeit, in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Der *in vivo* Nachweis dieses Differenzierungspotenzials erfolgt über die Entstehung von Teratomen nach Injektion undifferenzierter hESC in immundefiziente Mäuse.

Bereits Thomson und seine Kollegen erkannten die erheblichen Möglichkeiten der Untersuchung und Anwendung von hESC. Während der folgenden Jahre wurde das *in vitro* Differenzierungspotenzial der hESC intensiv untersucht und diverse direkte Differenzierungsprotokolle etabliert, die in Entwicklungsbiologie und experimenteller Medizin Anwendung finden. So können unter anderem dem Endoderm zugehörige Hepatozyten (Agarwal et al, 2008; Cai et al, 2007), Blutzellen (Ng et al, 2005) und Kardiomyozyten (Laflamme et al, 2007) des Mesoderms sowie dopaminerge Neurone und Motoneurone des Ektoderms (Li et al, 2005; Perrier et al, 2004) differenziert werden (Yabut & Bernstein, 2011). Die *in vitro* Verfügbarkeit ausreichender Mengen distinkter Zelltypen ist eine Voraussetzung für die Entwicklung von potenziellen Zellersatztherapien.

Trotz des Nutzens für Forschung und Medizin bergen sowohl die Gewinnung als auch die Anwendung von hESC ethische und medizinische Probleme, da die Isolierung der ICM die Zerstörung eines frühen Embryos implementiert. Darüber hinaus tragen potenzielle Zellersatztherapien das Risiko von Abstoßungsreaktionen. Die Suche nach alternativen Quellen für humane pluripotente Stammzellen wurde somit zu einem zentralen Thema der Forschung.

1.1.2 Induziert pluripotente Stammzellen

Schon seit vielen Jahren war es möglich, somatische Zellen *in vitro* mittels Zellkerntransfer oder Zellphysion in einen pluripotenten Zellstatus zu überführen (Blau et al, 1983; Gurdon, 1962). Takahashi und Yamanaka demonstrierten allerdings 2006 in einer bahnbrechenden Arbeit die direkte Erzeugung alternativer pluripotenter Stammzellen aus murinen Fibroblasten (Takahashi & Yamanaka, 2006). Durch retroviral induzierte ektopische Expression der vier Transkriptionsfaktoren Octamer (Oct) 3/4, *sex-determining region Y-related HMG box* (Sox) 2, *Kruppel-like factor* (Klf) 4 und c-Myc konnten murine embryonale und adulte Fibroblasten in ein pluripotentes Stammzellstadium reprogrammiert werden. Diese Zellen teilten die Haupt-eigenschaften der mESC und wurden somit als induziert pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) bezeichnet. Die Herstellung von iPSC aus humanen Zellen (hiPSC) wurde im Anschluss unabhängig voneinander ein Jahr später aus den Laboratorien von Thomson und Yamanaka berichtet (Takahashi et al, 2007; Yu et al, 2007).

Von den zunächst verwendeten Hautzellen wurden die Reprogrammierungstechniken auf unterschiedlichste somatische Zelltypen wie beispielsweise auf Keratinozyten (Aasen et al, 2008), Melanozyten (Utikal et al, 2009) oder Hepatozyten (Liu et al, 2010) übertragen. Die Reprogrammierung von Zellen in einen pluripotenten Zustand durch die Überexpression nur eines einzigen Transkriptionsfaktors, nämlich Oct3/4, gelang schließlich aus neuronalen Stammzellen (*neural stem cells*, NSC) des adulten Gehirns, welche bereits endogen Sox2 exprimieren (Kim et al, 2009b).

Die Unabhängigkeit vom somatischen Zelltyp als Ausgangspunkt für die Reprogrammierung zeigt die vielfältigen Möglichkeiten der Modifikation zellulärer Identitäten. Obwohl grundlegende und weitreichende Ähnlichkeiten zwischen hESC und hiPSC bestehen, können im kritischen Vergleich nicht nur im Bezug auf die Schlüsselqualitäten wie Selbsterneuerung und Differenzierungsverhalten, sondern auch auf genetischer und epigenetischer Ebene distinkte Unterschiede der beiden pluripotenten Zelltypen aufgezeigt werden. So konnte beobachtet werden, dass manche hiPSC-Linien weniger effizient in Zellen bestimmter Linien wie beispielweise der hematopoetischen oder neuroepithelialen Linien ausdifferenzieren als hESC (Feng et al, 2010; Hu et al, 2010a). Einige Studien zeigten weiter, dass der

reprogrammierte somatische Zelltyp die Eigenschaften der resultierenden hiPSC bestimmt und ein epigenetisches Gedächtnis in den reprogrammierten Zellen bestehen bleibt; einige hiPSC-Linien zeigen ein verstärktes Differenzierungsverhalten hin zu dem Zelltypus, aus dem sie gewonnen wurden (Bar-Nur et al, 2011; Hu et al, 2010b).

Ein schwerwiegender Nachteil der retroviralen Reprogrammierung, vor allem im Hinblick auf mögliche Zellersatztherapien, wird durch die Integration der Zielgene in das Wirtsgenom ausgelöst, wodurch ein erhöhtes Tumorrisiko durch potenzielle Reaktivierung der viralen Transgene, insbesondere des Onkogens c-Myc, hervorgerufen wird (Okita et al, 2007). Die Entwicklung nicht-integrativer Reprogrammierungstechniken war somit eine logische Folge dieses Problems. Somatische Zellen wurden mittels nicht-integrierender Adenoviren (Okita et al, 2008; Stadtfeld et al, 2008) oder Expressions-Plasmiden (Okita et al, 2008), Episomen (Yu et al, 2009) oder darüber hinaus DNA-frei mittels nicht-integrierender RNA-Viren (Fusaki et al, 2009), Proteinen (Kim et al, 2009a; Zhou et al, 2009) oder microRNA (Miyoshi et al, 2011) reprogrammiert.

Die Möglichkeit der Generierung integrationsfreier humaner iPSC verschafft einen vielversprechenden Zugang zu patientenspezifischen hiPSC, welche die ethischen und medizinischen Probleme, die im Zusammenhang mit der Nutzung humaner ESC auftreten, umgehen. Die Gewinnung der Zellen ist ethisch unumstritten und ein Einsatz in potenziellen Zellersatztherapien auf Grund des autologen Hintergrundes nicht durch mögliche Abstoßungsreaktionen belastet. Darüber hinaus ermöglichen krankheitsspezifische iPSC *in vitro* mechanistische Untersuchungen der Erkrankung, genetische Korrektur eines Defekts oder spezifische Substanz- und Medikamenten-Screenings, indem Zellen betroffener Patienten reprogrammiert, in den erkrankten Zelltyp differenziert und anschließend kultiviert werden (Abbildung 2).

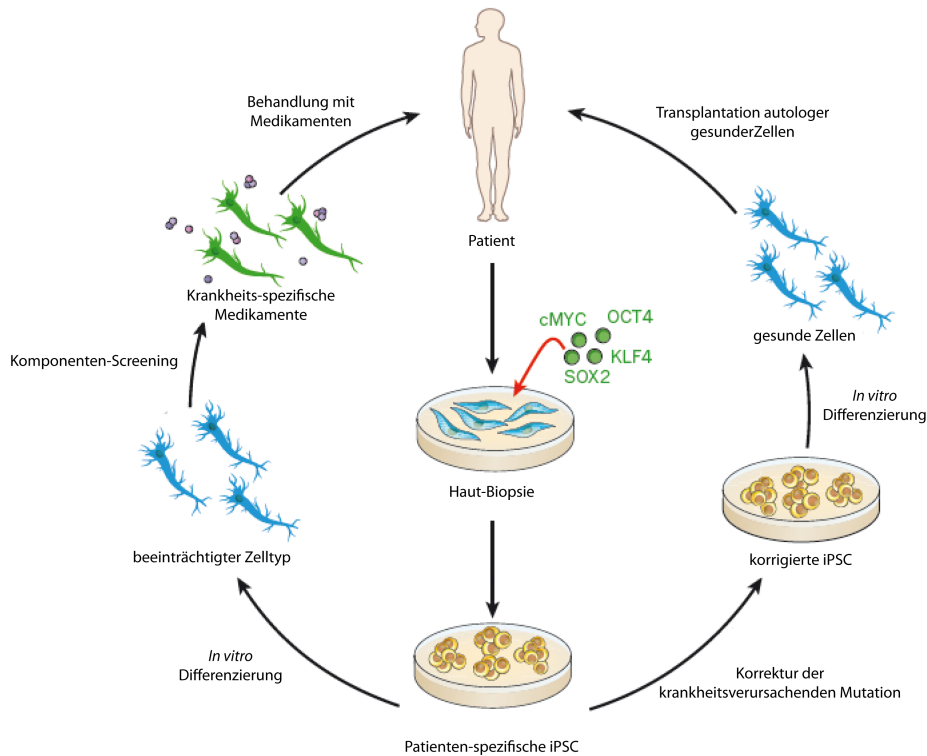


Abbildung 2: Medizinische Anwendung patientenspezifischer hiPSC

Die Generierung autologer hiPSC könnte die Modellierung und Behandlung von genetischen Erkrankungen ermöglichen. Einem Patienten würde dazu eine Hautbiopsie entnommen, die Fibroblasten in Kultur genommen und reprogrammiert. Die resultierenden patientenspezifischen hiPSC könnten zur Entwicklung krankheitsspezifischer Medikamente genutzt werden, indem der beeinträchtigte Zelltyp *in vitro* differenziert und zum Komponentenscreening genutzt wird. Eine weitere medizinische Anwendung der patientenspezifischen hiPSC könnten autologe Zellersatztherapien sein, bei denen der zugrundeliegende genetische Defekt *in vitro* in den hiPSC korrigiert wird, korrigierte gesunde Zellen des beeinträchtigten Zelltyps differenziert und dem Patienten transplantiert werden (Robinton & Daley, 2012).

Eine Studie zur β -Thalassämie (Cooley Anämie) zeigte kürzlich die Reprogrammierung von Fibroblasten eines Patienten und die anschließende genetische Korrektur des Defekts *in vitro* (Wang et al, 2012). Auch im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen wurden Studien publiziert, die beispielsweise die Reprogrammierung patientenspezifischer Zellen, Differenzierung des betroffenen Zelltyps und Darstellung des Phänotyps bei Chorea Huntington, Amyotropher Lateralsklerose (ALS), Multipler Sklerose, Morbus Parkinson, Spinocerebellärer Ataxie Typ 3 (SCA3, Machado-Joseph-Erkrankung) oder Pelizaeus-Merzbacher Erkrankung (*Pelizaeus-Merzbacher disease*, PMD) beschreiben (Dimos et al, 2008; Hargus et al, 2010; Inoue, 2012; Juopperi et al, 2012; Koch et al, 2011; Song et al, 2012; The Hd Ipsc, 2012).

1.2 Direkte Konversion

Die Reprogrammierung somatischer Zelltypen in einen pluripotenten Zustand beschreibt die Umkehrung eines als unidirektional geglaubten Weges während der Entwicklung. Ein weiterer Schritt in Richtung effizienter Generierung spezifischer somatischer Zelltypen stellt die direkte

Konversion somatischer Zellschicksale ohne einen Umweg über einen pluripotenten Zustand dar. Dieser Prozess wird als Linien-Reprogrammierung bezeichnet. Grundsätzlich lassen sich dabei zwei Systeme voneinander unterscheiden. Zum einen kann über das Einfügen von linienspezifischen Transkriptionsfaktoren oder microRNAs (miRNA) eine direkte Linienkonversion hervorgerufen werden. Alternativ kann der Einsatz aller oder einzelner klassischer Reprogrammierungs-Transkriptionsfaktoren einen transienten, epigenetisch instabilen Zustand der Ausgangszellen hervorrufen, welcher durch linienspezifische Kulturbedingungen mit entsprechenden Wachstumsfaktoren und Komponenten (*small molecules*) in einer Linienkonversion resultiert (Graf, 2011; Kim et al, 2012). 2010 gelang erstmals die Induktion funktioneller Neurone (iN) direkt durch ektopische Expression der Transkriptionsfaktoren *achaete-scute complex homolog* (Ascl) 1, Brn2 (Pou3f2) und *myelin-transcription factor 1 like* (Myt1l) aus murinen Fibroblasten (Vierbuchen et al, 2010). Unmittelbar danach beschrieben unterschiedliche Arbeitsgruppen in verschiedenen Ansätzen die Generierung von humanen iN (Pang et al, 2011; Yoo et al, 2011) und sogar patientenspezifischen iN sowie iN spezifischer neuronaler Subtypen *in vitro* (Caiazzo et al, 2011; Pfisterer et al, 2011; Qiang et al, 2011; Son et al, 2011). Darüber hinaus demonstrierten zwei Forschergruppen die direkte, transkriptionsfaktorvermittelte Reprogrammierung muriner Fibroblasten in oligodendrogliale Vorläuferzellen (Najm et al, 2013; Yang et al, 2013). Weiterhin konnte die direkte Konversion von murinen Fibroblasten sowie humanen kortikalen Astrozyten in tripotente neurale Stamm- und Vorläuferzellen und Neurone gezeigt werden (Corti et al, 2012; Lujan et al, 2012; Thier et al, 2012). Sogar die Generierung induzierter NSC aus murinen und humanen Fibroblasten einzig durch den Transkriptionsfaktor Sox2 wurde beschrieben (Ring et al, 2012). Eine direkte Linienkonversion in Astrozyten konnte bislang allerdings noch nicht gezeigt werden.

1.3 Leukodystrophien

Im Zentralnervensystem (ZNS) hängen Effizienz und Schnelligkeit der Weiterleitung von Aktionspotenzialen vom Myelin ab, einer lipidreichen Membranstruktur, welche von den Oligodendrozyten produziert wird. Funktionsdefekte der Oligodendrozyten führen zu myelinassozierten Erkrankungen, den sogenannten Leukodystrophien. Im Hinblick auf den Ursprung der Erkrankung kann unterschieden werden zwischen zugrundeliegenden genetischen Defekten, die einen insuffizienten Aufbau des Myelins zur Folge haben, und solchen, die einen metabolischen Defekt der Oligodendrozyten auslösen.

Zur ersten Gruppe der Leukodystrophien zählen die X-chromosomal rezessiv vererbte PMD und deren allelische Form, die spastische Paraplegie Typ 2 (SPG2). Beide Erkrankungen werden durch Mutationen im Proteolipid Protein (PLP) 1-Gen hervorgerufen. Das Ausmaß der Hypomyelinisierung ist je nach Mutation unterschiedlich, reicht bis zu nahezu fehlendem Myelin im ZNS und ist ausschlaggebend für den Zeitpunkt des Ausbruchs und die Progression der Erkrankung (Garbern, 2007).

Zur Gruppe der Leukodystrophien, welche durch einen metabolischen Defekt in Oligodendrozyten ausgelöst werden, zählen unter anderem die Metachromatische Leukodystrophie (MLD), das Canavan Syndrom und die X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie (X-ALD). Mutationen in den kodierenden Genen der Enzyme Arylsulfatase A (MLD) und Aspartoacylase (Canavan Syndrom) bzw. des peroxisomalen Halbtransporters Adrenoleukodystrophieprotein (ALDP; X-ALD) führen zur Akkumulation spezifischer Metabolite und zur daraus resultierenden Demyelinisierung unterschiedlicher Regionen des ZNS (Kolodny, 1989; Kumar et al, 2006; Lazzarini, 2004; Mosser et al, 1993).

Einen Kernpunkt in der Entwicklung von Zellersatztherapien stellt die Verfügbarkeit gut charakterisierter, reiner Zellpopulationen in ausreichenden Mengen dar, um Therapien zu standardisieren. Dieses Ziel könnte durch die gerichtete Differenzierung der entsprechenden Zelltypen aus pluripotenten, patientenspezifischen Stammzellen gelingen. Für die Differenzierung von Neuronen aus hiPSC wurden in den vergangenen Jahren diverse Protokolle etabliert (Falk et al, 2012), die zusätzlich den Zugang zu distinkten neuronalen Subpopulationen erlauben. Es konnte unter anderem die Differenzierung dopaminerger Neurone (Swistowski et al, 2010), kortikaler Interneurone (Arber & Li, 2013) sowie von Motorneuronen (Hu & Zhang, 2009) aus humanen iPSC gezeigt werden. Auch die Differenzierung humaner Astrozyten aus hiPSC gelang kürzlich effizient (Emdad et al, 2012; Krencik et al, 2011; Roybon et al, 2013; Shaltouki et al, 2013). Für die Generierung humaner Oligodendrozyten aus hiPSC wurden ebenfalls unterschiedliche Protokolle publiziert (Douvaras et al, 2014; Hu et al, 2009a; Hu et al, 2009b; Pouya et al, 2011; Sundberg et al, 2011; Wang et al, 2013b).

Tiermodelle

Mutationen in Genen kritischer Myelinproteine führten zur Etablierung von Tiermodellen für humane Erkrankungen oder für Myelinersatz. Die PLP-Mutationen stellen die größte Gruppe der Myelinmutationen dar und dienen als Modell der humanen PMD. Dazu zählen die jimpy Maus und die myelindefiziente (MD) Ratte, wobei vor allem letztere für Transplantationen genutzt wurde (Duncan, 1995). Im ZNS der MD-Ratte ist nahezu kein Myelin nachweisbar,

ihre kurze Überlebensdauer von 24-25 Tagen macht sie allerdings unattraktiv für Langzeitexperimente (Csiza & de Lahunta, 1979). Shiverer (shi) ist eine autosomal rezessive Mutation mit einer ausgedehnten Deletion im MBP Gen, wodurch das Myelin im ZNS hochgradig reduziert ist (Mikoshiha et al, 1992). Das Fehlen von MBP-positivem Myelin und eine Überlebensdauer von 120 Tagen macht die Shiverer-Maus attraktiv für die Langzeitanalyse der oligodendrogialen Differenzierung und des Myelinisierungspotenzials transplanteder Zellen (Duncan et al, 2011).

1.4 Oligodendrozyten

Oligodendrozyten sind die myelinproduzierenden Zellen des ZNS und garantieren die Isolation und saltatorische Erregungsleitung entlang der Axone. Sie entwickeln sich schrittweise durch morphologische Transformation aus bipolaren Vorläuferzellen über unreife, stark verzweigte Oligodendrozyten in reife myelinisierende Zelltypen mit komplexer Morphologie. Jeder dieser Entwicklungsschritte ist charakterisiert durch die Expression distinkter Marker (Abbildung 3).

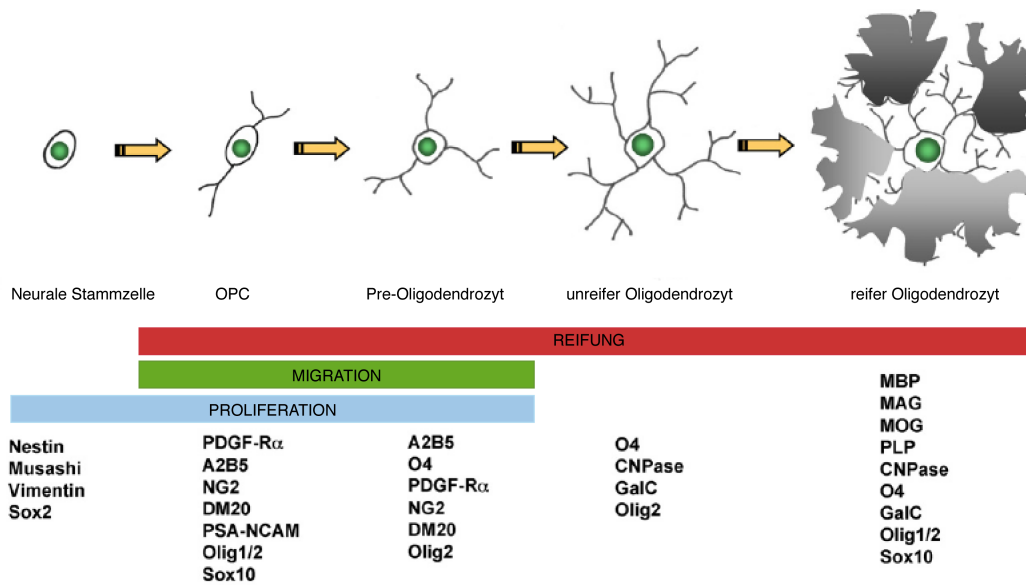


Abbildung 3: Morphologische Charakteristika und Markerexpression während der Oligodendrozytendifferenzierung

Oligodendrozyten differenzieren schrittweise aus bipolaren Vorläufern (OPC) über Pre-Oligodendrozyten und stark verzweigten unreifen Zellen zu myelinisierenden reifen Zelltypen. Jeder Differenzierungsabschnitt ist charakterisiert durch eine entsprechende Morphologie und ein distinktes Expressionsprofil von Proteinen und Transkriptionsfaktoren. Vorläuferzellen exprimieren PDGFR α , NG2 und Olig1/2. Während der Differenzierung zu unreifen Zellen erhöht sich der Verzweigungsgrad und die Expression von O4, CNPase und GalC kann beobachtet werden. Myelinisierende Oligodendrozyten bilden Myelinmembranen und exprimieren die Myelinkomponenten MBP, MAG, MOG und PLP sowie den Transkriptionsfaktor SOX10 (Buchet & Baron-Van Evercooren, 2009; Zhang, 2001).

Oligodendrozytenvorläufer exprimieren den PDGF Rezeptor α (*platelet-derived growth factor receptor alpha*, PDGFR α) sowie das Chondroitin Sulfat Proteoglykan CSPG4/NG2 (Nishiyama et al, 1999; Nishiyama et al, 1996; Pringle & Richardson, 1993). Die Expression des Transkriptionsfaktors *oligodendrocyte lineage transcription factor* (Olig) 2 als frühester oligodendrozytenspezifischer Marker ist dabei charakteristisch (Lu et al, 2000; Zhou et al, 2000).

Von ihren Entstehungsorten migrieren Oligodendrozytenvorläuferzellen in das Hirnparenchym und proliferieren und differenzieren dort unter dem Einfluss verschiedener Substanzen. PDGF-AA, ein Homodimer des PDGF, ist essenziell für die Proliferation der Zellen (Noble et al, 1988; Richardson et al, 1988; Wilson et al, 2003). Der Wachstumsfaktor *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) zeigt nur in Nagern einen positiven Effekt auf die Proliferation von Oligodendrozytenvorläufern, im humanen System zeigt sich aber ein inhibitorischer Effekt auf die Differenzierung (Bogler et al, 1990; Hu et al, 2009a; Wilson et al, 2003). Darüber hinaus konnten stimulierende Effekte von Trijodthyronin (T3), Glucocorticoiden und Retinsäure (*retinoic acid*, RA) auf die oligodendrogliale Vorläuferdifferenzierung nachgewiesen

werden, unter deren Einfluss die Zellen den Zellzyklus verlassen und differenzieren (Barres et al, 1994; Huang et al, 2011).

Im Zuge der Reifung in Pre-Oligodendrozyten wird neben PDGFR α , NG2 und Olig2 das durch den monoklonalen Antikörper O4 gebundene Glykolipid-Sulfatid auf der Oberfläche der Zellen exprimiert (Berg & Schachner, 1981; Sommer & Schachner, 1981). Unreife Oligodendrozyten weisen verzweigte Fortsätze auf und exprimieren neben O4 und Olig2 die Proteine Galactocerebrosidase (GalC) (Ranscht et al, 1982) und 2',3'-cyclische Nukleotid-3' Phosphodiesterase (CNPase). Ausgereifte Oligodendrozyten sind morphologisch durch die Ausprägung von Myelinmembranen und die Expression des Transkriptionsfaktors Sox10 sowie myelinspezifischer Proteine gekennzeichnet.

Myelin besteht zu mehr als 70 % aus Lipiden, die sich aus Cholesterin, Phospholipiden und Glykolipiden zusammensetzen. Typisch ist ein hoher Anteil an Galactosylceramid, Sulfatid und Plasmalogen. Die Zusammensetzung des Proteinanteils des Myelins ist charakteristisch: basische Myelinproteine (*myelin basic protein*, MBP), welche essenziell sind für die Ausbildung kompakten Myelins, machen 30-40 % der Myelinproteine aus, das PLP stellt ungefähr die Hälfte des Myelinproteins. Weiterhin kommen im Myelin das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG), CNPase, das myelinassoziierte Oligodendrozyten basische Protein (MOBP) und das Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) vor (Buchet & Baron-Van Evercooren, 2009; Bunge et al, 1962; Linington & Lassmann, 1987; Macklin et al, 1987; Poltorak et al, 1987; Zhang, 2001).

1.4.1 Regionaler Ursprung der Oligodendrozyten

Der Großteil der Oligodendrozyten des ZNS ist in der weißen Substanz zu finden. Trotz ihrer weitreichenden Verteilung entstehen die ersten Vorläuferzellen der Oligodendrozyten in distinkten ventralen Regionen des sich entwickelnden ZNS (Miller, 1996; Noll & Miller, 1993) und migrieren von ihrem Entstehungsort in die graue und weiße Substanz. Dort proliferieren die Vorläuferzellen und reifen schließlich zu myelinisierenden Oligodendrozyten aus (Barres & Raff, 1994; Ono et al, 2001).

Im ventralen Telencephalon lässt sich die Oligodendrogenese während der Embryonalentwicklung in der medialen und lateralen ganglionären Eminenz beobachten. Postnatal entstehen Oligodendrozyten zusätzlich im Kortex (Jakovcevski & Zecevic, 2005; Kessaris et al, 2006; Rakic & Zecevic, 2003).

Im Rückenmark entwickeln sich unter dem Einfluss gegenläufiger Gradienten von ventral sezerniertem *sonic hedgehog* (SHH; sezerniert von der Bodenplatte des Neuralrohrs) und dorsal

wirkenden *bone morphogenetic protein* (BMP) und Wnt-Proteinen (sezerniert von der Deckplatte des Neuralrohrs) Domänen neuraler Vorläuferzellen in dorso-ventraler Orientierung (Wilson & Maden, 2005). Jede Vorläuferdomäne ist charakterisiert durch die Expression definierter Transkriptionsfaktoren (Briscoe et al, 2000). In dorsalen Domänen werden die Transkriptionsfaktoren *paired box* (PAX) 3 und PAX7 exprimiert, ventrale Domänen sind durch die Expression von NK6 *homeobox* 1 (NKX6-1) und NKX6-2 charakterisiert (Abbildung 4).

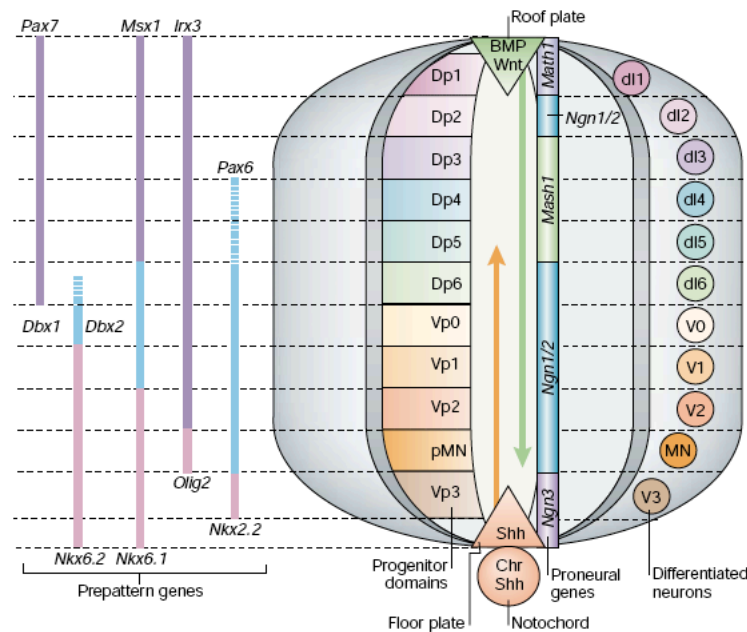


Abbildung 4: Neurale Vorläuferdomänen im Rückenmark

Während der Entwicklung entstehen im Rückenmark unter dem Einfluss gegenläufiger Gradienten von SHH (*sonic hedgehog*) und BMP (*bone morphogenetic protein*) Domänen neuraler Vorläuferzellen in dorso-ventraler Orientierung. Jede Domäne ist charakterisiert durch ein distinktes Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren (Gomez-Skarmeta et al, 2003).

Jede Vorläuferdomäne produziert während der Entwicklung zunächst einen distinkten neuronalen Subtyp gefolgt von astroglialen oder oligodendroglialen Zellen (Jessell, 2000). Innerhalb der ventralen pMN-Domäne (Motoneurondomäne), welche charakterisiert ist durch die Expression von Olig2 sowie von NKX6-Homeodomänen Transkriptionsfaktoren (Briscoe et al, 2000; Mizuguchi et al, 2001; Novitch et al, 2001; Qiu et al, 1998), entwickeln sich zunächst Motoneurone. Nach einem Neuron-zu-Glia Wechsel wird dort in einer späteren Entwicklungsphase der überwiegende Anteil der Oligodendrozytenvorläuferzellen des ZNS generiert (Pringle & Richardson, 1993; Richardson et al, 1997; Zhou & Anderson, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass der Wechsel zwischen Motoneuron- und Oligodendrozytendifferenzierung durch die Phosphorylierung von Olig2 beeinflusst wird (Li et al, 2011). Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, welche für den Neuron-zu-Glia Wechsel

und somit die Oligodendrozytenspezifikation eine zusätzliche wichtige Rolle spielen, sind Sox9 und Sox8 (Stolt et al, 2003).

Studien konnten zeigen, dass im Rückenmark nach der frühen Produktion von Oligodendrozyten aus der pMN-Domäne Oligodendrozytenvorläuferzellen auch unabhängig von der Expression von NKX6 Transkriptionsfaktoren und SHH aus dorsaleren Bereichen entstehen können. Olig2 wird in diesen Vorläuferzellen initial nicht exprimiert und ist somit nicht essenziell für deren Entstehung, spielt jedoch nach erfolgter oligodendroglialer Spezifikation eine grundlegende Rolle während der fortschreitenden Reifung der Oligodendrozyten (Cai et al, 2005; Vallstedt et al, 2005; Zhu et al, 2011). Diese dorsale Oligodendrozytenpopulation macht insgesamt aber nur einen Anteil von etwa 10-15 % aller reifen Oligodendrozyten des Rückenmarks aus (Richardson et al, 2006).

1.4.2 Transkriptionelle Kontrolle der Oligodendrozytenentwicklung

Nach erfolgter Spezifikation der Oligodendrozytenvorläufer unterliegt die weitere Differenzierung und Reifung dieser Zellen einer engen transkriptionellen Kontrolle (Abbildung 5).

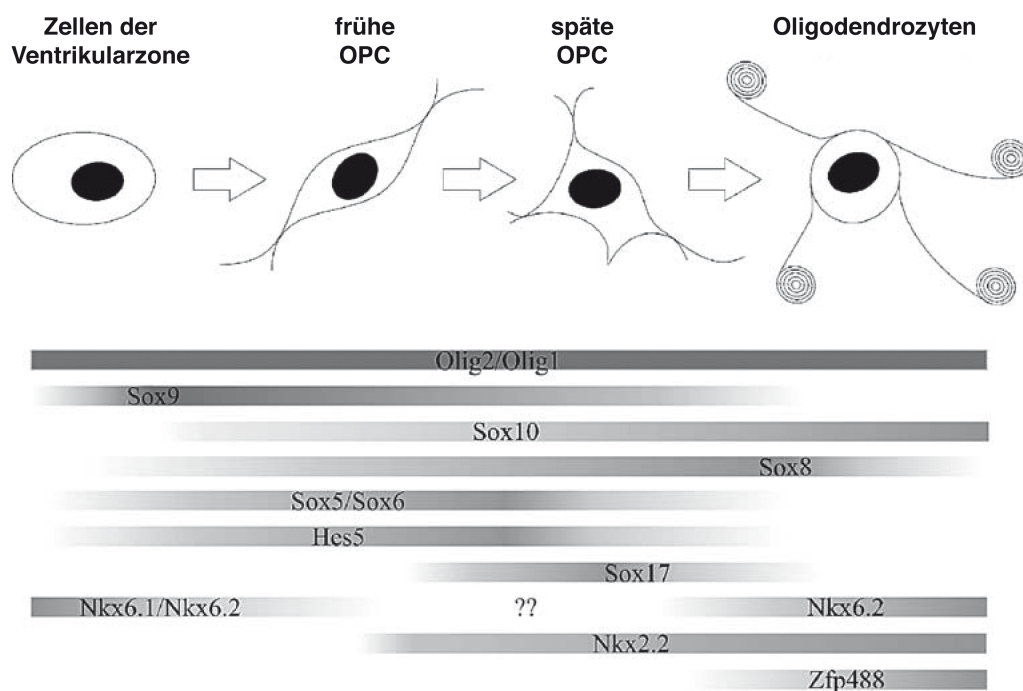


Abbildung 5: Transkriptionelle Kontrolle der Oligodendrozytenentwicklung

Die Entwicklung der Oligodendrozyten aus frühen Vorläuferzellen (*oligodendrocyte progenitor cells*, OPC) über späte OPC hin zu reifen Zelltypen unterliegt einer engen Kontrolle durch Transkriptionsfaktoren. Während Olig2 frühe Entwicklungsschritte bestimmt, ist die Expression von Olig1, Sox10 und Nkx2-2 essenziell für die terminale Differenzierung und Myelinisierung der Oligodendrozyten (Wegner, 2008).

Als früheste Transkriptionsfaktoren der oligodendroglialen Linie werden Olig1 und Olig2 exprimiert. Sie beeinflussen maßgeblich die gesamte Differenzierung (Lu et al, 2000; Zhou et

al, 2000). Studien an Mäusen mit Olig1 und Olig2 Null-Mutationen konnten zeigen, dass die Funktion von Olig2 während der frühen Entwicklungsphase der Oligodendrozyten essenziell ist, während Olig1 in der finalen Phase der Reifung hochreguliert wird und maßgeblich die terminale Differenzierung bestimmt (Arnett et al, 2004; Lu et al, 2002; Othman et al, 2011; Xin et al, 2005; Zhou & Anderson, 2002).

Olig2 ist in einem regulatorischen, transkriptionellen Netzwerk in der Lage, die Transkriptionsfaktoren Sox10 und Nkx2-2 zu induzieren und zu regulieren. Diese sind an der Regulation der Differenzierung und vor allem der Reifung der Oligodendrozyten beteiligt (Kuspert et al, 2011; Liu et al, 2007; Qi et al, 2001). Sox10 wirkt während der Ausreifung der Zellen zusammen mit dem engverwandten Protein Sox9. Tierexperimente konnten zeigen, dass weder der Verlust der Funktion von Sox9 noch derer von Sox10 einen Einfluss auf die Entstehung von Oligodendrozytenvorläuferzellen hat (Stolt et al, 2003; Stolt et al, 2002). Während der Ausreifung der Zellen hingegen ist Sox10 essenziell (Stolt et al, 2002).

Die mechanistischen Hintergründe der transkriptionellen Regulation der Oligodendrozyten-differenzierung sind unterschiedlich gut geklärt. Während der frühen Entwicklung induziert Olig2 PDGFR α , den wichtigsten Rezeptor in Oligodendrozytenvorläuferzellen zur Vermittlung von Überleben, Proliferation und Migration (Zhou et al, 2001). Auch für Sox9 und Sox10 konnte PDGFR α als mögliches gemeinsames Zielgen identifiziert werden (Finzsch et al, 2008).

Die reifungsfördernde Funktion von Olig1 geschieht dual. Auf der einen Seite wird die Expression myelinassoziierter Gene wie MBP, PLP und MAG stimuliert, auf der anderen Seite die Expression des astrozytären sauren Gliafaserproteins (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) unterdrückt (Xin et al, 2005). In diesem Netzwerk wurde das SMAD-interagierende Protein Sip1 (Weng et al, 2012) als ein direktes Zielgen sowohl von Olig1 als auch Olig2 beschrieben und darüber die Regulation der Myelinisierung durch Olig1/2 näher beleuchtet. Sip1 kann inhibitorische Signalwege, welche die Expression myelinassoziierter Gene blockieren, negativ regulieren. In frühen Oligodendrozyten ist Sip1 nicht exprimiert und wird erst in reifen Zellen unter der Coexpression von Olig1 und Olig2 induziert. Dort blockiert es die inhibitorischen Signalwege und ermöglicht die Expression myelinassoziierter Gene. Einen Hinweis auf eine duale Funktion von Olig1 während der terminalen Differenzierung der Oligodendrozyten lieferte zudem eine Studie, welche den Einfluss des Phosphorylierungsgrades von Olig1 auf dessen subzelluläre Lokalisation und die damit verbundene Funktion untersucht hat (Arnett et al, 2004). In proliferierenden Zellen liegt Olig1 unphosphoryliert im Zellkern vor und stimuliert die Expression myelinassoziierter Gene. Eine

Phosphorylierung hingegen ist für die Translokation des Proteins ins Zytoplasma verantwortlich. Dort scheint Olig1 an der Stimulation der Bildung von Myelinmembranen und der Oligodendrozytenreifung beteiligt zu sein (Niu et al, 2012).

Die terminale Oligodendrozytendifferenzierung wird durch die Sox10-vermittelte direkte Induktion und Regulation myelinassoziierter Gene wie MBP, PLP und MAG gefördert (Stolt et al, 2002). Der Transkriptionsfaktor Nkx2-2 ist ebenfalls essenziell für die terminale Differenzierung und scheint die Expression von PLP zu induzieren, ein direkter Effekt konnte bislang allerdings noch nicht nachgewiesen werden (Qi et al, 2001).

1.4.3 Regulatorische Signalwege während der Oligodendrozytenentwicklung

Die Entwicklung der Oligodendrozyten ist neben der transkriptionellen Kontrolle durch extrinsische Einflüsse überwacht. Dabei sind sowohl die inhibitorischen Signalwege wie der Notch-, BMP- und *wingless-type mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site family* (Wnt)-Signalweg als auch aktivierende wie der SHH-Signalweg bekannt. Darüber hinaus erscheint eine durch microRNA (miRNA) kontrollierte Regulation immer bedeutender. So können Übergänge zwischen unterschiedlichen Entwicklungsstadien reguliert werden.

Notch

Im sich entwickelnden ZNS spielt der Notch-Signalweg eine zentrale Rolle und ist essenziell für die Aufrechterhaltung undifferenzierter proliferierender neuraler Vorläuferzellen und verhindert deren frühzeitige neuronale Differenzierung (Louvi & Artavanis-Tsakonas, 2006; Yoon & Gaiano, 2005). Dabei ist der Signalweg abhängig von direkter Zell-Zell-Kommunikation. Die Aktivierung des Notch-Rezeptors erfolgt über die Bindung eines Liganden der Delta/Serrate/Lag2 Familie, der von der Oberfläche einer benachbarten Zelle präsentiert wird. Dies löst eine Spaltung des Notch-Rezeptors durch die Protease *a disintegrin and metalloprotease* (ADAM) aus. Dadurch werden eine γ -Sekretase-katalysierte Abspaltung der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors und deren Translokation in den Nukleus ermöglicht, wo die transkriptionelle Modulation der Zielgene stattfindet (Stockhausen et al, 2011). Als direkte Zielgene des Notch-Signalweges gelten in neuronalen Stammzellen unter anderem die *hairy and enhancer of split* (Hes) und *Hes-related with YRPM motif* (Hey) Proteine, welche pro-neurale Gene antagonisieren und neuronale Differenzierung regulieren können (Borghese et al, 2010; Kageyama et al, 2005; Yoon & Gaiano, 2005). Weiterhin ist bekannt, dass gliale Vorläuferzellen sowohl Hes1 als auch Hes5 exprimieren und durch deren Effekte zum einen in der Differenzierung in Oligodendrozyten oder Astrozyten, zum anderen in ihrem Differenzierungsfortschritt beeinflusst werden (Wu et al, 2003).

Während der Oligodendrozytenspezifikation und -reifung hat der Notch-Signalweg unterschiedliche Aufgaben. Die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen aus neuronalen Vorläufern wird durch einen aktiven Signalweg unterstützt, die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen erlaubt, die Differenzierung in reife Zelltypen und die Ausbildung von Myelin hingegen deutlich eingeschränkt (Park & Appel, 2003; Wang et al, 1998; Zhang et al, 2009).

BMP

BMPs gehören zu den sezernierten Proteinen der *transforming growth factor- β* (TGF- β) Familie und sind während der ZNS-Entwicklung an der Regulation vielfältiger Prozesse wie Proliferation, Zellspezifikation und Differenzierung beteiligt. Im sich entwickelnden Neuralrohr werden BMPs vorwiegend in dorsalen Regionen sezerniert und sind entscheidend für die Ausprägung dorsaler Vorläuferdomänen und die Inhibition ventralisierender Signale, beispielsweise ausgehend von SHH (Liem et al, 1995). Die Signalweiterleitung in den Zellkern erfolgt über die BMP Rezeptoren I und II und die Interaktion verschiedener Smad-Proteine, um dort die Transkription der Zielgene zu initiieren (Massaous & Hata, 1997; Wrana et al, 1994).

Die Regulation der BMPs kann über endogene Antagonisten wie Noggin, Chordin und Follistatin erfolgen. Diese binden BMPs und können somit deren Aktivität inhibieren (Fainsod et al, 1997; Piccolo et al, 1996; Zimmerman et al, 1996). Ein aktiver BMP Signalweg bewirkt eine verstärkte Expression von Proteinen der Inhibitor der Differenzierung (Id) Familie in unterschiedlichen Zelltypen, unter anderem in ESCs (Hollnagel et al, 1999; Miyazono & Miyazawa, 2002). Id Proteine interagieren mit basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Olig-Transkriptionsfaktoren und wirken so als dominant negative Regulatoren der Differenzierung (Benezra et al, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass Id2 and Id4 direkt mit Olig1 und Olig2 interagieren, deren Expression beeinflussen und somit den inhibitorischen Effekt von BMP auf die Oligodendrozyten-differenzierung vermitteln. Die Inhibition der Oligodendrozytenentstehung durch BMPs verläuft dabei zugunsten einer verstärkten Astroglionese (Chen et al, 2012; Cheng et al, 2007; Samanta & Kessler, 2004). Während der Reifung der Oligodendrozyten scheinen BMPs einen zusätzlichen inhibitorischen Effekt auf die Expression myelinassoziierter Gene auszuüben und ein Verharren der Zellen im Oligodendrozytenvorläuferstadium zu induzieren (Grinspan et al, 2000; See et al, 2004; See & Grinspan, 2009).

Wnt

Als weitere dorsal sezernierte Proteinfamilie mit inhibitorischem Einfluss auf die Oligodendrozytendifferenzierung sind die Wnt-Proteine beschrieben, die viele ähnliche Einflüsse auf die Entwicklung des ZNS ausüben wie BMPs. Die Wnt-Signalkaskade kann über einen kanonischen, β -Catenin abhängigen, und einen nicht kanonischen, β -Catenin unabhängigen, Signalweg erfolgen. Der kanonische Signalweg scheint die Regulation der Oligodendrozytendifferenzierung zu vermitteln (Komiya & Habas, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass ein aktiver Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Entwicklung von frühen Vorläuferzellen in unreife Oligodendrozyten inhibiert. Dabei wird weder die Proliferation von Vorläuferzellen beeinflusst, noch Zelltod oder Differenzierung in andere Zelltypen hervorgerufen. Während der fortschreitenden Differenzierung der Oligodendrozyten scheinen Übergänge von Vorläuferzellen zu reifen Zelltypen durch eine aktive Wnt-Kaskade reguliert zu sein, wobei Wnt die Differenzierung von pre-myelinisierenden Oligodendrozyten zu reifen Oligodendrozyten inhibiert (Fancy et al, 2009; Feigenson et al, 2009; Kim et al, 2008; Shimizu et al, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion des BMP- und Wnt Signalweges die Regulation der Oligodendrozytendifferenzierung vermittelt. Dabei ist der BMP Signalweg essenziell für eine inhibitorische Funktion von Wnt bezüglich der Oligodendrozytendifferenzierung (Feigenson et al, 2011). Eine mögliche molekulare Verbindung des BMP- und Wnt-Signalweges konnte durch die Identifikation des Smad-interagierenden Proteins Sip1 gefunden werden (Weng et al, 2012). Demnach vermindert Smad7, ein direktes Zielgen von Sip1, die Expression von β -Catenin und blockiert somit die inhibitorischen Effekte sowohl des BMP- als auch des Wnt-Signalweges.

SHH

In der Entwicklung des ZNS der Vertebraten spielt SHH als primärer aktivierender Ligand der Hedgehog Proteinfamilie eine zentrale Rolle (zusammengefasst in (Ingham & Placzek, 2006) und (Alvarez-Buylla & Ihrie, 2014)). SHH beeinflusst als Mitogen die Proliferation neuraler Zellen (Feijoo et al, 2011; Lai et al, 2003; Rapacioli et al, 2012) und das Zellüberleben (Rowitch et al, 1999) und als Morphogen die Entscheidung über unterschiedliche Zellschicksale (Fuccillo et al, 2006; Wilson & Maden, 2005).

Bindet sezerniertes SHH an das Oberflächenprotein Patched (PTCH), so wird die SHH-Signalkaskade ausgelöst. In Abwesenheit von SHH inhibiert PTCH das Transmembranprotein Smoothed (SMO). Durch Bindung von SHH wird PTCH inhibiert und die Inhibition von SMO aufgelöst. Die Transkription der SHH-Zielgene wird durch SMO über Transkriptions-

faktoren der GLI-Familie gesteuert. GLI1 dient dabei als konstitutiver Transkriptionsaktivator und zeigt eine starke SHH-Signalaktivität an (Alvarez-Buylla & Ihrie, 2014).

Die Oligodendrozytenentstehung und –Differenzierung wird durch SHH gefördert (Nery et al, 2001) (Orentas et al, 1999). So entstehen die meisten Oligodendrozyten *in vivo* aus der pMN-Domäne, die unter dem Einfluss hoher SHH-Konzentrationen ventral im Rückenmark positioniert ist (Pringle & Richardson, 1993; Richardson et al, 1997; Zhou & Anderson, 2002). Aber auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass sich unter dem Einfluss von SHH Oligodendrozyten sowohl aus murinen und humanen ESC (Billon et al, 2002; Hu et al, 2009a; Neman & de Vellis, 2012; Piao et al, 2015) als auch aus humanen fetalen Radialglia (Mo & Zecevic, 2009) differenzieren lassen.

microRNA

Während der Entwicklung des ZNS spielen miRNAs als transkriptionelle Regulatoren eine entscheidende Rolle, indem sie vielfältige Prozesse wie beispielsweise Proliferation, Zellspezifikation und Differenzierung kontrollieren. MiRNAs sind 20-25 Nukleotid lange, nicht-kodierende RNA-Fragmente, welche an die 3' nicht-translatierte Region ihrer Ziel-mRNAs binden und deren Translation oder Stabilität post-transkriptionell beeinflussen. Dabei bewirken miRNAs zumeist einen inhibitorischen Effekt auf ihre Ziel-mRNA, nur in wenigen Fällen konnte ein stimulierender Effekt beobachtet werden (Bartel, 2004; Bartel, 2009; Dugas et al, 2010).

Für einen korrekten Ablauf der Differenzierungsprozesse ist es entscheidend, positive und negative Regulatoren zu balancieren. In Studien an Nagern konnte gezeigt werden, dass miRNAs zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Differenzierung von Oligodendrozyten kritisch kontrollieren und regulieren und darüber hinaus selbst dynamisch reguliert sind (Abbildung 6). Sowohl während der frühen Zellspezifikation, als auch während der fortschreitenden Differenzierung und Myelinisierung ist die Aktivität von miRNAs essenziell (Dugas et al, 2010; Letzen et al, 2010; Zhao et al, 2010).

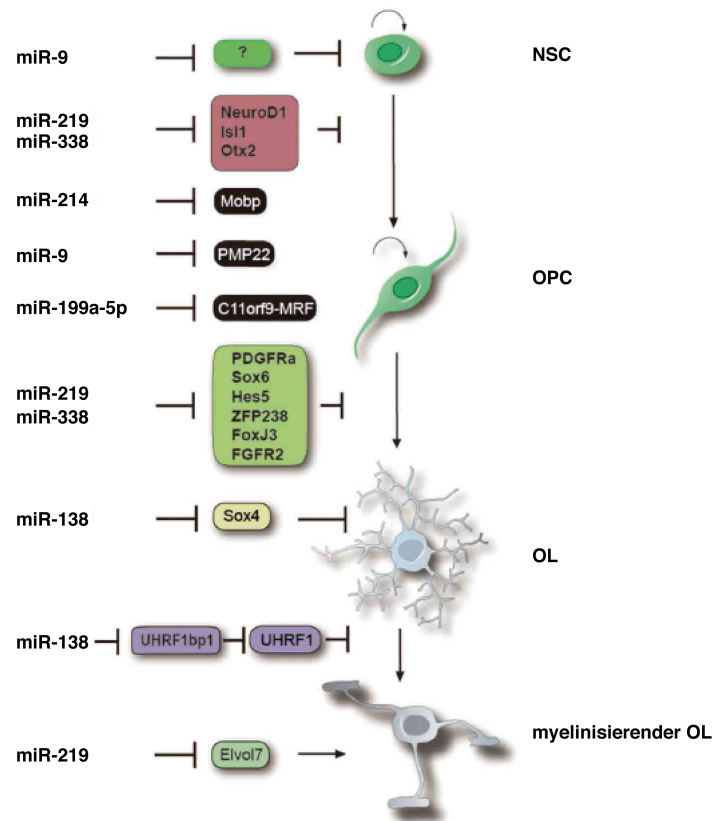


Abbildung 6: MicroRNA-vermittelte Kontrolle der Oligodendrozytendifferenzierung

MicroRNAs greifen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die oligodendrogliale Differenzierung ein und regulieren die gerichtete Differenzierung aus neuronalen Stammzellen (NSC) über Oligodendrozytenvorläuferzellen und unreife Oligodendrozyten (OL) in reife myelinisierende Zellen. Dies kann über die Inhibition pro-neuraler Transkriptionsfaktoren (NeuroD1, Isl1, Otx2), essenzieller Oligodendrozytenvorläufer Proteine (PDGFR α) sowie spezifischer Inhibitoren der oligodendroglialen Differenzierung (Sox6, Hes5) erfolgen (Barca-Mayo & Lu, 2012).

Sowohl die Oligodendrogenese als auch die Differenzierung in reife Zellstadien wird durch die Expression der miRNAs miR-219 und miR-338 begünstigt, indem bekannte negative Regulatoren der Oligodendrozytendifferenzierung wie Hes5 und Sox6 direkt inhibiert werden (Dugas et al, 2010; Zhao et al, 2010). Darüber hinaus konnten die Transkripte der Gene PDGFR α , Zinkfinger Protein (ZFP) 238, *forkhead box protein* (Fox) J3 und FGF Rezeptor (FGFR) 2 als Ziel-mRNAs identifiziert werden. Die Expression dieser Proteine erhält einen proliferativen Vorläuferstatus während der Oligodendrozytendifferenzierung aufrecht und blockiert somit ein Fortschreiten der Differenzierung. Zusätzlich konnten mRNAs der pro-neuralen Transkriptionsfaktoren NeuroD1, *islet* (Isl) 1 und *orthodenticle homeobox* (Otx) 2 als mögliche Ziele der miR-219 und miR-338 ermittelt werden. Bindung dieser mRNAs würde eine Inhibition der entsprechenden pro-neuralen Differenzierungsfaktoren und eine Begünstigung oligodendroglialer Differenzierung bewirken. Während der Oligodendrozytendifferenzierung wird die Expression einer weiteren miRNA, der miR-138, hochreguliert. Diese scheint während früher Entwicklungsphasen der Oligodendrozyten eine begünstigende

Wirkung auszuüben, allerdings die Differenzierung in reife Zellstadien zu verzögern (Dugas et al, 2010). Über welchen Mechanismus dieser Effekt erzielt wird, ist bislang unklar: vermutet wird eine duale Rolle zum einen über die Inhibition der Initiation der Oligodendrogenese und die der Ausreifung in myelinisierende Zelltypen. Als mögliche Ziel-mRNA wäre Sox4 denkbar, das Protein interagiert mit Sox6 während früher Phasen der Oligodendrozytendifferenzierung (Dugas & Notterpek, 2011). Zusätzlich zu miR-219, miR-138 und miR-338 wurden in Studien zwei weitere miRNAs mit stimulierendem Effekt auf die Oligodendrozytendifferenzierung identifiziert, miR-23a und miR-23b. Beide miRNAs reprimieren die Expression eines weiteren Inhibitors der Oligodendrozytendifferenzierung, Lamin B1 (Lin & Fu, 2009). Für miR-23a wurde darüber hinaus eine Beteiligung an der Myelinisierung des ZNS beschrieben (Lin et al, 2013).

In einer ersten Studie an humanen miRNAs während der oligodendroglialen Entwicklung aus hESC wurde gezeigt, dass in 8 von den Autoren definierten Stadien der Oligodendrozytenentwicklung ein distinktes Expressionsprofil von miRNAs zu beobachten ist. Innerhalb der untersuchten Zellstadien wiesen diese ein ähnliches Expressionsmuster auf, darunter miR-145, miR-199-3p, miR-214 und miR-205 (Letzen et al, 2010). Als mögliche Ziele der am stärksten regulierten miRNAs wurden myelinassoziierte mRNAs wie C11 *open reading frame* (orf) 9, *myelin gene regulatory factor* (Mrf), Claudin-11 (Cldn11), Myt1l und Mobp beschrieben. Darüber hinaus wurde eine starke Expression von miRNAs wie beispielsweise miR-184 beschrieben, welche die Astrogliogenese inhibieren. Keine der in Studien an Nagern als essenziell identifizierten miRNAs miR-23, miR-138, miR-219 und miR-338 spielte in den untersuchten, aus hESC gewonnen Zellen eine Rolle. Untersuchungen an akut aus der weißen Substanz isolierten humanen Oligodendrozyten zeigten dagegen, dass die miR-219 und miR-338 in diesen Zellen verstärkt exprimiert werden (de Faria et al, 2012). Die Ergebnisse der Studie an hESC-abgeleiteten Oligodendrozyten scheinen somit fraglich.

1.4.4 Oligodendrozytendifferenzierung *in vitro*

Um die molekularen Grundlagen der Oligodendrozytendifferenzierung oder oligodendrozytenassoziierter Erkrankungen zu untersuchen, ist die Kultivierung humaner Oligodendrozyten grundlegend. Eine mögliche Quelle stellt die Gewinnung oligodendroglialer Zellen unterschiedlicher Reifegrade aus primärem humanen Gewebe dar. So wurden bereits humane fetale und adulte Zellen kultiviert und in reife, myelinisierende Zelltypen differenziert (Windrem et al, 2004; Windrem et al, 2008; Zhang et al, 2000). Allerdings ist der Zugang zu primärem Gewebe eingeschränkt.

Aus diesem Grund wurden Differenzierungsprotokolle etabliert, welche die Gewinnung oligodendroglialer Zellen aus hPSC ermöglichen. Nistor und Kollegen publizierten 2005 ein Protokoll, in dem eine klassische RA-basierte Differenzierung (Bain et al, 1995; Wichterle et al, 2002) mit einem glialen Medium kombiniert wurde. Dieses Medium enthielt Komponenten wie Insulin, T3 und die Wachstumsfaktoren *epidermal growth factor* (EGF) und FGF-2 zur Unterstützung der Differenzierung und des Überlebens von Oligodendrozyten. Nach einer Differenzierungszeit von ca. 50 Tagen konnten Kulturen mit über 95 % an GalC- und O4-positiven Oligodendrozyten generiert werden, die nach Transplantation in die Shiverer-Maus kompaktes Myelin produzierten (Keirstead et al, 2005; Nistor et al, 2005).

Eine Weiterentwicklung dieses Protokolls durch Izrael *et al.* verfolgte den entwicklungsorientierten Ansatz der Induktion der oligodendroglialen Transkriptionsfaktoren NKX2-2, OLIG2 und SOX10 aus hESC zur Produktion hochgradig verzweigter, reifer humaner Oligodendrozyten *in vitro*. Der Einsatz des BMP Antagonisten Noggin an einem spezifischen Zeitpunkt des Differenzierungsprotokolls ermöglichte die Inhibition der neben NKX2-2 durch RA induzierte Expression von BMPs und infolgedessen die Expression von SOX10. Nach ca. 70 Tagen Differenzierung gelang die Generierung einer Kultur nahezu reiner expandierbarer O4-positiver Zellen mit Vorläufermorphologie, die *in vitro* nach terminaler Differenzierung zu ungefähr 40 % O4-positiven, differenzierten Oligodendrozyten und *in vivo* nach Transplantation in die Shiverer-Maus in myelinisierende Oligodendrozyten ausdifferenziert werden konnten (Izrael et al, 2007).

Hu und Kollegen nutzten den induzierenden Effekt von SHH, um durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NKX2-2, OLIG2 und SOX10 Oligodendrozytenvorläuferzellen und reife Oligodendrozyten des ventralen Rückenmarks zu generieren und zu charakterisieren. Innerhalb von 14 Wochen konnten die hESC in PDGFR α -positive Oligodendrozytenvorläuferzellen differenziert werden, welche nach weiteren 2-4 Wochen in verzweigte O4-positive Oligodendrozyten ausdifferenzierten. Nach Transplantation in die Shiverer-Maus reiften die Oligodendrozytenvorläufer zu reifen Oligodendrozyten heran und produzierten kompaktes Myelin (Hu et al, 2009a).

Wang und Kollegen haben die Protokolle von Izrael *et al.* und Hu *et al.* kombiniert und ein Differenzierungsschema entwickelt, um in 110-150 Tagen aus undifferenzierten humanen iPSC eine Mischpopulation aus Oligodendrozyten und Astrozyten zu generieren, welche nach Transplantation in die Shiverer-Maus die Myelinisierung des kongenital hypomyelinisierten Mausgehirns ermöglichten. Nach einer terminalen Differenzierungszeit von weiteren 3-4

Monaten konnte eine maximale Ausbeute an myelinisierenden Oligodendrozyten *in vitro* differenziert werden (Wang et al, 2013b).

Zwei neue Studien nutzen die duale Inhibition des SMAD-Signalweges (Chambers et al, 2009), um hESC bzw. hiPSC zu neuralisieren und anschließend oligodendrogial zu differenzieren (Douvaras et al, 2014; Piao et al, 2015).

Douvaras *et al.* beschreiben die Generierung myelinisierender Oligodendrozyten aus patientenspezifischen hiPSC unter dem Einfluss von RA und einem Agonisten des SHH-Signalweges (*smoothened agonist*, SAG). Dabei werden die adhärente Neuralisierung und oligodendrogiale Differenzierung durch eine kurze Phase einer Suspensionskultur unterbrochen. Nach 75 Tagen beschreiben die Autoren eine Effizienz von 44-70 % O4-positiver Zellen und eine Differenzierung in reife Oligodendrozyten nach 95 Tagen Kultur (Douvaras et al, 2014).

Piao *et al.* differenzieren hESC nach einer anfänglichen Neuralisierung unter dem Einfluss von FGF-8 und Purmorphamin, einem Agonisten von Smoothened. Nach mechanischer Isolation von Rosettenzellen werden diese nach 40 Tagen Kultur glial differenziert. Nach 100 Tagen Differenzierung sind 35 % der Zellen O4-positiv (Piao et al, 2015).

All diese Differenzierungen stellen zeitaufwändige Protokolle dar, die Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen auf direktem Wege aus hPSC differenzieren. Die Güte der resultierenden Zellen ist dabei immer wieder abhängig von der sensiblen Qualität der hPSC, wodurch die langwierigen Differenzierungen durch hohe Varianz gekennzeichnet sind.

1.5 Ziel der Arbeit

Die *in vitro* Untersuchung der humanen Oligodendrogenese sowie oligodendrozyten-assoziiierter Erkrankungen erfordert die Verfügbarkeit ausreichender Mengen humaner oligodendrogialer Zellen unterschiedlicher Reifegrade in stabiler Qualität. Die Nutzung primärer Zellen ist nur eingeschränkt möglich und basiert auf einer begrenzten Zugänglichkeit unterschiedlicher Quellen humanen Gewebes fetalen oder adulten Ursprungs. Vor diesem Hintergrund wurden in der Vergangenheit Differenzierungsparadigmen etabliert, welche die Nutzung humaner pluripotenter Stammzellen zur Genese oligodendrogialer Zellen ermöglichen. Alle bislang publizierten Studien gehen dabei einen direkten Differenzierungsweg von pluripotenten Stammzellen hin zu Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen. Diese Strategien beinhalten die ununterbrochene Differenzierung der pluripotenten Zellen über lange Zeiträume hinweg. Die Effizienz ist dabei abhängig von der Qualität der pluripotenten Stammzellen, welche sich *in vitro* als sensibel und anfällig erwiesen hat.

In der vorliegenden Arbeit sollte vor diesem Hintergrund eine Population neuronaler Vorläuferzellen aus humanen embryonalen sowie induziert pluripotenten Stammzellen generiert werden, welche über ein hohes oligodendrogiales Differenzierungspotenzial verfügt und somit als stabiles Intermediat zwischen pluripotenten Stammzellen und humanen Oligodendrozyten dienen kann. Somit sollte die *in vitro* Verfügbarkeit humaner oligodendrogialer Zellen sowohl aus humanen embryonalen als auch induziert pluripotenten Stammzellen ermöglicht werden, ohne dabei ein ständiges Zurückgreifen auf diese empfindlichen Zellen vorauszusetzen. Dies implizierte die Etablierung eines oligodendrogialen Differenzierungsprotokolls zur effizienten Herstellung humaner Oligodendrozyten.

Weiterführend sollten sowohl die gewonnenen Vorläuferzellen als auch die oligodendrogiale Differenzierung dieser Zellen weitreichend charakterisiert werden, um auf der einen Seite eine Bewertungsgrundlage für die Qualität neu etablierter Zelllinien zu schaffen. Auf der anderen Seite sollte dadurch eine Basis entwickelt werden, um sowohl den Einfluss unterschiedlicher Substanzen auf die oligodendrogiale Differenzierung testen als auch Unterschiede im Differenzierungspotenzial patientenabgeleiteter Zellen auffinden zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Hersteller

Abcam, Deutschland	Merck, Deutschland
Agilent Technologies, Deutschland	Millipore, Deutschland
Axxora, Deutschland	Miltenyi, Deutschland
Bayer Healthcare, Deutschland	Molecular Devices, Deutschland
BD Biosciences, Belgien	Nunc, Deutschland
Biometra, Deutschland	Olympus, Deutschland
BioRad, Deutschland	PAA, Deutschland
Carl Roth, Deutschland	PEQLAB, Deutschland
CellSystems, Deutschland	Pfizer, Deutschland
Corning Costar, USA	Promega, Deutschland
Covance, Deutschland	Qiagen, Deutschland
DAKO, Deutschland	R&D Systems, Deutschland
Dianova, Deutschland	RAD Source, USA
DSHB, USA	Sakura Finetek, Deutschland
DV Biologics, USA	Santa Cruz, USA
Eppendorf, Deutschland	Schott, Deutschland
Falcon/Becton Dickinson, Deutschland	Science Products, Deutschland
Greiner, Deutschland	Serva, Deutschland
Illumina, USA	Sigma-Aldrich, Deutschland
Invitrogen, Deutschland	StemCells, Inc, Großbritannien
Jena Optic, Deutschland	The Jackson Laboratory, USA
Kendro, Deutschland	Thermo Fischer, Deutschland
Laser Mells Griot, Deutschland	Wescor, Deutschland
Leica, Deutschland	Zeiss, Deutschland
Menzel, Deutschland	

2.2 Geräte

Alle Geräte, die im Folgenden nicht aufgeführt sind, gehörten zum allgemeinen Laborstandard.

Gerät	Hersteller	Gerät	Hersteller
Biological Irradiator RS 2000	RAD Source	ApoTom	Carl Zeiss
BioAnalyzer 2100	Agilent	IX 81 Konfokalmikroskop	Olympus
FACS® DiVa	BD Biosciences	Axioskop 2	Carl Zeiss
FACS® Calibur	BD Biosciences	Axiocam MRM	Carl Zeiss
Axopatch-200B Verstärker	Molecular Devices	ProgRes C14	Jena Optic
Digidata 1440	Molecular Devices	Mikroskoplaser	Laser Mells Griot
Illumina iScan	Illumina	Osmometer Vapro 5520	Wescor
Inkubator HERAccl	Kendro	Thermocycler T3000	Biometra
Kryostat CM3050S	Leica	iCycler	BioRad
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss	pH-Meter CG840	Schott
Axiovert 200M	Carl Zeiss	Nanodrop 1000	Thermo Fischer

2.3 Material

2.3.1 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Zellkulturschalen, Zentrifugenröhrchen, Zellsiebe und Zellschaber wurden von den Firmen BioRad, Corning Costar, Eppendorf, Falcon/Becton Dickinson, Greiner, Millipore und Nunc bezogen. Glasmaterialien wurden bei Schott und Menzel, Glaskapillare und Elektroden für die Elektrophysiologie (# GB150F-8P) bei Science Products erworben.

2.3.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien, die nachfolgend nicht aufgeführt sind, gehörten zum allgemeinen Laborstandard.

Chemikalie	Hersteller/Nr.	Chemikalie	Hersteller/Nr.
2-Mercaptoethanol	Invitrogen/31350-010	Insulin	Sigma-Aldrich/I6634
Alfazym	PAA/L11-012	Jervine	Sigma-Aldrich/J4145
Apo-Transferrin, human	Millipore/4452-01	Kaliumglukonat	Sigma-Aldrich/G4500
ATRA	Sigma-Aldrich/R2625	Ketanest S 25 mg/ml	Pfizer/Apotheke
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich/A4403	Kollagenase Typ IV	Invitrogen/17104019
B27	Invitrogen/17504044	Laminin	Sigma-Aldrich/L2020
B27 ohne Vitamin A	Invitrogen/12587-010	Matrigel	BD Bioscience/354230
BDNF	R&D/248-BD-025	Mg-ATP	Sigma-Aldrich/A9187
Biozytin	Sigma-Aldrich/B4261	N2-Supplement	PAA/F005-004
BSA Fraktion V (7,5 %)	Invitrogen/15260-037	Natrium Azid	Carl Roth/K305.1
CUR61414	Santa Cruz/sc-211143	Na-GTP	Sigma-Aldrich/51120
Cyclopamin	Sigma-Aldrich/C4116	Natrium Pyruvat MEM	Invitrogen/11360039
DAPI	Sigma-Aldrich/D9542	NEAA	Invitrogen/11140035
DEPC	Carl Roth/K028.2	NGS	Sigma-Aldrich/G6767
DNA Leiter 100 bp	PEQLAB/25-2010	NHS	Invitrogen/16050130
DNase (RNA)	Invitrogen/18068-015	Noggin	R&D/6057-NG
DNase (Zellkultur)	CellSystems/LS002140	Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich/P6148
dNTP Set	PEQLAB/20-2011	Pen/Strep	Invitrogen/15140-122
DMSO	Sigma-Aldrich/D2650	PDGF-AA	R&D Systems/221-AA-050
EGF, human	R&D/236-EG-01M	Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich/P-3655
EGTA	Carl Roth/3054.3	Propidiumiodid (PI)	Molecular Devices/P-21493
Ethidiumbromid	Carl Roth/2218.2	Rompun 2 %	Bayer/Apotheke
FCS	Invitrogen/10439024	SAG	Millipore/566660
FGF-2, human	R&D/Bulk 233-FB/CF	SHH	R&D/1314
FGF-8b	R&D/423-F8	SYBR Green	Sigma-Aldrich/S9430
bFGF	Invitrogen/13256-029	Taq DNA Polymerase	Invitrogen/10342-020
Fluorescein	BioRad/170-8780	Tissue-Tek®	Sakura Finetek/4583
Forskolin	Sigma-Aldrich/F6886	TriFast™	PEQLAB/30-2020
Einfrüermedium	Sigma-Aldrich/C2639	Trijod-L-Thyronin (T3)	Sigma-Aldrich/T551
Gelatine	Sigma-Aldrich/G-1890	Triton X-100	Sigma-Aldrich/T878
L-Glukose	Sigma-Aldrich/G8270	Trypsin-EDTA (TE)	Invitrogen/15400-054
Glutaraldehyd	Serva/23115.01	Trypsin-Inhibitor (TI)	Invitrogen/17075029
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen/25030024	VectaShield	Axxora/A-1000
GoTaq® Flexi	Promega/M8305	Y27632 (ROCK)	Merck/688000

2.3.3 Kits

Kit	Hersteller
iScript™cDNA Synthese Kit	BioRad
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit	Sigma-Aldrich
miScript Reverse Transcription Kit	Qiagen
miScript SYBR® Green PCR Kit	Qiagen

2.3.4 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
hESC Linie H9.2	Haifa, Israel (Amit et al. 2000)
hESC Linie I3	Haifa, Israel (Amit et al. 2000)
hESC Linie I6	Haifa, Israel (Amit et al. 2000)
hiPSC Linie iLB-C-35m-r4	Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn, Deutschland
hiPSC Linie iLB-C-31f-r1	Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn, Deutschland

2.3.5 Mausstämme

Mausstamm	Herkunft
Shiverer C3Fe.SWV-MBP ^{shi} /J	The Jackson Laboratory
Rag ^{-/-}	Haus für Experimentelle Therapie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Deutschland
shi/shi × rag ^{-/-}	Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn, Deutschland
CD1	Haus für Experimentelle Therapie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Deutschland
C57BL/6	Haus für Experimentelle Therapie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Deutschland

2.3.6 Primärantikörper

Epitop	Immunglobulin	Verdünnung	Hersteller
3CB2	Maus IgM	1:100	DSHB
4860	Ratte IgM	1:800	(Czopka et al, 2009)
BLBP	Kaninchen IgG	1:100	Abcam
CASPR	Kaninchen IgG	1:500	Abcam
CD19-PE	Maus IgG	1:150	BD Bioscience
CD133-APC	Maus IgG	1:20	Miltenyi
CD133-Biotin	Maus IgG	1:11	Miltenyi
GABA	Kaninchen IgG	1:700	Sigma-Aldrich
GFAP	Kaninchen IgG	1:1000	DAKO
vGLUT2	Kaninchen IgG	1:1000	Abcam
HO14	Ratte IgG	1:100	(Trojanowski et al, 1993)
Humane Nuclei	Maus IgG	1:100	Millipore
Ki67	Maus IgG	1:100	DAKO
MAP2AB	Maus IgG	1:200	Sigma-Aldrich
MBP	Ratte IgG	1:25	Abcam
Musashi	Kaninchen IgG	1:100	Millipore
Nestin	Kaninchen IgG	1:200	Millipore
Neurofilament	Kaninchen IgG	1:100	Sigma-Aldrich
NG2	Kaninchen IgG	1:100	Millipore
O4	Maus IgM	1:100	R&D Systems
OCT3/4	Kaninchen IgG	1:400	Santa Cruz
OLIG2	Kaninchen IgG	1:100	Millipore
SOX2	Maus IgG	1:100	R&D Systems
SOX9	Goat IgG	1:300	R&D Systems
STEM121	Maus IgG	1:1000	StemCells
TH	Maus IgG	1:1000	Sigma-Aldrich
TUBB3	Huhn IgG	1:1000	Millipore
TUBB3	Kaninchen IgG	1:1000	Covance
TUBB3	Maus IgG	1:1000	Covance
Vimentin	Maus IgM	1:100	Millipore

2.3.7 Sekundärantikörper

Epitop, Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-Maus IgG, Biotin	1:200	Dianova
anti-Ratte IgG, Biotin	1:200	Dianova
anti-Ratte IgM, Biotin	1:200	Dianova
Streptavidin, Cy3	1:450	Dianova
Streptavidin, Cy5	1:450	Dianova
anti-Maus IgG, Alexa 488/Alexa 555	1:1000	Invitrogen
anti-Maus IgM, Alexa 488/Alexa 555	1:1000	Invitrogen
anti-Kaninchen IgG, Alexa 488/Alexa 555	1:1000	Invitrogen
anti-Huhn IgG, Alexa 647	1:1000	Invitrogen
anti-Ratte IgG, FITC	1:250	Dianova

2.3.8 RNA

RNA	Katalognummer	Hersteller
Humanes fetales Hirn, Gesamt-RNA	540157	Agilent Technologies
Humanes fetales Rückenmark, Gesamt-RNA	pN002-r	DV Biologics

2.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

2.4.1 RT-PCR

Gen	Sequenz	Hybridisierungstemperatur	Produktgröße
<i>AQP4</i>	5'-GGAATTTCTGGCCATGCTTA-3' 5'-AGACTTGGCGATGCTGATCT-3'	60 °C	226 bp
<i>ASCL1</i>	5'-CGGCCAACAAAGAAGATGAGT-3' 5'-TGGAGTAGTTGGGGGAGATG-3'	60 °C	150 bp
<i>AXIN2</i>	5'-GGAGCTCTCCGAGACAGAGACAA-3' 5'-ACCAGGGTGC GG TAGGGGAT-3'	60 °C	123 bp
<i>BLBP</i>	5'-CCAGCTGGGAGAAGAGTTTG-3' 5'-CTCATAGTGGCGAACAGCAA-3'	62 °C	196 bp
<i>BMP2</i>	5'-TCCTTGC GCC CAGGTCCTTTGA-3' 5'-CATGGTCGACCTTTAGGAGACCGCA-3'	60 °C	109 bp
<i>BMP4</i>	5'-TATCTCGAGCCTGCAGCGCCAC-3' 5'-ACTACGGAATGGCTCCATAGGTCCC-3'	60 °C	125 bp
<i>BMPR1A</i>	5'-GATTCGGGCCCCACTTCGCC-3' 5'-CCCCTGCTTTTCTTACGACTCCTCC-3'	60 °C	221 bp
<i>CCND1</i>	5'-TCAAGTGTGACCCGGACTGCCT-3' 5'-GCGGCCCTTGGGGGTCCATGTTT-3'	60 °C	104 bp
<i>CD133</i>	5'-GCATTGGCATCTTCTATGGTT-3' 5'-CGCCTTGTCCTTGGTAGTGT-3'	60 °C	170 bp
<i>CXCR7</i>	5'-CTGCAGCCAGCAGAGCTCACA-3' 5'-GAGGCGGGCAATCAAATGACCTCC-3'	60 °C	138 bp
<i>DACH1</i>	5'-GTGAAAAACACCCCTCAGAA-3' 5'-CTTGTTCCACATTGCACACC-3'	60 °C	208 bp
<i>EGFR</i>	5'-CCAACTGCACCTACGGATGCAC-3' 5'-GCGCTTCCGAACGATGTGGC-3'	60 °C	168 bp
<i>EGR2</i>	5'-TTGACCAGATGAACGGAGTG-3' 5'-ACCAGGGTACTGAGGGTCAA-3'	60 °C	170 bp
<i>EMX1</i>	5'-CATTTCTACCCCTGGGTCT-3' 5'-TCTCGGAGAGGCTGAGACTG-3'	60 °C	232 bp
<i>EMX2</i>	5'-ACCTTCTACCCCTGGCTCAT-3' 5'-GCCACCACGTAGTGATTTCT-3'	60 °C	192 bp
<i>EN1</i>	5'-GACTCGCAGCAGCCTCTC-3' 5'-GCCTGGAACCTCCGCCTTG-3'	60 °C	179 bp
<i>FOXP1</i>	5'-CCCTCCCATTTCTGTACGTTT-3' 5'-CTGGCGGCTCTTAGAGAT-3'	60 °C	204 bp
<i>GAD1</i>	5'-GCTGGGGCTGCACTTGGCTT-3' 5'-CACCTCCCCAGGCAGCATCG-3'	60 °C	247 bp
<i>GAPDH</i>	5'-ATGACCCCTTCATTCACCTCAACT-3' 5'-ATACTTCTCATGGTTCACACCCAT-3'	60 °C	320 bp
<i>GBX2</i>	5'-CTCGCTGCTCGCCTTCTC-3' 5'-GCCAGTCAGATTGTCATCCG-3'	60 °C	169 bp
<i>GFAP</i>	5'-TCATCGCTCAGGAGGTCCCTT-3' 5'-CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT-3'	60 °C	383 bp

Material und Methoden

<i>GLAST</i>	5'-CTCACAGTCACCGCTGTCAT-3' 5'-CCATCTTCCCTGATGCCTTA-3'	58 °C	202 bp
<i>GLI1</i>	5'-GGCTGCAGTAAAGCCTTCAGCAAT-3' 5'-TGCAGCCAGGGAGCTTACATACAT-3'	60 °C	100 bp
<i>GPM6A</i>	5'-TGAGATGGCAAGAACTGCTG-3' 5'-CCAGGCCAACATGAAAAGAT-3'	60 °C	238 bp
<i>HES5</i>	5'-GCCCAGGGTTCTATGATATT-3' 5'-GAGTTCGGCCTTCACAAAAG-3'	60 °C	152 bp
<i>HOP</i>	5'-GCATTGACAGCTTCACTCCA-3' 5'-GGAAATGCTAGCCACACCAT-3'	60 °C	239 bp
<i>HOXA2</i>	5'-TTCAGCAAAATGCCCTCTCT-3' 5'-TAGGCCAGCTCCACAGTTCT-3'	60 °C	176 bp
<i>HOXB2</i>	5'-TTTAGCCGTTGCTTAGAGG-3' 5'-CGGATAGCTGGAGACAGGAG-3'	60 °C	173 bp
<i>HOXB4</i>	5'-ACACCCGCTAACAAATGAGG-3' 5'-GCACGAAAGATGAGGGAGAG-3'	60 °C	187 bp
<i>HOXB6</i>	5'-GAACTGAGGAGCGGACTCAC-3' 5'-CTGGGATCAGGGAGTCTTCA-3'	60 °C	153 bp
<i>HOXC11</i>	5'-AAAGGAGCCGCCCAACGC-3' 5'-AAGGGCCCGTCTGCAGGT-3'	60 °C	267 bp
<i>HOXC5</i>	5'-CCCCACAGTTGCTCTATGCT-3' 5'-GCCTCTAGGACCACTTGCTG-3'	60 °C	178 bp
<i>HOXD8</i>	5'-CCGTGGATGAGACCACAAGCAGC-3' 5'-CACCTCCTGCCGGGAAACGG-3'	60 °C	246 bp
<i>HOXD9</i>	5'-GCTTGCAGCGACCACCCGAT-3' 5'-CGGCGGGGTTGTTGGGTCA-3'	60 °C	100 bp
<i>ID2</i>	5'-CCCTGTGGACGACCCGATGA-3' 5'-ATTCAGAAGCCTGCAAGGACAGGA-3'	60 °C	279 bp
<i>ID4</i>	5'-GCCACCATCCCGCCCAAC-3' 5'-GCGGCCGCACACCTGGA-3'	60 °C	276 bp
<i>IRX3</i>	5'-ACGAGGAGGGAAACGCTTAT-3' 5'-CGCCGTCTAAGTTCTCCAAA-3'	60 °C	186 bp
<i>ISL1</i>	5'-TCCCTATGTGTTGGTTGCGGCA-3' 5'-GCGCATTGATCCCGTACAACCTGA-3'	60 °C	197 bp
<i>MAL</i>	5'-CTTCGGGGGCCTGGTGTGGAT-3' 5'-GTGGTAGGCTGCGTCCAAGGTGA-3'	60 °C	181 bp
<i>MAG</i>	5'-TCTGCACCCGAGGAACCTCT-3' 5'-GCCTCTCGCTCTCGTACTTCTCTGG-3'	60 °C	267 bp
<i>MBP</i>	5'-GAGCCCTCTGCCCTCTCATGCC-3' 5'-TCAGGGACAGTCTCTCCCCCTTCCC-3'	60 °C	215 bp
<i>MNX1</i>	5'-CTCGTACCCGCAGGTGCAAGG-3' 5'-GCCTGGGAGTTGAAGTCGGGCA-3'	60 °C	147 bp
<i>MOG</i>	5'-TCCCCACTTTCTGAGGGTGCCC-3' 5'-GAGTAGCTCTTCAAGGAATTGCCCTGC-3'	60 °C	139 bp
<i>MYT1</i>	5'-GCTGTGTGGGGCTCGGTAC-3' 5'-GGTGGGGCAGGTCCGTCTT-3'	62 °C	155 bp
<i>Nanog</i>	5'-CCTGTGATTTGTGGGCCCTG-3' 5'-GACAGTCTCCGTGTGAGGCAT-3'	60 °C	78 bp
<i>Nestin</i>	5'-CAGCGTTGGAACAGAGGT-3' 5'-TGGCACAGGTGTCTCAAGGGTAC-3'	60 °C	389 bp
<i>NG2</i>	5'-ACTTGCATCCGCGGCTTCTTCTT-3' 5'-ACAACGTGGCCCAGCCCTCTA-3'	60 °C	296 bp
<i>NKX2-1</i>	5'-CGCATCCAATCTCAAGGAAT-3' 5'-TGTGCCAGAGTGAAGTTTG-3'	60 °C	170 bp
<i>NKX2-2</i>	5'-TCTACGACAGCAGCGACAAC-3' 5'-TTGTCAATTGTCCGGTGACTC-3'	62 °C	154 bp
<i>NKX6-1</i>	5'-CCTGGCCTGTACCCCTCATCAA-3' 5'-TCTCGGGCCCCGCCAAGTAT-3'	60 °C	143 bp
<i>NKX6-2</i>	5'-CGCGTCTCGCCTACTCGCTG-3' 5'-GCGGGTCTCACAAGGCGTC-3'	60 °C	307 bp
<i>OLIG1</i>	5'-AGAGCGAGGCCGAGCAAGGA-3' 5'-AAGCGCGCAACTCCAGGGAC-3'	60 °C	228 bp

<i>OLIG2</i>	5'-GCTGCGTCTCAAGATCAACAG-3' 5'-CACCAGTTCGCTTCATCTCCTC-3'	60 °C	196 bp
<i>OTX2</i>	5'-TGCAGGGGTTCTTCTGTGAT-3' 5'-AGGGTCAGAGCAATTGACCA-3'	60 °C	234 bp
<i>PAX2</i>	5'-GGCTGTGTCAGCAAAATCCT-3' 5'-CTGGGCACTGTGTTCATTTGTC-3'	60 °C	206 bp
<i>PAX3</i>	5'-GCCAATCAACTGATGGCTTT-3' 5'-AGCGGTTGAGGTCTGTGAAC-3'	60 °C	164 bp
<i>PAX6</i>	5'-GTGTCCAACGGATGTGTGAG-3' 5'-CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC-3'	60 °C	254 bp
<i>PAX7</i>	5'-CCAAGATTCTTTGCCGCTAC-3' 5'-GATCTCCCAGCTGAACATGC-3'	60 °C	149 bp
<i>PDGFRα</i>	5'-CTATCCACACTGTCAAACAGGTTG-3' 5'-ACTGCTGGACTGAGAAGTTTCATC-3'	60 °C	454 bp
<i>PLP</i>	5'-CTGCTCACCTTCATGATTGC-3' 5'-TGACTTGCAGTTGGGAAGTC-3'	60 °C	343 bp
<i>PLZF</i>	5'-CTATGGGCGAGAGGAGAGTG-3' 5'-TCAATACAGCGTCAGCCTTG-3'	60 °C	152 bp
<i>PMP2</i>	5'-CAAGCTAGGCCAGGAATTTG-3' 5'-CCACGCCCTTCATTTTACAT-3'	60 °C	176 bp
<i>POU3F3</i>	5'-GTTCTCGCAGACCACCATCT-3' 5'-CGATAGAGGTCCGCTTCTTG-3'	60 °C	179 bp
<i>PTCH1</i>	5'-GCTTCCCCTGCTTTTGTCTT-3' 5'-TCCTGCAGCTCAATGACTTC-3'	60 °C	792 bp
<i>REX1</i>	5'-GCACACTAGGCAAACCCACC-3' 5'-CATTTGTTTCAGCTCAGCGATG-3'	60 °C	77 bp
<i>RFX4</i>	5'-TCTGAGACGGCAAACATCAC-3' 5'-GACTCGATGGGAGACTGCTC-3'	60 °C	231 bp
<i>OCT4</i>	5'-AGTGAGAGGCAACCTGGAGA-3' 5'-GTGAAGTGAGGGCTCCATA-3'	60 °C	273 bp
<i>S100β</i>	5'-AAAGAGCAGGAGGTTGTGGA-3' 5'-AGGAAAGGTTTGGCTGCTTT-3'	60 °C	161 bp
<i>SOX10</i>	5'-ATCCAGGCCCACTACAAGAG-3' 5'-GAAGTCGATGTGAGGCTTCC-3'	62 °C	213 bp
<i>SOX2</i>	5'-GTATCAGGAGTTGTCAAAGGCAGAG-3' 5'-TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC-3'	60 °C	78 bp
<i>SOX9</i>	5'-GACTCGCCACACTCCTCCT-3' 5'-CTCGATGTTGGAGATGACG-3'	62 °C	234 bp
<i>TH</i>	5'-GAGTACACCGCCGAGGAGATTG-3' 5'-GCCGATATACTGGGTGCACTGG-3'	60 °C	279 bp
<i>TUBB3</i>	5'-GCAACTACGTGGGCGACT-3' 5'-GGCCTGAAGAGATGTCCAAA-3'	60 °C	160 bp
<i>VGLUT1</i>	5'-CTGCCGCAGCTGGACGTTCT-3' 5'-GCCGAAGCCTCCGCAGTTCA-3'	60 °C	223 bp
<i>VGLUT2</i>	5'-CGCGGGGGCAAGGTCATCAA-3' 5'-TGGCAGCTCCGAAAACCCTGT-3'	60 °C	160 bp
<i>Vimentin</i>	5'-GGAAGAGAAGTTTGGCCGTTG-3' 5'-TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT-3'	56 °C	174 bp
<i>WNT1</i>	5'-TGCCAACAGCAGTGGCCGAT-3' 5'-CCGTTTCTCGACAGCCTCGGT-3'	60 °C	293 bp

2.4.2 Quantitative PCR

Gen	Sequenz	Hybridisierungstemperatur
<i>18S</i>	5'-TTCTTGGACCGGCCAAG-3' 5'-GCCGCATCGCCGGTCGG-3'	60 °C
<i>CD133</i>	5'-GCATTGGCATCTTCTATGGTT-3' 5'-CGCCTTGTCTTGGTAGTGT-3'	60 °C
<i>MBP</i>	5'-ATCCAAGTACCTGGCCACAG-3' 5'-GGAGCCGTAGTGAGCAGTTC-3'	60 °C

NG2	5'-GCCACCTCTGGAAGAACAAA-3' 5'-TGACCTGGAAGAGCACATCA-3'	60 °C
NKX6.1	5'-GCCTGGCCTGTACCCCTCATCA-3' 5'-GCTGTCCGGAAAAAGTGGGTCTCG-3'	60 °C
NKX6.2	5'-CCGAGAGCCAGGTGAAGGTCTG-3' 5'-TGCTTCTTCTTGGCCGACGC-3'	60 °C
OLIG1	5'-GTCCCTGGAGTTGCGCGCTT-3' 5'-CTCGGGGATGGCCTCTCGCT-3'	60 °C
OLIG2	5'-GACAAGCTAGGAGGCAGTGG-3' 5'-CGGCTCTGTCATTGCTTCT-3'	60 °C
SOX10	5'-ACCGCACACCTTGGGACACG-3' 5'-CAACGCCACCTCCTCGGAC-3'	60 °C

2.5 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °C in 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

Falls nicht abweichend erwähnt, wurden humane embryonale Stammzellen (*human embryonic stem cells*, hESC) und humane induziert pluripotente Stammzellen (*human induced pluripotent stem cells*, hiPSC) bei 4 °C und 130 × g für 3 min zentrifugiert, alle anderen Zelltypen bei 4 °C und 300 × g für 4 min.

Alle Grundmedien, Natrium-Pyruvat-Lösung, NEAA-Lösung, L-Glutamin-Lösung, 2-Mercaptoethanol-Lösung, Serum Replacement, Electro-Neurobasal Medium, fetales Kälberserum (FCS) sowie PBS wurden von Invitrogen bezogen.

2.5.1 Medien

MEF Medium

D-MEM
10 % FCS, hitzeinaktiviert
1 mM Natrium Pyruvat
0,1 mM NEAA
1 mM L-Glutamin

EB Medium

D-MEM/F12
0,8 g/l L-Glukose
0,5 % N2-Supplement
0,01 mg/ml Insulin
0,05 mg/ml humanes apo-Transferrin

hPSC Medium

Knock-out D-MEM
20 % Knock-out Serum Replacement
0,1 mM NEAA
1 mM L-Glutamin
0,1 mM 2-Mercaptoethanol
4 ng/ml bFGF

RGL-NPC Medium

D-MEM/F12
1,6 g/l L-Glukose
1 % N2-Supplement
0,02 mg/ml Insulin
0,1 mg/ml humanes apo-Transferrin

2.5.2 Reagenzien

Kollagenase Typ IV (1 mg/ml)

Kollagenase Typ IV wurde in Knock-out D-MEM gelöst, steril filtriert und nicht länger als eine Woche bei 4 °C gelagert.

Gelatine (0,1 %)

0,5 g Gelatine wurden in 500 ml H₂O autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Matrigel (MG)

MG wurde auf Eis bei 4 °C über Nacht aufgetaut. 1 ml MG wurde mit einer vorgekühlten Pipette in 29 ml gekühltes DMEM/F12 Medium überführt und gemischt.

Trypsin-EDTA (TE)

0,5 % Trypsin/EDTA Stock-Lösung wurde mit PBS zur gewünschten Konzentration verdünnt und bei 4 °C gelagert.

Poly-L-Ornithin (PO, 15 µg/ml)

- Stock-Lösung (1,5 mg/ml):
100 mg PO wurden in 67 ml ddH₂O gelöst, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.
- Arbeitslösung: Die Stock-Lösung wurde 1:100 in ddH₂O verdünnt und bei 4 °C gelagert.

2.5.3 Zellkultur-Stocklösungen

Reagenz	Konzentration und Lösungsmittel	Lagerung
ATRA (Retinsäure)	10 mM in DMSO	-80 °C
Apo-Transferrin	10 mg/ml in ddH ₂ O	-20 °C
Ascorbinsäure	100 mM in ddH ₂ O	-20 °C
BDNF	10 µg/ml in 0,1% BSA in PBS	-20 °C
CUR61414	1 mM in DMSO	-20 °C
Cyclopamin	5 mM in DMSO	-20 °C
EGF	10 µg/ml in 0,1% BSA/10 mM Eisessig in ddH ₂ O	-20 °C
bFGF	10 µg/ml in 0,1% BSA in PBS	-20 °C
FGF-2	10 µg/ml in 0,1 BSA in PBS	-20 °C
FGF-8b	100 µg/ml in 0,1 % BSA in PBS	-20 °C
Forskolin	0,01 M in Ethanol	-20 °C
Insulin	5 mg/ml 10 mM Natriumhydroxid	-20 °C
Jervine	10 mM in Ethanol	-20 °C
Noggin	100 µg/ml in PBS	-20 °C
PDGF-AA	10 µg/ml in 0,1% BSA/4 mM HCl in ddH ₂ O	-20 °C
SAG	1 mM in ddH ₂ O	-20 °C
SHH	100 µg/ml in 0,1 % BSA in PBS	-20 °C
Trijod-L-Thyronin (T3)	30 µg/ml in 0,33 M Natriumhydroxid	-80 °C
Y27632	10 mM in ddH ₂ O	-20 °C

2.5.4 Beschichtungen von Zellkulturschalen

Reagenz	Beschichtung
Poly-L-Ornithin (PO, 15 µg/ml)	Zellkulturschalen wurden mit PO Arbeitslösung bedeckt und über Nacht bei 37 °C inkubiert (PO-Schalen). Vor dem Gebrauch der Schalen wurde die PO-Lösung abgenommen und die Schalen zweimal mit PBS gewaschen.
Gelatine (0,1%)	Zellkulturschalen wurden mit Gelatine Lösung bedeckt und mindestens 20 min bei 37 °C inkubiert.
Laminin (Ln)	PO-Schalen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit einer 2 µg/ml Ln-Lösung in PBS für 4 h bis über Nacht bei 37 °C beschichtet (PO/Ln-Schalen).
Matrigel (MG)	MG wurde über Nacht auf Eis bei 4 °C aufgetaut und 1 ml mit einer vorgekühlten Pipette in 29 ml gekühltem DMEM/F12 Medium gelöst. Zellkulturschalen wurden mit der verdünnten Matrigellösung für 4 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C beschichtet

2.5.5 Gewinnung primärer embryonaler muriner Fibroblasten

Embryonale Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF) wurden aus Mausembryonen des Embryonalstadiums E13,5 bis E14,5 gewonnen. Dazu wurde ein trächtiges Weibchen des Mausstammes CD1 13 Tage nach Verpaarung durch zervikale Dislokation getötet und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Uterushörner wurden isoliert, die Embryonen von Plazenta und umgebenden Gewebe befreit und in eine Petrischale mit PBS überführt. Die Gehirne und Organe wurden mit einem Skalpell entfernt, das verbleibende Gewebe in frisches PBS überführt und weitestgehend von Blut befreit. Das Gewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert und in einem Reaktionsgefäß mit 0,075 % Trypsin/EDTA (TE) und Glasperlen (Ø 4 mm) auf einem Magnetrührer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe eines gleichen Volumens an MEF-Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb filtriert, die Glasperlen und das Zellsieb mit PBS gespült und alle Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden gezählt und in einer Konzentration von 5×10^6 /15 cm Zellkulturschale in MEF Medium ausplattiert und kultiviert.

Konfluente Zellen wurden enzymatisch mit 0,05 % TE abgelöst, durch Zentrifugation gesammelt und in 1× MEF-Einfriermedium als Passage 0 (P0) eingefroren bzw. direkt zur Expansion genutzt (siehe 2.5.6).

1× MEF-Einfriermedium

D-MEM
20 % FCS (hitzeinaktiviert)
10 % DMSO
gekühlt

2.5.6 Mitotische Inaktivierung primärer muriner Fibroblasten

Die mitotische Inaktivierung der MEF erfolgte mittels Bestrahlung mit γ -Strahlen. Frisch präparierte MEF bzw. eingefrorene P0 MEF wurden bis zur Passage 3 expandiert. Ein Kryoröhrchen mit eingefrorenen Zellen wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in vorgewärmtem MEF Medium aufgenommen, durch Zentrifugation sedimentiert und auf 3×15 cm Zellkulturschalen in frischem MEF Medium als Passage 1 (P1) ausplattiert. Frisch präparierte MEF wurden mit 0,05 % TE abgelöst, die enzymatische Reaktion mit MEF Medium gestoppt, die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in einem Verhältnis von 1:3 in frischem MEF Medium ausplattiert. Konfluente Zellen wurden mit 0,05 % TE auf 10×15 cm Zellkulturschalen als P2 und im Anschluss auf 30×15 cm Zellkulturschalen als P3 expandiert. Das Medium wurde während der Expansion alle 2-3 Tage erneuert. Zellen von konfluenten P3 Zellkulturschalen wurden mit 0,05 % TE gelöst, die Reaktion mit MEF Medium gestoppt und die Zellen mittels Zentrifugation gesammelt. Die Zellen wurden in 30 ml MEF gesammelt und in eine T175 cm² Zellkulturflasche mit geschlossenem Deckel überführt. Die mitotische Inaktivierung erfolgte durch Bestrahlung der Zellen mit 15 Gy in einem γ -Bestrahlungsgerät (160 kV, 25 mA für 6 min, 45 s).

Einfrieren bestrahlter muriner Fibroblasten

Die γ -bestrahlten MEF (γ -MEF) wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, die Zellzahl bestimmt und die Zellen sedimentiert. Je $2,4 \times 10^6$ Zellen wurden in 1 ml pro Kryoröhrchen eingefroren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in der Hälfte des entsprechenden Volumens an DMEM Grundmedium gelöst, sukzessive mit 2× MEF gekühltem Einfriermedium gemischt, in Kryoröhrchen gefüllt und in eine auf -20 °C vorgekühlte Styroporbox überführt. Nach 1 h bei -20 °C wurden die Zellen über Nacht bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2× MEF Einfriermedium

D-MEM

40 % FCS (hitzeinaktiviert)

20 % DMSO

2.5.7 Präparation primärer Astrozyten

Primäre Astrozyten wurden aus 3 Tage alten Jungtieren des Mausstammes C57BL/6 gewonnen. Die Jungtiere wurden unter sterilen Bedingungen dekapitiert und die cerebralen Cortices in kaltem PBS auf Eis isoliert. Die Meningen wurden komplett entfernt. Die Cortices wurden vorsichtig 5× mit einer 5 ml Plastikpipette in 0,05 % TE mit 50 μ g/ml DNase trituriert und anschließend für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Zelllösung wurde erneut trituriert, die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 10 ml MEF Medium gestoppt und die Zellen anschließend durch ein Zellsieb pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und in einem Verhältnis von Zellen aus 3-4 Hirnen pro gelatinebeschichteter T75 cm² Zellkulturflasche in MEF Medium mit 1 % Pen/Strep ausplattiert. Das Medium wurde am nächsten Tag gewechselt und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium erneuert. Konfluente Astrozyten wurden mit 0,05 % TE in einem Verhältnis von 1:3 passagiert.

Die mitotische Inaktivierung erfolgte durch Bestrahlung mit γ -Strahlung spätestens in Passage 3. Zu diesem Zweck wurden die Zellen auf matrigelbeschichtete Zellkulturschalen ausplattiert

und adhärent in MEF Medium mit 15 Gy bestrahlt (160 kV, 25 mA für 6 min, 45 sec). Nach der Bestrahlung wurde das Medium gewechselt und die Astrozyten weiter kultiviert.

2.5.8 Kultur humaner embryonaler und humaner induziert pluripotenter Stammzellen

hESC und hiPSC wurden nach Standardprotokollen in hPSC Medium auf einem Zellrasen aus γ -MEF kultiviert (Thomson et al, 1998). Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert, das Medium täglich erneuert.

Einen Tag vor dem Passagieren der hESC bzw. hiPSC wurden γ -MEF in einem Verhältnis von einem Kryoröhrchen auf zwei gelatinebeschichtete 6-Well Zellkulturplatten in MEF Medium aufgetaut. Dazu wurden die gefrorenen MEF bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in 10 ml vorgewärmtem MEF Medium aufgenommen und durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden in frischem MEF Medium resuspendiert, auf die 6-Well Zellkulturplatten überführt und über Nacht kultiviert.

Am nächsten Tag wurden die hESC- bzw. hiPSC-Kolonien mit 1 mg/ml Kollagenase-Lösung für 60 min bei 37 °C abgelöst, mit PBS abgespült und durch Zentrifugation sedimentiert. Die hESC/hiPSC wurden mechanisch durch wiederholtes Auf-und Abpipettieren mit einer 1 ml Feinpipette zerkleinert und in einem Verhältnis von 1:3-1:5 in hPSC Medium auf die vorbereiteten γ -MEF überführt.

Undifferenzierte hESC und hiPSC wurden als Einzelzellen eingefroren. Zu diesem Zweck wurden die Kulturen zunächst für 45 min bei 37 °C mit 10 μ M Rho Kinase Inhibitor Y (Y27632, ROCK Inhibitor) behandelt, anschließend einmal mit PBS gewaschen und in Alfacym inkubiert, bis einzelne hESC/hiPSC-Zellen durch sanftes Klopfen von der Schale gelöst werden konnten. Die Zellen wurden mit PBS abgespült, zur Einzelzellsuspension trituriert und durch Zentrifugation sedimentiert (210 \times g, 5 min, 4 °C). Die Zellen wurden in hESC/hiPSC Einfriermedium resuspendiert und langsam auf -80 °C eingefroren, wobei Zellen aus einem Well einer 6-Well Zellkulturplatte in 1 ml in ein Kryoröhrchen eingefroren wurden. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

hESC/hiPSC Einfriermedium

90 % Knock-out Serum Replacement
10 % DMSO

Einen Tag vor dem Auftauen der hESC/hiPSC wurden 6-Well Zellkulturplatten wie oben beschrieben mit frischen γ -MEF bestückt. Gefrorene hESC/hiPSC wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 9 ml vorgewärmtem hPSC Medium aufgenommen und sedimentiert (5 min, 210 \times g, 4 °C). Ein Kryoröhrchen wurde auf eine 6-Well Zellkulturplatte mit γ -MEF in frischem hPSC Medium mit 10 μ M ROCK Inhibitor ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, ohne ROCK Inhibitor zuzugeben.

2.5.9 Kultur der neuralen Stammzellen

Aus hESC und hiPSC abgeleitete neurale Stammzellen (*radial glia like (RGL) neural stem cells*, NSC; hESC-RGL-NPC, hiPSC-RGL-NPC) wurden in RGL-NPC Medium unter dem Einfluss von je 20 ng/ml EGF und FGF-2 auf PO/Ln beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. An einem Tag wurde das Medium gewechselt, am nächsten Tag wurden die Faktoren erneut dem Medium zugegeben. Konfluente Zellen wurden mit 0,025 % TE und 50 % Trypsin Inhibitor (TI, in PBS) in einem Verhältnis von 1:2 passagiert. Konfluente Schalen wurden in Einfriermedium eingefroren.

Zur Ermittlung der Verdopplungszeit wurden definierte Zellzahlen auf mit PO/Ln beschichtete Zellkulturschalen ausplattiert und die Zellzahl nach 24, 48, 72 und 96 h erneut bestimmt. Die Verdopplungszeit wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Verdopplungszeit} = (t_2 - t_1) * \frac{\log(2)}{\log(q_2 - q_1)}$$

wobei t=Zeit; q= Zellzahl.

Zur Ermittlung des Einflusses des SHH-Signalweges auf die Proliferation der RGL-NPC wurden diese mit 1 µM SAG bzw. 5 µM Cyclopamin über 2 Passagen unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 proliferiert. Anschließend wurde der Anteil der Ki67-positiven Zellen mittels Immunzytochemie untersucht.

2.5.10 Differenzierungsprotokolle

Neurale Differenzierung

Pluripotente Stammzellen wurden als Embryoidkörper (*embryoid bodies*, EB) nach dem in Abbildung 7 dargestellten Protokoll zu neuralen Linien differenziert.

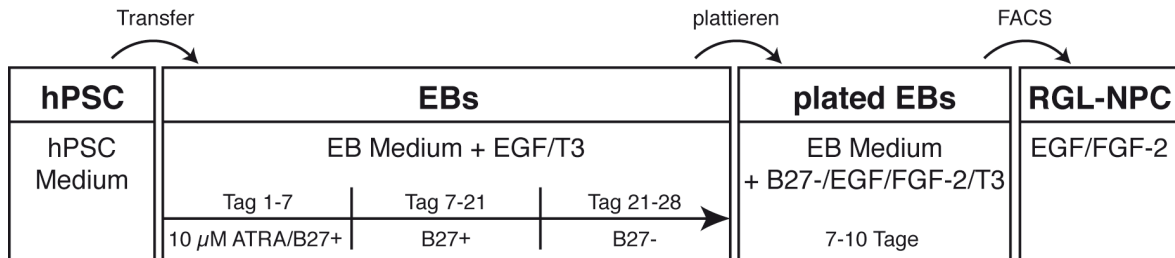


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung der RGL-NPC

hESC/hiPSC-Kolonien wurden mit 1 mg/ml Kollagenase-Lösung gelöst und in hPSC Medium auf unbeschichteten Petrischalen über Nacht kultiviert, um Einzelzellen und überführte γ-MEF zu entfernen. Am folgenden Tag wurden alle nicht-adhärenen Aggregate auf nicht-adhäsive Zellkulturschalen überführt und für 7 Tage in hPSC Medium kultiviert, um die EB Formierung zu unterstützen. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Anschließend wurden die EBs in Medium überführt, das zu gleichen Teilen aus hPSC Medium und EB Medium bestand, einen Tag später wurde 10 µM Retinsäure (*all-trans retinoic acid*, ATRA) zugefügt. Einen weiteren Tag später wurde das Medium zu EB-Medium gewechselt, dem 10 µM ATRA, 1 % B27 mit Vitamin A (B27+), 20 ng/ml EGF und 30 ng/ml Trijod-L-Thyronin (T3) zugefügt wurden, das Medium wurde täglich erneuert. Nach einer Woche wurde dem Medium keine zusätzliche Retinsäure mehr zugefügt, ein Medienwechsel erfolgte für 14 Tage jeden zweiten Tag. Für eine weitere Woche wurden die EBs in EB Medium kultiviert, dem 1 % B27 ohne Vitamin A (B27-), 20 ng/ml EGF und 30 ng/ml T3 zugesetzt wurden, das Medium wurde weiter jeden zweiten Tag gewechselt. Im Anschluss wurden die

EBs im zuletzt verwendeten Medium auf mit Matrigel beschichtete Zellkulturschalen überführt, am folgenden Tag wurden alle nicht-adhärenen Aggregate mit dem Medienwechsel entfernt und die Zellen für eine Woche unter Zusatz von 20 ng/ml FGF-2 kultiviert. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Medienwechsel, an den übrigen Tagen wurden den Kulturen zusätzlich je 20 ng/ml EGF und FGF-2 zugefügt.

Aus den auswachsenden Zellen wurden RGL-NPC mittels Durchflusszytometrie angereichert (siehe 2.5.11).

Neuronale Differenzierung

Die neuronale Differenzierung der hESC-RGL-NPC und hiPSC-RGL-NPC erfolgte auf matrigelbeschichteten Zellkulturschalen. Die Zellen wurden in RGL-NPC Medium in einer Dichte von ca. 10^5 Zellen/cm² ausgesät, dem Medium wurden je 20 ng/ml EGF und FGF-2 zugefügt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, die Wachstumsfaktoren entzogen und die Zellen unter dem Einfluss von 20 ng/ml BDNF für 3-6 Wochen differenziert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Medienwechsel.

Die gerichtete Differenzierung in neuronale Subtypen erfolgte angelehnt an bereits publizierte Differenzierungsparadigmen (Koch et al, 2009). Zur Differenzierung in dopaminerge Neurone wurden die Zellen zunächst unter dem Einfluss von 200 ng/ml SHH und 100 ng/ml FGF-8b kultiviert und im Anschluss für 3 Wochen neuronal differenziert. Zur Induktion motoneuronaler Zellen wurden die RGL-NPC zunächst für 5 Tage unter dem Einfluss von 1 μ M ATRA, 1 μ g/ml SHH und B27 unter proliferierenden Bedingungen (je 20 ng/ml EGF/FGF-2) kultiviert. Anschließend erfolgte der Entzug der Wachstumsfaktoren und die Differenzierung unter dem Einfluss von 1 μ g/ml SHH, 0,01 μ g/ml ATRA und B27 Supplement für 6 Tage, bevor die Zellen für 3 Wochen unter Zugabe von 50 ng/ml SHH neuronal differenziert wurden.

Astrogliale Differenzierung

Für die Differenzierung von Astrozyten wurden die hESC-RGL-NPC bzw. hiPSC-RGL-NPC in einer Dichte von $0,9 \times 10^5$ Zellen/cm² in RGL-NPC Medium mit je 20 ng/ml EGF und FGF-2 auf PO/Ln beschichtete Zellkulturschalen überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert, die Wachstumsfaktoren entzogen und dem Medium 10 % fetales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) zugefügt. Das Medium wurde über 10-14 Tage alle 3-4 Tage gewechselt.

Oligodendrogliale Differenzierung

Die Oligodendrozytendifferenzierung erfolgte auf matrigelbeschichteten Zellkulturschalen nach einem in Abbildung 8 dargestellten 3-stufigen Differenzierungsprotokoll.

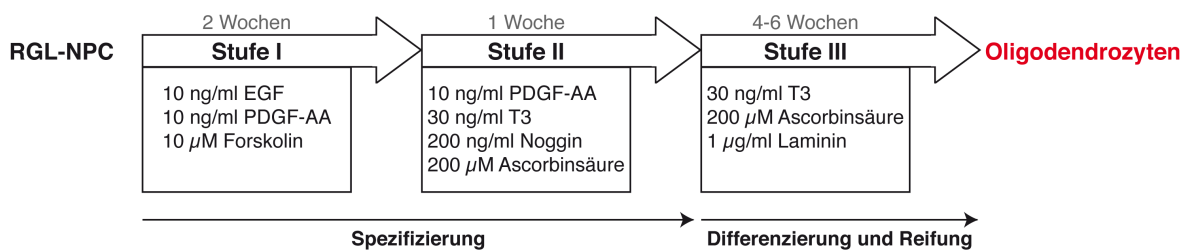


Abbildung 8: Schematische Darstellung des oligodendroglialen Differenzierungsprotokolles

Die hESC-RGL-NPC bzw. hiPSC-RGL-NPC wurden in RGL-NPC Medium mit je 20 ng/ml EGF und FGF-2 in einer Dichte von 10^5 Zellen/cm² ausplattiert. Nach 2 Tagen wurde das Medium gewechselt und zur Induktion glialer Zellen 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml

PDGF-AA und 10 μM Forskolin zugefügt. Über 2 Wochen wurde das Medium alle 2-3 Tage zur Hälfte erneuert. Im Folgenden wurde dem RGL-NPC Medium zur Unterstützung der Proliferation oligodendroglialer Vorläufer für eine Woche 10 ng/ml PDGF-AA, 30 ng/ml T3, 200 ng/ml Noggin und 200 μM Ascorbinsäure zugesetzt, ein 50 %iger Medienwechsel erfolgte wiederum alle 2-3 Tage. In einem letzten Schritt wurde zur Ausreifung der oligodendroglialen Zellen das RGL-NPC Medium für mindestens 4 Wochen mit 30 ng/ml T3, 200 μM Ascorbinsäure und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Laminin versetzt und das Medium alle 2-3 Tage zur Hälfte gewechselt.

Zur Untersuchung des Einflusses des SHH-Signalweges auf die oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPC wurden diese unter den oben beschriebenen Standardbedingungen bzw. unter Zugabe von 1 μM SAG, 5 μM Cyclopamin, 1 mM Jervine oder 1 μM CUR61414 zu den Standardmedien differenziert und 4 Wochen terminal ausgereift.

2.5.11 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Experimente (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) wurden von der Flow Cytometry Core Facility im Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie (IMMEI) der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn durchgeführt.

Zur Anreicherung neuronaler Zellen aus plattierten EBs wurden die Zellen mit 0,05 % TE und TI abgelöst und trituiert. Die Zellen wurden durch ein 40 μm Zellsieb pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zellkonzentration wurde auf 10^6 Zellen/50 μl in FACS Block-Lösung eingestellt und Zellen für 15 min auf Eis geblockt. Im Anschluss wurde APC-konjugierter anti-CD133-2 Antikörper in einer Verdünnung von 1:20 hinzugefügt, kurz mit den Zellen vermischt und für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch die Zugabe von 10 ml PBS entfernt, die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in FACS Puffer resuspendiert. Unmittelbar vor dem Sortieren wurde 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase zu den Zellen gegeben und die Zelllösung durch eine 40 μm Nylonmembran pipettiert. Zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen wurde 500 ng/ml Propidiumiodid eingesetzt. Die Zellen wurden mit einem FACS Diva Sortierer durch eine 90 μm Düse sortiert.

FACS-Block-Lösung

PBS
0,1 % BSA
5 % NGS

FACS Puffer

PBS
0,1 % BSA

2.5.12 Elektrophysiologie

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden RGL-NPC auf einem Zellrasen aus mitotisch inaktivierten primären Mausastrozyten kultiviert. Die RGL-NPC wurden in einer Dichte von 35 000 Zellen/ cm^2 in RGL-NPC-Medium mit je 20 ng/ml EGF und FGF-2 auf die Astrozyten gesetzt. Nach einem Tag wurde das Medium zu Electro-Neurobasal Medium gewechselt. Die Zellen wurden für 10 Wochen differenziert, das Medium jeden dritten Tag zur Hälfte erneuert. Das Elektro-Neurobasal-Medium wurde für mindestens 12 h vor jedem Medienwechsel im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 äquilibriert. 2 h vor den elektrophysiologischen Messungen wurde das Medium komplett ausgetauscht.

Die elektrophysiologischen Messungen wurden von Dr. Jaideep Cherakka Kesavan, Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, durchgeführt. Alle Messungen wurden mit pClamp Software (Version 10, Molecular Devices) bei RT in Messlösung aufgenommen. Die Pipettenelektroden wurden vertikal gezogen und anschließend im Feuer poliert (finaler Spitzenwiderstand: 2-4 $\text{M}\Omega$). Die Patchpipette war mit Pipettenlösung gefüllt. Die Signale wurden bei 1 oder 10 kHz gefiltert und in einer Frequenz von 10 oder 25 kHz aufgenommen. Die vermessenen Neurone wurden mit 0,25 % Biozytin in

der Pipettenlösung markiert. Nach Beendigung der Messung wurden die Zellen mit 4 % Formaldehydlösung fixiert und immunzytochemisch angefärbt.

Messlösung

140 mM NaCl
5 mM KCl
2 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES
25 mM D-Glukose
pH 7,2; 310–320 mOsm/kg

Pipettenlösung

120 mM Kaliumglukonat (C₆H₁₁O₇K)
20 mM KCl
10 mM NaCl
10 mM EGTA
1 mM CaCl₂
4 mM Mg-ATP
0,4 mM Na-GTP
10 mM HEPES
pH 7,2; 280–290 mOsm/kg

2.6 Molekularbiologie

2.6.1 Puffer und Lösungen

4% Formaldehydlösung

4% Paraformaldehyd wurde zusammen mit 3-4 Natriumhydroxidplättchen in 500 ml PBS auf einem Magnetrührer gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,4 (Zellfixation) bzw. 7,6 (Tierperfusion) mit HCl eingestellt, die Lösung durch Filterpapier filtriert und bei -20 °C gelagert.

PBS/Azid

0,1 % Natriumazid wurde in PBS gelöst und bei RT gelagert.

2.6.2 Immunzytochemie

Für immunzytochemische Analysen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 4 % Formaldehyd für 15 min bei RT fixiert. Zur Detektion von gamma-Aminobuttersäure (GABA) wurde dem Fixativ 0,05 % Glutaraldehyd zugesetzt. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Zellen dreimal für je 10 min mit PBS gewaschen. Falls notwendig wurden Zellmembranen bei RT für 20 min permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 20 min bei RT mit ICC Blocklösung abgesättigt. Falls die Immundetektion mit Biotin/Streptavidin verstärkt werden sollte, wurde endogenes Biotin bei RT für 15 min mit 5 % Milchpulver in ICC Blocklösung gesättigt. Der Primärantikörper wurde in ICC Blocklösung verdünnt und für mindestens 2 h bis ü.N. bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper bzw. mit Biotin/Streptavidin gekoppelte Antikörper wurde ebenfalls in ICC Blocklösung für (je) 1 h bei RT inkubiert. Zellkerne wurden für 1 min mit DAPI (1:10 000 in PBS) angefärbt und Zellen mit VectaShield unter Deckgläschen eingedeckelt.

Permeabilisierungslösung

0,1 % Triton X-100 in PBS/Azid

ICC Blocklösung

5 % NGS in PBS/Azid

2.6.3 Immunhistochemie

Alle Inkubationsschritte wurden bei RT in einer Feuchtkammer durchgeführt.

Die gefrorenen Hirnschnitte wurden bei RT aufgetaut und für 10 min in PBS rehydriert. Die Schnitte wurden für 45 min in IHC-Blocklösung inkubiert, anschließend wurde endogenes Biotin für weitere 15 min mit Biotin-Blocklösung abgesättigt und die Schnitte kurz mit PBS gespült. Die Primärantikörper wurden in IHC-Blocklösung verdünnt und ü.N. inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS für jeweils 10 min wurde der Biotin-konjugierte Antikörper in PBS verdünnt für 2 h inkubiert. Die Schnitte wurden dreifach für 10 min mit PBS gewaschen und die entsprechenden Sekundärantikörper in PBS verdünnt für 2 h inkubiert. Die Zellkerne wurden für 10 min mit DAPI (1:10 000 in PBS) angefärbt, die Schnitte ü.N. in PBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen und mit VectaShield unter einem Deckgläschen eingedeckelt.

IHC-Blocklösung

0,5 % Triton X-100
3 % NHS
1 % NGS
in PBS (ohne Azid)

Biotin-Blocklösung

5 % Milchpulver in IHC-Blocklösung

2.6.4 Isolation von RNA

Im Vorfeld der RNA-Isolation wurden die Zellen 1× mit PBS gewaschen, in PBS mit einem Zellschaber von den Zellkulturschalen gelöst und mittels Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C eingefroren.

Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA der Zellen wurde mittels RNeasy Mini Kit gemäß Herstellerangaben isoliert. 40 µl RNA-Lösung wurden mit je 5 µl DNase Puffer und DNase versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl 25 mM EDTA wurde die DNase für 10 min bei 65 °C unter leichter Rotation inaktiviert.

MicroRNA

MicroRNA-Proben wurden mittels TriFast™ aus proliferierenden NSC oder aus Zellen während der Oligodendrozytendifferenzierung isoliert. Das Zellpellet wurde in 1 ml TriFast™ resuspendiert und durch Pipettieren homogenisiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugefügt, die Probe für 15 s wiederholt invertiert und für 15 min bei RT inkubiert. Zellreste wurde für 5 min bei 12 000 × g und 4 °C abzentrifugiert, die in der oberen, wässrigen Phase befindliche RNA in ein separates Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach kurzem Invertieren wurden die Proben für 1 h auf Eis inkubiert. Die RNA wurde für 10 min bei 12 000 × g und 4 °C sedimentiert, das Pellet 2× mit je 700 µl eiskaltem Ethanol gewaschen, für 8 min bei 7 500 × g und 4 °C sedimentiert und an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 80 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Verunreinigungen mit DNA wurden durch einen Verdau mit DNase beseitigt. Zu diesem Zweck wurden der RNA Lösung je 10 µl Dnase Puffer und Dnase zugefügt und für 15 min bei RT inkubiert. Die DNase wurde nach Zugabe von 10 µl 25 mM EDTA für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

2.6.5 Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels iScript cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben. Die Konzentration der cDNA wurde am Nanodrop gemessen und angeglichen.

Alle Polymerase Kettenreaktionen (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden in einem T3 Thermocycler mit der GoTaq® Flexi DNA Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt, die Hybridisierungstemperaturen für jedes Oligonukleotidpaar ermittelt. Alle Proben wurden anhand der *GAPDH*-Expression normiert. Als Positivkontrolle diente cDNA, die aus humaner fetaler Hirn-RNA bzw. humaner fetaler Rückenmarks-RNA synthetisiert wurde.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze war wie folgt:

<u>Reaktionsansatz</u>	95 °C	2 min	} 30-36 Zyklen
1× Green GoTaq® Flexi Puffer	95 °C	30 s	
1,5 mM MgCl ₂	X °C	30 s	
0,4 mM dNTPs	72 °C	30 s	
8,0 µM Oligonukleotide	72 °C	10 min	
1,25 U GoTaq® DNA Polymerase	4 °C	∞	
6 ng cDNA			
H ₂ O ad 25 µl			

Zur Darstellung der PCR-Proben wurde die DNA über ein 1,5 % (in 1× TAE-Puffer + 1 ng/ml Ethidiumbromid) Agarosegel separiert und unter UV-Licht dokumentiert. Zur Größenkontrolle wurde eine 100 bp DNA-Leiter verwendet.

50× Tris-Acetat EDTA (TAE)-Puffer

2 M Tris
50 mM EDTA
1 M Eisessig

2.6.6 Quantitative Echtzeit-PCR

Alle Reaktionen der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) wurden in Triplikaten in einem BioRad iCycler mit zugehöriger Software durchgeführt. Die Spezifität der Oligonukleotide wurde mittels Schmelzkurve überprüft und das PCR-Produkt zusätzlich über ein Agarosegel (mRNA: 1,5 %; microRNA: 2 % in 1× TAE-Puffer + 1 ng/ml Ethidiumbromid) sichtbar gemacht. Zu diesem Zweck wurden die PCR-Proben mit 10× DNA-Probenpuffer versetzt. Zur Größenkontrolle wurde eine 100 bp DNA-Leiter verwendet.

Die Analyse der qPCR erfolgte über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode, alle Proben wurden auf die Expression der *18S* rRNA normiert.

50× Tris-Acetat EDTA (TAE)-Puffer

2 M Tris
50 mM EDTA
1 M Eisessig

Der 50×-Puffer wurde mit Wasser auf Einfachkonzentration verdünnt.

10× Agarosegel Probenpuffer

250 mg Bromphenol Blau
250 mg Xylen Cyanol
in 33 ml 150 mM Tris pH 7,6 lösen
60 ml Glycerol zufügen
7 ml H₂O zufügen
bei RT lagern

mRNA

Die Gesamt-RNA-Proben wurden wie in 2.6.4 beschrieben aus Zellen isoliert und mit DNase verdaut. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels iScript cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben. Die Konzentration der cDNA wurde am Nanodrop gemessen und angeglichen.

Die Fluoreszenz wurde in Echtzeit über die Interkalation von SYBR® Green in die neu-synthetisierte DNA gemessen, zur Kalibrierung wurde Fluorescein eingesetzt.

Reaktionsansatz und Zyklenbedingungen waren wie folgt:

<u>Reaktionsansatz</u>	95 °C	3 min	} 40 Zyklen
1x PCR Puffer ohne MgCl ₂	94 °C	20 s	
3mM MgCl ₂	60 °C	20 s	
200 µM dNTPs	72 °C	50 s	
0,75 U Taq DNA Polymerase	95 °C	1 min	
je 90 nM der Oligonukleotide	55 °C	1 min	
0,75x SYBR® Green	55-95 °C	0,5 °C/10 s	
10 nM Fluorescein	4 °C	∞	
H ₂ O ad 25 µl			

microRNA

Die microRNA-enthaltenden RNA-Proben wurden wie in 2.6.4 beschrieben isoliert und mit DNase verdaut. Die Synthese der cDNA erfolgte mittels miScript II Reverse Transcription Kit unter Verwendung des miScript HiFlex Puffers zur Synthese von cDNA aus mRNA und microRNA laut Herstellerangaben. Die Konzentration der cDNA wurde am Nanodrop vermessen und auf 25 ng/µl eingestellt.

Die qPCR erfolgte unter Verwendung des miScript SYBR® Green PCR Kits laut Herstellerangaben. Die Reaktionen wurden im 96-Well Maßstab in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Als microRNA-spezifischer Primer wurde die Sequenz der jeweiligen reifen microRNA synthetisiert.

Reaktionsansätze und Zyklenbedingungen waren wie folgt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	95 °C	15 min	} 40 Zyklen
1x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	94 °C	15 s	
1x miScript Universal Primer	55 °C	30 s	
0,23 µM microRNA spezifischer Primer	70 °C	35 s	
50 ng cDNA	95 °C	1 min	
H ₂ O ad 20 µl	55 °C	1 min	
	55-95 °C	0,5 °C/10 s	
	4 °C	∞	

2.6.7 Genomweite Expressionsanalyse

Die Gesamt-RNA-Proben wurden wie in 2.6.4 beschrieben präpariert. Das Genexpressionsprofil wurde von Dr. Michael Alexander aus der Abteilung Genomics des Life & Brain Zentrums in Bonn erstellt. Zur Qualitätssicherung wurden die RNA-Proben zunächst in einem BioAnalyzer 2100 auf einem RNA 6000 Nano Lab Chip auf Degradation hin untersucht. Anschließend erfolgte die RNA-Amplifikation und Biotin-UTP Markierung mittels Illumina®TotalPrep™RNA Amplification Kit. Die Proben wurden auf einen Illumina human HT-12 Expression BeadChip v3 hybridisiert und die Fluoreszenz mittels Illumina iScan Detektor detektiert. Die Datenanalyse erfolgte mittels Illumina BeadStudio und Illumina GenomeStudio.

2.7 Tiere, Transplantationen und Gewebeprozessierung

Alle Tierversuche wurden nach den Richtlinien der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn sowie des Tierschutzgesetzes des Landes Nordrhein Westfalen durchgeführt. Die durchgeführten Tierversuche sind im Tierversuchsantrag „Transplantation humaner ES- und iPS-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen in das Nervensystem von Labornagetieren (Humane remyelinisierende ZNS Transplantation)“ vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz unter dem Aktenzeichen 87-51.04.2010.A023 genehmigt. Die Tierhaltung und -pflege erfolgte nach Standards des Hauses für Experimentelle Therapie (HET) des Universitätsklinikums Bonn.

2.7.1 Generierung immundefizienter Shiverer-Mäuse

Myelin- und immundefiziente Mäuse (Shiverer, Genotyp $shi/shi \times rag2^{-/-}$) wurden durch die Kreuzung von Shiverer-Mäusen (C3Fe.SWV-Mbp^{shi}/J) mit homozygoten $rag2^{-/-}$ immundefizienten Mäusen (Shinkai et al, 1992; Windrem et al, 2008) generiert.

Genotypisierung der Shiverer-Mäuse

Der transgene Shiverer Phänotyp wurde durch PCR gemäß den Anleitungen von Jackson Laboratory bestimmt.

Die genomische DNA der Tiere wurde aus Schwanzspitzen unter Verwendung des REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kits isoliert. Je 2 µl der DNA Lösung wurde als Vorlage für die PCR genutzt, in der mittels Taq DNA Polymerase und zwei Paaren von Oligonukleotiden zum einen ein endogenes Kontroll-Produkt von 200 bp Größe (IMR0015/0016) als auch ein DNA Fragment der Mutation von 308 bp Größe (IMR0968/0969) amplifiziert werden konnten.

IMR0015: 5'-CAAATGTGTGCTTGTCTGGTG-3'

IMR0016: 5'-GTCAGTCGAGTGCAC-AGTTT-3'

IMR0968: 5'-ACCGTCCTGAG-ACCATTGTC-3'

IMR0969: 5-GTGCTTATCTAGTGTATGCCTGTG-3'

Die Reaktionskomponenten und Zyklenbedingungen der Shiverer PCR waren wie folgt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	94 °C	3 min	} 35 Zyklen
0,8x PCR Puffer	94 °C	30 s	
2 mM MgCl ₂	60 °C	1 min	
0,2 mM dNTPs	72 °C	1 min	
0,667 μM IMR0015	72 °C	2 min	
0,667 μM IMR0016	4 °C	∞	
1 μM IMR0968			
1 μM IMR0969			
0,025 U/μl Taq DNA Polymerase			
H ₂ O ad 12 μl			

Die PCR Produkte wurden mit 10x Agarosegel Probenpuffer versetzt und in einem 1,5 %igen Agarosegel (in 1x TAE Puffer + 1 ng/ml Ethidiumbromid) mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Größenkontrolle wurde eine 100 bp DNA-Leiter verwendet. Proben von Wildtyp-(WT) Tieren zeigten lediglich das 200 bp große Kontrollfragment, wohingegen Proben von Tieren, welche die Shiverer Mutation homo- oder heterozygot trugen, zusätzlich das 308 bp große Mutationsfragment aufwiesen. Homozygote Tiere wurden phänotypisch identifiziert.

50x Tris-Acetat EDTA (TAE) Puffer

- 2 M Tris
- 50 mM EDTA
- 1 M Eisessig

Arbeitskonzentration: 1x Verdünnung in H₂O

10x Agarosegel Probenpuffer

- 250 mg Bromphenol Blau
- 250 mg Xylen Cyanol
- in 33 ml 150 mM Tris pH 7,6 lösen
- 60 ml Glycerol zufügen
- 7 ml H₂O zufügen
- bei RT lagern

Identifikation homozygoter rag2^{-/-} Mäuse

Immundefiziente rag2^{-/-} Shiverer-Mäuse wurden mittels FACS Analyse identifiziert: in Blutproben wurden die B-Zellen über einen anti-CD19 Antikörper markiert, immundefiziente Tiere wurden durch das Fehlen von CD19-positiven Zellen bestimmt. Als Positivkontrolle für B-Zellen dienten WT-Tiere. Rag2^{-/-} Mäuse wurden als Kontrollen für immundefiziente Tiere eingesetzt.

Die Blutproben (50-100 µl) wurden mit 500 µl FACS Puffer gemischt und die Blutzellen sedimentiert (Tischzentrifuge, 5 min, 300 × g). Die Erythrozyten wurden in 500 µl Lysispuffer für 15 min bei RT lysiert. Nach Zugabe von 500 µl FACS Puffer wurden die verbliebenen Blutzellkomponenten durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 300 × g). Der PE-konjugierte anti-CD19 Antikörper wurde 1:150 in FACS Puffer verdünnt, das Zellpellet in dieser Färbelösung resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch die Zugabe von 1 ml FACS Puffer entfernt, die Zellen mittels Zentrifugation gesammelt und in 1 ml FACS Puffer resuspendiert. Nach Filtration durch eine 40 µm Nylonmembran wurden die Zellen am FACS Calibur Durchflusszytometer analysiert.

FACS-Puffer

1 % FCS
2 mM EDTA in PBS

Lysispuffer

9 Teile 0,83 % NH₄Cl
1 Teil 0,17 M Tris-HCl pH 7,65
steril filtriert

2.7.2 Transplantation und Gewebeaufarbeitung

Proliferierende RGL-NPC wurden mittels TE/TI von den Schalen gelöst und in PBS mit 0,1 % BSA auf 150 000 Zellen/µl konzentriert. Immundefiziente Shiverer-Mäuse wurden einen Tag nach der Geburt durch kurze Hypothermie auf Eis anästhesiert. Je 1 µl der Zellsuspension wurde mit einer gezogenen Glaskapillare in jede der beiden Hemisphären transplantiert (300 000 Zellen pro Tier). Die transplantierten Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen bei 37 °C beobachtet und anschließend zum Muttertier zurückgesetzt. Im Alter von 3 Wochen wurden die Tiere abgesetzt und regelmäßig kontrolliert. Bei Erreichen eines kritischen Zustandes (langanhaltende Krämpfe, mangelhafte Nahrungsaufnahme, schlechter Allgemeinzustand, in der Regel 3 Monate nach Transplantation) wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von 0,9 mg Ketanest und 0,18 mg Rompun je 10 g Körpergewicht anästhesiert und mit 40 ml PBS gefolgt von 45 ml 4 % Formaldehydlösung transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen, ü.N. in 4 % Formaldehydlösung postfixiert und anschließend bis zum Absinken bei 4 °C in 30 % Saccharoselösung inkubiert. Die kryoprotektierten Gehirne wurden in Tissue-Tek® eingebettet und bei -80 °C eingefroren. 20 µm Schnitte wurden mittels Immunhistochemie analysiert.

3 Ergebnisse

Alle bislang publizierten Protokolle zur Generierung humaner oligodendroglialer Zellen haben die direkte Differenzierung pluripotenter Stammzellen (*pluripotent stem cells*, PSC) über lange Zeiträume in Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen beschrieben (Douvaras et al, 2014; Hu et al, 2009b; Izrael et al, 2007; Piao et al, 2015; Wang et al, 2013b). Dabei wurde kein stabiler, intermediärer Zelltyp generiert, der eine effiziente und robuste oligodendrogliale Differenzierung ermöglicht und dabei gleichzeitig leicht kultivierbar und kryokonservierbar ist. In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine neurale Vorläuferzellpopulation (*neural precursor cells*, NPC) aus humanen pluripotenten Stammzellen generiert werden, die im Gegensatz zu den bislang publizierten NSC Populationen neben der Differenzierung humaner Neurone eine effiziente Generierung humaner Gliazellen, insbesondere der Oligodendrozyten, ermöglicht. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl humane embryonale Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESC) als auch humane induziert pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) als Quelle pluripotenter Stammzellen genutzt. Die humanen iPSC wurden im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Peitz aus adulten humanen Fibroblasten durch lentivirale Überexpression der Transkriptionsfaktoren SOX2, OCT3/4, c-MYC und KLF4 in einen pluripotenten Zustand reprogrammiert und validiert; die genutzten hiPSC-Kulturen wiesen Pluripotenz *in vitro* und *in vivo*, einen intakten Karyotyp und eine Inaktivierung der eingefügten Transgene auf. Die Kultur der Zellen erfolgte adhärent auf einem Zellrasen aus mitotisch inaktivierten, primären murinen Fibroblasten.

Das neurale Differenzierungsprotokoll wurde zunächst an humanen ESC etabliert und im Rahmen der Diplomarbeit von Julia Fischer auf humane iPSC übertragen.

3.1 CD133-positive neurale Vorläuferzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen

Zur Differenzierung pluripotenter Stammzellen in neurale Zelltypen (Abbildung 9) wurde das von Izrael *et al.* publizierte Protokoll zur Differenzierung humaner Oligodendrozyten aus humanen ESC modifiziert (Izrael et al, 2007). Undifferenzierte Kulturen mit scharf begrenzten Zellkolonien (9A) wurden mit Kollagenase von den umgebenden murinen Fibroblasten gelöst und über Nacht auf unbeschichteten Zellkulturschalen kultiviert, um Fibroblasten und Einzelzellen zu entfernen. Am nächsten Tag wurden alle nicht-adhärenen Zellaggregate in hPSC-Medium auf unbeschichtete Petrischalen überführt und 5-7 Tage bis zur Bildung robuster Embryoidkörper (*embryoid bodies*, EB) kultiviert. Zur Induktion der Differenzierung wurden die EBs fortan ohne β -Mercaptoethanol und den Wachstumsfaktor *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) in einem Medium basierend auf RGL-NPC-Medium mit *epidermal growth factor* (EGF), Trijod-L-thyronin (T3) und B27 kultiviert. Die Medienbedingungen wurden so gewählt, dass Zellen neuraler und insbesondere glialer Linien bevorzugt induziert, Zellen anderer Keimblätter hingegen nicht inhibiert wurden. Zur Induktion neuraler Zellen wurde das Medium zunächst für eine Woche mit einer hohen Konzentration Retinsäure (*all-trans retinoic acid*, ATRA, 10 μ M) versetzt (9B). Anschließend wurde die Konzentration der Retinsäure für 2 Wochen herabgesetzt (Zugabe von B27 mit Vitamin A, 9C) und die Zellen nachfolgend für eine weitere Woche ohne Retinsäure (B27 ohne Vitamin A, 9D) kultiviert. Die differenzierten EBs wurden schließlich auf mit Matrigel beschichteten Zellkulturschalen plattiert und unter dem Einfluss von EGF, FGF-2 und T3 kultiviert, um die Proliferation der auswachsenden Zellen zu stimulieren. Die aus den plattierten EBs herauswachsenden Zellen bildeten eine sichtbar heterogene Kultur unterschiedlicher Zelltypen. Zwischen Bereichen flacher Zellen konnten neben ausdifferenzierten Neuronen Zellen mit bipolarer, neuraler Morphologie beobachtet werden (9E). Diese neuralen Zellen wurden nach 7-10 Tagen Kultur auf Matrigel mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) angereichert. Zu diesem Zweck wurde ein Antikörper gegen CD133 eingesetzt, der bereits erfolgreich die Isolierung von Stammzellen des humanen Zentralnervensystems ermöglichte (Uchida et al, 2000). Aus den heterogenen Kulturen wurden nachfolgend hochgradig CD133 positive Zellen (9F) isoliert, welche 15-20 % der initialen Populationen ausmachten. Diese Zellen wurden adhären als Einzelzellschicht auf Poly-L-Ornithin/Laminin (PO/Ln) beschichteten Zellkulturschalen kultiviert und bildeten unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 eine homogene, stabil proliferierende, CD133 positive Zellpopulation (9G+H). Da die Dichte der Zellpopulation als ausschlaggebend für ein robustes Proliferationsverhalten beobachtet wurde,

wurden die Zellen erst bei Erreichen einer 100 %igen Konfluenz in einem Verhältnis von 1:2 mit Trypsin/EDTA (TE) und Trypsin Inhibitor (TI) passagiert. Im Folgenden werden diese Zellen als *radial glia like* (RGL) neurale Vorläuferzellen (RGL-NPC) bezeichnet.

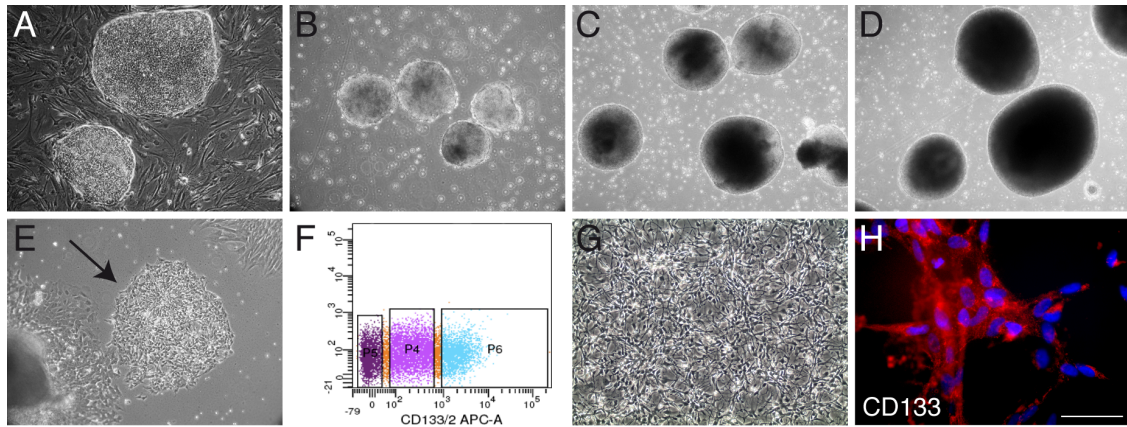


Abbildung 9: Generierung humaner neuraler Vorläuferzellen aus pluripotenten Stammzellen
 Zur Generierung humaner neuraler Vorläuferzellpopulationen wurden pluripotente Stammzellen (*human pluripotent stem cells*, hPSC, **A**) über ein dreistufiges Embryoidkörper- (*embryoid body*, EB) Protokoll unter dem Einfluss von EGF und T3 differenziert. Für eine Woche erfolgte die Induktion neuraler Zelltypen in Gegenwart hoher Konzentrationen von Retinsäure (*all trans retinoic acid*, ATRA und B27 + Vitamin A, **B**), worauf eine zweiwöchige Kultivierung unter geringer Retinsäurekonzentration folgte (B27 + Vitamin A, **C**). Nach einer weiteren Woche ohne Zugabe von Retinsäure (B27 - Vitamin A, **D**) wurden die EBs auf mit Matrigel beschichteten Zellschalen plattiert. Aus den auswachsenden heterogenen Kulturen (**E**) wurden neurale Vorläuferzellen (Pfeil) mittels Durchflusszytometrie über den neuralen Stammzellmarker CD133 angereichert (**F**). Diese Zellen wurden unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 als CD133-positive, homogene Populationen proliferiert (**G+H**). Maßstab: 50 µm.

3.2 Charakterisierung der RGL-NPC

Die humanen ESC- und iPSC-RGL-NPC wurden unter proneuralen Bedingungen generiert und über einen Antikörper gegen den neuralen Stammzellmarker CD133 mittels FACS angereichert. Im Folgenden sollten die Kulturen auf die Expression von Pluripotenzmarkern, die Fähigkeit zur Bildung von Neurosphären, ihr Expressionsprofil neuraler Stammzellmarker und ihre regionale Identität hin näher untersucht werden. Weiterhin wurde getestet, ob das neurale Differenzierungsprotokoll zelllinienunabhängig auf weitere humane ESC-Linien übertragen werden konnte. Zum Vergleich wurde im Hinblick auf die Expression neuraler Stammzellmarker und regionaler Transkriptionsfaktoren eine bereits publizierte und gut charakterisierte NSC Population (*long-term neural epithelial-like stem cells*, Lt-NES Zellen, (Koch et al, 2009)) herangezogen.

Im Zuge der Differenzierung wird in pluripotenten Stammzellen die Transkription von Pluripotenzgenen wie *Octamer (Oct) 3/4*, *Nanog* und *Rex1* (*Zinkfingerprotein (ZFP) 42*) zugunsten der Expression von Markern weiter eingeschränkter, multipotenter Stammzellen oder differenzierter Zellen herunterreguliert. Auf Transkriptebene (Abbildung 10A) konnte mittels

reverser Transkriptase (RT)-Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR; RT-PCR) gezeigt werden, dass die RGL-NPC im Gegensatz zu den ihnen zugrundeliegenden pluripotenten Stammzellen die Expression des Pluripotenzmarkers *REX1* vollständig und des Pluripotenzmarkers *OCT3/4* zu großen Teilen verloren haben. Die Expression von *Nanog* war in den hESC-RGL-NPC gar nicht und in den hiPSC-RGL-NPC nur noch sehr schwach nachzuweisen. Dies beschreibt den Verlust der Pluripotenz der Zellen im Zuge der neuronalen Differenzierung. Auch auf Proteinebene war im Gegensatz zu den pluripotenten Stammzellkolonien in den RGL-NPC keine Expression von OCT4 mehr detektierbar, womit eine Kontamination der RGL-NPC-Populationen mit verbliebenen pluripotenten Stammzellen ausgeschlossen werden konnte (10B).

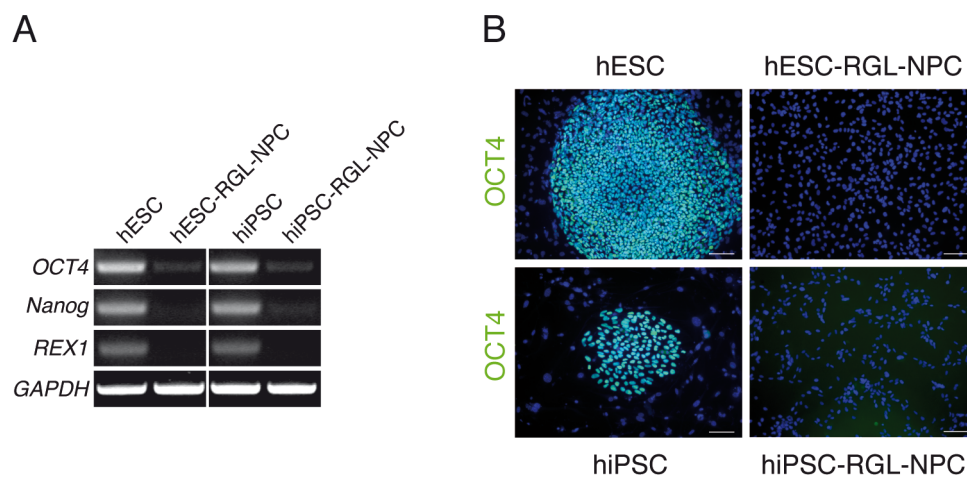


Abbildung 10: Verlust der Expression von Pluripotenzmarkern während der neuronalen Differenzierung

RGL-NPC exprimieren auf Transkriptebe (A) im Gegensatz zu den ihnen zugrundeliegenden pluripotenten Stammzellen kein *REX1* und nur geringe Mengen an *OCT3/4*. *Nanog* konnte in den hESC-RGL-NPC gar nicht, in den hiPSC-RGL-NPC nur sehr schwach nachgewiesen werden. Auf Proteinebene (B) konnte keine Expression von OCT4 in den RGL-NPC detektiert werden. Maßstab: 100 μm .

Um die Fähigkeit der RGL-NPC auf Sphärenbildung, beschrieben als eine Fähigkeit neuraler Stammzellen (Reynolds & Weiss, 1992), zu testen, wurden proliferierende Zellen mit TE/TI abgelöst und auf unbeschichtete Petrischalen passagiert. Nach vier Tagen unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 konnte die Bildung von Neurosphären beobachtet werden (Abbildung 11).

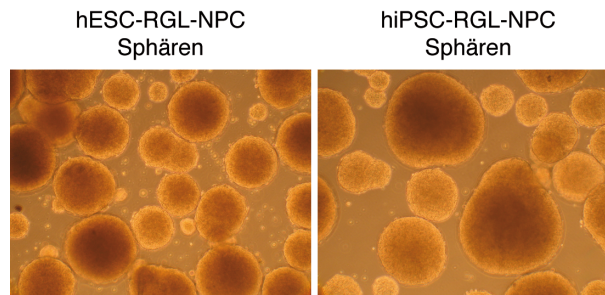


Abbildung 11: Neurosphärenassay

RGL-NPC wurden mit Trypsin/EDTA und Trypsin Inhibitor von den Zellkulturschalen abgelöst und unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 auf unbeschichtete Petrischalen passagiert. Nach 4 Tagen konnte die Bildung von Sphären beobachtet werden.

3.2.1 RGL-NPC exprimieren Marker neuraler Stammzellen und Radialglia

Um die neurale Identität der RGL-NPC zu bestätigen, wurde das Expressionsprofil der Zellen mittels RT-PCR und Immunzytochemie untersucht. Dabei wurde die Genexpression der RGL-NPC mit derer von aus hESC gewonnenen It-NES Zellen (It-hESNSC) verglichen. Zusätzlich dazu wurden in einer genomweiten Expressionsanalyse zwei humane ESC-RGL-NPC-Linien (I3; H9.2) und eine iPSC-RGL-NPC-Linie untersucht (Abbildung 12). Diese Analyse wurde von Dr. Michael Alexander aus der Abteilung Genomics des Life & Brain Zentrums in Bonn erstellt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden hintergrundbereinigt und die Daten der durchgeführten Triplikate gemittelt.

Die immunzytochemische Analyse der Proteinexpression der humanen ESC- und iPSC-RGL-NPC (12A+B, Fluoreszenzbilder in B zum Teil aus der Diplomarbeit von Julia Fischer) konnte zeigen, dass die RGL-NPC beider pluripotenter Stammzellquellen neben CD133 weitere typische neurale Stammzellmarker wie Nestin, *sex-determining region Y-related HMG box* (SOX) 2, SOX9 und Musashi exprimieren. Darüber hinaus konnte eine Expression von charakteristischen Markern radiärer Gliazellen, darunter Vimentin, *brain lipid binding protein* (BLBP) und 3CB2, ein radialgliazellspezifisches Epitop von Vimentin (Nakamura et al, 2008), beobachtet werden.

Auf Transkriptebene konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (12C). Zusätzlich zeigte sich, dass die RGL-NPC weitere Marker neuraler Stammzellen wie *achaete-scute complex homolog* (*ASCL*) 1, *paired box* (*PAX*) 6 und den *EGF-Rezeptor* (*EGFR*) exprimieren. Auch die Expression der Radialgliazell-Marker *Vimentin* (*VIM*) und *BLBP* konnte bestätigt werden. Weiterhin konnten Transkripte für *glial high affinity glutamate transporter* (*GLAST*) und *glial fibrillary acidic protein* (*GFAP*), ebenfalls Marker von Radialglia, nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich, dass in den RGL-NPC der PDGF Rezeptor α (*platelet-derived*

growth factor, *PDGFR α*), ein Marker früher Oligodendrozytenvorläuferzellen und Radialglia, exprimiert wird.

Im Vergleich zu den It-hESNSC zeigten sich deutliche Unterschiede. So konnte in diesen Zellen im Vergleich zu den RGL-NPC keine Expression der Marker von Radialglia *GLAST*, *GFAP* sowie *PDGFR α* detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass RGL-NPC im Gegensatz zu den It-hESNSC eine hohe Ähnlichkeit zu Radialglia zeigen.

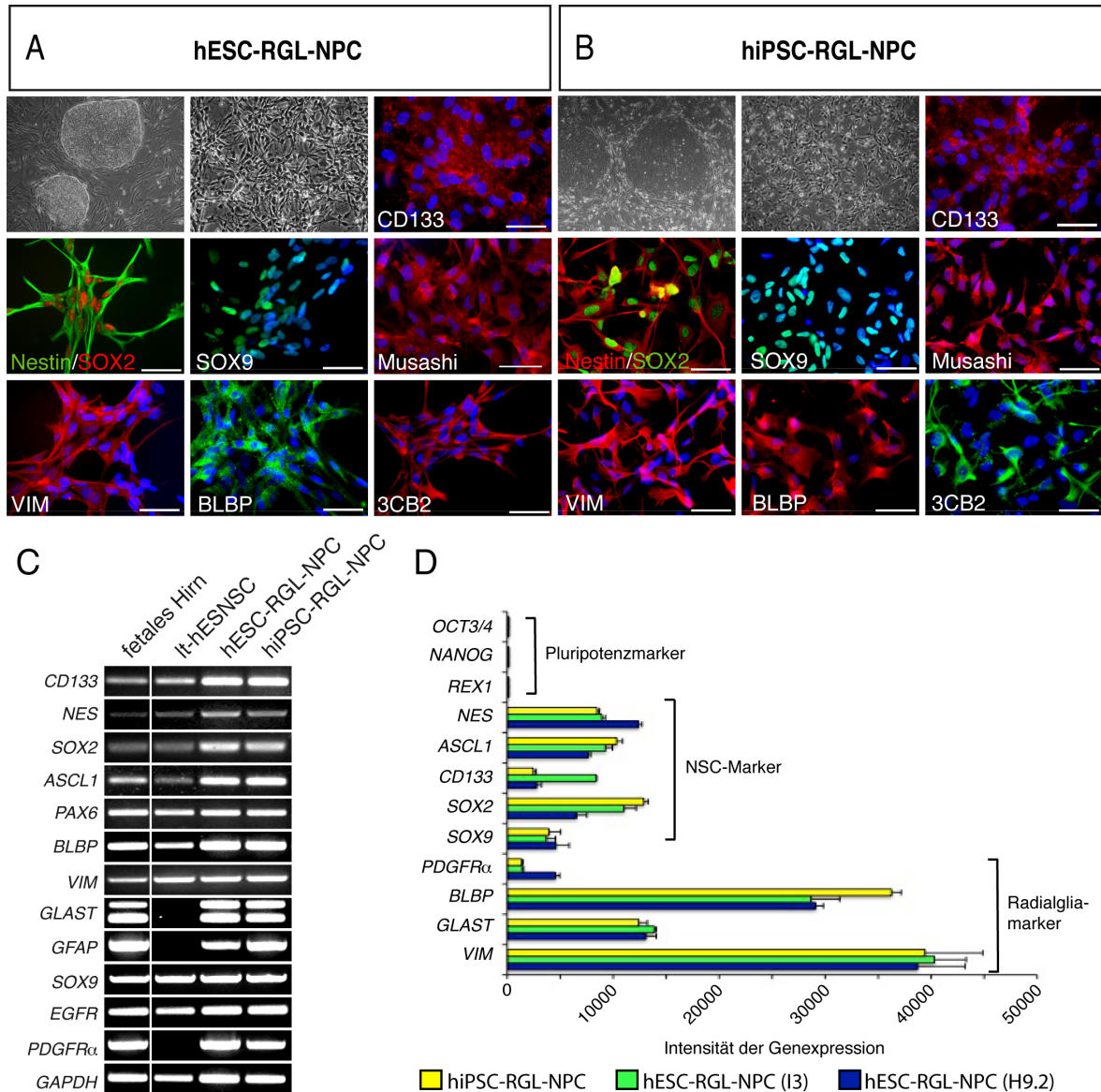


Abbildung 12: Expressionsprofil der RGL-NPC auf Protein- und Transkriptebene

Zur Bestimmung des Expressionsprofils der RGL-NPC wurden proliferierende Zellen auf Protein- (A + B) und Transkriptebene (C) untersucht und mittels RT-PCR mit einer etablierten NSC-Population verglichen (It-hESNSC, (Koch et al, 2009)). Eine vergleichende gesamtgenomische Expressionsanalyse (D) belegt die Ähnlichkeit sowohl zweier hESC-abgeleiteter NPC-Linien untereinander als auch im Vergleich zu einer hiPSC-abgeleiteten NPC-Linie. Maßstab: 50 μ m.

In einer genomweiten Expressionsanalyse wurden Proben einer humanen iPSC-RGL-NPC- und zweier ESC-RGL-NPC- Linien (H9.2 und I3) untersucht (Abbildung 12D). Der

Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Transkripte bestätigte die Ergebnisse der konventionellen RT-PCR und zeigte, dass keine der getesteten Linien die Pluripotenzgene *OCT3/4*, *Nanog* und *REX1* exprimiert. Darüber hinaus wurden Transkripte der neuralen Stammzell-Marker *CD133*, *Nestin (NES)*, *ASCL1*, *SOX2* und *SOX9* sowie der Radialgliamarker *PDGFR α* , *BLBP*, *GLAST* und *VIM* nachgewiesen. Dabei fällt die hohe Intensität der Expression der Radialgliamarker *BLBP*, *GLAST* und *VIM* auf. Der Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten zeigte weiterhin, dass sowohl die beiden untersuchten ESC-RGL-NPC-Linien untereinander als auch im Vergleich mit der getesteten iPSC-Linie eine sehr hohe Ähnlichkeit aufwiesen.

Um weiterführend zu überprüfen, ob das neurale Differenzierungsprotokoll robust auf andere Zelllinien übertragen werden kann, wurden RGL-NPCs aus zusätzlichen humanen ESC-Linien (I3, I6) generiert und charakterisiert (Abbildung 13). Auch in Zellen dieser Linien konnte mittels Immunzytochemie die Expression von CD133, Nestin, SOX2, Musashi, SOX9, BLBP und Vimentin auf Proteinebene detektiert werden. Auf Transkriptebene bestätigte sich das Expressionsprofil der zuvor untersuchten hESC- und hiPSC-RGL-NPC.

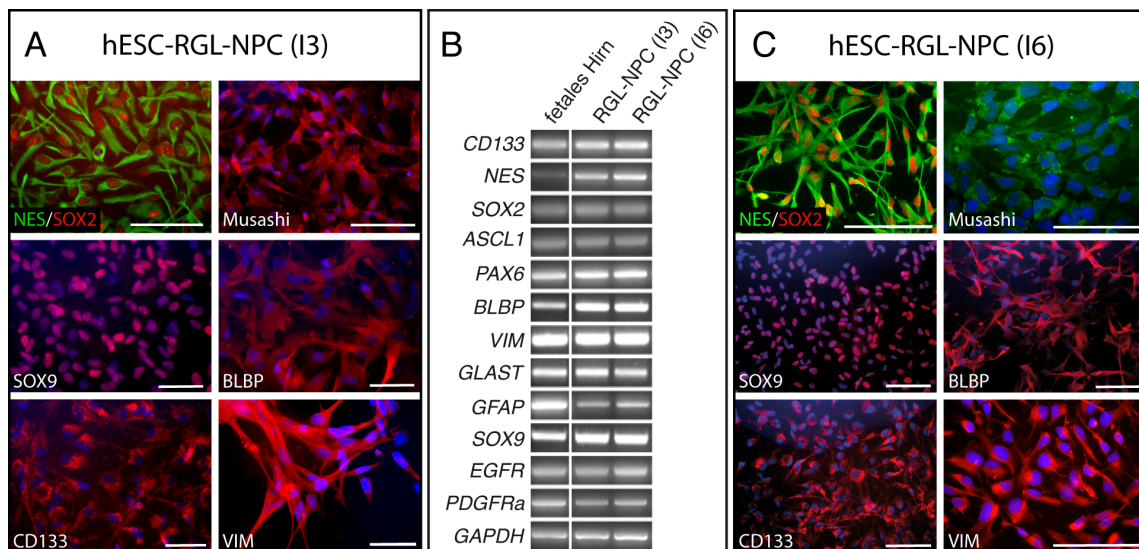


Abbildung 13: Zelllinienübertragbarkeit des neuralen Differenzierungsprotokolls

Embryonale Stammzellen der Linien I3 und I6 wurden nach dem in 3.1 beschriebenen Protokoll zu neuralen Stammzellen differenziert und das Expressionsprofil auf Protein- (A + C) und Transkriptebene (B) untersucht. Maßstab: (A) 50 μm , (C) 100 μm .

Die neurale Differenzierungsstrategie humaner ESC und iPSC gefolgt von einer Anreicherung CD133 positiver Zellen führte also zur Etablierung einer Zellpopulation mit Charakteristika neuraler Stammzellen und Radialglia mit robuster Übertragbarkeit auf diverse pluripotente Stammzelllinien.

3.2.2 RGL-NPC zeigen ein stabiles Wachstumsverhalten

Um die Wachstumsrate der RGL-NPC zu bestimmen, wurde eine definierte Anzahl von Zellen unter proliferativen Bedingungen ausgesät (0 h) und die Zellzahl nach 24, 48, 72 und 96 h erneut bestimmt. Die Versuche wurden mit humanen ESC- und iPSC-RGL-NPC in verschiedenen Passagen durchgeführt. Wie in Abbildung 14 dargestellt, folgten die Zellen einem stabilen Wachstumsverhalten. Aus den ermittelten Zellzahlen konnte eine Verdopplungszeit von $3,2 \pm 0,1$ Tagen für ESC-RGL-NPC und $3,6 \pm 0,3$ Tagen für iPSC-RGL-NPC ermittelt werden.

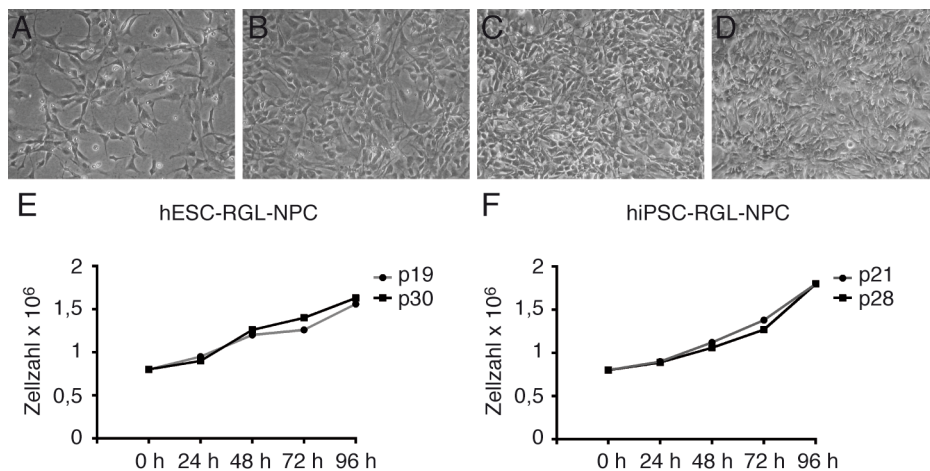


Abbildung 14: Proliferationsverhalten der RGL-NPC

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit wurden definierte Zellzahlen an hESC- und hiPSC-RGL-NPC unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 ausplattiert und die Zellzahl nach je 24, 48, 72 und 96 h erneut bestimmt. **A-D:** Repräsentative Bilder der hESC-RGL-NPC nach 24, 48, 72 und 96 h. **E:** Wachstum der hESC-RGL-NPC. **F:** Wachstum der hiPSC-RGL-NPC.

3.2.3 Bestimmung der regionalen Identität der RGL-NPC entlang der anterior-posterior- sowie dorso-ventral-Achse

Während der Entwicklung entstehen im Zentralnervensystem durch die spezifisch kombinierte Expression definierter Transkriptionsfaktoren positionelle Informationen. Diese führen zur regionalen Identität der entsprechenden Vorläuferpopulationen und somit zur Festlegung spezifischer neuraler Zellschicksale entlang der anterior-posterior Achse (AP-Achse) sowie in dorso-ventraler Orientierung (DV-Achse). Um die regionale Identität der RGL-NPC zu bestimmen, wurde die Expression regionalspezifischer Transkriptionsfaktoren der AP- sowie der DV-Achse auf Transkriptionsebene untersucht. Vergleichend wurden die schon zuvor genutzten lt-hESNSC Zellen mit einer bekannten regionalen Identität des anterioren Rhombencephalons und einer Zugehörigkeit zu intermediären/ventralen Vorläuferdomänen analysiert (Abbildung 15).

Entlang der AP-Achse ließ sich feststellen, dass die RGL-NPC eine regionale Identität aufwies, welche mit einem Phänotyp des posterioren Rhombencephalons und anterioren Rückenmarks übereinstimmt (15A). Typische Marker des Prosencephalons, darunter *forkhead homeobox (FOX) G1*, *empty spiracles homeobox (EMX) 1*, *EMX2* und *orthodenticle homeobox (OTX) 2* wurden von keinem untersuchten Zelltyp exprimiert. Unter den Transkriptionsfaktoren des Mesencephalons wurden *engrailed 1 (EN1)*, *gastrulation brain homeobox (GBX) 2* und *early growth response (EGR) 2* exprimiert. *NK2 homeobox 1 (NKX2-1)* und *PAX2* konnten nicht detektiert werden. Aus dem Bereich des Rhombencephalons exprimierten die lt-hESNSC das *Homeobox (HOX)*-Gen *HOXB2*. Transkriptionsfaktoren weiter posterior gelegener Bereiche wurden wie erwartet nicht exprimiert. Die RGL-NPC hingegen exprimierten *HOX*-Gene des Rhombencephalons und des Rückenmarks bis hin zur thorakalen Ebene (*HOXA2*, *HOXB2*, *HOXB4*, *HOXB6*, *HOXC5*, *HOXD8* und *HOXD9*). *HOX*-Gene noch weiter posterior gelegener Rückenmarksabschnitte, beispielsweise *HOXC11* der thorakalen Ebene, wurden nicht exprimiert.

Bei Betrachtung des Expressionsprofils der Transkriptionsfaktoren der DV-Achse fällt auf, dass die RGL-NPC im Gegensatz zu den lt-hESNSC Zellen keinen distinkten Vorläuferdomänen zugeordnet werden können (15B). Es wurden sowohl dorsale Transkriptionsfaktoren, darunter *PAX3* und *PAX7*, als auch Transkriptionsfaktoren intermediärer Domänen wie *iroquois homeobox (IRX) 3*, *PAX6*, *NKX6-2* und *NKX6-1* exprimiert. Der *oligodendrocyte lineage transcription factor (OLIG) 2* als ventraler Transkriptionsfaktor konnte detektiert werden, *NKX2-2* als Marker der am weitesten ventral gelegenen Domäne hingegen wurde nicht mehr exprimiert.

Das Expressionsprofil der lt-hESNSC Zellen lässt sich den intermediär-ventralen Domänen, die gekennzeichnet sind durch die Transkriptionsfaktoren *IRX3*, *PAX6*, *NKX6-2* und *NKX6-1*, zuordnen, wobei Transkriptionsfaktoren sowohl der am weitesten dorsal als auch ventral gelegenen Domänen nicht detektiert wurden.

Weder im Bereich der AP- noch der DV-Achse konnten große Unterschiede zwischen hESC- und hiPSC-RGL-NPC festgestellt werden.

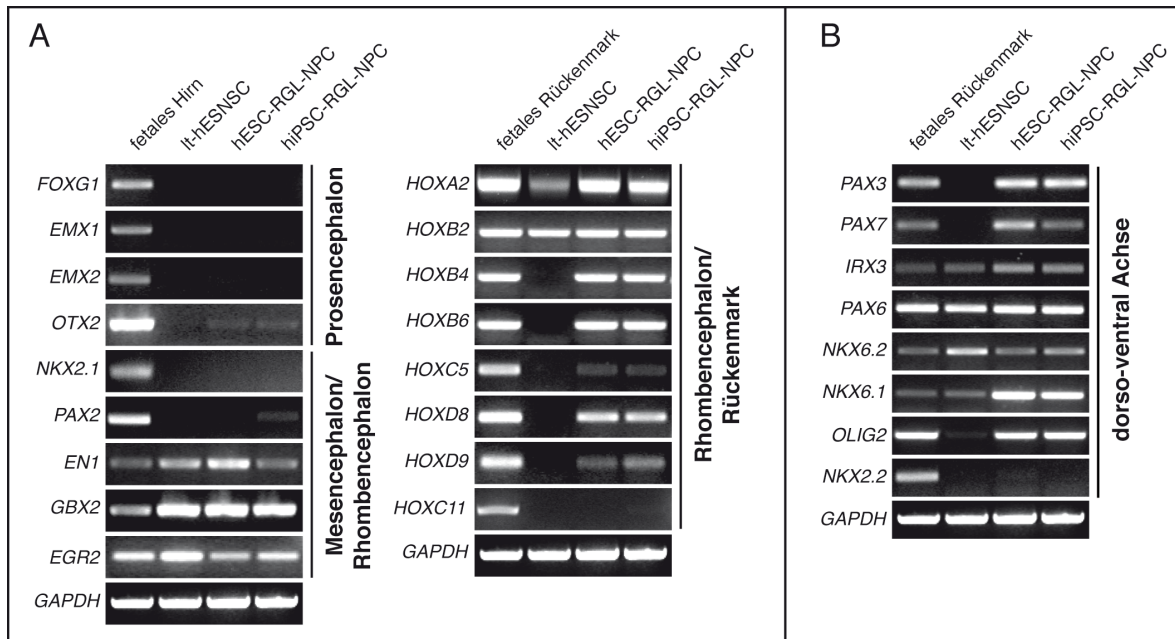


Abbildung 15: Regionale Identität der RGL-NPC

Zur Beschreibung der regionalen Identität der RGL-NPC wurde die Expression regionalspezifischer Transkriptionsfaktoren der anterior-posterior (A) und dorso-ventralen Achse (B) mittels RT-PCR vergleichend zu einer etablierten NSC-Population (It-hESNSC) mit einem bekannten Phänotyp des anterioren Rhombencephalons und einer Zugehörigkeit zu intermediären/ventralen Vorläuferdomänen untersucht.

Die RGL-NPC konnten ohne erkennbare Veränderungen der Morphologie und des Proliferationsverhaltens für mehr als 40 Passagen kultiviert werden. Um die Stabilität der regionalen Identität in der Langzeitkultur der RGL-NPC zu überprüfen, wurde das Expressionsprofil der regionalen Transkriptionsfaktoren der RGL-NPC im Abstand von jeweils 10 Passagen erneut analysiert (Abbildung 16). Es ist zu erkennen, dass die Expression der regionalen Transkriptionsfaktoren der RGL-NPC sowohl im Bezug auf die AP- als auch die DV-Achse im Wesentlichen stabil erhalten und zwischen hESC- und hiPSC-abgeleiteten RGL-NPC vergleichbar blieb. Kleinere Abweichungen zeigten sich bei den hESC-RGL-NPC bei der Expression von *EGR2*, die in Passage 38 abzunehmen scheint. Weiterhin wurde bei den hiPSC-RGL-NPC in Passage 38 eine schwache Expression des Prosencephalonmarkers *EMX2* detektiert. hiPSC-RGL-NPC der frühen Passagen zeigten zusätzlich noch eine sehr schwache Expression von *HOXC11*, einem Marker des thorakalen Rückenmarks, welche aber in höheren Passagen nicht mehr auftritt. Die Expression von *NKX6-1* scheint in frühen und späten Passagen geringer als in Zellen mittlerer Passagen, die Expression von *OLIG2* scheint in Zellen höherer Passagen abzunehmen.

Zusätzlich zu den regionalspezifischen Transkriptionsfaktoren wurde die Expression von CD133 während der Langzeitkultur beobachtet, diese blieb über alle untersuchten Passagen sowohl in den hESC- als auch hiPSC-RGL-NPC stabil.

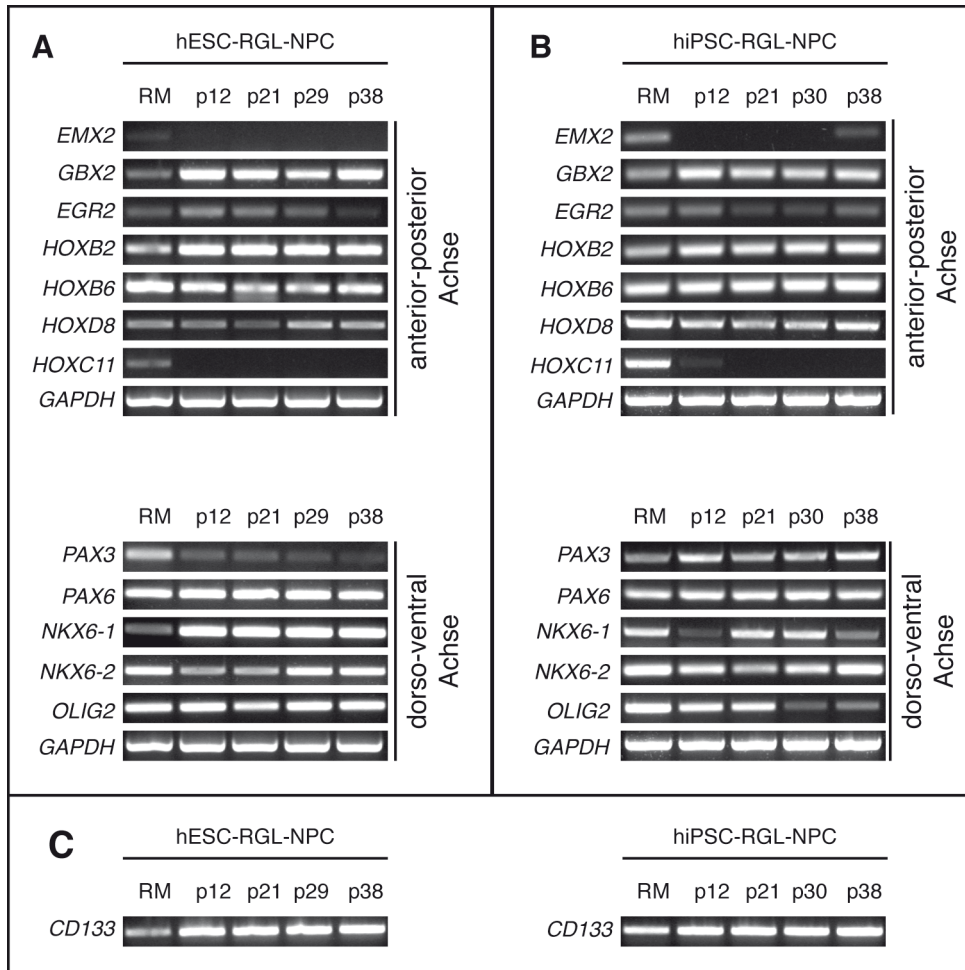


Abbildung 16: Expressionsprofil regionaler Marker sowie CD133 während der Langzeitkultur der RGL-NPC

Zur Überprüfung der Stabilität der regionalen Identität der RGL-NPC während der Langzeitkultur wurde die Expression regionalspezifischer Transkriptionsfaktoren in den hESC- (A) und hiPSC-RGL-NPC (B) über 40 Passagen im Abstand von je 10 Passagen mittels RT-PCR getestet. Weiterhin wurde die Expression von CD133 im Verlauf der Passagen beobachtet (C). RM: cDNA des fetalen Rückenmarks als Positivkontrolle.

Die generierten hESC- und hiPSC-RGL-NPC zeigten zusammengefasst einen über mindestens 40 Passagen hinweg robusten regionalen Phänotyp des posterioren Rhombencephalons und anterioren Rückenmarks ohne direkte Zugehörigkeit zu einer distinkten Vorläuferdomäne der DV-Achse.

3.2.4 RGL-NPC exprimieren Marker früher und später NSC-Populationen

Während der Entwicklung humaner ESC zu distinkten neuronalen Zelltypen können mehrere Populationen an NSC beschrieben werden, welche durch ihr Differenzierungspotenzial und Reaktionsvermögen auf extrazelluläre Stimuli in Bezug auf ihre Regionalisierung unterschieden werden können (Elkabetz et al, 2008). Dabei werden frühe NSC, welche aus neuronalen Rosetten gewonnen werden und ein breites Differenzierungspotenzial besitzen, von späten, stärker eingeschränkten NSC, die unter dem Langzeiteinfluss von EGF und FGF-2 kultiviert werden, abgegrenzt. Die hESC-RGL-NPC wurden im Hinblick auf die Expression bestimmter Marker, welche den Rosettenzellen oder langzeitproliferierten NSC (NSC^{EGF/FGF}) zugeordnet werden konnten bzw. von beiden Populationen geteilt wurden, untersucht und mit lt-hESNSC verglichen. Weiterhin wurde die relative Expression von *CD133* in diesen beiden Zellpopulationen sowie neuronalen Rosetten mittel quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) bestimmt (Abbildung 17). Die aus neuronalen Rosetten isolierte RNA wurde von Frau Dr. Sabine Müntst zur Verfügung gestellt.

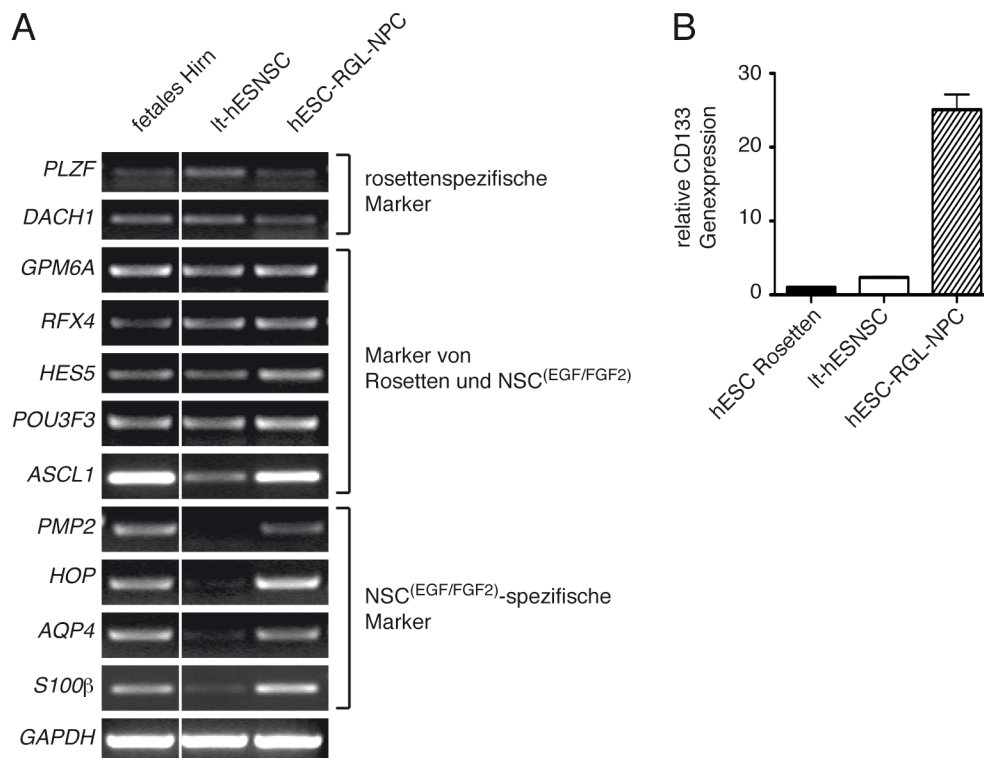


Abbildung 17: Vergleich der hESC-RGL-NPC zu Rosettenzellen sowie langzeitkultivierten NSC
 Zur Einordnung der hESC-RGL-NPC in den Rahmen unterschiedlicher NSC Populationen (Elkabetz et al, 2008), wurde die Expression von rosettenspezifischen Markern und solchen langzeitproliferierter NSC (NSC^{EGF/FGF}) sowie von beiden Populationen geteilten Markern mittels RT-PCR untersucht. Vergleichend wurde das Expressionsprofil einer weiteren NSC-Population (lt-hESNSC) dargestellt (A). Die relative Expression des NSC-Markers *CD133* wurde mittels qPCR in RGL-NPC und lt-hESNSC bestimmt und die Werte auf die Expression in neuronalen Rosetten bezogen. lt-hESNSC: $2,36 \pm 0,09$; hESC-RGL-NPC: $25,09 \pm 2,06$. Werte sind in Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt (B).

Es ist zu beobachten, dass die hESC-RGL-NPC sowohl Marker exprimierten, welche den Rosettenzellen und NSC^{EGF/FGF} zugeschrieben werden können als auch solche, die von beiden Populationen geteilt werden (17A). Im Gegensatz dazu exprimierten die lt-hESNSC nur die rosettenspezifischen und von Rosettenzellen und NSC^{EGF/FGF} geteilten Marker, nicht jedoch diejenigen, welche ausschließlich den NSC^{EGF/FGF} zugeordnet werden können. Lediglich eine schwache Expression des NSC^{EGF/FGF}-spezifischen Markers Calcium-bindenden Proteins *S100β* konnte detektiert werden. Allerdings erscheint die Expression der rosettenspezifischen Marker *promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF)* und *Dachshundhomolog (DACH) 1* in den RGL-NPC geringer als in den lt-hESNSC, die Expression der NSC^{EGF/FGF}-assoziierten Marker *Glycoprotein M6A (GPM6A)*, *regulatory factor X4 (RFX4)*, *hairy and enhancer of split (HES)5*, *POU3F3* und *ASCL1* hingegen verstärkt. Im Bezug auf die relative Expression von *CD133* lässt sich ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge von Rosettenzellen über lt-hESNSC hin zu den RGL-NPC beobachten (17B).

3.3 Differenzierungsverhalten der RGL-NPC

Neurale Stammzellen sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihr tripotentes Differenzierungsvermögen in die drei Hauptzelltypen des ZNS: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten. Im Folgenden wurde zunächst das tripotente Differenzierungsverhalten der RGL-NPC untersucht. Im Anschluss daran wurde die neuronale Differenzierung näher betrachtet und ein distinktes Differenzierungsprotokoll zur effizienten Oligodendrozytengenerierung aus RGL-NPC etabliert.

3.3.1 RGL-NPC differenzieren tripotent in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten

Um zu zeigen, dass sich die RGL-NPC tripotent in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten entwickeln können, wurden die Zellen unter Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 differenziert. Es ist exemplarisch die Differenzierung der hESC-RGL-NPC dargestellt (Abbildung 18).

Zur Differenzierung in neuronale Zelltypen wurden die RGL-NPC unter dem Einfluss von *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* kultiviert. Dieser stimuliert die Differenzierung und das Wachstum von Neuronen und unterstützt deren Überleben (Vicario-Abejon et al, 1995). Nach 3 Wochen konnten $35,2 \pm 2,1$ % der Zellen mittels Immunzytochemie positiv für den pan-neuronalen Marker β -III Tubulin detektiert werden (18A).

Um astrogliale Zelltypen zu generieren, wurden die RGL-NPC unter dem Einfluss fetalen Kälberserums (*fetal calf serum*, FCS) differenziert. Es ist bekannt, dass FCS verschiedene Faktoren enthält, welche die Expression von GFAP, einem Marker astrozytärer Zellen, induzieren, darunter *bone morphogenetic proteins* (BMP) (Chiang et al, 1996; Mabie et al, 1997). Nach 14 Tagen Differenzierung waren $62,4 \pm 3,4$ % der Zellen immunzytochemisch positiv für GFAP (18B).

Nach einem Entzug der Wachstumsfaktoren für 6 Wochen konnten $8,1 \pm 0,4$ % der Zellen mit dem O4 Antikörper markiert werden, welcher an oligodendrogliale Zellen bindet (18C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die RGL-NPC unter Entzug der Wachstumsfaktoren tripotent in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren können.

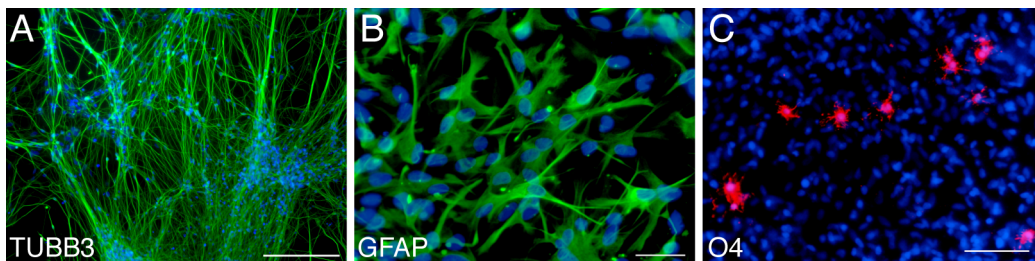


Abbildung 18: Tripotentes Differenzierungsverhalten der hESC-RGL-NPC

Zur Analyse des Differenzierungsverhaltens wurden hESC-RGL-NPC in drei unterschiedlichen Protokollen unter Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 differenziert und auf das Vorkommen von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten immunzytochemisch untersucht. Unter dem Einfluss von BDNF differenzierten die Zellen nach drei Wochen in $35,2 \pm 2,1$ % β -III-Tubulin (TUBB3)-positive Neurone (A). Die Zugabe von FCS führte zur astroglialen Differenzierung in $62,4 \pm 3,4$ % GFAP-positive Zellen (B). Nach Langzeitentzug der Wachstumsfaktoren für mindestens sechs Wochen konnten $8,1 \pm 0,4$ % O4-positive Oligodendrozyten detektiert werden (C). Werte in Mittelwert \pm Standardfehler; Maßstab: A + C: 100 μ m, B: 50 μ m.

3.3.2 Neuronale Differenzierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich RGL-NPC tripotent differenzieren lassen, wurde im Folgenden überprüft, ob die RGL-NPC *in vitro* zu funktionellen Neuronen unterschiedlicher Subtypen ausreifen. Zu diesem Zweck wurden zunächst 3 Wochen differenzierte neuronale Kulturen mittels Immunzytochemie und RT-PCR auf die Zusammensetzung der neuronalen Subtypen untersucht. Weiterhin wurden hESC-RGL-NPC für 10 Wochen auf einem Rasen aus mitotisch inaktivierten, primären Astrozyten der Maus differenziert und ihre elektrophysiologische Aktivität mittels Patch-clamp Messungen detektiert. Diese Messungen wurden von Dr. Jaideep Cherakka Kesavan durchgeführt.

Neuronale Subtypen

Nach drei Wochen Differenzierung unter Wachstumsfaktorentzug und dem Einfluss von BDNF konnte in den neuronalen Kulturen mittels Immunzytochemie die Expression der Isoformen A und B des Mikrotubuli-assoziiertes Proteins (MAP2AB) detektiert werden (Abbildung 19A). Die Isoformen A und B werden in Neuronen mit reifer Morphologie exprimiert. Der Großteil der RGL-NPC-abgeleiteten Neurone war positiv für gamma-Aminobuttersäure (GABA; 19B) als Marker für GABAerge Neurone. Im Gegensatz dazu wurden nur sehr wenige für den vesikulären Glutamattransporter 2 (vGlut2) positive glutamaterge Neurone beobachtet (19C). Der Anteil Tyrosinhydroxylase (TH)-positiver dopaminerge Neurone in den Kulturen war ebenfalls sehr gering (19D).

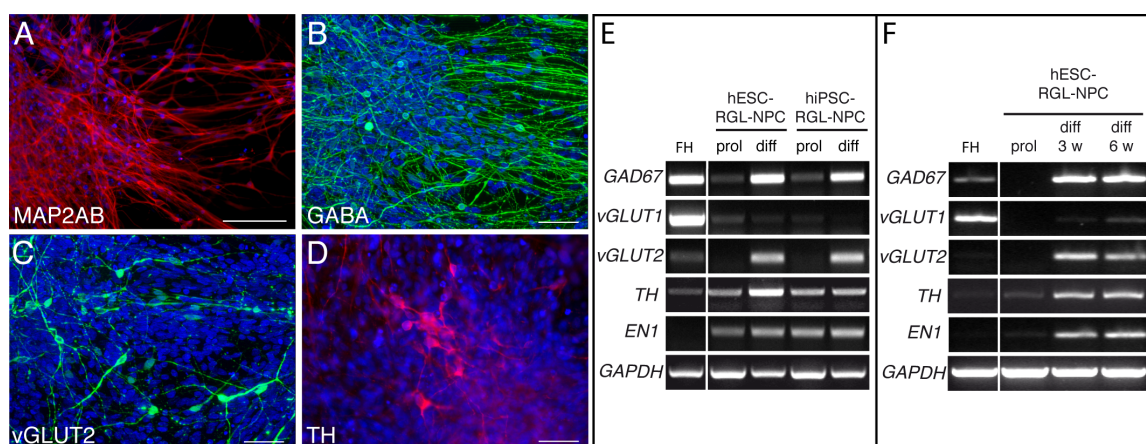


Abbildung 19: Analyse der Subtypenzusammensetzung RGL-NPC-abgeleiteter neuronaler Kulturen

Zur Untersuchung der neuronalen Differenzierung der hESC- und hiPSC-RGL-NPC wurden die Zellen für 3 bzw. 6 Wochen unter Entzug der Wachstumsfaktoren und dem Einfluss von BDNF neuronal differenziert und die neuronale Zusammensetzung dieser Kulturen mittels Immunzytochemie und RT-PCR untersucht. **A-D:** Immunzytochemische Analyse hESC-RGL-NPC-abgeleiteter neuronaler Kulturen. Maßstab: A: 100 μ m, B-D: 50 μ m. **E:** Analyse der Transkriptmenge neuronal differenzierter hESC- und hiPSC-RGL-NPC (diff) im Vergleich zu proliferierenden Zellen (prol). **F:** Vergleich der Transkriptmengen nach 3 und 6 Wochen neuronaler Differenzierung (diff 3/6 w) von hESC-RGL-NPC. FH, cDNA aus fetalem Hirn.

Auf Transkriptebene (19E) konnte nach drei Wochen Differenzierung der hESC-RGL-NPC ein deutlicher Anstieg der Transkripte des GABA-produzierenden Enzyms *Glutamat Decarboxylase* (*GAD1*), *vGLUT2* und *TH* sowie ein sehr schwacher Anstieg des Transkriptes für *EN1*, einem Transkriptionsfaktor dopaminerge Neurone, im Vergleich zu proliferierenden Zellen als Bestätigung der neuronalen Differenzierung der Kulturen gezeigt werden. Eine Expression von *vGlut1* konnte weder auf Transkript- noch Proteinebene detektiert werden. hiPSC-RGL-NPC zeigten in den hESC-abgeleiteten Zellen sehr ähnliches neuronales Differenzierungspotenzial bis auf einen schwächeren Anstieg der Transkripte für *TH* und *EN1* als Marker dopaminerge Neurone.

Um zu überprüfen, ob die RGL-NPC nach verlängerter neuronaler Differenzierung fortschreitend in diverse Subtypen ausreifen, wurden Zellen für 3 und 6 Wochen differenziert und die Transkriptmengen neuronaler Gene mittels RT-PCR verglichen (19F). Es zeigte sich kein deutlicher Unterschied in der Verteilung der neuronalen Subtypen zwischen 3 und 6 Wochen differenzierten Zellen mit Ausnahme geringer Transkriptmengen von *vGLUT1* nach 6 Wochen Differenzierung.

Zur Überprüfung der Stabilität der neuronalen Differenzierung der RGL-NPC während der Langzeitkultur wurden Zellen der Passagen 16 und 40 für 3 Wochen nach oben beschriebenem Protokoll differenziert und die Transkriptmengen neuronenasoziiierter Gene mittels RT-PCR untersucht (Abbildung 20). Dabei zeigte sich, dass das neuronale Differenzierungsverhalten der RGL-NPC in unterschiedliche neuronale Subtypen auch nach Langzeitkultur erhalten bleibt.

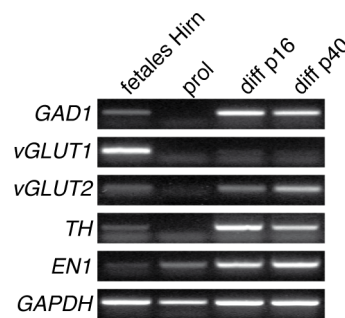


Abbildung 20: Neuronales Differenzierungsverhalten der RGL-NPC während der Langzeitkultur
Zur Überprüfung der Stabilität der neuronalen Differenzierung während der Langzeitkultur wurden hESC-RGL-NPC der Passagen 16 und 40 für 3 Wochen nach oben beschriebenem Protokoll neuronal differenziert (diff) und die Zusammensetzung der neuronalen Subtypen mittels RT-PCR untersucht. Vergleichend sind proliferierende RGL-NPC (prol) dargestellt.

Nachdem in den neuronalen Kulturen nach spontaner Differenzierung unter dem Einfluss von BDNF unterschiedliche Subtypen detektiert werden konnten, wurden im Folgenden zwei Protokolle zur gerichteten neuronalen Differenzierung in dopaminerge Neurone sowie Motoneurone angewendet (Abbildung 21). Die Protokolle wurden an bereits publizierte Differenzierungen angelehnt (Koch et al, 2009).

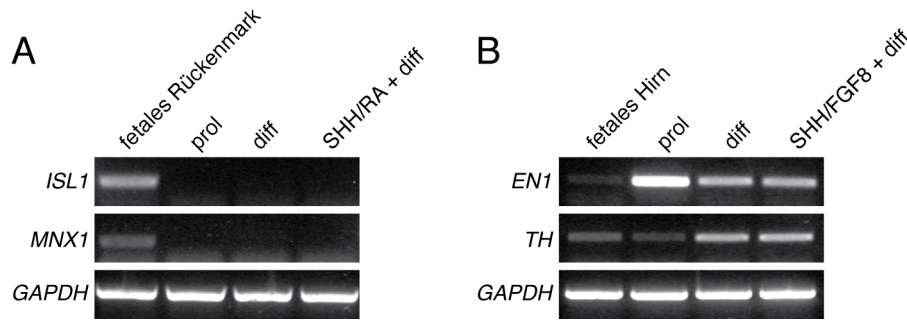


Abbildung 21: Gerichtete Differenzierung der RGL-NPC in neuronale Subtypen

Zur gerichteten neuronalen Differenzierung der hESC-RGL-NPC in Subtypen des ventralen Rückenmarks (Motoneurone, **A**) sowie des ventralen Mesencephalons (dopaminerge Neurone, **B**) wurden die Zellen unter permissiven Bedingungen beider Zelltypen kultiviert. Die Kulturbedingungen wurden von bereits publizierten Differenzierungsparadigmen (Koch et al, 2009) abgeleitet. **A:** Eine Ventralisierung und Posteriorisierung der RGL-NPC erfolgte zunächst für 6 Tage unter dem Einfluss von SHH und ATRA unter proliferativen Bedingungen, im Anschluss wurden die Zellen für weitere 6 Tage unter dem Einfluss von SHH und ATRA differenziert und schließlich für 3 Wochen ausgereift. Es erfolgte die Untersuchung der Expression von Transkriptionsfaktoren motoneuronaler Zellen im Vergleich zu proliferierenden (prol) sowie unter Standardbedingungen neuronal differenzierten (diff) hESC-RGL-NPC. **B:** Für die gerichtete Differenzierung der hESC-RGL-NPC in dopaminerge Neurone wurden die Zellen zunächst für 14 Tage unter dem Einfluss von SHH und FGF-8b kultiviert und im Anschluss daran für 3 Wochen ausgereift. Die Markerexpression dopaminerger Neurone wurde mittels RT-PCR vergleichend zu proliferierenden (prol) Zellen sowie neuronalen Standardkulturen (diff) analysiert.

Zur gerichteten Differenzierung der hESC-RGL-NPC in Motoneurone des Rückenmarks wurden die Zellen zunächst für 6 Tage unter dem Einfluss von *Sonic Hedgehog* (SHH), hohen Konzentrationen ATRA (1 μ M), EGF und FGF-2 zwecks Ventralisierung und Posteriorisierung proliferiert, anschließend für weitere 6 Tage unter dem Einfluss von SHH und einer geringen Konzentration von ATRA (0,1 μ M) differenziert und schließlich für weitere 3 Wochen in Anwesenheit geringer Konzentrationen von SHH (50 ng/ml) ausgereift. Im Vergleich zu spontan neuronal differenzierten Kulturen konnte keine Expression von *islet* (*ISL*) 1 und *motor neuron and pancreas homeobox* (*MNX*) 1 (auch HB9) als Marker ventraler, spinaler Motoneurone erreicht werden (21A).

Zur Induktion dopaminerger Neurone des Mesencephalons wurden RGL-NPC zunächst für 14 Tage unter dem Einfluss von SHH und FGF-8b differenziert und im Anschluss daran für 3 Wochen ausgereift. Verglichen mit spontan differenzierten neuronalen Kulturen konnte auch nach Anwendung eines Protokolles zur dopaminergen Differenzierung von NSC keine vermehrte Induktion der Marker *EN1* und *TH* bewirkt werden (21B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl hESC- als auch hiPSC-RGL-NPC nach drei Wochen Kultur unter Wachstumsfaktorentzug neuronal differenzierten und dabei vorwiegend Neurone eines interneuronähnlichen, GABAergen Phänotyps mit geringen Anteilen dopaminerger und glutamaterger Neuronen generierten. Die Anwendung von induktiven

Differenzierungsprotokollen zur Generierung dopaminergener Neurone des Mesencephalons sowie Motoneurone der Rückenmarks erbrachte keine verstärkte Induktion dieser Zelltypen.

Funktionelle Neurone aus RGL-NPC

Um die funktionalen Charakteristika RGL-NPC-abgeleiteter Neurone zu untersuchen, wurden hESC-abgeleitete Zellen auf mitotisch inaktivierten primären Fibroblasten der Maus für 10 Wochen unter Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 differenziert. Anschließend wurden die Neurone mittels Patch-clamp Technologie funktionell untersucht (Abbildung 22). Der Lösung der Messpipette war Biozytin zugefügt, sodass die vermessenen Zellen im Anschluss in Kombination mit Antikörpern gegen β -III-Tubulin und humane Nuklei (hNuc) immunzytochemisch als humane Neurone identifiziert werden konnten (22G).

Die Ableitung des Membranpotenzials (*whole-cell current clamp*) ließ die Bildung von Aktionspotenzialen in Reaktion auf fortlaufende Depolarisation von -50 bis +140 pA in Schritten von 10 pA bei einem Membranpotenzial von ungefähr -60 mV erkennen (22A+B). Zusätzlich konnten in der Hälfte der vermessenen Neurone spontane Aktionspotenziale sowohl mittels Ableitung des Membranpotenzials (*loose patch*, 22C, obere Messung) als auch des Gesamtzellstromes detektiert werden (22C, untere Messung). Weiterhin konnten mittels Tetrodotoxin (TTX)-vermittelter Inhibition spannungsabhängige Natriumkanäle nachgewiesen werden (22D). Die Zugabe von 4-Aminopyridin (4-AP) bewirkte die sichtbare Blockade spannungsabhängiger Kaliumkanäle (22E). Zusätzlich ließen sich spontane postsynaptische Ströme ableiten (22F), was auf funktionelle Synapsen der vermessenen Neuronen hindeutet.

Zusammenfassend konnten hESC-RGL-NPC nach 10 Wochen Differenzierung auf primären murinen Astrozyten zu funktionellen Neuronen ausreifen. Diese generierten sowohl spontane als auch durch schrittweise Depolarisation hervorgerufene Aktionspotenziale. Es konnten spannungsabhängige Na^+ - und K^+ -Kanäle sowie funktionelle Synapsen detektiert werden.

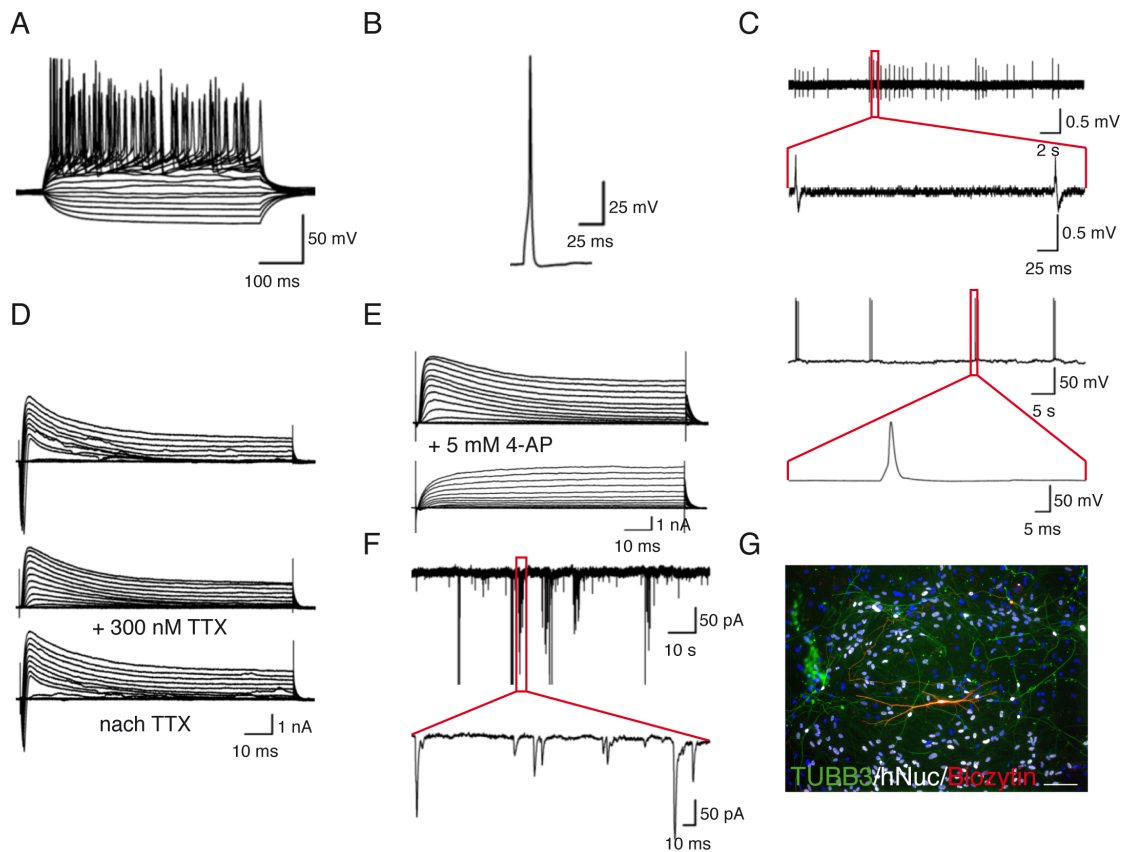


Abbildung 22: Funktionelle Analyse RGL-NPC-abgeleiteter Neurone

Um die funktionelle neuronale Ausreifung von RGL-NPC zu zeigen, wurden hESC-abgeleitete Zellen für 10 Wochen auf primären murinen Astrozyten differenziert und im Anschluss elektrophysiologisch untersucht. **A:** Ableitung des Membranpotenzials (*whole-cell current clamp*) und Detektion mehrerer Aktionspotenziale nach schrittweiser Depolarisation für je 500 ms von -50 bis $+140$ pA in 10 pA Schritten. Das Membranpotenzial wurde bei ungefähr -60 mV gehalten. **B:** Darstellung eines einzelnen Aktionspotenziales bei 140 pA. **C:** Detektion spontaner Aktionspotenziale durch Ableitung der Membranspannung an der Zelloberfläche (*loose-patch*, obere Abbildung) und des Membranpotenzials (untere Abbildung) jeweils mit Darstellung eines Ausschnittes in höherer Vergrößerung. **D:** Ableitung der Gesamtzellströme induziert durch Depolarisationsschritte von je 10 mV über ein Membranpotenzial von -80 bis $+60$ mV vor (oben) und während (Mitte) der Applikation von Tetrodotoxin (TTX) sowie nach Auswaschen von TTX (unten) zur Detektion spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle. **E:** Ableitung der Gesamtzellströme vor (oben) und während der Applikation von 4-Aminopyridin (4-AP) zur Inhibition spannungsabhängiger K^+ -Kanäle. **F:** Ableitung spontaner post-synaptischer Ströme bei einem Membranpotenzial von -70 mV zum Nachweis funktioneller Synapsen. **G:** Immunzytochemische Identifikation der bei Messung mit Biozitin markierten humanen Neurone in Kombination mit Antikörpern gegen β -III-Tubulin und hNuc. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

3.3.3 Differenzierung oligodendroglialer Zellen aus RGL-NPC

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die Etablierung eines Differenzierungsprotokolles zur effizienten Generierung humaner Oligodendrozyten aus pluripotenten Stammzellen sein. Dazu wurde eine NPC Population mit gliogenem Differenzierungspotenzial als stabiles Intermediat zwischen pluripotenten Stammzellen und Oligodendrozyten hergestellt. Nachdem beobachtet werden konnte, dass die generierten RGL-NPC spontan zu ca. 8% O4-positiven Oligodendrozyten ausdifferenzierten, wurde im Folgenden die Etablierung eines oligodendrozytenspezifischen Differenzierungsprotokolles angestrebt, welches die effiziente Generierung und nähere Charakterisierung humaner Oligodendrozyten

aus NPC *in vitro* erlaubt. Dazu diente ein dreistufiges Protokoll zur Differenzierung muriner Oligodendrozyten aus NSC als Ansatzpunkt (Glaser et al, 2007). In einem ersten Schritt sollten proliferierende gliale Vorläuferzellen induziert werden, welche im zweiten Schritt weiter proliferieren und schließlich unter Entzug der Wachstumsfaktoren terminal ausreifen sollten (Abbildung 23).

RGL-NPC lassen sich *in vitro* effizient in Oligodendrozyten und ihre Vorläufer differenzieren

Die oligodendrogliale Spezifikation der RGL-NPC erfolgte in zwei Schritten: zur Induktion proliferierender glialer Zelltypen aus RGL-NPC wurden die Zellen unter dem Einfluss von *platelet-derived growth factor AA* (PDGF-AA), EGF und Forskolin für 2 Wochen differenziert. Im Anschluss erfolgte eine einwöchige Kultivierung unter dem Einfluss von PDGF-AA, T3, Noggin und Ascorbinsäure (*ascorbic acid*, AA) zur Unterstützung der Proliferation oligodendroglialer Vorläuferzellen. Die terminale Ausreifung dieser Zellen erfolgte schließlich für 4-6 Wochen unter dem Einfluss von T3, AA und Laminin (23A).

Nach 4 Wochen terminaler Differenzierung zeigten sich verzweigte frühe Oligodendrozyten in den Kulturen (23B), welche nach 2 weiteren Wochen Reifung in Zellen mit multiplen, hochgradig verzweigten Fortsätzen ausdifferenzierten (23C). Immunzytochemische Analysen und Quantifizierung dieser Kulturen (23D+E; H) zeigten, dass nach 4 Wochen Differenzierung $77,9 \pm 2,5$ % der Zellen positiv für das Chondroitin-Sulfat Proteoglycan CSPG4/NG2 waren, das auf Oligodendrozytenvorläuferzellen und Pre-Oligodendrozyten exprimiert wird. Diese Zellen zeigten eine typische Morphologie oligodendroglialer Vorläufer mit rudimentär verzweigten bipolaren Fortsätzen. Darüber hinaus waren $53,8 \pm 4,9$ % der Zellen positiv für O4, einen Marker früher Oligodendrozyten. Diese Zellen zeigten im Vergleich zu den NG2-positiven Vorläufern eine komplexere Morphologie mit mehreren bis multiplen Fortsätzen eines höheren Verzweigungsgrades charakteristisch für Oligodendrozyten. Alle O4-positiven Zellen zeigten eine Koexpression des oligodendroglialen Transkriptionsfaktors OLIG2. Nach 6 Wochen terminaler Differenzierung der RGL-NPC konnte darüber hinaus die Expression des basischen Myelinproteins (*myelin basic protein*, MBP) detektiert werden, einem Marker reifer Oligodendrozyten (23G). Diese Zellen zeigten eine hochgradig verzweigte Morphologie reifer Oligodendrozyten. Zusätzlich konnten zum ersten Mal humane Oligodendrozyten mit dem monoklonalen Antikörper (mAB) 4860 detektiert werden (23F). Der Antikörper wurde im Labor von Prof. Faissner am Lehrstuhl für Zellmorphologie und Molekulare Neurobiologie der Ruhr-Universität Bochum als oligodendroglialer Marker generiert und markiert komplex verzweigte, MBP-exprimierende

Oligodendrozyten der Maus (Czopka et al, 2009). Die detektierten humanen Zellen wiesen ebenfalls die verzweigte Morphologie reifer Oligodendrozyten auf.

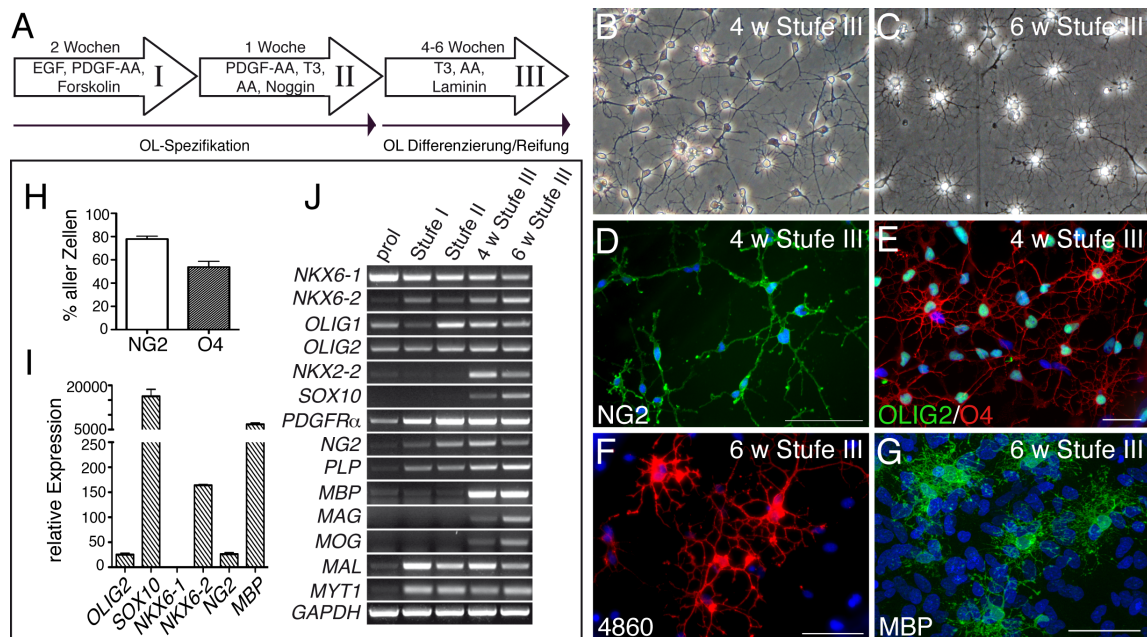


Abbildung 23: Effiziente Differenzierung hESC-RGL-NPC-abgeleiteter Oligodendrozyten

A: Übersicht über das dreistufige Differenzierungsprotokoll zur effizienten oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC. Zunächst wurden die Zellen für 2 Wochen unter dem Einfluss von EGF, PDGF-AA und Forskolin zur Induktion glialer Zelltypen differenziert (Stufe I). Anschließend wurden die Zellen für eine weitere Woche in Gegenwart von PDGF-AA, T3, Ascorbinsäure (AA) und Noggin kultiviert, um die Induktion und Proliferation oligodendroglialer Zellen zu unterstützen (Stufe II), bevor diese für 4-6 Wochen unter dem Einfluss von T3, AA und Laminin terminal differenziert wurden (Stufe III). OL, Oligodendrozyten. **B-G:** Phasenkontrastaufnahmen der oligodendroglial differenzierten Kulturen nach 4 bzw. 6 Wochen terminaler Differenzierung (4/6 Wochen Stufe III) mit korrespondierenden immunzytochemischen Färbungen. Maßstab: 50 μ m. **H:** Quantifizierung 6 Wochen terminal differenzierter Kulturen. **I:** qPCR-Analyse der Transkriptmengen oligodendroglialer Transkriptionsfaktoren sowie von Genen, die für das Oligodendrozytenvorläuferprotein NG2 und das Myelinprotein MBP kodieren. Dargestellt sind 6 Wochen terminal differenzierte Kulturen bezogen auf die Werte proliferierender Zellen. *OLIG2*: $24,88 \pm 1,21$; *SOX10*: $16\,283,43 \pm 1\,377,39$; *NKX6-1*: $0,11 \pm 0,01$; *NKX6-2*: $164,09 \pm 0,77$; *NG2*: $26,24 \pm 1,51$; *MBP*: $6\,816,77 \pm 2,57,01$. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. **J:** Untersuchung der Transkriptmengen von oligodendroglialen Transkriptionsfaktoren und Markerproteinen mittels RT-PCR in proliferierenden RGL-NPC (prol) sowie während des oligodendroglialen Differenzierungsprotokolls.

Um weitere quantitative Aussagen über die Expression der oligodendroglialen Transkriptionsfaktoren bzw. Markerproteine *NG2* und *MBP* zu erhalten, wurden 6 Wochen terminal differenzierte oligodendrogliale Kulturen mittels qPCR mit proliferierenden RGL-NPC verglichen (23I). Es ist zu erkennen, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren *OLIG2*, *SOX10* und *NKX6-2* deutlich hochreguliert war, was die oligodendrogliale Differenzierung der Kulturen bestätigt, wohingegen die Transkriptmenge für *NKX6-1* als schwach negativ reguliert detektiert wurde. Sowohl der oligodendrogliale Vorläufermarker *NG2* als auch das Myelinprotein *MBP* wurden deutlich verstärkt transkribiert.

Um den Verlauf der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC näher zu beleuchten, wurden die Kulturen innerhalb des Differenzierungsprotokolles nach den Differenzierungsstufen I und II sowie nach 4 und 6 Wochen der terminalen Stufe III auf Transkriptebene mittels RT-PCR (23j) untersucht. Im Vergleich zu proliferierenden RGL-NPC zeigte sich, dass die Expression aller für die oligodendrogliale Differenzierung und Reifung essenziellen Transkriptionsfaktoren wie *OLIG1/2*, *NKX2-2*, *NKX6-2* und *SOX10* im Zuge der Differenzierung induziert bzw. hochreguliert wurde. Betrachtet man die Expression von *OLIG1/2* als früheste oligodendrogliale Transkriptionsfaktoren, so schien die Expression von *OLIG1* ihren Höhepunkt nach der Phase II zu haben und ab da herunterreguliert zu werden. *OLIG2* wurde ab Phase II verstärkt exprimiert. *NKX6-2* war bereits ab der ersten Phase verstärkt, nach 6 Wochen terminaler Differenzierung hingegen am stärksten exprimiert. Die Rolle der Transkriptionsfaktoren *NKX2-2* und *SOX10* liegt in der Regulation der terminalen Differenzierung der Oligodendrozyten. *NKX2-2* wurde in den differenzierten RGL-NPC erst nach 4 Wochen terminaler Differenzierung exprimiert und schien nach 6 Wochen leicht negativ reguliert zu sein. *SOX10* wurde ebenfalls erst nach 4 Wochen terminaler Differenzierung induziert und nach 6 Wochen weiter hochreguliert. Einzig die Transkription von *NKX6-1* schien fortschreitend negativ reguliert zu sein.

Im Hinblick auf die Expression von Genen, deren Transkript für die Identifikation oligodendroglialer Vorläuferzellen herangezogen wird, darunter *PDGFR α* und das Proteoglycan *NG2*, lässt sich feststellen, dass während der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC diese schon direkt zu Beginn stimuliert und weiter hochreguliert wurden. Allerdings nahmen die Transkriptmengen für *PDGFR α* schon ab Beginn der terminalen Differenzierung leicht und für *NG2* nach 6 Wochen Ausreifung wieder ab.

Im Zuge der Reifung oligodendroglialer Zellen wird die Expression von Myelinkomponenten schrittweise hochreguliert, um schließlich die Ausbildung reifer, funktioneller Zelltypen zu ermöglichen. Die Transkriptanalyse zeigt, dass die Expression des Myelins *Proteolipidprotein (PLP)* stetig zunahm. Die Myelinkomponenten *MBP*, *myelinassoziertes Glykoprotein (MAG)* und *Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)* hingegen wurden erst nach 4 Wochen terminaler Differenzierung detektiert und auch nach 6 Wochen Differenzierung im Fall von *MBP* aufrechterhalten bzw. für *MAG* und *MOG* weiter hochreguliert. Zusätzlich wurde die Genexpression des myelinassozierten Transkriptionsfaktors *MYT1* sowie des Myelinproteins *myelin and lymphocyte protein (MAL1)* untersucht. *MAL1* war bereits nach der ersten Differenzierungsphase stark exprimiert, wurde innerhalb der zweiten Phase herunterreguliert, schien nach 4 Wochen terminaler Differenzierung wiederum verstärkt exprimiert und nach

6 Wochen wieder leicht herunterreguliert zu sein. *MYT1* wurde ebenfalls schon früh in der Differenzierung nach der ersten Phase detektiert und nicht deutlich sichtbar reguliert.

Das oligodendrogliale Differenzierungspotenzial der RGL-NPC bleibt während der Langzeitkultur stabil

Um zu überprüfen, ob das oligodendrogliale Differenzierungspotenzial der RGL-NPC während der Langzeitkultur der Zellen erhalten bleibt, wurden Zellen der Passagen 20 und 40 nach dem oben beschriebenen Protokoll differenziert, für 4 Wochen terminal ausgereift und mittels RT-PCR verglichen (Abbildung 24). Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede sowohl in der Induktion essenzieller oligodendroglialer Transkriptionsfaktoren wie *NKX6-1/2*, *OLIG1/2* und *SOX10* als auch bei der Expression oligodendrozyten- und myelinassoziierter Gene wie *NG2*, *MBP*, *MAG* und *MOG*. Die oligodendroglialen Kulturen der hochpassagigen RGL-NPC zeigten lediglich eine etwas schwächere Expression der Gene *NKX2-2*, *SOX10*, *PDGFR α* und *NG2*.

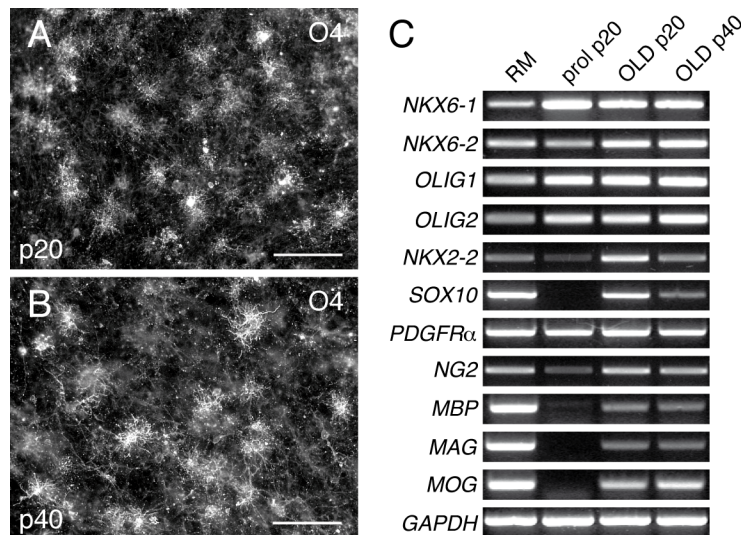


Abbildung 24: Oligodendrogliale Differenzierungsfähigkeit der hESC-RGL-NPC während der Langzeitkultur

Zur Überprüfung der Stabilität der RGL-NPC im Bezug auf das oligodendrogliale Differenzierungspotenzial während der Langzeitkultur wurden Zellen der Passagen 20 und 40 nach dem oben beschriebenen Differenzierungsprotokoll oligodendroglial differenziert, 4 Wochen terminal ausgereift (**A+B**: immunzytochemische Analyse der Kulturen mit einem Antikörper gegen O4. Maßstab: 100 μ m) und die Expression essenzieller Transkriptionsfaktoren sowie oligodendrozyten- und myelinassoziierter Gene der differenzierten Kulturen (OLD) im Vergleich zu proliferierenden RGL-NPC (prol) mittels RT-PCR untersucht (**C**). RM, cDNA des fetalen humanen Rückenmarks.

Das oligodendrogliale Differenzierungsprotokoll lässt sich auf hiPSC-RGL-NPC übertragen

In einem weiteren Schritt wurde das oligodendrogliale Differenzierungsprotokoll auf hiPSC-RGL-NPC angewendet und die resultierenden oligodendroglialen Kulturen untersucht (Abbildung 25). Es zeigt sich, dass nach 6 Wochen terminaler Differenzierung verzweigte Oligodendrozyten in den Kulturen vorhanden waren (25A), welche immunzytochemisch analog zu den hESC-RGL-NPC positiv für NG2, O4, MBP und 4860 gefärbt werden konnten (25B-E). Die qPCR-Analyse der Transkriptmengen nach 6 Wochen terminaler Differenzierung zeigte ebenfalls eine verstärkte Transkription der Gene für *OLIG2*, *SOX10*, *NKX6-2*, *NG2* und *MBP* sowie keine Veränderung der Transkriptmenge für *NKX6-1* (25F). Weiterhin zeigte die Analyse der oligodendroglialen Differenzierung mittels RT-PCR ähnliche Ergebnisse wie bei den hESC-RGL-NPC (25G). Allerdings lässt sich beobachten, dass die Transkriptmenge für *OLIG1* und *OLIG2* in den proliferierenden Zellen sehr gering erschien, aber nach der Differenzierungsstufe II deutlich erhöht war. Weiterhin wurde *SOX10* bereits nach der Stufe II induziert und nicht wie bei den hESC-RGL-NPC erst nach 4 Wochen terminaler Differenzierung. Zusätzlich zeigte die Analyse des Transkriptes des Chemokin (C-X-C Motif) Rezeptors *CXCR7*, einem Protein, dem in der murinen Oligodendrozyten-differenzierung eine wichtige Rolle während der Reifung zugeschrieben wird, dass in den terminalen Differenzierungsstufen die Transkription deutlich gesteigert war.

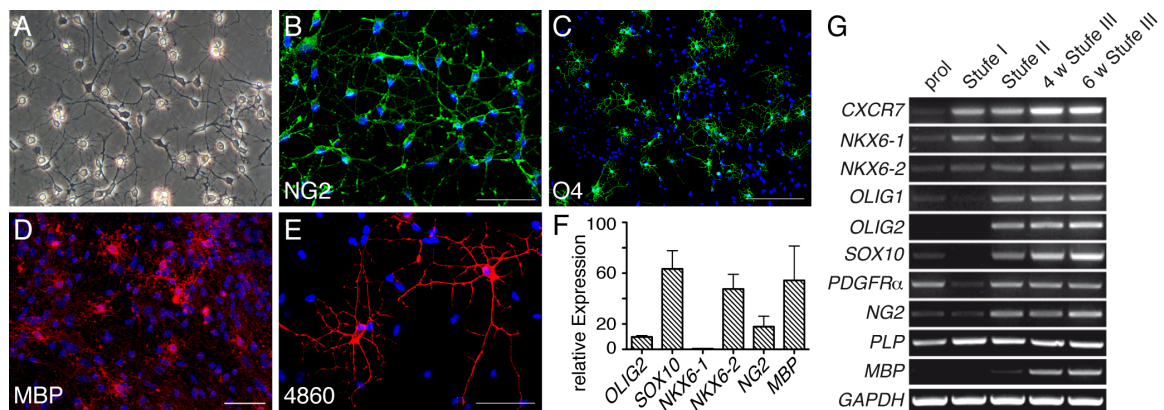


Abbildung 25: Oligodendrogliale Differenzierung der hiPSC-RGL-NPC

Das an hESC-RGL-NPC etablierte oligodendrogliale Differenzierungsprotokoll wurde auf hiPSC-RGL-NPC übertragen. **A-E**: Phasenkontrastbild 6 Wochen terminal differenzierter Zellen und korrespondierende immunzytochemische Färbungen von Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen. Maßstab: B, D, E: 50 μ m, C: 100 μ m. **F**: qPCR-Analyse der Transkriptmengen oligodendroglialer Transkriptionsfaktoren sowie von Genen, die für das Oligodendrozytenvorläuferprotein *NG2* und das Myelinprotein *MBP* kodieren. Dargestellt sind Werte 6 Wochen terminal differenzierter Kulturen bezogen auf proliferierende Zellen. *OLIG2*: $9,82 \pm 0,74$; *SOX10*: $63,36 \pm 10,16$; *NKX6-1*: $0,56 \pm 0,05$; *NKX6-2*: $47,56 \pm 8,16$; *NG2*: $17,92 \pm 5,79$; *MBP*: $54,31 \pm 19,21$. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. **G**: Untersuchung der Transkriptmengen von oligodendroglialen Transkriptionsfaktoren und Markerproteinen mittels RT-PCR in proliferierenden RGL-NPC (prol) sowie während des oligodendroglialen Differenzierungsprotokolles.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das in der vorliegenden Arbeit entwickelte dreistufige oligodendrogliale Differenzierungsprotokoll eine effiziente Differenzierung sowohl der hESC-RGL-NPC als auch der hiPSC-RGL-NPC in Vorläuferzellen und reife Zelltypen ermöglicht. Morphologisch und mittels Immunzytochemie konnten schwach verzweigte NG2-positive Vorläuferzellen, O4-positive frühe Oligodendrozyten mit vielen Fortsätzen und 4860- und MBP-positive reife Oligodendrozyten detektiert werden. Die Analyse des Expressionsprofils während der Differenzierung bestätigt eine Entwicklung entlang der oligodendroglialen Linie: essenzielle Transkriptionsfaktoren werden induziert bzw. stimuliert und am Ende der Differenzierung werden Myelinproteine exprimiert.

***In vivo* differenzieren RGL-NPC tripotent**

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass RGL-NPC *in vitro* effizient zu Oligodendrozyten ausdifferenzieren. Im Folgenden sollte nun das Differenzierungspotenzial proliferierender RGL-NPC *in vivo* untersucht werden. Als Tiermodell wurde zu diesem Zweck die Shiverer-Maus gewählt, welche bedingt durch eine Mutation kein Myelinprotein MBP bildet. Kann nach einer Zelltransplantation MBP detektiert werden, so stammt dieses von den transplantierten Zellen.

Proliferierende RGL-NPC wurden in neugeborene Shiverer-Mäuse in den Bereich der Anlagen des Corpus Callosum transplantiert. Nach ca. 100 Tagen wurden die Transplantate mittels Immunhistochemie untersucht, die transplantierten Zellen durch einen Antikörper gegen hNuc im Gewebe der Maus identifiziert und die Differenzierung der Zellen (Abbildung 26).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die humanen Zellen 3 Monate nach Transplantation im Gewebe des Empfängertieres überlebt haben. Sie konnten in den Bereichen der Lateralventrikel (26A), der Colliculi Inferiores (26B) und des Corpus Callosum (26C) gefunden werden. Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen MBP zeigen, dass die transplantierten proliferierenden RGL-NPC im Maushirn reife, myelinexprimierende Oligodendrozyten mit multiplen, stark verzweigten Fortsätzen generierten (26A-C). Die Morphologie der transplantierten humanen Zellen konnte mit einem Antikörper gegen humanes Zytoplasma sichtbar gemacht werden (STEM121, 26D-E). Konfokale Aufnahmen der Transplantate zeigen, dass viele Zellen morphologisch Oligodendrozyten gleichen und MBP-positive Fortsätze tragen. Weiterhin zeigen konfokale Analysen der MBP-positiven Segmente einen engen Kontakt zu Neuriten (angefärbt mit einem Antikörper gegen Neurofilament) (26G).

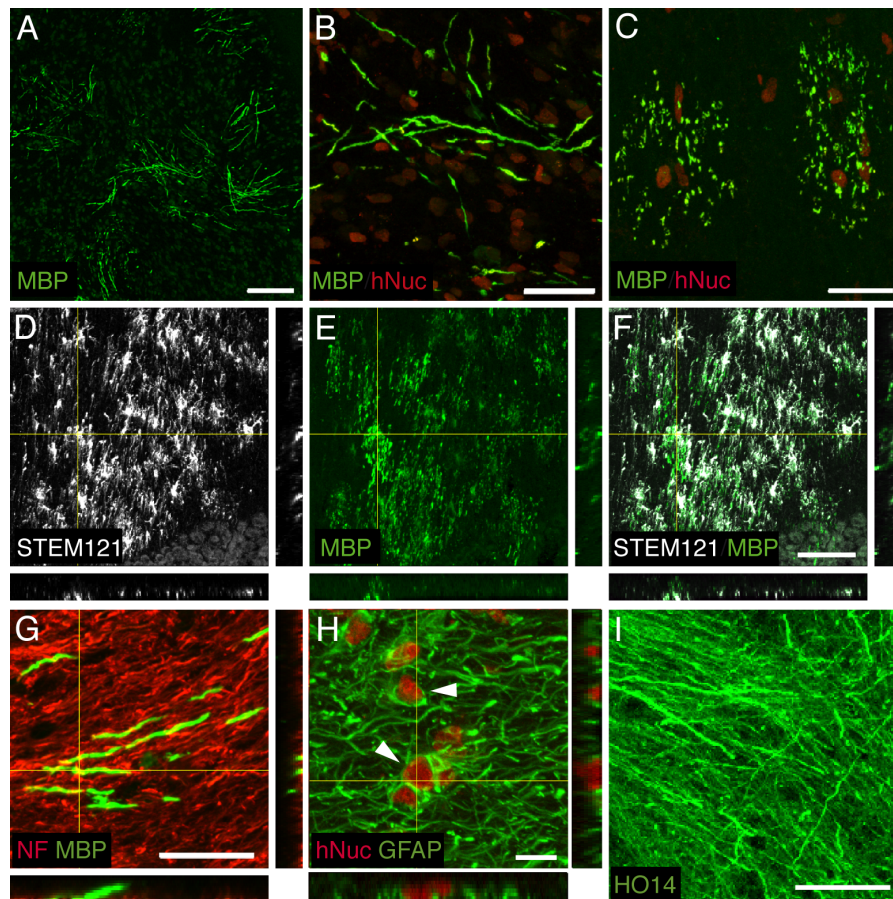


Abbildung 26: Analyse des Differenzierungspotenzials der RGL-NPC im Tiermodell der Shiverer-Maus

3 Monate nach Transplantation in die hypomyelinisierte Shiverer-Maus wurden hiPSC-RGL-NPC mit einem Antikörper gegen hNuc oder STEM121 nachgewiesen und das Differenzierungspotenzial mittels Kofärbungen mit Antikörpern gegen MBP, GFAP und humanes Neurofilament (HO14) untersucht. Es konnten humane Oligodendrozyten mit multiplen Fortsätzen in Bereichen des Lateralventrikels (**A**), der Colliculi inferiores (**B**) und des Corpus Callosum (**C**) nachgewiesen werden. Konfokale Analysen der Transplantate zeigten humane Zellen oligodendroglialer Morphologie, deren Fortsätze positiv für MBP waren (**D-F**) sowie engen Kontakt MBP-positiver Segmente zu Neuronen (NF, Neurofilament; **G**). Darüber hinaus konnten humane Astrozyten (**H**) und humane Neurone (**I**) detektiert werden. Maßstab: A: 100 μm , B: 40 μm , C+G: 30 μm , D-F+I: 50 μm , H: 10 μm .

Neben oligodendroglialen Zellen konnten mittels Koexpression von hNuc und GFAP humane Astrozyten nachgewiesen werden. Weiterhin wurden mit einem humanspezifischen Antikörper gegen Neurofilament humane Neurone in den transplantierten Tieren detektiert.

Zusammenfassend konnte nach Transplantation proliferierender RGL-NPC in die hypomyelinisierte Shiverer-Maus die tripotente Differenzierung der Zellen *in vivo* gezeigt werden.

RGL-NPC bilden myelinisierende Oligodendrozyten

Während der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC *in vitro* wird die Transkription essenzieller Myelinkomponenten wie MBP, PLP, MAG und MOG induziert und hochreguliert. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* können MBP-positive Oligodendrozyten detektiert werden. Eine nähere Betrachtung dieser Zellen sollte Aufschluss über das Myelinisierungspotenzial RGL-NPC-abgeleiteter Oligodendrozyten geben (Abbildung 27). Die Versuche wurden von Julia Fischer durchgeführt.

Bereits *in vitro* lässt sich beobachten, dass MBP-positive Oligodendrozyten entlang MAP2-positiver neuraler Fortsätze ausgerichtet sind und in engem Kontakt zu diesen stehen (27A+B). Immunhistochemische Analysen zeigen, dass 3 Monate nach Transplantation in die hypomyelinisierte Shiverer-Maus diskontinuierliche MBP-positive Segmente *in vivo* zu beobachten sind (27C+D, Pfeilspitzen). In den Zwischenräumen dieser MBP-positiven Segmente lassen sich CASPR-positive Strukturen detektieren (27D). Dies deutet auf die Bildung von Myelininternodien und Ranvierschen Schnürringen und somit die Differenzierung der RGL-NPC in myelinisierende Oligodendrozyten hin.

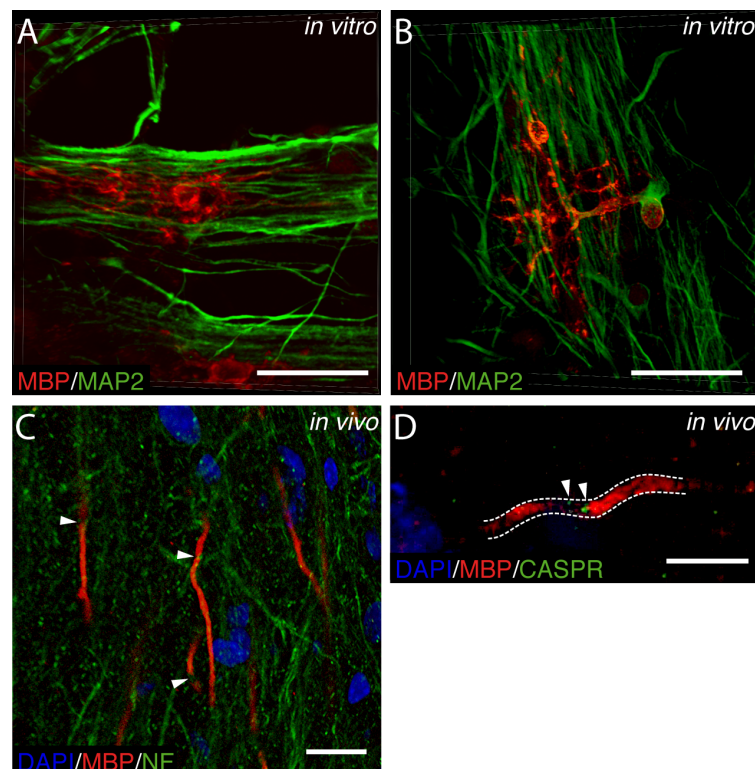


Abbildung 27: Myelinisierungspotenzial der RGL-NPC *in vitro* und *in vivo*

3D-Rekonstruktionen 6 Wochen terminal differenzierter oligodendroglialer Kulturen (A, B) zeigen, dass sich bereits *in vitro* MBP-positive Fortsätze der hiPSC-RGL-NPC-abgeleiteten Oligodendrozyten nahe an MAP2-positive neurale Fortsätze anlagern. *In vivo* (C, D) weisen darüber hinaus diskontinuierliche MBP-positive Segmente (Pfeilspitzen) auf die Bildung von Ranvierschen Schnürringen hin. Immunocytochemische Analysen mit einem Antikörper gegen CASPR (D) zeigen darüber hinaus ein positives Signal, das sich zwischen zwei benachbarten MBP-positiven Segmenten befindet. Die gestrichelten Linien deuten den Verlauf des MBP-Segments an. Maßstab: A+B: 50 μ m, C+D: 25 μ m.

Analyse des microRNA-Expressionsprofils während der oligodendroglialen Differenzierung

Untersuchungen an Nagern haben die Regulation der oligodendroglialen Differenzierung durch die microRNAs (miRNA) miR-23, miR-138, miR-219 und miR-338 eingehend beschrieben, während diese in einer ersten Studie zur Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen in Oligodendrozyten keine Rolle spielten (Dugas et al, 2010; Letzen et al, 2010; Lin & Fu, 2009; Zhao et al, 2010). In akut isolierten humanen glialen Vorläuferzellen hingegen konnte die Expression der miR-219 sowie miR-338 gezeigt werden (de Faria et al, 2012). Im Folgenden sollte eine mögliche Rolle dieser miRNAs während der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Expression der miRNAs während der Differenzierung von hESC-RGL-NPC nach den Stufen I und II sowie nach 6 Wochen terminaler Differenzierung (Stufe III) mittels qPCR untersucht (Abbildung 28). Dazu wurde die miRNA enthaltende Gesamt-RNA der Zellen isoliert und die Expression der miRNAs auf *GAPDH* normalisiert. Die Messungen wurden von Miriam Reisenhofer im Rahmen eines Praktikums durchgeführt.

Im Vergleich der relativen Genexpressionen nach der ersten Differenzierungsphase zu proliferierenden RGL-NPC ist die Expression der *miR-138-2* am stärksten hochreguliert. Die Expressionen der *miR-23a* und *miR-338-3p* sind ebenfalls hochreguliert, die der *miR-219-1-3p* jedoch leicht herunterreguliert (28A). Im Vergleich der relativen Genexpressionen nach der zweiten zur ersten Differenzierungsphase fällt auf, dass die Expression aller untersuchten miRNAs ungefähr um die Hälfte reduziert war (28B). Im Gegensatz dazu wurde die Expression aller miRNAs nach 6 Wochen terminaler Differenzierung verglichen mit Zellen nach der zweiten Phase deutlich verstärkt (28C).

Die zusammenfassende Darstellung der miRNA-Regulation über das gesamte Differenzierungsprotokoll jeweils bezogen auf proliferierende RGL-NPC verdeutlicht die dynamische Expression aller untersuchten miRNAs (28D). Während die relative Expression der *miR-23a* nach dem Differenzierungsphasen I und II geringfügig erhöht, bzw. erniedrigt war, wurde nach 6 Wochen terminaler Differenzierung eine deutlich erhöhte Expression detektiert. Ähnlich verhielt sich die Expression der *miR-219-1-3p*. Deutlich zu erkennen ist die stark erhöhte Expression der *miR-138-2* nach allen Differenzierungsphasen bezogen auf die Expression in proliferierenden Zellen. Die Expression der *miR-338-3p* konnte ähnlich der *miR-23a* und *miR-219-1-3p* mit geringen Unterschieden nach den ersten beiden Differenzierungsphasen aber mit einer deutlichen Steigerung nach 6 Wochen terminaler Differenzierung detektiert werden.

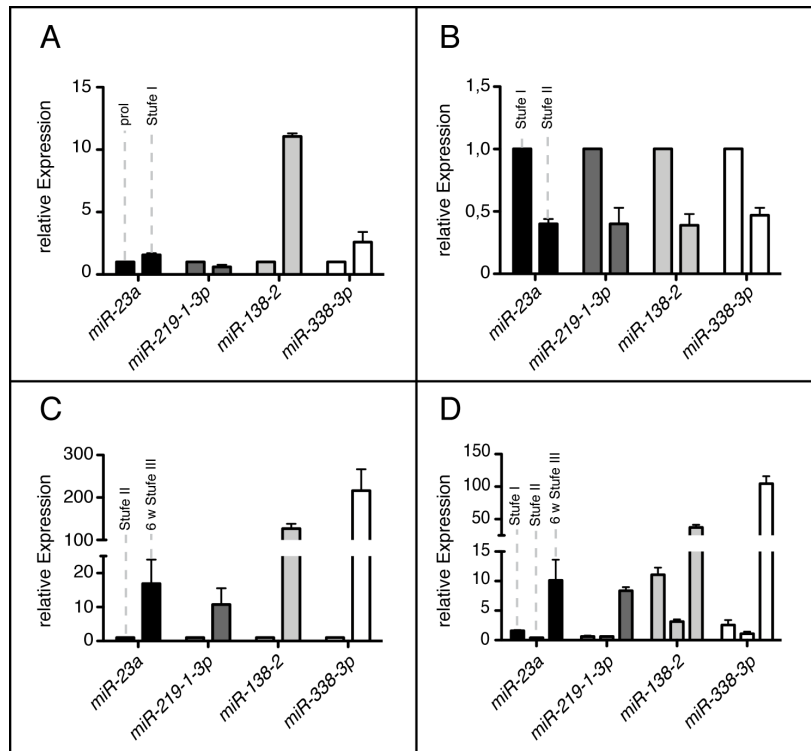


Abbildung 28: MicroRNA-Expression während der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC

Aus proliferierenden hESC-RGL-NPC sowie aus Zellen während der oligodendroglialen Differenzierung nach den Differenzierungsstufen I und II sowie nach 6 Wochen der Stufe III (terminale Differenzierung) wurde die Gesamt-RNA inklusive der miRNAs isoliert und mittels qPCR untersucht. Alle Werte wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert und in unterschiedlichen Relationen dargestellt. Werte sind in Mittelwerten + Standardfehler angegeben. **A:** Expression nach Stufe I auf die Expression in proliferierenden Zellen bezogen. *miR-23a*: $1,57 \pm 0,13$; *miR-219-1-3p*: $0,61 \pm 0,17$; *miR-138-2*: $11,05 \pm 0,25$; *miR-338-3p*: $2,59 \pm 0,82$. **B:** Expression nach Stufe II auf die Expression nach Stufe I bezogen. *miR-23a*: $0,4 \pm 0,04$; *miR-219-1-3p*: $0,4 \pm 0,13$; *miR-138-2*: $0,39 \pm 0,09$; *miR-338-3p*: $0,47 \pm 0,06$. **C:** Expression nach 6 Wochen Stufe III auf die Expression nach Stufe II bezogen. *miR-23a*: $16,91 \pm 7,08$; *miR-219-1-3p*: $10,75 \pm 4,79$; *miR-138-2*: $126,78 \pm 11,42$; *miR-338-3p*: $216,3 \pm 50,32$. **D:** Expression nach Stufe I, II und 6 Wochen Stufe III jeweils auf die Expression in proliferierenden Zellen bezogen. *miR-23a*: $1,58 \pm 0,13/0,4 \pm 0,04/10,13 \pm 3,48$; *miR-219-1-3p*: $0,61 \pm 0,17/0,63 \pm 0,07/8,36 \pm 0,62$; *miR-138-2*: $11,06 \pm 1,23/3,15 \pm 0,35/37,23 \pm 4,13$; *miR-338-3p*: $2,56 \pm 0,83/1,10 \pm 0,32/104,64 \pm 11,32$.

Zusammenfassend wurde die *miR-138-2* im Übergang von proliferierenden Zellen zur ersten oligodendroglialen Differenzierungsphase am deutlichsten hochreguliert. Nach 6 Wochen terminaler Differenzierung konnte die Hochregulation aller miRNAs festgestellt werden, wobei die *miR-138-2* und *miR-338-3p* hier am stärksten differentiell exprimiert wurden.

Einfluss von SHH auf die oligodendrogliale Differenzierung

Der Großteil der Oligodendrozyten des Rückenmarks entsteht aus ventralen Vorläuferdomänen unter dem Einfluss von SHH. *In vitro* konnte an humanen PSC gezeigt werden, dass SHH-abhängig oligodendrogliale Zellen spezifiziert werden können (Douvaras et al, 2014; Hu et al, 2009a). Um einen möglichen Effekt von SHH auf die oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPC zu überprüfen, wurden Zellen nach dem oben beschriebenen Protokoll unter dem Einfluss eines Agonisten (*smoothened agonist*, SAG) bzw. eines Inhibitors (Cyclopamin) des SHH-Signalweges differenziert und 4 Wochen terminal ausgereift. Als Kontrolle dienten regulär oligodendroglial differenzierte Kulturen (Abbildung 29). Die Analyse der Proteinexpression der oligodendroglial differenzierten Kulturen mit dem Myelinmarker MBP zeigte die verringerte Expression in SAG-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle und zu mit Cyclopamin behandelten Zellen (29A-C). Nachfolgend wurde die Expression oligodendroglialer Transkriptionsfaktoren und Gene mittels qPCR überprüft (29D). Unter Behandlung mit SAG konnte keine Stimulation der oligodendroglialen Differenzierung beobachtet werden, obwohl die erhöhte Expression des SHH-Rezeptors *Patched* (*PTCH1*) als direktes Zielgen des SHH-Signalweges einen aktivierten Signalweg demonstriert. Einzig die Expression des Transkriptionsfaktors *NKX6-2* konnte durch SAG stimuliert werden. Die Transkriptmengen für *OLIG1/2*, *SOX10*, *NG2* und *MBP* hingegen erschienen unter SAG-Einfluss geringfügig verringert. Die ursprünglich als Kontrolle durchgeführte Behandlung der RGL-NPC während der oligodendroglialen Differenzierung mit Cyclopamin zur Inhibition des SHH-Signalweges hingegen zeigte erstaunlicherweise eine deutliche Stimulation der Expression von *OLIG1* und *MBP*. Die Transkriptmengen der anderen untersuchten Gene hingegen schienen nur marginal beeinflusst. Um zu überprüfen, ob der stimulierende Effekt von Cyclopamin auf die *MBP*-Expression auch durch andere Inhibitoren des SHH-Signalweges hervorgerufen werden konnte, wurden RGL-NPC oligodendroglial differenziert und neben SAG und Cyclopamin mit den SHH-Inhibitoren CUR61414 und Jervine behandelt. Die Analyse des Expressionsprofils erfolgte mittels RT-PCR (29E).

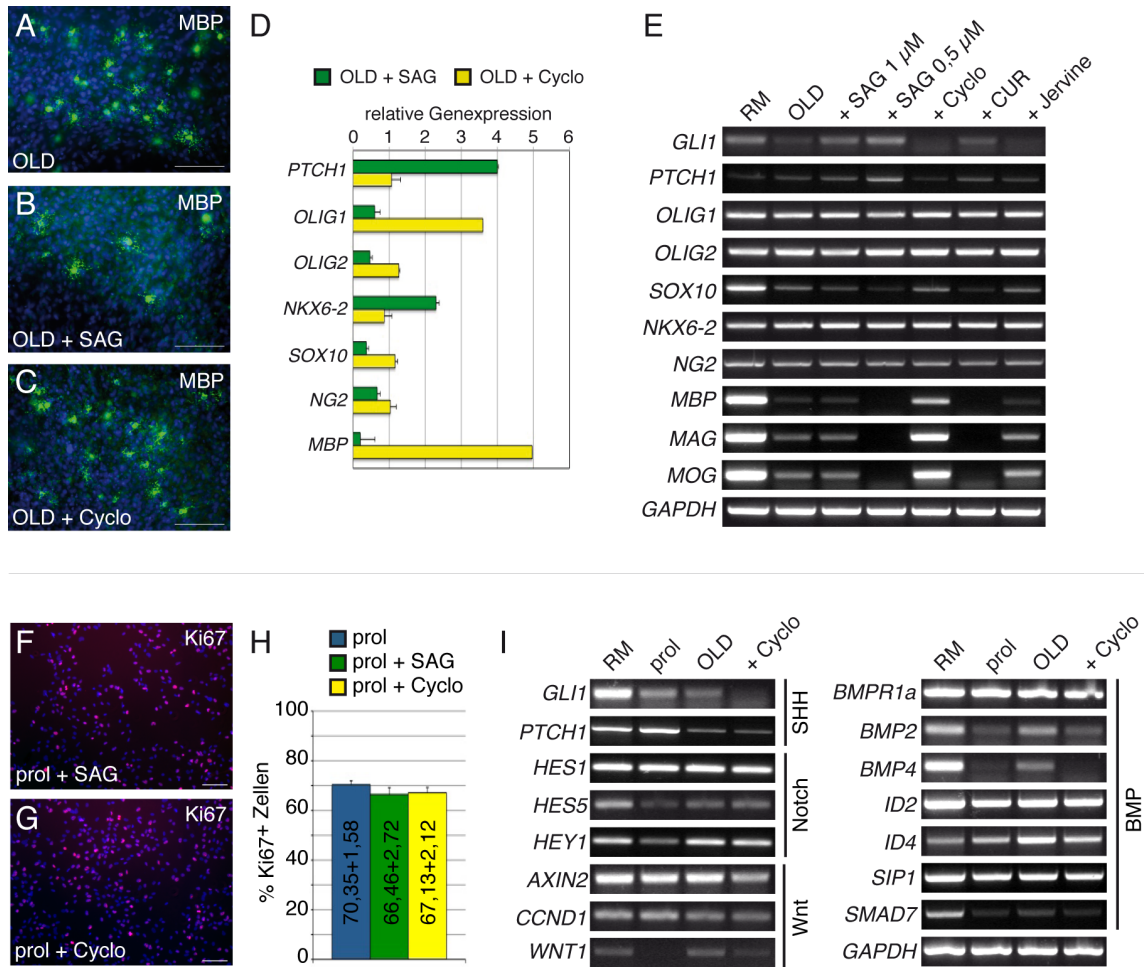


Abbildung 29: Einfluss des SHH-Signalweges auf die oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPC

Zur Analyse des Einflusses des SHH-Signalweges auf die oligodendrogliale Differenzierung (OLD) der hESC-RGL-NPC wurden Zellen unter dem Einfluss von SAG (*smoothened agonist*) bzw. Cyclopamin (Cyclo) nach dem oben beschriebenen Protokoll differenziert und für 4 Wochen terminal ausgereift. Als Kontrolle dienten regulär oligodendroglial differenzierte Kulturen. **A-C:** Immunzytochemische Analyse der MBP-Expression in oligodendroglialen Kulturen unter Standardbedingungen sowie unter Einfluss von SAG bzw. Cyclopamin. Maßstab: 100 µm. **D:** Die Transkriptmengen des direkten SHH-Zielgens *PTCH1* sowie oligodendrozyten-assoziiierter Gene wurden mittels qPCR untersucht. Die Daten (SAG/Cyclo) wurden auf die Expression von *18s* normalisiert und auf die Expression in regulären oligodendroglialen Kulturen bezogen. *PTCH1*: $4,0 \pm 0,25/1,07 \pm 0,03$; *OLIG1*: $0,60 \pm 0/3,60 \pm 0,15$; *OLIG2*: $0,47 \pm 0,03/1,27 \pm 0,07$; *NKX6-2*: $2,30 \pm 0,21/0,87 \pm 0,09$; *SOX10*: $0,37 \pm 0,07/1,17 \pm 0,07$; *NG2*: $0,67 \pm 0,17/1,03 \pm 0,09$; *MBP*: $0,20 \pm 0/4,97 \pm 0,41$. **E:** Analyse des Expressionsprofils von *GLI1* und *PTCH1* sowie oligodendrozyten-assoziierten Genen mittels RT-PCR. Vergleichend wurden Zellen mit zwei weiteren Inhibitoren des SHH-Signalweges (CUR61414, Jervine) behandelt. RM, cDNA des humanen fetalen Rückenmarks als Positivkontrolle. **F-H:** Untersuchung des Einflusses von SAG und Cyclopamin auf die Proliferation der RGL-NPC. hESC-RGL-NPC wurden für 2 Passagen proliferiert (prol) bzw. unter dem Einfluss von EGF/FGF-2 und SAG/Cyclopamin kultiviert. Anschließend erfolgte die immunzytochemische Analyse der Expression von Ki67 als Proliferationsmarker. Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Maßstab: 50 µm. **I:** Untersuchung der Expression von Zielgenen inhibitorisch auf die oligodendrogliale Reifung wirkender Signalwege (Notch, Wnt, BMP) sowie des SHH-Signalweges mittels RT-PCR. RM, cDNA des humanen fetalen Rückenmarks als Positivkontrolle.

Es ist zu erkennen, dass die Behandlung mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an SAG (0,5/1 µM) sowohl die Expression des SHH-Effektors *GLI family zinc finger (GLI) 1* als auch des Rezeptors *PTCH1* verstärkte, wobei eine Konzentration von 0,5 µM SAG einen größeren

Effekt erzielte. Die Behandlung der RGL-NPC mit 1 μ M SAG schien keinen Effekt auf die oligodendrogliale Differenzierung zu haben, der Einsatz von 0,5 μ M SAG hingegen bewirkte eine deutliche Verminderung der Transkriptmengen von *SOX10*, *MBP*, *MAG* und *MOG*, was auf eine reduzierte Reifung der Oligodendrozyten in der Kultur schließen lässt. Die Betrachtung der *GLI1*- und *PTCH1*-Transkriptmengen zeigt weiterhin, dass CUR61414 keinen inhibitorischen Effekt auf den SHH-Signalweg der RGL-NPC ausübte, sondern Transkriptmengen vergleichbar mit denen in mit 1 μ M SAG behandelten Kulturen detektiert werden konnten. Aber die Expression sowohl von *SOX10* als auch *MBP*, *MAG* und *MOG* war im Vergleich zu Standarddifferenzierungen deutlich verringert. Sowohl Cyclopamin als auch Jervine riefen hingegen eine Verminderung der Transkription von *GLI1* und *PTCH1* hervor, wobei der Effekt von Jervine etwas schwächer erscheint als der von Cyclopamin. Die Expression der untersuchten oligodendrozyten- und myelinassozierten Gene war in den Jervine-Kulturen vergleichbar mit der in Standarddifferenzierungen, die Transkription von *MAG* und *MOG* schien leicht verstärkt zu sein. In den mit Cyclopamin behandelten Kulturen zeigte sich nicht nur die verstärkte Expression von *SOX10* und *MBP*, sondern auch deutlich erhöhte Transkriptmengen für *MAG* und *MOG*. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CUR61414 keinen inhibitorischen Effekt auf den SHH-Signalweg in den untersuchten RGL-NPC-Kulturen ausübte, aber die Expression von Markergenen reifer Oligodendrozyten wie *SOX10*, *MBP*, *MAG* und *MOG* verringerte. Jervine konnte den SHH-Signalweg in den Kulturen inhibieren, allerdings keinen vergleichbaren reifungsfördernden Effekt auf die RGL-NPC-abgeleiteten Oligodendrozyten ausüben wie Cyclopamin.

Um zu ermitteln, über welchen Weg Cyclopamin die Expression myelinassoziierter Gene der RGL-NPC während der oligodendroglialen Differenzierung stimuliert, wurde zunächst überprüft, ob Cyclopamin die Proliferation der Zellen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden RGL-NPC über zwei Passagen hinweg proliferiert bzw. unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 sowie SAG oder Cyclopamin kultiviert. Anschließend erfolgte die immunzytochemische Analyse der Expression von Ki67 als Marker proliferierender Zellen des aktiven Zellzyklus. Es zeigte sich, dass der Anteil Ki67-positiver RGL-NPC durch SAG oder Cyclopamin unbeeinflusst war (29F-H). Nachfolgend wurde der Einfluss von Cyclopamin auf die Aktivität von Signalwegen mit bekannt inhibitorischem Effekt auf die Oligodendrozytenreifung überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Expression von Genen des Notch-, Wnt- und BMP/TGF β -Signalweges in proliferierenden RGL-NPC, oligodendroglialen Differenzierungen unter Standardbedingungen sowie nach Behandlung mit Cyclopamin mittels RT-PCT untersucht (29I). Dabei zeigt sich zunächst, dass Gene aller drei Signalwege in den oligodendroglialen Standarddifferenzierungen der RGL-NPC aktiv waren

und im Fall von *HES5*, *Hes-related with YRPM motif (HEY) 1*, *wingless-type mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site (WNT) 1*, *BMP2/4*, *Inhibitor der Differenzierung (ID) 2/4* sowie *SMAD7* sogar verstärkt transkribiert wurden. Lediglich die Transkriptmenge von *CyclinD1 (CCND1)* scheint im Vergleich zu proliferierenden RGL-NPC in den oligodendroglialen Kulturen verringert. In Kulturen, die unter dem Einfluss von Cyclopamin oligodendroglially differenziert wurden, zeigt sich keine Veränderung der Expression der Zielgene des Notch-Signalweges *HES1/5* und *HEY1*. Allerdings können geringfügig reduzierte Mengen der Transkripte von *AXIN2* und *WNT1*, Genen des Wnt-Signalweges, in den cyclopamin-behandelten oligodendroglialen RGL-NPC-Kulturen detektiert werden. Bei Betrachtung des BMP/TGF β -Signalweges zeigte sich, dass die Expression des *BMP Rezeptors 1a (BMPRIa)* zwar unverändert erscheint, die Transkriptmengen von *BMP2* sowie *BMP4* allerdings deutlich reduziert und mit der Expression in proliferierenden RGL-NPC vergleichbar sind. Darüber hinaus scheint die Expression von *ID4* und *SMAD7* nach Behandlung der RGL-NPC mit Cyclopamin verringert. Die Transkriptmengen der Gene *ID2* und des *SMAD interagierenden Proteins (SIP) 1* erscheinen unverändert. Somit kann nach Behandlung der RGL-NPC-Differenzierungen mit Cyclopamin die verringerte Expression sowohl von Genen des Wnt- als auch des BMP/TGF β -Signalweges festgestellt werden.

3.3.4 RGL-NPC zeigen Selbsterneuerung und Tripotenz auf Einzelzellebene

Als ein entscheidendes Charakteristikum neuraler Stammzellen gilt neben einem tripotenten Differenzierungsverhalten die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die hESC- und hiPSC-RGL-NPC tripotent in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren können, sollte anhand einer klonalen Analyse das Selbsterneuerungspotenzial der Zellen getestet werden (Abbildung 30). Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach Erzeugung einer Einzelzellsuspension in klonaler Dichte (ca. 20 Zellen/cm²) auf einen Zellrasen aus mitotisch inaktiven murinen Astrozyten gesetzt und unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 kultiviert.

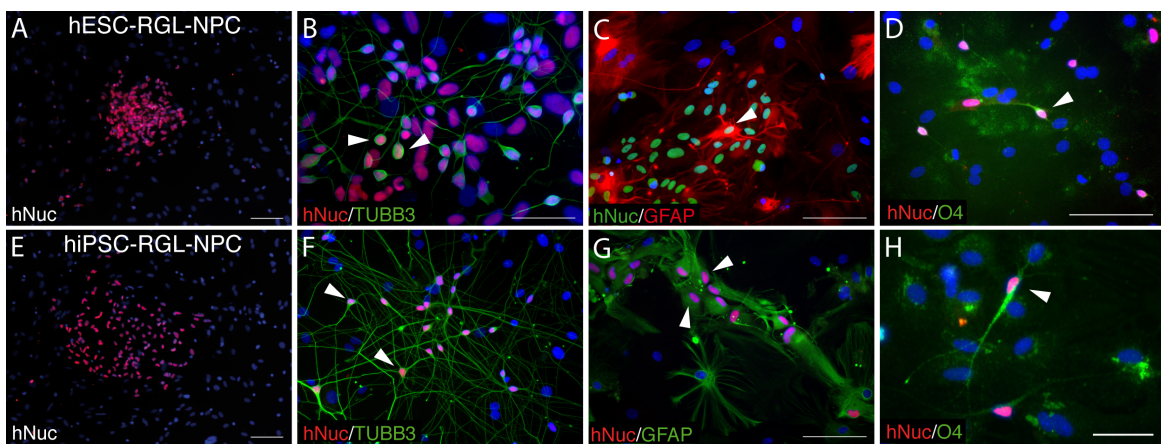


Abbildung 30: Selbsterneuerung und Tripotenz der RGL-NPC auf Einzelzellebene

Zur Überprüfung der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und tripotenten Differenzierung auf klonaler Ebene wurden hESC- und hiPSC-RGL-NPC als Einzelzellsuspension in klonaler Dichte (20 Zellen/cm²) auf mitotisch inaktiven murinen Fibroblasten ausplattiert und unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 kultiviert. Nach 4 Wochen wurden die entstandenen humanen Klone (A+E) den bereits beschriebenen Protokollen folgend tripotent differenziert und durch Koexpression mit hNuc humane Neurone (B+F), Astrozyten (C+G) und Oligodendrozyten (D+H) nachgewiesen. Maßstab: A+E: 100 µm, B-D, F-H: 50 µm.

Nach 14 Tagen konnten bereits erste Kolonien neuraler Zellen detektiert und mit einem Antikörper gegen hNuc positiv gefärbt werden (30A+E). Nach 2 weiteren Wochen unter proliferativen Bedingungen wurden die RGL-NPC nach den bereits beschriebenen Protokollen tripotent differenziert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in den hESC- als auch hiPSC-RGL-NPC-abgeleiteten Klonen humane Neurone (30B+F), Astrozyten (30C+G) und Oligodendrozyten (30D+H) entstanden waren. Die Kultivierung einzelner Klone als klonale Zelllinien gelang allerdings nicht.

4 Diskussion

RGL-NPC als Quelle humaner Oligodendrozyten

Die Differenzierung spezifischer Zelltypen des Zentralnervensystems (ZNS) aus pluripotenten Stammzellen (*pluripotent stem cells*, PSC) verspricht große Möglichkeiten für zukünftige Zellersatztherapien und Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Essenziell dafür ist ein grundlegendes Wissen über den jeweilig betroffenen Zelltyp. Für die neuronale Differenzierung von PSC sowie neuralen Stammzellen (*neural stem cells*, NSC) wurden mittlerweile diverse Protokolle publiziert, die den Zugang zu spezifischen Subtypen wie dopaminergen Neuronen oder Motoneuronen erlauben (Ganat et al, 2012; Koch et al, 2009; Lee et al, 2007; Li et al, 2005; Perrier et al, 2004; Takazawa et al, 2012). Ebenso konnte die Differenzierung von humanen Astrozyten gezeigt werden (Emdad et al, 2012; Krencik et al, 2011; Roybon et al, 2013; Shaltouki et al, 2013). Für die Generierung humaner Oligodendrozyten wurden bislang Protokolle publiziert, welche die direkte Differenzierung humaner PSC in Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen beschreiben (Douvaras et al, 2014; Hu et al, 2009a; Izrael et al, 2007; Keirstead et al, 2005; Piao et al, 2015; Pouya et al, 2011; Sundberg et al, 2011; Wang et al, 2013b). Dies geschieht über lange Zeiträume hinweg ohne die Etablierung eines stabil kultivierbaren Intermediats. Infolgedessen sind diese Differenzierungsparadigmen gekennzeichnet durch eine hohe Varianz ohne robuste Effizienz. Angeregt dadurch sollte in der vorliegenden Arbeit ein Intermediat zwischen PSC und humanen Oligodendrozyten in Form einer neuralen Vorläuferzellpopulation (*radial glia-like neural precursor cells*, RGL-NPC) generiert werden, welche stabil proliferiert, kryokonservierbar ist und sich effizient in Zellen oligodendrogialer Linien differenzieren lässt. Diese NPC sollten als unkomplizierte, leicht expandierbare Quelle humaner Oligodendrozyten für die Untersuchung der humanen Glio- und insbesondere Oligodendrogenese genutzt werden. Bislang bereits publizierte NSC-Populationen werden primär zur Generierung neuronaler Zellen eingesetzt und zeigen ein äußerst eingeschränktes gliales Differenzierungspotenzial (Elkabetz et al, 2008; Koch et al, 2009).

4.1 Generierung von multipotenten, radialgliaähnlichen Vorläuferzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen

Einfluss von Retinsäure auf die Generierung von RGL-NPC

Zu Beginn der Entwicklung bestehen die Neuralplatte und das Neuralrohr, die ersten Organisationen des ZNS, aus dem einschichtigen Neuroepithel. Die neuroepithelialen Zellen stellen den Ursprung aller Neurone und Makroglia und somit die primitivsten Vorläuferzellen des ZNS dar. Mit Beginn der Neurogenese strukturiert sich das Neuroepithel in ein vielschichtiges Gewebe um und die neuroepithelialen Zellen entwickeln sich in distinkte postmitotische Zellen sowie diverse Population von NSC und Radialglia (Huttner & Brand, 1997). Sowohl NSC als auch Radialglia besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und neuronalen Multipotenz, wenngleich die Differenzierungskapazität der Radialglia im Vergleich zu neuroepithelialen Zellen deutlich eingeschränkt ist (Hartfuss et al, 2001; Kriegstein & Gotz, 2003; Pinto & Gotz, 2007). Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass Radialglia sowohl in Nagern als auch im Humansystem als tripotente Vorläuferzellen für Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten dienen (Casper & McCarthy, 2006; Fogarty et al, 2005; Mo et al, 2007; Mo & Zecevic, 2009). Die Entwicklung neuroepithelialer Zellen in Radialglia konnte an embryonalen Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESC) *in vivo* nachvollzogen werden. Durch die Differenzierung muriner ESC unter dem Einfluss von Retinsäure (RA) konnten nahezu reine Zellpopulationen induziert werden, welche die charakteristischen Radialgliamarker exprimieren und neuronal differenziert werden können (Bibel et al, 2004; Hartfuss et al, 2001; Heins et al, 2002; Liour & Yu, 2003; Plachta et al, 2004). Die Generierung humaner Radialglia aus ESC hingegen gelang ohne den Einfluss von RA. Allerdings konnten aus diesen Radialglia keine Oligodendrozyten generiert werden (Nat et al, 2007).

Der frühe Einsatz initial hoher, im Verlauf der Differenzierung absinkender Konzentrationen an RA im Rahmen des in dieser Arbeit etablierten Protokolls ermöglichte die Isolation von RGL-NPC, einer Population von Vorläuferzellen mit starkem oligodendroglialen Differenzierungspotenzial, aus mehreren Linien humaner ESC und induziert pluripotenter Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC). Im Gegensatz zu der beschriebenen neuronalen Konversion humaner pluripotenter Stammzellen über eine duale Inhibition des SMAD-Signalweges (Chambers et al, 2009) erfolgte die hier gezeigte neurale Induktion während der Differenzierung der Embryoidkörper (*embryoid bodies*, EB) über eine klassische retinsäurevermittelte Neuralisierung (Bain et al, 1995; Maden, 2007; Nistor et al, 2005; Wichterle et al, 2002). Unter retinsäurevermittelter Differenzierung konnten bereits in anderen Studien verlässlich neurale Zellen mit einem multipotenten Differenzierungsverhalten in Neurone,

Astrozyten und Oligodendrozyten hervorgebracht werden (Bain et al, 1995; Wichterle et al, 2002). Die Anreicherung der RGL-NPC aus den heterogenen Differenzierungskulturen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) über einen Antikörper gegen CD133. Dabei handelt es sich um einen NSC-Marker, mit dem bereits Stammzellen des humanen ZNS isoliert werden konnten (Tamaki et al, 2002; Uchida et al, 2000). Die resultierenden CD133-positiven RGL-NPC konnten als adhärenente, stabil proliferierende Population unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren *epidermal growth factor* (EGF) und *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) für mindestens 50 Passagen mit einem stabilen Expressionsprofil entlang der AP- und DV-Achse kultiviert werden. Im Vergleich zu den ihnen zugrundeliegenden PSC zeigten die RGL-NPC keine Expression von Pluripotenzgenen, wodurch eine Kontamination der Kulturen mit PSC ausgeschlossen werden kann. RGL-NPC exprimieren typische Marker von NSC (Nestin, *sex-determining region Y-related HMG box* (SOX) 2, *paired box* (PAX) 6, SOX9 und *achaete-scute complex homolog* (ASCL1)) sowie von Radialglia wie *brain lipid binding protein* (BLBP), Vimentin, 3CB2, *Glutamat und Aspartat Transporter* (GLAST) und *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Hartfuss et al, 2001; Heins et al, 2002; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Prada et al, 1995). Übereinstimmend dazu wurde bereits beschrieben, dass CD133-positive, primäre humane NSC *in vitro* typische Radialgliamarker exprimieren (Sun et al, 2008). Auch in der Maus wird CD133 auf einem radialgliaähnlichen Zelltyp des frühen postnatalen Gehirns exprimiert (Pfenninger et al, 2007).

Während der Entwicklung des ZNS kommt der RA neben der Rolle als klassisches neuralisierendes Agenz eine wichtige Aufgabe auch in der Strukturbildung zu (Maden, 2007). Unter dem Einfluss von RA werden entlang der anterior-posterior (AP-) Achse Phänotypen des posterioren Rhombencephalons und anterioren Rückenmarks induziert, während im Bereich der dorso-ventralen (DV-) Achse ventrale Zelltypen unterdrückt und dorsale Schicksale induziert werden. Der frühe Einsatz einer hohen RA-Konzentration bestimmt somit vermutlich die regionale Identität der RGL-NPC als Zellen des posterioren Rhombencephalons (Expression von *gastrulation brain homeobox* (GBX) 2, *Homeobox* (HOX)-Genen HOXB2/B4) und anterioren Rückenmarks bis zur thorakalen Ebene (HOXB6/D8/D9) sowie das Fehlen von Markern des Pros- und Mesencephalons (*empty spiracles homeobox* (EMX) 1/2, *orthodenticle homeobox* (OTX) 2, *NK2 homeobox 1* (NKX2-1)) (Maden, 2007). Das Auftreten weiter caudal gelegener, beispielsweise lumbaler, Rückenmarkspopulationen (Expression von HOXC11) scheint durch den Einsatz von RA in der angewendeten Konzentration allein nicht induziert werden zu können (Liu et al, 2001; Wichterle et al, 2002). Auch die Expression sowohl dorsaler (PAX3/7) und intermediärer (NKX6-1/-2) als auch ventraler (*oligodendrocyte lineage transcription factor* (OLIG) 2) Marker der

DV-Achse könnte auf den RA-Konzentrationsgradienten während der neuralen Differenzierung zurückgeführt werden, da hohe RA-Konzentrationen dorsale Zelltypen induzieren, niedrige RA-Konzentrationen hingegen ventrale Schicksale ermöglichen (Maden, 2007; Okada et al, 2004; Wilson et al, 2007). Somit erlaubt der frühe Einsatz einer hohen RA-Konzentration die Induktion einer posterioren multipotenten Radialgliapopulation. Diese zeigt über einen unter retinsäurefreier Differenzierung erreichbaren vorwiegend neurogenen Charakter hinaus (Nat et al, 2007) die Fähigkeit zur Differenzierung humaner Oligodendrozyten.

Neurale Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen zu RGL-NPC unter dem Einfluss von EGF

Die neurale Differenzierung der humanen PSC zu RGL-NPC erfolgte unter dem Einfluss von EGF und gleichzeitigem Entzug des Wachstumsfaktors FGF-2. Dieser spielt eine Hauptrolle in der Erhaltung der Selbsterneuerung humaner PSC. FGF-2 ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Expression von Nanog, einem Schlüsselregulator der Selbsterneuerung humaner PSC, und für die Inhibition des *bone morphogenetic protein* (BMP)-Signalweges, welcher als primär differenzierungsinitiierend in humanen PSC beschrieben wurde (Greber et al, 2010; Xu et al, 2005). Der Einfluss von FGF-2 während der Induktion neuraler Zellen aus humanen PSC wurde lange kontrovers diskutiert und sowohl negative Effekte der FGF-Inhibition während der neuralen Differenzierung als auch die Förderung neuroektodermaler Induktion nach Entzug bzw. Inhibition von FGF-2 beschrieben (Chambers et al, 2009; Cohen et al, 2010; Greber et al, 2011; LaVaute et al, 2009). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass durch den Einsatz von FGF frühe neuroepitheliale, rosettenbildende Zellen mit neurogenen Eigenschaften induziert und proliferativ aufrechterhalten werden können (Elkabetz et al, 2008; Koch et al, 2009). Als weiterer Ansatz zur effizienten neuralen Induktion humaner PSC wurde die Inhibition des BMP-Signalweges durch den BMP-Antagonisten Noggin beschrieben (Itsykson et al, 2005). Durch diese Strategie wird die Differenzierung der Kulturen in Zellen nicht-neuraler Linien unterdrückt und die Anreicherung multipotenter neuraler Vorläuferzellen erreicht. Diese zeigen allerdings ein sehr geringes, eher spontanes oligodendrogiales Differenzierungsvermögen. Für die Induktion der RGL-NPC aus humanen PSC unter dem Einfluss hoher Konzentrationen von RA scheinen allerdings weder FGF-2 noch die Inhibition des BMP-Signalweges eine essenzielle Rolle zu spielen. Zusätzlich könnte die Differenzierung in Abwesenheit von FGF dazu führen, dass frühe neurale Zellschicksale, die einen vorwiegend neurogenen Charakter besitzen, nicht präferiert werden und somit die Anreicherung einer NPC-Population gelingt, die effizient die Differenzierung von Oligodendrozyten ermöglicht.

Tripotentes Differenzierungsverhalten und Selbsterneuerung der RGL-NPC

Stammzellen des ZNS sind charakterisiert durch ihr Vermögen zur tripotenten Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten sowie zur Selbsterneuerung. Sowohl an primären humanen NSC als auch aus humanen ESC abgeleiteten NSC konnten diese Charakteristika *in vitro* nachgewiesen werden. Die Fähigkeit zur tripotenten Differenzierung konnte auch auf klonaler Ebene gezeigt werden. (Conti et al, 2005; Elkabetz et al, 2008; Koch et al, 2009; Sun et al, 2008). Auch die RGL-NPC differenzieren unter dem Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 tripotent.

Die neuronale Differenzierung der RGL-NPC unter Entzug der Wachstumsfaktoren in Anwesenheit des *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) erbrachte eine heterogene Population neuronaler Zellen unterschiedlicher Subtypen. Mittels elektrophysiologischer Detektion von Aktionspotenzialen und postsynaptischen Strömen konnte die funktionelle Reifung spontan neuronal differenzierter RGL-NPC in reife neuronale Zelltypen *in vitro* nachgewiesen werden. Die vorwiegende Differenzierung der RGL-NPC in Zellen eines GABAergen Phänotyps ist dabei als Differenzierungsphänomen *in vitro* expandierter NSC bekannt (Jain et al, 2003; Koch et al, 2009). Neben GABA exprimiert ein Teil der RGL-NPC abgeleiteten Neurone den vesikulären Glutamattransporter vGLUT2, welcher während der frühen Entwicklung unter anderem im Rückenmark exprimiert wird (Landry et al, 2004). Die Differenzierung kleiner Population an Tyrosin Hydroxylase (TH)-positiven dopaminergen Neuronen wird vermutlich durch die Expression des Transkriptionsfaktors *engrailed 1* (*EN1*) in den RGL-NPC ermöglicht. Dieser Transkriptionsfaktor ist regionalspezifisch für das Mesencephalon als Ursprungsregion dopaminergener Neurone (Simon et al, 2001). Zusammenfassend spiegelt die spontane Differenzierung der RGL-NPC in die detektierten neuronalen Subtypen die regionale Identität der RGL-NPC als Zellen des Rhombencephalons und anterioren Rückenmarks wieder.

Primitive Vorläuferzellen des ZNS zeigen ein breites Differenzierungsspektrum in Reaktion auf exogene Morphogene und können in neuronale Subtypen diverser Hirnregionen differenziert werden (Li et al, 2005; Perrier et al, 2004; Zhang et al, 2001). Die Anwendung etablierter Differenzierungskonditionen (Koch et al, 2009) zur Generierung dopaminergener Neurone des Mesencephalons (*sonic hedgehog* (SHH)/FGF-8) oder von Motoneuronen des Rückenmarks (SHH/RA) erbrachte hingegen keine gerichtete Differenzierung der RGL-NPC in die entsprechenden Zelltypen. Dies deutet darauf hin, dass die regionale Identität und Differenzierungskapazität der RGL-NPC permanent und nicht durch morphogene Stimuli beeinflussbar ist. In Bezug auf das Unvermögen der RGL-NPC zur motoneuronalen Differenzierung könnte eine Publikation zum Einfluss des Phosphorylierungsgrades des

Transkriptionsfaktors Olig2 auf dessen Funktion Aufschluss geben (Li et al, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass während der strukturbildenden Entwicklung der Vorläuferdomänen der DV-Achse des Rückenmarks am Serin der Position 147 phosphoryliertes Olig2 entscheidend ist für die Etablierung der pMN-Domäne. Aus dieser Vorläuferdomäne entstehen in zeitlicher Abfolge zunächst Motoneurone und anschließend der Großteil der Oligodendrozyten des ZNS (Richardson et al, 1997; Zhou & Anderson, 2002). Während der Umstrukturierung der Zellen der pMN-Domäne hin zu oligodendrozytenproduzierenden Zellen wird Olig2 am Serin der Position 147 dephosphoryliert. Ektopisch exprimiertes, pseudo-dephosphoryliertes Olig2 (mutiertes Olig2 mit einem Basentausch von Serin zu Alanin an der Position 147) scheint während der Differenzierung von NSC ein Überspringen der Motoneuronentwicklung direkt hin zur Oligodendrozytenproduktion auszulösen (Li et al, 2011). Die Überprüfung des Phosphorylierungsgrades von OLIG2 am Serin 147 in differenzierenden RGL-NPC könnte zeigen, ob eine vorliegende Dephosphorylierung die Ursache für das Scheitern motoneuronaler Differenzierungsversuche ist.

Bemerkenswerterweise ergab bereits der Langzeitentzug der Wachstumsfaktoren unter Standardbedingungen einen Anteil von etwa 8 % Oligodendrozyten in den differenzierten RGL-NPC-Kulturen, was auf ein starkes, endogenes oligodendrogliales Differenzierungsvermögen hinweist. Keine der bislang beschriebenen NSC-Populationen konnte einen solchen Anteil an Oligodendroglia generieren. Dieses Potenzial dient als Grundlage zur Etablierung eines effizienten Protokolls zur Differenzierung von humanen Oligodendrozyten.

RGL-NPC im Licht etablierter neuraler Stammzellpopulationen

Anhand des Expressionsprofil der RGL-NPC konnte eine deutliche Ähnlichkeit zu Radialglia festgestellt werden. Vergleichend dazu zeigte eine bereits etablierte NSC-Population (*long-term neural epithelial-like stem cells*, lt-NES) mit stark neuronalem Differenzierungspotenzial (Koch et al, 2009) keine Expression typischer Radialgliamarker. Während der Entwicklung des ZNS entstehen zu Beginn der Neurogenese aus neuroektodermalen Zellen zunächst Neurone sowie NSC und Radialglia, welche als Ursprung späterer neuronaler Populationen sowie der Makroglia gelten (Huttner & Brand, 1997). Gemäß dieser zeitlichen Entwicklung konnten unterschiedliche frühe und späte Populationen an NSC aus humanen PSC *in vitro* generiert werden, welche sich anhand der Markerexpression und ihres Differenzierungspotenzial unterscheiden lassen. Die frühesten, dem Neuralrohr äquivalenten Zellspezifikationen der neuralen Differenzierung *in vitro*, die sogenannten neuralen Rosetten, sind charakterisiert durch ihr breites Differenzierungspotenzial. Sie sind in der Lage, sich in verschiedenste regionalspezifische neurale und gliale Identitäten, beispielsweise in dopaminerge Neurone des

Mesencephalon oder Motoneurone des Rückenmarks, in Reaktion auf exogene Differenzierungseinflüsse zu entwickeln (Li et al, 2005; Perrier et al, 2004; Zhang et al, 2001). Unter dem Einfluss von SHH und Notch können diese Zellen als frühe Rosetten-NSC (R-NSC) in Kultur gehalten werden. Sie behalten ihre Rosettenmorphologie sowie ihr breites Differenzierungspotenzial bei und können durch exogene Einflüsse regionalisiert werden (Elkabetz et al, 2008). Werden neurale Rosetten aus differenzierten humanen ESC-Kulturen isoliert und unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 proliferiert, so entwickeln sich späte neurale Vorläuferzellen mit NSC-Charakteristika (NSC^{EGF/FGF}), welche nur noch eingeschränkt differenziert und regional spezifiziert werden können (Elkabetz et al, 2008). Durch den Einsatz definierter Kulturbedingungen gelang weiterhin die Generierung einer intermediären Population an NSC (It-NES), welche Eigenschaften und Markerexpression sowohl der R-NSC als auch der NSC^{EGF/FGF} teilt (Koch et al, 2009). Im Vergleich der Expressionsprofile der frühen R-NSC, intermediären It-NES sowie späten langzeitproliferierten NSC^{EGF/FGF} erscheinen die RGL-NPC als Population später NSC. Die Expression rosettenspezifischer Marker ist schwächer verglichen mit It-NES und es werden Marker später NSC-Populationen exprimiert, die in den intermediären It-NES nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert werden (*peripheres Myelinprotein (PMP) 2*, *homeodomain-only protein (HOP)*, *Aquaporin (AQP) 4*, *S100β*). Übereinstimmend dazu zeigt sich die erheblich eingeschränkte Reaktion der RGL-NPC auf exogene regionalisierende Stimuli gemäß der Abnahme dieser Fähigkeit von frühen zu späten NSC-Populationen. Trotz spezifischer Medienbedingungen und im Gegensatz zu It-NES Zellen konnte keine präferierte neuronale Differenzierung in dopaminerge Neurone des Mesencephalons oder Motoneurone des Rückenmarks forciert werden. Dies lässt darauf schließen, dass die gewählten Medienbedingungen während der Generierung und Kultivierung der RGL-NPC eine späte NSC-Population hervorbringen. Diese stellen sich zwar als in ihrer regionalen Identität fixiert dar, ihre Charakteristika später NSC erscheinen aber analog zur zeitlich späten Entstehung der Oligodendrozyten während der Entwicklung essenziell für ein endogen hohes oligodendrogiales Differenzierungspotenzial. Im Unterschied zu den bereits beschriebenen frühen und späten NSC-Populationen mit niedriger glialer Differenzierungspotenz wurden die RGL-NPC über CD133 immunisoliert. Die hohe *CD133*-Expression in RGL-NPC verglichen mit akut isolierten Rosettenzellen und den intermediären It-NES könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine starke *CD133*-Expression NSC eines späten Typs charakterisiert. Die Anreicherung ausschließlich hochgradig CD133-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie zur Erzeugung der RGL-NPC-Populationen könnte somit als grundlegend für die Etablierung einer späten NSC-Population mit starker glialer Differenzierungskapazität angesehen werden.

Humane CD133-positive Zellen scheinen eine Mischpopulation aus Stammzellen mit und ohne oligodendrogliale Differenzierungsfähigkeiten darzustellen und anhand der Expression des CD140a-Antigens voneinander abgegrenzt werden zu können (Wang et al, 2013a). Dieses Antigen stellt ein Epitop des PDGFR α dar und wird von humanen oligodendroglialen Vorläuferzellen mit hochgradig myelinisierendem Potenzial exprimiert (Sim et al, 2011). Innerhalb der CD133-positiven Zellpopulation markiert eine CD140a-Expression laut Wang et al. die Zellen mit oligodendroglialem Differenzierungspotenzial, der CD140a-negative Anteil der CD133-Population stellt den Pool der neuralen Vorläuferzellen dar, denen die Fähigkeit zur Differenzierung in Oligodendrozyten fehlt (Wang et al, 2013a). Eine Untersuchung der RGL-NPC auf die Expression von CD140a auf Proteinebene könnte die deutliche Expression des PDGFR α -Gens auf Transkriptebeine bestätigen und eine weitere Erklärung des starken oligodendroglialen Differenzierungsvermögens der Zellen in Abgrenzung zu den It-NES liefern.

4.2 RGL-NPC als direkte und robuste Quelle humaner Oligodendrozyten

Protokoll zur effizienten Generierung von Oligodendrozyten aus RGL-NPC

Das deutliche spontane oligodendrogliale Differenzierungspotenzial der RGL-NPC unter Standardbedingungen (8 % O4-positive Zellen nach Langzeitentzug der Wachstumsfaktoren) wurde in dieser Arbeit genutzt, um ein effizientes oligodendrogliales Differenzierungsprotokoll zu etablieren. Als Basis wurden permissive Kulturbedingungen eines Differenzierungsschemas für murine NSC genutzt und an die Anforderungen der RGL-NPC Differenzierung angepasst (Glaser et al, 2007). Diese erfolgt in drei Schritten und ermöglicht zunächst die Spezifikation glialer Vorläuferzellen unter dem Einfluss von EGF, *platelet-derived growth factor AA* (PDGF-AA) sowie Forskolin gefolgt von der Proliferation glialer Zelltypen in Anwesenheit von PDGF-AA, Trijodthyronin (T3), Ascorbinsäure (AA) und Noggin. Abschließend werden die Zellen terminal unter dem Einfluss von T3, AA und Laminin in Oligodendrozyten differenziert.

Die Kombination von PDGF-AA, Forskolin und EGF und nicht FGF-2 während der ersten Stufe der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC ermöglichte eine effiziente Spezifikation von Oligodendrozytenvorläuferzellen. PDGF-AA spielt eine zentrale Rolle in der oligodendroglialen Differenzierung und wurde als potentes Mitogen oligodendroglialer Vorläuferzellen beschrieben (Asakura et al, 1997; Hu et al, 2008; Noble et al, 1988; Richardson et al, 1988). Es bewirkt die Spezifikation und Teilung früher Vorläuferzellen und verhindert deren frühzeitige Ausreifung (Ben-Hur et al, 1998; Noble et al, 1988; Raff et al, 1988). In Abwesenheit von PDGF-AA ist die Proliferation von Vorläuferzellen *in vivo* deutlich eingeschränkt (Fruttiger et al, 1999).

In Differenzierungen muriner Zellen wurde die Proliferation glialer Vorläufer durch PDGF-AA meist in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 unterstützt, da sich Hinweise darauf zeigten, dass FGF-2 als Mitogen für Oligodendrozytenvorläufer dienen und deren terminale Differenzierung sowie die Expression von Myelinen blocken kann (Bansal et al, 1996; Bogler et al, 1990; Brustle et al, 1999; McKinnon et al, 1990). Auch die Generierung von Oligodendrozyten aus murinen NSC gelang unter dem Einfluss von FGF-2 (Zhang et al, 1998). Die oligodendrogliale Differenzierung humaner Zellen hingegen erscheint in der Anwesenheit von FGF-2 äußerst ineffizient. Sowohl die Entstehung von Vorläuferzellen aus humanen ESC als auch eine Reifung bestehender Oligodendrozytenvorläufer scheint inhibiert zu sein (Grever et al, 1999; Hu et al, 2009a; Izrael et al, 2007). Dies könnte in einem inhibitorischen Effekt von FGF-2 auf die Expression der für die Oligodendro-

zytendifferenzierung essenziellen Transkriptionsfaktoren NKX2-2 und OLIG2 in humanen Zellen begründet sein (Hu et al, 2009a). Einige Studien an murinen Zellen konnten zusätzlich belegen, dass ein aktiver EGF-Signalweg das Überleben und die Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen stimuliert (Aguirre et al, 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass EGF die Induktion oligodendroglialer Vorläuferzellen anregen kann, welche nach Entzug des Wachstumsfaktors zu reifen Oligodendrozyten ausdifferenzieren (Gonzalez-Perez & Alvarez-Buylla, 2011).

Die Migration muriner Oligodendrozytenvorläufer wurde in etablierten Differenzierungsprotokollen durch den Einsatz von PDGF-AA in Kombination mit Forskolin unterstützt (Glaser et al, 2007). Forskolin wirkt als Stimulator der Adenylylzyklen und katalysiert so die Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Auf diesem Weg bewirkt Forskolin die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und somit eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Der cAMP/PKA Signalweg ist an der oligodendroglialen Differenzierung beteiligt; so konnte eine cAMP-abhängige Stimulation der Expression von 2',3'-cyclischer Nukleotid-3' Phosphodiesterase (CNPase) sowie die Begünstigung der oligodendroglialen Entwicklung gezeigt werden (Cohen et al, 1999; Joubert et al, 2010; McMorris, 1983; Raible & McMorris, 1989; Shiga et al, 2005).

Im zweiten Schritt der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC erfolgte die Proliferation glialer Vorläuferzellen unter dem Einfluss von PDGF-AA, T3, AA und Noggin. Schon früh zeigten sich Hinweise darauf, dass die Proliferation von oligodendroglialen Vorläuferzellen und deren Reifung in Oligodendrozyten sowohl durch zellintrinsische Mechanismen als auch durch die Regulation durch exogene Stimuli bestimmt ist (Durand & Raff, 2000; Ibarrola et al, 1996). Oligodendrozytenvorläufer durchlaufen während der Entwicklung eine determinierte Anzahl an Teilungen, bevor sie den Zellzyklus verlassen und zu funktionellen Oligodendrozyten ausreifen. Dabei detektiert ein intrinsischer Zeitmesser die Lebensdauer der Vorläuferzellen bis zu deren Differenzierung (Gao et al, 1997; Temple & Raff, 1986). Dieser Zeitmesser ist allerdings abhängig von der Stimulation der Zellen durch PDGF (Barres et al, 1992; Raff et al, 1983). Der Austritt der Oligodendrozytenvorläufer aus dem Zellzyklus und die Differenzierung sind darüber hinaus abhängig von einem weiteren exogenen Stimulus, beispielsweise T3 (Barres & Raff, 1994). T3 spielt während der oligodendroglialen Entwicklung an unterschiedlichen Zeitpunkten eine Rolle. So wird sowohl die Proliferation und das Überleben von frühen Vorläuferzellen als auch deren Differenzierung unterstützt (Ben-Hur et al, 1998; Ibarrola et al, 1996). Somit ergibt sich für die Regulation der Proliferation und Differenzierung von oligodendroglialen Vorläuferzellen ein Bild, in welchem die Zellen unter Einfluss von PDGF induziert werden und ohne zu

differenzieren proliferieren. In Anwesenheit von PDGF und T3 durchlaufen die Vorläuferzellen eine definierte Anzahl von Teilungen, bevor sie differenzieren. Die Abwesenheit von PDGF schließlich führt dazu, dass die oligodendroglialen Vorläufer die Proliferation rasch einstellen und unabhängig von der Anwesenheit von T3 ausreifen (Durand & Raff, 2000). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde das Medium zur Unterstützung der Proliferation oligodendroglialer Vorläufer in RGL-NPC Kulturen im direkten Vorfeld zur terminalen Reifung sowohl mit PDGF-AA als auch T3 versetzt, um die determinierte Proliferation von im ersten Differenzierungsschritt induzierten Vorläuferzellen zu ermöglichen.

Darüber hinaus wurde dem Medium Noggin als BMP-Antagonist hinzugefügt. BMPs nehmen auf unterschiedliche Entwicklungsstufen der Oligodendrozyten negativen Einfluss. So werden die Spezifikation oligodendroglialer Zelltypen sowie die Entwicklung von Vorläuferzellen in reife Oligodendrozyten durch BMPs inhibiert (Mekki-Dauriac et al, 2002; See et al, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Noggin an definierten Zeitpunkten kurz vor und während der terminalen oligodendroglialen Differenzierung humaner ESC die Generierung reifer Oligodendrozyten *in vitro* stimuliert (Izrael et al, 2007). Auch während der Differenzierung der RGL-NPC wurde die oligodendrogliale Entwicklung durch die Zugabe von Noggin vor der terminalen Differenzierung unterstützt. In Kulturen differenzierender NSC können BMPs sowohl von Astrozyten als auch Neuronen sezerniert werden (Chang et al, 2003; Hu et al, 2012; Wang et al, 2011). Astrozyten sezernieren zudem das oligodendrogliale Mitogen PDGF, welches im Kulturmedium oligodendroglial differenzierender RGL-NPC zur für die oligodendrogliale Spezifikation und Proliferation benötigten Konzentration beitragen könnte. Die Inhibition von BMPs durch Noggin erst vor dem Beginn der terminalen Differenzierung der RGL-NPC ermöglicht somit eine initiale Generierung astroglialer Zellen zu Beginn des Differenzierungsprotokolls, zusätzlich aber die Ausreifung der Oligodendrozyten in der terminalen Differenzierungsphase (Noble & Murray, 1984; Richardson et al, 1988).

Die Ausreifung der Oligodendrozytenvorläufer in der Phase der terminalen Differenzierung der RGL-NPC erfolgte unter dem Entzug des Mitogens PDGF aber unter der andauernden Zugabe von T3. In Abwesenheit von PDGF stellen oligodendrogliale Zellen die Proliferation rasch ein und reifen aus (Raff et al, 1988). Die Wirkung von T3 beruht nicht nur auf der Steuerung der terminalen Differenzierung, sondern auch auf der Unterstützung oligodendroglialen Überlebens (Barres et al, 1994; Ben-Hur et al, 1998; Ibarrola et al, 1996). Die Zugabe von Laminin unterstützt während der sensiblen Phase der terminalen Differen-

zierung der RGL-NPC zusätzlich das Überleben der Oligodendrozyten (Colognato et al, 2002; Frost et al, 1999; Relucio et al, 2012).

Werden humane NSC unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 über lange Zeiträume hinweg kultiviert, so gelingt die Differenzierung von Oligodendrozyten nur selten und ineffizient (Chandran et al, 2004; Zhang et al, 2000). Die Tatsache, dass sich RGL-NPC auch nach Langzeitkultur (40 Passagen) unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 in Oligodendrozyten differenzieren lassen, scheint in dem endogen hohen oligodendroglialen Differenzierungspotenzial begründet. Da sich die regionale Identität und das Differenzierungspotenzial der RGL-NPC auch unter dem Einfluss dorsalisierender oder ventralisierender Stimuli oder nach Langzeitkultur nicht verändert, kann davon ausgegangen werden, dass auch das persistierende oligodendrogliale Differenzierungsvermögen ein Charakteristikum der RGL-NPC als späte NSC-Population darstellt. Darüber hinaus scheint das *in vitro* zu beobachtende Auftreten diverser Stammzellpopulationen in definierter zeitlicher Abfolge (R-NSC – lt-NES – NSC^{EGF/FGF} – RGL-NPC) *in vivo*-Entwicklungsgänge widerzuspiegeln, wodurch zunächst die Generierung von Neuronen gefolgt von Astrozyten und schließlich Oligodendrozyten ermöglicht wird.

Oligodendrogliale Entwicklung der RGL-NPC

Die Entwicklung der RGL-NPC in Zellen der oligodendroglialen Linie lässt sich über 2 Wege nachverfolgen: über die Expression linienspezifischer Marker allein und in Kombination mit für die Oligodendrozytenentwicklung essenziellen Transkriptionsfaktoren auf Protein- und Transkriptebene (Zhang, 2001). In Kulturen vier Wochen terminal differenzierter RGL-NPC konnten sowohl bipolare NG2-positive Vorläuferzellen als auch frühe, stärker verzweigte Oligodendrozyten detektiert werden, die O4 sowie den oligodendroglialen Transkriptionsfaktor OLIG2 exprimieren (Nishiyama et al, 1999; Sommer & Schachner, 1981; Zhou et al, 2000). Nach 6 Wochen terminaler Differenzierung entwickelten sich aus den unreifen RGL-NPC-abgeleiteten Vorläuferzellen reife Oligodendrozyten, welche durch die Expression des basischen Myelinproteins (*myelin basic protein*, MBP) detektiert werden konnten (Zhang, 2001). Zum ersten Mal wurden darüber hinaus in diesen RGL-NPC Kulturen humane Oligodendrozyten mit dem Antikörper 4860 detektiert. Dieser markiert murine komplex verzweigte, membranbildende Oligodendrozyten im Zustand der Ausreifung und könnte auch im Humansystem als linienspezifischer Marker reifer Oligodendrozyten dienen (Czopka et al, 2009).

Die Überprüfung der Multipotenz der RGL-NPC sowie insbesondere des Myelinisierungspotenzials der aus diesen Zellen abgeleiteten Oligodendrozyten erfolgte nach Transplantation

proliferierender RGL-NPC in neugeborene Shiverer-Mäuse. Diese Tiere sind gekennzeichnet durch eine ausgedehnte Deletion im MBP-Gen und infolgedessen durch das Fehlen von MBP im ZNS (Mikoshiha et al, 1992). In den transplantierten Tieren konnten sowohl Neurone als auch Astrozyten und Oligodendrozyten humanen Ursprungs im Corpus callosum, den Colliculi inferiores sowie dem Lateralventrikel detektiert werden, was die Tripotenz der Zellen auch *in vivo* belegt. Darüber hinaus konnte im kongenital hypomyelinisierten Gehirn der transplantierten Shiverer-Mäuse Myelin mittels Detektion von MBP nachgewiesen werden. Insbesondere die diskontinuierliche Färbung einiger MBP-positiver Segmente und die Detektion von Contactin-assoziierte Protein (CASPR)-positiven Strukturen zwischen zwei MBP-Segmenten weist dabei auf die Bildung von Myelininternodien und die Entstehung von Ranvierschen Schnürringen hin. Diese haben eine charakteristische Architektur mit einer hohen Konzentration an spannungsabhängigen Natriumkanälen (Salzer, 1997) sowie unterschiedlichen Proteinen, die eine typische Verteilung zwischen Nodium, Paranodium und Internodium aufweisen. Eines dieser Proteine ist CASPR, das sich konzentriert in den Paranodien der Ranvierschen Schnürringe befindet. In nicht-myelinisierten oder noch gering myelinisierten Axonen hingegen ist das Protein diffus über die Länge des Axons verteilt (Einheber et al, 1997). Diese Daten weisen somit auf die Fähigkeit der RGL-NPC zur Differenzierung in myelinisierende Oligodendrozyten *in vivo* hin. Abschließend könnte zur endgültigen Darstellung der Funktionalität der Oligodendrozyten die Bildung von Myelinscheiden mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Hu et al, 2009a). Eine Besiedelung des gesamten Maushirns mit humanen Zellen wie in einer Transplantationsstudie mit primären glialen Vorläuferzellen humanen Ursprungs (Windrem et al, 2008) oder in Studien mit hiPSC-abgeleiteten Oligodendrozyten (Douvaras et al, 2014; Wang et al, 2013b) konnte nicht erreicht werden. Dies könnte darin begründet sein, dass nicht wie in diesen Studien durchgeführt in mehrere Stellen des neonatalen Hirns transplantiert wurde, sondern nur in je eine Stelle jeder Hemisphere. Um detaillierte Studien an humanen Oligodendrozyten *in vivo* durchführen zu können müsste der Anteil an oligodendroglialen im Vergleich zu neuronalen und astroglialen Zellen in den Transplantaten erhöht werden. Dazu könnten RGL-NPC transplantiert werden, die im Vorfeld *in vitro* oligodendroglial differenziert, aber nicht terminal ausgereift werden.

Eine Voraussetzung für die Untersuchung krankheitsspezifischer oligodendroglialer Zellen ist, dass der Ablauf der Differenzierung in gesunden Zellen als Referenz bekannt ist. Zu diesem Zweck wurde das Genexpressionsprofil der RGL-NPC an definierten Zeitpunkten des oligodendroglialen Differenzierungsprotokolls näher betrachtet. Es demonstriert die fortschreitende Entwicklung der RGL-NPC von Vorläuferzellen hin zu Oligodendrozyten.

Das dreistufige Differenzierungsschema ermöglicht die Induktion oligodendroglialer Vorläuferzellen (Expression von *NG2* und *PDGF Rezeptor α* (*PDGFR α*) (Nishiyama et al, 1996; Pringle & Richardson, 1993)) und deren Reifung in Myelin-exprimierende Oligodendrozyten (Expression der Myelogene *Proteolipidprotein* (*PLP*), *MBP*, *myelinassoziertes Glycoprotein* (*MAG*), *Myelin-Oligodendrozyten Glycoprotein* (*MOG*) und *myelin and lymphocyte protein* (*MAL*) (Buchet & Baron-Van Evercooren, 2009; Frank, 2000)). Die ansteigende Expression der Transkriptionsfaktoren *OLIG1/2* während der fortschreitenden Entwicklung der RGL-NPC stimmt mit Studien überein, welche die Bedeutung von OLIG-Transkriptionsfaktoren sowohl für die Zellspezifikation als auch für die terminale Differenzierung zu reifen Oligodendrozyten beschreiben (Arnett et al, 2004; Lu et al, 2002; Othman et al, 2011; Xin et al, 2005; Zhou & Anderson, 2002). *OLIG2* ist in differenzierenden RGL-NPC während der oligodendroglialen Spezifikation exprimiert und wird im Verlauf der Entwicklung hochreguliert, zu deren Ende hin die Expression der Transkriptionsfaktoren *SOX10* und *NKX2-2* durch *OLIG2* induziert und reguliert werden könnte (Kuspert et al, 2011; Liu et al, 2007; Qi et al, 2001). Erst in den terminalen Differenzierungsphasen werden *SOX10* und *NKX2-2* in den RGL-NPC-Kulturen exprimiert, übereinstimmend mit deren Funktion in der Regulation der Oligodendrozytenreifung (Qi et al, 2001; Stolt et al, 2002). Kürzlich wurde übereinstimmend zur zeitlichen Expression von *NKX2-2* während der Differenzierung der RGL-NPC beschrieben, dass dieser Transkriptionsfaktor in murinen Zellen die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläufern zu Oligodendrozyten beeinflusst und somit eine Schlüsselrolle in der zeitlichen Regulation der Oligodendrozytendifferenzierung einnehmen könnte (Zhu et al, 2014). Die Expression von *OLIG1* ist bereits in frühen oligodendroglialen RGL-NPC-Kulturen detektierbar, wird aber vor Beginn und während der terminalen Phase verstärkt. Dies stimmt mit Beobachtungen zur dualen Funktion von *OLIG1* in der Induktion der Expression myelinassoziierter Gene sowie der Stimulation der Membranbildung in reifen Oligodendrozyten überein (Niu et al, 2012).

Der Transkriptionsfaktor *NKX6-2* wird während der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC zunächst negativ reguliert, bevor er in den terminalen Phasen der Differenzierung wieder verstärkt exprimiert wird. Neben seiner Funktion als positionsbestimmender Transkriptionsfaktor ventraler Vorläuferdomänen des Rückenmarks (Gomez-Skarmeta et al, 2003) wurde für *NKX6-2* eine Beteiligung an der Regulation der Myelinisierung beschrieben. Übereinstimmend zum Expressionsprofil in oligodendroglial differenzierenden RGL-NPC-Kulturen wird *NKX6-2* nicht in Oligodendrozytenvorläufern, aber in postmitotischen reifen Oligodendrozyten exprimiert (Awatramani et al, 1997; Southwood et al, 2004). Somit könnte die Expression in frühen Phasen der Differenzierung die regionale Identität der RGL-NPC

widerspiegeln, die Expression in den terminalen Stufen aber das Entstehen myelinisierender Oligodendrozyten.

In ventralen Domänen des Rückenmarks entsteht der Großteil der Oligodendrozyten aus einer Vorläuferdomäne (pMN-Domäne), welche charakterisiert ist durch die Expression der NKX6-Transkriptionsfaktoren. In dieser Domäne ist die für die oligodendrogliale Spezifikation essenzielle Expression von OLIG2 in weiten Teilen abhängig von NKX6-1 (Liu et al, 2003). In dorsalen Bereichen des Rückenmarks sowie im Rhombencephalon scheint eine Differenzierung von Oligodendrozyten hingegen unabhängig von NKX6-1 möglich (Cai et al, 2005; Vallstedt et al, 2005). Für die fortschreitende oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPC scheint eine starke Expression von *NKX6-1* ebenfalls nicht essenziell.

Der Myelin-Transkriptionsfaktor 1 (MYT1) wird in proliferierenden Oligodendrozytenvorläufern stark exprimiert, aber auch in PLP-exprimierenden Oligodendrozyten detektiert (Armstrong et al, 1995). Dabei wird ihm eine kritische Rolle bei der Regulation proliferierender Vorläuferzellen hin zur terminalen Differenzierung sowie bei der Stimulation der Expression myelinassoziierter Gene zugeschrieben (Nielsen et al, 2004). Übereinstimmend dazu scheint die Expression von *MYT1* während der Phasen der Induktion und Proliferation oligodendroglialer Vorläuferzellen aus RGL-NPC im Vergleich zu den terminalen Differenzierungsstufen leicht erhöht.

Zusammenfassend konnten die RGL-NPC durch Anwendung des etablierten oligodendroglialen Differenzierungsprotokolles effizient in Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen differenziert werden. Die Differenzierung kann dabei anhand der Expression von typischen Markerproteinen der oligodendroglialen Zelllinie belegt und das Myelinisierungspotenzial der Zellen *in vivo* nachvollzogen werden. Die Differenzierung wurde weiterhin über die schrittweise Analyse des Genexpressionsprofils der oligodendroglialen Kulturen detailliert belegt und ist somit für weitergehende Untersuchungen in den einzelnen Differenzierungsschritten eingehend charakterisiert.

Kontrolle der Oligodendrozytendifferenzierung durch microRNA

Die Kontrolle der Oligodendrozytendifferenzierung findet auf unterschiedlichen Ebenen statt. Seit einiger Zeit treten microRNAs (miRNA) zunehmend in den Fokus, wenn regulatorische Prozesse in Oligodendrozyten betrachtet werden (Lau et al, 2008). Studien an Nagerzellen haben gezeigt, dass die oligodendrogliale Entwicklung auf post-transkriptioneller Ebene streng durch miRNAs kontrolliert wird. Neben anderen gehören die miRNAs miR-23, miR-138, miR-219 und miR-338 zu den am stärksten differentiell exprimierten miRNAs in Oligodendrozytenvorläufern und regulieren deren Proliferation und Reifung. Darüber hinaus

induziert die Überexpression dieser miRNAs in oligodendroglialen Vorläuferzellen die Differenzierung sowie die Expression myelinassoziierter Gene (Dugas et al, 2010; Lin & Fu, 2009; Zhao et al, 2010). Eine erste Studie verfolgte den Ansatz, die dynamische Expression von miRNAs während der oligodendroglialen Differenzierung humaner ESC zu untersuchen (Letzen et al, 2010). Zu diesem Zweck wurde ein oligodendrogliales Differenzierungsprotokoll etabliert, in acht Differenzierungsstufen von EBs über NSCs zu Oligodendrozyten unterschiedlicher Reifegrade unterteilt und ein miRNA-Expressionsprofil mittels eines Microarrays erstellt. Überraschenderweise spielte in Zellen dieses Differenzierungsschemas keine der in Nageroligodendrozyten als essenziell erwiesenen miRNAs während der oligodendroglialen Differenzierung eine Rolle. Eine neuere Arbeit sollte die Expression von miRNAs in murinen und humanen Zellen vergleichen. Zu diesem Zweck wurden akut aus der humanen weißen Substanz isolierte Oligodendrozyten mit Zellen der Maus verglichen (de Faria et al, 2012). Dabei stellte sich heraus, dass die miRNAs miR-219 und miR-338 sowohl in murinen als auch humanen Oligodendrozyten exprimiert und reguliert werden. Die Vergleichbarkeit der in beiden Arbeiten untersuchten oligodendroglialen Zelltypen erscheint somit fraglich.

Die Untersuchung von oligodendroglial differenzierten RGL-NPC zu definierten Zeitpunkten des in dieser Arbeit erstellten Protokolls bestätigte die dynamische Expression der *miR-219-1-3p* und *miR-338-3p* in humanen Oligodendrozyten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die *miR-23a* und *miR-138-2* ebenfalls dynamisch exprimiert werden, was einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung dieser miRNAs an der Differenzierung von RGL-NPC zu Oligodendrozyten liefert. Dabei lässt die hohe Expression der *miR-138-2* nach der ersten induktiven Differenzierungsphase der RGL-NPC eine Rolle für die oligodendrogliale Spezifikation und Proliferation früher Vorläuferzellen vermuten. Jede der untersuchten miRNAs könnte hingegen aufgrund ihrer starken Expression nach sechs Wochen terminaler Differenzierung die Reifung und Myelinisierung der Zellen beeinflussen. Für die *miR-23a* wurde in Nagerzellen bereits eine Beteiligung an der Myelinisierung des ZNS beschrieben (Lin et al, 2013). Targetanalysen ergaben, dass die miR-219 und miR-338 vorwiegend an der Regulation der Transition von NSC zu Oligodendrozytenvorläufern bzw. von Vorläufern zu unreifen Oligodendrozyten beteiligt sind. Die miRNAs miR-138 und miR-219 kontrollieren die Übergänge von Vorläufern zu unreifen Oligodendrozyten bzw. von unreifen zu myelinisierenden Zellen (Barca-Mayo & Lu, 2012). Um letztendlich aber einen direkten Effekt der miRNAs auf die Oligodendrozytendifferenzierung mittels Expressionsanalyse zu zeigen, müssten Untersuchungen an reinen Kulturen von Oligodendrozyten durchgeführt werden, um unerwünschte Nebeneffekte durch andere Zelltypen ausschließen zu können. Sowohl die

Untersuchungen an direkt oligodendroglial differenzierten humanen ESC-Kulturen (Letzen et al, 2010) als auch an den hier beschriebenen RGL-NPC haben heterogene Mischkulturen unterschiedlicher neuraler Zelltypen als Grundlage. Die Aufreinigung glialer Vorläufer aus primärem humanen Hirngewebe mittels A2B5-basierter Immunisolierung wie in der vergleichenden Studie zwischen Oligodendrozyten aus Mensch und Maus (de Faria et al, 2012) wurde häufig in der Literatur beschrieben (Roy et al, 1999; Windrem et al, 2002; Windrem et al, 2008). Allerdings konnte gezeigt werden, dass A2B5-positive Zellen keine reinen oligodendroglialen Vorläuferkulturen darstellen, sondern multipotente Vorläufer, die in Oligodendrozyten und Astrozyten differenzieren; sogar neuronale Zellen können A2B5 exprimieren (Nunes et al, 2003; Sim et al, 2011; Windrem et al, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Entfernung *polysialylated neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM)-positiver neuronaler Zellen keine reinen oligodendroglialen Zellen, sondern Mischkulturen aus Astrozyten und Oligodendrozyten hervorbringt (Windrem et al, 2004; Windrem et al, 2008). Somit ist auch in dieser zweiten Studie an humanen Zellen nicht ausgeschlossen, dass die beobachteten Expressionen der miRNAs auch oder teilweise aus Astrozyten oder neuronalen Zellen stammen. Um darüber hinaus zu zeigen, dass die miRNAs, die in den oligodendroglial differenzierenden RGL-NPC Kulturen als differentiell exprimiert gefunden wurden, einen tatsächlichen Einfluss auf die Oligodendrozytendifferenzierung humaner NSC ausüben, müssten die entsprechenden miRNAs in reinen Kulturen RGL-NPC-abgeleiteter Oligodendrozytenvorläufer analog zu Experimenten an murinen Zellen überexprimiert werden (Dugas et al, 2010; Lin & Fu, 2009; Zhao et al, 2010). Könnte infolgedessen eine Regulation oder Stimulation der Oligodendrozytendifferenzierung gezeigt werden, so wäre von einer Rolle der entsprechenden miRNAs während der Oligodendrozytenentwicklung auszugehen.

Einfluss regulatorischer Signalwege auf die oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPC

Der Großteil der Oligodendrozyten des ZNS entsteht während der Entwicklung unter dem Einfluss von SHH aus der pMN-Domäne (Richardson et al, 1997; Zhou & Anderson, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass neben der verstärkten Oligodendrogenese bedingt durch SHH (Nery et al, 2001; Orentas et al, 1999) die Differenzierung von Oligodendrozyten sowohl aus murinen als auch humanen ESC in Abhängigkeit von SHH erreicht werden kann (Billon et al, 2002; Douvaras et al, 2014; Hu et al, 2009a; Neman & de Vellis, 2012). Zusätzlich wurde die SHH-abhängige oligodendrogliale Differenzierung humaner fetaler Radialglia beschrieben (Mo & Zecevic, 2009). Im Gegensatz dazu erscheint die Differenzierung der RGL-NPC weder strikt von einem aktiven SHH-Signalweg abhängig noch durch diesen verstärkt werden

zu können. Dass Oligodendrozyten sowohl während der Entwicklung unabhängig von SHH entstehen können als auch die Differenzierung humaner PSC in Zellen oligodendroglialer Linien ohne den Einsatz von SHH gelingen kann, wurde mehrfach berichtet (Cai et al, 2005; Izrael et al, 2007; Nistor et al, 2005). Überraschenderweise konnte allerdings unter dem Einfluss eines Agonisten des SHH-Signalweges (SAG) eine Verminderung der MBP-Expression in oligodendroglial differenzierten RGL-NPC festgestellt werden. Es ist bekannt, dass SAG eine duale Wirkung auf die Aktivität des SHH-Signalweges mit einer Aktivierung in geringen Konzentration und einer steigenden Inhibition des Signalweges ab Konzentrationen von über 1 μM ausübt (Chen et al, 2002). Allerdings liegt die während der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC eingesetzte Konzentration von 0,5/1 μM im Bereich der stimulierenden Wirkung von SAG. Darüber hinaus kann durch die Detektion erhöhter Transkriptmengen von *patched (PTCH) 1* und *GLI family zinc finger (GLI) 1*, direkte Zielgene des aktiven SHH-Signalweges, von einer Aktivierung und nicht Inhibition des Signalweges ausgegangen werden. Die dennoch zu detektierenden Unterschiede in der Expression der SHH-Zielgene zeigt eine Tendenz zur geringeren Aktivierung des Signalweges bei SAG-Konzentrationen um 1 μM . Ein ähnliches reifungshemmendes Phänomen der oligodendroglialen Entwicklung wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Die Behandlung der RGL-NPC mit dem Inhibitor des SHH-Signalweges Cyclopamin (Pasca di Magliano & Hebrok, 2003) bewirkte hingegen erstaunlicherweise eine deutlich verstärkte Reifung der Oligodendrozyten. Sowohl das Transkript des Transkriptionsfaktors *OLIG1*, der während der terminalen Differenzierung sowie der Myelinbildung in Oligodendrozyten eine wichtige Rolle spielt (Niu et al, 2012), als auch das der Myelinprotein *MBP*, *MAG* und *MOG*, die in reifen Oligodendrozyten exprimiert werden (Barbarese & Pfeiffer, 1981), wurde verstärkt gebildet. Dies ist bislang in keiner Studie zur Rolle des SHH-Signalweges während der Oligodendrozytendifferenzierung beschrieben worden. Bislang zeigte sich, dass der Einsatz von Cyclopamin erwartungsgemäß die SHH-abhängige Oligodendrozytendifferenzierung der Maus sowie humaner ESC und Radialglia inhibiert (Hu et al, 2009a; Mo & Zecevic, 2009; Tekki-Kessaris et al, 2001). Ein möglicher Einfluss auf die Reifung der Zellen in myelinisierende Zelltypen wurde allerdings in keiner der Studien dargestellt.

Da SHH einen proliferativen Effekt auf neurale Vorläuferzellen und neuroepitheliale Zellen ausübt (Feijoo et al, 2011; Lai et al, 2003; Rapacioli et al, 2012), könnte davon ausgegangen werden, dass die Inhibition des SHH-Signalweges einen früheren Proliferationsstopp und somit einen früheren Start der Differenzierung der RGL-NPC bewirkt. Es konnte an humanen mesenchymalen Stammzellen gezeigt werden, dass die Inhibition des SHH-Signalweges durch Cyclopamin eine verminderte Proliferation der Zellen durch Verharren in

der G0/G1 Phase des Zellzyklus auslöst (Plaisant et al, 2011). Eine Inkubation proliferierender RGL-NPC mit SAG bzw. Cyclopamin bewirkte hingegen keine Veränderung des Anteils an Ki67-positiven Zellen. Ki67 wird als Marker proliferierender Zellen aus allen aktiven Abschnitten des Zellzyklus genutzt, ist in ruhenden Zellen der G0-Phase hingegen nicht detektierbar (Scholzen & Gerdes, 2000). Somit kann die verstärkte Ausreifung der RGL-NPC unter dem Einfluss von Cyclopamin während der oligodendroglialen Differenzierung nicht mit einem durch Cyclopamin bewirkten verfrühten Austritt aus dem Zellzyklus erklärt werden. Die Tatsache, dass durch Differenzierung der RGL-NPC in Anwesenheit anderer Inhibitoren des SHH-Signalweges - Jervin bzw. CUR61414 - keine mit Cyclopamin vergleichbaren reifungsfördernden Effekte erzielt werden konnten, deutet möglicherweise auf einen cyclopaminspezifischen Effekt auf oligodendrogliale differenzierende RGL-NPC hin.

Die Betrachtung der Expression von Genen der Notch-, Wnt- und BMP-Signalwege, welche inhibierende Einflüsse auf die Reifung von Oligodendrozyten ausüben (Fancy et al, 2009; Feigenson et al, 2009; See et al, 2004; Wang et al, 1998), zeigt zunächst, dass in den Standardkulturen oligodendrogliale differenzierter RGL-NPC scheinbar alle inhibierenden Signalwege aktiv sind. RGL-NPC-abgeleitete Oligodendrozyten exprimieren das Myelinprotein MBP sowie Transkripte der myelinassoziierten Gene *PLP*, *MAG* und *MOG*, eine Morphologie mit Ausprägung von Myelinmembranen wie aus Nageroligodendrozyten (Glaser et al, 2007; Gottle et al, 2010) konnte aber auch nach verlängerter terminaler Differenzierung von 6 Wochen *in vitro* nicht erreicht werden. Möglicherweise ist eine weiterreichende Reifung der RGL-NPC-abgeleiteten Oligodendrozyten durch die aktivierten inhibitorischen Signalwege der terminalen oligodendroglialen Differenzierung Notch/Wnt/BMP blockiert. Um dies zu überprüfen, müsste der Einfluss von Inhibitoren dieser Signalwege auf die Reifung der RGL-NPC Kulturen untersucht werden.

Ein aktivierter Notch-Signalweg verhindert die Transition von Oligodendrozyten zu myelinisierenden Zelltypen (Wang et al, 1998). Im Vergleich zu oligodendroglialen RGL-NPC-Differenzierungen unter Standardbedingungen erbrachte die Behandlung der Zellen mit Cyclopamin keine Veränderung der Transkripte der Notch-Effektoren (*hairy and enhancer of split(HES)*/*Hes-related with YRPM motif (HEY)*). Somit kann der reifungsfördernde Effekt von Cyclopamin nicht auf eine Modulation des Notch-Signalweges zurückgeführt werden. Allerdings konnten verringerte Mengen an *wingless-type mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site (WNT) 1*- und *AXIN2*-Transkripten in den Cyclopaminkulturen detektiert werden. Dies deutet auf eine verminderte Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges hin, da die Expression von *AXIN2* als Aktivitätsparameter für diesen genutzt werden kann (Jho et al, 2002). Studien konnten zeigen, dass ein aktivierter kanonischer Wnt-Signalweg zur

verzögerten Differenzierung vorhandener unreifer Oligodendrozyten in reife Zelltypen durch Verhinderung der entsprechend benötigten Reifungsschritte führt (Feigenson et al, 2009). Dies würde erklären, dass die oligodendrogliale Spezifikation der RGL-NPC unter Cyclopaminbehandlung unbeeinflusst erscheint, aber eine verbesserte Reifung durch Unterdrückung der inhibitorischen Einflüsse des Wnt-Signalweges auf die terminale Reifung oligodendroglialer Vorläuferzellen ermöglicht wird.

Bei der Betrachtung der Expression von Genen des BMP-Signalweges kann weiterhin beobachtet werden, dass sich durch die Behandlung der RGL-NPC mit Cyclopamin während der oligodendroglialen Differenzierung keine Veränderungen der Transkriptmengen des *BMP Rezeptors 1a (BMPR1a)* ergaben, wodurch nicht von einer modulierten Sensitivität der Kulturen gegenüber BMP ausgegangen werden kann. Allerdings konnten deutliche Verringerungen der Expression von *BMP2* und *BMP4* in den Kulturen gezeigt werden. Es ist bekannt, dass *BMP2* und *BMP4* die Reifung von Oligodendrozyten inhibieren (Cheng et al, 2007). Dieser Effekt wird vermittelt über eine verstärkte Expression der Proteine Inhibitor der Differenzierung 2 und 4 (*ID2/4*) sowie über die Suppression der Expression der Transkriptionsfaktoren *OLIG1* und *OLIG2* (Chen et al, 2012; Cheng et al, 2007). Auch in den oligodendroglialen RGL-NPC-Kulturen konnte nach Behandlung mit Cyclopamin eine verringerte Expression von *ID2* und *ID4* detektiert werden. Somit könnte durch eine verminderte Expression von *BMP2/4* in den Kulturen eine heruntergesetzte Aktivität des BMP-Signalweg bewirkt werden. Diese könnte die Expression von *ID2/4* verringern und somit eine verstärkte Expression von *OLIG1* ermöglichen, welche essenziell ist für die Expression von Myelinen wie beispielsweise *MBP* (Xin et al, 2005). In Kulturen differenzierender NSC werden BMPs von Astrozyten und Neuronen exprimiert (Chang et al, 2003; Hu et al, 2012; Wang et al, 2011). Um zu überprüfen, ob Cyclopamin einen Einfluss auf den BMP/Wnt-Signalweg der Astrozyten und Neurone in den oligodendroglialen RGL-NPC-Kulturen ausübt oder auf die Oligodendrozyten selbst müssten reine oligodendrogliale Kulturen mit Cyclopamin behandelt, untersucht und mit den Standardkulturen verglichen werden.

Aus der Literatur sind Wechselwirkungen zwischen dem Wnt- und BMP-Signalweg bekannt. Zum einen wurde beschrieben, dass ein aktivierter Wnt-Signalweg die Expression von BMP induzieren kann (Kasai et al, 2005). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass ein inaktivierter BMP-Signalweg sowohl die Expression von Wnt als auch der ID Proteine verringert (Wine-Lee et al, 2004) und die Expression der ID Proteine sowohl durch den BMP- als auch Wnt-Signalweg beeinflussbar ist (Hollnagel et al, 1999; Rockman et al, 2001). Kürzlich wurde durch die Beschreibung des SMAD-interagierenden Proteins 1 (*SIP1*) ein weiterer Zusammenhang zwischen dem Wnt- und BMP-Signalweg hergestellt, welcher einen Einfluss auf die

Myelinisierung nimmt (Weng et al, 2012). SIP1 reprimiert dabei die inhibitorischen Auswirkungen des BMP-Signalweges und aktiviert das Protein SMAD7, welches die Myelinisierung durch Hemmung sowohl des BMP- als auch Wnt-Signalweges fördert. Die Betrachtung der Expression von *SIP1* und *SMAD7* in den oligodendroglialen RGL-NPC-Differenzierungen nach Cyclopaminbehandlung zeigte hingegen geringfügig verringerte Transkriptmengen für beide Gene. Da SMAD7 ein direkt durch SIP1 reguliertes Gen ist (Weng et al, 2012) könnte hier ein Zusammenhang gesehen werden. Da gezeigt werden konnte, dass SIP1 direkt mit ID Proteinen interagieren kann (Weng et al, 2012), könnte die verringerte Transkriptmenge von SIP1 und infolgedessen die niedrigere Expression von SMAD7 in den cyclopaminbehandelten Kulturen mit der verringerten Aktivität des BMP-Signalweges korrelieren.

Abschließend kann in Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, welcher Signalweg durch die Behandlung der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC mit Cyclopamin beeinflusst wurde und welche Veränderungen in RGL-NPC-Kulturen sich als Folgewirkungen daraus ergaben. Die Tatsache, dass die auf die terminale Oligodendrozytendifferenzierung inhibierend wirkenden Signalwege Notch, BMP und Wnt in den Standardkulturen der oligodendroglialen RGL-NPC-Differenzierung aktiviert scheinen und eine Behandlung mit Cyclopamin die Aktivität des BMP- und Wnt-Signalweges scheinbar verringert und eine erhöhte Expression der Myelogene *MBP*, *MAG* und *MOG* hervorruft, könnte eine Möglichkeit bieten, durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der genannten Signalwege während der terminalen oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC ein reifungs- sowie myelinisierungsförderndes Differenzierungsmedium abzuleiten. Ein solches Medium könnte die Untersuchung der terminalen oligodendroglialen Differenzierung *in vitro* erlauben und Einblicke in Myelinisierungsprozesse ermöglichen. Dies erscheint vor allem im Hinblick auf die Untersuchung patientenspezifischer iPSC-abgeleiteter RGL-NPC im Rahmen myelinassoziierter Erkrankungen wie beispielsweise der Metachromatischen Leukodystrophie oder der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung essenziell.

4.3 RGL-NPC als Alternative zu etablierten oligodendroglialen Differenzierungsprotokollen für pluripotente Stammzellen?

Die Gewinnung humaner Oligodendrozyten zur Untersuchung der oligodendroglialen Entwicklung stellt trotz der publizierten Differenzierungsprotokolle immer noch eine Herausforderung dar. Der bislang gewählte Weg führte dabei über die direkte, ununterbrochene Differenzierung humaner PSC in oligodendrogliale Vorläuferzellen sowie

Oligodendrozyten (Douvaras et al, 2014; Hu et al, 2009a; Izrael et al, 2007; Nistor et al, 2005; Piao et al, 2015; Wang et al, 2013b). Diese Differenzierungsparadigmen führen über lange Zeiträume hinweg ohne einen stabil kultivierbaren Zwischenschritt zu den gewünschten Zellen. Dabei ist die Zuverlässigkeit und die Effizienz der Differenzierung abhängig von der Qualität der pluripotenten Stammzellkulturen, die aufgrund kleiner Abweichungen bereits deutlich schwanken kann (Fu & Xu, 2011; Tompkins et al, 2012). Weiterhin durchlaufen die Zellen in der Entwicklung von pluripotenten Stammzellen zu Oligodendrozyten diverse Vorläuferstadien, welche in den bisherigen Studien nicht identifiziert und charakterisiert wurden, aber Aufschluss über den Verlauf der Differenzierung sowie die Qualität der Kulturen geben könnten. Zusätzlich ist die großformatige Kultur humaner PSC und deren anschließende Differenzierung vor allem im Hinblick auf die Nutzung der Zellen für großangelegte Medikamentenscreenings oder potenzielle klinische Anwendungen eine große Aufgabe.

Die in dieser Arbeit gewählte Strategie der Erzeugung einer Population von RGL-NPC als Zwischenschritt in der Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu Oligodendrozyten umgeht dabei mehrere der erwähnten Schwierigkeiten. Durch eine initiale Differenzierungsphase von ungefähr 40 Tagen wird die Etablierung einer robust proliferierenden, über viele Passagen hinweg sowohl im Expressionsprofil als auch Differenzierungsverhalten stabilen NPC-Population als Quelle humaner oligodendroglialer Zellen ermöglicht, die nach Bedarf eingefroren und wieder aufgetaut werden kann. Das neurale Differenzierungsschema lässt sich dabei problemlos von unterschiedlichen Linien humaner ESC auf iPSC übertragen und eröffnet somit einen Zugang auch zu patientenspezifischen iPSC als Ausgangspunkt für krankheitsassoziierte Untersuchungen. Die intensive Charakterisierung der RGL-NPC stellt eine Grundlage zur Qualitätskontrolle sowohl für die laufende Kultur etablierter als auch für nachfolgend neu generierte RGL-NPC-Populationen dar. Ausgehend von etablierten RGL-NPC-Kulturen können neben Neuronen und Astrozyten durch Anwendung des spezifischen oligodendroglialen Differenzierungsprotokolles in einer Differenzierungszeit von 7-10 Wochen robust und effizient oligodendrogliale Zellen generiert werden, welche ein deutliches Myelinisierungspotenzial *in vivo* zeigen. Die adhärent durchgeführte oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPC ermöglicht zusätzlich jederzeit eine optische Kontrolle der Differenzierung. Die weitreichende Charakterisierung des Expressionsprofils der RGL-NPC ermöglicht weiterhin die Analyse einer verändert ablaufenden oligodendroglialen Entwicklung. Dies könnte beispielsweise im Rahmen von Untersuchungen an RGL-NPC geschehen, welche aus krankheitsspezifischen iPSC von Patienten mit einer myelinassoziierten Erkrankung gewonnen wurden. Zusätzlich können die RGL-NPC genutzt werden, um einen tieferen

Einblick in die humane Oligodendrogenese sowie oligodendrogliale Entwicklung zu erlangen. Darüber hinaus kann durch die robuste Proliferation und Anwendbarkeit der RGL-NPC über viele Passagen hinweg eine Kultur in großen Formaten zur Anwendung in Medikamentenstudien erreicht werden. Im Zusammenspiel mit der Etablierung patientenspezifischer iPSC könnten die RGL-NPC somit als Grundlage für die Untersuchung sowie Modulation und Behandlung oligodendrozytenassoziierter Erkrankungen *in vitro* eingesetzt werden.

4.4 Perspektiven

In dieser Arbeit wurde die Etablierung radialgliaähnlicher Vorläuferzellen (RGL-NPC) aus humanen ESC sowie iPSC gezeigt. Die RGL-NPC weisen neben einem tripotenten Differenzierungsverhalten ein starkes oligodendrogliales Entwicklungspotenzial auf und können *in vivo* in myelinisierende Oligodendrozyten differenzieren. Unter Anwendung des hier entwickelten spezifischen Differenzierungsprotokolles konnten aus den RGL-NPC effizient Oligodendrozyten und deren Vorläufer generiert werden, welche eingehend charakterisiert wurden. Diese Zellen können ein interessantes und wertvolles Instrument für die Analyse der humanen Oligodendrogenese sowie Untersuchungen im Rahmen von krankheitsassozierten Studien sowie der Medikamentenentwicklung darstellen.

Im Gegensatz zur murinen Oligodendrogenese ist die Entwicklung der Oligodendrozyten im Menschen aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit ausreichender Zellmengen guter Qualität bei weitem nicht so ausführlich untersucht. RGL-NPC können durch ihre robuste Kultur eine zuverlässige Quelle für humane oligodendrogliale Zellen *in vitro* bieten, wodurch deren Entwicklung detaillierter untersucht werden kann. Die weitreichende Charakterisierung der oligodendroglialen Differenzierung der RGL-NPC bietet eine stabile Basis zur Untersuchung endo- und exogener Einflüsse. Eine erste Betrachtung der Rolle des SHH-, Notch-, Wnt- und BMP-Signalweges zeigte deren mögliche Beteiligung an der Regulation der Reifung der RGL-NPC-abgeleiteten Oligodendrozyten, welche tiefergehend analysiert werden sollte. Der Einsatz spezifischer Inhibitoren der Signalwege könnte weiteren Aufschluss über die Regulation der humanen oligodendroglialen Entwicklung liefern. Zusätzlich bieten die ersten Untersuchungen zur Rolle von miRNAs während der Oligodendrozytenentwicklung in dieser Arbeit die Perspektive, den regulatorischen Einfluss unterschiedlicher miRNAs im Rahmen der glialen Differenzierung weiter zu beleuchten.

Die Etablierung hiPSC-abgeleiteter RGL-NPC-Linien bietet darüber hinaus einen sehr attraktiven Zugang zu patientenspezifischen Zellen. Auf diesem Wege könnte vergleichbar zu

Studien an neuronenasoziierten Erkrankungen wie beispielsweise der Machado-Joseph-Erkrankung (Koch et al, 2011) die Entwicklung von humanen, oligodendrozytenassoziierten Krankheitsmodellen *in vitro*, z.B. des Canavan-Syndroms oder der Metachromatischen Leukodystrophie, erreicht werden. Diese Modelle könnten als Ausgangspunkt sowohl für krankheitsmodellierende Untersuchungen als auch für potenzielle Medikamentenstudien genutzt werden.

5 Literaturverzeichnis

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* **26**(11): 1276-1284

Agarwal S, Holton KL, Lanza R (2008) Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* **26**(5): 1117-1127

Aguirre A, Dupree JL, Mangin JM, Gallo V (2007) A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat Neurosci* **10**(8): 990-1002

Alvarez-Buylla A, Ihrie RA (2014) Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Semin Cell Dev Biol* **33**: 105-111

Arber C, Li M (2013) Cortical interneurons from human pluripotent stem cells: prospects for neurological and psychiatric disease. *Front Cell Neurosci* **7**: 10

Armstrong RC, Kim JG, Hudson LD (1995) Expression of myelin transcription factor I (MyTI), a "zinc-finger" DNA-binding protein, in developing oligodendrocytes. *Glia* **14**(4): 303-321

Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJ, Stiles CD (2004) bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science* **306**(5704): 2111-2115

Asakura K, Hunter SF, Rodriguez M (1997) Effects of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor on oligodendrocyte precursors: insights gained from a neuronal cell line. *J Neurochem* **68**(6): 2281-2290

Awatramani R, Scherer S, Grinspan J, Collarini E, Skoff R, O'Hagan D, Garbern J, Kamholz J (1997) Evidence that the homeodomain protein Gtx is involved in the regulation of oligodendrocyte myelination. *J Neurosci* **17**(17): 6657-6668

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* **168**(2): 342-357

Bansal R, Kumar M, Murray K, Morrison RS, Pfeiffer SE (1996) Regulation of FGF receptors in the oligodendrocyte lineage. *Mol Cell Neurosci* **7**(4): 263-275

Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N (2011) Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* **9**(1): 17-23

Barbarese E, Pfeiffer SE (1981) Developmental regulation of myelin basic protein in dispersed cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(3): 1953-1957

Barca-Mayo O, Lu QR (2012) Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Front Neurosci* **6**: 13

Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* **70**(1): 31-46

Barres BA, Lazar MA, Raff MC (1994) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* **120**(5): 1097-1108

Barres BA, Raff MC (1994) Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron* **12**(5): 935-942

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2): 281-297

Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**(2): 215-233

Ben-Hur T, Rogister B, Murray K, Rougon G, Dubois-Dalcq M (1998) Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci* **18**(15): 5777-5788

Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**(1): 49-59

Berg G, Schachner M (1981) Immuno-electron-microscopic identification of O-antigen-bearing oligodendroglial cells in vitro. *Cell Tissue Res* **219**(2): 313-325

Bibel M, Richter J, Schrenk K, Tucker KL, Staiger V, Korte M, Goetz M, Barde YA (2004) Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci* **7**(9): 1003-1009

Billon N, Jolicoeur C, Ying QL, Smith A, Raff M (2002) Normal timing of oligodendrocyte development from genetically engineered, lineage-selectable mouse ES cells. *J Cell Sci* **115**(Pt 18): 3657-3665

Blau HM, Chiu CP, Webster C (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* **32**(4): 1171-1180

Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M (1990) Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16): 6368-6372

Borghese L, Dolezalova D, Opitz T, Haupt S, Leinhaas A, Steinfarz B, Koch P, Edenhofer F, Hampl A, Brustle O (2010) Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo. *Stem Cells* **28**(5): 955-964

Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**(4): 435-445

Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* **285**(5428): 754-756

- Buchet D, Baron-Van Evercooren A (2009) In search of human oligodendroglia for myelin repair. *Neurosci Lett* **456**(3): 112-119
- Bunge MB, Bunge RP, Pappas GD (1962) Electron microscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing mammalian central nervous system. *J Cell Biol* **12**: 448-453
- Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M, Qiu M (2005) Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron* **45**(1): 41-53
- Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X, Guo Y, Ding M, Deng H (2007) Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* **45**(5): 1229-1239
- Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, Sotnikova TD, Menegon A, Roncaglia P, Colciago G, Russo G, Carninci P, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Gustinich S, Dityatev A, Broccoli V (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* **476**(7359): 224-227
- Casper KB, McCarthy KD (2006) GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. *Mol Cell Neurosci* **31**(4): 676-684
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, 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**(3): 275-280
- Chandran S, Compston A, Jauniaux E, Gilson J, Blakemore W, Svendsen C (2004) Differential generation of oligodendrocytes from human and rodent embryonic spinal cord neural precursors. *Glia* **47**(4): 314-324
- Chang MY, Son H, Lee YS, Lee SH (2003) Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively. *Mol Cell Neurosci* **23**(3): 414-426
- Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, Beachy PA (2002) Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14071-14076
- Chen XS, Zhang YH, Cai QY, Yao ZX (2012) ID2: A negative transcription factor regulating oligodendroglia differentiation. *J Neurosci Res* **90**(5): 925-932
- Cheng X, Wang Y, He Q, Qiu M, Whittemore SR, Cao Q (2007) Bone morphogenetic protein signaling and olig1/2 interact to regulate the differentiation and maturation of adult oligodendrocyte precursor cells. *Stem Cells* **25**(12): 3204-3214
- Chiang YH, Silani V, Zhou FC (1996) Morphological differentiation of astroglial progenitor cells from EGF-responsive neurospheres in response to fetal calf serum, basic fibroblast growth factor, and retinol. *Cell Transplant* **5**(2): 179-189
- Cohen MA, Itsykson P, Reubinoff BE (2010) The role of FGF-signaling in early neural specification of human embryonic stem cells. *Dev Biol* **340**(2): 450-458

- Cohen RI, McKay R, Almazan G (1999) Cyclic AMP regulates PDGF-stimulated signal transduction and differentiation of an immortalized optic-nerve-derived cell line. *J Exp Biol* **202**(Pt 4): 461-473
- Colognato H, Baron W, Avellana-Adalid V, Relvas JB, Baron-Van Evercooren A, Georges-Labouesse E, French-Constant C (2002) CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nat Cell Biol* **4**(11): 833-841
- Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, Sun Y, Sanzone S, Ying QL, Cattaneo E, Smith A (2005) Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* **3**(9): e283
- Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Donadoni C, Salani S, Rizzo F, Nardini M, Riboldi G, Magri F, Zanetta C, Faravelli I, Bresolin N, Comi GP (2012) Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res* **318**(13): 1528-1541
- Csiza CK, de Lahunta A (1979) Myelin deficiency (md): a neurologic mutant in the Wistar rat. *Am J Pathol* **95**(1): 215-224
- Czopka T, Hennen E, von Holst A, Faissner A (2009) Novel conserved oligodendrocyte surface epitope identified by monoclonal antibody 4860. *Cell Tissue Res* **338**(2): 161-170
- de Faria O, Jr., Cui QL, Bin JM, Bull SJ, Kennedy TE, Bar-Or A, Antel JP, Colman DR, Dhaunchak AS (2012) Regulation of miRNA 219 and miRNA Clusters 338 and 17-92 in Oligodendrocytes. *Front Genet* **3**: 46
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**(5893): 1218-1221
- Douvaras P, Wang J, Zimmer M, Hanchuk S, O'Bara MA, Sadiq S, Sim FJ, Goldman J, Fossati V (2014) Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **3**(2): 250-259
- Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, Emery B, Zamanian JL, Foo LC, McManus MT, Barres BA (2010) Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* **65**(5): 597-611
- Dugas JC, Notterpek L (2011) MicroRNAs in oligodendrocyte and Schwann cell differentiation. *Dev Neurosci* **33**(1): 14-20
- Duncan ID (1995) *Inherited disorders of myelin of the central nervous system*, Cambridge: Oxford University Press.
- Duncan ID, Kondo Y, Zhang SC (2011) The myelin mutants as models to study myelin repair in the leukodystrophies. *Neurotherapeutics* **8**(4): 607-624
- Durand B, Raff M (2000) A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays* **22**(1): 64-71

- Einheber S, Zanazzi G, Ching W, Scherer S, Milner TA, Peles E, Salzer JL (1997) The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J Cell Biol* **139**(6): 1495-1506
- Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L (2008) Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* **22**(2): 152-165
- Emdad L, D'Souza SL, Kothari HP, Qadeer ZA, Germano IM (2012) Efficient differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells into functional astrocytes. *Stem Cells Dev* **21**(3): 404-410
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**(5819): 154-156
- Fainsod A, Deissler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G, Steinbeisser H, Blum M (1997) The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech Dev* **63**(1): 39-50
- Falk A, Koch P, Kesavan J, Takashima Y, Ladewig J, Alexander M, Wiskow O, Tailor J, Trotter M, Pollard S, Smith A, Brustle 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**(1): e29597
- Fancy SP, Baranzini SE, Zhao C, Yuk DI, Irvine KA, Kaing S, Sanai N, Franklin RJ, Rowitch DH (2009) Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev* **23**(13): 1571-1585
- Feigenson K, Reid M, See J, Crenshaw EB, 3rd, Grinspan JB (2009) Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation. *Mol Cell Neurosci* **42**(3): 255-265
- Feigenson K, Reid M, See J, Crenshaw IE, Grinspan JB (2011) Canonical Wnt signalling requires the BMP pathway to inhibit oligodendrocyte maturation. *ASN Neuro* **3**(3): e00061
- Feijoo CG, Onate MG, Milla LA, Palma VA (2011) Sonic hedgehog (Shh)-Gli signaling controls neural progenitor cell division in the developing tectum in zebrafish. *Eur J Neurosci* **33**(4): 589-598
- Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, Honig GR, Kim KS, Lanza R (2010) Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* **28**(4): 704-712
- Finzsch M, Stolt CC, Lommes P, Wegner M (2008) Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression. *Development* **135**(4): 637-646
- Fogarty M, Richardson WD, Kessaris N (2005) A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development* **132**(8): 1951-1959
- Frank M (2000) MAL, a proteolipid in glycosphingolipid enriched domains: functional implications in myelin and beyond. *Prog Neurobiol* **60**(6): 531-544

- Frost EE, Buttery PC, Milner R, French-Constant C (1999) Integrins mediate a neuronal survival signal for oligodendrocytes. *Curr Biol* **9**(21): 1251-1254
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Bostrom H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (1999) Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* **126**(3): 457-467
- Fu X, Xu Y (2011) Self-renewal and scalability of human embryonic stem cells for human therapy. *Regen Med* **6**(3): 327-334
- Fuccillo M, Joyner AL, Fishell G (2006) Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* **7**(10): 772-783
- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**(8): 348-362
- Ganat YM, Calder EL, Kriks S, Nelander J, Tu EY, Jia F, Battista D, Harrison N, Parmar M, Tomishima MJ, Rutishauser U, Studer L (2012) Identification of embryonic stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons for engraftment. *J Clin Invest* **122**(8): 2928-2939
- Gao FB, Durand B, Raff M (1997) Oligodendrocyte precursor cells count time but not cell divisions before differentiation. *Curr Biol* **7**(2): 152-155
- Garbern JY (2007) Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* **64**(1): 50-65
- Glaser T, Pollard SM, Smith A, Brustle O (2007) Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PLoS One* **2**(3): e298
- Gomez-Skarmeta JL, Campuzano S, Modolell J (2003) Half a century of neural pre patterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat Rev Neurosci* **4**(7): 587-598
- Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A (2011) Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev* **67**(1-2): 147-156
- Gottle P, Kremer D, Jander S, Odemis V, Engele J, Hartung HP, Kury P (2010) Activation of CXCR7 receptor promotes oligodendroglial cell maturation. *Ann Neurol* **68**(6): 915-924
- Graf T (2011) Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell* **9**(6): 504-516
- Greber B, Coulon P, Zhang M, Moritz S, Frank S, Muller-Molina AJ, Arauzo-Bravo MJ, Han DW, Pape HC, Scholer HR (2011) FGF signalling inhibits neural induction in human embryonic stem cells. *EMBO J* **30**(24): 4874-4884
- Greber B, Wu G, Bernemann C, Joo JY, Han DW, Ko K, Tapia N, Sabour D, Sternecker J, Tesar P, Scholer HR (2010) Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **6**(3): 215-226
- Grever WE, Zhang S, Ge B, Duncan ID (1999) Fractionation and enrichment of oligodendrocytes from developing human brain. *J Neurosci Res* **57**(3): 304-314

- Grinspan JB, Edell E, Carpio DF, Beesley JS, Lavy L, Pleasure D, Golden JA (2000) Stage-specific effects of bone morphogenetic proteins on the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol* **43**(1): 1-17
- Gurdon JB (1962) Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol* **4**: 256-273
- Hargus G, Cooper O, Deleidi M, Levy A, Lee K, Marlow E, Yow A, Soldner F, Hockemeyer D, Hallett PJ, Osborn T, Jaenisch R, Isacson O (2010) Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(36): 15921-15926
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* **229**(1): 15-30
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Gotz M (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* **5**(4): 308-315
- Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A (1999) Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem* **274**(28): 19838-19845
- Hu BY, Du ZW, Li XJ, Ayala M, Zhang SC (2009a) Human oligodendrocytes from embryonic stem cells: conserved SHH signaling networks and divergent FGF effects. *Development* **136**(9): 1443-1452
- Hu BY, Du ZW, Zhang SC (2009b) Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **4**(11): 1614-1622
- Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, Zhang SC (2010a) Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(9): 4335-4340
- Hu BY, Zhang SC (2009) Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* **4**(9): 1295-1304
- Hu JG, Fu SL, Wang YX, Li Y, Jiang XY, Wang XF, Qiu MS, Lu PH, Xu XM (2008) Platelet-derived growth factor-AA mediates oligodendrocyte lineage differentiation through activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Neuroscience* **151**(1): 138-147
- Hu JG, Zhang YX, Qi Q, Wang R, Shen L, Zhang C, Xi J, Zhou JS, Lu HZ (2012) Expression of BMP-2 and BMP-4 proteins by type-1 and type-2 astrocytes induced from neural stem cells under different differentiation conditions. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **72**(1): 95-101
- Hu Q, Friedrich AM, Johnson LV, Clegg DO (2010b) Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. *Stem Cells* **28**(11): 1981-1991
- Huang JK, Jarjour AA, Nait Oumesmar B, Kerninon C, Williams A, Krezel W, Kagechika H, Bauer J, Zhao C, Evercooren AB, Chambon P, Ffrench-Constant C, Franklin RJ (2011) Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat Neurosci* **14**(1): 45-53

- Huttner WB, Brand M (1997) Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol* **7**(1): 29-39
- Ibarrola N, Mayer-Proschel M, Rodriguez-Pena A, Noble M (1996) Evidence for the existence of at least two timing mechanisms that contribute to oligodendrocyte generation in vitro. *Dev Biol* **180**(1): 1-21
- Ingham PW, Placzek M (2006) Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet* **7**(11): 841-850
- Inoue K (2012) Patient-derived iPS cells for unveiling the molecular pathology of Pelizaeus-Merzbacher disease: a commentary on 'Reduced PLP1 expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus-Merzbacher disease patient with a partial PLP1 duplication'. *J Hum Genet*
- Itsykson P, Ilouz N, Turetsky T, Goldstein RS, Pera MF, Fishbein I, Segal M, Reubinoff BE (2005) Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol Cell Neurosci* **30**(1): 24-36
- Izrael M, Zhang P, Kaufman R, Shinder V, Ella R, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Chebath J, Revel M (2007) Human oligodendrocytes derived from embryonic stem cells: Effect of noggin on phenotypic differentiation in vitro and on myelination in vivo. *Mol Cell Neurosci* **34**(3): 310-323
- Jain M, Armstrong RJ, Tyers P, Barker RA, Rosser AE (2003) GABAergic immunoreactivity is predominant in neurons derived from expanded human neural precursor cells in vitro. *Exp Neurol* **182**(1): 113-123
- Jakovcevski I, Zecevic N (2005) Olig transcription factors are expressed in oligodendrocyte and neuronal cells in human fetal CNS. *J Neurosci* **25**(44): 10064-10073
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**(1): 20-29
- Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F (2002) Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* **22**(4): 1172-1183
- Joubert L, Foucault I, Sagot Y, Bernasconi L, Duval F, Alliod C, Frossard MJ, Pescini Gobert R, Curchod ML, Salvat C, Nichols A, Pouly S, Rommel C, Roach A, Hooft van Huijsduijnen R (2010) Chemical inducers and transcriptional markers of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci Res* **88**(12): 2546-2557
- Juopperi TA, Kim WR, Chiang CH, Yu H, Margolis RL, Ross CA, Ming GL, Song H (2012) Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. *Mol Brain* **5**(1): 17
- Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R (2005) Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* **306**(2): 343-348
- Kasai M, Satoh K, Akiyama T (2005) Wnt signaling regulates the sequential onset of neurogenesis and gliogenesis via induction of BMPs. *Genes Cells* **10**(8): 777-783

- Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O (2005) Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* **25**(19): 4694-4705
- Kessarlis N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* **9**(2): 173-179
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS (2009a) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* **4**(6): 472-476
- Kim J, Ambasudhan R, Ding S (2012) Direct lineage reprogramming to neural cells. *Curr Opin Neurobiol*
- Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Scholer HR (2009b) Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* **461**(7264): 649-643
- Kim S, Kim SH, Kim H, Chung AY, Cha YI, Kim CH, Huh TL, Park HC (2008) Frizzled 8a function is required for oligodendrocyte development in the zebrafish spinal cord. *Dev Dyn* **237**(11): 3324-3331
- Koch P, Breuer P, Peitz M, Jungverdorben J, Kesavan J, Poppe D, Doerr J, Ladewig J, Mertens J, Tuting T, Hoffmann P, Klockgether T, Evert BO, Wullner U, Brustle O (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* **480**(7378): 543-546
- Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brustle 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**(9): 3225-3230
- Kolodny EH (1989) *Metachromatic leukodystrophy and multiple sulfatase deficiency: sulfatide lipidoses*, Vol. 2, 6th edn.
- Komiya Y, Habas R (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**(2): 68-75
- Krencik R, Weick JP, Liu Y, Zhang ZJ, Zhang SC (2011) Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **29**(6): 528-534
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* **32**: 149-184
- Kriegstein AR, Gotz M (2003) Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* **43**(1): 37-43
- Kumar S, Mattan NS, de Vellis J (2006) Canavan disease: a white matter disorder. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **12**(2): 157-165
- Kuspert M, Hammer A, Bosl MR, Wegner M (2011) Olig2 regulates Sox10 expression in oligodendrocyte precursors through an evolutionary conserved distal enhancer. *Nucleic Acids Res* **39**(4): 1280-1293

- Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* **25**(9): 1015-1024
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* **6**(1): 21-27
- Landry M, Bouali-Benazzouz R, El Mestikawy S, Ravassard P, Nagy F (2004) Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* **468**(3): 380-394
- Lau P, Verrier JD, Nielsen JA, Johnson KR, Notterpek L, Hudson LD (2008) Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. *J Neurosci* **28**(45): 11720-11730
- LaVaute TM, Yoo YD, Pankratz MT, Weick JP, Gerstner JR, Zhang SC (2009) Regulation of neural specification from human embryonic stem cells by BMP and FGF. *Stem Cells* **27**(8): 1741-1749
- Lazzarini RA (2004) *Myelin Biology and Disorders*: Elsevier Academic Press.
- Lee H, Shamy GA, Elkabetz Y, Schofield CM, Harrision NL, Panagiotakos G, Socci ND, Tabar V, Studer L (2007) Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells* **25**(8): 1931-1939
- Letzen BS, Liu C, Thakor NV, Gearhart JD, All AH, Kerr CL (2010) MicroRNA expression profiling of oligodendrocyte differentiation from human embryonic stem cells. *PLoS One* **5**(5): e10480
- Li H, de Faria JP, Andrew P, Nitarska J, Richardson WD (2011) Phosphorylation regulates OLIG2 cofactor choice and the motor neuron-oligodendrocyte fate switch. *Neuron* **69**(5): 918-929
- Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, Zhang SC (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **23**(2): 215-221
- Liem KF, Jr., Tremml G, Roelink H, Jessell TM (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**(6): 969-979
- Lin ST, Fu YH (2009) miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination. *Dis Model Mech* **2**(3-4): 178-188
- Lin ST, Huang Y, Zhang L, Heng MY, Ptacek LJ, Fu YH (2013) MicroRNA-23a promotes myelination in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(43): 17468-17473
- Linnington C, Lassmann H (1987) Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol* **17**(1): 61-69
- Liour SS, Yu RK (2003) Differentiation of radial glia-like cells from embryonic stem cells. *Glia* **42**(2): 109-117

- Liu H, Ye Z, Kim Y, Sharkis S, Jang YY (2010) Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* **51**(5): 1810-1819
- Liu JP, Laufer E, Jessell TM (2001) Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* **32**(6): 997-1012
- Liu R, Cai J, Hu X, Tan M, Qi Y, German M, Rubenstein J, Sander M, Qiu M (2003) Region-specific and stage-dependent regulation of Olig gene expression and oligodendrogenesis by Nkx6.1 homeodomain transcription factor. *Development* **130**(25): 6221-6231
- Liu Z, Hu X, Cai J, Liu B, Peng X, Wegner M, Qiu M (2007) Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms. *Dev Biol* **302**(2): 683-693
- Louvi A, Artavanis-Tsakonas S (2006) Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* **7**(2): 93-102
- Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH (2002) Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* **109**(1): 75-86
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH (2000) Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25**(2): 317-329
- Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, Sudhof TC, Wernig M (2012) Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(7): 2527-2532
- Mabie PC, Mehler MF, Marmur R, Papavasiliou A, Song Q, Kessler JA (1997) Bone morphogenetic proteins induce astroglial differentiation of oligodendroglial-astroglial progenitor cells. *J Neurosci* **17**(11): 4112-4120
- Macklin WB, Campagnoni CW, Deininger PL, Gardinier MV (1987) Structure and expression of the mouse myelin proteolipid protein gene. *J Neurosci Res* **18**(3): 383-394
- Maden M (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **8**(10): 755-765
- Massaous J, Hata A (1997) TGF-beta signalling through the Smad pathway. *Trends Cell Biol* **7**(5): 187-192
- McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA (1990) FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* **5**(5): 603-614
- McMorris FA (1983) Cyclic AMP induction of the myelin enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in rat oligodendrocytes. *J Neurochem* **41**(2): 506-515
- Mekki-Dauriac S, Agius E, Kan P, Cochard P (2002) Bone morphogenetic proteins negatively control oligodendrocyte precursor specification in the chick spinal cord. *Development* **129**(22): 5117-5130

- Mikoshiha K, Aruga J, K. I, H. O, Martenson RE (1992) *Shiverer and allelic mutant mld mice*. CRC Press.
- Miller RH (1996) Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci* **19**(3): 92-96
- Miyazono K, Miyazawa K (2002) Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE* **2002**(151): pe40
- Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M (2011) Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* **8**(6): 633-638
- Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M (2001) Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* **31**(5): 757-771
- Mo Z, Moore AR, Filipovic R, Ogawa Y, Kazuhiro I, Antic SD, Zecevic N (2007) Human cortical neurons originate from radial glia and neuron-restricted progenitors. *J Neurosci* **27**(15): 4132-4145
- Mo Z, Zecevic N (2009) Human fetal radial glia cells generate oligodendrocytes in vitro. *Glia* **57**(5): 490-498
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**(6414): 726-730
- Najm FJ, Lager AM, Zaremba A, Wyatt K, Caprariello AV, Factor DC, Karl RT, Maeda T, Miller RH, Tesar PJ (2013) Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol* **31**(5): 426-433
- Nakamura T, Miyamoto O, Toyoshima T, Hirooka K, Kawai N, Shiraga F, Tamiya T, Xi G, Keep RF, Itano T (2008) 3CB2, a marker of radial glia, expression after experimental intracerebral hemorrhage: role of thrombin. *Brain Res* **1226**: 156-162
- Nat R, Nilbratt M, Narkilahti S, Winblad B, Hovatta O, Nordberg A (2007) Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures. *Glia* **55**(4): 385-399
- Neman J, de Vellis J (2012) A method for deriving homogenous population of oligodendrocytes from mouse embryonic stem cells. *Dev Neurobiol* **72**(6): 777-788
- Nery S, Wichterle H, Fishell G (2001) Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* **128**(4): 527-540
- Ng ES, Davis RP, Azzola L, Stanley EG, Elefanty AG (2005) Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* **106**(5): 1601-1603
- Nielsen JA, Berndt JA, Hudson LD, Armstrong RC (2004) Myelin transcription factor 1 (Myt1) modulates the proliferation and differentiation of oligodendrocyte lineage cells. *Mol Cell Neurosci* **25**(1): 111-123

Nishiyama A, Chang A, Trapp BD (1999) NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**(11): 1113-1124

Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB (1996) Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* **43**(3): 299-314

Nistor GI, Totoiu MO, Haque N, Carpenter MK, Keirstead HS (2005) Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* **49**(3): 385-396

Niu J, Mei F, Wang L, Liu S, Tian Y, Mo W, Li H, Lu QR, Xiao L (2012) Phosphorylated olig1 localizes to the cytosol of oligodendrocytes and promotes membrane expansion and maturation. *Glia*

Noble M, Murray K (1984) Purified astrocytes promote the in vitro division of a bipotential glial progenitor cell. *EMBO J* **3**(10): 2243-2247

Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P (1988) Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* **333**(6173): 560-562

Noll E, Miller RH (1993) Oligodendrocyte precursors originate at the ventral ventricular zone dorsal to the ventral midline region in the embryonic rat spinal cord. *Development* **118**(2): 563-573

Novitsch BG, Chen AI, Jessell TM (2001) Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* **31**(5): 773-789

Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G, 2nd, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA (2003) Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* **9**(4): 439-447

Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H (2004) Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* **275**(1): 124-142

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**(7151): 313-317

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**(5903): 949-953

Ono K, Tsumori T, Yokota S, Yasui Y (2001) Extensive proliferation of oligodendrocyte precursors in the parenchyma of the embryonic chick central nervous system. *Dev Biol* **231**(1): 77-86

Orentas DM, Hayes JE, Dyer KL, Miller RH (1999) Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* **126**(11): 2419-2429

Othman A, Frim DM, Polak P, Vujicic S, Arnason BG, Boullerne AI (2011) Olig1 is expressed in human oligodendrocytes during maturation and regeneration. *Glia* **59**(6): 914-926

Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, Citri A, Sebastiano V, Marro S, Sudhof TC, Wernig M (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* **476**(7359): 220-223

Park HC, Appel B (2003) Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification. *Development* **130**(16): 3747-3755

Pasca di Magliano M, Hebrok M (2003) Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* **3**(12): 903-911

Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12543-12548

Pfenninger CV, Roschupkina T, Hertwig F, Kottwitz D, Englund E, Bengzon J, Jacobsen SE, Nuber UA (2007) CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res* **67**(12): 5727-5736

Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, Wood J, Nelander J, Dufour A, Bjorklund A, Lindvall O, Jakobsson J, Parmar M (2011) Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(25): 10343-10348

Piao J, Major T, Auyeung G, Policarpio E, Menon J, Droms L, Gutin P, Uryu K, Tchiew J, Soulet D, Tabar V (2015) Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors remyelinate the brain and rescue behavioral deficits following radiation. *Cell Stem Cell* **16**(2): 198-210

Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM (1996) Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**(4): 589-598

Pinto L, Gotz M (2007) Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol* **83**(1): 2-23

Plachta N, Bibel M, Tucker KL, Barde YA (2004) Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells. *Development* **131**(21): 5449-5456

Plaisant M, Giorgetti-Peraldi S, Gabrielson M, Loubat A, Dani C, Peraldi P (2011) Inhibition of hedgehog signaling decreases proliferation and clonogenicity of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* **6**(2): e16798

Poltorak M, Sadoul R, Keilhauer G, Landa C, Fahrig T, Schachner M (1987) Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J Cell Biol* **105**(4): 1893-1899

Pouya A, Satarian L, Kiani S, Javan M, Baharvand H (2011) Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination. *PLoS One* **6**(11): e27925

- Prada FA, Dorado ME, Quesada A, Prada C, Schwarz U, de la Rosa EJ (1995) Early expression of a novel radial glia antigen in the chick embryo. *Glia* **15**(4): 389-400
- Pringle NP, Richardson WD (1993) A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* **117**(2): 525-533
- Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J, Fu H, Rao M, Sussel L, Rubenstein J, Qiu M (2001) Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* **128**(14): 2723-2733
- Qiang L, Fujita R, Yamashita T, Angulo S, Rhinn H, Rhee D, Doege C, Chau L, Aubry L, Vanti WB, Moreno H, Abeliovich A (2011) Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons. *Cell* **146**(3): 359-371
- Qiu M, Shimamura K, Sussel L, Chen S, Rubenstein JL (1998) Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. *Mech Dev* **72**(1-2): 77-88
- Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD (1988) Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* **333**(6173): 562-565
- Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* **303**(5916): 390-396
- Raible DW, McMorris FA (1989) Cyclic AMP regulates the rate of differentiation of oligodendrocytes without changing the lineage commitment of their progenitors. *Dev Biol* **133**(2): 437-446
- Rakic S, Zecevic N (2003) Early oligodendrocyte progenitor cells in the human fetal telencephalon. *Glia* **41**(2): 117-127
- Ranscht B, Clapshaw PA, Price J, Noble M, Seifert W (1982) Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(8): 2709-2713
- Rapacioli M, Botelho J, Cerda G, Duarte S, Elliot M, Palma V, Flores V (2012) Sonic hedgehog (Shh)/Gli modulates the spatial organization of neuroepithelial cell proliferation in the developing chick optic tectum. *BMC Neurosci* **13**(1): 117
- Relucio J, Menezes MJ, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Colognato H (2012) Laminin regulates postnatal oligodendrocyte production by promoting oligodendrocyte progenitor survival in the subventricular zone. *Glia* **60**(10): 1451-1467
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**(5052): 1707-1710
- Richardson WD, Kessaris N, Pringle N (2006) Oligodendrocyte wars. *Nat Rev Neurosci* **7**(1): 11-18

- Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermark B, Dubois-Dalcq M (1988) A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* **53**(2): 309-319
- Richardson WD, Pringle NP, Yu WP, Hall AC (1997) Origins of spinal cord oligodendrocytes: possible developmental and evolutionary relationships with motor neurons. *Dev Neurosci* **19**(1): 58-68
- Ring KL, Tong LM, Balestra ME, Javier R, Andrews-Zwilling Y, Li G, Walker D, Zhang WR, Kreitzer AC, Huang Y (2012) Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell* **11**(1): 100-109
- Robinton DA, Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* **481**(7381): 295-305
- Rockman SP, Currie SA, Ciavarella M, Vincan E, Dow C, Thomas RJ, Phillips WA (2001) Id2 is a target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J Biol Chem* **276**(48): 45113-45119
- Rowitch DH, B SJ, Lee SM, Flax JD, Snyder EY, McMahon AP (1999) Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci* **19**(20): 8954-8965
- Roy NS, Wang S, Harrison-Restelli C, Benraiss A, Fraser RA, Gravel M, Braun PE, Goldman SA (1999) Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci* **19**(22): 9986-9995
- Roybon L, Lamas NJ, Garcia-Diaz A, Yang EJ, Sattler R, Jackson-Lewis V, Kim YA, Kachel CA, Rothstein JD, Przedborski S, Wichterle H, Henderson CE (2013) Human stem cell-derived spinal cord astrocytes with defined mature or reactive phenotypes. *Cell Rep* **4**(5): 1035-1048
- Salzer JL (1997) Clustering sodium channels at the node of Ranvier: close encounters of the axon-glia kind. *Neuron* **18**(6): 843-846
- Samanta J, Kessler JA (2004) Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development* **131**(17): 4131-4142
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* **182**(3): 311-322
- See J, Zhang X, Eraydin N, Mun SB, Mamontov P, Golden JA, Grinspan JB (2004) Oligodendrocyte maturation is inhibited by bone morphogenetic protein. *Mol Cell Neurosci* **26**(4): 481-492
- See JM, Grinspan JB (2009) Sending mixed signals: bone morphogenetic protein in myelination and demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**(6): 595-604
- Shaltouki A, Peng J, Liu Q, Rao MS, Zeng X (2013) Efficient generation of astrocytes from human pluripotent stem cells in defined conditions. *Stem Cells* **31**(5): 941-952

- Shiga H, Asou H, Ito E (2005) Advancement of differentiation of oligodendrocyte progenitor cells by a cascade including protein kinase A and cyclic AMP-response element binding protein. *Neurosci Res* **53**(4): 436-441
- Shimizu T, Kagawa T, Wada T, Muroyama Y, Takada S, Ikenaka K (2005) Wnt signaling controls the timing of oligodendrocyte development in the spinal cord. *Dev Biol* **282**(2): 397-410
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, et al. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**(5): 855-867
- Sim FJ, McClain CR, Schanz SJ, Protack TL, Windrem MS, Goldman SA (2011) CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol* **29**(10): 934-941
- Simon HH, Saueressig H, Wurst W, Goulding MD, O'Leary DD (2001) Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *J Neurosci* **21**(9): 3126-3134
- Sommer I, Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* **83**(2): 311-327
- Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, Toma JS, Rafuse VF, Woolf CJ, Eggan K (2011) Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* **9**(3): 205-218
- Song B, Sun G, Herszfeld D, Sylvain A, Campanale NV, Hirst CE, Caine S, Parkinson HC, Tonta MA, Coleman HA, Short M, Ricardo SD, Reubinoff B, Bernard CC (2012) Neural differentiation of patient specific iPS cells as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis. *Stem Cell Res* **8**(2): 259-273
- Southwood C, He C, Garbern J, Kamholz J, Arroyo E, Gow A (2004) CNS myelin paranodes require Nkx6-2 homeoprotein transcriptional activity for normal structure. *J Neurosci* **24**(50): 11215-11225
- Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**(5903): 945-949
- Stockhausen MT, Kristoffersen K, Poulsen HS (2011) Notch signaling and brain tumors. *Adv Exp Med Biol* **727**: 289-304
- Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier MC, Schedl A, Wegner M (2003) The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev* **17**(13): 1677-1689
- Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U, Wegner M (2002) Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* **16**(2): 165-170
- 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**(2): 245-258

- Sundberg M, Hyysalo A, Skottman H, Shin S, Vemuri M, Suuronen R, Narkilahti S (2011) A xeno-free culturing protocol for pluripotent stem cell-derived oligodendrocyte precursor cell production. *Regen Med* **6**(4): 449-460
- Swistowski A, Peng J, Liu Q, Mali P, Rao MS, Cheng L, Zeng X (2010) Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions. *Stem Cells* **28**(10): 1893-1904
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**(5): 861-872
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**(4): 663-676
- Takazawa T, Croft GF, Amoroso MW, Studer L, Wichterle H, Macdermott AB (2012) Maturation of spinal motor neurons derived from human embryonic stem cells. *PLoS One* **7**(7): e40154
- Tamaki S, Eckert K, He D, Sutton R, Doshe M, Jain G, Tushinski R, Reitsma M, Harris B, Tsukamoto A, Gage F, Weissman I, Uchida N (2002) Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res* **69**(6): 976-986
- Tekki-Kessaris N, Woodruff R, Hall AC, Gaffield W, Kimura S, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD (2001) Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* **128**(13): 2545-2554
- Temple S, Raff MC (1986) Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* **44**(5): 773-779
- The Hd Ipsc C (2012) Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Huntington's Disease Show CAG-Repeat-Expansion-Associated Phenotypes. *Cell Stem Cell* **11**(2): 264-278
- Thier M, Worsdorfer P, Lakes YB, Gorris R, Herms S, Opitz T, Seiferling D, Quandel T, Hoffmann P, Nothen MM, Brustle O, Edenhofer F (2012) Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* **10**(4): 473-479
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**(5391): 1145-1147
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7844-7848
- Thomson JA, Odorico JS (2000) Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol* **18**(2): 53-57
- Tompkins JD, Hall C, Chen VC, Li AX, Wu X, Hsu D, Couture LA, Riggs AD (2012) Epigenetic stability, adaptability, and reversibility in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(31): 12544-12549

- Trojanowski JQ, Mantione JR, Lee JH, Seid DP, You T, Inge LJ, Lee VM (1993) Neurons derived from a human teratocarcinoma cell line establish molecular and structural polarity following transplantation into the rodent brain. *Exp Neurol* **122**(2): 283-294
- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14720-14725
- Utikal J, Maherali N, Kulalert W, Hochedlinger K (2009) Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* **122**(Pt 19): 3502-3510
- Vallstedt A, Klos JM, Ericson J (2005) Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* **45**(1): 55-67
- Vicario-Abejon C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D, McKay RD (1995) Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* **15**(1): 105-114
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**(7284): 1035-1041
- Wang J, O'Bara MA, Pol SU, Sim FJ (2013a) CD133/CD140a-Based Isolation of Distinct Human Multipotent Neural Progenitor Cells and Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Stem Cells Dev*
- Wang S, Bates J, Li X, Schanz S, Chandler-Militello D, Levine C, Maherali N, Studer L, Hochedlinger K, Windrem M, Goldman SA (2013b) Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination. *Cell Stem Cell* **12**(2): 252-264
- Wang S, Sdrulla AD, diSibio G, Bush G, Nofziger D, Hicks C, Weinmaster G, Barres BA (1998) Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **21**(1): 63-75
- Wang Y, Cheng X, He Q, Zheng Y, Kim DH, Whittemore SR, Cao QL (2011) Astrocytes from the contused spinal cord inhibit oligodendrocyte differentiation of adult oligodendrocyte precursor cells by increasing the expression of bone morphogenetic proteins. *J Neurosci* **31**(16): 6053-6058
- Wang Y, Zheng CG, Jiang Y, Zhang J, Chen J, Yao C, Zhao Q, Liu S, Chen K, Du J, Yang Z, Gao S (2012) Genetic correction of beta-thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell Res*
- Wegner M (2008) A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci* **35**(1): 3-12
- Weng Q, Chen Y, Wang H, Xu X, Yang B, He Q, Shou W, Higashi Y, van den Berghe V, Seuntjens E, Kernie SG, Bukshpun P, Sherr EH, Huylebroeck D, Lu QR (2012) Dual-mode modulation of Smad signaling by Smad-interacting protein Sip1 is required for myelination in the central nervous system. *Neuron* **73**(4): 713-728

- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**(3): 385-397
- Wilson HC, Onischke C, Raine CS (2003) Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors. *Glia* **44**(2): 153-165
- Wilson L, Maden M (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* **282**(1): 1-13
- Wilson LJ, Myat A, Sharma A, Maden M, Wingate RJ (2007) Retinoic acid is a potential dorsalisating signal in the late embryonic chick hindbrain. *BMC Dev Biol* **7**: 138
- Windrem MS, Nunes MC, Rashbaum WK, Schwartz TH, Goodman RA, McKhann G, 2nd, Roy NS, Goldman SA (2004) Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* **10**(1): 93-97
- Windrem MS, Roy NS, Wang J, Nunes M, Benraiss A, Goodman R, McKhann GM, 2nd, Goldman SA (2002) Progenitor cells derived from the adult human subcortical white matter disperse and differentiate as oligodendrocytes within demyelinated lesions of the rat brain. *J Neurosci Res* **69**(6): 966-975
- Windrem MS, Schanz SJ, Guo M, Tian GF, Washco V, Stanwood N, Rasband M, Roy NS, Nedergaard M, Havton LA, Wang S, Goldman SA (2008) Neonatal chimerization with human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. *Cell Stem Cell* **2**(6): 553-565
- Wine-Lee L, Ahn KJ, Richardson RD, Mishina Y, Lyons KM, Crenshaw EB, 3rd (2004) Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development* **131**(21): 5393-5403
- Winslow T, Duckwall C. (2001) Techniques for Generating Embryonic Stem Cell Cultures. *Appendix C: Human Embryonic Stem Cells and Human Embryonic Germ Cells*. Stem Cell Information, The National Institutes of Health resource for stem cell research.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**(6488): 341-347
- Wu Y, Liu Y, Levine EM, Rao MS (2003) Hes1 but not Hes5 regulates an astrocyte versus oligodendrocyte fate choice in glial restricted precursors. *Dev Dyn* **226**(4): 675-689
- Xin M, Yue T, Ma Z, Wu FF, Gow A, Lu QR (2005) Myelinogenesis and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in Olig1-null mice. *J Neurosci* **25**(6): 1354-1365
- Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA (2005) Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* **2**(3): 185-190
- Yabut O, Bernstein HS (2011) The promise of human embryonic stem cells in aging-associated diseases. *Aging (Albany NY)* **3**(5): 494-508

Yang N, Zuchero JB, Ahlenius H, Marro S, Ng YH, Vierbuchen T, Hawkins JS, Geissler R, Barres BA, Wernig M (2013) Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nat Biotechnol* **31**(5): 434-439

Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, Lee-Messer C, Dolmetsch RE, Tsien RW, Crabtree GR (2011) MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* **476**(7359): 228-231

Yoon K, Gaiano N (2005) Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* **8**(6): 709-715

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* **324**(5928): 797-801

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**(5858): 1917-1920

Zhang SC (2001) Defining glial cells during CNS development. *Nat Rev Neurosci* **2**(11): 840-843

Zhang SC, Ge B, Duncan ID (2000) Tracing human oligodendroglial development in vitro. *J Neurosci Res* **59**(3): 421-429

Zhang SC, Lundberg C, Lipsitz D, O'Connor LT, Duncan ID (1998) Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells. *J Neurocytol* **27**(7): 475-489

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **19**(12): 1129-1133

Zhang Y, Argaw AT, Gurfein BT, Zameer A, Snyder BJ, Ge C, Lu QR, Rowitch DH, Raine CS, Brosnan CF, John GR (2009) Notch1 signaling plays a role in regulating precursor differentiation during CNS remyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(45): 19162-19167

Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y, Hoang T, Xu X, Mi QS, Xin M, Wang F, Appel B, Lu QR (2010) MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **65**(5): 612-626

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* **4**(5): 381-384

Zhou Q, Anderson DJ (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* **109**(1): 61-73

Zhou Q, Choi G, Anderson DJ (2001) The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* **31**(5): 791-807

Zhou Q, Wang S, Anderson DJ (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* **25**(2): 331-343

Zhu Q, Whittemore SR, Devries WH, Zhao X, Kuypers NJ, Qiu M (2011) Dorsally-derived oligodendrocytes in the spinal cord contribute to axonal myelination during development and remyelination following focal demyelination. *Glia* **59**(11): 1612-1621

Zhu Q, Zhao X, Zheng K, Li H, Huang H, Zhang Z, Mastracci T, Wegner M, Chen Y, Sussel L, Qiu M (2014) Genetic evidence that Nkx2.2 and Pdgfra are major determinants of the timing of oligodendrocyte differentiation in the developing CNS. *Development* **141**(3): 548-555

Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**(4): 599-606

6 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir persönlich, selbständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Die Daten, die im Rahmen einer Kooperation gewonnen wurden, sind ausnahmslos gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen. Diese Dissertation wurde auszugsweise an nachfolgender Stelle publiziert:

Pluripotent stem cell-derived radial glia-like cells as stable intermediate for efficient generation of human oligodendrocytes.

Glia. 2015 Dec;63(12):2152-67. doi: 10.1002/glia.22882

Gorris R, Fischer J, Erwes K L, Kesavan J, Peterson D A, Alexander M, Nöthen M, Peitz M, Quandel T, Karus M und Brüstle O

Bonn, im Juli 2015

Raphaela Gorris