

Untersuchung der astrozytären Pathologie bei Morbus Canavan unter Verwendung induzierter pluripotenter Stammzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Jonas Saal
aus Ulm
2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Oliver Brüstle
2. Gutachter: PD Dr. Matthias Eckhardt, Institut für Biochemie und Molekularbiologie

Tag der Mündlichen Prüfung: 08. September 2021

Aus dem Institut für Rekonstruktive Neurobiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Oliver Brüstle

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Morbus Canavan	9
1.1.1	Geschichte	9
1.1.2	Klinisches Bild	9
1.1.3	Diagnostik	10
1.1.4	Pathologie	11
1.1.5	Humangenetik	12
1.1.6	Mitochondriale Beteiligung	12
1.1.7	Tiermodelle	13
1.1.8	Unterschiede der Pathologie in humanem Gewebe und Tiermodellen	14
1.2	N-acetylaspartat (N-acetylaspartic acid, NAA)	14
1.3	Erklärungsansätze zur Pathophysiologie des Morbus Canavan	20
1.4	Therapeutische Ansätze	21
1.5	Pluripotente Stammzellen	22
1.5.1	Embryonale Stammzellen	22
1.5.2	Induzierte pluripotente Stammzellen	23
1.6	Zelltypen im Zentralnervensystem	24
1.6.1	Neurale Stammzellen und Radiäre Glia	27
1.6.2	Natürliche Differenzierung der Zelltypen im ZNS	29

1.6.3	<i>In vitro</i> Differenzierung der neuronalen Zelltypen des ZNS	32
1.7	Disease Modelling	32
1.7.1	Organoide und Sphäroide	33
1.7.2	Ziel der Arbeit	34
2	Material und Methoden	35
2.1	Material	35
2.1.1	Geräte	35
2.1.2	Software	36
2.1.3	Chemikalien und Zellkulturagentien	37
2.1.4	Plastikware	39
2.1.5	Primer	40
2.1.6	Antikörper	41
2.1.7	Zellkultur	42
2.1.8	Molekularbiologie und Immuncytochemie	47
2.2	Methoden	49
2.2.1	Zellkultur	49
2.2.2	Reprogrammierung	49
2.2.3	Validierung der Pluripotenz der iPSC	50
2.2.4	Validierung der genomischen Integrität der iPSC	50
2.2.5	Kultur humaner induzierter pluripotenter Stammzellen	51
2.2.6	Kryokonservierung	51

2.2.7	Generierung von RGL-NPC aus humanen iPSC	52
2.2.8	Kultur RGL-NPC	53
2.2.9	Differenzierung der RGL-NPC in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten	53
2.2.10	Transfektion mit dem ASPA Vektor	54
2.2.11	Immuncytochemie	55
2.2.12	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS)	56
2.2.13	Isolation von genomischer DNA und mRNA	56
2.2.14	Proteinisolation	58
2.2.15	Messung der Komplex I Aktivität	59
2.2.16	Mikroskopie	59
2.2.17	Auswertung der mikroskopischen Bilder und Statistik	60
2.3	Statistik	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Aus Fibroblasten von CD Patienten lassen sich iPSC herstellen	63
3.1.1	Nachweis pluripotenzassoziierter Gene	64
3.1.2	Erfolgreiche Eliminierung der Transgene	64
3.1.3	Differenzierung der CD-iPSC zu Zellen aller drei Keimblätter	65
3.1.4	Validierung der zytogenetischen Integrität	67
3.2	Generierung von RGL-NPC aus CD-iPSC	68
3.2.1	<i>In vitro</i> Differenzierung von Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten	70
3.2.2	RGL-NPC abgeleitete Astrozyten exprimieren ASPA <i>in vitro</i>	72

3.3	Pathologische Kennzeichen von CD sind <i>in vitro</i> reproduzierbar	74
3.3.1	Lichtmikroskopischer Phänotyp der Mitochondrien	74
3.3.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrien	77
3.3.3	ASPA Überexpression verkleinert die Mitochondrien in CD-Astrozyten	81
3.4	Darstellung des Vakuolisierungsphänotyps in dreidimensionaler Kultur	86
3.5	Phänotypische Unterschiede zu murinen Astrozyten <i>in vitro</i>	91
4	Diskussion	94
4.1	Erfolgreiche Generierung eines CD Krankheitsmodelles	94
4.2	Exogenes NAA verringert die Zellzahl von Astrozyten in Kultur	97
4.3	ASPA Überexpression verringert die Pathologie in CD-Astrozyten	98
4.4	Nachweis des Vakuolisierungsphänotyps in dreidimensionaler Kultur	98
4.5	Hinweis auf Unterschiede zwischen humanen und murinen Astrozyten	99
4.6	Hypothese für die astrozytäre Beteiligung an der Pathogenese von CD	100
5	Zusammenfassung	107
6	Abbildungsverzeichnis	109
7	Literaturverzeichnis	111
8	Danksagung	126

Abkürzungsverzeichnis

AQP	Aquaporin
ASPA	Aspartoacylase
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BLBP	<i>brain lipid-binding protein</i>
BMP	<i>bone morphogenic factor</i>
CD	Morbus Canavan (<i>canavans disease</i>)
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
EB	embryoid body
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EM	Elektronenmikroskop
ES	Embryonale Stammzelle(n)
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GFAP	<i>glial fibrin acid protein</i>
GLAST	Glutamat Aspartat Transporter
GLT1	Glutamat Transporter 1
HN	Hämagglutinin-Neuramidase
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzelle(n) (<i>induced pluripotent stem cell</i>)
KO	Knockout
LIF	<i>leukemia inhibiting factor</i>
Ln	Laminin
MAG	<i>myelin associated protein</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEF	mouse embryonic fibroblast
MOG	<i>myelin oligodendrocyte protein</i>
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
NAA	N-Acetylaspartat

NAAG	N-Acetylaspartylglutamat
Nat8L	N-Acetylaspartat-Synthase
NG2	Neurales/Gliales Antigen 2
NSC	Neurale Stammzelle(n) (<i>neural stem cell</i>)
OPC	<i>oligodendrocyte precursor cell</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF α	<i>platelet-derived growth factor α</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PLP	<i>proteolipid protein</i>
PO	Poly-L-Ornithin
PSC	Pluripotente Stammzelle(n) (<i>pluripotent stem cell</i>)
qPCR	quantitative Echtzeit PCR
RA	Retinsäure (retinoic acid)
RG	Radiale Gliazelle(n)
RGL-NPC	Radial Glia ähnliche neurale Vorläuferzelle(n) (<i>radial-glia like neural stem cell</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROCK Inhibitor	Rho-associated kinase inhibitor Y27632
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SeV	Sendai Virus
SNP	short nuclear polymorphism
SVZ	Subventrikuläre Zone
TE	Trypsin-EDTA
TI	Trypsin Inhibitor
VZ	Ventrikuläre Zone
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Morbus Canavan

1.1.1 Geschichte

Die heute vor allem als Morbus Canavan (CD, *canavan's disease*) bekannte Erkrankung wurde erstmals 1931 von Myrtelle Canavan beschrieben (Canavan, 1931). Als eigenständiges Krankheitsbild wurde sie 1949 von van Bogaert und Bertrand definiert (van Bogaert & Bertrand, 1949). Daher findet sich in der Literatur auch die Bezeichnung „van Bogaert-Bertrand-Erkrankung“ bzw. „spongiforme Degeneration vom van Bogaert-Bertrand Typ“.

Die molekulare Ursache der Erkrankung konnte erst deutlich später aufgeklärt werden. Den ersten Hinweis lieferte die Beobachtung stark erhöhter N-Acetyl-Aspartat (NAA) Spiegel im Urin eines Kindes mit progressiver zerebraler Atrophie. Die bereits damals aufgestellte Hypothese einer verminderten NAA Hydrolyse konnte jedoch initial nicht bestätigt werden. Die Messungen erfolgten am Überstand kultivierter Fibroblasten. Ein Jahr später wurde ein ähnlicher Fall publiziert. Dabei stellte man erstmals einen Zusammenhang zur Aktivität der Aspartoacylase (ASPA), dem Enzym das die Hydrolyse von NAA zu Acetat und Aspartat katalysiert, her. Es gelang den Autoren deutlich verringerte ASPA Aktivitäten in kultivierten Fibroblasten der Patienten zu messen (Hagenfeldt u. a., 1987).

Die Verbindung zu CD wurde 1988 zum ersten Mal hergestellt. Zellen von drei CD Patienten (die Diagnose wurde klinisch und mittels Computertomographie gestellt) wurden kultiviert und auf ASPA Aktivität untersucht. Bei keinem der Patienten war eine Enzymaktivität feststellbar (Matalon u. a., 1988).

Mit der erfolgreichen Klonierung des ASPA Genes im Jahr 1993 (Kaul u. a., 1993a) wurde CD endgültig als monogenetische, autosomal-rezessiv vererbliche Erkrankung definiert.

1.1.2 Klinisches Bild

Dem klinischen Verlauf nach lässt sich die Erkrankung in drei verschiedene Formen einteilen: eine kongenitale, eine infantile und eine juvenile Form. Die Infantile ist dabei die häufigste Form (Adachi u. a., 1973a).

Patienten, die an der kongenitalen Form leiden, werden in den ersten Lebenstagen symptomatisch. Dabei fallen vor allem Lethargie und Probleme beim Saugen und Schlucken sowie der Okulomotorik auf. Die meisten Patienten versterben innerhalb der ersten Lebenswochen an einem Atemstillstand.

Die infantile Form zeigt sich klassischerweise erstmals im Alter von 10 Wochen bis zu 4 Monaten. Die Kinder fallen durch motorische Entwicklungsdefizite und muskuläre Hypotonie auf. Vor allem die Beweglichkeit und Koordination des Kopfes ist eingeschränkt. Typisch sind außerdem Makrozephalie (90% der Patienten), Nystagmus (87%) und visuelle Probleme bis hin zur Optikus- (30%) und Retinaatrophie (12%) (Traeger & Rapin, 1998). Auch Epilepsien treten vermehrt auf (bis 60%) und sind häufig therapierefraktär. Im Verlauf tritt eine generalisierte Hypertonie der Skelettmuskulatur mit zunehmenden Krampfanfällen auf. Die meisten Patienten erblinden. In der finalen Phase kommt es zu hyperthermen Episoden mit Erbrechen (Adachi u. a., 1973a).

Die juvenile Form zeichnet sich durch einen Symptombeginn um das fünfte Lebensjahr aus. Typisch sind dabei zerebelläre Ataxien und mentale Retardierung. Auch bei diesen Patienten kommt es im Verlauf oft zur Erblindung durch Optikusatrophie und Spastiken. Im Gegensatz zu den frühen Verlaufsformen tritt hier keine Makrozephalie auf. Die Patienten erleben typischerweise die zweite, in seltenen Fällen auch die dritte Lebensdekade (Adachi u. a., 1973a; Hoshino & Kubota, 2014a).

1.1.3 Diagnostik

Den ersten diagnostischen Hinweis liefert meist ein erhöhter NAA Spiegel im Urin. Mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS) lassen sich deutlich erhöhte NAA Konzentrationen im Gehirn feststellen: In CD Patienten beträgt sie 6-14 mM, verglichen mit 3-7 mM bei gesunden Kindern vergleichbaren Alters (Janson u. a., 2005a) .

In der Magnetresonanztomographie (MRT) lassen sich Vakuolisierung und spongiforme Degeneration darstellen (Hoshino & Kubota, 2014b; Reuben Matalon & Kimberlee Michals-Matalon, 1998). Bei vielen CD Patienten zeigt sich in der MRT ein zytotoxisches Ödem sowie eine eingeschränkte Diffusion (Merrill u. a., 2016). Der Goldstandard für die endgültige Diagnose ist die genetische Testung durch Sequenzierung des ASPA Gens. Dieser kommt auch im Hinblick auf die Beratung von Familienmitgliedern eine besondere Bedeutung zu.

1.1.4 Pathologie

Makroskopisch imponiert in erster Linie eine Makroenzephalie. In den ersten 20 Monaten der Erkrankung ist das Gehirngewicht durchschnittlich um das 1,55-Fache erhöht, nach 30 Monaten normalisiert es sich jedoch wieder nahezu (Faktor 1,03). Dies wird vor allem auf die fortschreitende Degeneration der weißen Substanz zurückgeführt (Adachi u. a., 1973a).

Die Oberfläche des Kortex erscheint makroskopisch unauffällig. Die auffälligste Veränderung ist eine massive ödematöse Schwellung der weißen Substanz, vor allem in subkortikalen Schichten. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zur Atrophie sowohl im zerebralen Kortex als auch im Zerebellum (Adachi u. a., 1973a).

Histologisch präsentieren sich im Kortex die multiforme Schicht (Stratum multiforme) sowie die subkortikale weiße Substanz durch zahlreiche Vakuolen aufgetrieben. Im Zerebellum sind vor allem die Purkinjezellschicht und die Körnerzellschicht betroffen (Abb. 1). Die Vakuolen sind von variabler Größe (ca. 5 - 100 µm im Durchmesser).

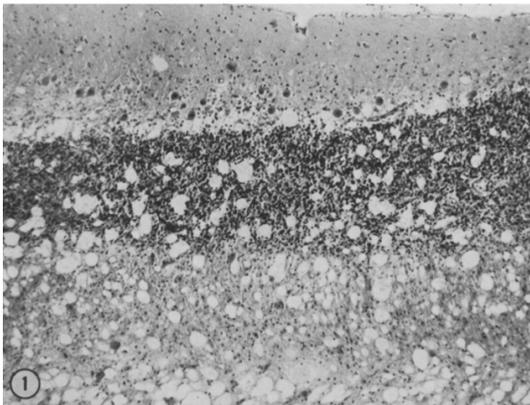


Abb. 1: Vakuolisierung im Kleinhirn eines CD Patienten, Bildquelle (ADACHI u. a., 1972)

In der inneren Pyramidenschicht der Großhirnrinde stellen sich die lichtmikroskopisch sichtbaren Vakuolen elektronenmikroskopisch als geschwollenes astrozytäres Zytoplasma dar. Die astrozytären Fortsätze sind bis zu den Endfüßen im gesamten Kortex geschwollen, in den äußeren Kortexschichten finden sich keine weiteren morphologischen Veränderungen. In allen kortikalen Schichten finden sich Alzheimer Typ II Astrozyten mit deutlich vergrößertem Kern und ohne sichtbares Zytoplasma.

In der Weißen Substanz finden sich vor allem subkortikal zahlreiche Vakuolen (bis zu 200 µm im Durchmesser). Diese liegen bevorzugt in räumlicher Beziehung zu astrozytären Fasern. Auch das Zytoplasma der Astrozyten zeigt sich „wässrig“ geschwollen, teilweise mit Ruptur der Zellmembran.

Die Axone erscheinen weitestgehend intakt. Gleiches gilt für die Morphologie und Anzahl der Neurone. Astrozyten und Oligodendrozyten kommen dagegen vermehrt vor. Sehr auffällig sind die Vakuolen innerhalb der Myelinscheiden. Sie befinden sich zwischen den

einzelnen Lamellen und sind frei von anfärbbaren Strukturen (Adachi u. a., 1966, , 1972, 1973a; Gambetti u. a., 1969). Nach 1980 wurden keine humanpathologischen Untersuchungen mehr veröffentlicht.

1.1.5 Humangenetik

Morbus Canavan basiert auf einer Mutation im Gen der Aspartoacylase (ASPA). Zahlreiche Mutationen wurden bis heute beschrieben, wobei einige gehäuft vorkommen. Die häufigste Mutation ist dabei eine Punktmutation in Codon 285 (Glu285Ala), gefolgt von einer weiteren Punktmutation in Codon 231, die zu einem Transkriptionsabbruch führt (Tyr231X). Beide Mutationen kommen vor allem bei Ashkenazi Juden vor und machen hier mehr als 96% aller Patienten aus (Hoshino & Kubota, 2014a). Die Heterozygotenfrequenz beider Mutationen zusammen beträgt unter Ashkenazi Juden etwa 1:40 (Matalon u. a., 1995). Bei nichtjüdischen Patienten ist eine Punktmutation in Codon 305 (Ala305Glu) am verbreitetsten und betrifft etwa ein Drittel aller Patienten. Die anderen Mutationen bei Nichtjuden sind wesentlich seltener (Matalon u. a., 1995).

1.1.6 Mitochondriale Beteiligung

Bereits deutlich vor der Identifikation der ASPA als Ursache der Canavan Erkrankung fielen in elektronenmikroskopischen Studien morphologisch veränderte Mitochondrien vor allem in Astrozyten sowie eine verringerte ATPase Aktivität auf (Adachi u. a., 1972). Die Mitochondrien stellten sich deutlich verlängert (bis zu 10 µm lang), mit filamentierter Matrix und veränderter Cristae dar (Abb. 2). Auch die Anzahl der Mitochondrien in Astrozyten war vermindert (Adachi u. a., 1966). Daher wurde der Verdacht geäußert, die Erkrankung könne ihre Ursache im Defekt eines mitochondrialen Enzymes haben (Adachi u. a., 1973a).

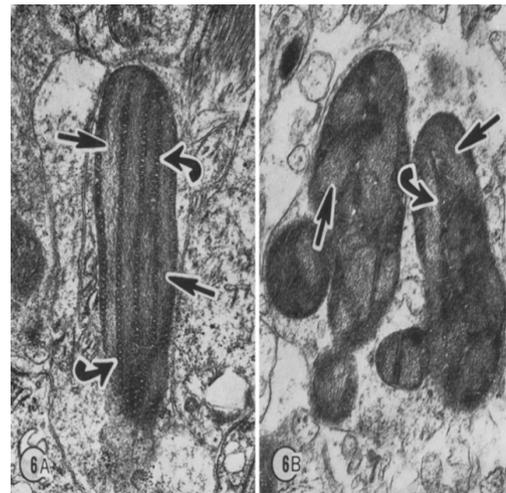


Abb. 2: Mitochondrien von CD Patienten sind strukturell verändert. Die geraden Pfeile markieren die filamentierte Matrix, die gebogenen Pfeile die ungleichmäßig konfigurierte Cristae.

Bildquelle (ADACHI u. a., 1972)

1.1.7 Tiermodelle

Es gibt mittlerweile vier verschiedene Tiermodelle für CD. Dabei handelt es sich um eine Rattenlinie und drei Mauslinien. Das erste Modell war die Tremor-Ratte, die zufällig in einer Laborratten-Zucht auftrat (Yamada u. a., 1985). Lange Zeit war der genetische Ursprung der Symptomatik unklar, Kitada und Kollegen stellten jedoch fest, dass im Genom der Tremor-Ratte das ASPA Gen vollkommen fehlt (Kitada u. a., 2000). Die Ratte weist jedoch noch andere Mutationen auf, sodass sie als Modell nur bedingt geeignet ist. Die Mausmodelle weisen homozygote Mutationen im ASPA Gen auf. Dabei handelt es sich um die ASPA KO Maus mit einer 10 Basenpaar (Bp) Deletion in Exon 4 des ASPA Gens (Matalon u. a., 2000a), die Nur7 Maus mit einer Basenaustausch nonsense Mutation im Exon 4 (Q193X, (Traka u. a., 2008a) und die ASPA LacZ Maus mit einer Insertion des Genes der bakteriellen β -Galactosidase (LacZ) in ein Intron sowie einer Deletion des Exon 2 des ASPA Genes (Mersmann u. a., 2011). Alle Mutationen führen zu einem Translationsprodukt ohne enzymatische Aktivität. Die NAA Konzentrationen sind dabei etwa auf das 2-3 Fache im Vergleich zum Wildtyp erhöht (12-18 mM in der CD Ratte, McPhee u. a., 2005).

In allen Tiermodellen finden sich wie im Menschen Vakuolisierung und Demyelinisierung vor allem in der subkortikalen weißen Substanz, in Hippocampus, Thalamus, Pons und Zerebellum. Die Vakuolen treten dabei teilweise zwischen den Myelinlamellen in den Myelinscheiden strukturell intakter Axone auf (Traka u. a., 2008). Weitgehend intakt präsentieren sich dagegen Rückenmark, Corpus callosum und Nervus Optikus. In der Tremor Ratte finden sich geschwollene Axone (Klugmann u. a., 2005a), in der Nur7 Maus sind nicht näher spezifizierte geschwollene Zellfortsätze beschrieben, die Axone stellen sich normal dar (Traka u. a., 2008a). Die Blut-Hirn-Schranke zeigt eine physiologische Funktion (Ahmed & Gao, 2014). In allen Mausmodellen wird eine reaktive Astroglieose beschrieben.

Phänotypisch weisen die homozygoten ASPA Mutanten eine geringere Körpergröße und einen deutlichen Tremor am gesamten Körper mit einem deutlich ataktischen Gangbild auf. In Koordinationstests wie dem Rotarod-Test schneiden ASPA defiziente Mäuse konstant schlechter ab als Kontrolltiere (Traka u. a., 2008a; Mersmann u. a., 2011). Diese Befunde sind bei männlichen Tieren stärker ausgeprägt (Mersmann u. a., 2011). Die

Lebenserwartung der homozygoten Mäuse liegt im Bereich von 9 bis 18 Monaten (Matalon u. a., 2000a; Traka u. a., 2008a; Mersmann u. a., 2011).

1.1.8 Unterschiede der Pathologie in humanem Gewebe und Tiermodellen

Die Forschung zu Morbus Canavan basiert heute größtenteils auf Tiermodellen. Diese haben jedoch ihre Limitationen, da eine Übertragbarkeit der Mechanismen auf den Menschen nicht unbedingt gegeben ist.

Die in der Literatur beschriebenen Pathologien in humanem post-mortem Gewebe und im Tiermodell decken sich nicht vollständig. Während die Vakuolisierung und Demyelinisierung in Nagern reproduzierbar ist, fallen vor allem in der Ultrastruktur Unterschiede auf. In humanem Gewebe sind elongierte Mitochondrien beschrieben (Adachi), die in keiner bisher veröffentlichten Tiermodellstudie Erwähnung finden. Zudem sind im humanen Gewebe vor allem geschwollene Astrozyten beschrieben (Adachi u. a., 1972), in den Tiermodellen wurde die Schwellung in Neuronen gesehen (Mersmann u. a., 2011).

1.2 N-acetylaspartat (N-acetylaspartic acid, NAA)

NAA wurde erstmals 1956 im Gehirn von Katzen und Ratten in einer Konzentration von 100 mg/100 g Gewebe nachgewiesen (TALLAN u. a., 1956). Im adulten, menschlichen Gehirn wurden in MRS Untersuchungen Konzentrationen von 7-13 mM ermittelt, wobei ca. 1 mM auf NAAG entfällt. Damit ist NAA einer der Metabolite mit der höchsten Konzentration im Gehirn (Barker u. a., 2006). In Kindern liegt die normale Konzentration im Bereich von 3 - 7 mM (Janson u. a., 2005b).

Die regionale Verteilung ist dabei weitestgehend homogen, lediglich im visuellen Kortex finden sich etwa 15 % höhere Konzentrationen (Pouwels & Frahm, 1997a). Die zelluläre und subzelluläre Verteilung ist deutlich heterogener und im Detail umstritten. In humanen Gliomen ist die Konzentration von NAA im Vergleich zum gesamten Gehirn erheblich geringer, was als Hinweis auf eine primär neuronale Lokalisation gewertet wird (Nadler & Cooper, 1972). Untersuchungen an isolierten Zellen der Ratte ergaben hohe Konzentrationen in Neuronen und unreifen Oligodendrozyten, konnten jedoch kein NAA in Astrozyten und reifen Oligodendrozyten nachweisen (Urenjak u. a., 1992). Eine andere

Studie fand jedoch auch in kultivierten reifen Oligodendrozyten der Ratte mit Neuronen vergleichbare NAA Konzentrationen (Bhakoo & Pearce, 2000). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der subzellulären Verteilung konnten NAA sowohl in den Myelinscheiden, als auch in neuronalen Perikaryen und Axonen nachweisen. Die höchste Konzentration fand sich jedoch in neuronalen Mitochondrien (Nordengen u. a., 2013). Außerhalb des ZNS ist NAA in braunem Fettgewebe sowie in der Niere vorhanden. Auch in einigen Neoplasien der Lunge und des Ovars sind erhöhte NAA Spiegel messbar, die Bedeutung dieser Beobachtung ist unklar (Bogner-Strauss, 2017).

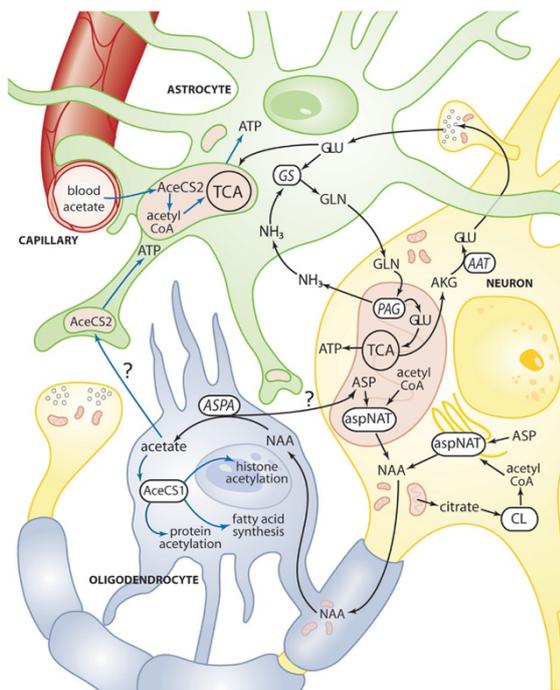


Abb. 3: NAA Stoffwechsel (Moffett u. a., 2013)

Die Funktion von NAA ist bis heute nicht vollständig geklärt. Eine Beteiligung am Energiestoffwechsel des ZNS wird von einigen Autoren diskutiert (Madhavarao & Namboodiri, 2006, Abb. 3). Diese Idee wird vor allem durch die mitochondriale Lokalisation der Synthese gestützt (Patel & Clark, 1979). Dabei besagt eine Theorie, dass NAA in Konkurrenz mit Oxalacetat um Acetyl-CoA steht und damit als Energiepuffer dient, indem in Zeiten eines Überangebotes an Acetyl-CoA vermehrt NAA gebildet wird. Die hier gebundenen Acetyl-CoA Gruppen könnten bei Bedarf durch Hydrolyse des NAA wieder dem Zitronensäurezyklus und damit der Energiegewinnung zugeführt werden (Moffett

u. a., 2013a). Dies wird unterstützt durch die Beobachtung in einem Rattenmodell zum Schädel-Hirn-Trauma, bei dem sich der posttraumatische Verlauf der NAA Konzentration parallel zur Konzentration von Adenosintriphosphat (ATP) verhält (Signoretti u. a., 2001). Die NAA Konzentration im visuellen Cortex nimmt bei visueller Stimulation ab, was ebenfalls ein Hinweis auf eine Energiespeicherfunktion ist (Baslow u. a., 2007).

NAA kann durch die vor allem in Neuronen exprimierte NAAG-Synthetase (*RIMKLA*) an Glutamat gebunden werden. Das entstehende N-Acetyl-Aspartyl-Glutamat (NAAG) wirkt als Neurotransmitter.

Eine andere Theorie sieht NAA als einen zu Acetyl-CoA alternativen Transportweg für Kohlenstoff, vor allem für die Lipidbiosynthese während der Myelinisierung. Unter Verwendung von Radioisotop-markiertem NAA konnten D'Adamo und Yatsu zeigen, dass Acetylgruppen, die aus aufgenommenem NAA stammen, in die Myelinlipide eingebaut werden (D'Adamo & Yatsu, 1966).

Eine Funktion von NAA im Wasserhaushalt des ZNS wird diskutiert (Baslow, 2002, 2003a). Dabei könnte in Neuronen gebildetes metabolisches Wasser an NAA gebunden ins Interstitium sowie in andere Zelltypen transportiert werden, deren Membranen ihrerseits über Aquaporine verfügen und damit wasserdurchlässig sind. Dafür sprechen der schnelle errechnete Umsatz (16,7 h) des gesamten NAA im ZNS sowie die ödematösen Veränderungen wie sie bei Störungen des NAA Stoffwechsels (Morbus Canavan, siehe unten) beobachtet werden (Baslow, 2002). Radiologisch findet sich bei einigen CD Patienten eine eingeschränkte Diffusion (Merrill u. a., 2016). Ein weiteres Indiz für eine Beteiligung von NAA am zerebralen Flüssigkeitshaushalt ist die Beobachtung, dass extrazelluläre NAA Konzentrationen im Gehirn von Ratten nach Mikrodialyse mit hypoosmolarem Medium deutlich ansteigen (Taylor u. a., 1995). Dagegen spricht, dass sich weder in Mäusen die kein NAA synthetisieren können (Maier u. a., 2015) noch in einem Patienten ohne nachweisbares NAA (Martin u. a., 2001b) Hinweise auf eine Vakuolisierung bzw. Ödembildung finden.

M. Baslow vermutet eine Stellung des NAA/NAAG Stoffwechsels in der Regulation des trizellulären Wasser- und Energiehaushaltes des ZNS. NAA und NAAG strömen laut dieser Hypothese aktivitätsabhängig aus Neuronen aus (Baslow & Guilfoyle, 2009). NAAG wird durch die NAAG-Peptidase (*FOLH1*) gespalten, die (bei Nagetieren) vor allem von Astrozyten membranständig exprimiert wird (beim Menschen gibt es Hinweise, dass die NAAG-Peptidase vor allem in Oligodendrozyten exprimiert wird (Zhang u. a., 2014a)). Das freiwerdende Glutamat stimuliert die Glykolyse in Astrozyten. NAA wird in Oligodendrozyten aufgenommen und durch ASPA hydrolysiert. Mit NAA und NAAG wird

Wasser gegen den Gradienten aus Neuronen in den Intrazellulärraum transportiert (Baslow, 2010).

In der klinischen Medizin spielt NAA gegenwärtig vor allem als wichtiger Marker in der Magnetresonanzspektroskopie (MRS) eine Rolle. NAA stellt den höchsten Peak im normalen menschlichen Hirn-MRS dar (Abb. 4).

Veränderungen der Konzentration finden sich bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen und werden meist als ein Maß für die neuronale Integrität interpretiert.

Verminderte NAA Konzentrationen finden sich z.B. in Gehirnen von Patienten mit ischämischen Schlaganfällen (Pouwels & Frahm, 1997b), Morbus Parkinson, Multipler Sklerose, Epilepsien und Infektionen des

ZNS (Moffett u. a., 2007). Auch wurde postuliert, dass die Intelligenz und der Bildungsstand in gesunden Probanden positiv mit der NAA Konzentration im Gehirn korreliert (Aydin u. a., 2012; Glodzik u. a., 2012). Ob diese Beobachtungen auf einen kausalen Zusammenhang zurückzuführen sind, oder ob NAA ein Surrogatparameter für den metabolischen Zustand der Neuronen ist, ist unklar.

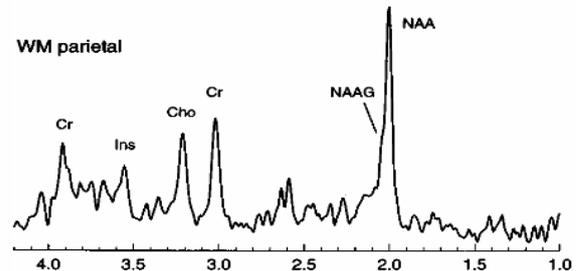


Abb. 4: MRS eines gesunden Probanden. Der höchste Peak ist der von NAA.

Bildquelle: (Pouwels & Frahm, 1997b)

Synthese von NAA

Die Bildung von NAA durch Acetylierung von Aspartat unter Verwendung von Acetyl-CoA wird durch das Enzym Aspartat-N-Acetyltransferase (Asp-NAT) katalysiert (Truckenmiller u. a., 1985, Abb. 5). Dieses Enzym wird durch das Gen *NAT8L* kodiert (Ariyannur u. a., 2010a).

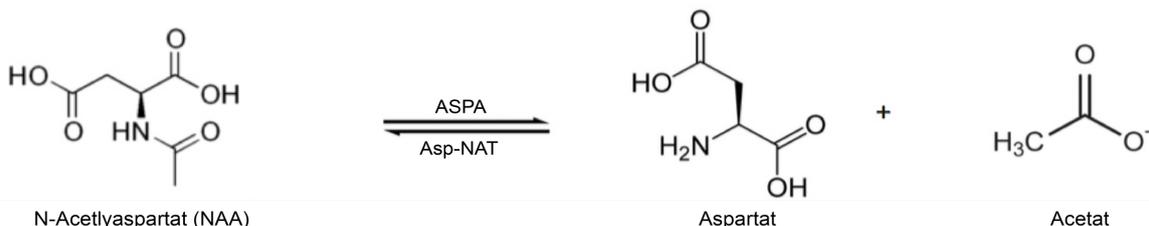


Abb. 5: Auf- und Abbau von NAA

Hohe Aktivitäten von Asp-NAT finden sich in isolierten Mitochondrien aus Rattengehirnen sowie myelinhaltigen Fraktionen (Madhavarao u. a., 2003). Zwei Studien zu *in vitro* Kollokalisationsanalysen kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen: Eine Gruppe fand Asp-NAT vor allem in Mitochondrien und im Zytoplasma (Ariyannur u. a., 2010b), in der zweiten Studie fand sich keine Kollokalisierung mit Mitochondrien aber eine starke Assoziation mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER, Tahay u. a., 2012).

Aufgrund der vorwiegend neuronalen Lokalisation von NAA wird meist eine neuronale Lokalisation von Asp-NAT angenommen. Eine Untersuchung zur Verteilung der Asp-NAT Aktivität in den verschiedenen Zelltypen des ZNS gibt es jedoch bisher nicht. RNA Sequenzierungsanalysen deuten im humanen Gehirn jedoch auf eine Expression vor allem in Astrozyten hin, während Asp-NAT in Nagern in Astrozyten und Neuronen gleichmäßig exprimiert ist (Zhang u. a., 2016a).

Deacetylierung von NAA

Der Abbau von NAA wird durch das Enzym Aspartoacylase (ASPA) katalysiert. Dieses besteht aus 313 Aminosäuren und wird durch das *ASPA* Gen codiert (Kaul u. a., 1993b). Es gibt zahlreiche Studien zur Expression von ASPA in der Gehirnentwicklung und in den verschiedenen Zelltypen im murinen Gehirn, zur Expression im humanen ZNS gibt es keine spezifischen Arbeiten. Die Ergebnisse sind dabei teilweise inkohärent. Einigkeit herrscht über die Tatsache, dass ASPA vor allem in Oligodendrozyten und ihren Vorläufern exprimiert ist (Chakraborty u. a., 2001; D'Adamo u. a., 1978; Klugmann u. a., 2003; Madhavarao u. a., 2004; Moffett u. a., 2011). Eine Studie findet in Astrozyten die höchste Aktivität (Bhakoo u. a., 2001), andere finden keine ASPA Expression in Astrozyten (Klugmann u. a., 2003; Madhavarao u. a., 2004; Moffett u. a., 2011). Auch in Neuronen finden einige Gruppen ASPA (Moffett u. a., 2011), andere dagegen nicht (Bhakoo u. a., 2001; Madhavarao u. a., 2004). Die subzelluläre Lokalisation in Oligodendrozyten ist ebenfalls umstritten. Während eine Gruppe in aufgereinigten Myelinfraktionen hohe Aktivitäten feststellt (Chakraborty u. a., 2001), finden Immunfluoreszenzstudien ASPA auf das Soma und Zellfortsätze beschränkt, können jedoch kein ASPA im Myelin nachweisen (Klugmann u. a., 2003; Moffett u. a., 2011). Interessanterweise zeigt ASPA im aufgereinigten Myelin eine Latenz von etwa 1h bis zum Einsatz der Reaktion, sowie eine höhere Aktivität als im Zytoplasma. Eine Isoform des

Enzyms oder eine Bindung an Strukturen im Myelin könnten dies sowie die Diskrepanz zwischen Aktivitätsmessungen und Immunfluoreszenzuntersuchungen erklären (Chakraborty u. a., 2001). Die oben genannten Studien wurden an verschiedenen Maus- und Rattenmodellen durchgeführt.

Außerhalb des ZNS ist ASPA in Niere, Leber und Lunge exprimiert (Sommer & Sass, 2012), die Funktion in nicht-neuronalen Geweben ist weitgehend unbekannt. ASPA ist in Gehirn und Duodenum von Mäusen mit Diabetes Typ II verstärkt exprimiert (Surendran u. a., 2006).

Die Expression von ASPA ist während der Entwicklung des ZNS vermutlich auf transkriptioneller Ebene reguliert. Die Expression von ASPA kann durch Glutamat stimuliert werden, was als Hinweis auf eine Expression in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität spezifischer Gehirnareale verstanden wird (Francis u. a., 2011a). In Mäusen zeigt ASPA die höchste Expression zwischen Postnataltag 20 (P20) und P30 (Mattan u. a., 2010), in Ratten um P17 (Bhakoo u. a., 2001). Dieser Zeitraum korreliert mit der Myelinisierung des ZNS bei Nagern. Zusätzlich zeigt sich eine räumliche Korrelation von ASPA Expression und Myelinbildung. Dies wird als Hinweis auf eine Funktion von ASPA in der Myelinisierung verstanden (Kirmani u. a., 2003).

Die Expression von ASPA in primären murinen Oligodendrozytenkulturen wird durch Glutamat, nicht jedoch durch NAA verstärkt. Dies kann als Hinweis auf eine Beteiligung am aktivitätsabhängigen Energiestoffwechsel verstanden werden (Francis u. a., 2011b). Alternativ kann es sich auch um einen negativen Rückkopplungsmechanismus handeln, wenn NAA als Reservoir für die Synthese von Glutamat angesehen wird (Clark u. a., 2006).

In ASPA KO Mäusen ist eine signifikant verringerte ATP Konzentration im Gehirn messbar. Dies ist durch spezifische Expression von ASPA in Oligodendrozyten reversibel (Francis u. a., 2012a, , 2016), was ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von ASPA für den Energiestoffwechsel ist.

Mehrere Studien an CD Tiermodellen ergeben Hinweise auf eine Funktion von ASPA in der Regulation der zellulären Differenzierung im ZNS. Die Expression des Wachstumsfaktors BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), welcher u.a. Funktionen für Differenzierung und Überleben von Oligodendrozyten im ZNS hat, korreliert negativ mit der von ASPA. Daraus ergibt sich im ZNS von CD Ratten eine deutlich erhöhte

Konzentration von BDNF. Dieser Effekt ist NAA abhängig (Francis u. a., 2006a). Im ZNS von CD Mäusen finden sich deutlich mehr Vorläuferzellen (identifiziert durch die Expression von Stammzellmarkern wie Nestin, Vimentin, NG2 und Sox2), die vermehrt acetylierte Histone und weniger dichtes Chromatin aufweisen (Kumar u. a., 2009; Mattan u. a., 2010), beides Hinweise auf eine vermehrt stattfindende Proliferation.

Subkortikal finden sich in CD Ratten vermehrt proliferative oligodendrogliale Vorläufer, kortikal dagegen vermindert, die Expression von Myelinenen wie *MBP* und *MOG* ist in CD Ratten gegenüber Kontrolltieren frühzeitig (p17) erhöht, liegt später (p28) jedoch darunter. Es wird daher angenommen, dass die Reifung der Vorläuferzellen in CD Tieren durch die erhöhte BDNF Konzentration verfrüht erfolgt. Da die zu früh gereiften Oligodendrozyten weder proliferieren noch migrieren, ist ihre Zahl im adulten Gehirn vermindert (Francis u. a., 2006a, 2012a).

1.3 Erklärungsansätze zur Pathophysiologie des Morbus Canavan

In der Literatur existieren verschiedene, teils widersprüchliche Theorien zur Pathophysiologie von CD. Bisher kann keine Theorie alle Beobachtungen aus Tierexperimenten und klinisch-pathologischen Studien erklären, die genauen Vorgänge sind daher weiterhin unklar. Die Erklärungsansätze für die pathologischen Veränderungen bei CD lassen sich in eine osmotische und eine metabolische Theorie unterteilen.

Die osmotische Hypothese geht davon aus, dass durch die Akkumulation von NAA im ZNS Wasser osmotisch gebunden wird, was für die Vakuolisierung verantwortlich ist (Baslow, 2003b). Dafür spricht die Beobachtung, dass es in ASPA KO Mäusen zu einer Umverteilung astrozytärer Aquaporine kommt (Clarner u. a., 2014).

Die metabolische Hypothese sieht den Mechanismus im Mangel von NAA in den Oligodendrozyten zur Synthese von Lipiden für die Bildung der Myelinschichten. Obwohl NAA in gesunden Ratten nachweislich im Myelin eingebaut wird (Chakraborty u. a., 2001) und die Konzentration von Acetat sowie die Synthese von Myelinlipiden im CD Mausmodell abnimmt (Madhavarao u. a., 2005a) spricht die Beobachtung, dass eine Unterbrechung der NAA Synthese durch einen *Nat8L* Knockout nicht zu einer Hypomyelinisierung führt (Guo u. a., 2015; Maier u. a., 2015), gegen diese These. Allerdings lassen sich Demyelinisierung und motorische Einschränkungen im Mausmodell

durch eine unmittelbar postnatale, triglyzeridreiche Diät verhindern, was ein Hinweis auf eine metabolische Beteiligung ist (Arun u. a., 2010; Francis u. a., 2014).

Im Tiermodell zeigt sich in CD Gehirnen eine deutlich verringerte ATP Konzentration. In CD Patienten ist per MRS eine erhöhte Laktat Konzentration in der grauen Substanz messbar, die mit der Schwere der Symptome korreliert (Francis u. a., 2016). Eine Beteiligung des Energiestoffwechsels über die Myelinisierung hinaus an der Pathophysiologie von CD scheint daher wahrscheinlich.

Eine direkte toxische Wirkung hoher NAA Konzentrationen auf Myelin, die die beobachtete Demyelinisierung erklären könnte, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Eine intrazerebrale Erhöhung der NAA Konzentration auf mit CD vergleichbares Niveau bei intakter ASPA führt nicht zu pathologischen Veränderungen (Appu u. a., 2017). Intraventrikuläre NAA Injektionen bei Ratten in sehr hohen Konzentrationen (finale Konzentration im Liquor ca. 1 M) lösen epileptische Anfälle aus (Akimitsu u. a., 2000). Solche gehören jedoch nicht zu den typischen klinischen Symptomen bei CD, sodass eine NAA Toxizität als Pathomechanismus unwahrscheinlich ist.

1.4 Therapeutische Ansätze

Bisher ist keine kausale Therapie für Morbus Canavan bekannt. Die einzige Option ist die supportive Therapie mit palliativer Zielsetzung. Seit einiger Zeit gibt es verschiedene Versuche, Therapien für CD zu entwickeln. Diese lassen sich grundsätzlich in zwei Ansätze unterteilen: Pharmakologische Therapien durch Substitution von Nährstoffen oder Senkung des NAA Spiegels und die Wiederherstellung der ASPA Aktivität durch Gen-, Zell- oder Enzyersatztherapie.

Der am weitesten fortgeschrittene Therapieansatz ist die Gentherapie. Dabei wird das Gen für die Aspartoacylase mit Hilfe eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) als Vektor in das Gehirn des Patienten eingebracht. Die Ergebnisse sind dabei durchaus vielversprechend. Im Mausmodell zeigten sich 3-5 Monate nach der Injektion des Virus in Striatum und Thalamus eine signifikante Steigerung ASPA Aktivität. Damit einher gingen eine Reduktion der Vakuolisierung sowie der NAA Konzentrationen im Gehirn. Allerdings waren die Veränderungen gegenüber der CD Maus auf die unmittelbare Umgebung der Injektionsstellen beschränkt (Matalon u. a., 2003). Eine selektive Überexpression von ASPA in Neuronen verhindert zwar das Auftreten epileptischer Anfälle, hat aber keinen

Einfluss auf die Vakuolisierung und die motorischen Defizite (Klugmann u. a., 2005a). Im Gegensatz dazu führt eine selektive Expression in Oligodendrozyten zu einer deutlichen Verbesserung der histopathologischen Veränderungen und der motorischen Fähigkeiten (Francis u. a., 2016). Neben mehreren Studien zur Gentherapie im Tiermodell (Klugmann u. a., 2005; Matalon u. a., 2003; McPhee u. a., 2005) gibt es bereits eine klinische Studie zu Sicherheit und Wirksamkeit der AAV-Gentherapie (Leone u. a., 2000; Janson u. a., 2002; Leone u. a., 2012b). Dabei wurden 13 Patienten im Alter von 3 - 96 Monaten mit humangenetisch gesicherter CD typischer Mutation, nachgewiesener Enzymdefizienz und ausgeprägten Krankheitssymptomen mit einem AAV Vektor therapiert. Im ersten Jahr nach der Injektion des AAV Vektors fanden sich keine wesentlichen immunologischen Reaktionen (McPhee u. a., 2006). Nach 10 Jahren Nachbeobachtungszeit zeigte sich nach AAV-Gentherapie eine Reduktion der NAA Konzentration im Gehirn der Patienten sowie ein besseres Abschneiden in motorischen Tests. Aussagen zu Überlebenszeiten trifft die Studie nicht (Leone u. a., 2012a).

Zur pharmakologischen Therapie gibt es gegenwärtig drei vielversprechende Ansätze.

In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass Lithiumzitat die NAA Konzentration im Gehirn von CD Patienten senken kann (Janson u. a., 2005a). Im Tiermodell konnte durch eine triglyzeridreiche Diät eine deutliche Verbesserung der Myelinisierung sowie der motorischen Leistung erzielt werden (Francis u. a., 2014). In ersten klinischen Studien wurde die Diät zwar gut vertragen, veränderte den klinischen Verlauf jedoch nicht (Segel u. a., 2011). Der neueste Ansatz ist die Entwicklung von Asp-NAT Inhibitoren, um die Synthese von NAA zu unterbinden. Dies erscheint vielversprechend, da die Abwesenheit von NAA im Tiermodell die Entstehung von Vakuolen im Gehirn verhindert. Im Tiermodell verbessert sich die Lebenserwartung jedoch nicht (Guo u. a., 2015; Maier u. a., 2015; Thangavelu u. a., 2017). Klinische Studien zu diesem Ansatz sind bisher nicht veröffentlicht.

1.5 Pluripotente Stammzellen

1.5.1 Embryonale Stammzellen

Pluripotente Stammzellen (*pluripotent stem cell*, PSC) besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind in der Lage, Gewebe der drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm sowie der Keimbahn zu bilden. Embryonale Stammzellen (ESZ)

sind die natürliche Form der pluripotenten Stammzellen. Ihre Isolierung aus der Blastozyste von Mäuseembryonen ist seit den 1980er Jahren (Evans & Kaufman, 1981) und aus humanen, durch *in vitro* Fertilisation entstandenen Embryonen, seit 1998 (Thomson u. a., 1998) möglich. Sie haben völlig neue Einblicke in die Embryonalentwicklung ermöglicht. Die Idee, ESZ therapeutisch zur Rekonstruktion von Geweben einzusetzen, wurde als vielversprechender Ansatz für neuartige Therapien Gegenstand der Forschung. Die Forschung an embryonalen Stammzellen wurde jedoch in einigen Ländern, darunter Deutschland, durch gesetzliche Restriktionen erschwert.

1.5.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Im Jahr 2006 gelang es erstmals, durch die gezielte Überexpression der vier Gene *OCT3/4*, *SOX2*, *C-MYC* und *KLF4* („Yamanaka-Faktoren“), murine Fibroblasten in einen pluripotenten Zustand zu versetzen (induzierte pluripotente Stammzellen, iPSC, Takahashi & Yamanaka, 2006). Ein Jahr später gelang dies unter Verwendung der gleichen Gene auch aus humanen Fibroblasten (Takahashi u. a., 2007; Yu u. a., 2007). Im Vergleich zu ES besitzen iPSC mehrere Vorteile: Die ethischen und regulatorischen Schwierigkeiten sind gegenüber der Arbeit mit menschlichen Embryonen deutlich reduziert. Fibroblasten sind einfach zu gewinnen, auf diese Weise lassen sich relativ schnell autologe Stammzellen für jede Person erstellen. Die entstehenden iPSC Zellen sind genetisch mit dem Spender identisch, was immunologische Abstoßungsreaktionen reduziert und daher Transplantationen sicherer macht. Für die medizinische Forschung ist vor allem die Möglichkeit interessant, pluripotente Stammzellen von Patienten zu gewinnen, da diese die Modellierung von Krankheiten *in vitro* erlauben.

Pluripotente Stammzellen (ESZ und iPSC) sowie *in vitro* abgeleitete Zellen sind transplantierbar, und integrieren sich bei Transplantation auch funktionell ins Wirtsgewebe (Brüstle u. a., 1999; Martino u. a., 2010; Nistor u. a., 2005; Sharp u. a., 2010; Doerr u. a., 2017). Sie stellen daher eine vielversprechende Quelle für Zellersatztherapien dar (Goldman, 2005; Goldman & Windrem, 2006; Yang & Wernig, 2013; Rashid & Lomas, 2012; Doerr u. a., 2015; Barker u. a., 2015). Pluripotente Stammzellen lassen sich *in vitro* in nahezu jeden Zelltyp differenzieren. Dazu existiert eine Vielzahl an Protokollen, die ermöglichen, unter Verwendung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Kulturbedingungen, Zelltypen aller Organsysteme zu erzeugen

(Murry & Keller, 2008). Die Anwendungen reichen von grundlegenden zellbiologischen Experimenten und der *in vitro* Modellierung von verschiedensten Erkrankungen bis zu Wirkstoffscreenings in der pharmazeutischen Forschung (Avior u. a., 2016).

Die meisten Protokolle zur Generierung von iPSC Zellen basieren auf der Überexpression von Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung von Zellen hemmen und dadurch Pluripotenz ermöglichen. Die entstehende Zellpopulation kann daher *in vivo* Teratome bilden, was ihre Sicherheit bei einem therapeutischen Einsatz einschränkt. Zahlreiche Signalwege der Zelle spielen bei der Regulation von Pluripotenz und Differenzierung eine Rolle (Federation u. a., 2014). Durch ihre pharmakologische Beeinflussung wurden zunehmend Protokolle entwickelt, die im Vergleich zur Takashi & Yamanaka mit weniger Genen auskommen (Ichida u. a., 2014) oder ganz auf Transgene verzichten (Hou u. a., 2013). Die Sicherheit der klassischen Reprogrammierung lässt sich durch die Verwendung nicht ins Wirtsgenom integrierender Vektoren verbessern. Dadurch werden die Pluripotenzfaktoren exprimiert, ohne dass eine Integration ins Wirtsgenom stattfindet. Dafür eignen sich Sendai-RNA-Virus Vektoren, deren virales Genom nach mehreren Passagen aus den Zellen entfernt wird (Mcarthur, Chad C u. a., 2012). Expressionsanalysen zeigen eine große genetische Heterogenität zwischen den iPSC Linien. Dies stellt eine Herausforderung für die Reproduzierbarkeit dar. Ein Großteil der genetischen Variation ist auf die interindividuelle Heterogenität zwischen den Zellspendern zurückzuführen, der Zelltyp der für die Reprogrammierung verwendet wurde scheint nur eine nachrangige Rolle zu spielen (Cahan & Daley, 2013; Burrows u. a., 2016; Carcamo-Orive u. a., 2017). Es gibt jedoch keinen grundsätzlichen genetischen Unterschied zwischen iPSC und ESZ, vielmehr findet sich bei beiden Zelltypen ein überlappendes genetisches Spektrum (Bock u. a., 2011).

1.6 Zelltypen im Zentralnervensystem

Die Zellen des menschlichen Zentralnervensystems (ZNS) werden traditionell in Neurone und Gliazellen unterteilt. Dabei besagt das ursprüngliche Modell, dass Neurone für die Signalübertragung und -verarbeitung zuständig sind, während die Gliazellen eine unterstützende Funktion übernehmen („glia“, griechisch für „Leim“). Die Tatsache, dass der Anteil glialer Zellen an der gesamten Zellzahl im ZNS mit der Komplexität des ZNS stark ansteigt (im Nervensystem von *Drosophila* wird der Anteil glialer Zellen auf 15%

geschätzt, beim Menschen liegen die Schätzungen bei ca. 50-90%, Freeman & Rowitch, 2013; Herculano-Houzel, 2014) deutet jedoch darauf hin, dass der Glia eine größere Bedeutung zukommt. Mittlerweile sind zahlreiche Funktionen der Gliazellen bekannt, durch welche diese aktiv und passiv an der Signalverarbeitung im ZNS beteiligt sind.

Die Gruppe der Gliazellen im zentralen Nervensystem wird weiter unterteilt in Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Mikroglia. Die Verarbeitung und Übertragung elektrischer und chemischer Signale im ZNS findet primär durch Neurone statt. Das menschliche Gehirn enthält ca. 80-100 Milliarden Neurone, die über Synapsen miteinander in Kontakt stehen und zahlreiche funktionelle Systeme bilden. Es handelt sich um eine sehr heterogene Zellpopulation, die regional und funktionell stark spezialisiert ist. Die Einteilung der Neurone kann nach funktionellen oder morphologischen Gesichtspunkten erfolgen. Neurone und im Besonderen Synapsen haben einen sehr hohen Energiebedarf, daher verbraucht das ZNS ca. 20% des Ruheenergiebedarfes des menschlichen Körpers bei ca. 2% Anteil am Körpergewicht (Mlody u. a., 2016).

Im menschlichen Gehirn stellen Astrozyten den größten Teil der Gliazellen (Kelley & Rowitch, 2016). Traditionell werden sie als unterstützende Zellen der Neurone gesehen, die für die strukturelle Integrität, die Homöostase von Flüssigkeiten und Ionen sowie die Rückaufnahme von Neurotransmittern verantwortlich sind. Es wird jedoch zunehmend deutlich, dass Astrozyten eine fundamentale Rolle in einer Reihe von Prozessen im ZNS spielen. Menschliche Astrozyten sind ca. 2,6-fach größer, haben etwa 10-mal mehr Fortsätze und sind morphologisch deutlich heterogener als die von Nagetieren. Dies weist möglicherweise auf eine besondere Bedeutung für die Leistungsfähigkeit des menschlichen Gehirns hin (Oberheim u. a., 2009; Suzana, 2014). Dazu passt die Beobachtung, dass Mäuse nach Transplantation menschlicher Astrozytenvorläufer eine größere synaptische Plastizität und verbesserte Lernleistungen zeigen (Han u. a., 2013). Neuere genetische Untersuchungen zeigen erhebliche Unterschiede in der Genexpression zwischen humanen und murinen Astrozyten, eine Studie fand über 600 Gene, die in humanen Astrozyten deutlich stärker exprimiert werden als in murinen. Ein Beispiel ist der Calciumkanal Ryanodinrezeptor 3, der als Verstärker von Calciumsignalen dient. Dies könnte ein Hinweis sein, dass humane Astrozyten Funktionen in der Signalübertragung erfüllen, zu denen murine Astrozyten nicht in der Lage sind (Zhang u. a., 2016b). Auch für den ASPA-Stoffwechsel relevante Gene wie *Nat8L* weisen im

Humanen ZNS eine stärkere Expression in Astrozyten auf als in Nagetieren (Zhang u. a., 2014a).

Astrozyten sind für die effiziente Funktion der Synapsen notwendig (Pfrieger & Barres, 1997), sie schütten „Gliotransmitter“ wie Glutamat, ATP und D-Serin aus und beeinflussen damit die Erregbarkeit und Signalübertragung an den Synapsen sowie deren Synchronisierung (Hamilton & Attwell, 2010; Poskanzer & Yuste, 2016). Astrozyten regulieren die aktivitätsabhängige Myelinisierung von Axonen (Ishibashi u. a., 2006), über zahlreiche Wachstumsfaktoren beeinflussen sie die Reaktion anderer Zelltypen auf pathologische Prozesse (Moore u. a., 2011), steuern die adulte Neurogenese (Song u. a., 2002) und bilden selbst im Rahmen der reaktiven Gliose Narben im ZNS (Pekny & Nilsson, 2005).

Eine elementare Rolle spielen Astrozyten im Energiehaushalt des ZNS. Sie regulieren das Energieangebot in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität. Die durch Glutamat ausgelöste Kalzium-Ausschüttung reguliert die Vasokonstriktion der Arteriolen (Gordon u. a., 2008), führt zu verstärktem Einbau von Glucosetransportern in die Zellmembran (Loaiza u. a., 2003) und stimuliert die aerobe Glykolyse in den Astrozyten (Pellerin & Magistretti, 1994). Das entstehende Lactat dient Neuronen als Energiequelle für die ATP Synthese (Mlody u. a., 2016).

Mittlerweile wird deutlich, dass es sich bei Astrozyten um eine sehr heterogene Gruppe von Zellen handelt, die sich sowohl morphologisch als auch funktionell erheblich zwischen den Regionen des ZNS und auch innerhalb einer Region unterscheiden (Alvarez-Buylla & Rowitch, 2015; Zhang & Barres, 2010).

Oligodendrozyten scheiden mit langen Fortsätzen ihrer Zellmembran die Axone von Neuronen ein, und ermöglichen dadurch eine deutlich schnellere, energieeffizientere Signalübertragung (saltatorische Erregungsleitung). Sie übernehmen dabei auch eine wichtige Funktion zur metabolischen Versorgung der Axone. Der Untergang von Oligodendrozyten ist an zahlreichen Krankheiten wie Multipler Sklerose und Leukodystrophien beteiligt.

Die Hauptaufgabe der Ependymzellen im Plexus choroideus ist die Produktion der Zerebrospinalflüssigkeit. Bei Mikroglia handelt es sich im entwicklungsbiologischen Sinne nicht um Zellen des ZNS, da sie dem mononukleär-phagozytären System zuzuordnen sind.

1.6.1 Neurale Stammzellen und Radiäre Glia

Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten sind neuroektodermalen Ursprungs und entstammen einer gemeinsamen Vorläuferpopulation, die als neurale Stammzellen (NSC, *neural stem cells*) bezeichnet wird. Aus diesen entwickeln sich sowohl neuronale als auch gliale Vorläuferzellen. Die Trennung in neuronale und gliale Entwicklung ist jedoch bei weitem nicht so eindeutig wie lange Zeit angenommen, da es zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung Zellstadien gibt, aus denen sowohl neuronale als auch gliale Zellen hervorgehen können (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009, Abb. 6).

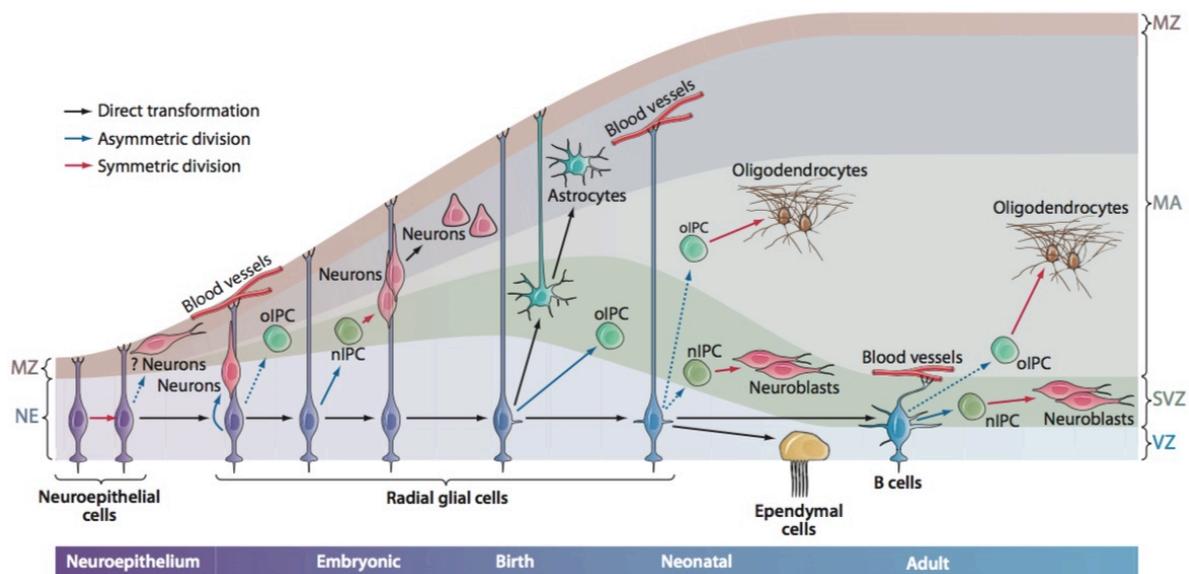


Abb. 6: Übersicht über die Entwicklung der Zelltypen im ZNS. Bildquelle: (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009)

Einen speziellen Typ neuraler Stammzellen stellen radiäre Gliazellen (RG) dar. Sie entstehen etwa zeitgleich mit dem Beginn der Neurogenese aus den neuroepithelialen Zellen des Neuralrohres. Die Somata liegen in der ventrikulären Zone (VZ), über Fortsätze stehen sie in Kontakt mit der pialen und der ventrikulären Oberfläche des sich entwickelnden ZNS und bilden dadurch eine Leitstruktur für die Migration der Neurone und ihrer Vorläufer. Sie sind zur Selbsterneuerung fähig: Durch asymmetrische Teilung entstehen aus ihnen Neurone bzw. neuronale Vorläufer sowie neue radiäre Gliazellen (Noctor u. a., 2001, 2004).

Neure Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch im adulten Gehirn Neurone aus Vorläuferzellen entstehen, die Charakteristika radiärer Glia sowie von Astrozyten aufweisen. Im Hippocampus adulter Mäuse existiert eine RG Population, aus der Neurone und Astrozyten hervorgehen können (Gebara u. a., 2016). In der subventrikulären Zone (SVZ) finden sich sogenannte B-Zellen, die Eigenschaften von RG und Astrozyten haben und daher auch als radiale Astrozyten bezeichnet werden. Aus diesen Zellen gehen auch im adulten Gehirn Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten hervor (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). Eine klare Unterscheidung zwischen neuronalen Stammzellen und Glia wird zunehmend aufgegeben, vielmehr scheinen gliale Subpopulationen Stammzeleigenschaften zu haben (Alvarez-Buylla u. a., 2001; Doetsch, 2003).

Einige spezialisierte Zellpopulationen behalten ihre RG Morphologie auch im adulten ZNS, beispielsweise die Müller-Glia der Retina oder die Bergmann-Glia im Zerebellum. Molekular unterscheiden sich radiale Gliazellen durch die Expression zahlreicher glialer Gene von neuroepithelialen Stammzellen, wichtige Beispiele sind der astrozytäre Glutamat Transporter (*GLAST*), *brain lipid-binding protein (BLBP)*, *Nestin*, *Vimentin* sowie *glial fibrillar acid protein (GFAP)* (Kriegstein & Götz, 2003). Radiale Gliazellen stellen eine heterogene, regionalisierte Population dar, aus der je nach ZNS Region verschiedene neuronale und gliale Subtypen hervorgehen. Damit spielen RG auch für die regionale Spezifizierung des ZNS eine wichtige Rolle (Kriegstein & Götz, 2003; Malatesta u. a., 2003).

In vitro ist die Differenzierung neuraler Stammzellen aus Maus ESZ unter Einfluss von *basic fibroblast growth factor (bFGF)* bereits länger beschrieben (Okabe u. a., 1996). Aus humanen ES Zellen gelang dies erst einige Jahre später (Zhang u. a., 2001). Dies stellt einen wichtigen Schritt dar, um Stammzellmodelle neurologischer Erkrankungen zu ermöglichen. Seither wurde eine Vielzahl von Protokollen entwickelt, um NSCs in verschiedenen Stadien zu generieren (zusammengefasst in Conti & Cattaneo, 2010). Gemeinsam ist diesen Zelllinien die Fähigkeit, unter definierten Kulturbedingungen zu Neuronen verschiedener Subtypen (zusammengefasst in Zhang, 2006) sowie zu Astrozyten und Oligodendrozyten (Brüstle u. a., 1999) zu differenzieren. Typische Marker, die in NSC exprimiert werden, sind Sox2, Pax6 und Nestin. Je nach verwendetem Protokoll lassen sich Vorläuferzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien gewinnen. Die am häufigsten eingesetzten Wachstumsfaktoren sind dabei *epidermal growth factor*

(EGF) und *fibroblast growth factor 2* (FGF2), wobei reifere NSC Stadien entstehen (Conti u. a., 2005; Gorris u. a., 2015a; Koch u. a., 2009; Reynolds u. a., 1992; Reynolds & Weiss, 1992). Unter Verwendung von *leukemia inhibiting factor* (LIF, Tropepe u. a., 2001), oder durch Inhibierung des SMAD Signalweges mit Noggin und SB431542 (Chambers u. a., 2009) lassen sich frühere Stadien neuraler Stammzellen erzeugen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Radiale Glia-ähnliche neurale Vorläuferzellen (RGL-NPC, *radial glia like neural precursor cell*) verwendet. Diese wurden unter Verwendung der Wachstumsfaktoren EGF und FGF2 sowie Retinsäure aus iPSC differenziert. Diese Vorläuferpopulation zeichnet sich durch die Expression der typischen RG Marker GLAST, BLBP und GFAP zusätzlich zu NSC Markern aus. Eine Besonderheit im Vergleich zu anderen NSC Linien ist die Fähigkeit, mit guter Effizienz zu Oligodendrozyten und Astrozyten zu differenzieren (Gorris u. a., 2015a). Daher eignet sich dieser Zelltyp ideal als Ausgangspopulation zur Krankheitsmodellierung mit astrozytärem Fokus.

1.6.2 Natürliche Differenzierung der Zelltypen im ZNS

Im zeitlichen Ablauf der Entwicklung liegt die Neurogenese vor der Gliogenese (Gallo & Deneen, 2014). Eine klare Trennung der Vorgänge erscheint jedoch angesichts der zahlreichen Interaktionen wenig sinnvoll.

Die Neurogenese findet in verschiedenen Regionen des ZNS statt, der Großteil der kortikalen Neurone entsteht in der VZ und der SVZ aus neuralen Stammzellen (Abb. 6). Dabei entstehen spezielle Subpopulationen oft bevorzugt in bestimmten Regionen. In der Maus findet dieser Vorgang zwischen den embryonalen Entwicklungstagen (E) 11,5 - 17,5 statt. Beim Menschen beginnt die Neurogenese um die vierte Entwicklungswoche, ein Großteil der Proliferation erfolgt bis etwa zur 20. Woche, Neurogenese findet jedoch während der gesamten Fetalzeit statt (Knuesel u. a., 2014; Stagni u. a., 2015). Die Migration der Neurone in die verschiedenen Regionen des Gehirns ist ein sehr komplexer Vorgang, der durch zahlreiche Gene reguliert wird (Molyneaux u. a., 2007). Auch im adulten Gehirn von Nagetieren findet Neurogenese statt. Diese geht unter anderem von Astrozyten in der SVZ (Doetsch u. a., 1999) und GLAST exprimierenden Zellen im Hippocampus aus (DeCarolis u. a., 2013). Das Ausmaß der adulten Neurogenese beim Menschen ist äußerst umstritten (Spalding u. a., 2013; Sorrells u. a., 2018).

Frühe astrozytäre Vorläufer sind vor allem RG-Zellen, die mit GFAP und GLAST (Shibata u. a., 1997) bereits wichtige astrozytäre Marker exprimieren. Aus ihnen entstehen durch den Einfluss verschiedener Gene, vor allem *SOX9* und *NFIA* (Deneen u. a., 2006) astrozytäre Vorläuferzellen. Diese wandern aus den mitotisch aktiven Zentren (z.B. SVZ) aus und beginnen zu differenzieren. Diese Differenzierung wird durch die Signalwege Notch, JAK/STAT und SMAD synergistisch stimuliert. Der JAK/STAT Signalweg wird unter anderem durch die Wachstumsfaktoren *leukemia inhibitory factor* (LIF) und *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) aktiviert. Die Wachstumsfaktoren von Typ *bone morphogenic protein* (BMP) wirken primär über den SMAD Signalweg (Gallo & Deneen, 2014). Dabei scheinen JAK/STAT und SMAD Aktivierung synergistische Effekte zu haben (Nakashima u. a., 1999). Bei Exposition mit LIF bzw. CTNF allein entstehen bipolare Astrozyten, welche verstärkt Sox1 exprimieren, weiterhin proliferieren und sich selbst erneuern, während BMP sternförmige Astrozyten erzeugt, die nicht weiter proliferieren. LIF/CTNF scheinen also vor allem astrozytäre Vorläufer zu generieren, während BMP für die Ausreifung verantwortlich ist (Bonaguidi u. a., 2005). Nach Transplantation in das Rückenmark von Ratten unterstützen unter BMP Einfluss differenzierte Astrozyten die axonale Regeneration und unterdrücken die Bildung von Glianarben, während unter Einfluss von CNTF differenzierte Astrozyten einen gegenteiligen Effekt haben (Davies u. a., 2008). Die Aktivierung des Notch Signalweges unterdrückt die Differenzierung der NSC und RG zu Neuronen und Oligodendrozyten. Die Vorläufer bleiben länger in einem multipotenten Stadium und differenzieren bevorzugt zu Astrozyten (Louvi & Artavanis-Tsakonas, 2006). Reife Astrozyten zeichnen sich durch eine verstärkte Expression von GFAP, S100 β , *glutamate transporter 1* (GLT1) und die Aquaporine 1 und 4 (AQP1/4) aus (Molofsky u. a., 2012). Als Reaktion auf eine Schädigung des ZNS können reife Astrozyten aktiviert werden und proliferativ aktiv werden. Diese stark GFAP positiven reaktiven Astrozyten sind stark proliferativ und zeigen *in vitro* die Fähigkeit zur neuronalen Differenzierung. Sie beeinflussen über sekretierte Mediatoren auch die Reaktion der anderen Zelltypen (Robel u. a., 2011; Gallo & Deneen, 2014).

Auch die Bildung oligodendroglialer Vorläufer (*oligodendrocyte precursor cell*, OPC) wird durch *SOX9* stimuliert, sie benötigt jedoch zusätzlich die Aktivierung der Gene *OLIG 1/2* (Cognato & French-Constant, 2004). Bei der Aktivierung spielen die Wachstumsfaktoren *platelet-derived growth factor α* (PDGF α) und FGF eine wichtige Rolle (Bansal u. a., 2003;

Baron u. a., 2000). Der BMP Signalweg wirkt inhibitorisch auf die oligodendrogliale Entwicklung, seine Inhibition durch Noggin stimuliert sie (Mekki-Dauriac u. a., 2002). Die Aktivierung des EGF Rezeptors stimuliert Proliferation und Migration der OPCs, inhibiert jedoch die Differenzierung (Ivkovic u. a., 2008). Die OPCs sind molekular durch die Expression von NG2, SOX10, des PDGF α -Rezeptors und OLIG2 gekennzeichnet (Emery, 2010; Ishibashi u. a., 2006). Es gibt Hinweise dafür, dass NG2+ Zellen auch zu Astrozyten und Neuronen differenzieren können und über synaptische Verbindungen verfügen (Nishiyama u. a., 2009). Die OPCs differenzieren weiter zu postmitotischen Oligodendrozyten, die *galactocerebroside* (GalC), 2', 3', Zyklische nukleotid 3' phosphodiesterase (CNPase) und *proteolipid protein* (PLP) exprimieren. Diese beginnen die Zellmembran zu vervielfachen (dabei vergrößert sich die Oberfläche um das 6500-Fache (Freeman & Rowitch, 2013)) und Axone in ihrer Umgebung zu umwickeln. Die Myelinisierung wird durch spezielle Proteine ermöglicht, darunter *myelin associated glycoprotein* (MAG), *myelin oligodendrocyte protein* (MOG), PLP und *myelin basic protein* (MBP) (Buchet & Baron-Van Evercooren, 2009). Die genauen Mechanismen sind dabei nicht vollständig bekannt, erwiesen ist eine Stimulation der Myelinisierung (Emery, 2010) sowie der Proliferation von OPCs (Gibson u. a., 2014) durch die elektrische Aktivität der Axone. Auch Astrozyten sind an diesem Vorgang durch die durch neuronale Aktivität ausgelöste LIF Ausschüttung beteiligt (Ishibashi u. a., 2006). Für die Differenzierung und Myelinisierung spielt Eisen eine wichtige Rolle: Eisenmangel in der Kindheit kann zu Hypomyelinisierung führen (Morath & Mayer-Pröschel, 2001; Todorich u. a., 2009). Das Schilddrüsenhormon T3 sowie Apotransferrin wirken ebenfalls stimulatorisch auf Proliferation, Differenzierung und Myelinisierung (Marziali u. a., 2015). In der Maus findet die Ausdifferenzierung der Oligodendrozyten sowie die Myelinisierung ab der späten Embryonalperiode statt, erreicht ihren Höhepunkt jedoch erst zwischen dem 5. und 15. Postnataltag (P). Der Prozess erstreckt sich auch darüber hinaus bis mindestens P40 (Semple u. a., 2013; Reemst u. a., 2016). Beim Menschen entstehen oligodendrogliale Vorläufer vor allem zwischen der 18. und 28. Woche p.c., die Myelinisierung beginnt im Anschluss und zieht sich über die gesamte Kindheit bis in die Pubertät (Semple u. a., 2013).

1.6.3 *In vitro* Differenzierung der neuronalen Zelltypen des ZNS

Für die Differenzierung von Neuronen *in vitro* wurden zahlreiche Protokolle entwickelt, die funktionell unterschiedliche neuronale Populationen erzeugen. Dabei ist die Differenzierung sowohl aus verschiedenen Stadien neuronaler Vorläuferzellen als auch direkt aus pluripotenten Stammzellen möglich (zusammengefasst in Mertens u. a., 2016). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Differenzierung von Neuronen aus RGL-NPCs durch Entzug der Faktoren EGF und FGF sowie Zugabe von *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und Ascorbinsäure. BDNF ist ein Wachstumsfaktor, der elementar für die neuronale Differenzierung ist (Bartkowska u. a., 2007).

In vitro können Astrozyten aus neuronalen Stammzellen durch Kultur in serumhaltigem Medium differenziert werden (Goldman u. a., 1986), wobei vermutlich das im Serum enthaltene BMP für die Differenzierung verantwortlich ist (Hu u. a., 2010). Auch unter serumfreien Bedingungen ist die Differenzierung reifer Astrozyten durch Stimulation mit BMP, LIF oder CNTF möglich (Bonaguidi u. a., 2005).

Die *in vitro* Differenzierung von Oligodendrozyten aus neuronalen Stammzellen erfolgt analog in mehreren Schritten: In einem ersten Schritt werden je nach Protokoll durch Zugabe von bFGF, EGF, PDGF oder Noggin OPCs generiert. Die Reifung zu myelinisierenden Oligodendrozyten findet dann unter Zugabe von T3, CNTF und Ascorbinsäure auf einer Laminin-haltigen Matrix statt (Alsanie u. a., 2013; Gorris u. a., 2015a).

1.7 Disease Modelling

Um Krankheiten im Labor nachstellen und untersuchen zu können stehen im Wesentlichen zwei verschiedene Ansätze zur Verfügung. Mit Hilfe von Tiermodellen lassen sich Krankheiten *in vivo* untersuchen, die Übertragbarkeit von Tierversuchen auf den Menschen ist jedoch nicht immer gegeben (Eisea & Lucas, 2002).

Eine weitere Möglichkeit stellt die *in vitro* Modellierung beispielsweise durch genetische Veränderung humaner Zellen dar (Jakel u. a., 2004a). Durch die Entwicklung von iPS Zellen ist es möglich geworden, Krankheiten mit patientenspezifischen Zelllinien nachzustellen (Jakel u. a., 2004b). Auf diese Weise lassen sich pathophysiologische Prozesse an humanen Zellen relativ einfach und ohne die ethischen und regulatorischen Schwierigkeiten von Tierversuchen untersuchen.

Die Nachteile des *in vitro disease modelling* liegen in der starken Vereinfachung des Systems. Das Zusammenspiel auf Gewebe-, Organ- und Organismusebene lässt sich in konventionellen 2D-Kulturen nur unzureichend darstellen, da die Zellen in einer artifiziellen Umgebung ohne den physiologischen Zellverband und mit deutlich reduzierten Zell-Zell-Kontakten kultiviert werden.

1.7.1 Organoide und Sphäroide

In den letzten Jahren ist es zunehmend möglich geworden, nicht nur einzelne Zelltypen isoliert aus Stammzellen zu differenzieren, sondern auch dreidimensionale Strukturen zu erzeugen, sogenannte Sphäroide oder Organoide. Sphäroide stellen dabei grundsätzlich alle dreidimensional-sphärischen Kulturen von Zellen dar, unabhängig von ihrer Zusammensetzung und regionalen Mustern (Paşca u. a., 2015).

Organoide haben dagegen den Anspruch die histologische Architektur von Organen möglichst genau nachzubilden. Dazu gehört bei ZNS Organoiden die Darstellung der verschiedenen Schichten, insbesondere des Kortex sowie die Regionalisierung und Migration der verschiedenen Zelltypen während der Organogenese (Lancaster & Knoblich, 2014; McCracken u. a., 2014; Clevers, 2016).

1.7.2 Ziel der Arbeit

Obwohl die genetische Ursache für Morbus Canavan bekannt ist, sind die pathophysiologischen Zusammenhänge weiterhin unklar. Es gibt bis heute keine kausale Therapie, die medizinischen Möglichkeiten beschränken sich auf palliative Maßnahmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe von patientenspezifischen iPSC ein *in vitro* Krankheitsmodell für Morbus Canavan etabliert werden. Dazu sollten zunächst Fibroblasten von CD Patienten zu iPSC reprogrammiert werden. Aus diesen sollten anschließend RGL-NPC und daraus wiederum Astrozyten, Neurone und Oligodendrozyten generiert werden, um eine genaue Auswertung phänotypischer Auffälligkeiten *in vitro* zu ermöglichen. Der besondere Fokus dieser Arbeit sollte dabei vor allem auf der im Mausmodell bisher nicht beschriebenen Pathologie in Astrozyten liegen. Dazu sollten von CD Patienten iPSC abgeleitete Astrozyten detailliert untersucht werden. Neben der Zellmorphologie steht vor allem die mitochondriale Beteiligung sowie die Vakuolenbildung im Fokus der Arbeit. Die CD und Kontroll-Astrozyten wurden zunächst licht- und elektronenmikroskopisch analysiert. Auch der funktionelle Status der Mitochondrien sollte korreliert werden. Zur Darstellung der Vakuolisierung wurde auf ein dreidimensionales Modell aus astrozytären Sphäroiden zurückgegriffen, um die Pathologie im Gewebeverband darstellen zu können.

In einem weiteren Schritt sollte der Versuch unternommen werden, die Pathologie durch Überexpression des *ASPA* Gens in CD-RGL-NPC zu beheben. Die vorliegende Arbeit stellt in Zusammenschau mit den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Reisenhofer, 2012; Mizhorova, 2014, unveröffentlichte Arbeiten von Vivian Kaps und Julia Fischer) nach unserer Kenntnis den ersten Ansatz dar, die Pathologie von Morbus Canavan *in vitro* anhand humaner neuraler Zellen zu modellieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav D-150	Systemec, Deutschland
Tischzentrifuge Cetrifuge 5415D	Eppendorf, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Deutschland
Mini Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR
PH Meter Mettler Toledo	Mettler Toledo Gruppe
Pipetboy accu-jet pro	BioRad, Deutschland
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries
Western Blot Power Pac 200	BioRad, Deutschland
Thermocycler Professional Trio	Biometra, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 40R	Thermo Scientific
Kühlschrank -80°C U570 Premium	New Brunswick, USA
Kühlschrank -150°C VIP Plus	Panasonic
Inkubator HeraCell	Kendro, Deutschland
Fuchs-Rosental Zählkammer	Carl Roth, Deutschland
FACS Sorter Diva	BD Bioscience, USA
Mikroskop DMI8	Leica Microsystems, Deutschland
Mikroskop Kamera OrcaFlash 4.0	Hamamatsu, Japan
TempController 2000.2	Pecon, Deutschland
Transmissions-Elektronenmikroskop	Phillips CM10
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Deutschland
Mikroskop Imager Z.1 Apotome	Carl Zeiss, Deutschland
Mikroskop Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Deutschland
Mikroskop Confocal IX81	Olympus, Deutschland
Nanodrop 1000	PEQLAB, Deutschland
Pipettierhilfe AccuJet	Brand, Deutschland
Kühlschränke -20°C	Liebherr, Deutschland

Kühlschränke 4°C	Liebherr Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Kendro, Deutschland
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Deutschland
Wasserbad 1008	GFL, Deutschland
QPCR Cycler	Eppendorf, Deutschland
Microm HM 355S	Thermo Scientific, USA
Einbett Automat Excelsior AS	Thermo Scientific, USA
Paraffin Straße TES99	Medite, Deutschland
Zellsieb-Falcon Cell Strainer 40 µm	BD Bioscience, USA

2.1.2 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CC	Adobe, USA
Adobe Illustrator CC	Adobe, USA
Axio Vision	Carl Zeiss, Deutschland
Leica Application Suite	Leica Microsystems, Deutschland
NanoDrop 1000	Thero Scientific, USA
Quantity One	BIO-RAD, Deutschland
Microsoft Office 2008	Microsoft, USA
SPSS Statistics v.25	IBM, USA
Fiji ImageJ	National Institutes of Health, USA
EM Software	iTEM Desktop, ResAlta Research Technologies, USA
ReadCube	

2.1.3 Chemikalien und Zellkulturagentien

Zellkultur

Substanz	Hersteller
3,3,5- Triiodthyronin (T3)	Sigma Aldrich, Deutschland
Accutase	Millipore, Deutschland
B-27 Supplement	Invitrogen, Deutschland
beta-Mercaptoethanol	Invitrogen, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Deutschland
Collagenase IV	Invitrogen, Deutschland
Cytotune Sendai Kit	Thermo Scientific, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Deutschland
DMEM/F-12	Invitrogen, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Deutschland
EGF	R&D Systems, Deutschland
FCS	Invitrogen, Deutschland
FGF2	R&D Systems, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gelatine	Invitrogen, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich, Deutschland
KnockOut DMEM	Invitrogen, Deutschland
KnockOut Serum Replacement	Invitrogen, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Deutschland
Laminin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Matrigel	BD Bioscience, Deutschland
N2 Supplement	Invitrogen, Deutschland
NGS	Sigma-Aldrich, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deutschland
PBS	Invitrogen, Deutschland

Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Deutschland
Protease Inhibitor (Halt)	Thermo Scientific, Deutschland
Retinsäure	Carl Roth, Deutschland
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich, Deutschland
(Apo-)Transferrin	Millipore, Deutschland
TRIS	Carl Roth, Deutschland
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	Invitrogen, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Deutschland
Y-27632 (ROCK Inhibitor)	Tocris Bioscience, Vereinigtes Königreich

Molekularbiologie und Immuncytochemie

Substanz	Hersteller
DAPI	Sigma-Aldrich, Deutschland
ddH ₂ O Ampuwa	Fresenius Kabi, Deutschland
DNA ladder	New England Biolabs, USA
DNase	Cell Systems, Deutschland
DNeasy Blood & Tissue Kit	Quiagen, Deutschland
dNTP	PEQLAB, Deutschland
Eosin G Lösung 1%	Carl Roth, Deutschland
Ethanol	Merck, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deutschland
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega, USA
Hämatoxylin CAT	Biocare Medical
Infinium Global Screening Array Bead Chip	Illumina, USA
iScript reverse Transkriptase	BIO-RAD, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Deutschland
Mitotracker® FM Red	Thermo Scientific, Deutschland
Natrium Pyruvat	Invitrogen, Deutschland
Natrium Selenit	Sigma-Aldrich, Deutschland

Precision Plus Protein Dual Color Standards	BIO-RAD, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Deutschland
Triton	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypanblau	Merck, Deutschland
Tween®20	Carl Roth, Deutschland

2.1.4 Plastikware

Produkt	Hersteller
4-, 6-, 12-, 24- well Zellkulturplatten	Nunc, Deutschland
24- well Zellkulturplatten 15µm	Ibidi, Deutschland
4- well Zellkulturslider 15µm	Ibidi, Deutschland
Zellschaber	Corning, USA
Zellsieb Nylon (40 µm)	BD Biosciences, Deutschland
Cryovials (1, 1,8ml)	Nunc, Deutschland
Falcon® Tubes (15, 50ml)	BD Biosciences, Deutschland
PCR 8-strip Tubes	Biozym, Deutschland
Petrischalen	BD Biosciences, Deutschland
Pipettenspitzen	Nerbe Plus, Deutschland
Spritzen	BD Biosciences
Sterilfilter (0,45µm)	Sarstedt, Deutschland
Zellkulturschalen (3,5, 6, 10, 15cm)	BD Biosciences, Deutschland
Eppendorf Tubes	Greiner Bio-One, Deutschland
Ultra-low attachment dishes	Corning, USA
Aggrewell® 400	Stemcell Technologies, Kanada
Plastikpipetten (1, 2, 5, 10, 25ml)	BD Biosciences, Deutschland
µ-Plate 24-well Platten (180 µm)	Ibidi GmbH, Deutschland
Einfrierbehälter CoolCell®	Corning, USA

2.1.5 Primer

Zielgen	Sequenz	Länge	HT
<i>ASPA</i>	CACTACCCTGCTACGTTTATCTG GGATACTTGGCTATGGAACGAG	126 bp	60 °C
<i>Nat8L</i>	CTGTGGACTCACGTTTCCGA AGCGACTCGTAGAGCTTGTG	145 bp	60 °C
<i>BLBP</i>	CGAGCGCTCCTTCCCTTCTCCT AGCCCACGCCTAGAGCCTTCAT	300 bp	60 °C
<i>CNP</i>	GCCTTCACGCTGACCATCTC GCAGTTGCTGCTCGCTTAACT	82 bp	61 °C
<i>GAPDH</i>	TGACAACTTTGGTATCGTGGA TGACAACTTTGGTATCGTGGA	141bp	60 °C
<i>MPB</i>	GAGCCCTCTGCCCTCTCATGCC TCAGGGACAGTCCTCTCCCCTTTCCC	215 bp	60 °C
<i>NG2</i>	ACTTGCATCCGCGGCTTCTTCTT ACAACGTGGCCCAGCCCTCTA	296 bp	60 °C
<i>Olig1</i>	AGAGCGAGGCCGAGCAAGGA AAGCGCGCAACTCCAGGGAC	228 bp	60 °C
<i>PAX6</i>	GTGTCCAACGGA TGTGTGAG CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC	254 bp	60 °C
<i>PDGFR</i>	CTATCCACACTGTCAAACAGGTTG ACTGCTGGACTGAGAAGTTTCATC	454 bp	60 °C
<i>SeV</i>	GGATCACTAGGTGATATCGAGC ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC	181 bp	55 °C
<i>SOX2</i>	GCCGAGTGGAACCTTTTGTCG GCCGAGTGGAACCTTTTGTCG	154 bp	60 °C
<i>S100b</i>	AAAGAGCAGGAGGTTGTGGA AGGAAAGGTTTGGCTGCTTT	161 bp	60 °C

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Immunglobulin	Verdünnung	Hersteller
GFAP	Kaninchen IgG	1:1000, PBT1	Merck, Deutschland
AFP	Kaninchen IgG	1:200, PBS/A	DAKO, Dänemark
ASPA	Kaninchen IgG	1:1000, PBT1	Sigma-Aldrich, Deutschland
β -III-Tubulin	Maus IgG	1:1000, PBT1	Covance, USA
CD133	Maus IgG	1:20, FACS Puffer	Miltenyi Biotech, Deutschland
HN	Maus IgG	1:1000	Life Technologies, USA
MBP	Ratte IgG	1:25, PBT1	Abcam, USA
Nestin	Maus IgG	1:100	R&D Systems, Deutschland
O4	Maus IgM	1:100 PBS/A	R&D Systems, Deutschland
OCT3/4	Kaninchen IgG	1:400 PBT1	Santa Cruz Biotechnology, USA
Olig2	Kaninchen IgG	1:200 PBT1	Millipore, Deutschland
Pax6	Kaninchen IgG	1:100 PBT1	Covance, USA
SMA	Maus IgG	1:200 PBT1	Millipore, Deutschland
SOX2	Maus IgG	1:100 PBT1	R&D Systems, Deutschland
SOX9	Ziege IgG	1:200 PBT1	R&D Systems, Deutschland
SSEA4	Maus IgG	1:200 PBS/A	DSHB, USA
Tra1-60	Maus IgM	1:500 PBS/A	Millipore, Deutschland

Tra1-81	Maus IgM	1:500 PBS/A	Millipore, Deutschland
Vimentin	Maus IgM	1:500 PBT1	Millipore, Deutschland
Human	Maus IgG	1:100 PBT1	Abcam, Vereinigtes Königreich
Mitochondria			Königreich
S100 β	Kaninchen IgG	1:500 PBT1	Abcam, Vereinigtes Königreich

Sekundärantikörper

Floureszenzfarbstoff	Antigen	Verdünnung	Hersteller
Alexa 555	Anti-Kaninchen IgG	1:1000 PBS	Invitrogen, Deutschland
Alexa 555	Anti-Maus IgG	1:1000 PBS	Invitrogen, Deutschland
Alexa 488	Anti- Kaninchen IgG	1:1000 PBS	Invitrogen, Deutschland
Alexa 488	Anti-Maus IgG	1:1000 PBS	Invitrogen, Deutschland
Alexa 488	Anti-Maus IgM	1:1000 PBS	Invitrogen, Deutschland
Alexa 555	Anti-Ziege IgG	1:1000 PBS	Invitrogen, Deutschland
Alexa 488	Anti-Ratte IgG	1:1000 PBS	Invitrogen, Deutschland
Alexa 555	Anti-Ratte IgG	1:1000 PBS	Invitrogen, Deutschland

2.1.7 Zellkultur

Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt drei von CD Patientenfibroblasten abgeleitete sowie drei humane Kontrolllinien verwendet (Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Ethikvotum 275/08). Darüber hinaus wurden drei Zelllinien von Mäusen sowie MEF Zellen als Feeder-Zellen verwendet.

Die Zelllinien C6, CD7 und CD8 wurden im Rahmen vorheriger Arbeiten der Arbeitsgruppe von Miriam Reisenhofer (Reisenhofer, 2012) reprogrammiert. Die Validierung erfolgte teilweise im Rahmen der Masterarbeit von Marija Mizhorova (Mizhorova, 2014). Die Zelllinie KO#S8 wurde von Kim Erwes reprogrammiert. Die Reprogrammierung und Validierung der Zelllinie FAC19 erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

Zellen mit ASPA Mutation (Morbus Canavan Zellen)

- CD7 Die CD7 Zelllinie ist aus CD Patientenfibroblasten abgeleitet, die vom Coriell Institut (Camden, USA) bereitgestellt wurden (GM04260). Sie enthalten die homozygote Mutation c.914 C>A (p.Ala305Glu) im ASPA Gen. Dies ist die häufigste Mutation bei nicht jüdischen Patienten. Außerdem liegt heterozygot die Mutation c.527 C>A (p.Gly176Asp) vor. Der Patient war zum Zeitpunkt der Zellentnahme zwei Jahre alt.
- CD8 Die CD8 Fibroblasten wurden ebenfalls vom Coriell Institut zur Verfügung gestellt (GM00068). Bei diesen Zellen liegt im ASPA Gen die Mutation c.854A>C (p.Glu285Ala) homozygot vor, die die häufigste Mutation bei jüdischen Patienten darstellt. Der Patient war bei der Entnahme der Zellen zwei Jahre alt.
- FAC19 Die Fibroblasten der Linie FAC019 wurden von Prof. Sass (Universität Basel) zur Verfügung gestellt. Sie enthalten die homozygote Mutation c.914C>A(p.Ala305Glu). Die Patientin war bei Zellentnahme vier Jahre alt.

Humane Kontrollzellen

- C6#S1 Die C6 Zelllinie ist von Fibroblasten eines gesunden, 33 jährigen, männlichen Spenders abgeleitet. Die Fibroblasten wurden vom Coriell Institut bezogen.
- KO#S8 Die KO Zelllinie ist von Fibroblasten eines gesunden, 22 jährigen, weiblichen Spenders abgeleitet. Die Fibroblasten wurden vom Coriell Institut bezogen.

Murine Zelllinien

ms 1-3 Die murinen NSC Linien ms1, ms2 und ms3 wurden von Julia Fischer aus ASPA- und immundefizienten Mäusen, Embryonaltag E14.5 (Mausstamm-Bezeichnung: C3Fe.SWV.C57BL/6- Aspa^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} Rag2^{tm1CGN} Il2rg^{tm1Wjl/J}) präpariert.

Stocklösungen

Retinsäure (ATRA)	10 mM in DMSO	-80°C
Apo-Transferrin	10 mg/ml in H ₂ O	-20°C
Ascorbinsäure	100 mM in H ₂ O	-20°C
BDNF	10 µg/ml in 0,1% BSA in PBS	-20°C
EGF	10 µg/ml in 0,1% BSA + 10 mM Eisessig in H ₂ O	-20°C
bFGF	10 µg/ml in 0,1% BSA in PBS	-20°C
Forskolin	0,01 M in Ethanol	-20°C
Insulin	5 mg/ml in 10 mM Natriumhydroxid	-20°C
Noggin	100 µg/ml in PBS	-20°C
PDGF-AA	10 µg/ml in 0,1% BSA + 4 mM HCL in H 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
DNase	10 mg/ml in PBS	-20°C
L-Glutamin	200 mM	-20°C
Penicillin/Streptomycin	10000 U/ml; 10000 µg/ml	-20°C

Zellkulturmedien

N2-Medium

DMEM/F12

1,6 g/l Glucose

1 % N2-Supplement

0,02 mg/ml Insulin

1 % Penicillin/Streptomycin

N2Diff-Medium

N2 Medium

0,1 mg/ml humanes apo-Transferrin

iPSC-Medium

Knockout DMEM

20 % Knockout Serum Replacement

0,1 mM NEAA

1 mM L-Glutamin

0,1 mM 2-Mercaptoethanol

40 ng/ml bFGF

DMEM/F12-basiertes iPSC
Medium (Reprogrammierung)

400 ml DMEM/F12

100 ml Serum Replacement

5 ml NEAA

2 ml L-Glutamin

1 ml b-ME

5 ml Pen/Strep

4-10 ng bFGF

MEF-Medium

D-MEM

10 % FCS, hitzeinaktiviert

1 mM Natrium Pyruvat

0,1 mM NEAA

1 mM L-Glutamin

EB-Medium

Knockout DMEM

25 % Serum Replacement

1,25 % NEAA

1,25 % L-Glutamin

Einfrriermedium (für NSC und
ESC/iPSC)

90 % Serum Replacement

10 % DMSO

E („essential“) 8 Medium

DMEM/F12 + HEPES

64 µg/ml LAAP

14 ng/ml Natriumselenit

10 ng/ml Tranferrin

20 µg/ml Insulin

50 ng/ml TGF-β

40 ng/ml bFGF

1 µg/ml Heparin

Sonstige

Zellkultur-Lösungen

Trypsin	95 % PBS 5 % Trypsin-EDTA (10x)
Trypsin-Inhibitor	H ₂ O 0,25 g/l Trypsin Inhibitor (Sojabohnenextrakt)
PBS-EDTA	PBS 1,8 mg/ml NaCl 0,25 % EDTA (50 mM)
FACS Puffer	PBS 0,1 % BSA
FACS Blockpuffer	FACS Puffer 5 % NGS

Beschichtungen

Poly-L-Ornithin (PO)	Die Zellkulturschalen wurden über Nacht bei 37 °C mit Poly-L-Ornithin (PO) 15 µg/ml in PBS inkubiert. Vor der Verwendung wurden die Schalen zweimal mit PBS gewaschen.
PO/Laminin (PO/Ln)	PO beschichtete Schalen (s.o.) wurden nach dem Waschen über Nacht bei 37 °C mit 2 µg/ml Laminin in PBS inkubiert.
Matrigel	Matrigel wurde auf Eis über Nacht aufgetaut und im Verhältnis 1:30 in DMEM/F-12 Medium gelöst. Zur Beschichtung wurden die Zellkulturschalen über Nacht bei 4 °C inkubiert.
Gelatine	Zellkulturschalen wurden für mindestens 30 Minuten mit 0,1 % Gelatine bei 37 °C inkubiert.

2.1.8 Molekularbiologie und Immuncytochemie

Pufferlösungen für die Immuncytochemie

<u>Fixierlösung (4% PFA)</u>	<u>0,1 % PBS Azid</u>
1 l PBS	500 ml PBS
40 g Paraformaldehyd (PFA)	0,1 % Natriumazid
<u>PBS/A</u>	<u>PBT1</u>
500 ml PBS	PBS
0,1 % Rinder-Serumalbumin (BSA)	1 % BSA
	0,1 % Tritonx100

Gelelektrophorese

50x Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE)

242 g Tris

100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)

57,1 ml Eisessig

1 l dd H₂Ovor Benutzung 1:50 mit ddH₂O verdünnt

Proteinbiochemie

4x SDS-PAGE Sample Puffer

4 ml 100 % Glycerol

2,4 ml 1 M Tris-HCL, pH 6,8

8,0 g SDS

0,04 g Bromphenolblau

0,5 ml beta-Mercaptoethanol

10x Lauffuffer

10 g SDS

30,3 g Tris

144,1 g Glycin

800 ml ddH₂O-> mit H₂O auf 1000 ml auffüllen1x Transferpuffer

2,9g Glycerin

5,8g Tris

0,37g SDS

200ml Methanol

-> mit H₂O auf 1000 ml auffüllen1x TBS

6,05 g Tris

8,74 g NaCl

800 ml ddH₂O

-> pH 7,5

-> mit H₂O auf 1000 ml auffüllen1x TBS-T

1 l TBS

0,1 % Tween®

Blockierlösung

95 % TBS/TBS-T

5 % Milchpulver

Ponceau S Färbelösung

1 g Ponceau S

50 ml Essigsäure

-> mit H₂O auf 1000 ml auffüllen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Mediumwechsel und Passagierung wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle Medien wurden vor dem Mediumwechsel im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Sofern nicht angegeben wurden die Zellen bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die Zählung der Zellen erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer nach Anfärbung mit Trypanblau (25 µl Zellsuspension in 75 µl Trypanblau).

Kultur der Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden auf mit 0,1 % Gelatine beschichteten Zellkulturschalen in MEF Medium kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,05 % TE abgelöst. Die Zellen wurden in MEF Medium aufgenommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und auf Gelatine beschichtete Zellkulturschalen ausgebracht.

Die Kryokonservierung erfolgte in DMEM mit 20 % FCS und 10 % DMSO.

2.2.2 Reprogrammierung

Alle Schritte die Sendai Viruspartikel involvieren wurden unter S2 Sicherheitsbedingungen durchgeführt.

Für die Reprogrammierung wurden die humanen Fibroblasten auf Matrigel™ beschichteten 24 well Platten ausgesät. Einen Tag nach der Passagierung wurden sie mit CytoTune™ Sendai Vektoren (*hOCT3/4*, *hSOX2*, *hKLF4*, *hC-MYC*) inkubiert. Dabei handelt es sich um virale RNA-Vektoren, die im Zytoplasma replizieren und nicht in der Lage sind, sich in das Wirtsgenom zu integrieren. Dadurch ermöglichen sie eine transiente Überexpression der zur Reprogrammierung notwendigen Gene (LIEU u. a., 2013).

Dazu wurden 100 µl der Vektor-Lösung in 4 ml Advanced DMEM mit 5 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep aufgenommen. Das Medium auf den Fibroblasten wurde durch 250 µl pro Well dieser Lösung ersetzt. Die Zellen wurden für 45 min bei 32 °C und 1500 g zentrifugiert und anschließend für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Vektor enthaltende Medium entfernt und durch Advanced DMEM Medium ersetzt.

Nach sieben Tagen wurden die Zellen eine Stunde mit ROCK Inhibitor inkubiert und anschließend mit TE abgelöst. Die Zellen wurden in TI aufgenommen und zentrifugiert. Die Zellen wurden in Advanced DMEM mit 10 μ M ROCK Inhibitor auf 10 cm Zellkulturschalen mit MEF Feeder-Zellen ausgesät (10⁶ Zellen/Schale). Am nächsten Tag wurde das Medium durch DMEM/F-12 basiertes iPSC Medium mit 10 ng/ml FGF2 ersetzt. Die Zellen wurden für 28 Tage bei zweitägigem Mediumwechsel kultiviert. Anschließend wurden die Kolonien manuell vereinzelt. Dazu wurden die Zellen eine Stunde mit ROCK Inhibitor inkubiert und die Kolonien mit einer 100 μ l Pipette unter dem Mikroskop unter der Sterilbank aufgenommen. Die einzelnen Kolonien wurden dann in eine neue, mit Feeder-Zellen beschichtete 24-Well Zellkulturplatte transferiert und in iPSC Medium kultiviert. Um die vollständige Entfernung der viralen Vektoren zu validieren wurde die Kolonien gegen die virale Hämagglutinin-Neuramidase (HN) gefärbt. Außerdem wurde eine RT-PCR mit Sendai-Virus spezifischen Primern durchgeführt.

2.2.3 Validierung der Pluripotenz der iPSC

Um die Pluripotenz der generierten iPSC zu validieren wurden die Zellen auf die Pluripotenzmarker *tumor rejection antigen 1-60* (TRA--1-60), TRA-1-81, *stage-specific embryonic antigen 4* (SSEA4) sowie *Oct3/4* gefärbt.

Zur Differenzierung in die drei Keimblätter wurden die Kolonien mit 1 mg/ml Kollagenase für 1 h bei 37 °C inkubiert, abgelöst, zentrifugiert und in EB Medium aufgenommen. Nach drei Wochen wurden die EBs auf Gelatine beschichtete Zellkulturschalen plattiert und für weitere drei Wochen in MEF Medium für meso- und endodermale und in N2 Medium auf Matrigel für ektodermale Differenzierung kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die erfolgreiche Differenzierung wurde durch Färbung gegen die Antigene β -III-Tubulin (TUB3, Ektoderm), *smooth muscle actin* (SMA, Mesodern) und Alpha-Fetoprotein (AFP, Endoderm) bestätigt.

2.2.4 Validierung der genomischen Integrität der iPSC

Um die genomische Integrität der generierten iPSC zu validieren wurde eine small nuclear polymorphism (SNP) Analyse durchgeführt. Die Untersuchung wurde am Institut für Humangenetik der Universität Bonn unter Verwendung des *Infinium Global Screening*

Array Beac Chip durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Julia Fischer.

2.2.5 Kultur humaner induzierter pluripotenter Stammzellen

Humane iPS Zellen wurden auf murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) als *feeder* Zellen oder auf Matrigel kultiviert.

iPSC Kultur auf MEF

Die humanen iPSC wurden auf einem konfluenten Zellrasen aus MEF in iPSC Medium kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt, eine Passagierung fand alle 3-4 Tage bei Konfluenz statt. Zum Ablösen wurden die Zellen für etwa 1 h mit 1 mg/ml Kollagenase Typ IV in DMEM-KO inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf MEF ausgebracht. Die MEF wurden am Vortag in MEF Medium aufgetaut und auf Gelatine beschichtete Platten ausgesät.

iPSC Kultur im E8 System

Die *feeder*-freie Kultur erfolge nach dem E8 Protokoll (Guokai Chen u. a., 2011), dazu wurden die iPSC in E8 Medium auf Matrigel beschichteten 6 well Platten kultiviert. Mediumwechsel fand täglich, eine Passagierung etwa alle 3-5 Tage bei etwa 80 % Konfluenz, statt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS-EDTA gewaschen und bei RT ca. 5 min mit PBS-EDTA inkubiert. Anschließend wurde das PBS-EDTA abgesaugt, die Zellen in frischem E8 Medium aufgenommen und auf eine neue, beschichtete 6 well Platte überführt.

2.2.6 Kryokonservierung

Die Zellen wurden in Flüssigstickstofftanks kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen für 5-10 min mit Accutase inkubiert, abgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in ein Cryovial überführt. Dieses wurde anschließend in einem Einfrierbehälter langsam (1°C/min) auf -80 °C abgekühlt und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C schnell erwärmt, im Verhältnis 1:10 in Medium aufgenommen und zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in frischem iPSC Medium mit 10 μ M ROCK Inhibitor aufgenommen und ausgesät.

2.2.7 Generierung von RGL-NPC aus humanen iPSC

Die Generierung der RGL-NPC erfolgte nach einem publizierten Protokoll (Gorris u. a., 2015b). Dieses Protokoll benötigt 40 Tage.

Zur Generierung von EBs wurden die iPSC Kolonien 1h mit Kollagenase inkubiert, abgelöst, 3 min bei 800 rpm zentrifugiert, in iPSC Medium aufgenommen und auf eine unbeschichtete Zellkulturschale transferiert. Die Feeder-Zellen setzten sich über Nacht auf der Zellkulturschale ab und die EBs wurden am nächsten Tag auf EB Schalen transferiert. Nach drei Tagen wurde das iPSC Medium durch EB Medium ersetzt und die EBs eine weitere Woche in EB Medium bei zweitägigem Mediumwechsel kultiviert. Nach sieben Tagen wurde das Medium durch 50 % EB Medium und 50 % N2 Medium ersetzt, am achten Tag wurde 10 μ M RA hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen in einem dreischrittigen Protokoll in Medium mit abnehmender RA Konzentration kultiviert. Im ersten Schritt erfolgte die Kultur für sieben Tage in N2 Medium mit 1 % B27 Supplement und zusätzlich 10 μ M ATRA (*all-trans retinoic acid*). Im zweiten Schritt wurde für 14 Tage N2 Medium mit 1 % B27 verwendet, im dritten Schritt wurden die EBs für weitere sieben Tage in N2 Medium mit 1 % RA freiem B27 Supplement kultiviert. Im ersten Schritt erfolgte der Mediumwechsel täglich, in den weiteren Schritten jeden zweiten Tag. Im Anschluss an den dritten Schritt wurden die EBs auf Matrigel beschichtete 10 cm Zellkulturschalen transferiert und für 10-14 Tage bei täglichem Mediumwechsel in N2 Medium mit 1 % RA freiem B27 Supplement, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml FGF2 und 30 ng/ml T3 kultiviert.

Im Anschluss an dieses Protokoll wurden die Zellen per Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) nach Expression des Oberflächenantigens CD133 sortiert. Dazu wurden die Zellen mit TE abgelöst und mit einem Zellsieb vereinzelt. Die Zellsuspension wurde 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert und in einer Konzentration von 10^6 Zellen/50 μ l in FACS Blockpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4 °C mit CD133 Antikörper (1:20) inkubiert. Die Negativkontrolle verblieb in FACS Blockpuffer. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 in FACS Puffer aufgenommen. Unmittelbar vor dem FACS Vorgang wurde 20

µg/ml DNase hinzugegeben und die Zellen wurden erneut durch ein Zellsieb vereinzelt. Propidium iodid (500 ng/ml) wurde hinzugegeben, um die Kerne beschädigter Zellen anzufärben. Anschließend wurden die Zellen in der FACS Core-Facility des UKB sortiert. Die CD133 positiven Zellen wurden in N2 Medium mit 20 ng/ml EGF und 20 ng/ml FGF2 aufgenommen und auf Matrigel beschichtete 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät (0,8-1x10⁶ Zellen/ Schale). Nach mehreren Passagen wurden die Zellen auf PO/Ln beschichtete Schalen überführt.

2.2.8 Kultur RGL-NPC

Die RGL-NPCs wurden auf PO/Ln beschichteten Zellkulturschalen in N2 Medium mit je 20 ng/ml EGF und FGF2 kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. An Tagen ohne Mediumwechsel wurden Wachstumsfaktoren zugegeben.

Zur Passagierung erfolgte die Ablösung mit 0,025 % Trypsin in PBS für 3-5 Minuten und anschließender Inaktivierung mit Trypsin Inhibitor. Anschließend wurden die Zellen 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und auf neue Schalen ausgebracht.

2.2.9 Differenzierung der RGL-NPC in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten

Alle Zelldifferenzierungen erfolgten auf mit Matrigel beschichteten Zellkulturschalen.

Neurone

Zur neuronalen Differenzierung wurden die RGL-NPCs mindestens drei Wochen lang in N2 Medium mit 10 ng/ml BDNF und 100 µm AA inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage.

Astrozyten

Es wurden zwei verschiedene Protokolle zur astroglialen Differenzierung verwendet.

Im serumhaltigen Protokoll wurden RGL-NPCs mindestens zwei Wochen lang in N2 Medium mit 5 % hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. Dabei wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt.

Zur Generierung serumfreier Astrozyten wurden RGL-NPCs in auf *ultra low attachment dishes* ausgebracht, bis sie Sphären bildeten. Nach drei Tagen wurde das RGL-NPC

Medium durch N2Diff Medium mit 10 ng/ml LIF und 20 ng/ml BMP4 ersetzt. Nach mindestens drei Wochen wurden die Sphären auf Matrigel beschichteten Zellkulturschalen plattiert oder als Sphären analysiert.

Oligodendrozyten

Oligodendrozyten wurden in einem dreischrittigen Protokoll generiert. Im ersten Schritt wurden RGL-NPCs für zwei Wochen in N2Diff Medium mit 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml PDGF-AA und 4 µg/ml Forskolin kultiviert um gliale Vorläufer zu induzieren. Anschließend folgte eine Woche in N2Diff Medium mit 10 ng/ml PDGF-AA, 30 ng/ml T3, 200 µM AA und 20 ng/ml Noggin um die Proliferation oligodendroglialer Vorläufer zu stimulieren. Im letzten Schritt erfolgte die Differenzierung und Reifung für mindestens 4 Wochen in N2Diff Medium versetzt mit 30 ng/ml T3, 200 µM AA und 1 µg/ml Laminin.

2.2.10 Transfektion mit dem ASPA Vektor

Um eine CD Zelllinie zu erzeugen, die funktionelles ASPA Protein exprimiert, wurde ein lentiviraler Vektor mit einem Plasmid generiert, welches das ASPA Protein über den Promotor des *human elongation factor 1α* (*EF1α*) sowie ein Ampicillin-Resistenz Gen exprimiert (Abb. 7).

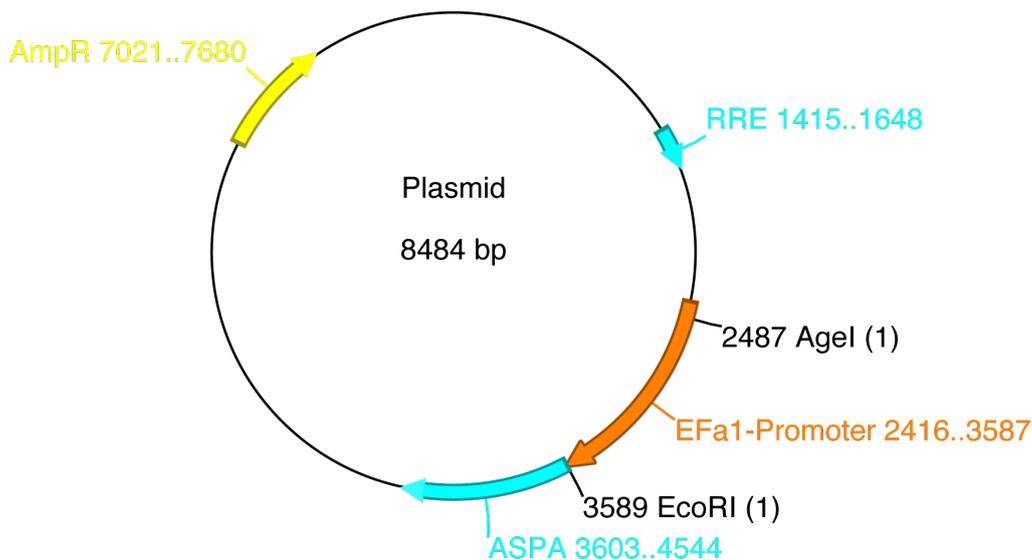


Abb. 7: Plasmid zur Überexpression von ASPA: Das verwendete Plasmid enthält eine optimierte ASPA Sequenz. Die Expression erfolgt über den konstitutiv exprimierten EF1 α -Promotor.. Zur Selektion enthält das Plasmid ein Ampicillin-Resistenz Gen (AmpR).

Der Vektor wurde freundlicherweise von Marija Mizhorova zur Verfügung gestellt.

Die Herstellung des lentiviralen Vektors erfolgte auf 293 FT Zellen. Dazu wurden die Zellen zwei Stunden mit Chloroquin (50 mM) inkubiert. Anschließend wurden je 10 cm Schale 293 FT Zellen folgende Plasmide in Calciumchlorid-Lösung zugegeben: 3 µg pMD2.G (Virushülle), 7,5 µg psPAX2 (Verpackung), 10 µg ASPA Plasmid. Es erfolgte die Inkubation der 293 FT Zellen für 6 Stunden. Dann wurde für mehrere Tage der Zellkulturüberstand gesammelt. Anschließend erfolgte die Virusisolation mit dem LentiX Concentrator Kit analog der Gebrauchsinformationen des Herstellers. Zur Kontrolle wurde ein paralleler Ansatz mit dem pMAX Plasmid zur Transfektionskontrolle sowie einem dem ASPA Plasmid analogen *green fluorescent protein* (GFP) exprimierenden Plasmid.

Anschließend erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem Vektor für 24h in N2 Medium bei 37 °C. Die Zelllinien FAC3 und CD8 wurden durch Vivian Kaps und Julia Fischer transfiziert, die Linie FAC19 im Rahmen dieser Arbeit.

Die Generierung des lentiviralen Vektors sowie die Infektion der Zellen erfolgte unter S2 Biosicherheitsbedingungen.

2.2.11 Immuncytochemie

Die Zellen wurden auf Zellkulturschalen fixiert. Dazu wurde das Medium entfernt und zweimal mit PBS (37 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei RT mit 4 % PFA Fixierlösung fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal für 10 min mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 30 min in Blockierlösung (TBS oder TBS-T (bei intrazellulären Antigenen zur Permeabilisierung der Zellmembran) mit 5 % Milchpulver) inkubiert. Dann wurde der Erstantikörper in Blockierlösung zwei Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mindestens eine Stunde mit dem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne durch einminütige Inkubation mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in Mowiol eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt. Für die Färbung in Multi-well Platten wurden Schalen der Firma ibidi (Zellkulturschalen mit Glasboden) verwendet, die Färbung erfolgte analog.

2.2.12 Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS)

Zum Sortieren der Zellen nach Expression des Oberflächenantigens CD133 wurden diese mit Accutase abgelöst. Dieser wurden 0,1 mg/ml DNase zugesetzt, um ein Verklumpen der Zellen zu verhindern. Dabei wurde eine Zelldichte von 6×10^6 Zellen/ml angestrebt. Diese wurden nach Zentrifugation (4 min bei 1200 rpm) in PBS mit 0,1 % Rinderserumalbumin (PBS/A) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis mit dem Primärantikörper inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit PBS/A. Anschließend erfolgte die Vereinzelung der Zellen durch ein $40 \mu\text{m}$ Zellsieb. Die Zellsuspension wurde bis zur Sortierung auf Eis gelagert. Die Zellsortierung wurde durch die Durchflusszytometrie core facility am Institut für experimentelle Immunologie durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden parallel verarbeitete Zellen ohne Inkubation mit dem Antikörper verwendet. Die Zellen wurden nach der Sortierung unmittelbar auf Matrigel plattiert.

2.2.13 Isolation von genomischer DNA und mRNA

Zur Isolation von mRNA sowie genomischer DNA wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Aus dem entstehenden Pellet wurden die Nukleinsäuren mit Hilfe des RNeasy mini Kits (RNA) bzw. DNeasy Blood & Tissue Kits (DNA) entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Aus der isolierten mRNA wurde mit Hilfe des iScript cDNA Synthesis Kit gemäß Herstellerangaben cDNA synthetisiert. Die Einstellung der Konzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop. Die PCR Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit der GoTaq® Flexi DNA Polymerase durchgeführt.

Dabei wurden die Reaktionsansätze wie folgt angesetzt:

GoTaq Puffer	10 μl
dNTP mix, 10 mM	je 1 μl
Primer	je 1 μM
GoTaq® Polymerase	0,25 μl (1,25 u)
Probe	< 0,3 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$
Wasser	auf 50 μl auffüllen

Die PCR wurde mit 34 Zyklen durchgeführt:

95 °C 2 min
 ---- Beginn Wiederholungssequenz (34 Zyklen)
 95 °C 30 s
 HT 30 s
 72 °C 30 s
 ---- Ende Wiederholungssequenz (34 Zyklen)
 72 °C 10 min
 4 °C bis Ende

Die Hybridisierungstemperatur (HT) ist für jedes Primerpaar angegeben.

Die Separierung erfolgte auf einem 1,5 % (in TAE-Puffer + 1 ng/ml Ethidiumbromid) Agarosegel. Die Darstellung erfolgte in einem BioRad Geldoc.

Sequenzierungen

Sofern nicht anders angegeben wurden die Sequenzierungen im Microsynth-Sequolab (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA mit dem Blood&Tissue Kit (Quiagen) extrahiert und die Konzentration auf 18 ng/100 bp Zielfragmentlänge eingestellt. Das Zielfragment wird mittels LongAmp DNA Polymerase mit folgendem Ansatz amplifiziert:

LongAmp Puffer	5 µl
dNTP	0,75 µl
Primermix (0,1 µM)	2 µl
DNA	100 ng
LongAmpTaq	1 µl
H ₂ O	auf 23,75 µl auffüllen

2.2.14 Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS mit einem Zellschaber abgelöst und zentrifugiert (8000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in kaltem RIPA Puffer aufgenommen, mit 2 µl Halt™ Protease und Phosphatase Inhibitor versetzt, 1 h bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend zentrifugiert (13200 rpm, 30 min, 4°C). Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mittels Pierce® BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Die SDS-PAGE wurde auf einem 5 % Sammelgel und einem 12 % Trenngel durchgeführt.

Sammelgel

2,7 ml H₂O
 0,67 ml 30% Acryl Bisacrylamid Mix
 0,5 ml Tris (1,5M, pH 6,8)
 0,04 ml 10% SDS
 0,04 ml 10% Ammoniumpersulfat
 0,004 ml TEMED

Trenngel

4ml H₂O
 3,3 ml 30 % Acryl Bisacrylamid Mix
 2,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8)
 0,1 ml 10 % SDS
 0,1 ml 10 % Ammoniumpersulfat
 0,004 ml TEMED

10 µg von jeder Proteinprobe wurde in 5 µl 4x Ladepuffer aufgenommen und mit Laufpuffer auf 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden in das Gel geladen. Die Auftrennung fand bei 30 mA für ca. 1-2 h statt. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Polyvinyliden Fluorid (PVDF) Membran übertragen. Dazu wurde diese 2 min in Methanol aktiviert. Das Gel wurde auf der PVDF Membran platziert. Ober- und unterhalb wurden je drei Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier in der Kammer (Transfergerät) platziert. Der Transfer wurde 2h bei 100mA durchgeführt. Das Vorhandensein von Protein wurde mittels Ponceau S Färbelösung bestätigt. Anschließend wurde das Gel mit TBS-T gewaschen und mit 5% Milchpulver in TBS-T 1h blockiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte in TBS-T + 5% Milchpulver über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit

TBS-T inkubierte die Membran mit Zweitantikörper eine Stunde bei RT, unmittelbar im Anschluss wurden die Proteine mittels ECL Advance Western Blotting Detection Kit im ChemiDoc visualisiert.

2.2.15 Messung der Komplex I Aktivität

Die Aktivität von Komplex I der Atmungskette wurde anhand des Sauerstoffverbrauches durch ein enzymatisches Essay bestimmt. Dazu wurden die Zellen differenziert und anschließend mittels Zellschaber abgetrennt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in Flüssigstickstoff konserviert. Die Isolation der Mitochondrien sowie die Enzymatischen Messungen wurden durch die Arbeitsgruppe von Wolfram Kunz am Institut für experimentelle Epileptologie der Universität durchgeführt. Die Methodik ist in (KUDIN u. a., 2004) beschrieben.

2.2.16 Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie

Die wie zuvor beschrieben mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gefärbten Zellen wurden die oben genannten Lichtmikroskope mit Lichtquellen in den Wellenlängen 493 nm, 553 nm und 653 nm verwendet.

Sphären

Für die Auswertung der dreidimensionalen Kulturen wurden die Sphären in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 5 µm dicke Schnitte erstellt und auf Glas Objektträger aufgezogen. Diese wurden mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Für die HE Färbung wurden die Schnitte 2 min mit Hämatoxylin Lösung inkubiert, und anschließend zum Entwickeln 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Inkubation mit Eosin erfolgte für 1-2 min, nach erneutem Waschen wurden die Zellen in Xylol entwässert und mit einem Deckglas abgedeckt.

LiveCell Mikroskopie

Für die Analyse der Mitochondrien lebender Zellen wurden diese auf ibidi µ-Plate 24-well Platten ca. eine Woche lang kultiviert. Dann wurden sie für 1 h im Inkubator mit Mitotracker™ Red FM (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) inkubiert. Anschließend

wurde das Medium gewechselt und die Zellen in den Inkubator des Mikroskops transferiert und für eine Stunde in diesem belassen, um zu vermeiden, dass Stressreaktionen auf Mediumwechsel und Transport das Ergebnis beeinflussen. Anschließend wurden die Mitochondrien fotografiert und ausgewertet.

Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Analyse wurden das Medium von den Zellen entfernt und nach einmaligem Waschen durch EM Puffer ersetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß zentrifugiert (13500 rpm, 10 min, RT). Das Pellet wurde durch Herrn Jörg Bedorf im Institut für Pathologie der Universität in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Untersuchung der Proben erfolgte mit einem dem Phillips CM10.

2.2.17 Auswertung der mikroskopischen Bilder und Statistik

Die Bilder wurden mit Hilfe der Fiji ImageJ Software (National Institutes of Health, USA) analysiert.

Dazu wurden die lichtmikroskopischen Aufnahmen in binäre schwarz-weiß Bilder umgewandelt. Die Erkennung der Mitochondrien erfolgte automatisch durch die Software (Abb. 8).

Bei den EM Aufnahmen wurden die Umrise der Mitochondrien manuell nachgezeichnet (Abb. 9, 10).

Anschließend erfolgte die automatische Analyse der Formparameter der Mitochondrien. Dabei wurden folgende Parameter ermittelt:

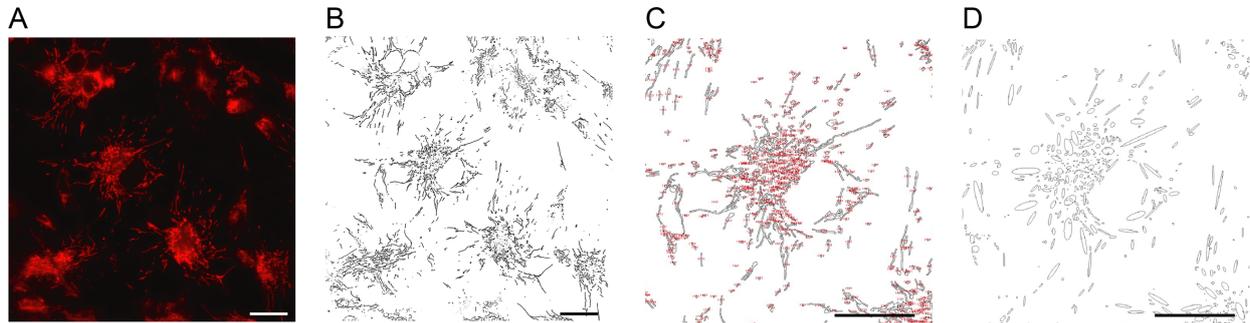


Abb. 8: Softwarebasierte Auswertung der lichtmikroskopischen Aufnahmen. **(A)** Aufnahme von Astrozyten gefärbt mit dem MitoTracker® **(B)** binärisiertes schwarz-weiß Bild **(C)** Automatische Erkennung der Objektumrisse durch die Software **(D)** Automatische Erstellung von Ellipsen um die Objekte, diese dienen zur Ermittlung der aspect ratio. Maßstabsbalken 25 µm

Parameter	Definition
Feret Durchmesser:	längster Abstand zwischen zwei Punkten auf der Randlinie
Fläche:	Fläche des Mitochondriums in der Schnittebene
Form Faktor:	$\frac{4\pi \times \text{Fläche}}{\sqrt{\text{Umfang}}}$
Aspect Ratio:	lange Achse/kurze Achse (Ellipse, die Objekt einschließt)

Form Faktor und Aspect Ratio dienen dabei als Parameter für die Morphologie der Mitochondrien. Ein Zusammenhang zwischen diesen und verschiedenen mitochondrialen Funktionsdefekten ist beschrieben (Koopman u. a., 2008).

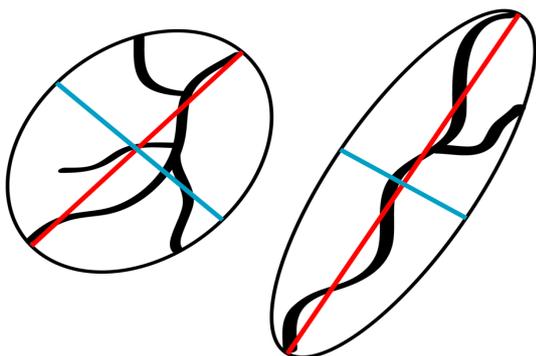


Abb. 9: Schema der Methode zur Ermittlung von Form Faktor und Aspect Ratio: Die Bildobjekte (Schwarze Linie) werden durch die kleinstmögliche Ellipse eingeschlossen. Anschließend wird die lange Achse (rote Linie) und die kurze Achse (blaue Linie) bestimmt.

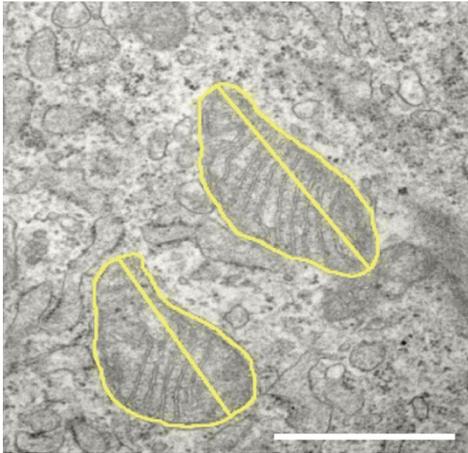


Abb. 10: Schema zur manuellen Vermessung vom Mitochondrien: In den TEM Bildern wurden die Umrise der Mitochondrien manuell nachgezeichnet, anschließend erfolgte die automatische Vermessung des Feret-Durchmessers (gerade gelbe Linie), Maßstabsbalken: 1 μm

2.3 Statistik

Die Statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der SPSS Statistics Software (IBM, USA).

Für die Angabe der Signifikanz gilt in der gesamten Arbeit folgende Nomenklatur: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$. Messwerte im Text sind \pm Standardfehler angegeben. Die Fehlerbalken in Graphen stellen das 95% Konfidenzintervall dar, sofern nicht anders angegeben. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde der Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Die Varianzhomogenität wurde mit dem Levene-Test untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Aus Fibroblasten von CD Patienten lassen sich induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) herstellen

Mit dem Ziel der Generierung eines zellbasierten Krankheitsmodells wurden Fibroblasten aus Hautproben von Morbus Canavan (*Canavan's disease*, CD) Patienten zu induziert pluripotenten Stammzellen (iPSC) reprogrammiert.

Die Patientenzelllinie FAC19 wurde im Rahmen dieser Arbeit reprogrammiert, alle anderen verwendeten iPSC wurden in vorherigen Arbeiten in der Arbeitsgruppe generiert und validiert. Die Reprogrammierung erfolgte mit dem CytoTune™-iPS Reprogramming Kit (Nishimura u. a., 2011), das auf der Infektion mit dem RNA-basierten Sendai-Virus (SeV) beruht. Die vier Faktoren *C-MYC*, *KLF4*, *OCT3/4* und *SOX2* wurden in die Zellen eingebracht. Die Zellen wurden darauf für 28 Tage auf Feeder-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF), kultiviert. Dabei handelt es sich um teilungsunfähige murine Fibroblasten, die für den Pluripotenzertalt wichtige Faktoren ins Medium sezernieren und eine Matrix bilden, auf der die iPSC wachsen können. Anschließend wurden die Kolonien manuell aufgenommen, in einzelne Kulturschalen überführt und fortan als separate Klone behandelt. Für die weitere Validierung wurden die beiden morphologisch homogensten und am stabilsten proliferierenden Klone (#3 und #4) ausgewählt. Alle weiteren Experimente wurden an Klon #4 durchgeführt. Nach etwa 10 Passagen wurden die CD iPSC in das Feeder-freie E8 Kultursystem überführt (Guokai Chen u. a., 2011, Abb. 11). Im Anschluss erfolgte die Validierung der generierten iPSC Klone *in vitro*.

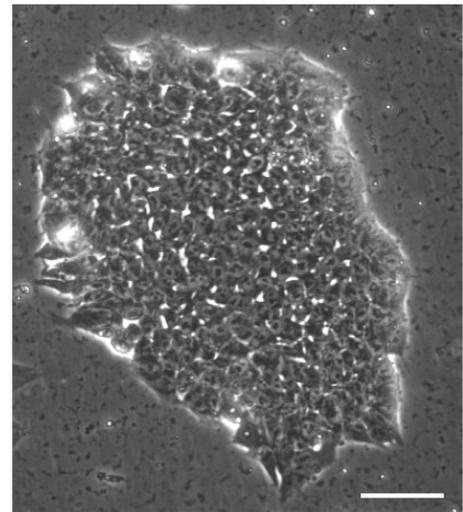


Abb. 11: iPSC Kolonie im Feeder-freien E8 System auf Matrigel. Maßstabsbalken: 50 µm

3.1.1 Nachweis pluripotenzassoziierter Gene

Pluripotente Stammzellen zeichnen sich durch die Expression verschiedener, spezifischer Antigene aus. Zu den am häufigsten verwendeten Markern pluripotenter Stammzellen zählen das Glycolipid *stage specific embryonic antigen 4* (SSEA4), die Transkriptionsfaktoren Oct 3/4 sowie die Oberflächenproteoglycane Tra1-60 und Tra1-81. Alle vier Epitope konnten in beiden untersuchten CD-iPSC Klonen durch Antikörperfärbung nachgewiesen werden (Abb. 12).

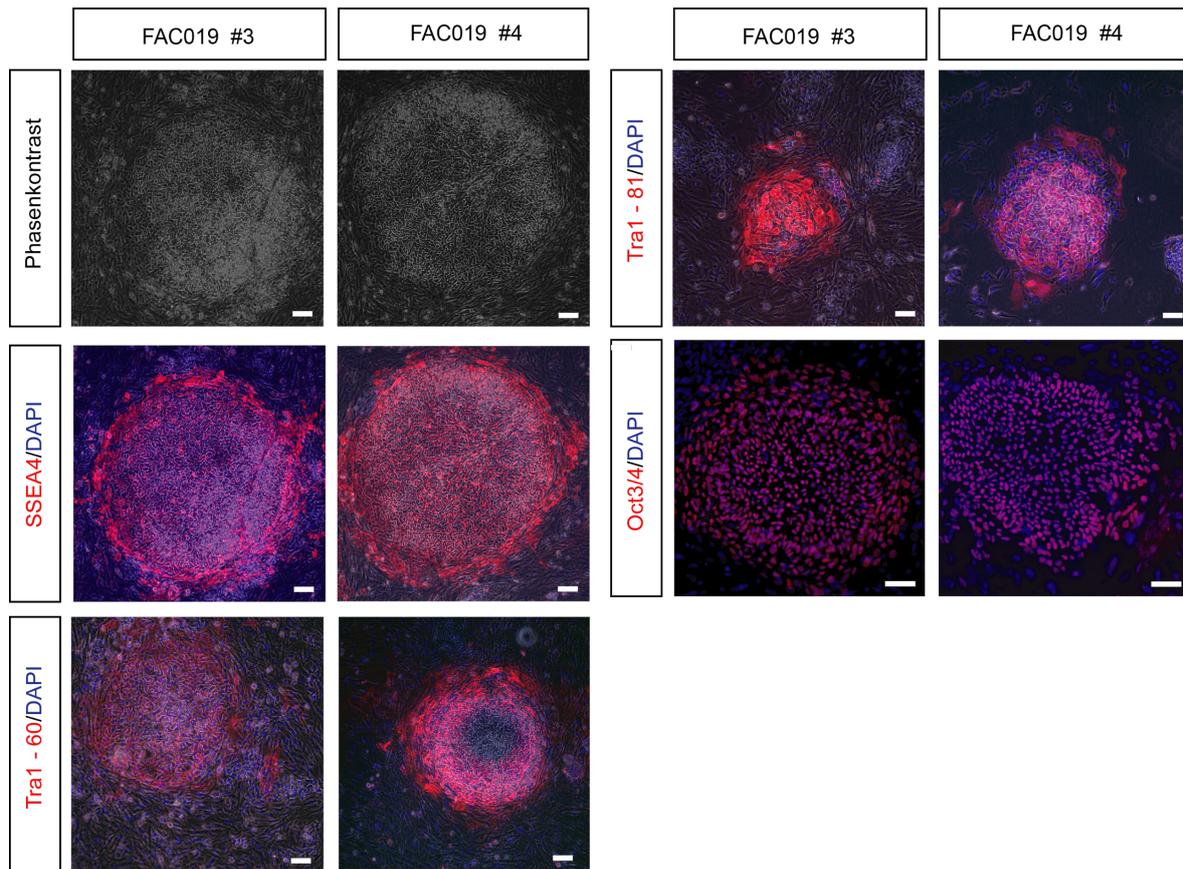


Abb. 12: Immunfluoreszenz humaner Pluripotenz-Marker in den iPSC Klonen FAC019 #3 und FAC019 #4. Die Färbungen erfolgten an Zellklonen auf MEF Feederzellen. Maßstabsbalken 100 μ m

3.1.2 Erfolgreiche Eliminierung der Transgene

Die Reprogrammierung der Fibroblasten erfolgte durch Sendai-Virus Vektoren. Diese exprimieren die Transkriptionsfaktoren, ohne in das Wirtsgenom zu integrieren. Dies gelingt durch ein durch die Entfernung des *fusion-proteins*, das für die Integration des

Virusgenoms notwendig ist. Daher sind die Vektoren nach mehreren Passagen nicht mehr in den Zellen nachweisbar. Um die vollständige Entfernung der viralen Partikel nach der Reprogrammierung zu bestätigen, wurden die Kolonien nach 5-8 Passagen mit Antikörpern gegen das virale Oberflächenprotein Hämagglutininneuramidase (HN) gefärbt. Dabei konnte die vollständige Entfernung der Partikel bestätigt werden. Auch in der PCR konnte das virale Genom nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 13).

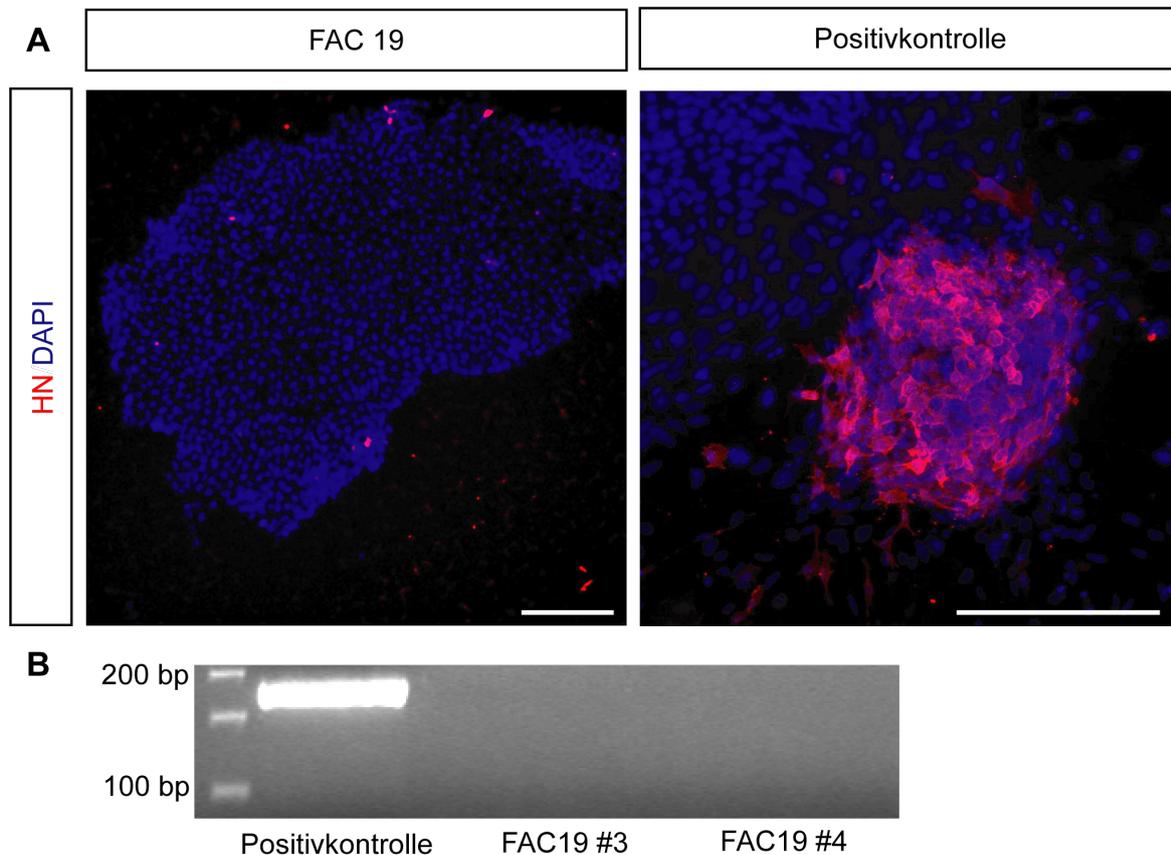


Abb. 13: Inaktivierung des Sendai-Vektors: (A) Nach 5-8 Passagen zeigen die Kolonien keine Expression des viralen Oberflächenproteins HN. Unmittelbar nach Transfektion wird das Protein stark exprimiert (Positivkontrolle, Bild von Julia Fischer). (B) In der PCR ist kein virales Genom nachweisbar. Maßstabsbalken: 75 μ m

3.1.3 Differenzierung der CD-iPSC zu Zellen aller drei Keimblätter

Definitionsgemäß sind pluripotente Stammzellen in der Lage, sich zu Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter Ektoderm, Endoderm und Mesoderm zu entwickeln. Um die Pluripotenz der CD-iPSC *in vitro* zu bestätigen, wurden die iPSC abgelöst, drei Wochen lang als embryoiden Aggregate (*embryoid bodies*, EB) kultiviert und anschließend plattiert.

Für endo- und mesodermale Differenzierung erfolgte die Kultur für weitere drei Wochen in MEF Medium und für ektodermale Differenzierung in N2 Medium.

Die Expression von *smooth muscle actin* (SMA), alpha-Fetoprotein (AFP) und β -III-Tubulin bestätigt die Entstehung von meso- endo- und ektodermalen Zellen (Abb. 14).

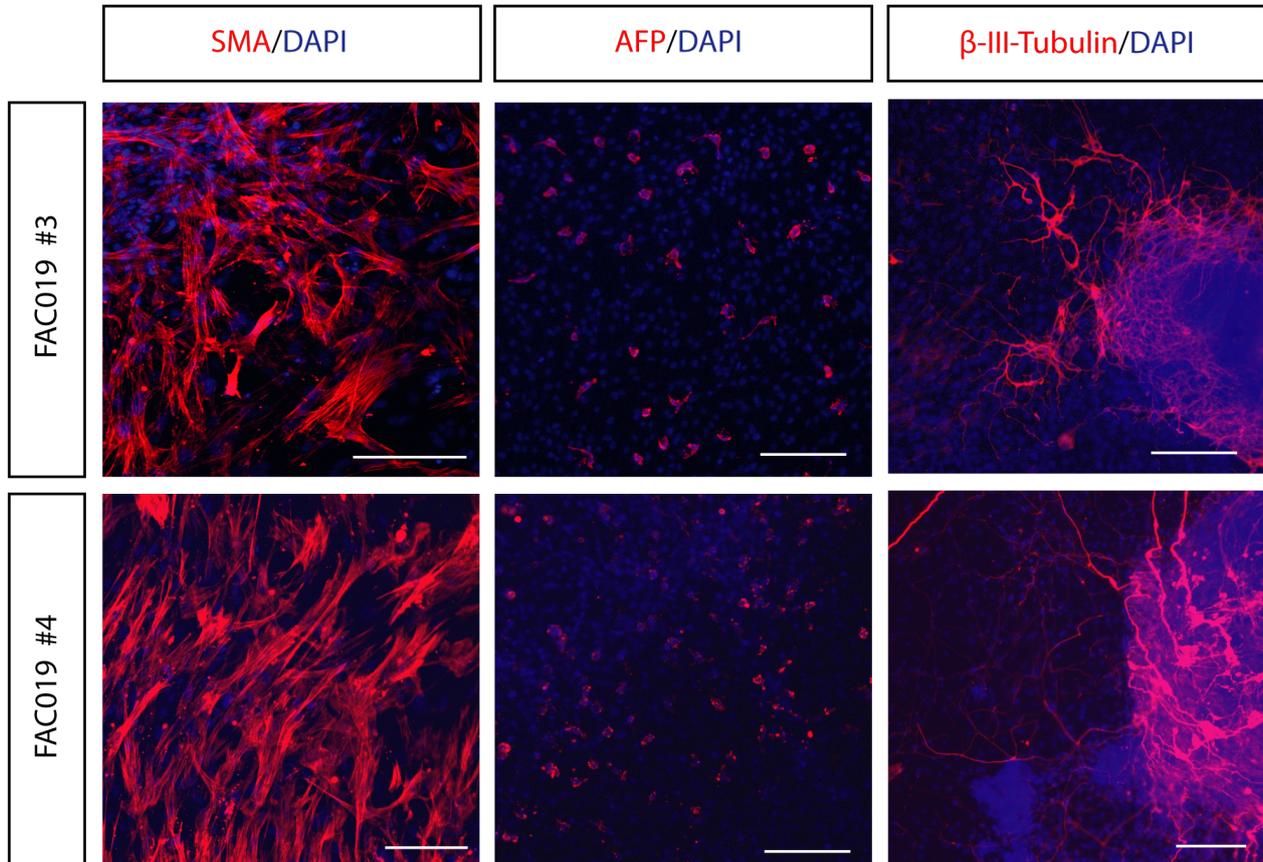


Abb. 14: Bestätigung der Pluripotenz: CD iPSC differenzieren zu SMA-positiven mesodermalen, AFP-positiven endodermalen, und β -III-Tubulin positiven ektodermalen Zellen. Maßstabsbalken: 150 μ m

3.1.4 Validierung der zytogenetischen Integrität



Abb. 15: Bestätigung der zytogenetischen Integrität: Die zytogenetische Integrität der generierten iPSC wurde durch single-nucleotide polymorphism (SNP) Analyse validiert. Hier ist für jedes Chromosom (Karyotyp 46XY) die Allelfrequenz (der Anteil der untersuchten Chromosomen, die das Allel tragen, oben) und die logarithmische Darstellung der copy number variation (CNV)- Ratio (unten). Für die untersuchte iPSC Zelllinie (FAC019#4) zeigten sich keine Auffälligkeiten.

3.2 Generierung von radial-glia like neural progenitor cells (RGL-NPC) aus CD-iPSC

Aus den iPSC wurden nach einem etablierten Protokoll (Gorris u. a., 2015, Abb. 16) RGL-NPC (Abb. 17) generiert, um eine stabile, proliferative Population neuronaler Vorläuferzellen als Ausgangspopulation für die weiteren Differenzierungen zu erhalten. Zusammenfassend werden die iPSC dabei in EBs umgewandelt und anschließend insgesamt vier Wochen in N2 Medium mit abnehmender Retinsäure-Konzentration kultiviert. Die Zugabe von all-trans-Retinsäure spielt für die Induktion neuronaler Zelltypen eine entscheidende Rolle (Jones-Villeneuve u. a., 1982; Fraichard u. a., 1995; Bain u. a., 1995; Rohwedel u. a., 1999).

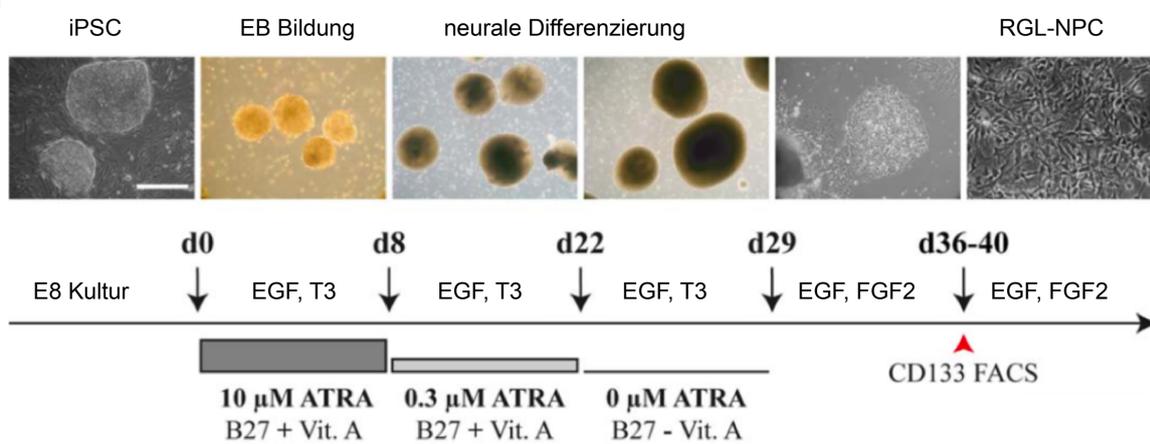


Abb. 16: Schematische Darstellung der Differenzierung von RGL-NPC aus iPSC (adaptiert nach: GORRIS u. a., 2015)

Anschließend wurden die EBs auf Matrigel-beschichteten Zellkulturplatten plattiert. Die dabei auswachsenden Zellen wurden durch Fluoreszenzsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) anhand der Expression des Oberflächenproteins CD133 angereichert. Die CD133 positiven Zellen wurden fortan adhären

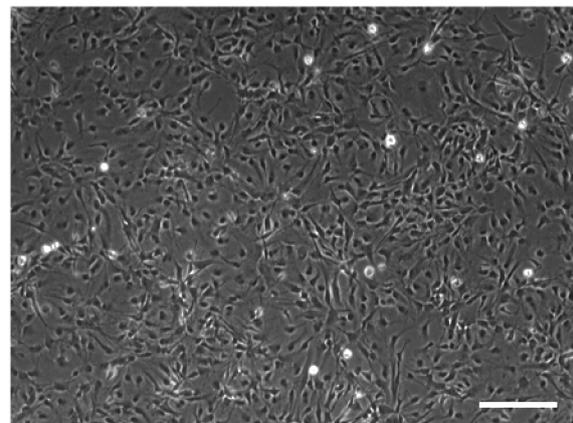


Abb. 17: Phasenkontrastaufnahme der RGL-NPC Maßstabsbalken: 100 µm

als Einzelzellschicht kultiviert und proliferierten stabil durch Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und FGF2.

Um die Identität der RGL-NPC zu bestätigen wurden diese mit Antikörpern gegen die Oberflächenproteine Nestin und Vimentin sowie die Transkriptionsfaktoren Sox2 und Sox9 gefärbt (Abb. 18). Dabei bestätigte sich die Expression dieser Marker in der generierten Zellpopulation. Eine semiquantitative PCR bestätigte die Expression weiterer Marker für neurale Stammzellen (*SOX2*, *PAX6*, *NESTIN*) und radiale Glia (*VIMENTIN*, *NG2*, *GFAP*, *CD133*, Abb. 19).

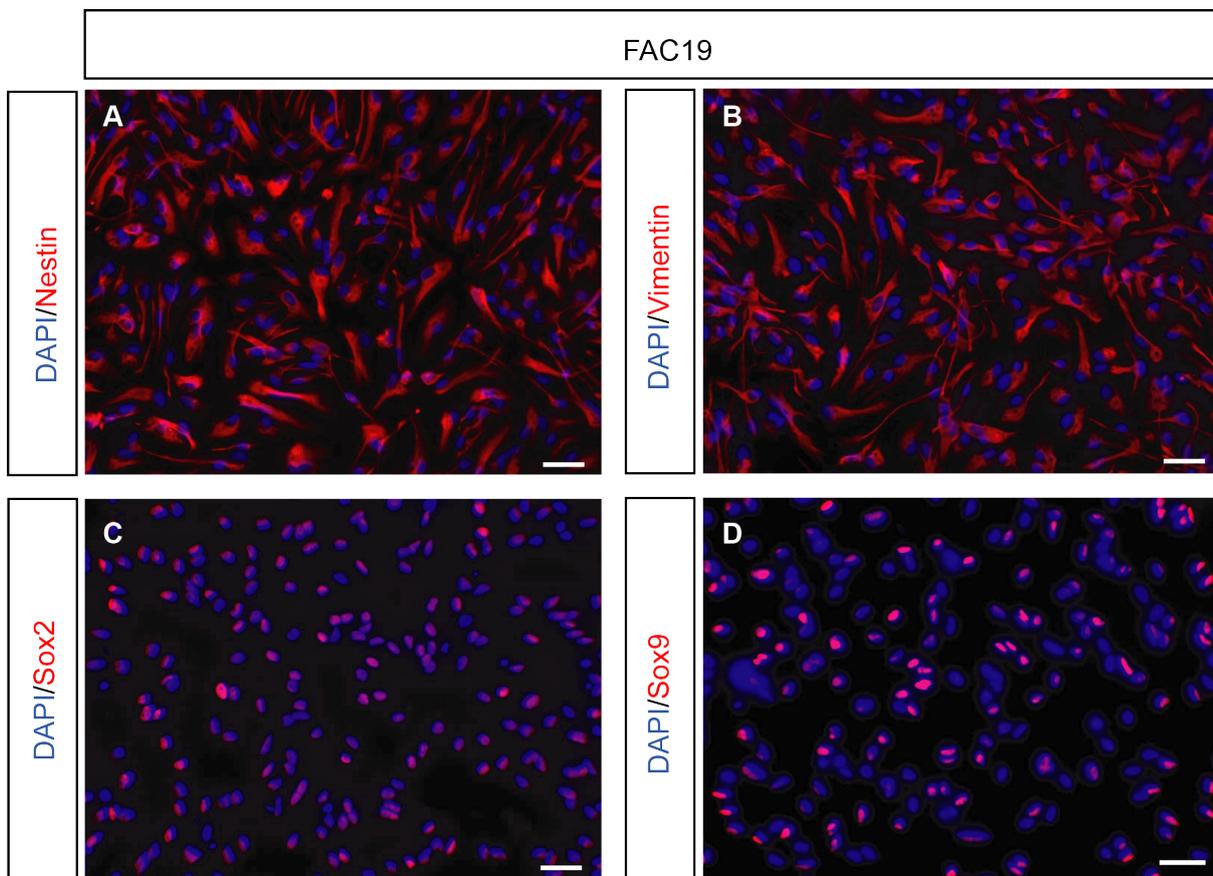


Abb. 18: Färbung Stammzelltypischer Marker: Die RGL-NPC exprimieren die für neurale Stammzellen typischen Proteine Nestin (A), Vimentin (B) und die Transkriptionsfaktoren Sox2 (C) und Sox9 (D), Zelllinie FAC 019 Maßstab: 40 µm

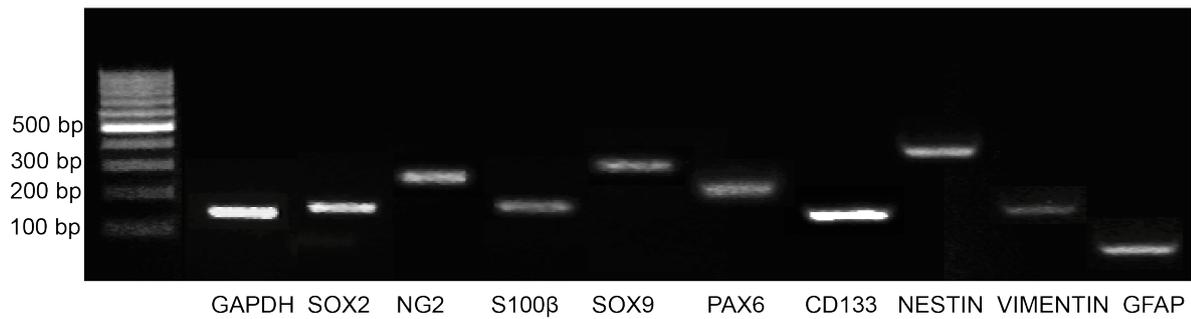


Abb. 19: PCR auf für neurale Stammzellen typische Gene: In der semiquantitativen PCR bestätigt sich die Expression von für neurale Stammzellen und radiale Glia typische Genen in den FAC19 #4 RGL-NPC. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein ubiquitär exprimiertes Gen (*housekeeping gene*) und dient als Positivkontrolle

3.2.1 *In vitro* Differenzierung von Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten

Die RGL-NPC der CD Linien (FAC019, CD7, CD8) sowie der Kontrolllinien (C6, H9.2) wurden in die drei vorherrschenden Zelltypen des ZNS, Astrozyten, Neurone und

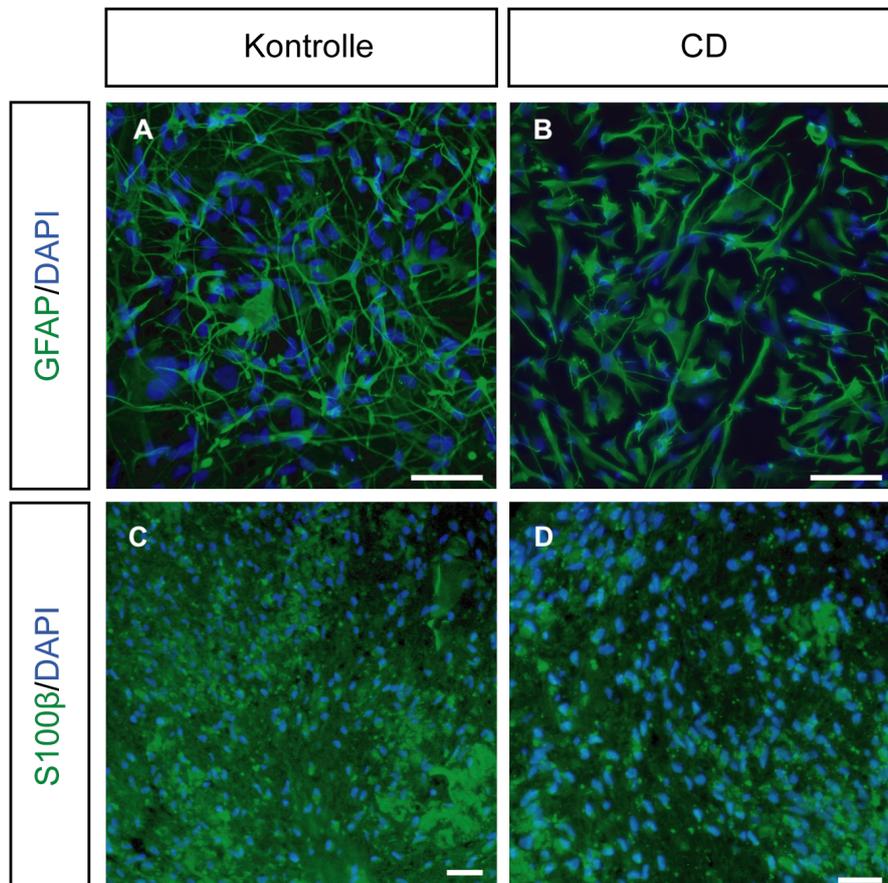


Abb. 20: Expression astrozytärer Marker: Nach 14 tägiger Kultur in Serumhaltigem Medium exprimieren $79 \pm 21\%$ der Zellen den für Astrozyten typischen Oberflächenmarker GFAP (**A, B**). Auch die Expression von S100 β ist nachweisbar (**C, D**), Zelllinie FAC19, Maßstabsbalken: 50 μ m

Oligodendrozyten, differenziert. Dabei zeigten sich weder im Differenzierungsverhalten noch in der Morphologie der ausdifferenzierten Zellen offensichtliche Unterschiede zwischen Patientenzellen und gesunden Kontrollen.

Zur astrozytären Differenzierung wurden RGL-NPC in serumhaltigem Medium für mindestens 14 Tage differenziert. Die Zellen stellten sich anschließend mit verzweigter Morphologie dar und exprimierten die Astrozytenmarker GFAP und S100 β (Abb. 20). 79 \pm 21 % (Standardabweichung, n = 250 Zellen) der Zellen waren positiv für GFAP.

Zur neuronalen Differenzierung wurden die RGL-NPC für mindestens 21 Tage unter Einfluss von BDNF differenziert. Die entstehenden Neurone weisen die typische Morphologie mit langen Fortsätzen auf. 33 \pm 1,7 % (Standardabweichung, n=511 Zellen) der Zellen sind positiv für β -III-Tubulin (Abb. 21).

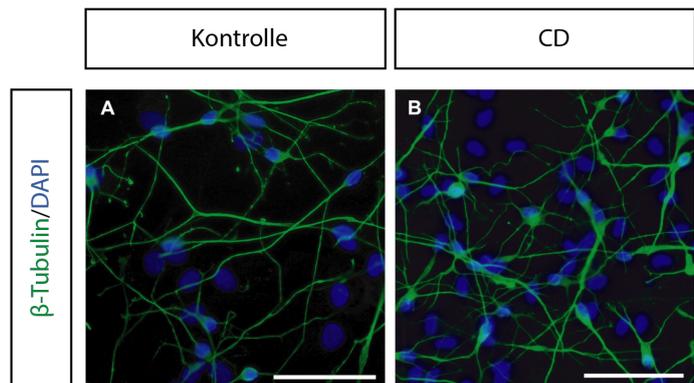


Abb. 21: Expression neuronaler Marker: Nach drei Wochen exprimieren ca. 33% der neuronal differenzierten RGL-NPC β -III-Tubulin, Zelllinie FAC19, Maßstabsbalken 25 μ m

Die Differenzierung zu Oligodendrozyten erfolgte in einem dreistufigen Protokoll (Abb. 22) über insgesamt mindestens sieben Wochen. Im ersten Schritt wurden für zwei Wochen unter Einfluss von EGF, Forskolin und PDGF-AA gliale Vorläuferzellen angereichert. Diese wurden in einem zweiten Schritt eine Woche lang durch Zugabe von Ascorbinsäure, Noggin, PDGF-AA und T3 weiter oligodendroglial spezifiziert. Im dritten Schritt erfolgte über vier Wochen die Ausdifferenzierung zu reifen Oligodendrozyten, dazu

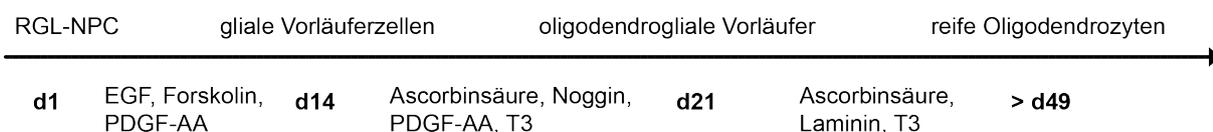


Abb. 22: Schematische Darstellung der Differenzierung von RGL-NPC zu Oligodendrozyten

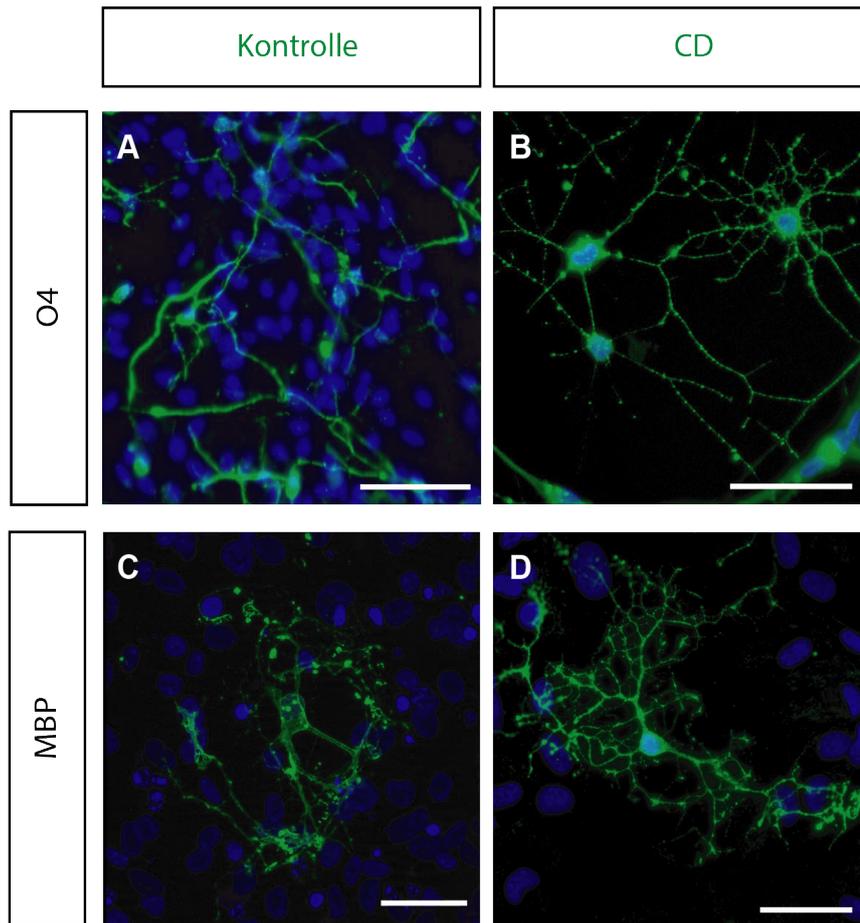


Abb. 23: Expression oligodendroglialer Marker: RGL-NPC abgeleitete Oligodendrozyten exprimieren O4 und MBP (MBP Färbungen von Julia Fischer), Maßstabsbalken: 25 μ m

wurden die Wachstumsfaktoren entzogen und die Zellen unter Einfluss von Ascorbinsäure, Laminin und T3 terminal differenziert.

Dabei entstanden O4 und MBP positive Zellen, die die typische, weit verzweigte Morphologie der Oligodendrozyten aufweisen.

Die Differenzierung der Oligodendrozyten zeigte sich in unserem CD Zellmodell nicht sichtbar eingeschränkt (Abb. 23).

3.2.2 RGL-NPC abgeleitete Astrozyten exprimieren ASPA *in vitro*

In der Literatur wird ASPA vor allem als in Neuronen und Oligodendrozyten vorkommendes Enzym beschrieben. Ob Astrozyten ASPA exprimieren ist in der Literatur umstritten. Vor allem aus humanen Zellen gibt es wenige Daten. Untersuchungen des

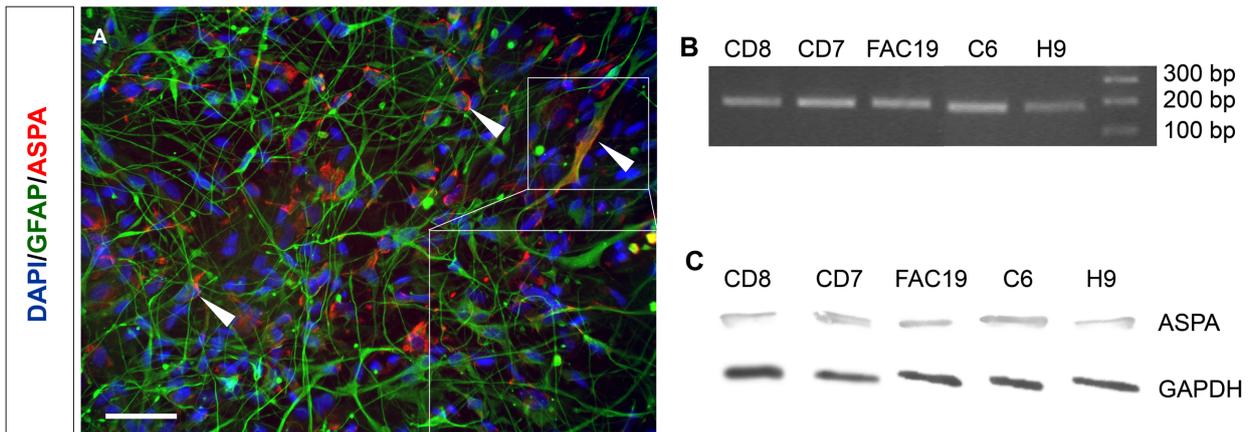


Abb. 24: Astrozyten der CD Linie FAC19 exprimieren nach drei Wochen Kultur in serumhaltigem Medium ASPA *in vitro*: (A) Kolokalisation von GFAP und ASPA in der Immunfluoreszenz (B) In der semiquantitativen PCR auf ASPA mRNA ist diese in RGL-NPC abgeleiteten Astrozyten nach drei Wochen Kultur in serumhaltigem Medium in allen untersuchten Zelllinien (CD Linien CD7, CD 8 und FAC010 sowie Kontrolllinien C6 und H9 (embryonale Stammzelllinie)) nachweisbar. (C) Nachweis des ASPA Proteins im Western Blot, Maßstabsbalken 40 μ m

Transkriptoms weisen jedoch darauf hin, dass in Astrozyten ASPA exprimiert wird (Zhang u. a., 2014). Die Expression von ASPA wurde in unserem Zellkulturmodell an durch dreiwöchige Kultur in serumhaltigem Medium aus RGL-NPC abgeleiteten Astrozyten aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien untersucht. Wir konnten ASPA mittels PCR und Westernblot sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene nachweisen. Kolokalisation von ASPA und GFAP in der Immunfluoreszenz bestätigt die Expression in einigen Astrozyten (Abb. 24). Die genaue Identität der ASPA positiven Zellen ohne GFAP Expression ist nicht bestimmt. Es ist jedoch anzunehmen, dass es sich zumindest bei einem Teil dieser Zellen um GFAP negative Astrozyten handelt. GFAP ist zwar der meist verbreitete und am besten untersuchte Marker zur Identifikation von Astrozyten, jedoch sind in zahlreichen Untersuchungen auch GFAP negative Astrozyten beschrieben (Kimmelberg, 2004).

3.3 Pathologische Kennzeichen von CD sind *in vitro* reproduzierbar

3.3.1 Lichtmikroskopischer Phänotyp der Mitochondrien

Zu den historisch ersten histopathologischen Beobachtungen bei Morbus Canavan zählen elongierte Mitochondrien in Astrozyten (Adachi u. a., 1966). In den zahlreichen Analysen muriner Modelle ist diese Beobachtung nicht beschrieben. Ob dies auf einen Mangel an Untersuchungen zurückzuführen ist oder ob diese Veränderung in murinen Gehirnen nicht

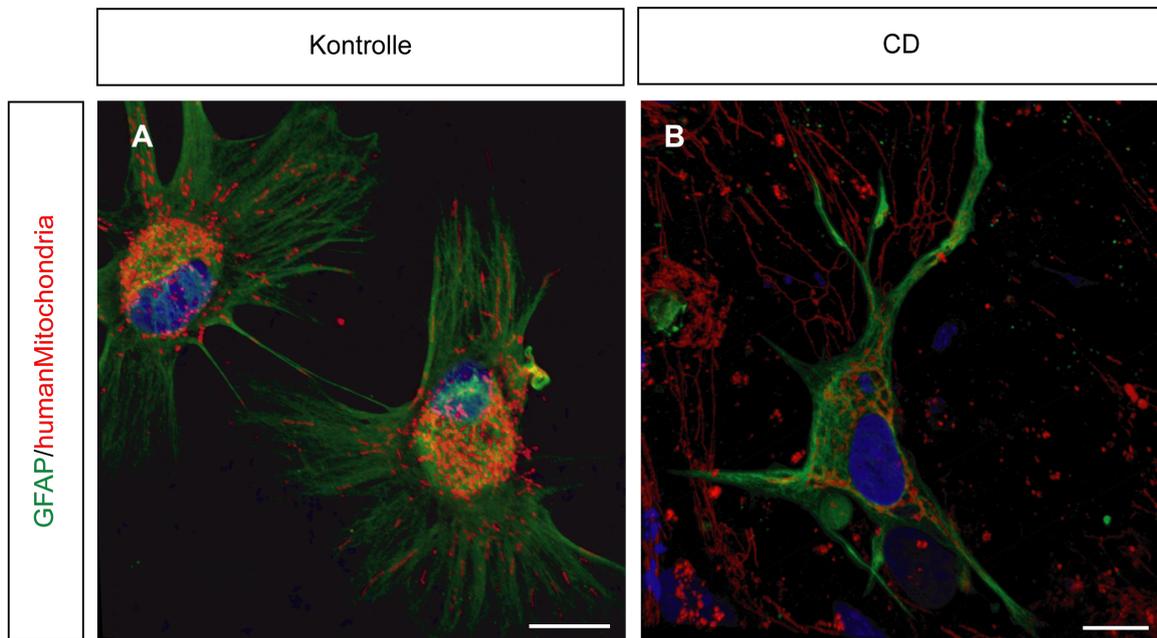


Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung astrozytärer Mitochondrien: Im Fluoreszenzmikroskop zeigen sich große mitochondriale Netzwerke in GFAP-positiven Astrozyten. Abgebildet sind zwei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierte Astrozyten der Linien C6 (**A**) und FAC19 (**B**), fixiert und gefärbt mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und humane Mitochondrien (rot, Bilder von Julia Fischer), Maßstabsbalken 25µm

auftritt geht aus der Literatur nicht hervor. Um festzustellen ob diese Veränderung in unserem iPSC basierten Modell reproduzierbar ist, untersuchten wir die Mitochondrien der CD iPSC abgeleiteten Astrozyten fluoreszenzmikroskopisch nach Anfärbung mit einem Antikörper gegen humane Mitochondrien (Abb. 25) beziehungsweise an vitalen Zellen mit dem MitoTracker™ red. Aufgrund der morphologischen Vielfalt der Mitochondrien gestaltete sich die Quantifizierung kompliziert. Daher nutzen wir ein softwarebasiertes System um eine große Anzahl von Mitochondrien auszumessen und dadurch die Messunsicherheit durch eine große Stichprobe statistisch zu auszugleichen

(siehe Material und Methoden Teil dieser Arbeit). Die folgenden Daten wurden alle an für drei Wochen in serumfreiem Medium differenzierten, RGL-NPC abgeleiteten Astrozytenkulturen softwarebasiert erhoben. Die Mitochondrien der CD Astrozyten waren im Durchschnitt signifikant verlängert (Feret Durchmesser $2,78 \pm 2,89 \mu\text{m}$ verglichen mit $2,54 \pm 3,05 \mu\text{m}$). Auch die Schnittfläche zeigte sich vergrößert ($1,55 \pm 2,6 \mu\text{m}^2$ verglichen mit $1,27 \pm 3,7 \mu\text{m}^2$, Abb. 26 A, B). Ausgewertet wurden insgesamt 42650 Bildobjekte (d.h. von der Software erkannte, angeschnittene Mitochondrien) in CD Zellen (3 Zelllinien: FAC19, CD7 und CD8) sowie 105234 Bildobjekte in Kontrollzellen (2 Zelllinien: C6 und H9).

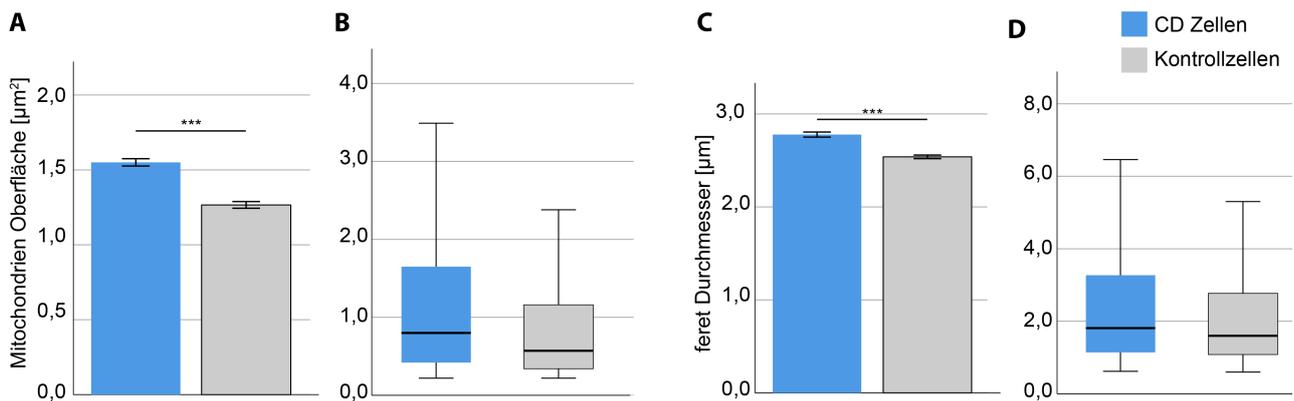


Abb. 26: Vergleich der Mitochondrien von CD- und WT-Astrozyten im Fluoreszenzmikroskop: (A) Die Schnittfläche der Mitochondrien in CD Astrozyten ist gegenüber Kontrollzellen signifikant vergrößert ($1,55 \pm 2,6 \mu\text{m}^2$ verglichen mit $1,27 \pm 3,7 \mu\text{m}^2$, $p < 0,0005$). (C) Gleiches gilt für den Feret-Durchmesser ($2,78 \pm 2,89 \mu\text{m}$ verglichen mit $2,54 \pm 3,05 \mu\text{m}$, $p < 0,0005$). (B, D) Im Vergleich der Verteilung der einzelnen Mitochondrien zeigt sich, dass in CD Astrozyten vor allem vermehrt lange und in der Schnittfläche vergrößerte Mitochondrien vorkommen. In A, C sind die Mittelwerte und Standardfehler dargestellt, in den Boxplots in B, D der Median, der Interquartilbereich zwischen 1. und 3. Quartil sowie die Spannweite (ohne Ausreißer). Ausgewertet wurden drei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierte RGL-NPC abgeleitete Astrozyten. Gezählt wurden insgesamt 42650 Bildobjekte in CD Zellen (3 Zelllinien: FAC19, CD7 und CD8) sowie 105234 Bildobjekte in Kontrollzellen (2 Zelllinien: C6 und H9.2).

Mitochondrien sind morphologisch ausgesprochen vielfältige Organellen, die äußerst dynamische Netzwerke bilden und sich abhängig von metabolischen Anforderungen verbinden und teilen können. Es gibt zahlreiche Belege für morphologische Veränderungen der Mitochondrien bei verschiedensten Erkrankungen (Chen & Chan, 2009). Diese Veränderungen sind vielfältig und unterscheiden sich oft erheblich zwischen

verschiedenen Zelltypen. Um eine valide Untersuchung der mitochondrialen Morphologie an unserem Zellkulturmodell zu etablieren benötigt man daher objektivierbare morphologische Messgrößen.

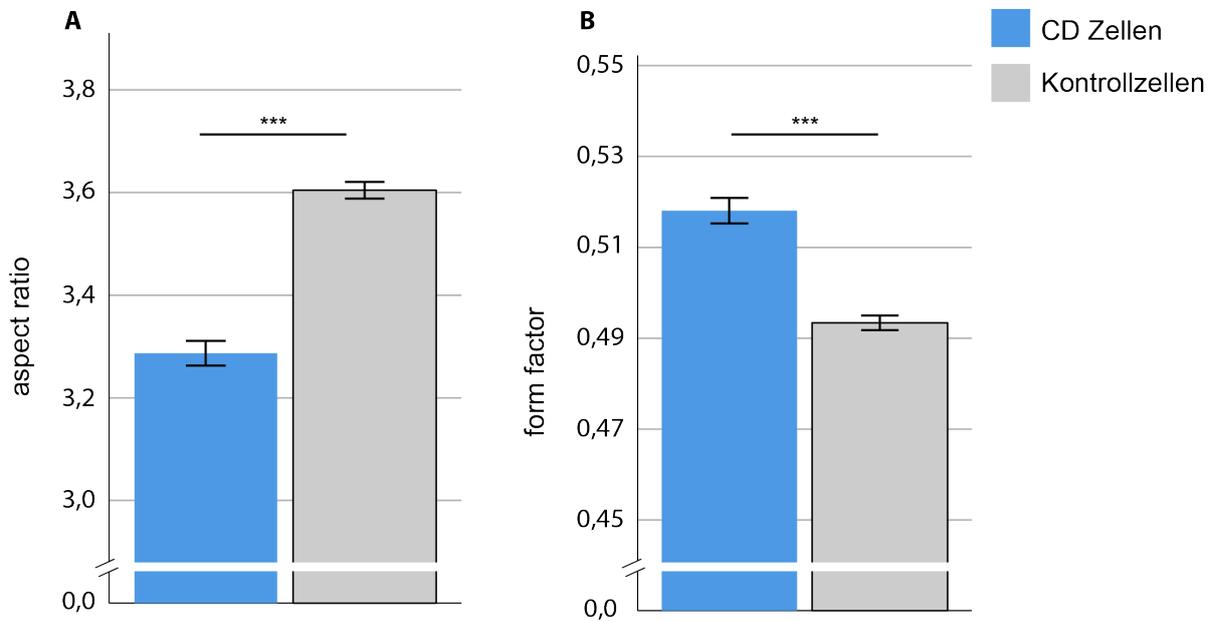


Abb. 27: Formparameter von Mitochondrien im Fluoreszenzmikroskop: (A) Die aspect ratio (AR) der Mitochondrien ist in CD Astrozyten signifikant vermindert ($3,29 \pm 2,54$ im Vergleich zu $3,61 \pm 2,68$, $p < 0,0005$). **(B)** Der form factor (FF) ist dagegen signifikant erhöht ($0,518 \pm 0,29$ im Vergleich zu $0,493 \pm 0,27$, $p < 0,0005$). Ausgewertet wurden insgesamt 42650 Bildobjekte in CD Zellen (3 Zelllinien: FAC19, CD7 und CD8) sowie 105234 Bildobjekte in Kontrollzellen (2 Zelllinien: C6 und H9.2). Ausgewertet wurden drei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierte RGL-NPC abgeleitete Astrozyten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Zur softwarebasierten Quantifizierung eignen sich vor allem die Parameter Formfaktor (FF) und *Aspect Ratio* (AR). Beide Parameter zeigen sich bei verschiedenen Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion verändert (Koopman u. a., 2005). Die AR stellt dabei ein Maß für die Länge der Mitochondrien dar, während der FF den Verzweigungsgrad quantifiziert (siehe auch Material und Methoden). Wir untersuchten diese Formparameter bei in unserem CD Zellkulturmodell. Dabei zeigte sich die AR gegenüber Kontrollastrozyten verringert (CD $3,29 \pm 2,54$, Kontrolle $3,61 \pm 2,68$, $p < 0,0005$) und der FF erhöht (CD $0,518 \pm 0,29$, Kontrolle $0,493 \pm 0,27$, $p < 0,0005$, Abb. 27). Ausgewertet wurden insgesamt 42650 Bildobjekte in CD Zellen (3 Zelllinien: FAC19, CD7 und CD8) sowie 105234 Bildobjekte in Kontrollzellen (2 Zelllinien: C6 und H9.2).

Diese Daten wiesen darauf hin, dass CD einen Einfluss auf die Morphologie von Mitochondrien hat, der über verschiedene Zelllinien hinweg zu beobachten ist. Eine Rolle des mitochondrialen Stoffwechsels in der Krankheitsentstehung scheint daher wahrscheinlich.

3.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrien

Um diesen Phänotyp in unserem Krankheitsmodell weiter zu validieren wurden Astrozyten aus CD-RGL-NPC differenziert und nach drei bis vier Wochen Differenzierung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht. Die Zellkultur sowie die mikroskopische Untersuchung, die Aufnahme der Bilder sowie die Vermessung und statistische Auswertung erfolgten im Rahmen dieser Arbeit bzw. bei einzelnen Replikaten durch Julia Fischer. Die Einbettung der Proben sowie die Erstellung der Ultradünnschnitte erfolgte durch Jörg Bedorf (Institut für Pathologie, Universität Bonn). Dabei zeigten sich die Mitochondrien der CD Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen strukturell verändert (Abb. 28). Die Cristae waren aufgelockert und weniger regelmäßig, zahlreiche Mitochondrien zeigten Schwellungen und leere Räume, die mit Flüssigkeitsansammlungen vereinbar sind. Diese Beobachtung war in allen 3 untersuchten Zelllinien konstant (Abb. 29).

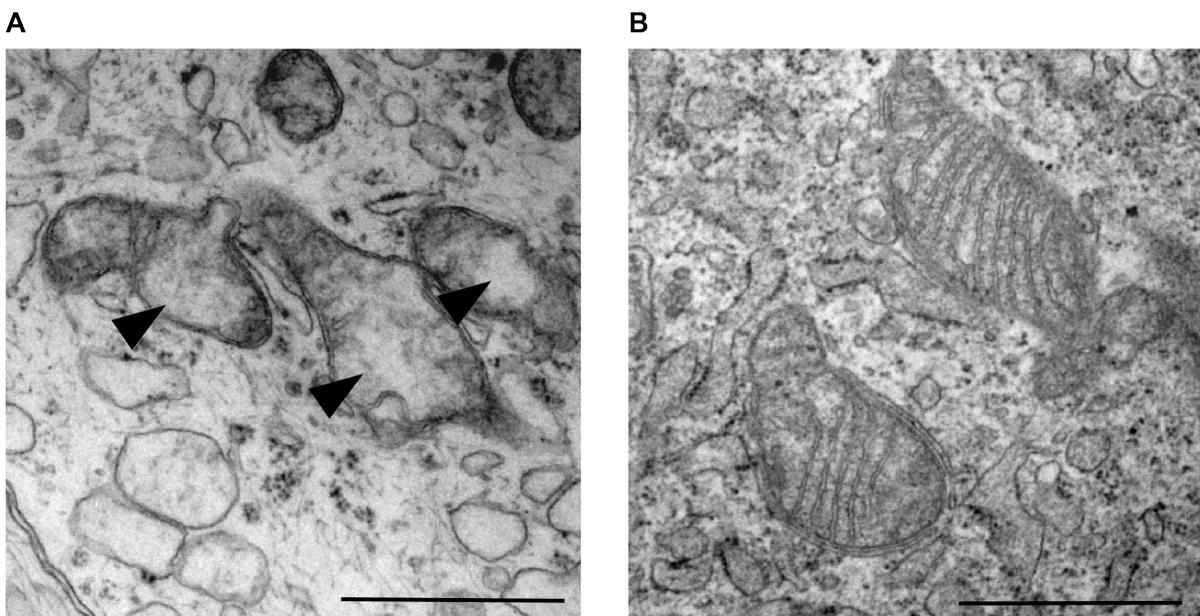


Abb. 28: TEM Aufnahmen der Mitochondrien von CD- (A) und Kontrollastrozyten (B): Die Mitochondrien in CD-Astrozyten sind strukturell verändert und weisen große Bereiche ohne Cristae-Struktur auf (Pfeile). Dargestellt sind drei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierte Astrozyten der Zelllinien FAC19 (A) und C6 (B), Maßstabsbalken 1 µm

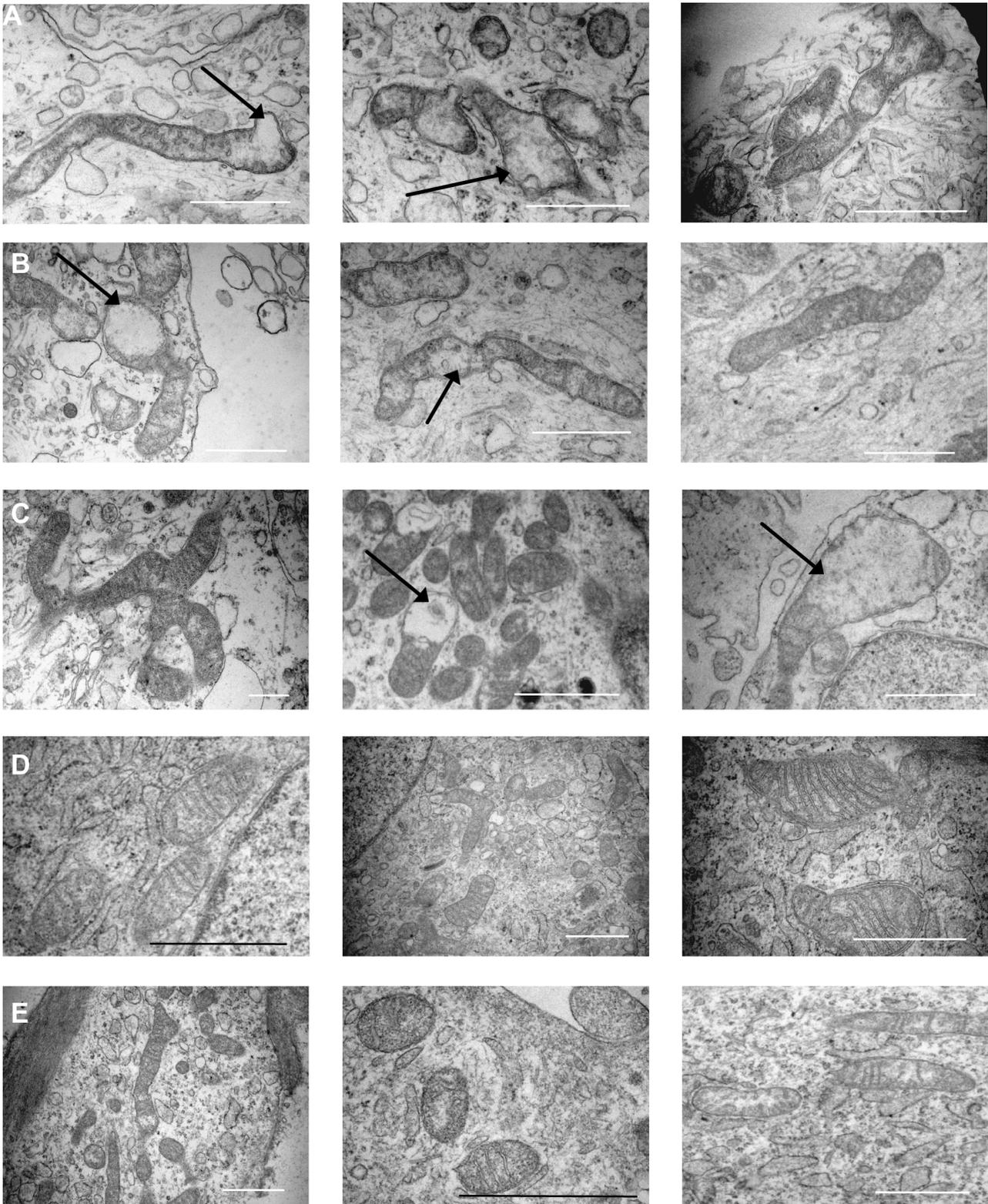


Abb. 29: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien drei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierter Astrozyten: Morbus Canavan patientenspezifische Zellen (A: CD8, B: CD7, C: FAC19) weisen deutlich stärker ausgeprägte Veränderungen der Cristae-Struktur auf (Pfeile), als Kontrollzellen (D: C6, E: H9.2). Maßstabsbalken: 1 μ m

Um die Veränderungen zu quantifizieren wurden die Mitochondrien auf den TEM Aufnahmen manuell ausgemessen. Das Vorgehen ist in 2.2.17 beschrieben. In allen analysierten CD-Zelllinien waren die Mitochondrien gegenüber den Kontrollen signifikant ($p < 0,005$) verlängert. Im Mittel betrug der Feret Durchmesser der CD-Zellen $1,26 \pm 0,71 \mu\text{m}$, bei den gesunden Kontrollen waren es $0,83 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (Abb. 30 B).

Die Länge der einzelnen Mitochondrien variierte erheblich, was sich vor allem durch die verschiedenen Anschnittebenen erklärt. Bei einem direkten Vergleich der Streuung der Längen der einzelnen Mitochondrien fällt jedoch auf, dass vor allem lange Mitochondrien ($> 1 \mu\text{m}$) in den CD-Zellen deutlich vermehrt auftraten (Abb. 30 A). Auch die Schnittfläche der Mitochondrien war vergrößert. Sie betrug bei CD-Astrozyten im Mittel $0,43 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ verglichen mit $0,21 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ bei Kontrollzellen (Abb. 30 D). Analog zum Feret-Durchmesser zeigte sich auch hier, dass vor allem vermehrt Mitochondrien mit einer großen Schnittfläche vorkamen (Abb. 30 C). Insgesamt wurden 1007 Mitochondrien in CD- und 464 in Kontrollastrozyten ausgemessen. Diese Daten bestätigen die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen. Es fällt auf, dass die Werte für Feret Durchmesser und Schnittfläche bei den fluoreszenzmikroskopischen Messungen größer sind als bei den elektronenmikroskopischen. Dies erklärt sich durch die deutlich dünnere dargestellte Schichtdicke und damit wesentlich kleineren Anschnitte. Der Feret Durchmesser ist in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen um das 1,52 Fache verlängert, in den fluoreszenzmikroskopischen um das 1,09 Fache. Dieser Unterschied erklärt sich vermutlich zumindest teilweise durch die deutlich größere Varianz in der ungenaueren automatisierten Messung

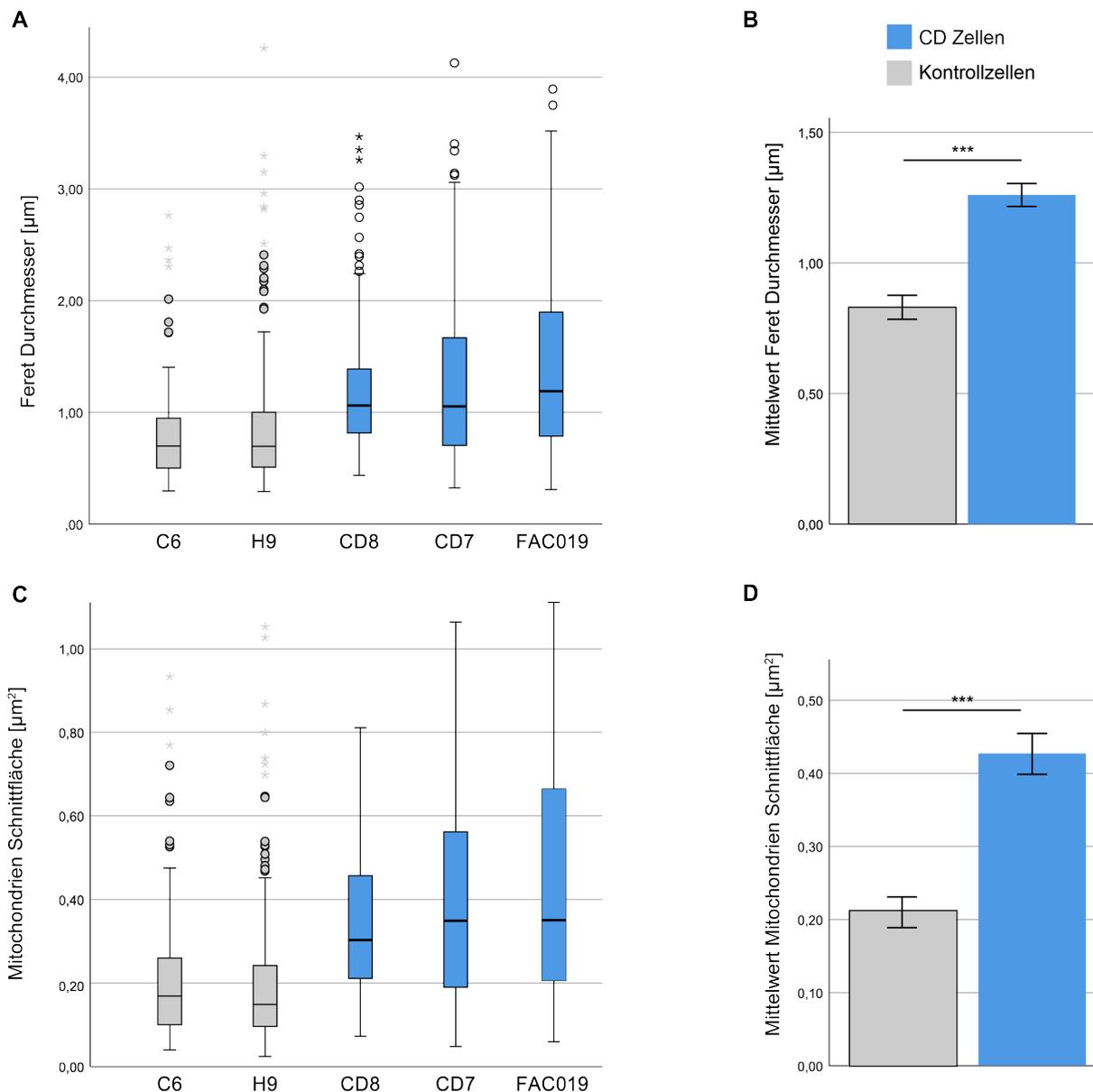


Abb. 30: Vergleich der Mitochondrien von CD- und WT-Astrozyten im TEM: Sowohl Feret Durchmesser als auch die Schnittfläche der Mitochondrien von drei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierten RGL-NPC abgeleiteten Astrozyten sind bei manuellem Ausmessen im TEM bei CD-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen signifikant vergrößert. (**B, D**). Dies ist in allen untersuchten Zelllinien erkennbar (**A, C**). Die Boxplots in A und C zeigen den Median, dem Interquartilbereich zwischen 1. und 3. Quartil sowie die Spannweite (ohne Ausreißer). In B und D sind die Mittelwerte und Standardfehler dargestellt. Ausgewertet wurden insgesamt 1007 Mitochondrien in CD Zellen (3 Zelllinien: FAC19, CD7 und CD8) sowie 464 Mitochondrien in Kontrollzellen (2 Zelllinien: C6 und H9.2).

3.3.3

3.3.4 ASPA Überexpression verkleinert die Mitochondrien in CD-Astrozyten signifikant

Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der Mitochondrien durch die Überexpression von ASPA reversibel sind, wurden die Mitochondrien der ASPA überexprimierenden CD-Astrozyten im TEM analog zu den CD-Astrozyten untersucht. Morphologisch wiesen die Mitochondrien weiter vereinzelt veränderte Cristae und Auftreibungen auf, jedoch in deutlich geringerem Maße als die der unbehandelten Zellen (Abb. 31).

Die Schnittfläche der Mitochondrien ASPA überexprimierender Astrozyten stellt sich

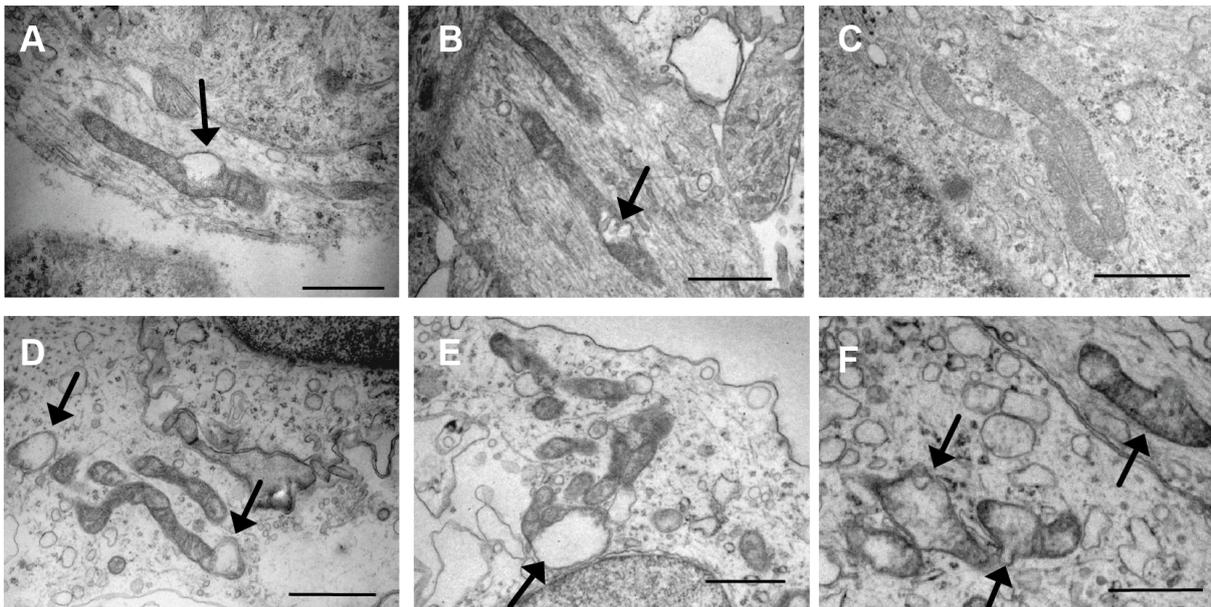


Abb. 31: Beeinflussung des morphologischen Phänotyps durch ASPA Überexpression: TEM Aufnahmen drei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierter Astrozyten. CD Zellen mit künstlicher ASPA Überexpression (CD8 + ASPA, **A-C**) weisen Veränderungen der Cristae Struktur auf (Pfeile), jedoch in geringerem Maße als CD Zellen (CD8, **D-F**), Maßstabsbalken: 1 μm

gegenüber den CD-Astrozyten signifikant verkleinert dar ($0,28 \pm 0,19 \mu\text{m}^2$ gegenüber $0,43 \pm 0,45 \mu\text{m}^2$, $p < 0,0005$). Es besteht weiterhin eine größere Schnittfläche als bei den Kontrollzellen, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($0,28 \pm 0,19 \mu\text{m}^2$ gegenüber $0,21 \pm 0,23 \mu\text{m}^2$, $p = 0,27$).

Auch der Feret-Durchmesser der Mitochondrien ist signifikant geringer als bei CD-Astrozyten ($1,08 \pm 0,61 \mu\text{m}$ gegenüber $1,26 \pm 0,71 \mu\text{m}$, $p < 0,005$). Trotz der ASPA Überexpression sind die Mitochondrien gegenüber Kontrollzellen weiterhin signifikant verlängert ($1,08 \pm 0,61 \mu\text{m}$ verglichen mit $0,83 \pm 0,50 \mu\text{m}$, $p < 0,0005$, Abb. 32).

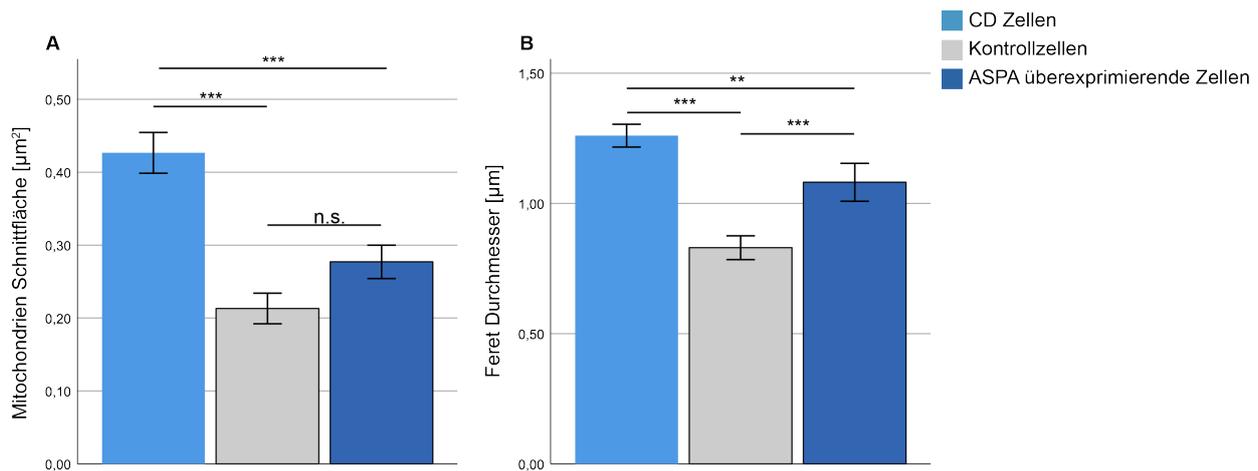


Abb. 32: ASPA Überexpression vermindert den CD Effekt: Die Schnittfläche der Mitochondrien in überexprimierenden Zellen ist signifikant kleiner, als die der CD Mitochondrien und nicht signifikant größer als die der Kontrollmitochondrien (**A**). Der Feret-Durchmesser ist bei den Mitochondrien ASPA überexprimierender Zellen gegenüber den Kontrollzellen vergrößert, gegenüber den CD Zellen jedoch signifikant verkleinert. (**B**). Ausgewertet wurden TEM Aufnahmen von 3 Wochen in serumhaltigem Medium differenzierten RGL-NPC abgeleiteten Astrozytenkulturen, n= 268 Mitochondrien ASPA überexprimierender Zellen (CD8 + ASPA), 237 Mitochondrien von CD Zellen (CD8), 201 Mitochondrien von Kontrollzellen (C6), die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler

Funktioneller Defekt der Mitochondrien

Der Mechanismus hinter den beobachteten morphologischen Veränderungen der Mitochondrien ist unklar. Die Hypothese, dass der Energiestoffwechsel eine Rolle in der Pathogenese von CD spielt ist verbreitet, aber bisher unbestätigt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Wolfram Kunz am Institut für Experimentelle Epileptologie untersuchten wir die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette. Die Enzymaktivitätssays wurden von der Arbeitsgruppe Kunz durchgeführt. Dabei zeigte sich in allen drei untersuchten CD-iPSC abgeleiteten Astrozytenlinien eine verminderte Aktivität des Komplex I. Im Mittel war diese auf 55,9% vermindert ($p < 0,005$, $n = 10$ an drei Zelllinien (FAC19, CD7, CD8), Abb. 33 A). Die Überexpression von ASPA in CD-Astrozyten führte zu einem Anstieg der Komplex I Aktivität auf im Mittel 113,53 %. Die Erhöhung der Aktivität gegenüber den CD-Zellen war in beiden untersuchten Linien (CD8 + ASPA, FAC19 + ASPA, Abb. 33 B) messbar.

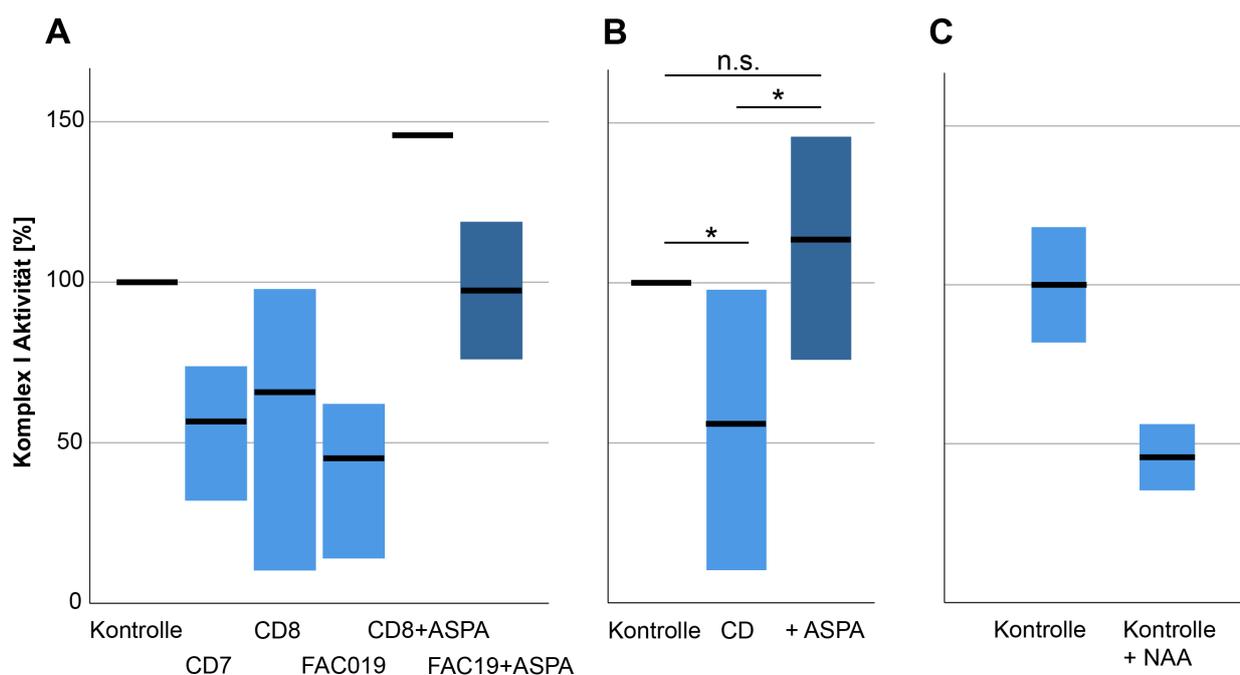


Abb. 33: Aktivität des Komplex I der Atmungskette: dargestellt ist die Aktivität im Vergleich zu Kontrollzellen (C6, 100%), die Messungen wurden durch die Arbeitsgruppe von Wolfram Kunz (Institut für experimentelle Epileptologie, Universität Bonn) durchgeführt. **(A, B):** Die Aktivität von Komplex I der Atmungskette ist in CD Astrozyten gegenüber den Kontrollen signifikant vermindert ($55,9 \pm 9,3 \%$, $p = 0,012$). Überexpression von ASPA in CD Astrozyten erhöht die Komplex I Aktivität gegenüber unbehandelten CD Astrozyten signifikant ($113,5 \pm 20,3 \%$ vs $55,9 \pm 9,3 \%$, $p = 0,015$). Dargestellt sind die einzelnen Zelllinien **(A)** sowie die zusammengefassten Werte nach ASPA Expression **(B)**. Die Messungen wurden an drei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierten Astrozyten durchgeführt. **(C):** Kultur der Astrozyten in Medium mit 20 mMol NAA verringert die Komplex I Aktivität auf mit CD Zellen vergleichbares Niveau, eine Aussage zur Signifikanz ist bei $n = 2$ nicht möglich. In allen Grafiken sind die Spannweite und Mittelwerte dargestellt.

In einem zweiten Versuch wurden wildtypische Kontrollastrozyten unter Einfluss von 20 mMol NAA im serumhaltigen Medium differenziert. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Komplex I Aktivität auf 45,72 % gegenüber Zellen der gleichen Linie, die parallel ohne Zugabe von NAA differenziert wurden (Abb. 33 C). Der Versuch wurde an zwei verschiedenen Kontrolllinien durchgeführt.

Hohe NAA Konzentrationen im Medium verringern die Zahl von CD-Astrozyten

Der Zusammenhang zwischen NAA und der Pathologie bei CD ist nicht eindeutig geklärt.

Um zu überprüfen, welche Auswirkungen NAA in erhöhten Konzentrationen auf Astrozyten hat, wurde dem Kulturmedium von CD Astrozyten NAA zugesetzt. Die

natürliche Konzentration von NAA im menschlichen Gehirn beträgt etwa 10 mMol (Urenjak u. a., 1992). Bei CD ist die Konzentration etwa auf das Doppelte bis Dreifache erhöht (Wittsack u. a., 1996).

Wir untersuchten die Auswirkungen von exogen zugeführtem NAA auf unser Krankheitsmodell durch Zugabe von 2, 10 und 20 mMol NAA zum Medium während der letzten beiden Wochen der Differenzierung CD-iPSC abgeleiteter Astrozyten (Abb. 34 A). Dabei zeigte sich nach zwei Wochen eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl bereits bei physiologischen Konzentrationen. Eine Konzentration von 20 mMol NAA im Medium verringerte die Zellzahl um etwa 50 % (Abb. 34 B).

In einem zweiten Experiment sollte die Abhängigkeit dieses Effektes von der ASPA Defizienz bei CD untersucht werden. Dazu wurden CD- und Kontroll-RGL-NPC unter Zugabe von 20 mMol NAA ins Medium zu Astrozyten differenziert. Dabei zeigte sich in einem ersten Experiment nach zwei Wochen bei den CD-Zellen erneut die deutliche Reduktion der Zellzahl auf 17,3 (n = 1). Bei den Kontrollzellen mit intakter ASPA Aktivität war die Zellzahl nicht verändert (100,4, n = 1, Abb. 34 C, D).

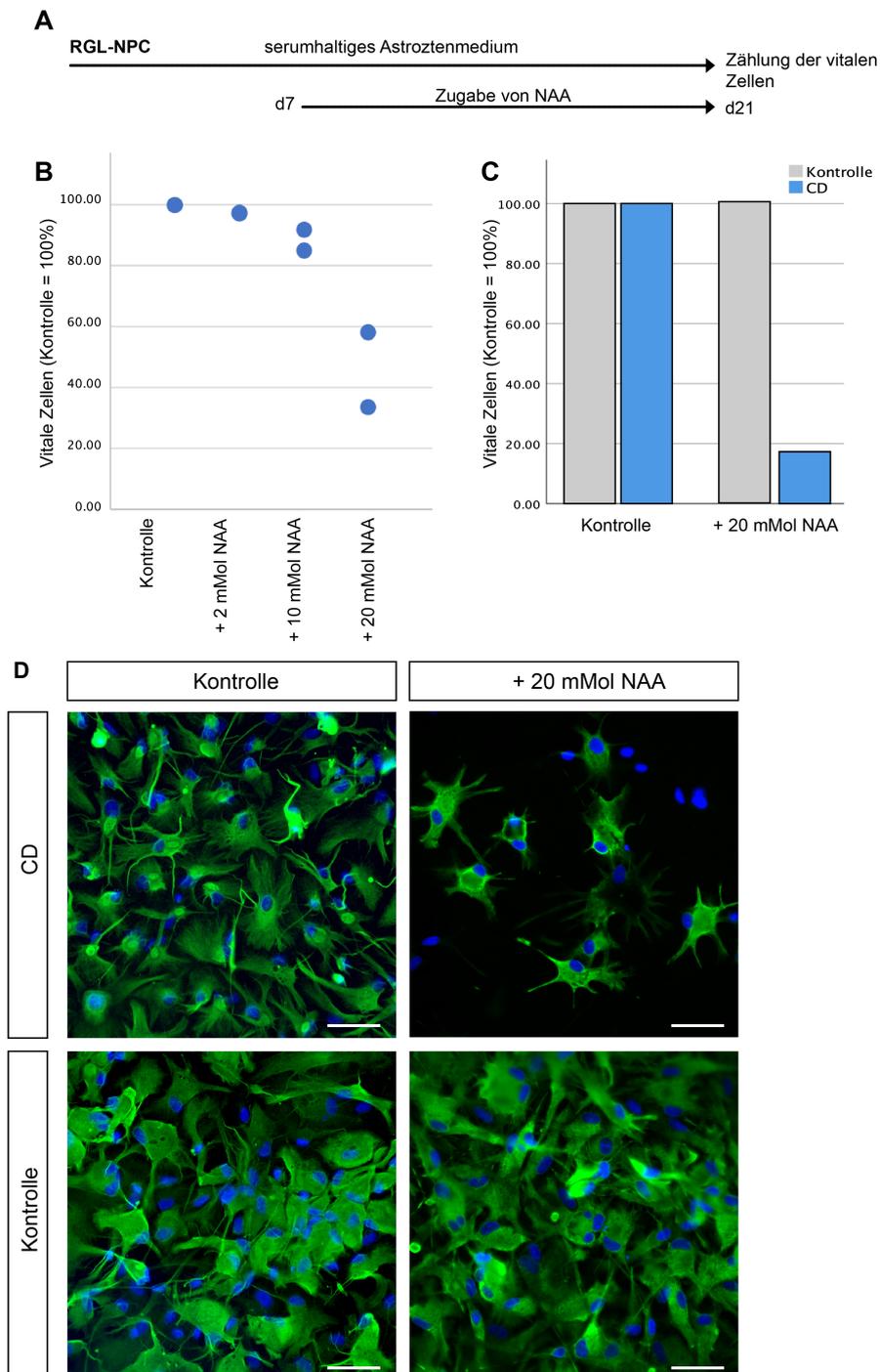


Abb. 34: Zugabe von NAA zum Kulturmedium vermindert die Zelldichte: (A) Für dieses Experiment wurden Astrozyten aus RGL-NPC eine Woche in serumhaltigem Medium differenziert, anschließend wurde dem Medium für zwei Wochen NAA zugegeben. (B) Die Zugabe von NAA zum Medium während der Differenzierung von CD-Astrozyten hat einen dosisabhängigen Effekt auf die Zellzahl ($n = 2$, Zelllinie CD8). (C) Dieser Effekt ist in gesunden Kontrollzellen nicht nachweisbar ($n = 1$, Zelllinie CD7). (D) In der Immunfluoreszenz zeigt sich deutlich die Abnahme der GFAP positiven Zellen (grün) bei Zugabe von NAA zum Medium. (Dargestellte Zelllinien: CD7 und C6, Maßstabsbalken: 50 μm)

3.4 Darstellung des Vakuolisierungsphänotyps in dreidimensionaler Kultur

Ein Kennzeichen von Morbus Canavan ist die ausgeprägte Vakuolisierung des Gehirns. Die Ursache ist bisher nicht eindeutig geklärt, vermutet wird eine gestörte Osmoregulation durch akkumulierendes NAA. Dieser Mechanismus ist ein einer einlagigen zweidimensionalen Zellkultur in der alle Zellen Kontakt zum Nährmedium haben nicht vollständig reproduzierbar. Zu überprüfen ob eine Vakuolisierung in dreidimensionaler Kultur auftritt wurden Astrozyten in Zusammenarbeit mit Julia Fischer in dreidimensionalen Sphären unter Einfluss von LIF und BMP4 ohne Zugabe von Serum differenziert. Dazu wurde eine Zellsuspension aus RGL-NPC von ca. 600 Zellen/ μ l auf *ultra low attachment dishes* ausgebracht und kultiviert, bis sich Sphären bildeten. Die Sphären wurden anschließend für 4 Wochen unter Einfluss von LIF und BMP4 differenziert. Die entstandenen Sphäroide erreichen einen Durchmesser von etwa 0,5 - 1 mm (Abb. 35).

Die Sphären wurden nach sechs Wochen in Kultur in Paraffin eingebettet und geschnitten. Immunfluoreszenzfärbungen gegen GFAP bestätigten eine nahezu vollständige GFAP Positivität der Zellen innerhalb der Sphären (Abb. 36 A, B). Es fanden sich keine β III-Mikroglobulin positiven Zellen. Über die genaue Zusammensetzung der Sphären und das Vorhandensein weiterer Zelltypen (Vorläuferzellen, Oligodendrozyten, Neurone) lässt sich anhand der durchgeführten Experimente keine sichere Aussage treffen. Der weit überwiegende Anteil der Zellen scheint jedoch astrozytär differenziert zu sein.

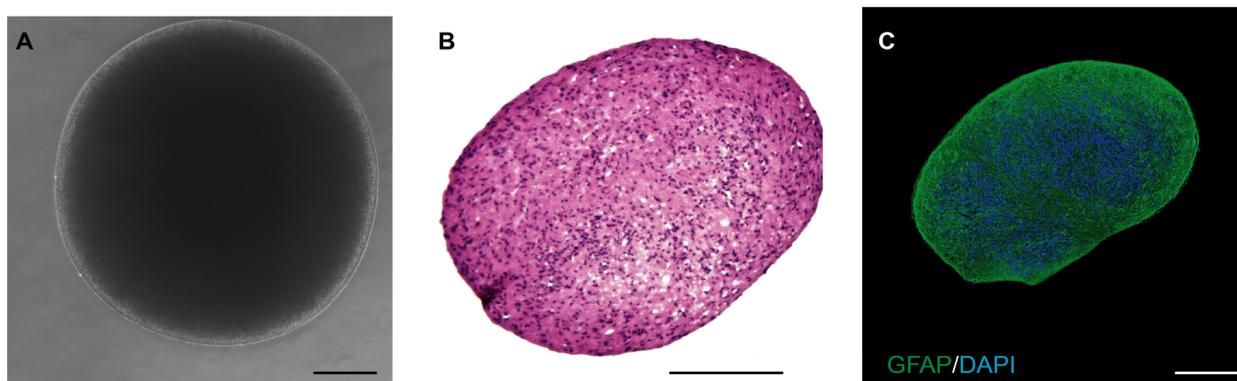


Abb. 35: Unter Einfluss von LIF und BMP4 differenzieren RGL-NPC in dreidimensionaler Kultur zu Astrozyten: (A) Phasenkontrast (B) HE Färbung (C) GFAP Immunfluoreszenz. Die Sphären aus RGL-NPC wurden für 6 Wochen LIF und BMP4 haltigem Medium differenziert. Maßstabsbalken 200 μ m

Vor allem nahe der Zellkerne findet sich eine Expression von ASPA (Abb. 36 C, D). Eine genaue Zuordnung der Fluoreszenzsignale zu einzelnen Zellen ist aufgrund des engen Zellverbundes in der dreidimensionalen Kultur schwierig, die große Mehrheit der Zellen scheint jedoch positiv für ASPA und GFAP zu sein.

Einige Sphären wurden auf Matrigel plattiert und für zwei Wochen in adhäsiver Kultur in serumfreiem Medium kultiviert. Die aus den Sphären auswandernden Zellen wiesen eine verzweigte Morphologie auf (Abb. 36 E, F). Auch diese Zellen waren in der Immunfluoreszenz positiv für GFAP (Abb. 36 G, H). Aus diesen Daten wurde gefolgert, dass die beschriebenen Sphären ein geeignetes Modell darstellen, um astrozytäre Pathologien *in vitro* zu modellieren. Daher wurden CD-RGL-NPC sowie Kontroll-RGL-NPC parallel zu astrozytären Sphären differenziert, um Effekte zu untersuchen, die in der zweidimensionalen Zellkultur nicht reproduzierbar sind. Dabei stand vor allem die Vakuolisierung im Fokus. Die Sphären wurden nach einer Differenzierungszeit von acht Wochen in Paraffin eingebettet, geschnitten und gefärbt.

Sphären aus CD-Patientenzellen wiesen dabei eine auffallende Vakuolisierung auf, die bei Kontrollzellen nicht zu finden war (Abb. 37) Diese Vakuolen sind ähnlich denen in CD-Tiermodellen. Sie treten vor allem im Zentrum größerer Sphären auf, die Randbereiche und kleinere Sphären sind frei von Vakuolen. Dies ist möglicherweise durch die schlechtere Nährstoffversorgung und/oder schlechtere Entsorgung akkumulierender Abfallstoffe erklärbar. Die Vakuolisierung variiert erheblich zwischen den einzelnen Sphären, ist bei CD Zellen jedoch deutlich ausgeprägter als bei Kontrollen.

In diesem Modell sollte untersucht werden, ob sich die Veränderungen durch eine Überexpression von ASPA beeinflussen lassen. Dazu wurden die mit dem ASPA Vektor infizierten RGL-NPC zu Sphären differenziert und untersucht. Hier zeigte sich eine leicht verminderte Vakuolisierung im Vergleich zu den CD Sphären, jedoch waren mehr Vakuolen sichtbar als bei Kontrollzellen (Abb. 36 C, F, I). Aufgrund einer hohen Variabilität der Vakuolisierung der einzelnen Sphären die auf verschiedene Einflussfaktoren hinweist (z.B. Größe der Sphäre), ist eine quantitative Aussage nicht sicher möglich.

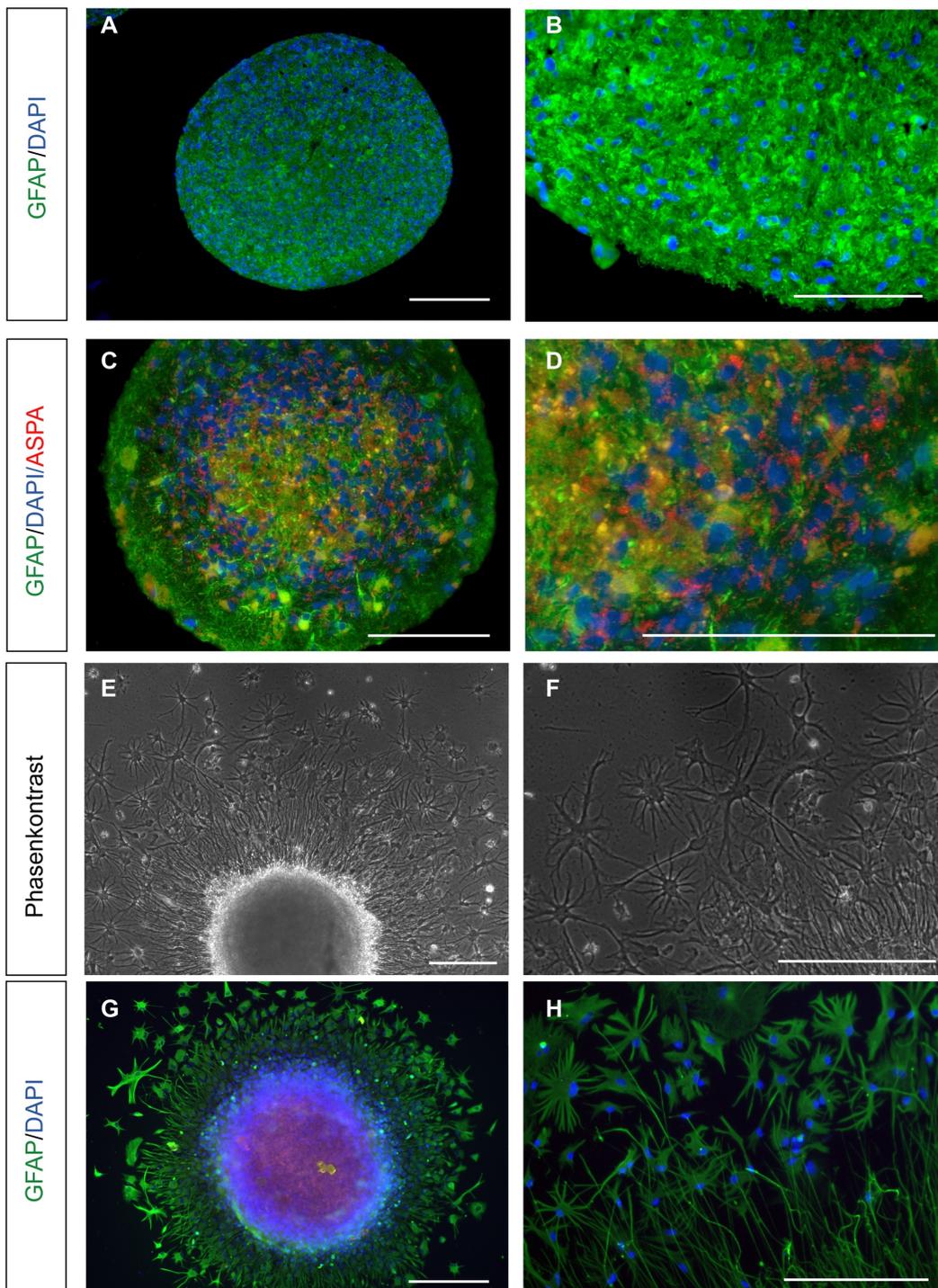


Abb. 36: Kontroll RGL-NPC abgeleitete Astrosphären exprimieren ASPA. Innerhalb der Sphären ist die überwiegende Mehrheit der Zellen GFAP positiv (**A, B**, Immunfluoreszenzfärbung auf Paraffinschnitten). In den Sphären findet sich ASPA Expression, vor allem nahe der Zellkerne (**C, D**). Werden die in serumfreiem Medium differenzierten Sphären auf Matrigel plattiert, wachsen Zellen mit verzweigter Morphologie aus (**E, F**, Phasenkontrast), diese Zellen sind positiv für den astrozytären Marker GFAP (**G, H**). Die Zellen wurden nach einer Differenzierungszeit von 6 Wochen in Paraffin eingebettet, geschnitten und gefärbt (**A-D**) bzw. auf Matrigel plattiert (**E-H**). Maßstabsbalken 250 µm, Zelllinie: C6 (ASPA Wildtyp)

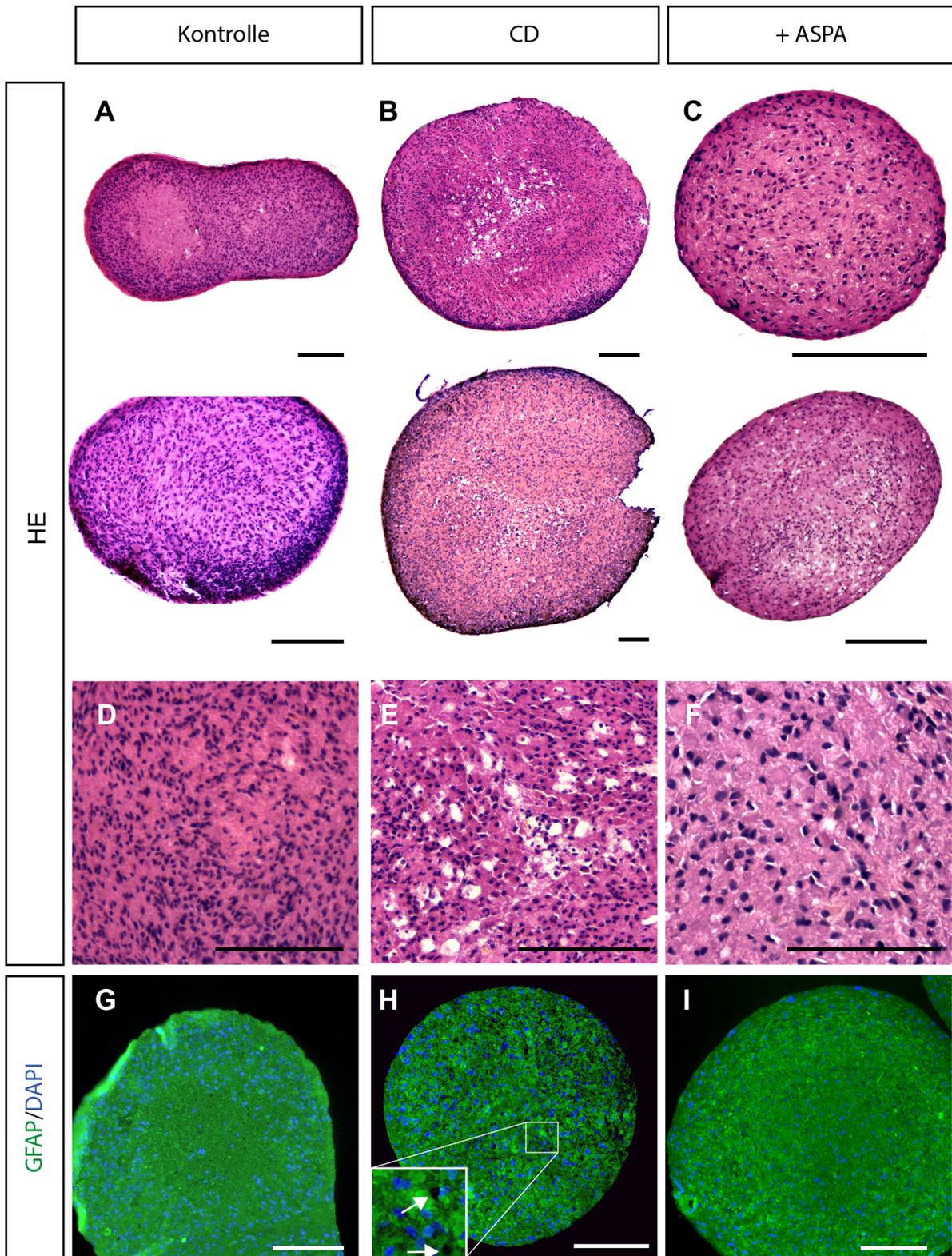


Abb. 37: Vakuolisierung in astrozytären Sphären: In serumfreiem Medium differenzierte Sphären aus Kontroll-RGL-NPC weisen keine Vakuolisierung auf (**A, D, G**). Aus CD-RGL-NPC differenzierte Sphären weisen vor allem zentral deutliche Vakuolen auf (**B, E, H**). Diese sind in der GFAP Färbung als Aussparungen erkennbar (Pfeile, **H**). Durch die Überexpression von ASPA in den CD Zellen scheint diese Vakuolisierung reduziert, die große Variabilität zwischen den einzelnen Sphären erschwert eine Beurteilung (**C, F, I**). A-F sind HE gefärbte Paraffinschnitte 8 Wochen differenzierter Sphären, bei G-I handelt es sich um Immunfluoreszenzfärbungen GFAP positiver Zellen (grün). Zelllinien: H9.2 (**A, D, G**), CD8 (**B, E, H**), CD8 + ASPA (**C, F, I**), Maßstabsbalken: 200 µm

Es sollte untersucht werden, ob erhöhte NAA Konzentrationen im Medium in der Lage sind, die beschriebenen Vakuolen in aus gesunden Zellen differenzierten Sphären hervorzurufen. Dazu wurden analog zu den Versuchen im zweidimensionalen Modell Sphären aus gesunden Kontrollzellen in serumfreiem Medium für vier Wochen vordifferenziert und anschließend in Medium mit 20 mMol NAA für weitere zwei Wochen kultiviert. Die entstandenen Sphären wurden eingebettet und gefärbt. Dabei zeigten sich im Vergleich zu Kontrollen eine verstärkte zentrale Vakuolisierung, die im Ausmaß Ähnlichkeit mit CD-iPSC abgeleiteten Sphären hat (Abb. 38). In der Immunfluoreszenz wird deutlich, dass diese Vakuolen im Unterschied zu „leeren Räumen“ als Ausdruck lockerer Zellverbände oder von Fixierungsartefakten, von GFAP positiven Strukturen eingeschlossen sind (Pfeile in Abb. 38) Diese ähneln morphologisch den Vakuolen, die in CD Zellen auftreten (Abb. 37). Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Julia Fischer durchgeführt, die die Färbungen, Schnitte und Bilder anfertigte.

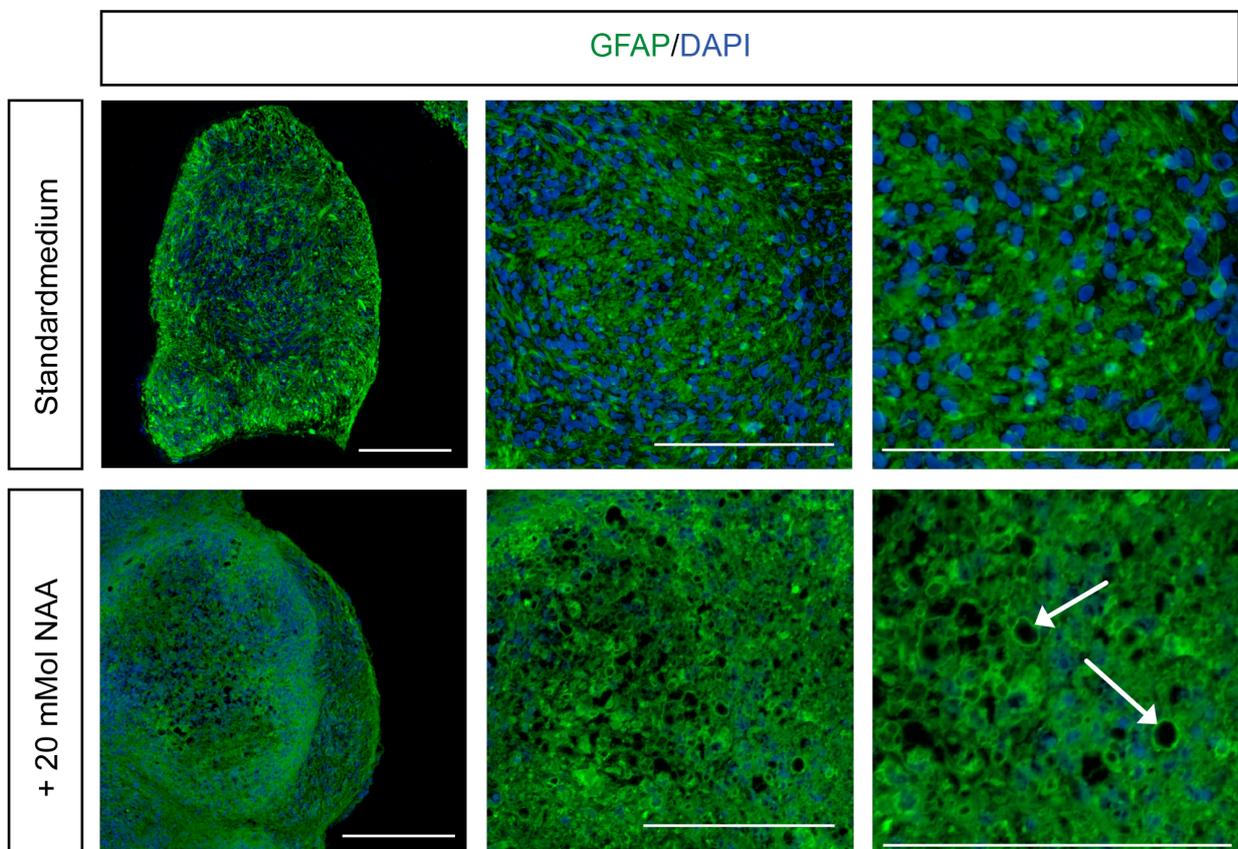


Abb. 38: Zugabe von NAA zum Kulturmedium verstärkt die Vakuolisierung: Serumfrei differenzierte Astrozyten aus Kontroll-RGL-NPC in dreidimensionaler Kultur weisen deutliche Vakuolen (Pfeile) auf, wenn dem Differenzierungsmedium nach 4 Wochen Differenzierung für weitere 2 Wochen 20 mMol NAA zugegeben wird (**D-E**). (Bilder von Julia Fischer) Maßstabsbalken 200 μ m

3.5 Phänotypische Unterschiede zu murinen Astrozyten in vitro

Die Forschung zur Zell- und Molekularbiologie von CD findet bisher fast ausschließlich an Nagetieren bzw. Nagetierzellen statt. Um die Validität dieser weit verbreiteten Modelle zu überprüfen, sollten die in unserem humanen Zellmodell beobachteten Pathologien an murinen Zellen überprüft werden. Dazu wurden primäre Maus NPC (Primärzellen aus E14.5 Maus-ZNS) aus

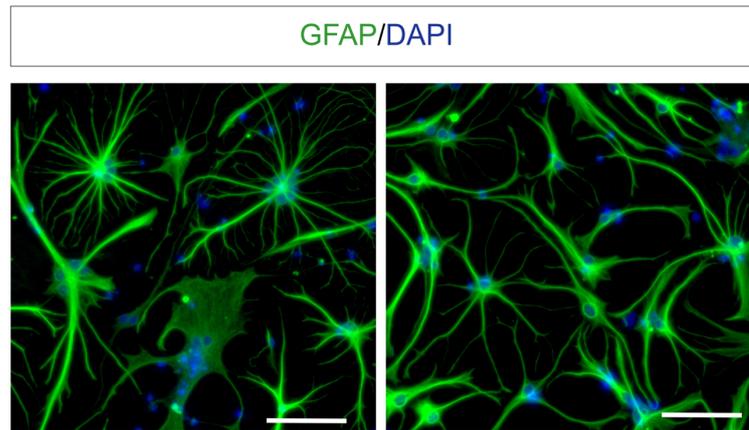


Abb. 39: Astrozyten aus murinen NPC: Nach 2 Wochen Kultur in serumhaltigem Medium weisen murine NSC eine verzweigte Morphologie und GFAP Positivität auf. Dargestellt sind Zellen aus ASPA WT NSC, Maßstabsbalken: 75 μ m

Embryonen von ASPA/RAG2 Mäusen präpariert. Dabei wurde je eine Linie homo- und heterozygot ASPA mutierter Zellen sowie eine wildtypische Linie generiert. Die Tierzucht sowie die Präparation der Zellen wurden von Julia Fischer durchgeführt. Die murinen NSC wurden analog zu den humanen RGL-NPC für zwei Wochen in serumhaltigem Medium differenziert. Sie wiesen anschließend die für Astrozyten typische, verzweigte Morphologie sowie in der Immunfluoreszenz Positivität für GFAP auf (Abb. 39). Im Vergleich zu humanen, in serumhaltigem Medium aus RGL-NPC abgeleiteten Astrozyten sind die murinen Zellen filigraner mit weniger flächigen Ausläufern. Sie ähneln damit eher den in serumfreiem Medium differenzierten humanen Astrozyten. Die murinen Astrozyten wurden analog zu den humanen Zellen im TEM analysiert. Morphologisch stellten sich die Mitochondrien sowohl in hetero- als auch homozygoten ASPA *knock out* (KO) Zellen unauffällig dar. Ausgeprägte Schwellungen und Cristae-Veränderungen sind im Gegensatz zum humanen Zellmodell nicht zu finden (Abb. 40). Die Mitochondrien stellten sich nicht vergrößert dar. Weder Feret-Durchmesser (homozygote Zellen 1,14 μ m, heterozygote Zellen 1,189 μ m, Kontrollzellen 1,22 μ m) noch die Schnittfläche (homozygot 0,29 μ m, heterozygot 0,31 μ m, Kontrolle 0,34 μ m) waren signifikant verändert (Abb. 41, n = 254 Wildtyp, 262 heterozygot, 256 homozygot)

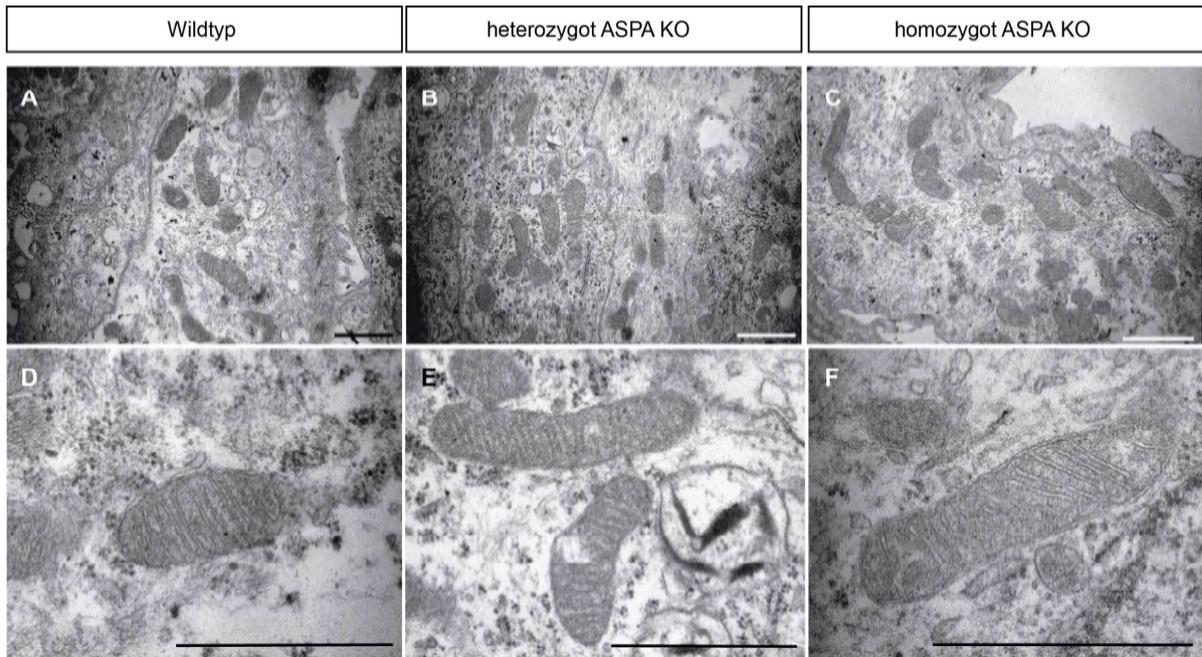


Abb. 40: Mitochondrien ASPA überexprimierender Astrozyten im TEM : Die Mitochondrien der Astrozyten aus hetero (B, E) – und homozygoten (C, F) ASPA KO Mauszellen waren gegenüber WT Kontrollzellen (A, D) nicht auffallend verändert. Insbesondere waren keine Störungen der Cristae Struktur und keine leer erscheinenden Räume sichtbar. Dargestellt sind TEM Aufnahmen von für zwei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierten Astrozyten aus primären murinen NSC. Maßstabsbalken 1 μm

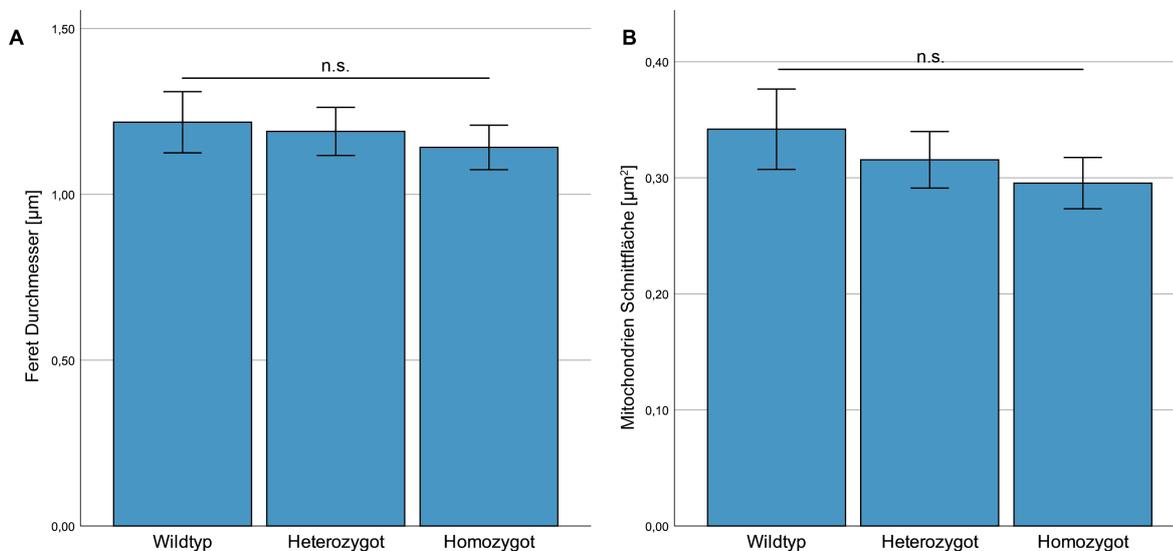


Abb. 41: Auswertung im TEM vermessenen Mitochondrien: Der Feret-Durchmesser der Mitochondrien in ASPA mutierten Zellen ist gegenüber gesunden Kontrollen nicht signifikant vergrößert (A). Gleiches gilt für die Schnittfläche (B). Dargestellt ist die manuelle Vermessung der Mitochondrien von über zwei Wochen in serumhaltigem Medium aus primären murinen NSC differenzierten Astrozyten, n = 254 Wildtyp, 262 Heterozygot, 256 Homozygot. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Analog zu den humanen iPSC-abgeleiteten Astrozyten wurden die murinen Astrozyten auf die Aktivität des Komplex I der Atmungskette untersucht. Dabei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen ASPA KO Zellen ($85,3 \pm 41,54 \%$) und heterozygoten KO Zellen ($118,18 \pm 42,42 \%$) und Wildtyp Kontrollen ($100 \pm 36,58 \%$, Abb. 42, $n = 2$).

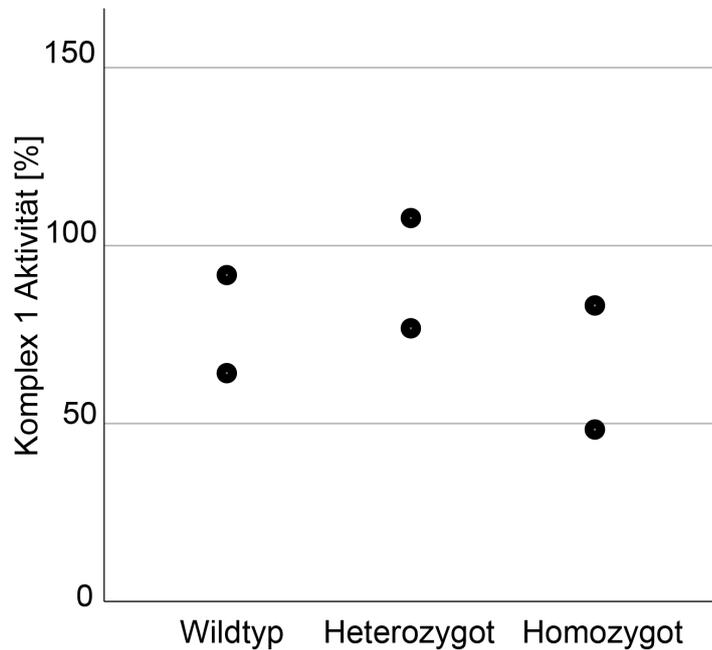


Abb. 42: Aktivität von Komplex 1 der Atmungskette in murinen Astrozyten: Dargestellt ist die Aktivität von Komplex 1 der Atmungskette in aus primären murinen NSC über zwei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierten Zellen. Diese scheint nicht im Zusammenhang mit der ASPA Aktivität zu stehen. Das Experiment wurde zweimal wiederholt, die Punkte stellen einzelne Messungen dar. 100% bezeichnet die Aktivität humaner, wildtypischer Astrozyten die parallel differenziert wurden.

4 Diskussion

4.1 Erfolgreiche Generierung eines CD Krankheitsmodelles

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro* Krankheitsmodell für Morbus Canavan auf Basis patientenspezifischer Stammzellen beschrieben. Zusammen mit den Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe stellt dies die erste Möglichkeit dar, die Erkrankung an betroffenen menschlichen Zellen näher zu untersuchen. Dabei ist es erstmals gelungen, den astrozytären Phänotyp und vor allem die aus humanem *post-mortem* Gewebe bekannte Verlängerung astrozytärer Mitochondrien in einem Modell zu reproduzieren.

Aus CD-iPSC wurden erfolgreich RGL-NPC generiert. Diese waren in der Lage zu Astrozyten sowie Neuronen und Oligodendrozyten zu differenzieren. Dabei zeigte sich im Differenzierungsverhalten kein offensichtlicher Unterschied zu gesunden Kontrolllinien.

Inwieweit ein Unterschied im Differenzierungsverhalten in der Zellkultur zu erwarten ist, ist fraglich. ASPA ist nicht obligat für die Differenzierung der Zellen im ZNS, in sämtlichen CD Tiermodellen können alle Zelltypen nachgewiesen werden. In verschiedenen Tiermodellen wurden jedoch Unterschiede in Differenzierung und Überleben verschiedener Zelltypen im ZNS beschrieben. In einigen Fällen scheint es sich um reaktive Prozesse zu handeln (Traka u. a., 2008a); teilweise scheint auch eine veränderte Migrationsfähigkeit eine Rolle zu spielen (Francis u. a., 2006a). Es werden aber auch zellintrinsische Prozesse beschrieben. Eine ASPA Defizienz scheint zu einer vermehrten Proliferation von Progenitorzellen zu führen, möglicherweise durch eine verminderte Deacetylierung von Histonen (Kumar u. a., 2009a). Diese Effekte lassen sich in Zellkulturmodellen möglicherweise nicht nachbilden. Ein Überangebot an Nährstoffen im Zellkulturmedium könnte Pathomechanismen, die mit einem Energie- bzw. Acetyl-CoA Mangel zusammenhängen maskieren. In der zweidimensionalen Zellkultur sind auch Veränderungen im Nährstofftransport und -austausch zwischen den Zelltypen des ZNS nicht ausreichend darstellbar. Im Extrazellulärraum akkumulierende Substanzen (in Fall von CD vor allem NAA) werden im Zellkulturmedium verdünnt und durch regelmäßige Mediumwechsel entfernt.

Unsere Ergebnisse bestätigen, dass *in vitro* unter den gegebenen, stressarmen Zellkultur-Bedingungen in humanen Zellen die Funktionalität der ASPA für die Differenzierung keines der untersuchten Zelltypen essentiell ist.

Mitochondriale Veränderungen bei CD sind in der Literatur beschrieben (Adachi u. a., 1972). Um diese Veränderungen in unserem Modell zu untersuchen färbten wir die Mitochondrien in CD-Astrozyten immunhistochemisch an. In unserem Zellkulturmodell weisen die Mitochondrien von CD Zellen gegenüber Kontrollen veränderte Formparameter auf: Die aspect ratio (AR) ist dabei vermindert und der form factor (FF) erhöht. Das bedeutet, dass die Mitochondrien weniger langgestreckt und verzweigter sind. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Arbeiten an Mitochondrien mit isoliertem Komplex I Defekt (Koopman u. a., 2005) . Die Autoren vermuten hinter der Beobachtung einen Mechanismus, der die ATP Produktion durch erhöhte Netzwerkkomplexität verbessert. Vor allem die Erhöhung des Form Factors scheint dabei relativ spezifisch für Defekte des Komplex I zu sein. In einer weiteren Studie konnte die gleiche Gruppe zeigen, dass die zunehmende Verzweigung der Mitochondrien bei Komplex I Defekten mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale zusammenhängt (Koopman, 2005). Der genaue Mechanismus ist nach wie vor ungeklärt.

Unsere Beobachtungen weisen auf eine Beteiligung von Mitochondrien in CD Astrozyten hin und geben Hinweise auf eine Schädigung der Atmungskette. Um diese zu belegen sind jedoch Messungen der Komplexaktivitäten notwendig (siehe Abschnitt 1.1.5).

Bei der Untersuchung immunhistochemisch veränderter Mitochondrien ließen sich in unserem Zellkulturmodell verlängerte Mitochondrien ausmessen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Angaben aus pathologischen Untersuchungen aus humanem Gewebe. Das Quantifizieren der Größenparameter der Mitochondrien im Lichtmikroskop erwies sich jedoch schwierig. Mitochondrien bilden weit verzweigte Netzwerke, die bei lichtmikroskopischer Auflösung nicht immer klar zu trennen sind. Außerdem treten aufgrund der Dicke der Präparate zahlreiche Überlagerungen auf, die das Messen erschweren. Durch die softwarebasierte Auswertung konnte eine große Zahl an Bildobjekten ausgewertet werden, um diese Effekte zu minimieren. Dennoch ist die das System störanfällig, sodass für eine valide Aussage eine weitere Untersuchungsmethode notwendig scheint.

Daher führten wir zur weiteren Validierung der Ergebnisse elektronenmikroskopische Untersuchungen von CD-Astrozyten durch. Dabei konnten wir die Beobachtung verlängerter Mitochondrien bestätigen. Die etwa um den Faktor drei kürzere Länge der

Mitochondrien im EM im Vergleich zu den lichtmikroskopischen Auswertungen erklärt sich durch bessere Auflösung vernetzter Mitochondrien sowie die Tatsache dass durch die deutlich geringere Schnittdichte im Elektronenmikroskop die Mitochondrien in verschiedenen Ebenen angeschnitten werden.

Zusätzlich zur Vergrößerung der Mitochondrien konnten wir deutliche Veränderungen der Struktur nachweisen, insbesondere eine verringerte Ausbildung der Cristae und große, leer erscheinende Bereiche innerhalb der Mitochondrien. Diese Befunde passen gut zu den bei CD beschriebenen Veränderungen (Adachi u. a., 1973a). Ähnliche Veränderungen sind für andere Erkrankungen des ZNS beschrieben, darunter Alzheimer Demenz, Morbus Huntington und HIV assoziierte Demenz (Baloyannis, 2013; Costa & Scorrano, 2012; Martins u. a., 2016; Rozzi u. a., 2017). Mitochondriale Defizite wurden in Krankheitsmodellen verschiedener neurodegenerativer und neuropsychiatrischer Erkrankungen beobachtet (Mlody u. a., 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien bei Energiemangel bevorzugt fusionieren, um der Autophagie zu entgehen und die ATP Produktion aufrecht zu erhalten (Gomes u. a., 2011). Vor diesem Hintergrund können die verlängerten Mitochondrien als Hinweis auf einen Energiemangel in CD-Astrozyten verstanden werden. Auch wenn der genaue Mechanismus ungeklärt bleibt, unterstützt diese Beobachtung die Hypothese, dass CD eine Erkrankung des Energiestoffwechsels ist.

Die Mitochondrien von CD Zellen wiesen eine verminderte *aspect ratio* und einen größeren *form factor* auf, als Mitochondrien in Kontrollzellen (Abschnitt 3.3.2). Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Mitochondrien verzweigter und weniger langgestreckt sind. Sehr ähnliche Veränderungen sind im Zusammenhang mit Komplex I Defizienz beschrieben (Koopman u. a., 2005). Daher untersuchten wir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Wolfram Kunz die Aktivität der Atmungskettenkomplexe in CD Astrozyten. Dabei zeigte sich im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine verminderte Aktivität des Komplex I. Defekte der Atmungskette und speziell des Komplex I sind mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen assoziiert. In der Substantia nigra von Parkinson Patienten findet sich eine reduzierte Komplex I Aktivität (Schapira u. a., 1990), auch bei Patienten mit Temporallappenepillepsie ist ein Komplex I Defekt zu beobachten (Kunz u. a., 2000). Das genetische Leigh-Syndrom, das häufig mit Mutationen im Komplex I einhergeht, führt zu Demyelinisierung und Vakuolisierung des Gehirns mit

Aussparung der Neurone. Diese pathologischen Veränderungen ähneln denen in CD. Auch wenn die genaue Bedeutung der Beobachtung für die Pathogenese von CD unklar bleibt, unterstreichen diese Parallelen die Wichtigkeit des Komplex I für die Funktion des ZNS. Diese Hinweise auf ähnliche Pathomechanismen mit anderen Erkrankungen des ZNS sind bisher rein spekulativ, bieten jedoch interessante Perspektiven zur Einordnung von CD. Eine wichtige Funktion des Energiestoffwechsels in der Entstehung von CD wird verbreitet angenommen. Der Befund einer verminderten Aktivität des Komplex I, eines zentralen Elementes im zellulären Energiestoffwechsel, passt in dieses Bild.

4.2 Exogenes NAA verringert die Zellzahl von Astrozyten in Kultur

In Tiermodellen ist gut belegt, dass NAA keine zytotoxischen Effekte hat (Nordengen u. a., 2013; Appu u. a., 2017). Eine Induktion epileptischer Anfälle im Tiermodell ist beschrieben, allerdings bei Konzentrationen die deutlich über den in CD beobachteten liegen (Akimitsu u. a., 2000; Kitada u. a., 2000; Klugmann u. a., 2005b). Auch bei CD Patienten treten Epilepsien gehäuft auf, über den Zusammenhang mit der NAA Konzentration ist jedoch nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von NAA auf Kulturen humaner Astrozyten *in vitro* untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Diskrepanz zwischen CD und Kontrollzellen. Während Kontrollzellen mit ASPA Aktivität keine signifikante Beeinträchtigung zeigten, war die Zelldichte von CD Astrozyten erheblich erniedrigt, was als Zeichen für einen vermehrten Zelluntergang verstanden werden kann. Diese Beobachtung ist kompatibel mit der Hypothese, dass erhöhte NAA Spiegel für das ZNS unproblematisch sind, solange ASPA Aktivität vorhanden ist (Appu u. a., 2017).

Ein Faktor für die Unterschiede zwischen CD und Kontrollzellen ist möglicherweise eine Funktion der ASPA in der Genexpression. Die BDNF Expression in primären Ratten Oligodendrozyten steigt signifikant an, wenn keine ASPA Aktivität vorliegt und NAA hinzugegeben wird. Ist ASPA aktiv, erhöht externes NAA die Expression nicht signifikant (Francis u. a., 2006b). Inwiefern sich diese Beobachtung auf andere Zelltypen und Gene übertragen lässt, ist nicht bekannt.

In Astrozyten mit normaler ASPA Aktivität zeigten sich die Mitochondrien im EM nach Kultur in Medium mit 10mMol NAA signifikant verlängert. Dies ist mit dem in Abschnitt 4.6 etablierten Modell vereinbar, da Astrozyten in diesem System vermehrt NAA in ihr

Zytoplasma aufnehmen. Da Astrozyten nur eine geringe ASPA Aktivität aufweisen und mit jedem Mediumwechsel neues NAA hinzugegeben wird, ist es den Zellen nicht möglich das NAA vollständig abzubauen. Es kommt daher in astrozytären Mitochondrien wie bei CD zu einem Aspartat Überschuss mit indirekter Hemmung des Energiestoffwechsels. Die dosisabhängige Wirkung auf die Zellzahl bereits in physiologischen Konzentrationen kann verschiedene Ursachen haben. Erstens wird das NAA zusätzlich zum endogen produzierten NAA hinzugegeben, sodass eine höhere intrazelluläre Konzentration resultiert. Zweitens fällt die Veränderung des pH-Wertes in der Zellkultur durch andere Puffersysteme möglicherweise größer aus als im Gehirn.

4.3 ASPA Überexpression verringert die Pathologie in CD-Astrozyten

Die ASPA überexprimierenden CD Zellen haben kürzere Mitochondrien als unbehandelte CD Zellen. Der Feret-Durchmesser ist gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht, die Oberfläche der Mitochondrien nicht. Wir werten diese Beobachtung als Beleg dafür, dass die mitochondrialen Veränderungen unmittelbar mit dem ASPA Mangel bei CD zusammenhängen. Für die Unterschiede gegenüber Kontrollzellen gesunder Probanden kommen verschiedene Gründe in Betracht. Erstens erfolgt eine Überexpression über den sehr aktiven EF1 α -Promotor, dadurch liegt die ASPA Aktivität deutlich über der natürlichen. Die Auswirkungen einer erhöhten ASPA Aktivität sind nicht bekannt. Eine Wiederherstellung der natürlichen Aktivität beispielsweise durch Korrektur der Mutation mittels CRISPR/Cas9 könnte Abhilfe schaffen. Zweitens wurden die überexprimierenden Zellen vor der Transfektion für mehrere Passagen ohne ASPA Aktivität in Kultur gehalten. Veränderungen in Stoffwechsel und Epigenetik können nicht ausgeschlossen werden, sind jedoch rein spekulativ. Drittens besteht zwischen den Zelllinien eine natürliche Schwankung bezüglich der Genetik. Diese Schwierigkeiten lassen sich letztlich nur durch die Generierung isogener Kontrolllinien umgehen.

4.4 Nachweis des Vakuolisierungsphänotyps in dreidimensionaler Kultur

Die Limitationen des etablierten zweidimensionalen Zellkulturmodelles liegen vor allem in der Natur der Methode. So handelt es sich stets um reduktionistische Kulturen von Zellen,

die nicht über die sonst *in vivo* vorhandenen Kontakte zum umgebenden Gewebe verfügen. Dadurch lassen sich interzelluläre Pathologien und gewebsspezifische Effekte nur unzureichend reproduzieren. Vor diesem Hintergrund ist es wenig verwunderlich, dass die Vakuolisierung, die vermutlich auf die Akkumulation von NAA zurückzuführen ist, in der zweidimensionalen Zellkultur nicht nachweisbar ist.

Um die Pathologie im Gewebeverband bestmöglich darstellen zu können, etablierten wir ein dreidimensionales Modell in Form von Sphäroiden aus RGL-NPC abgeleiteten Astrozyten. Auch hierbei traten keine offensichtlichen Unterschiede in Differenzierungsverhalten und Morphologie zwischen CD- und Kontrollzellen auf. In sphärischen Astrozytenkulturen ließen sich vor allem zentral deutliche Vakuolen nachweisen, die große Ähnlichkeit zu den in Tiermodellen vorkommenden Vakuolen aufwiesen. Dies werten wir als deutlichen Hinweis auf eine Störung des osmotischen Gleichgewichtes durch extrazellulär akkumulierendes NAA. Die Lage der Vakuolen nahe dem Zentrum der Sphäroide kann als Hinweis gewertet werden, dass eine schlechtere Nährstoffversorgung bzw. Abfallstoffentsorgung eine Rolle in der Entstehung spielt. Wir gehen davon aus, dass sich in Organoiden, die über alle Zelltypen des ZNS verfügen, weitere Aspekte der Pathologie wie beispielsweise die Myelinisierung untersuchen lassen können.

4.5 Hinweis auf Unterschiede zwischen humanen und murinen Astrozyten

Seit Entdeckung des ersten CD Tiermodelles sind Untersuchungen zur Pathologie der Erkrankung vor allem an Mäusen und Ratten durchgeführt worden. Dabei wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen nicht grundsätzlich in Frage gestellt. Die Validität der Tiermodelle wird gestützt durch die Tatsache, dass die pathologischen Veränderungen im Gehirn (Demyelinisierung, Vakuolisierung) im Tiermodell reproduziert werden können (Matalon u. a., 2000; Mersmann u. a., 2011; Traka u. a., 2008b). Auf zellulärer Ebene gibt es jedoch keine Untersuchungen an menschlichem Gewebe seit den Arbeiten der 70er Jahre (Adachi u. a., 1966, , 1972, , 1973a, , 1973b). Vor allem in Bezug auf die Beteiligung der verschiedenen Zelltypen an der Krankheitsentstehung gibt es keine Daten aus menschlichen Zellen.

In den EM Studien an humanem post-mortem Gewebe finden sich Veränderungen vor allem im Myelin und in Astrozyten. Während die Demyelinisierung und Vakuolisierung im

Tiermodell ausgiebig untersucht wurden und reproduzierbar sind, gibt es keine Berichte über pathologische Veränderungen in Astrozyten im Tiermodell. In der Aspa LacZ Maus sind geschwollene Axone beschrieben (Mersmann u. a., 2011). In humanem Gewebe scheinen die Neurone, ihre Fortsätze und die Synapsen hingegen unverändert. Die Schwellungen treten hier in Astrozyten und im Myelin auf (Adachi u. a., 1973a). Dies spricht dafür, dass es Unterschiede in der interzellulären Verteilung der einzelnen Schritte des NAA Stoffwechsels zwischen Nager und Mensch gibt.

Es konnte gezeigt werden, dass der Transporter NaDC3 NAA Na⁺ abhängig durch Zellmembranen transportiert. Die Expression dieses Transporters im menschlichen Gehirn ist in Astrozyten und RG nachweisbar, nicht jedoch in Neuronen (Huang u. a., 2000a). Neuere RNA Sequenzierungsstudien deuten auf eine schwache Expression in menschlichen, nicht aber in murinen Neuronen hin (Zhang u. a., 2014b). Die gleiche Studie fand die Expression von Asp-NAT im humanen ZNS weitestgehend auf Astrozyten beschränkt, in der Maus hingegen gleichmäßig auf Astrozyten und Neurone verteilt. Dies könnte die in Mäusen sichtbare Schwellung der Neurone erklären, da die Akkumulation von NAA hier ausgeprägter wäre als in menschlichen Zellen. Die nicht veränderten Mitochondrien in murinen ASPA-KO Zellen deuten auf andere Gleichgewichtsverhältnisse im Energiestoffwechsel im Gehirn der Maus hin, die genaue Ursache ist jedoch unklar. Dennoch stellen diese Ergebnisse die Validität von Mausmodellen für die Erforschung von CD ernsthaft in Frage.

4.6 Hypothese für die astrozytäre Beteiligung an der Pathogenese von CD

Über die Rolle von Astrozyten in der Pathogenese von CD ist wenig bekannt. Auf Grund der Demyelinisierung als führendem Symptom sowie der primär oligodendroglialen Expression von ASPA haben sich die meisten Untersuchungen auf Oligodendrozyten und Neurone konzentriert. Die Beobachtung veränderter Mitochondrien in Astrozyten in pathologischen Präparaten (Adachi u. a., 1973a) sowie die Hinweise auf eine primär astrozytäre Lokalisation von Asp-NAT in menschlichen Zellen (Zhang u. a., 2014a) deuten jedoch auf eine Rolle der Astrozyten hin.

In einer Studie wurde im CD Modell der Tremor-Ratte durch einen selektiv neurotrophen AAV-Vektor das ASPA Gen in Neuronen exprimiert. Die Genübertragung erfolgte am postnatalen Tag 22 - 24. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß eine Steigerung der

Enzymaktivität im Gehirn sowie eine Reduktion der magnetresonanzspektroskopisch gemessenen NAA Konzentration. Eine Verbesserung der Vakuolisierung, Myelinisierung sowie der motorischen Leistungsfähigkeit blieb jedoch aus (Klugmann u. a., 2005b). In einer anderen Arbeit erfolgte die Expression über einen oligodendrozytenspezifischen Promotor (Olig-1) am postnatalen Tag p 2-3 in der nur-7 Maus. Dabei zeigte sich eine deutliche Verbesserung des pathologischen (Myelinisierung, Vakuolisierung) und des klinischen (motorische Leistung) Phänotyps (Francis u. a., 2016). Eine dritte Gruppe nutzte AAV Vektoren und den GFAP Promotor um eine spezifische Expression von ASPA in Astrozyten von ASPA KO Mäusen zu erreichen. Hier fand die Behandlung am 20. Postnataltag statt. Auch diese Arbeit zeigte eine deutliche Verbesserung des pathologischen Phänotypes, die motorischen Leistungen der behandelten Mäuse übertraf sogar die der wildtypischen Kontrolltiere (Gessler u. a., 2017). Auch wenn diese Studien auf Grund methodischer Unterschiede (unterschiedliche Therapiezeitpunkte, Vektoren und Tiermodelle) nur bedingt vergleichbar sind, weisen sie doch auf eine wichtige Rolle der Gliazellen in der Pathogenese von CD hin.

Im Folgenden wird ein Modell der CD Pathophysiologie entworfen, das die Beobachtungen dieser Arbeit mit der Literatur in Einklang bringen soll. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Nummerierung in Abb. 43:

Astrozyten haben mit ihren Endfüßen Kontakt zu Kapillaren und verfügen in der Plasmamembran über aktive Transporter für Glukose (1). Sie haben eine hohe Aktivität der Glykolyse, ein großer Teil des entstehenden Pyruvats wird in Lactat umgewandelt, das Neuronen als Energiequelle dient (Bélanger u. a., 2011). Astrozyten nehmen aktiv Glutamat aus dem Extrazellulärraum auf (2). Dieses wird größtenteils in Glutamin umgewandelt und an Neurone abgegeben (3). Ein Teil des Glutamats wird durch Transaminierung zu α -Ketoglutarat in den Zitratzyklus eingeschleust (4) und dient zur Energiegewinnung (McKenna u. a., 2006). Dieser Anteil nimmt mit der Glutamatzufuhr zu (McKenna u. a., 1996). Die Transaminierung von Glutamat zu α -Ketoglutarat ist gekoppelt an die Reaktion von Oxalacetat zu Aspartat. Bei der Einschleusung von Glutamat in den Zitratzyklus entsteht also indirekt Aspartat. Dieses kann über das Malat-Aspartat-Shuttle die mitochondriale Matrix verlassen (5). Dieser Transporter ist jedoch in Astrozyten nur schwach aktiv (McKenna u. a., 2006; Berkich u. a., 2007). Eine weitere Möglichkeit, Aspartat aus dem Mitochondrium auszuschleusen, ist die Umwandlung in NAA durch die

Asp-NAT (6). Dieses NAA kann dann durch den in Astrozyten stark exprimierten (Zhang u. a., 2014a) NaDC3 Transporter (7) aus der Zelle transportiert werden (Sager u. a., 1999; Huang u. a., 2000b; George u. a., 2004). In Oligodendrozyten kann das NAA durch ASPA abgebaut werden (8), Ein Funktionsausfall der ASPA führt zu einer Akkumulation von NAA. Dies führt zu einer Bindung von Wasser im Intrazellulärraum und damit zur Bildung von Vakuolen (9).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass von CD Patienten iPS Zell-abgeleitete Astrozyten morphologisch veränderte Mitochondrien und funktionelle Einschränkungen im Energiestoffwechsel aufweisen. Daher ist eine funktionelle Rolle von ASPA im Energiestoffwechsel anzunehmen. Das beim Abbau von NAA entstehende Acetat kann für die Synthese von Lipiden verwendet werden. Aspartat kann dem Energiestoffwechsel zugeführt werden. Dies ist mit der Beobachtung zu vereinbaren, dass Aspartat aus NAA nicht exportiert wird und Acetat nicht in den oligodendroglialen Zitratzyklus eingeht (Amaral u. a., 2016). NAA könnte damit eine Art Pufferfunktion für Energie im ZNS übernehmen. Diese These wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die NAA Konzentration nach Schädel-Hirn-Traumata abnimmt, was als Hinweis auf die verstärkte Mobilisierung der Reserven verstanden werden kann (Moffett u. a., 2013a). Eine Abnahme der ATP Konzentration sowie eine Zunahme des oxidativen Stresses im CD Tiermodell ist nachgewiesen (Francis u. a., 2012b). Dass Acetylgruppen aus NAA in Myelin integriert werden, ist experimentell gut belegt (Chakraborty u. a., 2001; Madhavarao u. a., 2005b), damit ist ein Zusammenhang der Demyelinisierung mit dem Energiestoffwechsel denkbar.

Der genaue Zusammenhang von ASPA und mitochondrialer Funktion ist bislang unklar. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Akkumulation von NAA im Extrazellulärraum und konsekutiv im Zytosol über eine Verminderung des Gradienten den Transport von Aspartat aus dem astrozytären Mitochondrium erschwert, was indirekt die Transaminierung von Glutamat hemmt. In der Folge kommt es zu einem Mangel an Substraten für den Zitratzyklus, die zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten für die Atmungskette zur Verfügung stehen. Der Mangel dieser Reduktionsäquivalente führt zu durch Substratmangel zu einer Verminderung der Aktivität des Komplex I und damit indirekt der ATP Produktion. Dazu passt die in dieser Arbeit nachgewiesene Abnahme

der Aktivität des Komplex I der Atmungskette sowie die verlängerten Mitochondrien die als Hinweis für Energiemangel verstanden werden können.

Für die hier formulierte Hypothese spricht die Beobachtung, dass ASPA KO Mäuse geringere Acetyl-CoA und ATP Konzentrationen aufweisen und Hinweise auf oxidativen Stress zeigen (Francis u. a., 2012a). In Adipozyten konnte gezeigt werden, dass Asp-NAT KO zu einer kompensatorischen Hochregulation der zytosolischen ATP Ziträt-Lyase führt, die es ermöglicht, dem Zitratzyklus Acetylgruppen in Form von Acetyl-CoA zu entziehen (Pessentheiner u. a., 2013). Dieser Weg kommt auch im ZNS als Alternative in Frage, um Acetylgruppen zu transportieren

Zu dieser These passen Beobachtungen aus murinen und humanen braunen Adipozyten. Außerhalb des ZNS findet sich vor allem in braunem Fettgewebe eine hohe Konzentration von NAA sowie ASPA und dem NAA synthetisierendem Enzym Asp-NAT. Asp-NAT *knock-out* (KO) in braunen Adipozyten führt zu einer Akkumulation von NAA, einer geringeren zytosolischen Acetyl-CoA Konzentration, einem beeinträchtigten Lipidstoffwechsel sowie einer geringeren Zahl von Mitochondrien. Asp-NAT Überexpression hat gegenteilige Effekte. Asp-NAT KO führt in braunen Adipozyten zu einer Induktion der ATP Citrat Lyase (Pessentheiner u. a., 2013).

Diese Beobachtungen legen eine Funktion des NAA Stoffwechsels für den Energiemetabolismus brauner Adipozyten nahe. Inwieweit dies auf das ZNS übertragbar ist, ist unklar.

Eine der wichtigsten pathologischen Befunde bei CD ist die Demyelinisierung. Auch hier ist ein genauer Mechanismus bislang nicht belegt. In Zusammenschau der Befunde kann als Ursache ein Mangel an energiereichen Substraten in Oligodendrozyten als wahrscheinlich angesehen werden. Dieser entsteht, da Aspartat

und Acetat aus NAA ohne funktionale ASPA nicht zur Verfügung gestellt werden können. Die Myelinisierung findet vor allem in der Säuglingsphase statt, in der das Glukoseangebot beschränkt ist. Daher ist dieser energieaufwändige Prozess in besonderem Maße von der Versorgung des ZNS mit Ketonkörpern abhängig (Moffett u. a., 2013b). Ketonkörper werden im ZNS deutlich effektiver verstoffwechselt als Glucose. Astrozyten sind im Gegensatz zu Neuronen und Oligodendrozyten in der Lage, auch Fettsäuren zu metabolisieren (Edmond u. a., 1987). Dies begründet die größere Bedeutung des Acetylgruppentransfers von Astrozyten zu Oligodendrozyten in der Phase der Myelinisierung.

Die auf den ersten Blick widersprüchlichen Beobachtungen, dass sowohl eine diätische Therapie mit Triglyceriden, als auch ein Asp-NAT KO zu einer Verbesserung der Myelinisierung führen, sind mit diesem Modell vereinbar. Ein erhöhtes Angebot von Acetyl-CoA durch die Therapie mit Triglyceriden führt zu einem verbesserten Substratangebot für den Zitratzyklus. Dadurch steht den Zellen ausreichend Energie zur Verfügung, und überschüssiges Aspartat kann durch Transaminierung zu Oxalacetat in den Stoffwechsel eingespeist werden. In den Oligodendrozyten stehen mehr Substrate für die Fettsäuresynthese zur Verfügung, da die triglyceridreiche Diät zu einer deutlich erhöhten Ketonkörper Produktion führt. Dadurch wird die Myelinisierung verbessert. Die Vakuolisierung tritt unter der Therapie weiterhin abgeschwächt auf (Francis u. a., 2014), ein Hinweis, dass diese Therapie nur einen Teil des Krankheitsursprunges behebt, da sie die NAA Akkumulation nicht beeinflusst. Auch bei KO der Asp-NAT und damit völligem Fehlen von NAA tritt keine Demyelinisierung auf (Guo u. a., 2015; Maier u. a., 2015). Das Fehlen von Vakuolen ist ohne NAA Akkumulation zu erwarten, überraschend ist die normale Myelinisierung. Ohne Aktivität der Asp-NAT stehen der Zelle mehr Acetylgruppen zur Verfügung, die genutzt werden können um Aspartat in den Zitratzyklus einzuschleusen. Es steht mehr Energie zur Verfügung, da es nicht zur Synthese von NAA kommt, das anschließend akkumuliert und damit Energie bindet. Die Beobachtung, dass Asp-NAT KO Mäuse gegenüber CD Mäusen keine verbesserte Lebenserwartung haben (Maier u. a., 2015) weist jedoch darauf hin, dass nicht alle Funktionen von NAA auf alternativen Wegen ersetzt werden können.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des Aspartatstoffwechsels im Mitochondrium für die Myelinisierung ist die Pathologie die durch einen Defekt des ACG1 Transporters

verursacht wird (Wibom u. a., 2009; Ramos u. a., 2011). Sowohl bei Patienten als auch im Tiermodell kommt es zur Abnahme der NAA Konzentration, Hypomyelinisierung und Reifungsdefiziten bei Oligodendrozyten. Die Begründung der Pathologie bei ACG1 Defizienz durch die Abnahme der NAA Konzentration muss durch die weitestgehend normale Myelinisierung des Patienten ohne messbares NAA (Martin u. a., 2001a) als nicht ausreichend angesehen werden. Vor allem die Tatsache, dass sich der Phänotyp der ACG1 Defizienz mit einer ketogenen Diät massiv verbessern lässt (Dahlin u. a., 2015), deutet analog zu CD auf einen Defekt des Energiestoffwechsels hin. Durch einen Substratmangel für den Zitratzyklus kommt es zu einem Mangel an NAA und Zitrat, sodass keine Kompensation über die ATP-Zitrat Lyase möglich ist. Ein erhöhtes Substratangebot durch ketogene Diät verbessert den Phänotyp ohne die NAA Konzentration wesentlich zu erhöhen (Dahlin u. a., 2015), vermutlich wird also vor allem der Weg über die ATP Zitrat Lyase stimuliert, da zur NAA Synthese im Mitochondrium Aspartat fehlt. Die Parallelen zwischen CD und ACG1 Defizienz sind ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von Mitochondrien für CD.

Eine der prominentesten Beobachtungen bei CD ist die ausgeprägte Vakuolisierung im ZNS. Diese ist in der Literatur sowohl in pathologischen Präparaten als auch im Tiermodell beschrieben. In dieser Arbeit konnten die Vakuolen in astrozytären Sphären reproduziert werden. Die wahrscheinlichste Erklärung ist ein osmotischer Effekt des akkumulierenden NAA sowohl extrazellulär als auch im Zytosol. Die Beobachtung, dass das Zytoplasma der Astrozyten von CD Patienten geschwollen ist (Adachi u. a., 1973a), unterstützt auch hier die Bedeutung der Astrozyten.

Das postulierte Modell erklärt alle im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde. Die in verlängerten Mitochondrien, die strukturellen Veränderungen der Cristae sowie die Defizienz des Komplex I der Atmungskette passen zu einem Mangel energiereicher Substrate für den Zitratzyklus. Die in dreidimensionalen Sphären nachgewiesenen Vakuolen sind durch die extrazelluläre Akkumulation von NAA erklärbar. Die Beobachtung, dass die Zugabe von NAA zur Zellkultur die Komplex I Aktivität von Kontrollastrozyten verringern kann ist durch eine indirekte Hemmung der Transaminierung von Glutamat durch die Akkumulation von Aspartat im Mitochondrium erklärbar (9). Bei CD Zellen ist dieser Effekt so ausgeprägt, dass er das Überleben der

Zellen beeinträchtigt, Kontrollzellen scheinen dies durch Abbau des NAA durch ASPA kompensieren zu können.

5 Zusammenfassung

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte iPSC basierte Krankheitsmodell für Morbus Canavan bietet erstmals die Möglichkeit, die pathophysiologischen Vorgänge der Erkrankung *in vitro* an humanen Zellen zu untersuchen.

In der zweidimensionalen Zellkultur von CD-Astrozyten ist es gelungen, die strukturellen Veränderungen der Mitochondrien zu reproduzieren und in ersten Experimenten einen funktionellen Defekt des Komplex I der Atmungskette nachzuweisen. In einem dreidimensionalen Modell mit astrozytären Sphäroiden lässt sich auch die Vakuolisierung darstellen, das makroskopisch eindrucklichste Kennzeichen der Pathologie von CD. Durch Überexpression von ASPA in den CD Zellen sind die mitochondrialen Veränderungen sowie die Vakuolisierung teilweise reversibel. Dies deckt sich mit Beobachtungen in Tiermodellen.

Von den bisherigen Arbeiten zu Morbus Canavan unterscheidet sich diese Arbeit vor allem durch den Einsatz humaner Zellen und den Fokus auf Astrozyten. Es ergaben sich Hinweise, dass die Beobachtungen in Mauszellen nicht reproduzierbar sind. Die Validität von Tiermodellen sollte daher zukünftig kritisch hinterfragt werden. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Astrozyten eine größere Rolle bei CD spielen als bisher angenommen. Die Bedeutung der einzelnen Zelltypen könnte in Kokultur- oder in Organoidexperimenten an humanen Zellen weiter differenziert werden. Analoge Untersuchungen an Mitochondrien von Neuronen und Oligodendrozyten könnten aufzeigen, inwieweit der Energiestoffwechsel der anderen ZNS Zelltypen betroffen ist. In gemeinsamen Kulturen von CD Astrozyten mit Kontroll-Oligodendrozyten bzw. Neuronen ließe sich die Bedeutung der Astrozyten für CD weiter untersuchen. Durch die Generierung von Organoiden, die alle Zelltypen des ZNS enthalten und die natürliche Komposition einzelner Gehirnregionen nachbilden, ließen sich die Pathologien weiter untersuchen und insbesondere das Zusammenspiel der unterschiedlichen Zelltypen genauer betrachten.

Eine sinnvolle Erweiterung können auch isogene Kontrolllinien darstellen, also genetisch „reparierte“ CD-Linien oder gesunde Zelllinien, in die künstlich eine Mutation ins ASPA

Gen eingebracht wird. Solche Linien haben den Vorteil, die natürliche genetische Variabilität ausblenden und fokussiert die Auswirkungen einer spezifischen Mutation untersuchen zu können. Die Auswirkungen des unterschiedlichen Spenderalters der CD- und Kontroll-Fibroblasten sind nicht bekannt. Diesbezüglich könnten altersangepasste oder isogene Kontrollen aufschlussreich sein.

Die Pathophysiologie von Morbus Canavan kann letztendlich nur umfassend aufgeklärt werden, wenn die Funktion von NAA im ZNS und die Stoffwechselzusammenhänge besser verstanden werden. Das CD-iPSC Modell kann hierzu ein Werkzeug liefern. Dabei sollte vor allem die Rolle der Astrozyten zukünftig mehr Aufmerksamkeit zukommen. Ein verbessertes Verständnis der Grundlagen der Erkrankung könnte zukünftig neue Therapiekonzepte ermöglichen. Erste Tests sowie Wirkstoffscreenings können in einem Zellkulturmodell in großem Maßstab erfolgen. Damit bietet sich eine Alternative zu Tiermodellen, die vor allem den Vorteil bietet, humane Zellen zu verwenden.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vakuolisierung im Kleinhirn eines CD Patienten	11
Abb. 2: Mitochondrien von CD Patienten sind strukturell verändert.	12
Abb. 3: NAA Stoffwechsel (Moffett u. a., 2013)	15
Abb. 4: MRS eines gesunden Probanden. Der höchste Peak ist der von NAA.	17
Abb. 5: Auf- und Abbau von NAA	17
Abb. 6: Übersicht über die Entwicklung der Zelltypen im ZNS	27
Abb. 7 Plasmid zur Überexpression von ASPA	54
Abb. 8: Softwarebasierte Auswertung der lichtmikroskopischen Aufnahmen	61
Abb. 9 Schema der Methode zur Ermittlung von Form Faktor und Aspect Ratio	61
Abb. 10 Schema zur manuellen Vermessung vom Mitochondrien	62
Abb. 11 iPSC Kolonie im Feeder-freien E8 System auf Matrigel	63
Abb. 12 Immunfluoreszenz humaner Pluripotenz-Marker	64
Abb. 13 Inaktivierung des Sendai-Vektors	65
Abb. 14 Bestätigung der Pluripotenz	66
Abb. 15 Bestätigung der zytogenetischen Integrität	67
Abb. 16 Schematische Darstellung der Differenzierung von RGL-NPC aus iPSC	68
Abb. 17: Phasenkontrastaufnahme der RGL-NPC	68
Abb. 18 Färbung Stammzelltypischer Marker	69
Abb. 19 PCR auf für neurale Stammzellen typische Gene	70
Abb. 20 Expression astrozytärer Marker	70
Abb. 21 Expression neuronaler Marker	71
Abb. 22: Schematische Darstellung der Differenzierung von RGL-NPC zu Oligodendrozyten	71
Abb. 23 Expression oligodendroglialer Marker	72
Abb. 24 Astrozyten der CD Linie FAC19 exprimieren nach drei Wochen Kultur in seumhaltigem Medium ASPA in vitro	73
Abb. 25 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung astrozytärer Mitochondrien	74
Abb. 26 Vergleich der Mitochondrien von CD- und WT-Astrozyten im Fluoreszenzmikroskop	75
Abb. 27 Formparameter von Mitochondrien im Fluoreszenzmikroskop	76
Abb. 28 TEM Aufnahmen der Mitochondrien von CD- (A) und Kontrollastrozyten (B)	77

Abb. 29 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien drei Wochen in serumhaltigem Medium differenzierter Astrozyten	78
Abb. 30: Vergleich der Mitochondrien von CD- und WT-Astrozyten im TEM	80
Abb. 31: Beeinflussung des morphologischen Phänotyps durch ASPA Überexpression	81
Abb. 32: ASPA Überexpression vermindert den CD Effekt	82
Abb. 33: Aktivität des Komplex I der Atmungskette	83
Abb. 34: Zugabe von NAA zum Kulturmedium vermindert die Zelldichte	85
Abb. 35: Unter Einfluss von LIF und BMP4 differenzieren RGL-NPC	86
Abb. 36: Kontroll RGL-NPC abgeleitete Astrosphären exprimieren ASPA	86
Abb. 37: Vakuolisierung in astrozytären Sphären	89
Abb. 38: Zugabe von NAA zum Kulturmedium verstärkt die Vakuolisierung	90
Abb. 39: Astrozyten aus murinen NPC	91
Abb. 40: Mitochondrien ASPA überexprimierender Astrozyten im TEM	92
Abb. 41: Auswertung im TEM vermessenen Mitochondrien	92
Abb. 42: Aktivität von Komplex 1 der Atmungskette in murinen Astrozyten	93
Abb. 43: Hypothetischer Pathomechanismus von CD.	104

7 Literaturverzeichnis

Adachi, M; Schneck, L; Cara, J; Volk, BW: Spongy degeneration of the central nervous system (van Bogaert and Bertrand type; Canavan's disease): a review. In: Human pathology Bd. 4 (1973a), Nr. 3, S. 331–347

Adachi, M; Torii, J; Schneck, L; Volk, BW: Electron microscopic and enzyme histochemical studies of the cerebellum in spongy degeneration. In: Acta neuropathologica Bd. 20 (1972), Nr. 1, S. 22–31

Adachi, M; Torii, J; Volk, BW; Briet, P; Wolintz, A: Electron microscopic and enzyme histochemical studies of cerebellum, ocular and skeletal muscles in chronic progressive ophthalmoplegia with cerebellar ataxia. In: Acta Neuropathologica (1973b)

Adachi, M; Wallace, BJ; Schneck, L; Volk, BW: Fine structure of spongy degeneration of the central nervous system (van Bogaert and Bertrand type). In: Journal of neuropathology and experimental neurology Bd. 25 (1966), Nr. 4, S. 598–616

Ahmed, Seemin; Gao, Guangping: Examination of the Blood Brain Barrier integrity in a mouse model of the neurodegenerative Canavan's disease. In: J Neurol Disord Bd. 2 (2014), Nr. 6

Akimitsu, T; Kurisu, K; Hanaya, R; Iida, K; Kiura, Y; Arita, K; Matsubayashi, H; Ishihara, K; u. a.: Epileptic seizures induced by N-acetyl-L-aspartate in rats: in vivo and in vitro studies. In: Brain Research Bd. 861 (2000), Nr. 1, S. 143–150

Alsanie, Walaa F; Niclis, Jonathan C; Petratos, Steven: Human embryonic stem cell-derived oligodendrocytes: protocols and perspectives. In: Stem cells and development Bd. 22 (2013), Nr. 18, S. 2459–2476

Amaral, Ana; Hadera, Mussie; Kotter, Mark; Sonnewald, Ursula: Oligodendrocytes Do Not Export NAA-Derived Aspartate In Vitro. In: Neurochem Res (2016)

Amit, Michal; Carpenter, Melissa K; Inokuma, Margaret S; Chiu, Choy-Pik; Harris, Charles P; Waknitz, Michelle A; Joseph, Itskovitz-Eldor; Thomson, James A: Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture Bd. 227 (2000), Nr. 2, S. 271–278

Appu, Abhilash P; Moffett, John R; Arun, Peethambaran; Moran, Sean; Nambiar, Vikram; Krishnan, Jishnu K S KS; Puthillathu, Narayanan; Namboodiri, Aryan M A MA: Increasing N-acetylaspartate in the Brain during Postnatal Myelination Does Not Cause the CNS Pathologies of Canavan Disease. In: Front Mol Neurosci Bd. 10 (2017), S. 161

Ariyannur, Prasanth S; Moffett, John R; Manickam, Pachiappan; Pattabiraman, Nagarajan; Arun, Peethambaran; Nitta, Atsumi; Nabeshima, Toshitaka; Madhavarao, Chikkathur N; u. a.: Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. In: Brain research Bd. 1335 (2010b), S. 1–13

Arun, Peethambaran; Madhavarao, Chikkathur N; Moffett, John R; Hamilton, Kristen; Grunberg, Neil E; Ariyannur, Prasanth S; Gahl, William A; Anikster, Yair; u. a.: Metabolic acetate therapy improves phenotype in the tremor rat model of Canavan disease. In: *J. Inherit. Metab. Dis.* Bd. 33 (2010), Nr. 3, S. 195–210

Aydin, Kubilay; Uysal, Seda; Yakut, Azize; Emiroglu, Birgul; Yilmaz, Fatma: N-acetylaspartate concentration in corpus callosum is positively correlated with intelligence in adolescents. In: *Neuroimage.* Bd. 59 (2012), Nr. 2, S. 1058–1064

Bain, Gerard; Kitchens, Daniel; Yao, Min; Huettner, James E.; Gottlieb, David I.: Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro. In: *Developmental Biology* Bd. 168 (1995), Nr. 2, S. 342–357

Baloyannis, Stavros: *Alterations of Mitochondria and Golgi Apparatus Are Related to Synaptic Pathology in Alzheimer's Disease*, 2013

Barker, Peter B.; Bonekamp, David; Riedy, Gerard; Smith, Mari: Quantitation of NAA in the Brain by Magnetic Resonance Spectroscopy. In: Moffett, J. R.; Tieman, S. B.; Weinberger, D. R.; Coyle, J. T.; Namboodiri, A. M. A. (Hrsg.): *N-Acetylaspartate: A Unique Neuronal Molecule in the Central Nervous System*. Boston, MA : Springer US, 2006, S. 183–197

Barker, RA; J, Drouin-Ouellet; Neurology, Parmar - M: Cell-based therapies for Parkinson disease—past insights and future potential. In: *Nature Reviews Neurology* (2015)

Bartkowska, K; Paquin, A; Gauthier, AS; Kaplan - DR: Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development. In: *Development* 134(24): 4369-80 (2007)

Baslow, MH; Hrabe, Guilfoyle DN: Dynamic relationship between neurostimulation and N-acetylaspartate metabolism in the human visual cortex. In: *Journal of molecular neuroscience* (2007)

Baslow, Morris H: Evidence supporting a role for N-acetyl-L-aspartate as a molecular water pump in myelinated neurons in the central nervous system. An analytical review. In: *Evidence supporting a role for N-acetyl-L-aspartate as a molecular water pump in myelinated neurons in the central nervous system. An analytical review.* Bd. 40 (2002), Nr. 4, S. 295–300

Baslow, Morris H: Brain N-acetylaspartate as a molecular water pump and its role in the etiology of Canavan disease: a mechanistic explanation. In: *Journal of molecular neuroscience: MN* Bd. 21 (2003b), Nr. 3, S. 185–190

Baslow, Morris H: Evidence that the tri-cellular metabolism of N-acetylaspartate functions as the brain's „operating system“: how NAA metabolism supports meaningful intercellular frequency-encoded communications. In: *Amino acids* Bd. 39 (2010), Nr. 5, S. 1139–1145

- Baslow, Morris H; Guilfoyle, David N: Are astrocytes the missing link between lack of brain aspartoacylase activity and the spongiform leukodystrophy in Canavan disease? In: *Neurochem. Res. Bd.* 34 (2009), Nr. 9, S. 1523–34
- Bélanger, M; Allaman, I; metabolism, Magistretti - PJ: Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. In: *Cell metabolism* (2011)
- Berkich, DA; Ola, MS; Cole, J: Mitochondrial transport proteins of the brain. In: *Journal of Neurosci. Res.* 2007 Nov 15;85(15):3367-77
- Bhakoo, KK; Craig, TJ; Styles, P: Developmental and regional distribution of aspartoacylase in rat brain tissue. In: *Journal of neurochemistry Bd.* 79 (2001), Nr. 1, S. 211–220
- Bhakoo, KK; Pearce, D: In vitro expression of N-acetyl aspartate by oligodendrocytes: implications for proton magnetic resonance spectroscopy signal in vivo. In: *Journal of neurochemistry Bd.* 74 (2000), Nr. 1, S. 254–262
- Bock, Christoph; Kiskinis, Evangelos; Verstappen, Griet; Gu, Hongcang; Boulting, Gabriella; Smith, Zachary D; Ziller, Michael; Croft, Gist F; u. a.: Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. In: *Cell*, Bd. 144 (2011), Nr. 3, S. 439–452
- van Bogaert, L; Bertrand, I: Sur une idiotie familiale avec dégénérescence spongieuse du névraxe Bd. 49 (1949)
- Bogner-Strauss, Juliane G: N-Acetylaspartate Metabolism Outside the Brain: Lipogenesis, Histone Acetylation, and Cancer. In: *N-Acetylaspartate Metabolism Outside the Brain: Lipogenesis, Histone Acetylation, and Cancer.* Bd. 8 (2017), S. 240
- Bonaguidi, MA; T, McGuire; Hu, M; Kan, L: LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. In: *Development* (2005)
- Brüstle, O; Jones, KN; Learish, RD; Karram, K; Choudhary, K; Wiestler, OD; Duncan, ID; McKay, RD: Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. In: *Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants.* Bd. 285 (1999), Nr. 5428, S. 754–756
- Burrows CK, Banovich NE, Pavlovic BJ, Patterson K, Gallego Romero I, Pritchard JK, Gilad Y. Genetic Variation, Not Cell Type of Origin, Underlies the Majority of Identifiable Regulatory Differences in iPSCs. Gaffney DJ, editor. *PLoS Genet.* 2016; 12: e1005793
- Cahan P, Daley GQ. Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14: 357–368
- Canavan, Myrtelle: Schilder's Encephalitis Periaxialis Diffusa: Report of a case in a child aged sixteen and one-half months. In: *Archives of Neurology & Psychiatry Bd.* 25 (1931), Nr. 2, S. 299–308

- Carcamo-Orive I, Hoffman GE, Cundiff P, Beckmann ND, D'Souza SL, Knowles JW, Patel A, Papatsenko D, Abbasi F, Reaven GM, Whalen S, Lee P, Shahbazi M, Henrion MYR, Zhu K, Wang S, Roussos P, Schadt EE, Pandey G, Chang R, Quertermous T, Lemischka I. Analysis of Transcriptional Variability in a Large Human iPSC Library Reveals Genetic and Non-genetic Determinants of Heterogeneity. *Cell Stem Cell*. 2017; 20: 518-532.e9
- Chakraborty, G; Mekala, P; Yahya, D; Wu, G; Ledeen, RW: Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for myelin-associated aspartoacylase. In: *Journal of neurochemistry* Bd. 78 (2001), Nr. 4, S. 736–745
- Chambers, Stuart M; Fasano, Christopher A; Papapetrou, Eirini P; Tomishima, Mark; Sadelain, Michel; Studer, Lorenz: Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling. In: *Nat. Biotechnology*. Bd. 27 (2009), Nr. 3, S. 275–280
- Chen, Hsiuchen; Chan, David C: Mitochondrial dynamics–fusion, fission, movement, and mitophagy- in neurodegenerative diseases. In: *Human molecular Genetics*, Bd. 18 (2009), Nr. R2, S. R169–R176
- Clark, Joseph F; Doepke, Amos; Filosa, Jessica A; Wardle, Robert L; Lu, Aigang; Meeker, Timothy J; J, Pyne-Geithman, Gail: N-acetylaspartate as a reservoir for glutamate. In: *Med. Hypotheses* Bd. 67 (2006), Nr. 3, S. 506–12
- Clarner, Tim; Wieczorek, Nicola; Krauspe, Barbara; Jansen, Katharina; Beyer, Cordian; Kipp, Markus: Astroglial redistribution of aquaporin 4 during spongy degeneration in a Canavan disease mouse model. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* Bd. 53 (2014), Nr. 1, S. 22–30
- Clevers, H: Modeling development and disease with organoids. In: *Cell* (2016)
- Conti, L; Pollard, SM; Gorba, T; Reitano, E; Toselli, M: Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. In: *PLoS Biol.* (2005)
- Conti, Luciano; Cattaneo, Elena: Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? In: *Nature reviews. Neuroscience* Bd. 11 (2010), Nr. 3, S. 176–187
- Costa, Veronica; Scorrano, Luca: Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. In: *Embo J* Bd. 31 (2012), Nr. 8, S. 1853–1864
- D'Adamo, AF; Yatsu, FM: Acetate metabolism in the nervous system. N-acetyl-L-aspartic acid and the biosynthesis of brain lipids. In: *Journal of neurochemistry* Bd. 13 (1966), Nr. 10, S. 961–965
- D'Adamo, Amedeo F.; Wertman, Elon; Foster, Faye; Schneider, Howard: A radiochemical assay for N-acetyl-L-aspartate amidohydrolase (EC 3.5.1.15) and its occurrence in the tissues of the chicken. In: *Life Sciences* Bd. 23 (1978), Nr. 8, S. 791–795

Dahlin, M; Martin, DA; Hedlund, Z; Jonsson, M: The ketogenic diet compensates for AGC1 deficiency and improves myelination. In: *Epilepsia*. 2015 Nov;56(11):e176-81

Davies, JE; Pröschel, C; Zhang, N; Noble - M: Transplanted astrocytes derived from BMP- or CNTF-treated glial-restricted precursors have opposite effects on recovery and allodynia after spinal cord injury. In: *Journal of Biology* (2008)

Doerr, Jonas; Böckenhoff, Annika; Ewald, Benjamin; Ladewig, Julia; Eckhardt, Matthias; Gieselmann, Volkmar; Matzner, Ulrich; Brüstle, Oliver; u. a.: Arylsulfatase A Overexpressing Human iPSC-derived Neural Cells Reduce CNS Sulfatide Storage in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. In: *Mol. Ther. Bd. 23* (2015), Nr. 9, S. 1519–1531

Doerr, Jonas; Schwarz, Martin Karl; Wiedermann, Dirk; Leinhaas, Anke; Jakobs, Alina; Schloen, Florian; Schwarz, Inna; Diedenhofen, Michael; u. a.: Whole-brain 3D mapping of human neural transplant innervation. In: *Nature Communications Bd. 8* (2017), S. 14162

Edmond, J; Robbins, RA; Bergstrom, JD; Cole, RA; de Vellis, J: Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. In: *Journal of neuroscience research Bd. 18* (1987), Nr. 4, S. 551–561

Elesa, SH; Lucas, RE: The mousetrap: what we can learn when the mouse model does not mimic the human disease. In: *The mousetrap: what we can learn when the mouse model does not mimic the human disease* (2002)

Evans, MJ; Kaufman, MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In: *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.

Federation, Alexander J; Bradner, James E; Meissner, Alexander: The use of small molecules in somatic-cell reprogramming. In: *Trends Cell Biol. Bd. 24* (2014), Nr. 3, S. 179–187

Fraichard, A.; Chassande, O.; Bilbaut, G.; Dehay, C.; Savatier, P.; Samarut, J.: In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. In: *Journal of Cell Science Bd. 108* (1995), Nr. 10, S. 3181

Francis, Jeremy S; Markov, Vladimir; Leone, Paola: Dietary triheptanoin rescues oligodendrocyte loss, dysmyelination and motor function in the *nur7* mouse model of Canavan disease. In: *Journal of inherited metabolic disease Bd. 37* (2014), Nr. 3, S. 369–381

Francis, Jeremy S; Olariu, Ana; W, McPhee, Scott; Leone, Paola: Novel role for aspartoacylase in regulation of BDNF and timing of postnatal oligodendrogenesis. In: *Journal of neuroscience research Bd. 84* (2006a), Nr. 1, S. 151–169

Francis, Jeremy S; Olariu, Ana; W, McPhee, Scott; Leone, Paola: Novel role for aspartoacylase in regulation of BDNF and timing of postnatal oligodendrogenesis. In: *J. Neurosci. Res. Bd. 84* (2006b), Nr. 1, S. 151–69

Francis, Jeremy S; Strande, Louise; Markov, Vladamir; Leone, Paola: Aspartoacylase supports oxidative energy metabolism during myelination. In: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* Bd. 32 (2012a), Nr. 9, S. 1725–36

Francis, Jeremy S; Strande, Louise; Markov, Vladamir; Leone, Paola: Aspartoacylase supports oxidative energy metabolism during myelination. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* Bd. 32 (2012b), Nr. 9, S. 1725–1736

Francis, Jeremy S; Strande, Louise; Pu, Amy; Leone, Paola: Endogenous aspartoacylase expression is responsive to glutamatergic activity in vitro and in vivo. In: *Glia* Bd. 59 (2011a), Nr. 10, S. 1435–46

Francis, Jeremy S; Wojtas, Ireneusz; Markov, Vladimir; Gray, Steven J; J, McCown, Thomas; Samulski, RJ; Bilaniuk, Larissa T; Wang, Dah-Jyuu J; u. a.: N-acetylaspartate supports the energetic demands of developmental myelination via oligodendroglial aspartoacylase. In: *Neurobiol. Dis.* Bd. 96 (2016), S. 323–334

Gambetti, P; Mellman, WJ; Gonatas, NK: Familial spongy degeneration of the central nervous system (van Bogaert-Bertrand disease) (1969)

George, Ronald L; Huang, Wei; Naggar, Hany A; Smith, Sylvia B; Ganapathy, Vadivel: Transport of N-acetylaspartate via murine sodium/dicarboxylate cotransporter NaDC3 and expression of this transporter and aspartoacylase II in ocular tissues in mouse. In: *Biochimica et biophysica acta* Bd. 1690 (2004), Nr. 1, S. 63–69

Gessler, Dominic J; Li, Danning; Xu, Hongxia; Su, Qin; Sanmiguel, Julio; Tuncer, Serafettin; Moore, Constance; King, Jean; u. a.: Redirecting N-acetylaspartate metabolism in the central nervous system normalizes myelination and rescues Canavan disease. In: *JCI Insight* Bd. 2 (2017), Nr. 3, S. e90807

Glodzik, Lidia; Wu, William E; Babb, James S; Achtnichts, Lutz; Amann, Michael; Sollberger, Marc; Monsch, Andreas U; Gass, Achim; u. a.: The whole-brain N-acetylaspartate correlates with education in normal adults. In: *Psychiatry Res.* Bd. 204 (2012), Nr. 1, S. 49–54

Goldman, Steve: Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. In: *Nat. Biotechnology* Bd. 23 (2005), Nr. 7, S. 862–871

Goldman, Steven A; Windrem, Martha S: Cell replacement therapy in neurological disease. In: *Bio. Sci.* Bd. 361 (2006), Nr. 1473, S. 1463–1475

Gomes, Ligia C.; Benedetto, Giulietta Di; Scorrano, Luca: During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. In: *Nature Cell Biology* Bd. 13 (2011), Nr. 5

Gordon, Grant R; Choi, Hyun B; Rungta, Ravi L; C, Ellis-Davies, Graham; A, MacVicar, Brian: Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. In: *Nature* Bd. 456 (2008), Nr. 7223, S. 745–9

Gorris, Raphaela; Fischer, Julia; Erwes, Kim L; Kesavan, Jaideep; Peterson, Daniel A; Alexander, Michael; Nöthen, Markus M; Peitz, Michael; u. a.: Pluripotent stem cell-derived radial glia-like cells as stable intermediate for efficient generation of human oligodendrocytes. In: *Glia*. 2015 Dec;63(12):2152-67

Guo, Fuzheng; Bannerman, Peter; Mills Ko, Emily; Miers, Laird; Xu, Jie; Burns, Travis; Li, Shuo; Freeman, Ernest; u. a.: Ablating N-acetylaspartate prevents leukodystrophy in a Canavan disease model. In: *Annals of neurology* Bd. 77 (2015), Nr. 5, S. 884–888

Guokai Chen; Daniel R Gulbranson; Zhonggang Hou; Jennifer M Bolin; Victor Ruotti; Mitchell D Probasco; Kimberly Smuga-Otto; Sara E Howden; u. a.: Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. In: *Nat. Methods* Bd. 8 (2011), Nr. 5, S. 424–429

Hagenfeldt, L; Bollgren, I; Venizelos, N: N-Acetylaspartic aciduria due to aspartoacylase deficiency—a new aetiology of childhood leukodystrophy . In: *J Inherit Metab Dis*. 1987;10(2):135-41.

Hamilton, Nicola B; Attwell, David: Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? In: *Nat. Rev. Neurosci.* Bd. 11 (2010), Nr. 4, S. 227–38

Han, Xiaoning; Chen, Michael; Wang, Fushun; Windrem, Martha; Wang, Su; Shanz, Steven; Xu, Qiwu; Oberheim, Nancy A; u. a.: Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. In: *Cell Stem Cell* Bd. 12 (2013), Nr. 3, S. 342–53

Hoshino, Hideki; Kubota, Masaya: Canavan disease: clinical features and recent advances in research. In: *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* Bd. 56 (2014a), Nr. 4, S. 477–483

Hou, Pingping; Li, Yanqin; Zhang, Xu; Liu, Chun; Guan, Jingyang; Li, Honggang; Zhao, Ting; Ye, Junqing; u. a.: Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. In: *Science*. Bd. 341 (2013), Nr. 6146, S. 651–654

Hu, Jian-Guo G; Lü, He-Zuo Z; Wang, Yan-Xia X; Bao, Ming-Sheng S; Zhao, Bao-Ming M; Zhou, Jian-Sheng S: BMP signaling mediates astrocyte differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. In: *J. Exp. Med.* Bd. 222 (2010), Nr. 3, S. 195–200

Huang, W; Wang, H; Kekuda, R; Fei, YJ; Friedrich, A; Wang, J; Conway, SJ; Cameron, RS; u. a.: Transport of N-acetylaspartate by the Na(+)-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* Bd. 295 (2000a), Nr. 1, S. 392–403

Huang, W; Wang, H; Kekuda, R; Fei, YJ; Friedrich, A; Wang, J; Conway, SJ; Cameron, RS; u. a.: Transport of N-acetylaspartate by the Na(+)-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Bd. 295 (2000b), Nr. 1, S. 392–403

Ichida, Justin K; T C W, Julia; Williams, Luis A; Carter, Ava C; Shi, Yingxiao; Moura, Marcelo T; Ziller, Michael; Singh, Sean; u. a.: Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. In: *Nat. Chem. Biol.* (2014)

Jakel, RJ; Schneider, BL; Svendsen, CN: Using human neural stem cells to model neurological disease. In: *Nature Reviews Genetics* (2004)

Janson, Christopher G; Assadi, Mitra; Francis, Jeremy; Bilaniuk, Larissa; Shera, David; Leone, Paola: Lithium citrate for Canavan disease. In: *Pediatric neurology Bd.* 33 (2005), Nr. 4, S. 235–243

Janson, Christopher; Scott, McPhee; Bilaniuk, Larissa; Haselgrove, John; Testaiuti, Mark; Freese, Andrew; Wang, Dah-Jyuu J; Shera, David; u. a.: Clinical protocol. Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain. In: *Human gene therapy Bd.* 13 (2002), Nr. 11, S. 1391–1412

Jones-Villeneuve, E M; McBurney, M W; Rogers, K A; Kalnins, V I: Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. In: *The Journal of Cell Biology Bd.* 94 (1982), Nr. 2, S. 253

Kaul, R; Gao, GP; Balamurugan, K; Matalon, R: Cloning of the human aspartoacylase cDNA and a common missense mutation in Canavan disease. In: *Nature genetics Bd.* 5 (1993), Nr. 2, S. 118–123

Kirmani, Batool F; Jacobowitz, David M; Namboodiri, M A A: Developmental increase of aspartoacylase in oligodendrocytes parallels CNS myelination. In: *Brain research. Developmental brain research Bd.* 140 (2003), Nr. 1, S. 105–115

Kitada, K; Akimitsu, T; Shigematsu..., Y: Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous System. In: *Brain Research* (2000)

Klugmann, Matthias; Leichtlein, Claudia B; Symes, CW; Serikawa, Tadao; Young, Deborah; During, Matthew J: Restoration of aspartoacylase activity in CNS neurons does not ameliorate motor deficits and demyelination in a model of Canavan disease. In: *Mol. Ther. Bd.* 11 (2005), Nr. 5, S. 745–53

Klugmann, Matthias; Symes, CW; Klaussner, Bettina K; Leichtlein, Claudia B; Serikawa, Tadao; Young, Deborah; During, Matthew J: Identification and distribution of aspartoacylase in the postnatal rat brain. In: *Neuroreport Bd.* 14 (2003), Nr. 14, S. 1837–1840

Knuesel, Irene; Chicha, Laurie; Britschgi, Markus; Schobel, Scott A; Bodmer, Michael; Hellings, Jessica A; Toovey, Stephen; Prinssen, Eric P: Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders Bd. 10 (2014), Nr. 11, S. 643–660

Koch, Philipp; Opitz, Thoralf; Steinbeck, Julius A; Ladewig, Julia; Brüstle, Oliver: A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro

instruction and synaptic integration. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Bd. 106 (2009), Nr. 9, S. 3225–3230

Koopman, Werner J; Distelmaier, Felix; Esseling, John J; Smeitink, Jan A; Willems, Peter H: Computer-assisted live cell analysis of mitochondrial membrane potential, morphology and calcium handling. In: Methods Bd. 46 (2008), Nr. 4, S. 304–11

Koopman, Werner J; Visch, Henk-Jan J; Verkaart, Sjoerd; van den Heuvel, Lambertus W; Smeitink, Jan A; Willems, Peter H: Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. In: Am. J. Physiol., Cell Physiol. Bd. 289 (2005), Nr. 4, S. C881-90

Koopman, WJH: Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂ - mediated mitochondrial outgrowth. In: *Ajp Cell Physiology* Bd. 288 (2005), Nr. 6

Kudin AP, Bimpong-Buta NY-B, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of Superoxide-producing Sites in Isolated Brain Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 4127–4135

Kumar, Shalini; Biancotti, Juan C; Matalon, Reuben; de Vellis, Jean: Lack of aspartoacylase activity disrupts survival and differentiation of neural progenitors and oligodendrocytes in a mouse model of Canavan disease. In: *Journal of neuroscience research* Bd. 87 (2009), Nr. 15, S. 3415–3427

Kunz, WS; Kudin, AP; Vielhaber, S; Blümcke I: Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. In: *Annals of Neurology* (2000)

Lancaster, Madeline A; Knoblich, Juergen A: Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies Bd. 345 (2014), Nr. 6194, S. 1247125

Leone, P.; Janson, C. G.; Bilaniuk, L.; Wang, Z.; Sorgi, F.; Huang, L.; Matalon, R.; Kaul, R.; u. a.: Aspartoacylase gene transfer to the mammalian central nervous system with therapeutic implications for Canavan disease. In: *Annals of Neurology* Bd. 48 (2000), Nr. 1, S. 27–38

Leone, Paola; Shera, David; McPhee, Scott W; Francis, Jeremy S; Kolodny, Edwin H; Bilaniuk, Larissa T; Wang, Dah-Jyuu J; Assadi, Mitra; u. a.: Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. In: *Sci Transl Med.* Bd. 4 (2012), Nr. 165

Lieu PT, Fontes A, Vemuri MC, MacArthur CC. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells with CytoTune, a Non-Integrating Sendai Virus. In: Lakshmi U, Vemuri MC, editors. *Pluripotent Stem Cells: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 p. 45–56 Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0_5

Loaiza, Anitsi; Porras, Omar H; Barros, Luis F: Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. In: *J. Neurosci.* Bd. 23 (2003), Nr. 19, S. 7337–42

Louvi, Angeliki; Artavanis-Tsakonas, Spyros: Notch signalling in vertebrate neural development. In: Notch signalling in vertebrate neural development Bd. 7 (2006), Nr. 2, S. 93–103

Madhavarao, Chikkathur N; Arun, Peethambaran; Moffett, John R; Szucs, Sylvia; Surendran, Sankar; Matalon, Reuben; Garbern, James; Hristova, Diana; u. a.: Defective N-acetylaspartate catabolism reduces brain acetate levels and myelin lipid synthesis in Canavan's disease. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Bd. 102 (2005), Nr. 14, S. 5221–6

Madhavarao, Chikkathur N; Moffett, John R; Moore, Roger A; Viola, Ronald E; Namboodiri, M A A; Jacobowitz, David M: Immunohistochemical localization of aspartoacylase in the rat central nervous system. In: The Journal of comparative neurology Bd. 472 (2004), Nr. 3, S. 318–329

Madhavarao, Chikkathur N.; Namboodiri, Aryan M. A.: Naa Synthesis and Functional Roles. In: Moffett, J. R.; Tieman, S. B.; Weinberger, D. R.; Coyle, J. T.; Namboodiri, A. M. A. (Hrsg.): N-Acetylaspartate: A Unique Neuronal Molecule in the Central Nervous System. Boston, MA : Springer US, 2006 — ISBN 978-0-387-30172-3, S. 49–66

Madhavarao, CN; Chinopoulos, C; Chandrasekaran, K; Namboodiri, M A A: Characterization of the N-acetylaspartate biosynthetic enzyme from rat brain. In: Journal of neurochemistry Bd. 86 (2003), Nr. 4, S. 824–835

Maier, Helena; Lihua, Wang-Eckhardt; Hartmann, Dieter; Gieselmann, Volkmar; Eckhardt, Matthias: N-Acetylaspartate Synthase Deficiency Corrects the Myelin Phenotype in a Canavan Disease Mouse Model But Does Not Affect Survival Time. In: The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience Bd. 35 (2015), Nr. 43, S. 14501–14516

Martin, Ernst; Andrea Capone; Jacques Schneider; Juergen Hennig; Thorsten Thiel: Absence of N-acetylaspartate in the human brain: Impact on neurospectroscopy? In: Annals of Neurology Bd. 49 (2001a), Nr. 4

Martin, Ernst; Capone, Andrea; Schneider, Jacques; Hennig, Juergen; Thiel, Thorsten: Absence of N-acetylaspartate in the human brain: Impact on neurospectroscopy? In: Annals of Neurology Bd. 49 (2001b), Nr. 4

Martino, Gianvito; Franklin, Robin J; Baron Van Evercooren, Anne; Kerr, Douglas A; Stem Cells in Multiple Sclerosis (STEMS) Consensus Group: Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects. In: Nat. Rev. Neurol. , Bd. 6 (2010), Nr. 5, S. 247–255

Martins, Isaura; Jack, Rivers-Auty; Allan, Stuart; Lawrence, Catherine: Mitochondrial Abnormalities and Synaptic Loss Underlie Memory Deficits Seen in Mouse Models of Obesity and Alzheimer's Disease. In: J Alzheimer's Dis Bd. Preprint (2016), Nr. Preprint, S. 1–18

Matalon, R; Michals, K; Kaul, R: Canavan disease: from spongy degeneration to molecular analysis. In: The Journal of pediatrics Bd. 127 (1995), Nr. 4, S. 511–517

Matalon, R; Michals, K; Sebesta, D; Deanching, M; Gashkoff, P; Casanova, J: Aspartoacylase deficiency and N-acetylaspartic aciduria in patients with Canavan disease. In: American journal of medical genetics Bd. 29 (1988), Nr. 2, S. 463–471

Matalon, R; Rady, PL; Platt, KA; Skinner, HB; Quast, MJ; Campbell, GA; Matalon, K; Ceci, JD; u. a.: Knock-out mouse for Canavan disease: a model for gene transfer to the central nervous system. In: J Gene Med Bd. 2 (2000), Nr. 3, S. 165–75

Matalon, Reuben; Surendran, Sankar; Rady, Peter L; Quast, Michael J; Campbell, Gerald A; Matalon, Kimberlee M; Tying, Stephen K; Wei, Jingna; u. a.: Adeno-associated virus-mediated aspartoacylase gene transfer to the brain of knockout mouse for canavan disease. In: Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy Bd. 7 (2003), Nr. 5 Pt 1, S. 580–587

Mattan, Natalia S; Ghiani, Cristina A; Lloyd, Marcia; Matalon, Reuben; Bok, Dean; Casaccia, Patrizia; de Vellis, Jean: Aspartoacylase deficiency affects early postnatal development of oligodendrocytes and myelination. In: Neurobiology of disease Bd. 40 (2010), Nr. 2, S. 432–443

Mcarthur, Chad C; Fontes, Andrew; Kuningger, David; Bailey, Matthew; Taliana, Antje; Vemuri, Mohan C; Lieu, Pauline T: Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA Sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions. In: Stem Cells (2012)

McCracken, KW; Catá, EM; Crawford, CM; Sinagoga, KL: Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. In: Nature Bd. 516 (2014), Nr. 7531, S. 400–404

McKenna, Mary; Sonnewald, Ursula; Huang, Xueli; Stevenson, Joseph; Zielke, Ronald H: Exogenous Glutamate Concentration Regulates the Metabolic Fate of Glutamate in Astrocytes. In: J. Neurochem., Bd. 66 (1996), Nr. 1, S. 386–393

McKenna, Mary; Waagepetersen, Helle S; Schousboe, Arne; Sonnewald, Ursula: Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools. In: Biochem. Pharmacol. Bd. 71 (2006), Nr. 4, S. 399–407

McPhee, S. W. J.; Francis, J.; Janson, C. G.; Serikawa, T.; Hyland, K.; Ong, E. O.; Raghavan, S. S.; Freese, A.; u. a.: Effects of AAV-2-mediated aspartoacylase gene transfer in the tremor rat model of Canavan disease. In: Brain research. Molecular brain research Bd. 135 (2005), Nr. 1–2, S. 112–121

McPhee, S. W.; Janson, CG; Li, C; Samulski, RJ; Camp, AS; Francis, J; Shera, D; Lioutermann, L; u. a.: Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. In: The journal of gene medicine Bd. 8 (2006), Nr. 5, S. 577–588

Merrill, Steven T; Nelson, Gary R; Longo, Nicola; Bonkowsky, Joshua L: Cytotoxic edema and diffusion restriction as an early pathoradiologic marker in canavan disease: case report and review of the literature. In: Orphanet J Rare Dis Bd. 11 (2016), Nr. 1, S. 169

Mersmann, Nadine; Tkachev, Dmitri; Jelinek, Ruth; Röth, Philipp T; Möbius, Wiebke; Ruhwedel, Torben; Rühle, Sabine; Wolfgang, Weber-Fahr; u. a.: Aspartoacylase-lacZ knockin mice: an engineered model of Canavan disease. In: PLoS ONE Bd. 6 (2011), Nr. 5

Mertens, J; Marchetto, MC; Bardy - C: Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. In: Nat Rev Neurosci. 2016 Jul;17(7):424-37

Mizhorova, Marija: Generation and Validation of CD-Patient-Specific Radial Glia-like Neural Stem Cells and Analysis of their Oligodendrocyte Differentiation Capacity. Bonn, Universität Bonn, Masterarbeit, 2014

Mlody, Barbara; Lorenz, Carmen; Inak, Gizem; Prigione, Alessandro: Energy metabolism in neuronal/glia induction and in iPSC models of brain disorders. In: Seminars in cell & developmental biology Bd. 52 (2016), S. 102–109

Moffett, John R; Arun, Peethambaran; Ariyannur, Prasanth S; Garbern, James Y; Jacobowitz, David M; Namboodiri, Aryan M: Extensive aspartoacylase expression in the rat central nervous system. In: Glia Bd. 59 (2011), Nr. 10, S. 1414–1434

Moffett, John R; Arun, Peethambaran; Ariyannur, Prasanth S; Namboodiri, Aryan M: N-Acetylaspartate reductions in brain injury: impact on post-injury neuroenergetics, lipid synthesis, and protein acetylation. In: Frontiers in neuroenergetics Bd. 5 (2013), S. 11

Moffett, John R; Ross, Brian; Arun, Peethambaran; Madhavarao, Chikkathur N; Namboodiri, Aryan M: N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. In: N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. Bd. 81 (2007), Nr. 2, S. 89–131

Nadler, JV; Cooper, JR: N-acetyl-L-aspartic acid content of human neural tumours and bovine peripheral nervous tissues. In: J. Neurochem. Bd. 19 (1972), Nr. 2, S. 313–319

Nakashima, K; Yanagisawa, M; letters, Arakawa - H: Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2. In: FEBS letters (1999)

Nishimura, Ken; Sano, Masayuki; Ohtaka, Manami; Furuta, Birei; Umemura, Yoko; Nakajima, Yoshiro; Ikehara, Yuzuru; Kobayashi, Toshihiro; u. a.: Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. In: The Journal of biological chemistry Bd. 286 (2011), Nr. 6, S. 4760–71

Nistor, Gabriel I; Totoiu, Minodora O; Haque, Nadia; Carpenter, Melissa K; Keirstead, Hans S: Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. In: Glia Bd. 49 (2005), Nr. 3, S. 385–396

Nordengen, Kaja; Heuser, Christoph; Rinholm, Johanne E; Matalon, Reuben; Gundersen, Vidar: Localisation of N-acetylaspartate in oligodendrocytes/myelin. In: Brain structure & function (2013)

Oberheim, Nancy; Takano, Takahiro; Han, Xiaoning; He, Wei; Lin, Jane HC; Wang, Fushun; Xu, Qiwu; Wyatt, Jeffrey D; u. a.: Uniquely hominid features of adult human astrocytes. In: *The Journal of Neuroscience* Bd. 29 (2009), Nr. 10, S. 3276–3287

Okabe, S; Forsberg-Nilsson, K; Spiro, AC; Segal, M; McKay, RD: Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. In: *Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro*. Bd. 59 (1996), Nr. 1, S. 89–102

Paşca, Anca M; Sloan, Steven A; Clarke, Laura E; Tian, Yuan; Makinson, Christopher D; Huber, Nina; Kim, Chul Hoon; Park, Jin-Young; u. a.: Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. In: *Nature Methods* Bd. 12 (2015), S. 671

Patel, TB; Clark, JB: Synthesis of N-acetyl-L-aspartate by rat brain mitochondria and its involvement in mitochondrial/cytosolic carbon transport. In: *Biochem. J.* Bd. 184 (1979), Nr. 3, S. 539–546

Pellerin, L; Magistretti, PJ: Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1994)

Pessentheiner, Ariane R; Pelzmann, Helmut J; Walenta, Evelyn; Schweiger, Martina; Groschner, Lukas N; Graier, Wolfgang F; Kolb, Dagmar; Uno, Kyosuke; u. a.: NAT8L (N-acetyltransferase 8-like) accelerates lipid turnover and increases energy expenditure in brown adipocytes. In: *J. Biol. Chem.* Bd. 288 (2013), Nr. 50, S. 36040–51

Poskanzer, Kira E; Yuste, Rafael: Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2016), S. 201520759

Pouwels, Petra JW; Frahm, Jens: Differential distribution of NAA and NAAG in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. In: *NMR in Biomedicine* Bd. 10 (1997b), Nr. 2, S. 73–78

Ramos, Milagros; Pardo, Beatriz; Irene, Llorente-Folch; Saheki, Takeyori; Del Arco, Araceli; Satrústegui, Jorgina: Deficiency of the mitochondrial transporter of aspartate/glutamate aralar/AGC1 causes hypomyelination and neuronal defects unrelated to myelin deficits in mouse brain. In: *Journal of neuroscience research* Bd. 89 (2011), Nr. 12, S. 2008–2017

Rashid, ST; Lomas, David A: Stem cell-based therapy for α_1 -antitrypsin deficiency. In: *Stem Cell Res. Ther.* Bd. 3 (2012), Nr. 1, S. 4

Reemst, Kitty; Noctor, Stephen C; Lucassen, Paul J; Hol, Elly M: The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development Bd. 10 (2016)

Reisenhofer, Miriam Helen: Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Model of Canavan's Disease. Bonn, Universität Bonn, Dissertation, 2012

Reuben Matalon; Kimberlee Michals-Matalon: Spongy Degeneration of the Brain, Canavan Disease: Biochemical and Molecular Findings. In: Spongy Degeneration of the Brain, Canavan Disease: Biochemical and Molecular Findings Bd. 18 (1998), Nr. 6, S. 471–481

Reynolds, BA; Tetzlaff, W; Weiss, S: A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. In: J. Neurosci. Bd. 12 (1992), Nr. 11, S. 4565–4574

Reynolds, BA; Weiss, S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. In: Science Bd. 255 (1992), Nr. 5052, S. 1707–1710

Rohwedel, J.; Guan, K.; Wobus, A.M.: Induction of Cellular Differentiation by Retinoic Acid in vitro. In: Cells Tissues Organs Bd. 165 (1999), Nr. 3–4, S. 190–202

Rozzi, Summer; Avdoshina, Valeria; Fields, Jerel; Trejo, Margarita; Ton, Hoai; Ahern, Gerard; Mocchetti, Italo: Human Immunodeficiency Virus Promotes Mitochondrial Toxicity. In: Neurotox Res Bd. 32 (2017), Nr. 4, S. 723–733

Sager, Thomas Nikolaj; Thomsen, Christian; Valsborg, Jacob Stenmann; Laursen, Henning; Hansen, Anker Jon: Astroglia Contain a Specific Transport Mechanism for N-Acetyl-L-Aspartate. In: Journal of Neurochemistry Bd. 73 (1999), Nr. 2, S. 807–811

Schapira, AHV; Cooper, JM; Dexter - D: Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. In: Adv. Neurol. (1990)

Segel, Reeval; Anikster, Yair; Zevin, Shoshana; Steinberg, Avraham; Gahl, William; Fisher, Drora; Orna, Staretz-Chacham; Zimran, Ari; u. a.: A safety trial of high dose glyceryl triacetate for Canavan disease. In: Mol Genet Metab Bd. 103 (2011), Nr. 3, S. 203–206

Semple, BD; Blomgren, K; Gimlin, K; in ... Ferriero - DM: Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. In: Prog. Neurobiol. (2013)

Sharp, Jason; Frame, Jennifer; Siegenthaler, Monica; Nistor, Gabriel; Keirstead, Hans S: Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after cervical spinal cord injury. In: Stem Cells, Bd. 28 (2010), Nr. 1, S. 152–163

Signoretti, S; Marmarou, A; Tavazzi, B: N-Acetylaspartate reduction as a measure of injury severity and mitochondrial dysfunction following diffuse traumatic brain injury. In: J. Neurotrauma. (2001)

Sommer, Anke; Sass, Jörn O O: Expression of aspartoacylase (ASPA) and Canavan disease. In: Gene Bd. 505 (2012), Nr. 2, S. 206–10

Sorrells, Shawn F; Paredes, Mercedes F; Arantxa, Cebrian-Silla; Sandoval, Kadellyn; Qi, Dashi; Kelley, Kevin W; James, David; Mayer, Simone; u. a.: Human hippocampal

neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. In: *Nature* Bd. 555 (2018), Nr. 7696, S. 377

Spalding, Kirsty L; Bergmann, Olaf; Alkass, Kanar; Bernard, Samuel; Salehpour, Mehran; Huttner, Hagen B; Boström, Emil; Westerlund, Isabelle; u. a.: Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. In: *Cell* Bd. 153 (2013), Nr. 6, S. 1219–1227

Stagni, F; Giacomini, A; Guidi, S; in behavioral ... Ciani - E: Timing of therapies for Down syndrome: the sooner, the better. In: *Front. Behav. Neurosci.* (2015)

Surendran, Sankar; Matalon, Reuben; Tying, Stephen K: Upregulation of aspartoacylase activity in the duodenum of obesity induced diabetes mouse: implications on diabetic neuropathy. In: *Biochemical and biophysical research communications* Bd. 345 (2006), Nr. 3, S. 973–975

Suzana, Herculano-Houzel: The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. In: *Glia* (2014)

Tahay, Gaëlle; Wiame, Elsa; Tyteca, Donatienne; Courtoy, Pierre J; Van Schaftingen, Emile: Determinants of the enzymatic activity and the subcellular localization of aspartate N-acetyltransferase. In: *Biochem. J.* Bd. 441 (2012), Nr. 1, S. 105–12

Takahashi, K; Tanabe, K; Ohnuki, M; Narita, M; Ichisaka, T: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. In: *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Tallan, HH; Moore, S; Stein, WH: N-Acetyl-L-aspartic acid in brain. In: *Journal Biol. Chem* Bd. 219 (1956), Nr. 1, S. 257–264

Taylor, DL; Davies, SE; Obrenovitch, TP; Doheny, MH; Patsalos, PN; Clark, JB; Symon, L: Investigation into the role of N-acetylaspartate in cerebral osmoregulation. In: *J. Neurochem.* Bd. 65 (1995), Nr. 1, S. 275–281

Thangavelu, Bharani; Mutthamsetty, Vinay; Wang, Qinzhe; Viola, Ronald E: Design and optimization of aspartate N-acetyltransferase inhibitors for the potential treatment of Canavan disease. In: *Bioorg. Med. Chem.* Bd. 25 (2017), Nr. 3, S. 870–885

Thomson, JA; Itskovitz-Eldor, J; Shapiro, SS; Waknitz, MA; Swiergiel, JJ; Marshall, VS; Jones, JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. In: *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.* Bd. 282 (1998), Nr. 5391, S. 1145–1147

Traeger, EC; Rapin, I: The clinical course of Canavan disease. In: *Pediatr. Neurol.* Bd. 18 (1998), Nr. 3, S. 207–212

Traka, Maria; Wollmann, Robert L; Cerda, Sonia R; Dugas, Jason; Barres, Ben A; Popko, Brian: Nur7 is a nonsense mutation in the mouse aspartoacylase gene that causes spongy degeneration of the CNS. In: *J. Neurosci.* Bd. 28 (2008), Nr. 45, S. 11537–49

Tropepe, V; Hitoshi, S; Sirard, C; Mak, TW; Rossant, J; van der Kooy, D: Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. In: *Neuron*. Bd. 30 (2001), Nr. 1, S. 65–78

Truckenmiller, ME; Namboodiri, MA; Brownstein, MJ; Neale, JH: N-Acetylation of L-aspartate in the nervous system: differential distribution of a specific enzyme. In: *J. Neurochem.* Bd. 45 (1985), Nr. 5, S. 1658–62

Urenjak, Jutta; Williams, Stephen R.; Gadian, David G.; Noble, Mark: Specific Expression of N-Acetylaspartate in Neurons, Oligodendrocyte-Type-2 Astrocyte Progenitors, and Immature Oligodendrocytes In Vitro. In: *Journal of Neurochemistry* Bd. 59 (1992), Nr. 1

Wibom, Rolf; Lasorsa, Francesco M; Töhönen, Virpi; Barbaro, Michela; Sterky, Fredrik H; Kucinski, Thomas; Naess, Karin; Jonsson, Monica; u. a.: AGC1 deficiency associated with global cerebral hypomyelination. In: *N. Engl. J. Med.* Bd. 361 (2009), Nr. 5, S. 489–95

Wittsack, HJ; Kugel, H; Roth B: Quantitative measurements with localized ¹H MR spectroscopy in children with Canavan's disease. In: *Journal Magn. Reson. Imaging* (1996)

Yamada, J; Serikawa, T; Ishiko, J; Inui, T; Takada, H; Kawai, Y; Okaniwa, A: Rats with congenital tremor and curled whiskers and hair. In: *Jikken dobutsu. Experimental animals* Bd. 34 (1985), Nr. 2, S. 183–188

Yang, Nan; Wernig, Marius: Harnessing the stem cell potential: a case for neural stem cell therapy. In: *Nat. Medicine* Bd. 19 (2013), Nr. 12, S. 1580–1581

Yu, J; Vodyanik, MA; Smuga-Otto, K: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. In: *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20

Zhang, SC; Wernig, M; Duncan, ID; Brüstle, O; Thomson, JA: In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. In: *Nat. Biotechnology* Bd. 19 (2001), Nr. 12, S. 1129–1133

Zhang, Su-Chun C: Neural subtype specification from embryonic stem cells. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* Bd. 16 (2006), Nr. 2, S. 132–142

Zhang, Ye; Chen, Kenian; Sloan, Steven A; Bennett, Mariko L; Scholze, Anja R; Sean, O'Keeffe; Phatnani, Hemali P; Guarnieri, Paolo; u. a.: An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. In: *J. Neurosci.* Bd. 34 (2014b), Nr. 36, S. 11929–47

Zhang, Ye; Sloan, Steven A.; Clarke, Laura E.; Caneda, Christine; Plaza, Colton A.; Blumenthal, Paul D.; Vogel, Hannes; Steinberg, Gary K.; u. a.: Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. In: *Neuron* Bd. 89 (2016), Nr. 1, S. 37–53

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Oliver Brüstle für die Überlassung des Themas und die großzügige materielle, finanzielle und fachliche Unterstützung bedanken. Ohne die Infrastruktur des Institutes für rekonstruktive Neurobiologie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Projektbesprechungen während der experimentellen Phase sowie Hinweise und Korrekturen bei der Abfassung der schriftlichen Dissertation haben maßgeblich zu der Qualität des Ergebnisses beigetragen.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für rekonstruktive Neurobiologie für die Unterstützung der experimentellen Arbeit danken. Im Besonderen möchte ich die Mitglieder der Arbeitsgruppe danken: Dr. Michael Karus, Dr. Kim Erwes und Melanie Bloschies. Diese Arbeit baut auf den Vorarbeiten zu Morbus Canavan am Standort auf, diese wurden insbesondere von Raphaela Gorris, Miriam Reisenhofer Marija Mizhorova und Vivian Kaps vorangetrieben.

Außerhalb des Institutes gilt mein Dank Prof. J.O. Sass von der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg für die Überlassung der Fibroblasten der Zelllinie FAC19. Der Arbeitsgruppe von Prof. W. Kunz am Institut für experimentelle Epileptologie der Universität führte die Messungen der Komplex I Aktivität durch und lieferte damit wertvolle Ergebnisse für diese Arbeit. Jörg Bedorf vom Institut für Pathologie der Universität Bonn führte die Präparation der Proben für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen durch und leistete großartige Unterstützung bei der Anfertigung der EM Aufnahmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Julia Fischer für die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit. Von ihr habe ich einen großen Teil des Handwerkszeuges gelernt, dass für diese Arbeit notwendig war. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung während der experimentellen Phase wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen. Trotz knapper Zeit hatte sie stets ein offenes Ohr für Fragen. Auch von theoretischer Seite lieferte sie immer wieder wertvolle Beiträge, letztendlich wäre die Idee für diese Arbeit ohne sie nicht in dieser Form entstanden.