

Patientenspezifische induziert pluripotente  
Stammzellen als Modellsystem zur Untersuchung  
der lysosomalen Speichererkrankung  
Metachromatische Leukodystrophie

DISSERTATION

zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Kim Lina Erwes  
aus Siegburg

Bonn, 2016

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Brüstle

2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Fürst

Tag der Promotion: 29.11.2016

Erscheinungsjahr: 2017

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	I
Abbildungen .....	V
Tabellen .....	VI
1. Einleitung .....	7
1.1 Embryonale Stammzellen .....	7
1.2 Induziert pluripotente Stammzellen .....	8
1.3 Anwendungsmöglichkeiten von humanen iPSCs im Fokus der Neurobiologie .....	11
1.3.1 <i>IPSC-basierte in vitro-Modelle neurologischer Erkrankungen</i> .....	11
1.3.2 <i>IPSC-basierte Therapieansätze zur Behandlung neurologischer Erkrankungen</i> .....	15
1.3.3 <i>IPSC-basierte in vitro-Modelle für Wirkstoffscreenings zur Behandlung von neurologischen Erkrankungen</i> .....	17
1.4 Oligodendrozyten .....	18
1.4.1 <i>Entstehung der Oligodendrozyten</i> .....	18
1.4.2 <i>Entwicklung der Oligodendrozyten</i> .....	20
1.4.3 <i>Aufbau und Funktion von Myelin</i> .....	22
1.4.4 <i>Differenzierung von humanen Oligodendrozyten in vitro</i> .....	23
1.4.5 <i>Die Funktionalität von in vitro generierten humanen Oligodendrozyten in vivo</i> .....	26
1.5 Lysosomale Speichererkrankungen .....	27
1.5.1 <i>Transport lysosomaler Enzyme</i> .....	28
1.5.2 <i>Metachromatische Leukodystrophie</i> .....	29
1.5.3 <i>Krankheitsmodelle der MLD</i> .....	32
1.5.4 <i>Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der MLD</i> .....	34
1.6 Ziel der Arbeit .....	37
2. Material und Methoden .....	38
2.1 Hersteller .....	38
2.2 Technische Ausstattung .....	38
2.3 Material .....	39
2.3.1 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	39
2.3.2 <i>Chemikalien und Reagenzien</i> .....	40
2.3.3 <i>Gebrauchsfähige Reagenzien</i> .....	42
2.3.4 <i>Mausstämme</i> .....	42
2.3.5 <i>Primäre Zellpräparationen</i> .....	43
2.3.6 <i>Antikörper</i> .....	44
2.3.7 <i>Oligonukleotide</i> .....	45
2.4 Zellkultur .....	46
2.4.1 <i>Zellkulturmedien</i> .....	46
2.4.2 <i>Zellkulturreagenzien</i> .....	47

2.4.3 Zellkulturlösungen .....	47
2.4.4 Oberflächenbeschichtung für Zellkulturschalen.....	48
2.4.5 Mitotische Inaktivierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten .....	48
2.4.6 Generierung, Charakterisierung und Kultivierung von humanen iPSCs.....	49
2.4.7 Keimblattdifferenzierung <i>in vitro</i> .....	50
2.4.8 Generierung und Kultivierung von RGL-NPCs .....	51
2.4.9 Oligodendrogliale, astrogliale und neuronale Differenzierung von RGL-NPCs .....	52
2.4.10 Quantitative Durchflusszytometrie .....	53
2.4.11 Quantifizierung der Zellen .....	53
2.4.12 Behandlung der MLD-RGL-NPCs mit rhARSA.....	53
2.4.13 Bestimmung des intrazellulären Sulfatidmetabolismus .....	54
2.5 Molekularbiologie .....	54
2.5.1 Ernte von Zellen .....	54
2.5.2 Isolation von RNA.....	55
2.5.3 Isolation von genomischer DNA .....	55
2.5.4 Isolation von Proteinen .....	55
2.5.5 RT-PCR .....	55
2.5.6 Einzelnukleotid-Polymorphismus Analyse.....	56
2.5.7 Sequenzierung der Mutationen im ARSA-Gen.....	56
2.5.8 Bestimmung der ARSA-Enzymaktivität .....	59
2.5.9 Immunzytochemische Färbungen .....	60
2.5.10 Transplantationen und Gewebeaufarbeitung .....	60
2.5.11 Histologie.....	63
2.6 Software .....	64
3. Ergebnisse .....	66
3.1 MLD-spezifische Hautfibroblasten weisen distinkte Mutationen im ARSA-Gen auf.....	66
3.2 MLD-spezifische Hautfibroblasten können in iPSCs reprogrammiert werden.....	68
3.3 MLD-spezifische iPSCs können unter definierten Medienbedingungen in RGL-NPCs differenziert werden .....	73
3.4 RGL-NPCs differenzieren unter bestimmten Kulturbedingungen in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten .....	77
3.5 MLD-spezifische Zellen sind ARSA-defizient .....	81
3.6 MLD-spezifische und Kontroll-Oligodendrozyten zeigen eine ähnliche Differenzierung sowie einen vergleichbaren Nachweis von Sulfatid.....	83
3.7 RGL-NPCs als humanes Zellkulturmodell für die Aufnahme extrazellulärer ARSA .....	85
3.7.1 RGL-NPCs nehmen extrazelluläre rhARSA abhängig von M6P-Rezeptoren auf .....	85
3.7.2 Funktionelle Wiederherstellung der ARSA-Enzymaktivität in RGL-NPCs .....	87
3.7.3 Patientenspezifische Unterschiede bei der Aufnahme von exogener rhARSA in MLD-RGL-NPCs .....	88

3.8 Das Verhalten von <i>in vitro</i> -generierten MLD-spezifischen Zellen in einem Arsa- und myelindefizienten Milieu .....	90
3.8.1 Die Arsa <sup>-/-</sup> /Shi/Rag2 <sup>-/-</sup> -Maus ist myelindefizient und weist Sulfatidablagerungen im Gehirn auf .....	91
3.8.2 RGL-NPCs überleben in der Arsa <sup>-/-</sup> /Rag2 <sup>-/-</sup> -Maus und differenzieren in gliale Subtypen .....	92
3.8.3 RGL-NPCs differenzieren in der Arsa <sup>-/-</sup> /Shi/Rag2 <sup>-/-</sup> -Maus in reife Oligodendrozyten .....	94
4. Diskussion .....	96
4.1 MLD-spezifische oligodendrogliale Kulturen dienen als Grundlage für ein humanes MLD-spezifisches <i>in vitro</i> -Modell .....	96
4.1.1 Mit den MLD-RGL-NPCs steht eine Quelle für humane MLD-spezifische Oligodendrozyten zur Verfügung .....	96
4.1.2 Das generierte <i>in vitro</i> -Modell weist MLD-spezifische Veränderungen auf .....	98
4.2 MLD-spezifische RGL-NPCs nehmen exogene ARSA auf und eignen sich als humanes neurales Zellkulturmodell, um entsprechende Therapieansätze zu evaluieren .....	105
4.3 Die Arsa <sup>-/-</sup> /Shi/Rag2 <sup>-/-</sup> -Maus eignet sich als <i>in vivo</i> -Modell zur Überprüfung der Funktionalität MLD-spezifischer Oligodendrozyten sowie für die Evaluation zellbasierter Therapien .....	110
4.4 Perspektiven .....	112
5. Zusammenfassung .....	114
6. Literaturverzeichnis .....	116
7. Erklärung .....	135

## Abkürzungen

Abkürzung	Name	Abkürzung	Name
#	Klon	BLBP	<i>brain lipid-binding protein</i>
%	Prozent	BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
°C	Grad Celsius	bp	Basenpaare
-/-	homozygot	BSA	bovines Serumalbumin
+/-	heterozygot	bzw.	beziehungsweise
3D	dreidimensional	C	<i>Control</i> , Kontrolle
a	adult	C	Cystein
A	Aktivität	ca.	circa
A	Ampere	Caspr	<i>contactin-associated protein</i>
AA	<i>ascorbic acid</i> , Ascorbinsäure	CC	<i>Corpus Callosum</i>
Abb.	Abbildung	cDNA	<i>coding DNA</i> , kodierende Desoxyribonukleinsäure
ABCD1	<i>adenosine triphosphate [ATP]- binding-cassette transporter superfamily D member 1</i>	cm	Zentimeter
AD	<i>Alzheimer's disease</i> , Morbus Alzheimer	CNPase	2',3'-cyclische Nukleotid-3' Phosphodiesterase
Adv	<i>Advanced</i>	CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
AFP	<i>alpha-fetoprotein</i>	CRISPR–Cas9	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated 9</i>
ALD	Adrenoleukodystrophie	CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose	Ctrl	<i>control</i> , Kontrolle
AMD	altersbedingte Makuladegeneration	d	Schichtdicke
aMLD	adulte Form der MLD	DAB	<i>3,3'-diaminobenzidine</i>
AP	Alkalische Phosphatase	DABCO	1,4-
APC	Allophycocyanin	DAPI	Diazabicyclo[2.2.2]octan
ApE	<i>A plasmid Editor</i>	ddH <sub>2</sub> O	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ARSA	Arylsulfatase A	DMEM	doppelt destilliertes Wasser
Arsa <sup>-/-</sup>	Arsa-defizient	DMSO	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ARSB	Arylsulfatase B	DNA	Dimethylsulfoxid
ASCL1	<i>achaete-scute complex homolog 1</i>	DNase	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ATP	Adenosintriphosphat	dNTP	Desoxyribonuklease
ATRA	<i>all-trans retinoic acid</i> , Retinsäure		Deoxynucleotid
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>		
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>		

Abkürzung	Name	Abkürzung	Name
EB	<i>embryonic body</i> , Embryoidkörper	HSCT	<i>haematopoetic stem cell therapy</i> , hämatopoetische Stammzelltherapie
EDTA	Ethyldiamintetraessig-säure	ICM	<i>Inner cell mass</i> , Innere Zellmasse
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	Ig	Immunglobulin
ER	Endoplasmatisches Retikulum	IKBKAP	<i>I-<math>\kappa</math>-B kinase complex-associated protein</i>
ERT	<i>enzyme replacement therapy</i> , Enzymersatztherapie	iN	induzierte Neurone
ESC	<i>embryonic stem cell</i> , embryonale Stammzelle	iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i> , induziert pluripotente Stammzelle
ETOH	Ethanol	IVS	<i>Intervening Sequence</i>
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>	kb	Kilobase
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum	kDa	Kilodalton
FD	Familiäre Dysautonomie	Klf4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	KO	<i>knock out</i>
g	Gramm	konz.	konzentriert
g	Erdbeschleunigung	kV	Kilovolt
G6P	Glukose-6-Phosphat	l	Liter
GalC	Galactocerebrosidase	L	Leucin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	LB	Life & Brain
Ges	Gesamt	liMLD	spätaffantile Form der MLD
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>	Lat.	lateinisch
GLAST	Glutamat-Aspartat Transporter	Ln	Laminin
Gy	Gray	m	männlich
h	human	M	Molar
h	<i>hour</i> , Stunde	M6P	Mannose-6-Phosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser	mA	Millampere
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	mAB	<i>monoclonal antibody</i>
HCl	Salzsäure	MAG	<i>myelin associated glycoprotein</i>
HE	Hämalaun-Eosin	MAL	<i>myelin and lymphocyte protein</i>
HMG	<i>high mobility group</i>	MBP	<i>myelin basic protein</i>
HN	Hämagglutin-Neurominidase	MD	myelindefizient
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>	MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> , embryonale Mausfibroblasten
HSC	<i>haematopoetic stem cell</i> , hämatopoetische Stammzellen	mg	Milligramm
		MG	Matrigel

Abkürzung	Name	Abkürzung	Name
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	OLIG	<i>oligodendrocyte transcription factor</i>
min	Minute	OPC	<i>oligodendrocyte precursor cell, Oligodendrozyten-vorläuferzellen</i>
ml	Milliliter	p	Aminosäuresequenz
MLD	Metachromatische Leukodystrophie	P	Passage
mM	Millimol	P	Prolin
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>	PAX	<i>Paired box</i>
MPR	M6P-spezifische Rezeptoren	PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion</i>
MS	Multiple Sklerose	PD	<i>Parkinson's disease, Morbus Parkinson</i>
mU	Milliunit	PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
Myt1l	<i>myelintranscription factor 1 like</i>	PDGF-AA	PDGF bestehend aus zwei A-Ketten
Na	Natrium	PDGFR $\alpha$	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
NaCl	Natriumchlorid	PE	Phycoerythrin
NaOH	Natriumhydroxid	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
NBD	N-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]	pH	<i>potentia hydrogenii</i> (lat.), Säuregrad einer Flüssigkeit
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	PLP	<i>proteolipid protein</i>
ND	Nano Drop	pMN-Domäne	<i>motor neuron progenitor domain, Motor-neurondomäne</i>
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> , nicht-essentielle Aminosäuren	pmol	Pikomol
NES	Nestin	pNCS	<i>4-Nitrocatechol sulfate dipotassium salt</i>
NeuroD1	<i>Neurogenic differentiation 1</i>	PNS	peripheres Nervensystem
ng	Nanogramm	PO	Poly-L-Ornithin
NG2	Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan CSPG4/NG2	RA	<i>retinoic acid, Retinsäure</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>	Rag	<i>recombination-activating gene</i>
nm	Nanometer	Rag2 <sup>-/-</sup>	Rag2-defizient
nmol	Nanomol	RG-Zellen	Radiale Gliazellen
Nogo-A	<i>Neurite outgrowth inhibition protein A</i>	RGL-NPC	<i>radial glia-like neural precursor cells; radialgliaähnliche neurale Vorläuferzellen</i>
OCT	Octamer		
OD	optische Dichte		
OL	Oligodendrozyt		

Abkürzung	Name	Abkürzung	Name
rhARSA	humane rekombinante Arylsulfatase A	Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (Lat.)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
RNase	Ribonuklease	TBST	<i>Tris-buffered saline-Tween</i>
ROCK	Rho Kinase Inhibitor Y	TE	Trypsin-EDTA
RPE	Retinales Pigmentepithel	tg	transgen
RT	Raumtemperatur	TI	Trypsin-Inhibitor
RT	<i>Reverse transcription</i>	TUBB3	$\beta$ III-Tubulin
S	Sendai	U	Unit
Sap-B	Saponin B	ü. N.	über Nacht
SCA3	Spinocerebelläre Ataxie Typ 3	$\mu$ l	Mikroliter
SeV	Sendaivirus	um	Mikrometer
SHH	<i>sonic hedgehog</i>	ÜS	Überstand
Shi	Shiverer	UV	Ultraviolett
SMA	Spinale Muskelatrophie	V	Volt
SMA	<i>smooth muscle actin</i>	V	Volumen
SMN	<i>survival motor neuron</i>	v	Volumen
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus	v/v	Volumen pro Volumen
		VIM	Vimentin
		VPA	<i>valproic acid</i> , Valproinsäure
SOX	<i>sex-determining region Y-related HMG box</i>	w	weiblich
SSEA-4	<i>stage-specific embryonic antigen-4</i>	W	Woche
Sulfatid	3'-O-Sulfo-Galaktosylceramid	w/v	Tryptophan
SW	Schwangerschaftswoche	Wnt	<i>weight per volume</i> ; Masse pro Volumen
t	Zeit	z. B.	<i>Wingless/Integrated</i>
T3	Trijod-L-Thyronin	ZNS	zum Beispiel
TAE	Tris-Aacetat-EDTA	$\beta$ -ME	zentrales Nervensystem
TALENs	<i>transcription activator-like effector nucleases</i>	$\gamma$	2-Mercaptoethanol
		$\varepsilon$	Gamma
			Extinktionskoeffizient

## Abbildungen

<b>Abb. 1:</b> Gewinnung von humanen pluripotenten embryonalen Stammzellen.....	7
<b>Abb. 2:</b> Medizinische Anwendung von patientenspezifischen iPSCs.....	10
<b>Abb. 3:</b> Neurale Vorläuferdomänen im embryonalen Rückenmark.....	19
<b>Abb. 4:</b> Die Entwicklung von Oligodendrozyten.....	21
<b>Abb. 5:</b> Myelinisierung im ZNS.....	22
<b>Abb. 6:</b> Synthese und Transport lysosomaler Enzyme.....	29
<b>Abb. 7:</b> Hydrolyse von Sulfatid.....	30
<b>Abb. 8:</b> Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der MLD.....	35
<b>Abb. 9:</b> PCR-Amplifikate der Oligonukleotide ARSA 1-5.....	58
<b>Abb. 10:</b> Aufbau des humanen ARSA-Gens mit Kennzeichnung der MLD-verursachenden Mutationen.....	67
<b>Abb. 11:</b> Reprogrammierung von Hautfibroblasten zu hiPSCs.....	68
<b>Abb. 12:</b> Nachweis der Sendaiviren in den generierten iPSCs.....	70
<b>Abb. 13:</b> Expression pluripotenzassozierter Proteine in hiPSCs.....	71
<b>Abb. 14:</b> <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Keimblattdifferenzierung der hiPSCs.....	72
<b>Abb. 15:</b> Genomische Integrität der hiPSCs.....	73
<b>Abb. 16:</b> Neurale Differenzierung von hiPSCs in RGL-NPCs.....	74
<b>Abb. 17:</b> Expressionsprofil der RGL-NPCs auf Proteinebene.....	75
<b>Abb. 18:</b> Expressionsprofil der RGL-NPCs auf Transkriptionsebene.....	76
<b>Abb. 19:</b> Quantitative FACS-Analyse der GLAST-Expression in RGL-NPCs.....	77
<b>Abb. 20:</b> Astrogliale und neuronale Differenzierung der RGL-NPCs.....	78
<b>Abb. 21:</b> Oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPCs.....	79
<b>Abb. 22:</b> Neurone und Astrozyten in oligodendroglialen Kulturen.....	81
<b>Abb. 23:</b> Expression und Enzymaktivität von ARSA in Hautfibroblasten und RGL-NPCs.....	82
<b>Abb. 24:</b> ARSA-Aktivität in astroglialen, neuronalen und oligodendroglialen Kulturen.....	83
<b>Abb. 25:</b> Vergleich der Kontroll- und MLD-spezifischen Oligodendrozyten <i>in vitro</i> .....	84
<b>Abb. 26:</b> Intrazelluläre Aufnahme von rhARSA.....	86
<b>Abb. 27:</b> Analyse des Sulfatidmetabolismus.....	88
<b>Abb. 28:</b> ARSA-Aktivität in rhARSA-behandelten MLD-spezifischen RGL-NPCs.....	89
<b>Abb. 29:</b> MBP-Expression <i>in vivo</i> .....	91
<b>Abb. 30:</b> Sulfatidablagerungen <i>in vivo</i> .....	92
<b>Abb. 31:</b> Analyse der transplantierten RGL-NPCs <i>in vivo</i> .....	93
<b>Abb. 32:</b> MBP-Expression und Sulfatidnachweis in transplantierten humanen Zellen und im Gewebe der Arsa <sup>-/-</sup> /Shi/Rag2 <sup>-/-</sup> -Maus.....	95
<b>Abb. 33:</b> Wiederherstellung der ARSA-Enzymaktivität in liMLD-spezifischen Zellen durch die Kultivierung mit konzentriertem Überstand von neuronal differenzierten und ARSA-überexprimierenden Kulturen.....	109

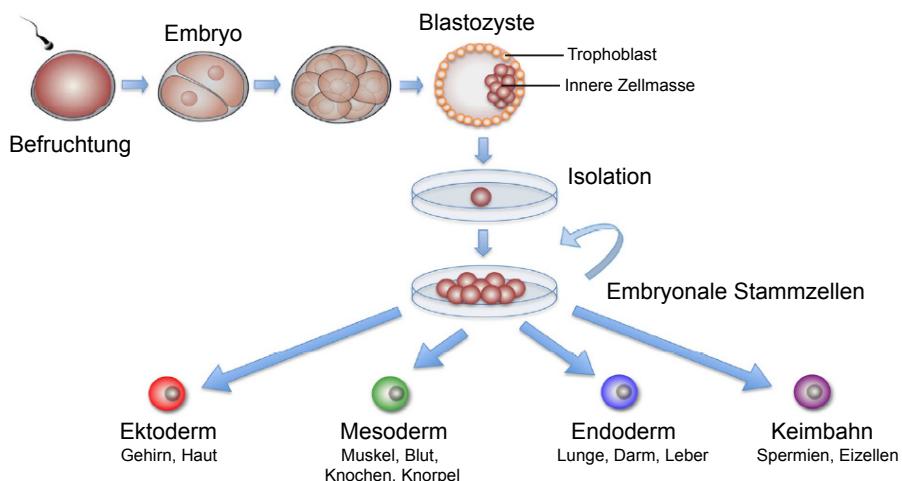
## Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> Überblick der humanen Hautfibroblasten und deren Eigenschaften. ....	<b>66</b>
<b>Tabelle 2:</b> Überblick der generierten hiPSC-Klone und deren Validierung sowie Differenzierung in RGL-NPCs. ....	<b>69</b>
<b>Tabelle 3:</b> P-Werte zu den ARSA-Enzymaktivitätsmessungen an patientenspezifischen RGL-NPCs nach rhARSA-Behandlung. ....	<b>90</b>
<b>Tabelle 4:</b> Einzelwerte der ARSA-Enzymaktivitäten von liMLD-RGL-NPCs nach rhARSA-Behandlung .....	<b>107</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Embryonale Stammzellen

Die Embryonalentwicklung beginnt mit der Teilung der befruchteten Eizelle, die ihr totipotentes Stadium verlässt und die Blastozyste bildet. Umliegend entsteht der Trophoblast, der später die Plazenta und das Extraembryonalgewebe formt. Innen liegend hat sich die innere Zellmasse (*inner cell mass*, ICM) abgesetzt (Abb. 1), deren Zellen weiter in die drei Keimblätter sowie in die Zellen der Keimbahn differenzieren. Durch die fortlaufende Spezifizierung entwickelt sich final der gesamte Embryo. Die embryonalen Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESC) werden aus der ICM der Blastozyste gewonnen (Abb. 1). In diesem Stadium sind sie undifferenziert, pluripotent, und fähig sich selbst zu erneuern.



**Abb. 1: Gewinnung von humanen pluripotenten embryonalen Stammzellen.**

Für die Generierung von humanen embryonalen Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESC) wird die befruchtete Eizelle in Kultur genommen und *in vitro* differenziert. Die pluripotenten Zellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen und in einem definierten Medium kultiviert. Schließlich werden die pluripotenten Zellpopulationen mechanisch isoliert. Die so entstandenen humanen ESC-Linien können in die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm sowie in die Zellen der Keimbahn differenziert werden. Modifiziert nach Yabut & Bernstein, 2011.

Erstmals gelang es 1981 zwei Forschungsgruppen gleichzeitig, murine ESCs zu isolieren und in Kultur zu bringen (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Erst 17 Jahre später schafften Thomson *et al* den Durchbruch und isolierten erfolgreich humane ESCs (Thomson *et al*, 1998). Die Stammzellen formten kompakte Zellkolonien und zeigten eine robuste Zellerneuerung. Sie exprimierten pluripotenz- assoziierte Oberflächenantigene und waren in der Lage, in alle drei Keimblätter zu differenzieren.

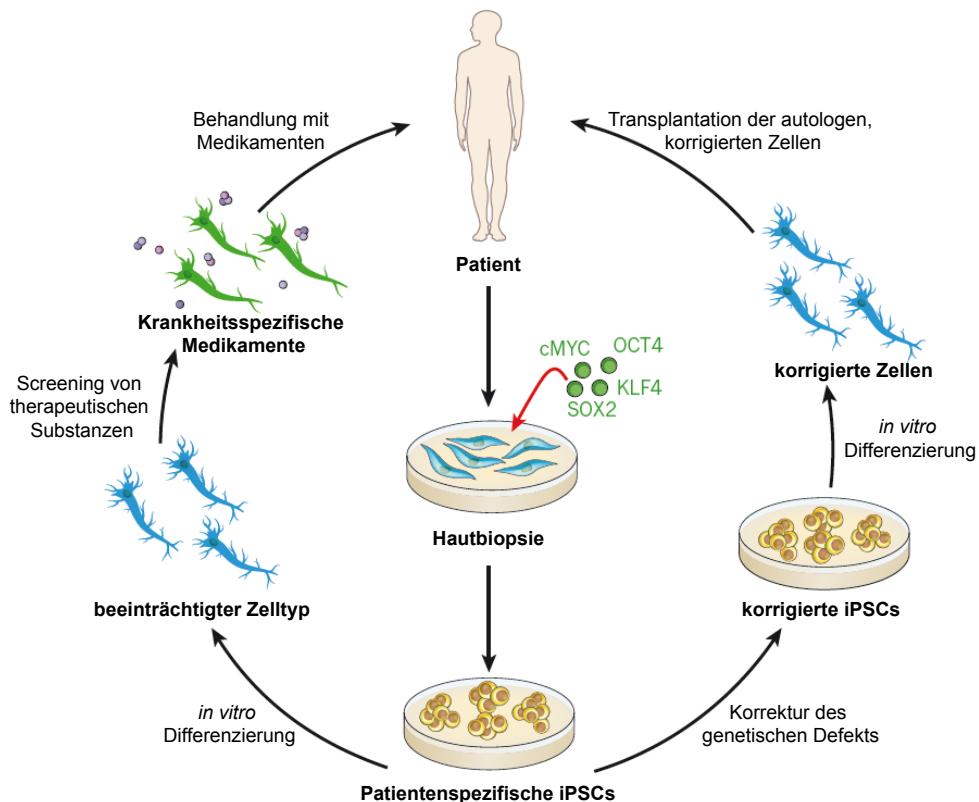
Aufgrund ihrer pluripotenten Eigenschaften sind ESCs für die Forschung und Medizin von großem Nutzen. Durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und des hohen Differenzierungspotentials stellen sie eine unbegrenzte Quelle für den therapeutischen Einsatz gewebespezifischer Zellen und möglicherweise sogar für Gewebe oder gesamte Organe dar. Dieser Therapieansatz ist besonders vielversprechend für Krankheiten, die mit einem bleibenden Verlust von Gewebe oder spezifischen Zelltypen einhergehen, wie bei Morbus Parkinson oder einem Herzinfarkt. Neben dem Gewebeersatz eignen sich ESCs auch als *in vitro*-Modell. Es können die molekularen Mechanismen einer Zelle untersucht werden, wie die Genregulation, Proteininteraktionen oder die Zellkommunikation. Des Weiteren kann die Embryonalentwicklung studiert und Medikamente in einem humanen System entwickelt und getestet werden. Für Fragestellungen, die einen bestimmten Zelltyp betreffen, ist es notwendig, die ESCs in der Zellkulturschale gezielt in den gewünschten somatischen Zelltyp zu differenzieren. Zahlreiche Studien demonstrierten bereits ein Differenzierungspotential von murinen ESCs, aber auch von humanen ESCs in verschiedene Zelltypen. Unter spezifischen Zellkulturbedingungen konnten z. B. Zellen mesodermalen Ursprungs, wie hämatopoetische Zellen (Pick *et al*, 2007; Chadwick *et al*, 2003; Kaufman *et al*, 2001) oder Zellen endodermalen Ursprungs, wie Hepatozyten (Agarwal *et al*, 2008; Cai *et al*, 2007), aber auch Zellen des Ektoderms, wie dopaminerge Neurone (Yan *et al*, 2005; Perrier *et al*, 2004) oder Motoneurone (Li *et al*, 2005), generiert werden.

### 1.2 Induziert pluripotente Stammzellen

In den letzten Jahrzehnten wurden die Mechanismen der Pluripotenz eingehend studiert. Die Arbeiten über den somatischen Zellkerntransfer (Wilmut *et al*, 1997; Briggs & King, 1952) und die Fusion von somatischen Zellen mit Stammzellen (Tada *et al*, 2001) zeigten auf, dass Stammzellen Faktoren exprimieren, die Pluripotenz induzieren und aufrechterhalten können. Diese Erkenntnisse wurden genutzt, um, neben den ESCs, alternative Wege für die Generierung pluripotenter Stammzellen zu finden. Im Jahr 2006 beschrieben Takahashi und Yamanaka zum ersten Mal die Reprogrammierung somatischer Zellen der Maus in induziert pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC; Takahashi & Yamanaka, 2006). Sie nutzten die retrovirale Transduktion der vier Transkriptionsfaktoren *Octamer (Oct) 4, sex-determining region Y-related HMG box (Sox) 2, Kruppel-like factor (Klf) 4* und *c-Myc* (Takahashi & Yamanaka, 2006). Die entstandenen iPSCs ähnelten den

ESCs in vielen Haupteigenschaften, wie der Morphologie und dem *in vitro*- und *in vivo*-Differenzierungspotential in alle drei Keimblätter. Bereits Ende 2007 beschrieben zwei Forschungsgruppen zeitgleich die Generierung von iPSCs aus humanen Fibroblasten (Takahashi *et al*, 2007; Yu *et al*, 2007). Nach diesem Durchbruch folgten zahlreiche Arbeiten, die eine Generierung humaner iPSCs (hiPSCs; Lowry *et al*, 2008; Mali *et al*, 2008) sowie die Generierung von iPSCs aus anderen humanen somatischen Zellen zeigten, wie Keratinozyten (Aasen *et al*, 2008; Aasen & Izpisúa Belmonte, 2010), Stammzellen der Nabelschnur (Ye *et al*, 2009) oder Hepatozyten (Liu *et al*, 2010).

Die iPSC-Technologie revolutionierte die Stammzellforschung. Neben einer unerschöpfbaren Quelle an Stammzellen können auch patientenspezifische und damit autologe Stammzellen generiert werden, die bei einer möglichen Zellersatztherapie nicht abgestoßen werden. Bei genetisch bedingten Krankheiten kann der Gendefekt in den patientenspezifischen iPSCs korrigiert werden. Nach einer Differenzierung der korrigierten Zellen in den zu ersetzenden somatischen Zelltyp können sie anschließend in das gewünschte Zielorgan des Patienten transplantiert werden (Abb. 2). Darüber hinaus können Erkrankungen, bei denen die krankheitsspezifischen Zellen schwer zu isolieren sind (z. B. Gehirn oder Herz), mit Hilfe von hiPSCs in der Zellkulturschale modelliert und die molekularen Pathomechanismen untersucht werden. Zusätzlich können diese Krankheitsmodelle auch für Wirkstoffscreenings und Toxizitätsassays herangezogen werden (Abb. 2). Bevor eine klinische Anwendung von hiPSCs in Betracht gezogen werden kann, muss die Generierung der iPSCs optimiert werden. Die Effizienz der Reprogrammierung soll gesteigert und das Risiko der Tumorigenität, welches durch die retrovirale Integration und die Verwendung der Onkogene *c-MYC* und *KLF4* hervorgerufen wird, vermindert werden. Als Alternative zu den Retroviren wurden andere Methoden verwendet, um die Transkriptionsfaktoren in die Zellen einzubringen. Dazu zählen nicht-integrative Adenoviren (Zhou & Freed, 2009; Stadtfeld *et al*, 2008) und Expressionsplasmide (Okita *et al*, 2008; Si-Tayeb *et al*, 2010b) sowie episomale (Yu *et al*, 2009), lentivirale (Sommer *et al*, 2009) oder Transposonvektoren, die wieder aus dem Empfängergenom entfernt werden können (Kaji *et al*, 2009; Woltjen *et al*, 2009).



**Abb. 2: Medizinische Anwendung von patientenspezifischen iPSCs.**

Für die Generierung autologer induziert pluripotenter Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) wird dem Patienten eine Hautbiopsie entnommen und in Kultur genommen (Mitte). Die auswachsenden Fibroblasten werden durch die retrovirale Transduktion der vier Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *cMYC* in iPSCs reprogrammiert. Die generierten patientenspezifischen iPSCs können für die Entwicklung von Medikamenten herangezogen werden (links). Hierfür werden die Zellen *in vitro* in den beeinträchtigten Zelltypen differenziert. Diese werden für das Screening von therapeutischen Komponenten genutzt. Der Patient kann final mit dem krankheitsspezifischen Medikament behandelt werden. Darüber hinaus kann in den patientenspezifischen iPSCs der genetische Defekt korrigiert und die iPSCs weiter in den gewünschten Zelltyp *in vitro* differenziert werden. Schließlich können die korrigierten Zellen in das gewünschte Zielorgan des Patienten zur Zellersatztherapie transplantiert werden (rechts). Modifiziert nach Robinton & Daley, 2012.

iPSCs wurden auch mit Hilfe von DNA-freien Methoden generiert, wie rekombinante Proteine (Zhou *et al*, 2009; Kim *et al*, 2009a), nicht-integrierende RNA-Viren (Fusaki *et al*, 2009), synthetische mRNAs (Warren *et al*, 2010) oder microRNAs (Miyoshi *et al*, 2011). Darüber hinaus wurden für die Onkogene *c-MYC* und *KLF4* Alternativen gefunden. Beide konnten durch die Zugabe von *NANOG* und *LIN28* (Haase *et al*, 2009; Yu *et al*, 2009, 2007) oder durch die Verabreichung der Chemikalie Valproinsäure (*valproic acid*, VPA; Huangfu *et al*, 2008) ersetzt werden. Zusätzlich ermöglichte die Verwendung bestimmter somatischer Zellen den Ausschluss verschiedener Transkriptionsfaktoren. Bei Stammzellen der Nabelschnur sowie bei Nierenepithelzellen, die sich im Urin befinden, reichten *OCT4* und *SOX2* für die Generierung der hiPSCs aus (Zhou *et al*, 2012; Giorgi *et al*, 2010). Neurale

Stammzellen benötigten aufgrund ihrer hohen endogenen SOX2-Expression nur OCT4, um erfolgreich reprogrammiert zu werden (Kim *et al*, 2009b).

Um die Effizienz der Reprogrammierung zu steigern, setzten Judson und Kollegen microRNAs ein (Judson *et al*, 2009). Weitere Arbeiten zeigten auch, dass eine sauerstoffarme Umgebung der zu reprogrammierenden Zellen (Yoshida *et al*, 2009) sowie die Zugabe von Vitamin C (Esteban *et al*, 2010) zu einer Steigerung der Reprogrammierungseffizienz führen kann.

Neben dem Ziel, das Krebsrisiko zu senken und die Effizienz der Reprogrammierung zu steigern, müssen die iPSCs, um therapeutisch eingesetzt werden zu können, *in vitro* zielgerichtet in den gewünschten Zelltypen differenziert werden. Das stellt eine weitere Herausforderung dar. Viele Differenzierungsprotokolle sind sehr komplex und zeitaufwendig. Dadurch kann es zu einer hohen Variabilität in der Zielzellpopulation kommen. Je nach Gewebeart liegt die Schwierigkeit darin, die iPSCs nicht nur vollständig, sondern auch möglichst effizient in den gewünschten Zelltypen zu differenzieren. Es wurden bereits verschiedene aus hiPSCs abgeleitete somatische Zellenlinien generiert, z. B. Hepatozyten (Cho *et al*, 2012; Si-Tayeb *et al*, 2010a), Lungenepithelzellen (Wong & Rossant, 2013) sowie neurale Zellen (Chambers *et al*, 2009; Zhou *et al*, 2010; Kreitzer *et al*, 2013; Karumbayaram *et al*, 2009) oder Blutzellen (Ebihara *et al*, 2012; Dias *et al*, 2011).

### **1.3 Anwendungsmöglichkeiten von humanen iPSCs im Fokus der Neurobiologie**

#### **1.3.1 IPSC-basierte *in vitro*-Modelle neurologischer Erkrankungen**

Eine große Herausforderung bei der Generierung von stammzellbasierten *in vitro*-Modellen einer Krankheit ist die gerichtete Differenzierung der hiPSCs in den beeinträchtigten somatischen Zelltyp. Dieser soll idealerweise die charakteristischen Merkmale der Krankheit aufweisen. Es ist wichtig, ein entsprechendes Differenzierungsprotokoll zu Verfügung zu haben, um nicht nur den richtigen Gewebetyp, sondern auch spezifische und vor allem reifere Zelltypen eines Gewebes zu generieren. Da viele neurodegenerative Krankheiten erst im späten Lebensalter auftreten, ist eine lange *in vitro*-Differenzierung in den beeinträchtigten Zelltyp vorherzusehen. Außerdem werden einige Erkrankungen nicht nur durch genetische Faktoren bestimmt, sondern kommen sporadisch vor und/oder werden durch äußere Umstände beeinflusst, die schwierig in einem *in vitro*-Modell experimentell dargestellt werden können. Schließlich müssen geeignete Methoden

verfügbar sein, um einen möglichen Phänotyp der entsprechenden Krankheit aufzudecken zu können.

Die ersten Arbeiten über iPSC-basierte *in vitro*-Modelle demonstrierten zwar die Generierung von patientenspezifischen iPSCs, scheiterten aber an dem Nachweis möglicher krankheitsspezifischer Merkmale (Park *et al*, 2008; Dimos *et al*, 2008; Soldner *et al*, 2009). Es fehlten entsprechende Differenzierungsprotokolle und die untersuchten Krankheiten traten sporadisch auf. Dimos *et al* hatten darüber hinaus Schwierigkeiten, die Fibroblasten von einer älteren Patientin zu reprogrammieren. Demzufolge stellt nicht nur die Differenzierung des krankheitsspezifischen somatischen Zelltyps, sondern auch das Alter der Fibroblasten selbst eine Herausforderung für die Generierung von *in vitro*-Modellen dar. Zum ersten Mal gelang es Ebert *et al* 2009 von einem Patienten, der an spinaler Muskelatrophie (SMA) litt, hiPSCs zu generieren, diese in den beeinträchtigten Zelltypen zu differenzieren und einen krankheitsspezifischen Phänotyp aufzuzeigen (Ebert *et al*, 2009). Bei der SMA handelt es sich um eine monogenetische Erkrankung, die durch Mutationen im *survival motor neuron* (SMN)-Gen ausgelöst wird. Das führt zu einer reduzierten Expression des SMN-Proteins und im weiteren Verlauf zu einem Verlust der unteren Motoneuronen. Mit einem entsprechenden Differenzierungsprotokoll demonstrierte diese Arbeitsgruppe, dass die patientenspezifischen Zellen zwar Motoneurone bilden konnten, diese aber aufgrund der reduzierten SMN-Expression nicht weiter differenzierten bzw. verfrüh degenerierten (Ebert *et al*, 2009). Im selben Jahr wurde ein iPSC-basiertes *in vitro*-Modell der Familiären Dysautonomie (FD) vorgestellt (Lee *et al*, 2009). Bei der FD handelt es sich um eine tödliche periphere Neuropathie. Sie wird durch eine Punktmutation im *IKBKAP* (*I-k-B kinase complex-associated protein*)-Gen ausgelöst. Das führt zu einem Verlust der autonomen und sensorischen Neuronen. Lee und Kollegen generierten FD-abgeleitete Vorläuferzellen der Neuralleiste (Lee *et al*, 2009). Bei der Differenzierung dieser Zellen in periphere Neurone stellten sie neben dem *Splicing*-Defekt im *IKBKAP*-Gen zusätzlich Defizite in der neuronalen Differenzierung und dem Migrationsverhalten fest.

Andere Arbeitsgruppen konnten bei weiteren monogenetischen Erkrankungen, die das Nervensystem betreffen, einen krankheitsspezifischen Phänotyp *in vitro* demonstrieren. Dazu gehörten unter anderen das Rett-Syndrom (Marchetto *et al*, 2010; Ananiev *et al*, 2011; Cheung *et al*, 2011), die Adrenoleukodystrophie (Jang *et al*, 2011) und die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3; Koch *et al*, 2011). Zusätzlich konnten auch Krankheiten, die durch verschiedene Mutationen und äußere Faktoren

beeinflusst werden, in der Zellkulturschale modelliert werden, wie Morbus Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD; Duan *et al*, 2014; Israel *et al*, 2012; Kondo *et al*, 2013; Yagi *et al*, 2011) oder Morbus Parkinson (*Parkinson's disease*, PD; Devine *et al*, 2011; Imaizumi *et al*, 2012; Nguyen *et al*, 2011; Sánchez-Danés *et al*, 2012; Seibler *et al*, 2011).

### Methoden zur Induktion krankheitsspezifischer Merkmale in *in vitro*-Modellen

Wenn in einem krankheitsspezifischen *in vitro*-Modell, trotz bekannter Mutationen, kein Phänotyp festgestellt werden kann, kann das verschiedene Gründe haben. Beispielsweise treten die Krankheiten im Menschen sporadisch auf und/oder werden nicht nur durch genetische Faktoren, sondern auch durch äußere Einflüsse, wie den Lebensgewohnheiten oder der Umwelt, bestimmt. Das späte Auftreten einer Krankheiten im Menschen kann auch ein Grund für das Ausbleiben eines krankheitsspezifischen Erscheinungsbildes in *in vitro*-Kulturen sein. Meistens weisen die in den Zellkultursystemen enthaltenen Zellen ein junges Reifestadium auf und können deshalb keinen krankheitsspezifischen Phänotyp entwickeln. Um Zellen mit einem höheren Reifegrad zu erhalten, können die Zellen über einen längeren Zeitraum differenziert werden. Eine länger andauernde Kultivierung ist jedoch zeitaufwendig, mit Kosten verbunden und durch äußere Einflüsse limitiert. Die Gefahr einer Kontamination ist groß und die heute zur Verfügung stehenden Zellkultursubstrate, auf denen die Zellen wachsen, reichen für eine lang andauernde Kultivierung meist nicht aus. Die Zellen sterben oder schwimmen ab. Ein 3D-Kultursystem kann dem entgegenwirken. Choi und Kollegen differenzierten in einem basalmembranartigen Matrix-basierten System AD-abgeleitete Neurone und konnten AD-spezifisches Krankheitsmerkmale aufzeigen. Die Neurone wiesen Aggregate des Tau-Proteins auf und in der umliegenden Matrix konnten  $\beta$ -Amyloid-Plaques detektiert werden (Choi *et al*, 2014).

Neben der Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum, kann der Alterungsprozess in den Zellen auch aktiv beschleunigt werden. Reaktive Sauerstoffverbindungen lösen in Zellen Stress aus, was wiederum mit Altern assoziiert wird. Demzufolge kann der Einsatz von oxidativen Stressfaktoren, wie Rotenon oder Wasserstoffperoxid, einen altersbedingten Phänotyp *in vitro* induzieren. Nguyen und Kollegen generierten iPCS-abgeleitete dopaminerige Neurone von Patienten, die an sporadischer PD litten (Nguyen *et al*, 2011). Bei PD kommt es zum Absterben dieser Zellen in der *Substantia nigra* und es entstehen Proteinaggregate aus  $\alpha$ -Synuclein.

Nguyen *et al* kultivierten krankheitsspezifische dopaminerige Neurone mit Wasserstoffperoxid und stellten eine sensitivere Reaktion dieser Neurone im Vergleich zu den Kontrollzellen fest. Die Zellen reagierten mit Aktivierung der Caspase-3 und einem darauffolgenden Zelltod. Auch Progerin, eine verkürzte Form von Lamin A, verursacht ein vorzeitiges Altern im Menschen. Eine Studie demonstrierte durch die Expression dieses Proteins in iPSC-abgeleiteten Fibroblasten und Neurone charakteristische Altersmerkmale, wie die Kürzung der Telomere und eine Verminderung der Zellteilungen (Miller *et al*, 2013). Zusätzlich konnte in PD-spezifischen dopaminerigen Neuronen durch die Progerin-Expression ein altersbedingter Phänotyp demonstriert werden. Die Neuriten der Neurone waren degeneriert und die Mitochondrien vergrößert (Miller *et al*, 2013). Darüber hinaus kann der Phänotyp einer neurodegenerativen Krankheit *in vitro* auch durch eine Glutamat-induzierte neuronale Aktivität ausgelöst werden. Koch und Kollegen setzten Neurone von SCA3-Patienten hohen extrazellulären Konzentrationen an Glutamat aus. Das führte in den Zellen zur Aggregation des Ataxin3-Proteins und spiegelte so den krankheitsrelevanten Phänotyp wider (Koch *et al*, 2011).

### Generierung von *in vitro*-Modellen durch *Gene Editing*

Viele genetisch bedingte neurodegenerative Erkrankungen kommen sehr selten vor. Das stellt für die Generierung eines krankheitsspezifischen Zellkulturmodells eine weitere Herausforderung dar. Es gibt wenige Patienten, denen eine Gewebeprobe entnommen werden kann und der Wissenschaft steht somit wenig Zellmaterial zur Verfügung. Einen Lösungsweg bietet das sogenannte *Gene Editing*, bei dem ein Gendefekt artifiziell in die Zellen eingebracht wird. Durch die homologe Rekombination wird das mutierte Gen mittels viralen Vektoren in das Genom der Zellen eingefügt. Die zielgerichtete Induktion von Doppelstrangbrüchen mittels Zinkfingernukleasen (Hockemeyer *et al*, 2009), TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*; Hockemeyer *et al*, 2011; Miller *et al*, 2011) oder CRISPR–Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated* 9; Cong *et al*, 2013; Fu *et al*, 2013; Mali *et al*, 2013; Ran *et al*, 2013) kann die Effizienz des *Gene Editing* deutlich erhöhen. Umgekehrt können mit dieser Methode auch Gendefekte in patientenspezifischen Zellen eliminiert werden. Dabei wird der mutierte Bereich des Gens durch eine gesunde Sequenz ersetzt. So konnten bereits isogene Zelllinien von verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen generiert werden (Corti *et al*, 2012; An *et al*, 2012; Ryan *et al*, 2013; Soldner *et al*, 2011; Reinhardt *et al*, 2013b; Sanders

*et al*, 2014). Diese Linien haben den Vorteil, dass das Genom, bis auf den Gendefekt, identisch ist und sich so linienspezifische Unterschiede minimieren lassen und krankheitsspezifische Charakteristika genau studiert werden können.

### **1.3.2 iPSC-basierte Therapieansätze zur Behandlung neurologischer Erkrankungen**

Viele neurologische Erkrankungen gehen mit dem Verlust von Nervenzellen einher. Dazu gehören neben den neurodegenerativen Erkrankungen auch traumatische Hirn- und Rückenmarksverletzungen. Dabei kann sich das abgestorbene Nervengewebe nicht regenerieren, und es kommt zu irreversiblen Schäden. Ein therapeutischer Ansatz ist, das geschädigte Gewebe durch neues zu ersetzen, wobei die Herausforderung sowohl in einem strukturellen als auch in einem funktionellen Zellersatz liegt. Nicht nur das zerstörte Gewebe muss an der richtigen Stelle erneuert werden, sondern die transplantierten Zellen müssen in das Empfängergewebe migrieren, sich integrieren und die entsprechenden Funktionen aufnehmen. Es ist wichtig, dass der richtige Zelltyp transplantiert wird, der idealerweise keinen Krebs auslöst und vom Empfänger nicht abgestoßen wird. Bevor zellbasierte Therapien im Menschen Anwendung finden, müssen diese zuvor präklinisch in entsprechenden Tiermodellen evaluiert werden.

Die Entwicklung der iPSC-Technologie hat die regenerative Medizin vorangebracht. Wo zuvor ESC-basierte Therapieansätze studiert wurden, können heute patientenspezifische iPSCs als Grundlage dienen und neben einer unbegrenzten Quelle an pluripotenten Zellen eine Abstoßungsreaktion im Patienten vermeiden. Bei genetisch bedingten Krankheiten mit einem bekannten Gendefekt kann dieser mittels *Gene Editing* in den patientenspezifischen Zellen korrigiert werden und dem Patienten können die eigenen genetisch modifizierten Zellen transplantiert werden (Abb. 2). Der erste iPSC-basierte Therapieeinsatz auf dem Gebiet der neurodegenerativen Erkrankungen gelang Wernig und Kollegen. Sie generierten aus reprogrammierten murinen Fibroblasten dopaminerige Neurone, da diese vornehmlich in der PD betroffen sind, und transplantierten die Zellen in PD-Modellratten (Wernig *et al*, 2008). Die Tiere zeigten eine Verbesserung in den motorischen Tests. Es folgten weitere Studien, in denen gesunde humane iPSCs in neurale Zellen differenziert und in verschiedene PD-Tiermodelle transplantiert wurden (Han *et al*, 2015; Doi *et al*, 2014; Rhee *et al*, 2011; Kikuchi *et al*, 2011). Auch hier differenzierten die transplantierten Zellen in dopaminerige Neurone und führten zu einer Verbesserung der motorischen Fähigkeiten in den Tieren. Ein weiteres Beispiel für einen iPSC-basierten Therapie-

ansatz einer neurodegenerativen Erkrankungen stellten Nizzardo *et al* vor. Sie forschen an der Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Bei dieser Krankheit kommt es im Patienten zu einem Verlust der oberen und unteren Motoneuronen, was schließlich zu Lähmungen und einem frühzeitigem Tod führt. Nizzardo *et al* transplantierten gesunde hiPSC-abgeleitete neurale Stammzellen in ein ALS-Mausmodell (Nizzardo *et al*, 2014). Nach der Transplantation konnten in den Mäusen die motorischen Störungen vermindert und die Lebenserwartung der Tiere erhöht werden.

Eine erste klinische Studie für einen iPSC-basierten Therapieansatz beschreibt das *Moorfields Eye Hospital* in England (Clinical Trial NCT02464956, 2016). Von Patienten, die an der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) leiden, sollen iPSC-abgeleitete Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) generiert werden. Das Ziel ist es, die Sicherheit und Effizienz der Methode zu überprüfen. Möglicherweise können die Zellen für Transplantationen zur Behandlung der AMD herangezogen werden. Bei der AMD sterben mit zunehmendem Alter die RPE-Zellen ab. Das kann zu einer Beeinträchtigung der Sehfähigkeit und schließlich zum Erblinden führen. Eine Transplantation der patientenspezifischen RPE-Zellen soll den Krankheitsverlauf verlangsamen oder sogar aufhalten können.

Dennoch birgt die therapeutische Verwendung von hiPSCs weiterhin das Risiko der Tumorigenität. Außerdem dauern sowohl der Prozess der Reprogrammierung an sich als auch die Differenzierung in entsprechende somatische Zelltypen sehr lange. Das kann zu genetischen und epigenetischen Veränderungen in den Zellen führen (Pera, 2011; Hussein *et al*, 2011; Gore *et al*, 2011; Lister *et al*, 2011). Um dem entgegenzuwirken, kann dieser Prozess verkürzt werden. Bei der direkten Konversion wird das pluripotente Stadium umgangen und leicht zugängliche somatische Zellen direkt in den präferierten Zelltypen transdifferenziert. Bei neuralen Zellen gelang zum ersten Mal 2010 die Induktion funktioneller Neurone (induzierte Neurone, iN) aus murinen Fibroblasten durch die ektopische Expression der Transkriptionsfaktoren *achaete-scute complex homolog* (Ascl) 1, Brn2 (Pou3f2) und *myelintranscription factor 1 like* (Myt1l) (Vierbuchen *et al*, 2010). Durch die Zugabe eines vierten Faktors, *neurogenic differentiation 1* (NeuroD1), gelang derselben Forschungsgruppe kurz darauf die Generierung von iNs aus humanen Fibroblasten (Pang *et al*, 2011). Yoo und Kollegen zeigten im selben Jahr mit Hilfe der microRNAs miR-9/9\* und miR-124 die direkte Konversion von humanen Fibroblasten in iNs (Yoo *et al*, 2011). Ladewig *et al* demonstrierten durch den Einsatz von Faktoren, die eine

neurale Differenzierung begünstigen, wie Inhibitoren des SMAD-Signalwegs oder der Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , eine gesteigerte Effizienz der Transdifferenzierung (Ladewig *et al*, 2012). Schließlich konnten auch tripotente neurale Vorläufer- bzw. Stammzellen (Lujan *et al*, 2012; Thier *et al*, 2012) sowie oligodendrogliale Vorläuferzellen (Najm *et al*, 2013; Yang *et al*, 2013; Kim *et al*, 2015) aus murinen Fibroblasten transdifferenziert werden.

### **1.3.3 iPSC-basierte *in vitro*-Modelle für Wirkstoffscreenings zur Behandlung von neurologischen Erkrankungen**

Neben der Untersuchung von Krankheitsaspekten auf zellulärer Ebene eignet sich ein iPSC-basiertes Zellkulturmodell auch für Toxizitätsstudien und Wirkstoffscreenings im Kontext einer präklinischen Arzneimittelentwicklung. Lange wurden hierfür Tiermodelle und daraus gewonnene primäre Zellen verwendet. Diese spiegeln aber nicht exakt die humanen physiologischen Gegebenheiten und die damit verbundenen phänotypischen Eigenschaften wider. Das kann dazu führen, dass bestimmte Substanzen unterschiedliche Effekte in den verschiedenen Spezies hervorrufen. Zum Beispiel führte die Gabe von Vitamin E oder Kreatin in einem transgenen Mausmodell für ALS zu einer Verbesserung der motorischen Fähigkeiten und einer verlängerten Lebenserwartung der Tiere. Im Menschen war dagegen keine deutliche Besserung zu erkennen (Desnuelle *et al*, 2001; Groeneveld *et al*, 2003; Shefner *et al*, 2004; Gurney *et al*, 1996). Um solche speziesspezifischen Unterschiede besser verifizieren zu können, können iPSC-basierte Zellkultursysteme herangezogen werden. Es können Zeit und Geld gespart sowie klinische Studien schneller in die Wege geleitet werden (zusammengefasst nach Singh *et al*, 2015).

Bei neurodegenerativen Erkrankungen haben schon viele Arbeitsgruppen Nutzen aus iPSC-abgeleiteten Krankheitsmodellen gezogen und Wirkstoffe gefunden, die den krankheitsrelevanten Phänotyp verbessern konnten. Beispielsweise zeigten Ebert und Kollegen 2009 in einem iPSC-basierten Modell für die SMA, dass im Vergleich zu gesunden Motoneuronen in SMA-abgeleiteten Zellen, die einen reduzierten Proteingehalt von SMN aufwiesen, die Verabreichung der Substanzen VPA und Tobramycin zu einem Anstieg des Proteinlevels von SMN führte (Ebert *et al*, 2009). In einer weiteren Studie zur Familiären Dysautonomie (FD) konnten die Wissenschaftler durch bereits bekannte Substanzen sowie durch ein großangelegtes Wirkstoffscreening zwei Substanzen ausfindig machen, die einen positiven Effekt zeigten (Lee *et al*, 2009, 2012). Das Pflanzenhormon Kinetin und der  $\alpha_2$ -Andrenozeptor-Antagonist SKF-86466 verbesserten beide die neuronale

Differenzierung und das Migrationsverhalten der FD-spezifischen Zellen. Für die Adrenoleukodystrophie (ALD) wurden auch iPSC-abgeleitete Zellen herangezogen, um Wirkstoffe ausfindig zu machen. Die ALD resultiert aus einer Mutation im *ABCD1* (*adenosine triphosphate [ATP]-binding-cassette transporter superfamily D member 1*)-Gen. Das führt unter anderem zu Anhäufungen von Fettsäuren in Oligodendrozyten, die dadurch ihr Myelinisierungspotential verlieren. Jang *et al* generierten ALD-spezifische Oligodendrozyten, in denen sie Akkumulationen dieser Fettsäuren detektieren konnten. Durch Behandlung der Zellen mit den Arzneistoffen Lovastatin oder Natriumphenylbutyrat konnte eine Reduktion der Fettsäuren erreicht werden (Jang *et al*, 2011). Auch für weitere neurodegenerative Erkrankungen, wie der AD oder der ALS wurden Wirkstoffe entdeckt, die einen positiven Effekt auf das krankheits-spezifische Erscheinungsbild in den entsprechenden iPSC-basierten Zellkultursystemen zeigten (AD: Israel *et al*, 2012; Kondo *et al*, 2013; Mertens *et al*, 2013; Yagi *et al*, 2011; Yahata *et al*, 2011; ALS: Burkhardt *et al*, 2013; Egawa *et al*, 2012).

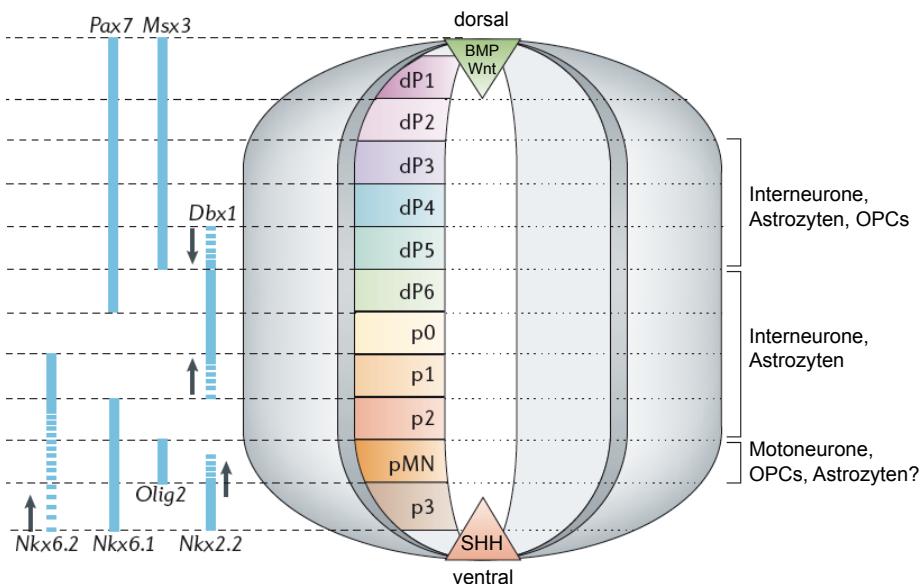
### 1.4 Oligodendrozyten

Das zentrale Nervensystem (ZNS) von Säugetieren besteht aus Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten sowie aus Mikrogliazellen, Ependymzellen und Blutgefäßen. Die Oligodendrozyten sind die myelinbildenden Zellen und vorwiegend in der weißen Substanz des Gehirns zu finden. Ihre Hauptfunktion ist die Bildung der Myelinmembranen. Diese dienen der elektrischen Isolierung der Axone von Neuronen und gewährleisten eine schnelle und exakte Reizweiterleitung. Neben der Myelinmembran ist die Plasmamembran der Oligodendrozyten wichtig für die Biogenese, Sortierung und den Transport von Komponenten der Myelinmembran.

#### 1.4.1 Entstehung der Oligodendrozyten

Während der Embryonalentwicklung entstehen die Oligodendrozytenvorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*, OPC) zu unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Bereichen des Nervensystems (Richardson *et al*, 2006). Da der Zugang zu humanem fetalem Gewebe limitiert ist, beruhen die Erkenntnisse der Oligodendrozytenentwicklung hauptsächlich auf Studien in Nagetieren. Dabei ist die Entstehung der OPCs im Rückenmark am besten erforscht. Der Großteil dieser OPCs (85-90 %) entsteht im ventralen Bereich des sich entwickelnden Rückenmarks in einer spezialisierten Domäne, der Motoneurondomäne (pMN-Domäne, Richardson

et al, 2006). Diese Domäne formt sich mit anderen neuralen Vorläuferdomänen in dorso-ventraler Orientierung unter Einfluss eines gegenläufigen Gradienten von ventral sezerniertem *sonic hedgehog* (SHH) und dorsal wirkenden *bone morphogenetic proteins* (BMP) und Wnt (*Wingless/Integrated*)-Proteinen (Wilson & Maden, 2005). Die Domänen sind durch die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren charakterisiert und bringen unterschiedliche Zelltypen hervor (Briscoe et al, 2000; Richardson et al, 2006; Abb. 3).



**Abb. 3: Neurale Vorläuferdomänen im embryonalen Rückenmark.**

Während der Embryogenese entstehen im Rückenmark unter Einfluss eines gegenläufigen Gradienten von SHH (*sonic hedgehog*) und BMPs (*bone morphogenetic proteins*) in Kombination mit Wnt-Proteinen neurale Vorläuferdomänen in dorso-ventraler Orientierung. Die Neurone werden vor den Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*; OPC)) generiert. Grundsätzlich bilden sich OPCs vor Astrozyten und ventrale vor dorsalen Zellen. In der Grafik wird deutlich, dass jede Vorläuferdomäne durch die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. OPCs entstehen nach der Entwicklung von Motoneuronen durch einen Neuron-zu-Glia Wechsel aus der pMN-Domäne. Danach entwickeln sich OPCs auch in den dorsalen Bereichen des Rückenmarks. Modifiziert nach Richardson et al, 2006.

Die Vorläuferzellen der pMN-Domäne sind durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Nkx6-* (Qiu et al, 1998; Briscoe et al, 2000) und *oligodendrocyte transcription factor 2* (*Olig2*) gekennzeichnet (Abb. 3; Mizuguchi et al, 2001; Novitch et al, 2001). Es entstehen zuerst Motoneurone und anschließend nach einem Neuron-zu-Glia Wechsel die OPCs (Richardson et al, 1997; Sun et al, 1998; Zhou & Anderson, 2002). In einer späteren Phase der Embryogenese entwickeln sich zusätzlich OPCs, unabhängig von *Nkx6* und SHH in den dorsalen Bereichen des Rückenmarks. Sie machen hier den kleineren Anteil (10-15 %) der OPC-Population aus (Cai et al, 2005; Fogarty et al, 2005; Vallstedt et al, 2005; Zhu et al, 2011). Weitere OPCs entstehen im Vorderhirn zu zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten in

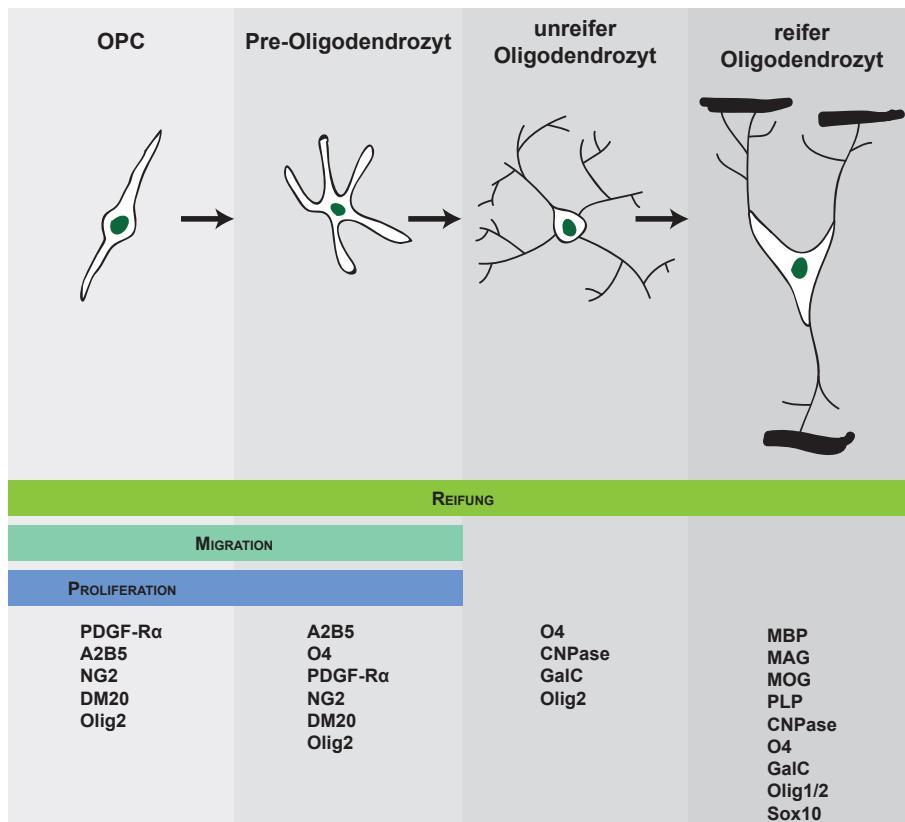
verschiedenen Bereichen des ventralen Telencephalon. Von hier aus bevölkern sie das gesamte embryonale Telencephalon und den cerebralen Cortex. Später bilden sich zusätzlich OPCs im postnatalen Cortex (Kessaris *et al*, 2006).

Während die Proliferation und Migration von Neuronen hauptsächlich pränatal stattfinden, sind die Proliferation und Migration von glialen Zellen weitestgehend postnatale Prozesse. Vor allem die Differenzierung und Reifung der Zellen findet nach der Geburt statt. In Nagern laufen die Entstehung der OPCs und deren Migration und Reifung innerhalb von wenigen Wochen ab. Im Menschen dauern diese Prozesse gemäß deren Entwicklung länger, sind aber in den Grundzügen miteinander vergleichbar. Die ersten OPCs erscheinen im Nager an Embryonaltag 9 und im Menschen in der 10 Schwangerschaftswoche (SW). Deren Ausreifung findet bei Nagetieren weitestgehend postnatal statt, beim Menschen beginnt sie noch pränatal in der 18 SW. Erste *myelin basic protein* (MBP)-positive Zellen und damit reife Oligodendrozyten sind beim Menschen während der Schwangerschaft zwischen der 28-40 SW zu beobachten, im Nager erst eine Woche nach der Geburt. Während in den Nagetieren die Myelinisierung nach wenigen Wochen vollständig abgeschlossen ist, dauert diese beim Menschen sogar bis ins Jugendalter an (zusammengefasst nach Barateiro & Fernandes, 2014)

### 1.4.2 Entwicklung der Oligodendrozyten

Die entstandenen OPCs besitzen ein sehr großes Migrationspotential und wandern von ihren Entstehungsorten in die Faserstrukturen des ZNS. Dort vermehren sie sich und reifen schließlich zu myelinisierenden Oligodendrozyten aus (Ono *et al*, 2001). Während dieser Entwicklung passieren die Zellen gewisse Stadien, wobei jedes Stadium durch bestimmte morphologische Eigenschaften, dem Proliferations- und Migrationsverhalten sowie dem Myelinisierungspotential und einem spezifischen Expressionsmuster charakterisiert ist (Abb. 4).

OPCs haben eine bipolare Morphologie, sie proliferieren und sind migratorisch aktiv (Abb. 4). Die typischen Marker in dieser Phase sind der *platelet-derived growth factor receptor alpha* (PDGFR $\alpha$ ; Pringle *et al*, 1992) und das Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan CSPG4/NG2 (NG2; Nishiyama *et al*, 1999; Polito & Reynolds, 2005), die auf der Oberfläche der OPCs detektiert werden können. Der Transkriptionsfaktor *Olig2* als frühester oligodendrozytenspezifischer Marker ist ein weiteres wichtiges charakteristisches Merkmal (Lu *et al*, 2000; Zhou *et al*, 2000).



**Abb. 4: Die Entwicklung von Oligodendrozyten.**

Die Entwicklung der Oligodendrozyten kann in vier verschiedene Stadien unterteilt werden. Zuerst entstehen bipolare OPCs, die vorwiegend PDGFR $\alpha$ , NG2 und Olig2 exprimieren. Pre-Oligodendrozyten bilden bereits mehrere Ausläufer aus und zeigen zusätzlich eine Expression von O4. Während der Differenzierung zu unreifen Oligodendrozyten erhöht sich der Verzweigungsgrad der Zellen und sie exprimieren CNPase und GalC. Final bilden die Oligodendrozyten reich verzweigte Fortsätze und Myelinmembranen aus. Sie exprimieren die Myelinproteine MBP, MAG, MOG und PLP sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Sox10. Bild von Julia Fischer, modifiziert nach Buchet & Baron-Van Evercooren, 2009.

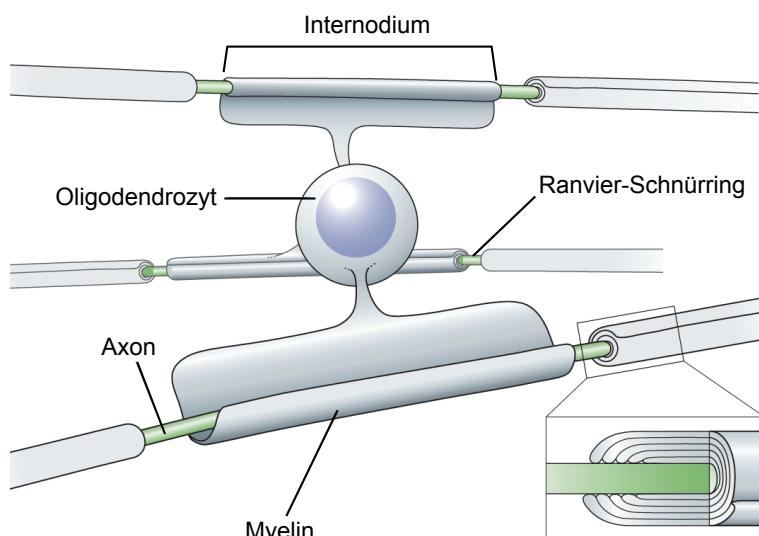
Pre-Oligodendrozyten exprimieren neben NG2 zusätzlich das Glykolipid Sulfatid O4 auf der Zelloberfläche (Berg & Schachner, 1981; Sommer & Schachner, 1981). In der weiteren Entwicklung verlassen die noch unreifen, nicht-myelinisierenden Oligodendrozyten das proliferative Stadium und beginnen langsam auszureifen. Die Komplexität der Zellmorphologie nimmt zu und sie bilden multiple Fortsätze aus. In diesem Stadium ist die Expression der 2',3'-cyclischen Nukleotid-3' Phosphodiesterase (CNPase; Buchet & Baron-Van Evercooren, 2009; Zhang, 2001) und der Galactocerebrosidase (GalC; Ranscht *et al*, 1982) typisch. Reife und myelinisierende Oligodendrozyten haben reich verzweigte Fortsätze ausgebildet und exprimieren verschiedene Myelinproteine, z. B. das *proteolipid protein* (PLP) oder MBP (zusammengefasst nach Buchet & Baron-Van Evercooren, 2009).

Auf molekularer Ebene wird die Oligodendrozytenspezifierung und -differenzierung durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie *Olig1/2*, *Nkx2.2*, *Sox9* und *Sox10* reguliert (Rowitch, 2004; Richardson *et al*, 2006). Viele Studien haben gezeigt, dass

*Olig1* und *Olig2* besonders wichtig für die Spezifizierung der Oligodendrozyten sind (Lu *et al*, 2000, 2002; Zhou *et al*, 2000; Takebayashi *et al*, 2002). Die Expression der Transkriptionsfaktoren *Sox10* und *Nkx2.2* spielt während der terminalen Differenzierung und Myelinisierung der Oligodendrozyten eine wichtige Rolle (Stolt *et al*, 2002; Qi *et al*, 2001). Neben den intrinsischen Faktoren gibt es auch Komponenten, die von außen auf den Prozess der Oligodendrozytdifferenzierung einwirken. PDGF-AA, ein Homodimer des PDGFs, wirkt positiv auf die Proliferation der OPCs (Noble *et al*, 1988; Richardson *et al*, 1988; Wilson *et al*, 2003). Zusätzlich wirken Trijod-L-Thyronin (T3) und Retinsäure (*retinoic acid*, RA) stimulierend auf die Differenzierung der OPCs (Barres *et al*, 1994; Huang *et al*, 2011).

#### 1.4.3 Aufbau und Funktion von Myelin

Im ZNS wird das Myelin von den Oligodendrozyten gebildet und besteht aus mehreren Lagen von Membranen. Ein Oligodendrozyt kann mehrere Axone ummanteln. Die Ummantelung ist in Segmente kompakten Myelins, den sogenannten Internodien, und in kurze freiliegende Bereiche des Axons, den Ranvier-Schnürringen, unterteilt (Abb. 5).



**Abb. 5: Myelinisierung im ZNS.**

Der Oligodendrozyt bildet mehrlagige Myelinmembranen aus und ummantelt damit mehrere Axone von Neuronen. Dabei entstehen kompakte Myelinsegmente (Internodien), die durch myelinfreie Bereiche, den Ranvier-Schnürringen, unterteilt werden. In den Schnürringen befinden sich Ionenkanäle, die eine saltatorische Reizweiterleitung ermöglichen. Modifiziert nach Popko, 2003.

Reifes Myelin besteht zu 70 % aus Glykolipiden, wobei Galactosylceramid und das sulfatierte Derivat Sulfatid den Hauptanteil ausmachen. Der Rest besteht aus Proteinen. MBP und PLP machen dabei 80 % der Gesamtproteine aus. Die Lipide und Proteine werden größtenteils in den Zellkompartimenten des Oligodendrozyten

gebildet und schließlich zur Membran transportiert. MBP ist eine Ausnahme und wird in der Myelinmembran synthetisiert. Die Myelinmembranen sind sehr stabil und die Metabolisierung der Komponenten dauert Wochen bis Monate (Saher & Simons, 2010). In den Ranvier-Schnürringen befinden sich spannungsabhängige Ionenkanäle. Das ermöglicht die saltatorische Reizweiterleitung, eine sprunghafte Weiterleitung der Reize von Schnürring zu Schnürring, die dadurch um ein 100-faches erhöht wird. Neben der elektrischen Isolierung modulieren die Oligodendrozyten durch die Myelinisierung auch Reifung, Überleben und Regenerationsfähigkeit von Axonen. Eine Fehlfunktion oder Verlust von Myelin kann zu einer axonalen und neuronalen Degeneration führen (zusammengefasst nach Paz Soldán & Pirko, 2012).

### 1.4.4 Differenzierung von humanen Oligodendrozyten *in vitro*

Aufgrund einer Vielzahl von neurologischen Erkrankungen, die mit dem Verlust oder der Schädigung von Myelin einhergehen, ist das Interesse sehr groß, humane Oligodendrozyten *in vitro* zu generieren. Das ermöglicht unter pathologischen Bedingungen, molekulare Mechanismen in den Zellen zu untersuchen sowie potentielle Zellen für eine Ersatztherapie zur Verfügung stehen zu haben.

Eine Quelle für humane oligodendrogliale Zellen stellt das humane Nervengewebe selbst dar. Das ist allerdings schwer zugänglich und es muss auf abgetriebene Föten zurückgegriffen werden. Verschiedene Arbeitsgruppen gelang eine erfolgreiche Isolierung der humanen fetalen oligodendroglialen Zellen und deren Differenzierung in reifere Zellstadien (Monaco *et al*, 2012; Cui *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2000). Dennoch wurden alternative Differenzierungsprotokolle generiert, welche die Gewinnung von oligodendroglialen Zellen aus humanen ESCs ermöglichen und die Verwendung von humanen Föten vermieden. Die Grundlage für diese Protokolle waren Studien an murinen ESCs, die nicht nur eine Differenzierung in Oligodendrozyten, sondern auch erste Transplantationsexperimente dieser Zellen in das Gehirn und Rückenmark von Mäusen demonstrierten (Glaser *et al*, 2005; Liu *et al*, 2000; Brüstle *et al*, 1999; Zhang *et al*, 2006). 2005 stellten Nistor und Kollegen die ersten aus humanen ESCs gewonnenen Oligodendrozyten vor (Nistor *et al*, 2005). Sie nutzten unabhängig von SHH ein RA-basiertes Protokoll mit Unterstützung von Insulin, T3 und *fibroblast growth factor* (FGF). Die Funktionalität der Zellen wurde *in vivo* in adulten Ratten mit Rückenmarksverletzungen demonstriert (Keirstead *et al*, 2005). Sieben Tage nach der Verletzung wurden hESC-abgeleitete OPCs in das Rückenmark transplantiert. Die OPCs differenzierten in Oligodendrozyten,

remyelinisierten das geschädigte Gewebe und führten so zu einer Verbesserung der motorischen Fähigkeiten der Tiere. Es folgten weitere Differenzierungsprotokolle an hESCs, die auf die verschiedenen entwicklungsbiologischen Aspekte der embryonalen und postnatalen Oligodendrogenese zurückgriffen. Dazu gehörte die Expression der für die Entstehung von Oligodendrozyten wichtigen Transkriptionsfaktoren, wie *Nkx2.2*, *Olig2* und *Sox10* (Stacpoole *et al*, 2013; Sundberg *et al*, 2011) sowie die Antagonisierung von BMPs, wie z. B. durch Noggin (Izrael *et al*, 2007) oder die Spezifizierung der Zellen in Abhängigkeit von SHH (Hu *et al*, 2009; Stacpoole *et al*, 2013; Sundberg *et al*, 2011). Nachdem 2006 die Generierung von iPSCs beschrieben wurde, wurden auch diese Zellen herangezogen, um funktionelle Oligodendrozyten zu differenzieren (Ogawa *et al*, 2011b; Pouya *et al*, 2011; Czepiel *et al*, 2011; Piao *et al*, 2015; Wang *et al*, 2013), wobei die Ergebnisse stark variierten. Wang und Kollegen, deren Differenzierung auf den Arbeiten von Izrael *et al* und Hu *et al* basierte, konnten nach ca. 150 Tagen Oligodendrozyten mit einer Effizienz von 79 % bilden und deren Funktionalität *in vivo* in myelindefizienten Mäusen bestätigen (Wang *et al*, 2013). Vor kurzem wurden auch Oligodendrozyten aus patientenspezifischen iPSCs generiert (Douvaras *et al*, 2014; Numasawa-Kuroiwa *et al*, 2014; Jang *et al*, 2011). Zum Beispiel differenzierten Douvaras *et al* Multiple Sklerose (MS)-spezifische Oligodendrozyten. Sie konnten zwar ein Myelinisierungspotential der Zellen *in vivo* zeigen, aber keine krankheitsspezifischen Merkmale aufdecken. Die oben erwähnten Protokolle für die Differenzierung von humanen ESC- und iPSC-abgeleiteten Oligodendrozyten sind technisch sehr anspruchsvoll und zeitintensiv (Nistor *et al*, 2005; Izrael *et al*, 2007; Hu *et al*, 2009; Kang *et al*, 2007; Sundberg *et al*, 2011; Stacpoole *et al*, 2013; Jang *et al*, 2011; Ogawa *et al*, 2011b; Pouya *et al*, 2011; Czepiel *et al*, 2011; Wang *et al*, 2013; Piao *et al*, 2015). Als Ausgangszellpopulation dienten immer pluripotente Stammzellen, die auf einem direkten Differenzierungsweg in Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen differenziert wurden. Die langen Differenzierungsphasen (> 100 Tage) können zu einer hohen Variabilität in den Ergebnissen verschiedener Ansätze führen. Eine Population von neuralen Stammzellen als stabiler Zwischenschritt kann dem vorbeugen und aufgrund der Fähigkeit dieser Zellen, sich selbst zu erneuern, als konstante Ausgangszellpopulation für die Generierung der Oligodendrozyten dienen. Es wurden bereits neurale Stammzellpopulationen beschrieben, die aber wenig bis gar nicht in Oligodendrozyten differenziert werden konnten (Chambers *et al*, 2012; Elkabetz *et al*, 2008; Falk *et al*, 2012; Koch *et al*, 2009; Lee *et al*, 2010; Li *et al*, 2011; Reinhardt *et al*, 2013a). Ein in

unserem Labor kürzlich etabliertes Protokoll beschreibt die Generierung einer stabilen Zellpopulation von radialgliaähnlichen neuralen Vorläuferzellen (*radial glial-like*, RGL; *neural precursor cells*, NPC; RGL-NPC; Gorris *et al*, 2015). Verschiedene vorangegangene Studien zeigten bereits, dass sowohl aus murinen als auch aus humanen radialen Gliazellen (RG-Zellen) Oligodendrozyten entstehen können (Fogarty *et al*, 2005; Ganat *et al*, 2006; Sun *et al*, 2008; Mo & Zecevic, 2009; Casper & McCarthy, 2006). Die RGL-NPCs sollen somit vorwiegend als effiziente Quelle für humane Oligodendrozyten dienen. Während der Embryogenese entstehen RG-Zellen im sich entwickelnden ZNS durch asymmetrische Zellteilung aus neuroepithelialen Zellen. Die RG-Zellen stellen sowohl in der Gliogenese als auch in der Neurogenese eine wichtige Vorläuferzellpopulation dar (Barry *et al*, 2014). Typische Merkmale für diese Zellen sind neben der Expression von *brain lipid-binding protein* (BLBP) und dem Glutamat-Aspartat Transporter (GLAST) (Morest & Silver, 2003), zytoplasmatische Glycogengranulate (Gadisseux & Evrard, 1985) sowie die Expression des für neurale Stammzellen wichtigen Faktors *Nestin* (Hartfuss *et al*, 2001). Sie haben eine längliche bipolare Morphologie und multipotente Differenzierungseigenschaften (Barry *et al*, 2014). Die in Gorris *et al* beschriebenen RGL-NPCs spiegelten viele dieser Merkmale wider und erhielten folglich den Namen einer radialgliaähnlichen neuralen Vorläuferzellpopulation. Sie können in einem Embryoidkörper (*embryonic body*, EB)-basierten Protokoll sowohl von humanen ESCs als auch von iPSCs generiert werden. EBs sind Aggregate aus Stammzellen, die entstehen, wenn die pluripotenten Zellkolonien ohne Kontakt zu einer Oberfläche kultiviert werden. Nach ihrer Entstehung enthalten die EBs alle Zellen der drei Keimblätter (Keller, 1995). Im Differenzierungsprotokoll nach Gorris *et al* wird die neurale Differenzierung der ektodermalen Zellen durch die Zugabe von Retinsäure (*all-trans retinoic acid*, ATRA) angeregt. Nach 4 Wochen werden die EBs plattiert und aus den auszuwachsenden Zellen werden die RGL-NPCs mit Hilfe einer Immunselektion nach CD133 angereichert. CD133 ist ein Stammzellmarker, mit dem bereits Stammzellen aus humanen Gehirngewebe gewonnen werden konnten (Tamaki *et al*, 2002; Uchida *et al*, 2000). Die isolierten RGL-NPCs wachsen adhärent und sind über mehrere Wochen stabil proliferativ. Sie können expandiert und kryokonserviert werden. Unter Entzug von Wachstumsfaktoren und der Zugabe entsprechender Faktoren können sie in Neurone, Astrozyten und besonders in Oligodendrozyten differenziert werden. Damit bestätigen sie ihr tripotentes Differenzierungsvermögen. Aufgrund ihres starken oligodendroglialen

Differenzierungspotentials können die RGL-NPCs herangezogen werden, um oligodendrozyten- und krankheitsspezifische Mechanismen zu untersuchen. Darüber hinaus können sie für einen möglichen Zellersatz in der regenerativen Medizin eingesetzt werden.

### **1.4.5 Die Funktionalität von *in vitro* generierten humanen Oligodendrozyten *in vivo***

Eine Schädigung oder der Verlust von Myelin können verschiedene Ursachen haben. Dazu gehören traumatische Verletzungen (z. B. im Rückenmark) sowie chronische (z. B. MS) und neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Metachromatische Leukodystrophie, Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit). In den meisten Fällen sind die myelinbildenden Zellen geschädigt und/oder sterben ab. Im weiteren Verlauf kann es zur Degeneration der Axone und schließlich zum Absterben der Neurone kommen. Zellersatztherapien können helfen, das geschädigte Gewebe wieder aufzubauen und freigelegte Axone mit Hilfe von intakten Oligodendrozyten zu remyelinisieren. Um diese Therapieansätze zu evaluieren und die Funktionalität der Oligodendrozyten zu überprüfen, können die Zellen in entsprechenden Tiermodellen untersucht werden. Die ersten Arbeiten wurden mit humanen embryonalen Gewebefragmenten bzw. Zellen durchgeführt (Gumpel *et al*, 1987; Brüstle *et al*, 1998; Seilhean *et al*, 1996). 1987 beschrieben Gumpel und Kollegen zum ersten Mal, dass transplantierte humane Zellen fähig sind, das ZNS von myelindefizienten Mäusen zu remyelinisieren (Gumpel *et al*, 1987). Sie verwendeten kleine Gehirnfragmente von humanen Fötten, die im ersten Trimester der Schwangerschaft abgetrieben wurden, und transplantierten diese in das Gehirn der Shiverer-Maus. In diesem Tiermodell kann aufgrund einer Deletion im *Mbp*-Gen kein kompaktes Myelin gebildet werden (Molineaux *et al*, 1986; Dupouey *et al*, 1979). Demzufolge ist diese Maus gut geeignet, um die Remyelinisierung von transplantierten Zellen *in vivo* zu studieren. In späteren Experimenten wurden die oligodendroglialen Zellen gezielt aus bereits gewonnenem humanen Gehirngewebe isoliert und anschließend in die Shiverer-Maus transplantiert (Windrem *et al*, 2004, 2008, 2014). Die Zellen integrierten erfolgreich in das Mausgewebe und reiften zu myelinbildenden Zellen aus. Die Lebensdauer der Tiere konnte teilweise durch die Remyelinisierung verlängert werden (Windrem *et al*, 2008, 2014). Trotzdem stellt der eingeschränkte Zugang zu humanem primären Nervengewebe einen Nachteil der vorgestellten Studien dar. Eine Alternative stellen *in vitro* generierte, von Stammzellen abgeleitete oligodendrogliale Zellen dar. Das erste Transplantationsexperiment wurde mit aus

murinen ESCs abgeleiteten Oligodendrozytenvorläuferzellen durchgeführt (Brüstle *et al*, 1999). Die Zellen wurden in myelindefiziente (MD) Ratten eingebracht. Im Gehirn der Tiere konnte anschließend eine Remyelinisierung beobachtet werden. Sechs Jahre später wurden zum ersten Mal humane ESC-abgeleitete OPCs in die Shiverer-Maus transplantiert. Auch hier konnte eine erfolgreiche Integration, Reifung und Myelinausbildung der eingebrachten Zellen demonstriert werden (Nistor *et al*, 2005). Neben weiteren Transplantationsstudien an ESC-abgeleiteten oligodendroglialen Zellen (Keirstead *et al*, 2005; Izrael *et al*, 2007; Hu *et al*, 2009; Sharp *et al*, 2010; Erceg *et al*, 2010; Kim *et al*, 2012) wurden mit Entwicklung der iPSC-Technologie auch iPSC-abgeleitete Zellen *in vivo* hinsichtlich ihrer Funktionalität Myelin auszubilden untersucht (Wang *et al*, 2013; Douvaras *et al*, 2014). Wang und Kollegen zeigten in ihrer Arbeit, dass die transplantierten hiPSC-abgeleiteten OPCs in die Shiverer-Maus nicht nur zu einer weitreichenden Myelinisierung, sondern auch zu einer deutlichen Verlängerungen der Lebenserwartung der Tiere führte (Wang *et al*, 2013).

Neben der Shiverer-Maus gibt es weitere Tiermodelle, um *in vivo*-Myelinisierung zu studieren. Dazu gehört die bereits erwähnte MD-Ratte. Durch eine Mutation im X-Chromosom-gekoppelten *Plp*-Gen kann bei den männlichen Trägern im Gehirn kein PLP gebildet werden, was zu einer Demyelinisierung führt (Csiza & de Lahunta, 1979; Simons & Riordan, 1990). In Tieren mit traumatischen Rückenmarksverletzungen oder in denen eine Demyelinisierung künstlich erzeugt wurde, kann auch eine Remyelinisierung durch die eingebrachten Zellen untersucht werden. Die Demyelinisierung kann artifiziell z. B. durch die Immunisierung mit Myelinproteinen (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; Steinman, 1999) oder durch die Verabreichung von Lysolecithin (Blakemore *et al*, 1977; Woodruff & Franklin, 1999) hervorgerufen werden.

### 1.5 Lysosomale Speichererkrankungen

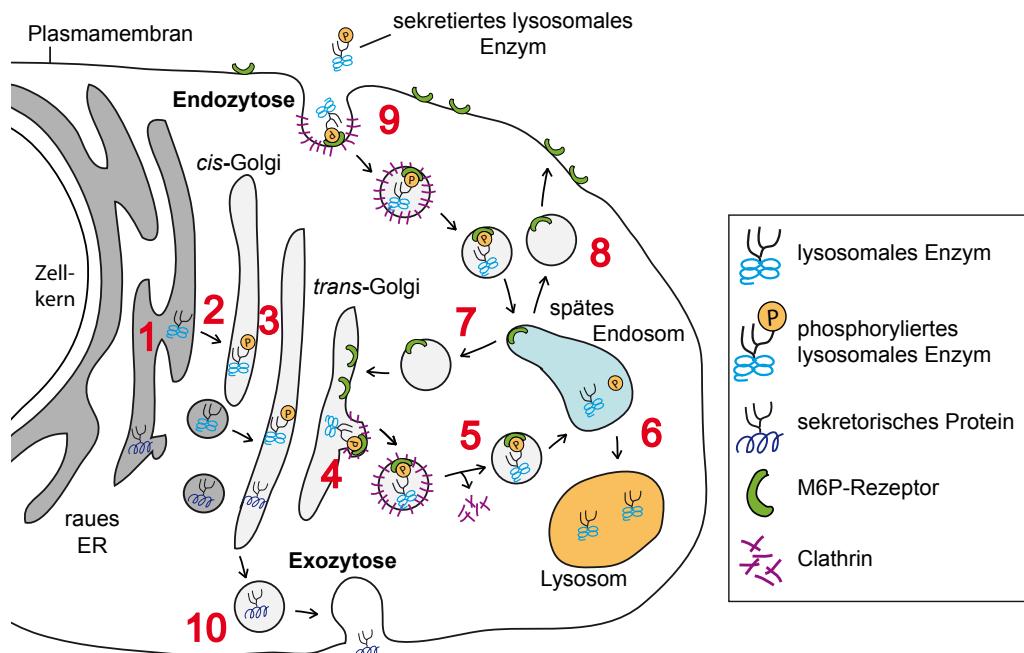
Lysosomale Speichererkrankungen umfassen eine Gruppe von mehr als 40 Stoffwechselkrankheiten. Sie werden meist durch einen Gendefekt verursacht, der wiederum zur einer Fehlfunktion von lysosomalen Enzymen, Membran- oder Transportproteinen führt (Futerman & van Meer, 2004). Dadurch wird der intrazelluläre Stoffwechsel gestört, was wiederum zu intralysosomalen Ablagerungen von verschiedenen Substraten, wie Sphingolipiden, Glykosaminoglykanen, Glycoproteinen und Glykogen, in verschiedenen Geweben und Organen führt. Der

entstehende Phänotyp einer lysosomalen Speicherkrankheit ist meist sehr komplex und betrifft mehrere Gewebe oder Organe (zusammengefasst nach Parenti *et al*, 2013).

### 1.5.1 Transport lysosomaler Enzyme

Lysosomen sind membranumgebene zytoplasmatische Organellen tierischer Zellen. Sie haben ein inneres saures pH-Optimum und ermöglichen den Abbau von Substraten in einer geschützten Umgebung. Lysosomen enthalten mehr als 50 lösliche saure Hydrolasen (z. B. Proteasen, Lipasen oder Sulfatasen) und mehr als 120 Membranproteine, die ständig neu ersetzt werden müssen (Bräulke & Bonifacino, 2009). Sie werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet, danach im Golgi-Apparat modifiziert und schließlich in Vesikel verpackt zum Endosom transportiert (Abb. 6; Bräulke & Bonifacino, 2009). Final werden die Proteine durch die vollständige Fusion von Endosom und Lysosom oder durch wiederholte transiente Fusionsprozesse zwischen den beiden Kompartimenten in das Lysosom übertragen (Pryor & Luzio, 2009). Der vesikuläre Transport der Proteine erfordert komplexe Sortierungssignale und Erkennungsproteine. Ein wichtiges Signal stellen die Mannose-6-Phosphat-(M6P)-Reste dar, die als lysosomales Lokalisierungssignal dienen und an M6P-spezifische Rezeptoren (MPR) binden können (Abb. 6; Bräulke & Bonifacino, 2009). Die MPRs befinden sich nicht nur in der Membran des Golgi-Apparats und der Endosomen, sondern auch in der äußeren Plasmamembran aller Säugetierzellen (Bräulke *et al*, 1987; Bräulke & Bonifacino, 2009). Somit ist es möglich, extrazelluläre lysosomale Enzyme, die an einen M6P-Rest gekoppelt sind, aufzunehmen und zu den Lysosomen zu transportieren (Abb. 6, Schritt 9). Zusätzlich entkommt während der Sortierung ein gewisser Anteil (5-20 %) der löslichen lysosomalen Enzyme und wird aus den Zellen in den Extrazellulärraum sezerniert (Abb. 6; Schritt 10; Chao *et al*, 1990; Bräulke & Bonifacino, 2009). Diese Prozesse ermöglichen den Vorgang der sogenannten Kreuzkorrektur. Exogen verabreichtes oder von einer benachbarten Zelle sekretiertes lysosomales Enzym kann von einer anderen Zelle über die M6P-Rezeptoren aufgenommen, zum Lysosomen transportiert werden und dort die enzymatische Funktion aufnehmen (Platt & Lachmann, 2009; Matzner & Gieselmann, 2005). Auf diesem Vorgang beruhen verschiedenen Therapieansätze lysosomaler Speichererkrankungen, die das Ziel haben, das defekte Enzym durch Enzymsubstitution zu ersetzen, wie bei der

Enzymersatztherapie, *in vivo* Gentherapien oder zellbasierten Therapien (siehe Punkt 1.5.4).



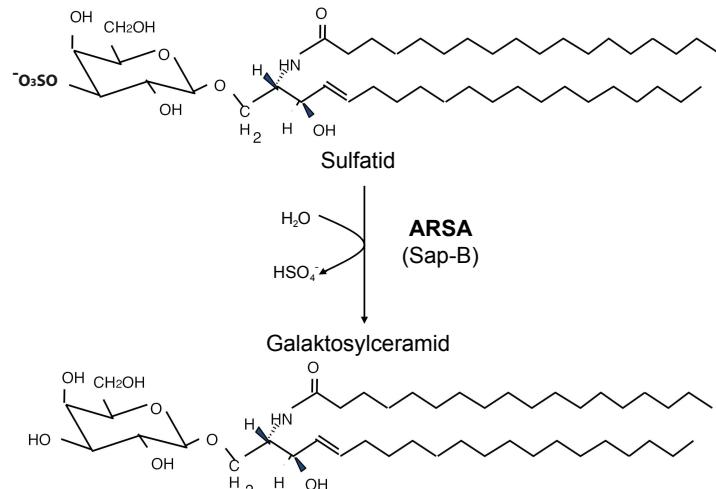
**Abb. 6: Synthese und Transport lysosomaler Enzyme.**

Lysosomale Enzyme werden im rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und ko-translational glykoliert (1). Anschließend werden sie an den *cis*-Golgi-Apparat übergeben (2), wo mindestens ein Mannose-Rest des Enzyms phosphoryliert wird (3). Die phosphorylierten Enzyme binden an Mannose-6-Phosphat-(M6P)-Rezeptoren. Diese befinden sich in der Membran von Vesikeln, die sich vom trans-Golgi-Netzwerk formen und schließlich lösen (4). Die Clathrin-umhüllten Vesikel fusionieren mit späten Endosomen (5). Der niedrige pH-Wert führt zur Freisetzung des phosphorylierten Enzyms. Durch eine weitere Fusion (transient oder vollständig) wird das aktive Enzym in das Lysosom übergeben (6). Der M6P-Rezeptor wird wiederverwendet und zurück zum Golgi-Apparat transportiert (7). Ein Teil der Rezeptoren wird auch zur Plasmamembran gebracht (8). Hier können sezernierte lysosomale Enzyme über M6P durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden und über das Endosom zum Lysosom transportiert werden (9). Zusätzlich können im rauen ER synthetisierte Proteine mittels Exozytose aus den Zellen sekretiert werden (10). Modifiziert nach Desnick & Schuchman, 2002.

### 1.5.2 Metachromatische Leukodystrophie

Die Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine lysosomale Speicherkrankheit und gehört zu den Sphingolipidosen. Sie ist monogenetisch und wird autosomal-rezessiv vererbt. Die Erkrankung ist panethnisch und somit in vielen verschiedenen Volksgruppen, z. B. bei Europäern, Japanern, Arabern, Südafrikanern, Iranern und Indern vertreten (von Figura *et al*, 2001). In Europa liegt die Prävalenz bei 1:100.000 (Heim *et al*, 1997; Poorthuis *et al*, 1999). Die MLD wird verursacht durch eine Defizienz des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase A (ARSA, EC 3.1.6.8). Unter physiologischen Bedingungen katalysiert ARSA den Abbau von 3'-O-Sulfo-Galaktosylceramid (Sulfatid; Abb. 7).

Aufgrund der ARSA-Defizienz kann Sulfatid nicht abgebaut werden und lagert sich intralysosomal ab. Pathologische Sulfatidakkumulationen finden sich in verschiedenen Geweben, wie in der Gallenblase, der Niere und insbesondere im Nervengewebe (Baier & Harzer, 1983; Satoh *et al*, 1988; Joosten *et al*, 1975). Als Glycosphingolipid stellt Sulfatid eine Hauptkomponente der Myelinmembranen dar (Saher & Simons, 2010). Demzufolge betreffen die pathologischen Ablagerungen hauptsächlich die myelinbildenden Zellen, die Oligodendrozyten im ZNS und die Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem (PNS). Dabei kann das pathologische Speichermaterial nicht nur in den Lysosomen, sondern auch in der Myelinmembran auftreten (Saravanan *et al*, 2004). Zusätzlich können die Ablagerungen in Neuronen und Astrozyten vorkommen (Molander-Melin *et al*, 2004; Hess *et al*, 1996; Peng & Suzuki, 1987).



**Abb. 7: Hydrolyse von Sulfatid.**

Das lysosomale Enzym Arylsulfatase A (ARSA) hydrolysiert durch die Abspaltung eines Sulfatrestes an der Glukoseeinheit den Abbau von 3'-O-Sulfo-Galaktosylceramid (Sulfatid) zu Galaktosylceramid. Das Aktivatorprotein Saponin B (Sap-B) wird benötigt, um das Sulfatid der ARSA zugänglich zu machen (Gieselmann & Krägeloh-Mann, 2010).

Im Verlauf der MLD kommt es zu einer fortschreitenden Demyelinisierung des Nervensystems, die von verschiedenen neurologischen Symptomen begleitet wird, wie Bewegungsstörungen, Krämpfen und zunehmenden Koordinations- und Sprachschwierigkeiten (Gieselmann, 2008). Vermutlich sind die zu Anfang auftretenden neurologischen Symptome ein Resultat der Sulfatidablagerungen in Neuronen und nicht durch den Verlust von Myelin verursacht (Hess *et al*, 1996). Im weiteren Krankheitsverlauf tritt die Demyelinisierung mehr in den Vordergrund und deren klinische Konsequenzen dominieren den MLD-Phänotyp. Die Schädigung des Myelins führt sekundär zu einem weiteren Verfall der Axone.

Warum die Sulfatidablagerungen in Neuronen zu einem Funktionsverlust und in der weißen Substanz zur Demyelinisierung führen, ist bislang noch nicht genau geklärt (Gieselmann & Krägeloh-Mann, 2010). Vermutlich führen die zunehmenden Sulfatidakkumulationen zu einer Störung des lysosomalen-endosomalen Systems und lösen so weitere sekundäre pathogene Prozesse aus, die eine Apoptose in den Zellen herbeiführen können (Vitner *et al*, 2010). In den myelinbildenden Zellen kann das negative Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Myelins haben und so zur Instabilität der Membran führen (O'Brien & Sampson, 1965).

Je nach Beginn der Krankheit können drei verschiedene klinische Formen unterschieden werden, die spätinfantile, die juvenile und die adulte Form (von Figura *et al*, 2001; Kolodny & Moser, 1983). Die Erstgenannte ist die schwerwiegendste Form der MLD und entwickelt sich in den ersten beiden Lebensjahren. Diese Patienten überleben kaum das erste Lebensjahrzehnt. Bei der juvenilen Form treten die ersten Symptome zwischen dem 3. und 16. Lebensjahr auf. Die Krankheit endet meist im zweiten oder dritten Jahrzehnt tödlich. Die adulte Form stellt die schwächste Form dar. Sie beginnt erst nach dem 16. Lebensjahr, führt aber dennoch mit der Zeit zum Tod (Polten *et al*, 1991). Insgesamt ist der Verlauf der adulten Form langsamer als bei der juvenilen und spätinfantilen Form, wobei die adulte und juvenile Form teilweise überlappen können (von Figura *et al*, 2001).

Genetisch betrachtet ist die MLD sehr heterogen. Bis heute sind mehr als 150 Mutationen im ARSA-Gen bekannt (The Human Gene Mutation Database ARSA, 2016). Die Mutationen kommen sowohl in hetero- als auch in homozygoter Form vor, und in einem Patienten können verschiedene Mutationen gleichzeitig im ARSA-Gen auftreten. Daraus resultieren die unterschiedlichen Schweregrade der MLD (siehe oben). Von den genetischen Veränderungen sind ungefähr 75 % durch Punktmutationen ausgelöst (The Human Gene Mutation Database ARSA, 2016). Es kann aber auch zu Veränderungen in Schnittstellen zwischen Exon und Intron, sowie zu Deletionen oder frühzeitigen Stopp-Sequenzen kommen (Gieselmann & Krägeloh-Mann, 2010). Welche Form der MLD entsteht, hängt von den jeweiligen Mutationen ab und korreliert mit der ARSA-Enzymaktivität. Homozygote Nullallel-Träger leiden immer an der spätinfantilen Form. Die Mutationen führen zu starken Strukturveränderungen des ARSA-Proteins, sodass es sofort proteasomal abgebaut wird und kein funktionelles Enzym das Lysosom erreicht (Poepel *et al*, 2005, 2010). Bei der juvenilen und adulten Form besteht eine ARSA-Restaktivität. Das Protein ist nur teilweise falsch gefaltet, und ein geringer Anteil gelangt vorbei an der Qualitäts-

kontrolle der Zelle zum Lysosom (von Figura *et al*, 1983; von Bülow *et al*, 2002). Das erklärt sowohl den späteren Beginn als auch den langsameren Verlauf der beiden Formen (Gieselmann, 2008). Bei der adulten Form liegt meist eine homo- oder heterozygote Mutation vor, die mit einer Restaktivität assoziiert ist (Berger *et al*, 1997; Polten *et al*, 1991). Die juvenile MLD beinhaltet zusätzlich oder einzeln eine heterozygote Mutation, die mit einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität assoziiert wird (Berger *et al*, 1997). Bei einem Vergleich von Geschwistern mit identischen Genotypen wurde ein unterschiedlicher Krankheitsverlauf der MLD festgestellt (Arbour *et al*, 2000). Diese Heterogenität lässt vermuten, dass weitere unbekannte genetische und epigenetische Faktoren einen Einfluss auf den Phänotyp und Krankheitsverlauf der MLD haben können (Gieselmann, 2008).

### 1.5.3 Krankheitsmodelle der MLD

Die molekularen Pathomechanismen der MLD sind noch nicht ausreichend geklärt, und die Erkrankung ist bis heute nicht heilbar. Um die Krankheit besser verstehen zu können und um geeignete Therapiemöglichkeiten zu finden, ist es wichtig, ein passendes Krankheitsmodell zur Verfügung zu haben. Das sollte idealerweise die Hauptmerkmale der MLD, wie Sulfatidablagerungen, Demyelinisierung und neuronale Degeneration, widerspiegeln.

Da die MLD bislang nur im Menschen beschrieben wurde, existiert kein natürlich vorkommendes Tiermodell. 1996 generierten Hess und Kollegen die Arsa-defiziente ( $\text{Arsa}^{-/-}$ )-Maus. Durch die Eliminierung des Arsa-Gens mittels homologer Rekombination wird das Arsa-Protein nicht gebildet (Hess *et al*, 1996). Das Tiermodell spiegelt biochemisch die spätaffile Form der MLD wider. Im Vergleich zum Menschen zeigt die Maus allerdings einen milderen Phänotyp. Mit zunehmendem Alter entstehen in dem Tier, wie beim Menschen, fortschreitende Sulfatidakkumulationen. Dennoch treten nur milde neurologische Symptome auf und es findet keine weitreichende Demyelinisierung im Nervensystem statt. Lediglich der Durchmesser der myelinisierten Axone ist vermindert (Hess *et al*, 1996). Um den Phänotypen zu verstärken, wurde ein weiteres Tiermodell generiert. Zusätzlich zur Arsa-Defizienz wurden die sulfatidsynthetisierenden Enzyme (UDP-Galaktose:Ceramid Galaktosyltransferase und 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat:Cerebrosid Sulfotransferase) in den neuralen Zellen überexprimiert (Ramakrishnan *et al*, 2007; Eckhardt *et al*, 2007). Das führte im Tier zu einem

Anstieg der Sulfatidakkumulationen und zu einer Degeneration der Axone. Die Maus entwickelte vergleichbare neurologische Symptome wie im MLD-Patienten.

Auch wenn die  $\text{Arsa}^{-/-}$ -Maus nicht den umfassenden MLD-Phänotyp widerspiegelt, dient sie heute als wichtiges Tiermodell, um Therapiemöglichkeiten für die MLD zu evaluieren. Gerade bei Therapien, die darauf basieren, das defekte Enzym zu ersetzen, konnten in diesem Tiermodell erste Erfolge sichtbar gezeigt werden (siehe Punkt 1.5.4). Dagegen können Therapien, die neben der Wiederherstellung der Enzymaktivität zusätzlich auf einen Zellersatz und eine Remyelinisierung abzielen, nur vermindert in der  $\text{Arsa}^{-/-}$ -Maus studiert werden. Eine zusätzliche Mutation im Tiermodell, die dazu führen würde, dass kein Myelin gebildet werden kann oder es zu einer Demyelinisierung kommt, kann dieses Problem beheben.

Neben Tiermodellen sind krankheitsspezifische *in vitro*-Modelle von großer Wichtigkeit für die Erforschung von Erkrankungen. Sie sind leichter zugänglich und ermöglichen, molekulare Mechanismen in der Zellkulturschale zu untersuchen. Für die MLD existieren bereits derartige Modelle. Humane primäre Fibroblasten von MLD-Patienten wurden herangezogen, um verschiedene Aspekte der Krankheit zu studieren, wie die ARSA-Enzymaktivität oder die molekularen Grundlagen der unterschiedlichen Mutationen (Polten *et al*, 1991; von Figura *et al*, 1983, 1986). Im Jahr 2004 stellten Saravanan *et al* ein *in vitro*-Modell von sulfatidspeichernden Zellen vor. Dabei handelte es sich um primäre Nierenzellen, die aus der  $\text{Arsa}^{-/-}$ -Maus gewonnen wurden (Saravanan *et al*, 2004). In der MLD speichern Nierenzellen, nach den Zellen des Nervensystems, am meisten Sulfatid (Gieselmann *et al*, 1998; Hess *et al*, 1996; Lüllmann-Rauch *et al*, 2001). Saravanan und Kollegen stellten mit Hilfe dieser Zellen fest, dass das *myelin and lymphocyte protein* (MAL) in Arsa-defizienten Nierenzellen fehllokaliert ist und im Zusammenhang mit den Sulfatidablagerungen und der MLD-Pathologie steht (Saravanan *et al*, 2004). Klein und Kollegen nutzten ebenfalls die Arsa-defizienten Nierenzellen und untersuchten den Prozess der lysosomalen Exozytose von Sulfatid. Sie zeigten, dass ein Teil des akkumulierten Speichermaterials in den Extrazellulärraum abgegeben werden kann (Klein *et al*, 2005). Allerdings können mit den beschriebenen Zellen nur gewisse Fragestellungen, wie Mutationen, die Enzymaktivität oder die Speicherung von Sulfatid studiert werden. Viele Fragen, die gerade die myelinbildenden Zellen, aber auch Neurone und deren gemeinsame Interaktion sowie die Auswirkungen der Demyelinisierung betreffen, bleiben offen. Weitere Arbeitsgruppen isolierten aus der  $\text{Arsa}^{-/-}$ -Maus Schwann-Zellen oder neurale Vorläuferzellen, die weiter in Oligodendrozytenvorläufer

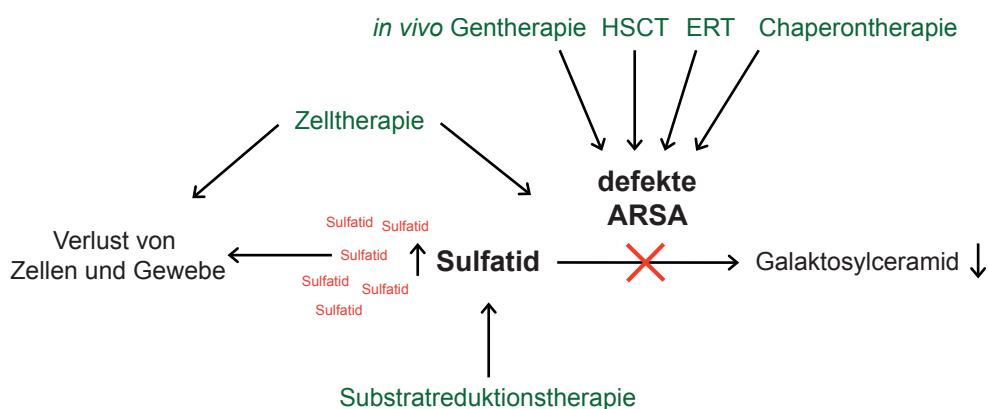
differenziert wurden (Pituch *et al*, 2015; Saravanan *et al*, 2007). Allerdings handelt es sich hierbei um murine Modelle, die aus der *Arsa<sup>-/-</sup>*-Maus gewonnen wurden und nicht alle Krankheitsmerkmale aufweisen. Es fehlt ein robustes Kultursystem auf der Basis humaner und vorzugsweise oligodendroglialer Zellen. Humane Fibroblasten sind am einfachsten zugänglich, bergen aber das Problem, nicht alle MLD-Merkmale widerzuspiegeln. Mit Hilfe der iPSC-Technologie (siehe Punkt 1.2) ist es möglich, Fibroblasten, die von MLD-Patienten gewonnen wurden, zu reprogrammieren. Die generierten MLD-spezifischen iPSCs können anschließend mit entsprechenden Protokollen in Oligodendrozyten oder Schwann-Zellen differenziert werden.

### 1.5.4 Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der MLD

Die MLD ist bis heute nicht heilbar. Patienten werden häufig nur symptomatisch behandelt. Allerdings wurden bereits viele Ansätze kausaler Therapiemöglichkeiten beschrieben (Abb. 8). Die meisten beruhen darauf, dass ARSA über M6P-Rezeptoren von den MLD-spezifischen Zellen aufgenommen und so die Enzymaktivität wiederhergestellt werden kann (siehe Punkt 1.5.1). Dazu gehört die hämatopoetische Stammzelltherapie (haematopoetic stem cell therapy, HSCT), die Enzymersatztherapie (enzyme replacement therapy, ERT) sowie die Gen- und Zelltherapie (Abb. 8).

Die HSCT macht sich zu Nutze, dass die transplantierten hämatopoetischen Stammzellen (*haematopoetic stem cells*; HSC) über die Bluthirnschranke zum Wirkungsort gelangen (Asheuer *et al*, 2004; Simard & Rivest, 2004) und dort ARSA abgeben, welches von den defizienten Zellen aufgenommen werden kann (Platt & Lachmann, 2009; Matzner & Gieselmann, 2005). Es wurden bereits viele MLD-Patienten, die an unterschiedlichen Formen der MLD litten, mittels HSCT behandelt (Görg *et al*, 2007; Solders *et al*, 1998; Kidd *et al*, 1998; Navarro *et al*, 1996; Malm *et al*, 1996; Kapaun *et al*, 1999; Guffon *et al*, 1995; Krivit *et al*, 1999; Bredius *et al*, 2007). Dabei wurde ersichtlich, dass Transplantationen in Patienten, die an der spätinfantilen Form leiden, weniger effektiv sind (Bredius *et al*, 2007; Malm *et al*, 1996; Malatack *et al*, 2003). Im Gegensatz dazu konnten Patienten in frühen Stadien der juvenilen und adulten Form durchaus von den Transplantationen profitieren, da der Krankheitsverlauf langsamer voranschreitet (Görg *et al*, 2007; Guffon *et al*, 1995; Kapaun *et al*, 1999; Kidd *et al*, 1998; Malm *et al*, 1996; Navarro *et al*, 1996; Solders *et al*, 1998). Es konnte ein Aufschub der Krankheitsentwicklung, aber keine vollständige Heilung erreicht werden. Ein deutlicherer Effekt konnte in einem

weiteren Ansatz erzielt werden, in dem HSCs genetisch verändert wurden und ARSA überexprimierten. In der *Arsa<sup>-/-</sup>*-Maus führte die Transplantation dieser Zellen zu einer fast vollständigen Umkehrung der Sulfatidablagerungen im ZNS und PNS (Biffi *et al*, 2006, 2004). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine klinische Phase I/II Studie eingeleitet (Clinical Trial NCT01560182, 2016). Erste Ergebnisse zeigten, dass an der spätaufgetretenen MLD leidende Patienten, die vor dem Auftreten erster schwerwiegender Symptome behandelt wurden, von dieser Therapie profitieren konnten (Biffi *et al*, 2013).



**Abb. 8: Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der MLD.**

Die meisten Therapieansätze der MLD verfolgen das Ziel, das defekte ARSA-Enzym zu ersetzen. Die hämatopoetische Stammzelltherapie (*haematopoietic stem cell therapy*, HSCT), die Enzymersatztherapie (*enzyme replacement therapy*, ERT) und Zelltherapien machen sich zu Nutze, dass extrazelluläre ARSA von defizienten Zellen aufgenommen werden kann. Einen weiteren Ansatz stellt die *in vivo* Gentherapie dar, die durch Vektor-vermittelte ARSA-Expression die Enzymaktivität wiederherstellt. Bei der Chaperontherapie schützen Enzyminhibitoren fehlgefaltete ARSA-Proteine vor einem schnellen proteasomalen Abbau. Die Substratreduktionstherapie zielt darauf ab, die Sulfatidsynthese zu blockieren und so die pathologischen Akkumulationen zu verhindern (Patil & Maegawa, 2013).

ERTs werden bereits erfolgreich bei anderen lysosomalen Speichererkrankungen eingesetzt (Beck, 2010). Allerdings stellen Speichererkrankungen, bei denen das Nervensystem involviert ist, eine besondere Herausforderung dar. Das verabreichte rekombinante Protein muss die Bluthirnschranke passieren. Trotzdem konnten bei der MLD erste Therapieerfolge erzielt werden. Durch mehrfache intravenöse Verabreichung von ARSA in die *Arsa<sup>-/-</sup>*-Maus konnte die Pathologie und Funktion im ZNS verbessert werden (Matthes *et al*, 2012; Matzner *et al*, 2005, 2009b). In einem weiteren Ansatz wurde versucht, die Bluthirnschranke zu umgehen, indem Minipumpen intrecerebroventrikular in MLD-Tiermodelle implantiert wurden, die kontinuierlich rekombinantes ARSA in die Cerebrospinalflüssigkeit abgaben (Stroobants *et al*, 2011). Die Sulfatidablagerungen und neurologischen Symptome konnten so reduziert werden. Ein ähnlicher Ansatz, bei dem ARSA direkt intrathekal

verabreicht wird, ist bereits in der klinischen Phase I/II (Clinical Trial NCT01510028, 2016).

Zelltherapien können neben dem ARSA-Protein gleichzeitig, in Abhängigkeit vom gewählten Zelltyp, das geschädigte Gehirngewebe ersetzen. Es wurden bereits primäre murine Oligodendrozytenvorläufer und neurale Vorläuferzellen sowie murine ESC-abgeleitete gliale Vorläuferzellen in die *Arsa*<sup>-/-</sup>-Maus transplantiert (Klein *et al*, 2006; Kawabata *et al*, 2006; Givogri *et al*, 2006, 2008). Kürzlich generierten Doerr *et al* humane MLD-spezifische iPSCs und differenzierten diese weiter in neurale und astrogliale Vorläuferzellen. Durch eine Überexpression von ARSA wurde der Gendefekt in den Zellen korrigiert. Eine Transplantation der Zellen in das Gehirn von *Arsa*<sup>-/-</sup>-Mäusen führte zu einer Reduktion der Sulfatidablagerungen (Doerr *et al*, 2015).

Da die MLD vorwiegend durch den Defekt in einem Enzym verursacht wird, eignen sich auch *in vivo* Gentherapien zur Behandlung der Krankheit. Dabei wird ARSA über Lentiviren, Adenoviren oder Adeno-assoziierte Vektoren direkt intracerebral verabreicht. Dies führte in bereits erfolgten Studien sowohl zu einer weitreichenden Expression von ARSA im Gehirn von Ratten und nichtmenschlichen Primaten als auch zu einer Verbesserung der neuropathologischen Veränderungen und Bewegungsstörungen in den genannten MLD-Tiermodellen (Colle *et al*, 2010; Consiglio *et al*, 2001; Kurai *et al*, 2007; Miyake *et al*, 2014; Piguet *et al*, 2012; Rosenberg *et al*, 2014; Zerah *et al*, 2015). *In vivo* Gentherapien haben den Vorteil der Langzeitkorrektur, greifen aber auch durch Verwendung viraler Vektoren in das Genom des Patienten ein.

Ein weiterer Therapieansatz macht sich zu Nutze, dass das defekte ARSA-Enzym aufgrund seiner Fehlfaltung im Proteasom schnell abgebaut wird, aber grundsätzlich aktiv ist. Bei dieser sogenannten Chaperontherapie werden Enzyminhibitoren verabreicht, die eine korrekte Faltung des ARSA-Enzyms unterstützen und somit einen frühzeitigen Abbau verhindern sollen (Fan, 2008). Das Enzym gelangt in das Lysosom und kann seiner Funktion nachgehen.

Die Substratreduktionstherapie zielt darauf ab, die Synthese von Sulfatid zu inhibieren und so die pathologischen Ablagerungen zu minimieren (Platt & Lachmann, 2009; Beck, 2010).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Mit Hilfe der iPSC-Technologie können patientenspezifische Zellkulturmodelle generiert werden, die es nicht nur erlauben, die krankheitsverursachenden Prozesse zu studieren, sondern auch ermöglichen, therapeutische Wirkstoffe auszutesten. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein iPSC-basiertes humanes MLD-spezifisches *in vitro*-Modell zu generieren. Es wurden Hautfibroblasten von vier MLD-Patienten in iPSCs reprogrammiert und unter Verwendung eines in unserem Labor etablierten Differenzierungsprotokolls in einen der am meisten betroffenen Zelltypen der MLD, den Oligodendrozyten, differenziert. Der Vorteil an diesem Protokoll ist die Generierung einer stabilen Zellpopulation an RGL-NPCs (Gorris *et al*, 2015). Diese Zellen können nicht nur wiederholt als Ausgangszellpopulation für Oligodendrozyten, sondern auch für Astrozyten und Neurone herangezogen werden. Das erlaubt, zelltypspezifische Untersuchungen sowie Interaktionen zwischen den einzelnen Subtypen zu studieren. Das generierte MLD-spezifische *in vitro*-System sollte idealerweise vielseitig einsetzbar sein und Aufschluss über die Pathomechanismen der MLD geben. Eine Herausforderung stellte hierbei die Differenzierung in Oligodendrozyten selbst und die Aufdeckung von krankheitsspezifischen Unterschieden in den Kulturen dar. Darüber hinaus sollen die generierten RGL-NPCs genutzt werden, um die Aufnahme von extrazellulärer ARSA in den ARSA-defizienten Zellen *in vitro* zu studieren. Auf diesem Vorgang der sogenannten Kreuzkorrektur basieren verschiedene Therapieansätze der MLD und die RGL-NPCs können demzufolge für Vorversuche entsprechender Therapiestrategien herangezogen werden.

Neben Zellkulturmodellen sind *in vivo*-Modelle ein unverzichtbares Hilfsmittel in der Forschung. Es können krankheitsrelevante Prozesse verfolgt und mögliche Therapieansätze erforscht werden. In dieser Arbeit wurde durch die Kreuzung der Arsa<sup>-/-</sup>- und Shiverer-Maus ein neues Tiermodell generiert. Resultierend aus der Defizienz des Arsa-Proteins entstehen in der Maus Sulfatidablagerungen, der Genotyp der Shiverer-Maus führt zu einem Verlust des kompakten Myelins. Dieses Mausmodell wurde genutzt, um die Funktionalität und das Differenzierungsverhalten *in vitro*-generierter MLD-RGL-NPCs in einem krankheitsspezifischen Milieu zu studieren. Mit diesem Ansatz können mögliche Zusammenhänge zwischen Sulfatidablagerungen und Demyelinisierung aufgedeckt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Hersteller

Adobe, Irland	Eppendorf, Deutschland	Promega, Deutschland
Analytical Instrument, USA	Faust, Deutschland	Qiagen, Deutschland
AppliChem, Deutschland	Fresenius Kabi, Deutschland	R&D Systems, Deutschland
Axxora, Deutschland	Graphpad, USA	RAD Source, USA
Bayer Healthcare, Deutschland	Greiner Bio-One, Deutschland	Sakura Finetek, Deutschland
BD Bioscience, Belgien	Illumina, USA	Sarstedt, Deutschland
Biocare Medical, USA	Kendro, Deutschland	Sartorius, Deutschland
Biometra, Deutschland	Leica, Deutschland	Schott, Deutschland
BioRad, Deutschland	Life Technologies, Deutschland	Serva, Deutschland
Biozym, Deutschland	Merck Millipore, Deutschland	Severin, Deutschland
Brand, Deutschland	Mettler Toledo, Deutschland	Sigma-Aldrich, Deutschland
Branson, USA	Microsoft, USA	SPL Life Sciences, Korea
Canon, Deutschland	Miltenyi Biotech, Deutschland	StemCells, Inc, UK
Carl Roth, Deutschland	Molecular Devices, Deutschland	Systec, Deutschland
Carl Zeiss, Deutschland	NeoLab, Deutschland	The Jackson Laboratory, USA
CellSystems, Deutschland	New England BioLabs, USA	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Chart Industries, USA	NIH, USA	Tree Star, USA
Coriell Institute for Medical Research, USA	Nikon, Deutschland	Vector Laboratories, USA
Corning, USA	Nunc, Deutschland	VELP Scientifica, USA
Covance, USA	PAA Laboratories, Deutschland	VWR, Deutschland
DAKO, Deutschland	Panasonic, Deutschland	Zymo Research Europe, Deutschland
Dianova, Deutschland	Peprotech, USA	Zytomed Systems, Deutschland
DNAstar®, USA	PEQLAB, Deutschland	
DSHB, USA	Pfizer, Deutschland	
Engelbrecht, Deutschland		

### 2.2 Technische Ausstattung

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

Gerät	Hersteller	Gerät	Hersteller
DFC290 Kamera (für DM 1000 LED)	Leica	Biological Irradiator RS 2000	RAD Source
Autoklav D-150	Systec	Cryostat Microm Cryo-Star HM 560	GMI
AxioCam MRM	Carl Zeiss	Digitalkamera Powershot G5	Canon
Axioskop 2	Carl Zeiss	Elektrophoresekammern	Biometra
Axiovert 200M	Carl Zeiss		

Gerät	Hersteller	Gerät	Hersteller
FACS® Calibur	BD Biosciences	Multipipette	Eppendorf
FACS® DiVa	BD Biosciences	Nano Drop ND-1000	PEQLAB
Fluoreszenzlampe mbq 52	Carl Zeiss	Netzteil Elektrophoresekammer Standard P25	Biometra
Flüssigstickstoff	Chart Industries	pH Meter	Mettler Toledo
Gefriertruhe -170 °C	Panasonic	Pipette-boy Accu-Jet	Brand
GelDoc	BioRad	Pipetten	Eppendorf
Inkubator HeraCell150	Thermo Scientific	Spectrophotometer OptiMax Tunable Microplate Reader	Analytical Instrument
Inverse Lichtmikroskope (Axiovert 25, 40C, 40CFL)	Carl Zeiss	Stereomikroskop SMZ1500	Nikon
Kühlschränke (4 °C); Gefrierer (-20 °C, -80 °C); Trockenschrank; Backofen	Thermo Scientific (Liebherr, Kendro, Heraeus)	Sterilbank HERAsafe/guard	Thermo Scientific
Leica DM 1000 LED	Leica	Thermocycler T Professional Trio	Biometra
Leica DM IL LED	Leica	Thermocycler T3000	Biometra
Leica Live Cell DMI6000 B	Leica	Thermomixer compact	Eppendorf
Megafuge 40 R & 1.0 R	Thermo Scientific	Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf
Microzentrifuge Galaxy Mini	VWR	Ultraschallbad 1510	Branson
Mikrowelle	Severin	Vortex Mixer 2X3	VELP Scientifica
Minizentrifuge	NeoLab	Waage	Sartorius
Mr Frosty	Thermo Scientific	Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal	Faust
		Zeiss Axiolmager.Z1/ApoTome	Carl Zeiss

## 2.3 Material

### 2.3.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien, die im Folgenden nicht aufgeführt worden sind, gehören zum allgemeinen Laborstandard.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
12-, 24-, 96-Well Zellkulturschale	Corning
4-Well Zellkulturschale	Nunc
6-Well Zellkulturschale	Thermo Scientific
Cellstar™ 175 cm <sup>2</sup> Flasche	Greiner Bio-One
Deckgläser	Engelbrecht
FACS Röhrchen (5 ml)	Sarstedt
Glaspipetten (5; 10; 25 ml)	Brand

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Glasware (Flaschen; Kolben; Bechergläser)	Brand, Schott, VWR
Kryoröhrchen (1; 1,8 ml)	Nunc
Multipipette Spitzen	Eppendorf
Objektträger Superfrost® Plus	Thermo Scientific
Pasteurpipetten	Brand
Pasteurplastikpipette (3 ml)	Brand
PCR-Stripes (0,2 ml)	Biozym
Petrischale (Ø 10 cm)	BD Bioscience
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One
Serologische Plastikpipetten (1; 2; 5; 10; 25 ml)	BD Bioscience
Spritzen (10; 20; 50 ml)	BD Bioscience
Tubes (0,5; 1,5)	Eppendorf
Tubes (15; 50 ml)	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche (25, 75 cm <sup>2</sup> )	Nunc
Zellkulturschale Ø 15 cm	SPL Life Sciences
Zellkulturschalen (Ø 3,5; 6; 1 cm)	VWR
Zellschaber	Corning
Zellsieb 40 µm Nylon	BD Bioscience

### 2.3.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller/Nr.	Chemikalie	Hersteller/Nr.
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich /63689	bFGF	Life Technologies/ 13256-029
4-Nitrocatechol sulfate dipotassium salt	Sigma Aldrich/ N7251	Blocklösung	Zytomed Systems/ ZUC007-100
Agarose	PEQLAB/35-1020	Bromophenol blau	Sigma Aldrich/B0126
Alcian Blue 8GX	Sigma Aldrich/ A3157	BSA	Sigma Aldrich/A7030
Alfazym	PAA Laboratories/ L11-012	BSA Fraktion V (7,5 %)	Life Technologies/ 15260-037
Ampuwa® H <sub>2</sub> O	Fresenius Kabi	Cytoseal™ XYL	Thermo Scientific/ 8312-4
Apo-Transferrin, human	Sigma Aldrich/ T1147	D-Glukose	Sigma Aldrich/ G8270
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich/ A4403	D-Saccharose	Carl Roth/4621
B27	Life Technologies/ 17504-044	DABCO	Sigma Aldrich/ 290734
B27 ohne Vitamin A	Life Technologies/ 12587-010	DAPI	Sigma Aldrich/ D9542
BDNF	R&D Systems/248-BD-025	DMSO	Sigma Aldrich/ D2650

Chemikalie	Hersteller/Nr.	Chemikalie	Hersteller/Nr.
DNA-Leiter (1 kb)	PEQLAB/25-2030	Mowiol 4-88	Carl Roth/0713
DNA-Leiter (100 bp)	PEQLAB/25-2010	Matrigel™	BD Bioscience/354230
DNase (RNA)	Life Technologies/ 18068-015	Methanol	Carl Roth/4627
DNase (Zellkultur)	CellSystems/ LS002140	N2-Supplement	PAA Laboratories/ F005-004
dNTPs	PEQLAB/20-2011	Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth/9265
EDTA	Carl Roth/X986	Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth/6771
EGF, human	R&D Systems/236-EG-01M	NGS	Life Technologies/ 16050130
Essigsäure	Merck/100063	Noggin	R&D Systems/ 6057-NG
Eisessig 96 %	Carl Roth/T179	Paraformaldehyd	Sigma Aldrich/ P6148
Eosin 1 % wässrige Lösung	Carl Roth/3137	PDGF-AA	Peprotech/100-13A
Ethanol	Merck, AppliChem	Poly-L-Ornithin	Sigma Aldrich/P- 3655
Ethidiumbromid	Carl Roth/2218	Propidiumiodid	Molecular Devices/P-21493
FGF-2, human	R&D Systems/Bulk 233-FB/CF	Retinsäure	Sigma Aldrich/ R2625
Forskolin	Sigma Aldrich/F6886	rhARSA	Prof. V Giesemann
Gelatine	Life Technologies/ G-1890	Rompun 2 %	Bayer/Apotheke
Glukose-6-Phosphat	Sigma Aldrich/ G7250	Tissue-Tek®	Sakura Finetek/ 4583
Glutaraldehyd (25 %)	Serva/23114.01	Trijod-L-Thyronin	Sigma Aldrich/T551
Glycerin	Sigma Aldrich/ G5516	Tris base	Carl Roth/AE15
Glycin	Carl Roth/3908	Triton-X 100	Sigma Aldrich/T878
Haematoxylin	Biocare Medical/ CATHE-H	Triton™ N-101	Sigma Aldrich/303135
HCl	Carl Roth/X942	Trypanblau Lösung (0,4 %)	Life Technologies/ 15250-061
Insulin	Sigma Aldrich/ I6634-1G	Trypsin-EDTA	Life Technologies/ 15400-054
Isopropanol	AppliChem/A3928	Trypsin-Inhibitor	Life Technologies/ 17075029
Ketanest S 25 mg/ml	Pfizer/Apotheke	Tween-20	Carl Roth/9127
Kollagenase Typ IV	Life Technologies/ 17104019	Vectashield®	Axxora//A-1000
L-Glutamin 200 mM	Life Technologies/ 25030024	Wasserstoff-peroxidase 30 %	Carl Roth/CP26
Laminin	Sigma Aldrich/ L2020	Xylene Cyanol	Sigma Aldrich/ X4126
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth/A537	Xylol	Carl Roth/CN80
Mannose-6-Phosphat	Sigma Aldrich /M3655	Y27632	Merck//688000

### 2.3.3 Gebrauchsfähige Reagenzien

Kits	Hersteller
CytoTune®-iPS Sendai Reprogramming Kit	Life Technologies
DAB-Substrate Kit High Contrast	Zytomed Systems
DNA Clean & Concentrator™-5 Kit	Zymo Research
DNase I, Amplification Grade	Life Technologies
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega
iScript™cDNA Synthese Kit	BioRad
LongAmp® Taq PCR Kit	New England BioLabs
Quick-RNA™ MiniPrep	Zymo Research
REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit	Sigma Aldrich
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Taq DNA Polymerase Kit	Life Technologies
Vector® Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III SK-5300	Vector Laboratories

### 2.3.4 Mausstämme

#### CD1-Maus

Der CD1-Mausstamm wurde verwendet, um embryonale Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF) zu gewinnen und diese nach Bestrahlung als *Feeder-Zellen* (siehe Punkt 2.4.5) einzusetzen. Die Mäuse stammen aus dem Haus für Experimentelle Therapie der Universität Bonn.

#### Rag2-defiziente Maus

Rag2-defiziente ( $Rag2^{-/-}$ , C57BL/6-Rag2<sup>tm1CGN</sup>/J) Mäuse besitzen durch eine homozygote Mutation im *recombination activating gene 2* (*Rag2*) keine reifen und immunkompetenten B- und T-Lymphozyten (Shinkai *et al*, 1992). Dieser Mausstamm ist immundefizient und wurde für Teratomanalysen (siehe Punkt 2.5.10) verwendet. Außerdem wurde dieser Mausstamm in die nachfolgend beschriebenen Mausstämme eingekreuzt. Dadurch wurde bei einer Transplantation von humanen Zellen eine Abstoßungsreaktion vermindert. Es waren somit keine zusätzlichen immunsuppressiven Maßnahmen notwendig. Die Mäuse stammen aus dem Haus für Experimentelle Therapie der Universität Bonn.

#### Arsa- und Rag2-defiziente Maus

In der Arsa<sup>-/-</sup>-Maus (CST-tg/ASA-KO; Hess *et al*, 1996) wurde das *Arsa*-Gen mittels homologer Rekombination inaktiviert. Somit weisen sie keine Enzymaktivität für Arsa auf und können kein Sulfatid metabolisieren. Die Sulfatidablagerungen entstehen schon wenige Wochen nach der Geburt und nehmen mit fortschreitendem Alter zu. Genetisch und biochemisch spiegelt die Arsa<sup>-/-</sup>-Maus den Phänotyp der MLD wider. Im Vergleich zum Menschen zeigt die Maus aber keine weitreichende Demyelinisierung und schwächere neurologische Symptome. Sie reflektieren ein

frühes Stadium der humanen MLD. Im späteren Alter entwickeln die Mäuse unter anderem Gang- und Bewegungsstörungen, sowie Hyperaktivität und Ataxien. Die Lebenserwartung der Tiere ist nicht verkürzt (Hess *et al*, 1996). Um die Arsa<sup>-/-</sup>-Maus für Transplantationen zu verwenden, wurde im Vorfeld der genetische Hintergrund der Rag2<sup>-/-</sup>-Maus eingekreuzt (Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>, CST-tg/ASA-KO /Rag2<sup>tm1CGN</sup>/J). Die Arsa<sup>-/-</sup>-Maus wurde von Prof. Volkmar Gieselmann (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

#### Shiverer/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus

Die Shiverer (Shi) Maus (C3Fe.SWV.B6-Mbp<sup>shi</sup>/J) besitzt eine Deletion im *Mbp*-Gen. Dadurch kann im homozygoten Fall kein kompaktes Myelin im ZNS dieser Maus gebildet werden. Ab dem 12. postnatalen Tag zeigen sich erste neurologische Symptome in Form von Tremor. Die Symptome verstärken sich mit zunehmendem Alter und führen später zu lang anhaltenden Krampfanfällen. Für homozygote Tiere liegt die Lebenserwartung zwischen 50-100 Tagen (Chernoff, 1981; Molineaux *et al*, 1986).

Um die Shiverer-Maus für Transplantationen zu verwenden, wurde zusätzlich der genetische Hintergrund der Rag2<sup>-/-</sup>-Maus eingekreuzt (Shi/Rag2<sup>-/-</sup>, C3Fe.SWV.C57BL/6-Mbp<sup>shi/shi</sup>Rag2<sup>tm1CGN</sup>/J). Die Shiverer-Maus wurde vom Jackson Laboratory (USA) bezogen.

#### Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus

Die Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>(C3Fe.SWV.C57BL/6-ASA<sup>(tm1Gie)</sup>Mbp<sup>(shi/shi)</sup>Rag2<sup>(tm1CGN)</sup>/J)-Maus wurde im Vorfeld durch die Einkreuzung der verschiedenen Mausstämme generiert. Dieses Tiermodell kombiniert den Verlust der Enzymaktivität von Arsa (Arsa<sup>-/-</sup>) mit dem Verlust von kompakten Myelin im ZNS (Shi).

### 2.3.5 Primäre Zellpräparationen

Offizielle Nomenklatur	Labor-bezeichnung	Zelltyp	Herkunft
LB-C-31f	Ctrl-1	Humane Hautfibroblasten	Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Bonn, Deutschland
LB-C-6m	Ctrl-3	Humane Hautfibroblasten	Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA (GM00200)
LB-MLD-1f	aMLD	Humane Hautfibroblasten	Dr. Volkmar Gieselmann; Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn, Deutschland
LB-MLD-3m	liMLD-2	Humane Hautfibroblasten	Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA (GM00243)
LB-MLD-4m	liMLD-3	Humane Hautfibroblasten	Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA (GM00197)
LB-MLD-5m	liMLD-4	Humane Hautfibroblasten	Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA (GM02331)
RG	Ctrl-2	Humane Hautfibroblasten	Raphaela Gorris, Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Bonn, Deutschland
CD1	CD1	Embryonale Mausfibroblasten	Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Bonn, Deutschland

### 2.3.6 Antikörper

#### Primärantikörper

Epitop	Verdünnung	Immunglobulin	Hersteller
473HD	1:300	Ratte IgM	Faissner <i>et al</i> , 1994
4860	1:800	Ratte IgM	Czopka <i>et al</i> , 2009
AFP	1:200	Kaninchen IgG	DAKO
Cd133-APC	1:20	Maus IgG	Miltenyi Biotech
Cd133-Biotin	1:11	biotinylated	Miltenyi Biotech
GFAP	1:1000	Kaninchen IgG	DAKO
GLAST-PE	1:11	Maus IgG	Miltenyi Biotech
HN	1:500	Maus IgG	Life Technologies
Isotyp-PE	1:11	Maus IgG	Miltenyi Biotech
Map2ab	1:500	Maus IgG	Sigma Aldrich
MBP	1:25	Maus IgG	Merck Millipore
Nestin	1:100	Kaninchen IgG	Merck Millipore
NG2	1:100	Kaninchen IgG	Merck Millipore
Nogo-A	1:20	Schaf IgG	R&D Systems
O4	1:100	Maus IgM	R&D Systems
OLIG2	1:500	Kaninchen IgG	Merck Millipore
PDGFR $\alpha$	1:100	Ziege IgG	R&D Systems
SMA	1:200	Maus IgM	DAKO
SOX2	1:100	Maus IgG	R&D Systems
SOX9	1:200	Ziege IgG	R&D Systems
SSEA-4	1:200	Maus IgG	DSHB
STEM121 <sup>TM</sup>	1:1000	Maus IgG	StemCells
STEM123 <sup>TM</sup>	1:1000	Maus IgG	StemCells
Sulph1 (SU:R3)	1:100/400	Maus IgG	Prof. Jan-Eric Måansson
Tra-1-60	1:500	Maus IgM	Merck Millipore
Tra-1-81	1:500	Maus IgG	Merck Millipore
TUBB3	1:1000	Kaninchen IgG	Covance
TUBB3	1:1000	Maus IgG	Covance
Vimentin	1:100	Maus IgM	Merck Millipore

## Sekundärantikörper

Epitop, Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen IgG, Alexa 488/555	1:1000	Life Technologies
anti-Maus IgG, Alexa 488/555	1:1000	Life Technologies
anti-Maus IgG, Biotin	1:200	Dianova
anti-Maus IgM, Alexa 488/555	1:1000	Life Technologies
anti-Ratte IgG, Alexa 555	1:1000	Life Technologies
anti-Ratte IgM, Alexa 488	1:1000	Life Technologies
anti-Schaf IgG, Alexa 555	1:1000	Life Technologies
anti-Ziege IgG, Alexa 555	1:1000	Life Technologies
Streptavidin, Cy3	1:450	Dianova
ZytoChemPlus (HRP) Polymer anti-Maus	/	Zytomed Systems

## 2.3.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurde von *Life Technologies* bezogen.

Gen	Sequenz	Hybridisierungs-temperatur	Produktgröße
ARSA	5'-CTCTCTTGGGACAGACCCCT-3' 5'-GGCGGCCCTAGAGGGTG-3'	60 °C	258 bp
ARSB	5'-GACTCTTACCGTGTCCCAG-3' 5'-GGACAGGAGCTTGTGACGA-3'	60 °C	300 bp
ASCL1	5'-CGGCCAACAAAGAAGATGAGT-3' 5'-TGGAGTAGTTGGGGAGATG-3'	60 °C	150 bp
BLBP	5'-CCAGCTGGGAGAAGAGTTG-3' 5'-CTCATAGTGGCGAACAGCAA-3'	62 °C	196 bp
CD133	5'-GCATGGCATCTTCTATGGTT-3' 5'-CGCCTTGTCCCTGGTAGTGT-3'	60 °C	170 bp
GAPDH	5'-ATGACCCCTTCATTGACCTCAACT-3' 5'-ATACTTCTCATGGTCACACCCAT-3'	60 °C	320 bp
GFAP	5'-TCATCGCTCAGGGAGGTCCTT-3' 5'-CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT-3'	60 °C	383 bp
NES	5'-CAGCGTTGGAACAGAGGT-3' 5'-TGGCACAGGTGTCTCAAGGGTAC-3'	60 °C	389 bp
OLIG2	5'-GCTCGTCTCAAGATCAACAG-3' 5'-CACCAAGTCGCTTCATCTCCTC-3'	60 °C	196 bp
PAX6	5'-GTGTCCAACGGATGTGAG-3' 5'-CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC-3'	60 °C	254 bp
PDGFR $\alpha$	5'-CTATCCACACTGTCAAACAGGTTG-3' 5'-ACTGCTGGACTGAGAAGTTTCATC-3'	60 °C	545 bp
SeV	5'-GGATCACTAGGTGATATCGAGC-3' 5'-ACCAGACAAGAGTTAACAGAGATATGTATC-3'	60 °C	181 bp
SOX2	5'-GTATCAGGAGTTGTCAGGCAGAG-3' 5'-TCCTAGTCTAAAGAGGGCAGCAAAC-3'	60 °C	78 bp
SOX9	5'-GACTCGCCACACTCCTCCT-3' 5'-CTCGATGTTGGAGATGACG-3'	62 °C	234 bp
VIM	5'-GGAAGAGAACTTGCCTGTTG-3' 5'-TCCAGCAGCTCCTGTAGGT-3'	56 °C	174 bp

## 2.4 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Falls nicht abweichend erwähnt, wurden hiPSCs bei 130 x g für 3 min, RGL-NPCs und Fibroblasten bei 300 x g für 5 min zentrifugiert.

Zellzahlen wurden unter Verwendung einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt. Dafür wurden die Zellen in einer 1:4 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung versetzt und in die Zählkammer gegeben. Anschließend wurden 4 Kleinquadrate ausgezählt und die Zellzahl<sub>Gesamt</sub> wie folgt berechnet. Der Faktor 5 berücksichtigt die Tiefe der Zählkammer:

$$\text{Zellzahl}_{\text{Gesamt}} = \frac{\text{Zellzahl}}{4} \times 4 \times 5 \times \text{Vol } (\mu\text{l})$$

Alle Grundmedien sowie die Natrium-Pyruvat-Lösung, NEAA-Lösung, L-Glutamin-Lösung, Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep), 2-Mercaptoethanol-Lösung, das KnockOut<sup>TM</sup> Serum Replacement, fetale Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) und PBS wurden von *Life Technologies* bezogen.

### 2.4.1 Zellkulturmedien

#### 1 x MEF-Einfriermedium

DMEM  
10 % FCS, hitzeinaktiviert  
10 % DMSO

#### MEF-Medium

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

#### DMEM/F-12 hiPSC-Medium

DMEM/F-12  
50 % KnockOut<sup>TM</sup> Serum Replacement  
0,1 mM NEAA  
0,5 mM L-Glutamin  
1 x Pen/Strep  
0,1 mM 2-Mercaptoethanol  
4-10 ng/ml bFGF

#### hiPSC-Medium

KnockOut<sup>TM</sup> DMEM  
20 % KnockOut<sup>TM</sup> Serum Replacement  
0,1 mM NEAA  
1 mM L-Glutamin  
0,1 mM 2-Mercaptoethanol  
4-10 ng/ml bFGF

#### Einfriermedium hiPSC/RGL-NPC

90 % KnockOut<sup>TM</sup> Serum Replacement  
10 % DMSO

#### 2 x MEF-Einfriermedium

DMEM  
20 % FCS, hitzeinaktiviert  
20 % DMSO

#### 5 % Adv. DMEM

Advanced DMEM  
5 % FCS, hitzeinaktiviert  
1 mM L-Glutamin  
1 x Pen/Strep

#### EB-Medium

KnockOut<sup>TM</sup> DMEM  
20 % KnockOut<sup>TM</sup> Serum Replacement  
0,1 mM NEAA  
1 mM L-Glutamin

#### N2-Medium

DMEM/F-12  
1,6 g/l D-Glukose  
1 x N2-Supplement  
0,02 mg/ml Insulin  
0,1 mg/ml humanes Apo-Transferrin  
1 x Pen/Strep

## 2.4.2 Zellkulturreagenzien

### Gelatine (0,1 %)

1 g Gelatine in 1 l ddH<sub>2</sub>O lösen, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

### Matrigel® (MG)

MG bei 4 °C auf Eis ü. N. auftauen lassen. Mit einer vorgekühlten Pipette Aliquots à 1 ml auf Eis pipettieren und bei -20 °C lagern.

### Trypsin-EDTA (TE)

0,5 %ige Trypsin/EDTA Stock-Lösung mit PBS zur gewünschten Konzentration verdünnen und bei 4 °C lagern.

### Kollagenase Typ IV (1 mg/ml)

Kollagenase Typ IV in KnockOut™ DMEM lösen, steril filtrieren und nicht länger als eine Woche bei 4 °C lagern.

### Poly-L-Ornithin (PO, 15 µg/ml)

Stock-Lösung (1,5 mg/ml): 100 mg PO in 67 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren und bei -20 °C lagern. Arbeitslösung: Stock-Lösung 1:100 in ddH<sub>2</sub>O verdünnen und bei 4 °C lagern.

### Trypsin-Inhibitor (TI)

2,5 g Trypsin-Inhibitor in 1 l ddH<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

### Hitzinaktiviertes FCS

FCS bei 37 °C im Wasserbad auftauen und anschließend unter wiederholtem Schütteln bei 56 °C 30 min inkubieren. Aliquots à 50 ml bei -20 °C lagern.

## 2.4.3 Zellkulturlösungen

Reagenz	Konzentration und Lösungsmittel	Lagerung
Apo-Transferrin	10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	-20 °C
Ascorbinsäure	100 mM in ddH <sub>2</sub> O	-20 °C
BDNF	10 µg/ml in 0,1 % BSA in PBS	-20 °C
DNase 1%	10 mg/ml in PBS	-20 °C
EGF	10 µg/ml in 0,1 % BSA/10 mM Eisessig in ddH <sub>2</sub> O	-20 °C
bFGF	10 µg/ml in 0,1 % BSA in PBS	-20 °C
FGF-2	10 µg/ml in 0,1 % BSA in PBS	-20 °C
Forskolin	10 mM in Ethanol	-20 °C
G6P	0,75 M in ddH <sub>2</sub> O	-20 °C
Insulin	5 mg/ml in 10 mM NaOH	-20 °C
M6P	0,75 M in ddH <sub>2</sub> O	-20 °C
Noggin	100 µg/ml in PBS	-20 °C
PDGF-AA	10 µg/ml in 0,1 % BSA/4 mM HCl in ddH <sub>2</sub> O	-20 °C
Trijod-L-Thyronin	30 µg/ml in 0,33 M Natriumhydroxid	-80 °C
Retinsäure	10 mM in DMSO	-80 °C
Y27632	10 mM in ddH <sub>2</sub> O	-20 °C

#### 2.4.4 Oberflächenbeschichtung für Zellkulturschalen

Reagenz	Beschichtung
Poly-L-Ornithin (PO)	Die Zellkulturschalen wurden mit der PO-Lösung bedeckt und ü. N. bei 37 °C inkubiert (PO-Schalen). Vor dem Gebrauch wurde die PO-Lösung abgenommen und die Schalen 2 x mit PBS gewaschen.
Gelatine (0,1 %)	Die Zellkulturschalen wurden mit Gelatine-Lösung bedeckt und mindestens 20 min bei 37 °C inkubiert.
Laminin (Ln)	Die PO-Schalen wurden 2 x mit PBS gewaschen und mit einer 2 µg/ml Ln-Lösung in PBS für mindestens 4 h bei 37 °C oder ü. N. bei 4 °C beschichtet (PO/Ln-Schalen).
Matrigel® (MG)	Das MG wurde über Nacht bei 4 °C auf Eis aufgetaut. Mit einer vorgekühlten Pipette wurde 1 ml MG in 29 ml gekühltem DMEM/F-12 Medium gelöst. Die Zellkulturschalen wurden mit der verdünnten MG-Lösung für 4 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C beschichtet.

#### 2.4.5 Mitotische Inaktivierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten

Die MEFs wurden aus Embryonen des Mausstammes CD1 gewonnen und zur Expansion, Bestrahlung und weiteren Verwendung als sogenannte *Feeder*-Zellen zur Verfügung gestellt. Die *Feeder*-Zellen dienten der Kokultivierung mit humanen Stammzellen, um so deren Wachstum und Erhaltung der Pluripotenz während der Proliferation zu gewährleisten (Lim & Bodnar, 2002).

Bevor MEFs als *Feeder*-Zellen verwendet werden konnten, wurden sie mittels  $\gamma$ -Bestrahlung mitotisch inaktiviert. Die zuvor isolierten MEFs wurden bei Passage (P) 0 eingefroren. Ein Kryoröhrchen wurde auf 3 x 15 cm Zellkulturschalen aufgetaut und bis P3 expandiert. Dafür wurde das gefrorene Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C angetaut, die Zellsuspension in 9 ml vorgewärmten MEF-Medium aufgenommen und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden in frischem MEF-Medium als P1 ausplattiert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie mit 0,05 % TE abgelöst, die enzymatische Reaktion mit MEF-Medium gestoppt, und die Zellen durch Zentrifugation gesammelt. Anschließend wurden sie auf neue Zellkulturschalen ausplattiert, wobei im ersten Expansionsschritt die Zellen von 3 auf 10 und im zweiten von 10 auf 30 x 15 cm Zellkulturschalen ausplattiert wurden. Das Medium wurde während der Expansion alle 2-3 Tage erneuert. Zellen von konfluenten P3-Zellkulturschalen wurden mit 0,05 % TE gelöst, die Reaktion mit MEF-Medium gestoppt und die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert. Sie wurden in 30 ml MEF-Medium aufgenommen und in eine T175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit geschlossenem Deckel überführt. Die mitotische Inaktivierung erfolgte durch die Bestrahlung der Zellen mit 15 Gy in einem  $\gamma$ -Bestrahlungsgerät (160 kV, 25 mA für 6 min, 45 s).

Anschließend wurden die  $\gamma$ -bestrahlten MEFs oder auch *Feeder*-Zellen zur weiteren Lagerung und Verwendung eingefroren. Hierfür wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert. In einem Kryoröhrchen wurden je  $2,4 \times 10^6$  Zellen in 1 ml 1 x MEF-Einfriermedium eingefroren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in der Hälfte des entsprechenden Volumens an DMEM-Grundmedium gelöst, sukzessive mit gekühltem 2 x MEF-Einfriermedium gemischt, in Kryoröhrchen gefüllt und in eine auf -20 °C vorgekühlte Styroporbox überführt. Nach 1 h bei -20 °C wurden die Zellen ü. N. bei -80 °C gelagert und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

## 2.4.6 Generierung, Charakterisierung und Kultivierung von humanen iPSCs

Für die Generierung von hiPSCs wurde das *CytoTune<sup>TM</sup>-iPS Sendai Reprogramming Kit* verwendet. Dieses Kit basiert auf der Reprogrammierung von somatischen Zellen mit Hilfe von nicht-integrativen Sendaiviren (Fusaki *et al*, 2009). Die Viren kodieren für die Transkriptionsfaktoren *c-MYC*, *KLF4*, *OCT-4* und *SOX2*. Nach Entstehung der gewünschten Stammzellkolonien werden die Viren nach einigen Passagen aus den Zellen ausgeschleust. Die Existenz der Viren kann mit Hilfe von entsprechenden Oligonukleotiden, die die Virussequenz erkennen und der Expression des Hämagglutinin-Neuraminidase(HN)-Proteins an der Zelloberfläche überprüft werden.

### Reprogrammierung der Hautfibroblasten

Für die Reprogrammierung mussten zuerst die Hautfibroblasten aufgetaut werden. Dafür wurde das gefrorene Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C angetaut, die Zellsuspension in 9 ml vorgewärmten MEF-Medium aufgenommen und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden in frischem MEF-Medium auf unbeschichtete Zellkulturschalen oder -flaschen ausplattiert. Zum Start der Reprogrammierung wurden an Tag 1 150.000 Fibroblasten pro Vertiefung einer MG-beschichteten 12-Well Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Viren nach Herstellerangaben in 5 % Adv. DMEM verdünnt und auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden diese durch Zentrifugation bei 37 °C, 3000 x g und 45 min mit den Viren infiziert. Die darauffolgenden Tage wurde das Medium der infizierten Zellen jeden Tag erneuert. An Tag 6 nach der Infektion wurden entsprechende 10 cm Zellkulturschalen mit *Feeder*-Zellen vorbereitet, wobei ein Kryoröhrchen auf eine 10 cm Zellkulturschale aufgetaut wurde. Einen Tag später wurden 100.000 infizierte Zellen pro 10 cm Zellkulturschale in 5 % Adv. DMEM-Medium ausgesät. Um Apoptose zu verringern und das Überleben der infizierten Zellen zu steigern, wurden diese 1 h vor Ablösung mit 10 µM Rho Kinase Inhibitor Y (Y27632, ROCK-Inhibitor) inkubiert (Ishizaki *et al*, 2000; Watanabe *et al*, 2007). Anschließend wurden sie mit 0,025 % TE abgelöst und die Reaktion mit 50 %igem TI gestoppt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation gesammelt und entsprechend ausgesät. Einen Tag später wurde das Medium zu DMEM/F-12-basierten hiPSC-Medium gewechselt und alle zwei Tage erneuert. Die ersten Kolonien konnten 4-7 Wochen nach der Infektion gepickt werden. Das Picken der Kolonien wurde unter einer Horizontal-Sterilbank mit Hilfe eines Stereomikroskops durchgeführt. Gepickte Kolonien wurden trituriert und zusammen mit ROCK-Inhibitor auf *Feeder*-Zell-beschichtete 12-Well Zellkulturplatten überführt. Entstandene iPSC-Klone wurden mindestens 5 x passagiert, bevor sie eingefroren oder zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung verwendet wurden.

### Charakterisierung der generierten iPSCs

Ausgewählte Klone (3 Linien pro Patient) wurden zur Charakterisierung herangezogen. Dafür wurde die Expression verschiedener Pluripotenzmarker (*Tra-1-60*, *Tra-1-81* und *SSEA-4*) sowie des HN-Proteins mittels immunozytochemischer Färbungen (siehe Punkt 2.5.9) überprüft. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) wurde mit dem *Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III SK-5300* untersucht. Wie oben bereits erwähnt wurde zusätzlich die Expression der Sendaivirus-assoziierten Gene mittels spezifischen Oligonukleotiden und RT-PCR (RT: *reverse transcription*; PCR: *polymerase chain reaction*) überprüft. Um die genomische Integrität der hiPSCs zu untersuchen, wurde eine genomweite Einzelnukleotid-Polymorphismus (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) Analyse wie in Punkt 2.5.6

beschrieben durchgeführt. Die Differenzierung in alle drei Keimblätter wurde *in vitro* und *in vivo* (Teratomanalyse, Wesselschmidt, 2011) überprüft (siehe Punkt 2.4.7 und 2.5.10).

#### Kultivierung und Passagieren der generierten iPSCs

Die generierten hiPSCs wurden nach Standardprotokollen in hiPSC-Medium auf *Feeder*-Zellen kultiviert (Thomson *et al*, 1998). Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert und das Medium wurde täglich erneuert. Einen Tag vor dem Passagieren der hiPSCs wurden *Feeder*-Zellen in einem Verhältnis von einem Kryoröhrchen auf zwei gelatinebeschichtete 6-Well-Zellkulturplatten in MEF-Medium aufgetaut. Dazu wurden die eingefrorenen *Feeder*-Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspension in 9 ml vorgewärmtem MEF-Medium aufgenommen und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden in frischem MEF-Medium in Suspension gebracht, auf die 6-Well-Zellkulturplatten überführt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die hiPSC-Kolonien mit 1 mg/ml Kollagenase Typ IV-Lösung für 60 min bei 37 °C abgelöst, mit PBS abgespült und durch Zentrifugation gesammelt. Die hiPSCs wurden mechanisch durch mehrfaches Triturieren mit einer 1 ml Feinpipette zerkleinert und in einem Verhältnis von 1:3 in hiPSC-Medium auf die vorbereiteten *Feeder*-Zellen überführt.

#### Kryokonservierung der generierten iPSCs

Um hiPSCs zu lagern, wurden sie als Einzelzellsuspension eingefroren. Hierfür wurden die Kulturen zunächst für 60 min bei 37 °C mit 10 µM ROCK-Inhibitor behandelt, anschließend mit PBS gewaschen und 5-10 min bei Raumtemperatur (RT) mit Alfazym inkubiert bis einzelne hiPSCs durch sanftes Klopfen von der Schale gelöst werden konnten. Die Zellen wurden mit PBS abgespült, zur Einzelzellsuspension trituriert und durch Zentrifugation bei 4 °C und 300 x g für 5 min gesammelt. Danach wurde das Zellpellet im Einfriermedium resuspendiert, wobei die Zellen aus einem Well einer 6-Well-Zellkulturplatte in 1 ml in einem Kryoröhrchen eingefroren wurden. Die Zellen wurden langsam bei -80 °C eingefroren und für die Langzeitlagerung am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Um hiPSCs aufzutauen, wurden einen Tag zuvor auf entsprechende 6-Well Zellkulturplatten wie oben beschrieben frische *Feeder*-Zellen ausgesät. Eingefrorene hiPSCs wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, die Zellsuspension in 9 ml vorgewärmtem hiPSC-Medium aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 210 x g). Ein Kryoröhrchen wurde auf eine 6-Well Zellkulturplatte mit *Feeder*-Zellen in frischem hiPSC-Medium mit 10 µM ROCK-Inhibitor ausgesät.

#### **2.4.7 Keimblattdifferenzierung *in vitro***

Für die *in vitro*-Keimblattdifferenzierung wurden die hiPSCs als intakte Kolonien mittels Kollagenase Typ IV wie in Punkt 2.4.6 beschrieben abgelöst und bei 4 °C und 130 x g für 3 min gesammelt. Anschließend wurden sie ohne zu trituriert in hiPSC-Medium auf nicht-adhäsive 10 cm Zellkulturschalen überführt. Am nächsten Tag hatten sich aus den hiPSC-Kolonien freischwimmende runde EBs gebildet. Das Medium wurde zu EB-Medium gewechselt und die Aggregate für 7 Tage kultiviert, wobei alle 2 Tage das Medium erneuert wurde. Anschließend wurden sie auf MG-beschichtete 6 cm Zellkulturschalen plattiert und das Medium am darauffolgenden Tag gewechselt. Für die Differenzierung in ektodermales Gewebe wurden die plattierten EBs in N2-Medium und für die Differenzierung in Derivate von Mesoderm und Endoderm im MEF-Medium kultiviert. Drei Wochen später konnten die aus den

EBs ausgewachsenen und differenzierten Zellen mittels immunzytochemischer Färbungen (siehe Punkt 2.5.9) analysiert werden.

#### 2.4.8 Generierung und Kultivierung von RGL-NPCs

Die Generierung von RGL-NPCs erfolgte nach einem an hESCs etablierten Protokoll (Gorris *et al*, 2015). Dieses basiert auf der Bildung von EBs und der Differenzierung in einem Medium mit absteigender Konzentration von ATRA.

Um die neurale Differenzierung zu starten, wurden hiPSCs so lange kultiviert bis sie große und andifferenzierte Kolonien gebildet hatten. Diese wurden mit Hilfe von Kollagenase Typ IV wie in Punkt 2.4.6 beschrieben als intakte Kolonien abgelöst und durch Zentrifugation (4 °C, 130 x g, 3 min) abgesetzt. Anschließend wurden sie ohne zu trituriert in hiPSC-Medium auf unbeschichteten 10 cm Zellkulturschalen überführt und ü. N. kultiviert. Die mit überführten *Feeder*-Zellen sollten dadurch entfernt werden und sich absetzen. Am darauffolgenden Tag hatten sich aus den hiPSC-Kolonien nicht-adhäsente runde EBs gebildet, die im weiteren Verlauf auf nicht-adhäsive 10 cm Zellkulturschalen überführt und für 7 Tage in EB-Medium kultiviert wurden. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Um die neurale Differenzierung zu initiieren, wurden die EBs in Medium überführt, das zu gleichen Teilen aus EB-Medium und N2-Medium bestand. Am nächsten Tag wurde dem Medium 10 µM ATRA zugefügt und einen weiteren Tag später wurde das Medium vollständig zu N2-Medium gewechselt, dem neben 10 µM ATRA auch 1 % B27-*Supplement*, 20 ng/ml *epidermal growth factor* (EGF) und 30 ng/ml T3 zugefügt wurde. Das Medium wurde täglich erneuert. Nach weiteren 7 Tagen wurde dem Medium keine zusätzliche ATRA zugefügt und ein Medienwechsel erfolgte für 14 Tage jeden zweiten Tag. Für eine weitere Woche wurden die EBs in N2-Medium kultiviert, dem 1 % B27-*Supplement* ohne Retinsäure, 20 ng/ml EGF und 30 ng/ml T3 zugesetzt wurde. Das Medium wurde weiterhin jeden zweiten Tag erneuert. Im letzten EB-Kultivierungsschritt wurden die EBs im zuletzt verwendeten Medium auf MG-beschichtete 10 cm Zellkulturschalen überführt. Nicht-adhäsente Aggregate wurden am nachfolgenden Tag mit einem Medienwechsel entfernt, und die Zellen wurden für eine Woche zusätzlich mit 20 ng/ml FGF-2 kultiviert. Es erfolgte jeden zweiten Tag ein Medienwechsel, wobei an den übrigen Tagen den Kulturen je 20 ng/ml EGF und FGF-2 zugefügt wurde.

#### Isolierung der RGL-NPCs mittels FACS

Aus den platierten EBs wuchsen heterogene Zellpopulationen heraus, die unter anderen Kolonien mit bipolaren Zellen beinhalteten. Die RGL-NPCs wurden mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (*Fluorescent activated cell sorting*, FACS) angereichert. Alle durchflusszytometrischen Experimente wurden von der Flow Cytometry Core Facility am Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie der Universität Bonn durchgeführt. Zur Anreicherung neuraler Zellen aus platierten EBs wurden die Zellen mit 0,05 % TE und TI abgelöst und trituriert. Die Zellen wurden durch ein 40 µm-Zellsieb gegeben, um eine Einzelzelluspension zu erhalten. Die Zellkonzentration wurde auf  $10^6$  Zellen/50 µl in FACS Block-Lösung eingestellt. Dann wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Anschließend wurde ein APC-konjugierter anti-CD133 Antikörper in einer Verdünnung von 1:20 hinzugefügt, kurz mit den Zellen vermischt und für weitere 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch die Zugabe von PBS entfernt und die Zellen im Anschluss durch Zentrifugation sedimentiert. Sie wurden anschließend in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in FACS-Puffer resuspendiert. Unmittelbar vor dem Sortieren wurde

20 µg/ml DNase zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension durch eine 40 µm-Nylonmembran pipettiert. Um zwischen lebenden und toten Zellen differenzieren zu können, wurde 500 ng/ml Propidiumiodid hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit einem FACS® DiVa Sortierer durch eine 90 µm Düse sortiert.

<u>FACS Block-Lösung</u>	<u>FACS-Puffer</u>
PBS mit	PBS mit
0,1 % BSA	0,1 % BSA
5 % NGS	

### Kultivierung der generierten RGL-NPCs

Aus hiPSCs abgeleitete RGL-NPCs wurden in N2-Medium unter dem Einfluss von je 20 ng/ml EGF und FGF-2 auf PO/Ln-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. An einem Tag wurde das Medium gewechselt, am nächsten Tag wurden die Faktoren erneut dem Medium zugegeben. Konfluente Zellen wurden mit 0,025 % TE und 50 % TI in einem Verhältnis von 1:2 passagiert. Um die RGL-NPCs zu lagern, wurden konfluente 6 cm Zellkulturschalen jeweils in 1 ml Einfriermedium in 1 Kryoröhrchen eingefroren. Die Zellen wurden wie Fibroblasten im entsprechenden Medium sowie auf entsprechende Zellkulturschalen aufgetaut.

### **2.4.9 Oligodendrogliale, astrogiale und neuronale Differenzierung von RGL-NPCs**

#### Oligodendrogliale Differenzierung

Die Differenzierung in Oligodendrozyten erfolgte nach dem an hESC-abgeleiteten RGL-NPCs etablierten 3-stufigen Differenzierungsprotokoll (Gorris *et al*, 2015). Im ersten Schritt wurden die RGL-NPCs in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro MG-beschichtete 3 cm Zellkulturschale in N2-Medium (je 20 ng/ml EGF und FGF-2) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium zu N2-Medium mit 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml PDGF-AA und 10 µM Forskolin gewechselt. Über 2 Wochen wurde die Hälfte des Mediums alle 2-3 Tage erneuert. Im zweiten Schritt wurde dem N2-Medium 1 Woche neben 10 ng/ml PDGF-AA auch 30 ng/ml T3, 500 ng/ml Noggin sowie 200 µM Ascorbinsäure (*ascorbic acid*; AA) zugefügt. Ein halber Mediumwechsel erfolgte wiederum alle 2-3 Tage. Im letzten Schritt wurde das N2-Medium mit 30 ng/ml T3, 200 µM AA und 2 µg/ml Ln versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen für mindestens vier weitere Wochen kultiviert und das Medium alle 2-3 Tage zur Hälfte gewechselt.

#### Astrogiale Differenzierung

Für die Differenzierung von hiPSC-abgeleiteten RGL-NPCs in Astrozyten wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro PO/Ln-beschichteter 3 cm Zellkulturschale in N2-Medium mit je 20 ng/ml EGF und FGF-2 ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert, die Wachstumsfaktoren entzogen und dem Medium 10 % FCS zugefügt. Das Medium wurde über 14 Tage alle 3-4 Tage gewechselt.

### Neuronale Differenzierung

Die neuronale Differenzierung von hiPSC-abgeleiteten RGL-NPCs erfolgte auf MG-beschichteten 3 cm und 6 cm Zellkulturschalen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  bzw.  $2,2 \times 10^6$  Zellen pro Schale in N2-Medium (je 20 ng/ml EGF und FGF-2) ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt, die Wachstumsfaktoren entzogen und die Zellen unter dem Einfluss von 20 ng/ml *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) für 3-6 Wochen kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

### **2.4.10 Quantitative Durchflusszytometrie**

Die RGL-NPCs wurden mit 0,025 % TE und 50%igem TI abgelöst, gezählt und durch Zentrifugation gesammelt. Die Zellkonzentration wurde auf  $10^6$  Zellen/100  $\mu$ l in FACS Block-Lösung eingestellt. Pro Zelllinien wurden 2 Ansätze vorbereitet. Die Zellsuspensionen wurden zunächst 15 min auf Eis geblockt. Anschließend wurde sie für weitere 12 min mit einem PE-gekoppelten GLAST-Antikörper bzw. der dazugehörigen Isotypkontrolle (Maus IgG-PE) bei 4 °C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch die Zugabe von PBS entfernt. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die quantitative, durchflusszytometrische Analyse wurde in einem FACS Calibur Durchflusszytometer durchgeführt. Für die spätere Auswertung der ermittelten Ergebnisse mittels FlowJo 8.7 Software wurden *Forward Scatter*, *Side Scatter* und die Fluoreszenz aufgenommen.

### **2.4.11 Quantifizierung der Zellen**

Die Quantifizierung der neural differenzierten Zellen erfolgte an immunzytochemisch angefärbten Kulturen. Die Bilder wurden mit dem Zeiss Axiolmanager.Z1/ApoTome aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe der ImageJ 1.42q Software gezählt. In einem Gesichtsfeld wurden alle DAPI-positiven Zellen sowie alle Zellen, die positiv für einen zellspezifischen Marker waren, quantifiziert. Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil dieser Zellen mit Hilfe von Excel 2008 berechnet und schließlich aus den Zahlen der unterschiedlichen Gesichtsfelder unter Verwendung von Prism6 der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt sowie eine Grafik erstellt. In den oligodendroglialen Kulturen wurden die O4-positiven Zellen gezählt und jeweils drei Gesichtsfelder in drei unabhängigen Experimenten ausgewertet. Für die astroglialen Kulturen wurden GFAP-positive Zellen in drei Gesichtsfelder von drei unabhängigen Experimenten quantifiziert. Bei den neuronal differenzierten Kulturen wurden jeweils zwei Gesichtsfelder in zwei unabhängigen Experimenten herangezogen und die TUBB3-positiven Zellen gezählt.

### **2.4.12 Behandlung der MLD-RGL-NPCs mit rhARSA**

Um RGL-NPCs mit rekombinanter humaner Arylsulfatase A (rhARSA) zu behandeln, wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Bevor die Zellen behandelt wurden, wurden sie 1 x mit PBS gewaschen, und das Medium anschließend im entsprechenden Volumen auf die Zellen gegeben und für 24 h inkubiert. Um eine bessere Aufnahme des ARSA-Proteins zu erhalten, wurde den Zellen zusätzlich 0,3 % BSA hinzugefügt (Matthes *et al*, 2011). Nach der Behandlung wurde der Überstand gesammelt und die Zellen zunächst 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem sauren Waschpuffer für 3 min inkubiert, um

mögliches Protein, welches an der Zelloberfläche haftet, zu entfernen (Bockenhoff *et al*, 2014). Danach wurden die Zellen erneut 2 x mit PBS gewaschen und pelletiert. Sie wurden entweder direkt weiter verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Um die Aufnahme von ARSA über den M6P-Weg zu hemmen, wurde zusätzlich bei der Behandlung der Zellen M6P (7,5 mM) zu den Kulturen hinzugefügt. Um einen Unterschied der ARSA-Aufnahme durch eine Veränderung der Osmolarität im Medium auszuschließen, wurde als Kontrolle neben M6P immer ein Ansatz mit Glukose-6-Phosphat (G6P; 7,5 mM) durchgeführt (Bockenhoff *et al*, 2014).

Das rhARSA wurde von Dr. Ulrich Matzner (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und gemäß Matthes *et al*, 2012 hergestellt.

**Saurer Waschpuffer**

50 mM Glycin, 150 mM NaCl

Zusätze in H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert auf 3,0 einstellen, bei 4 °C lagern.

#### **2.4.13 Bestimmung des intrazellulären Sulfatidmetabolismus**

Für die Bestimmung des Sulfatidmetabolismus der RGL-NPCs wurden die Zellen in einer Dichte von  $0,6 \times 10^6$  Zellen pro Well einer MG-beschichteten 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen 24 h mit konzentriertem konditioniertem Überstand bzw. rhARSA wie in Punkt 2.4.12 behandelt. Nach einem zweifachen Waschschritt mit PBS wurden die Zellen in N2-Medium ohne Phenolrot kultiviert (je 20 ng/ml EGF und FGF-2). Anschließend wurden sie für 6 h mit 5 nmol des fluoreszenzmarkierten Sulfatidanalogs N-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-cerebroside 3-sulfate (NBD-Sulfatid; Matreya, Pleasant Gap, PA, USA) inkubiert (nach Monti *et al*, 1992). Im Anschluss wurden sie in PBS gewaschen und für weitere 18 h in frischem N2-Medium ohne Phenolrot (je 20 ng/ml EGF und FGF-2) gehalten. Wenn NBD-Sulfatid abgebaut wird, entstehen neben NBD-Galactosylceramid noch weitere NBD-markierte Abbauprodukte, die aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit des Fluorophors von den Zellen in das Medium abgegeben werden. Die Gesamtlipide wurden aus dem Medium durch Festphasenextraktion isoliert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Durch die angehängte Fluoreszenz können die Banden der Abbauprodukte mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners bei einer Wellenlänge von 473 bzw. 537 nm detektiert werden. Die Präsenz der Banden der Abbauprodukte kann als Indikator für die Funktionalität der zellulären ARSA herangezogen werden. Das Experiment wurde zum größten Teil im Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bonn durch Herrn Dr. Ulrich Matzner durchgeführt.

### **2.5 Molekularbiologie**

#### **2.5.1 Ernte von Zellen**

Für die Isolation von RNA, genomicscher DNA oder Protein müssen die Zellen zuerst geerntet werden. Bei hiPSC-Kolonien wurden die Zellen entsprechend des Passagievorgangs mit Hilfe von Kollagenase Typ IV gewonnen, um eine mögliche Kontamination durch *Feeder*-Zellen zu vermeiden. Bei allen anderen Zelltypen wurden die lebenden Zellen 1 x mit PBS gewaschen, um diese anschließend in PBS mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale zu lösen und mittels Zentrifugation (4.000 U/min und 4 °C für 5 min) zu sedimentieren. Die Zellpellets wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C eingefroren.

## 2.5.2 Isolation von RNA

Die Gesamt-RNA der Zellen wurde unter Verwendung des *Quick-RNA™ MiniPrep Kit* gemäß Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde in 40 µl DNase- und RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde eine Verdauung mit DNase I vorgenommen. Hierfür wurde die RNA-Lösung mit je 5 µl DNase-Puffer und DNase versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl 25 mM EDTA wurde die DNase für 10 min bei 65 °C unter leichter Rotation inaktiviert. Der Gehalt an RNA wurde mit Hilfe des Nano Drop (ND)-1000 gemessen. Danach konnte die RNA für weitere Experimente verwendet werden oder wurde bei -80 °C gelagert.

## 2.5.3 Isolation von genomicscher DNA

Für die Isolation von genomicscher DNA wurde das *DNeasy® Blood & Tissue Kit* laut Herstellerangaben verwendet. Der Gehalt an genomicscher DNA wurde mit Hilfe des ND-1000 gemessen. Die eluierte genomicsche DNA wurde direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

## 2.5.4 Isolation von Proteinen

Für die Isolation von Proteinen für den ARSA-Enzymaktivitätsassay wurde das Pellet in eiskaltem TN-101-Puffer resuspendiert. Das Volumen der Pufferlösungen variierte entsprechend der Pelletgröße, und die Isolation fand weitestgehend auf Eis bzw. bei 4 °C statt. Im nächsten Schritt wurde die Proteinlösung für 3 min in einem Ultraschallbad behandelt. Das führt zum Aufschluss der Zellwände. Anschließend wurden die Lysate bei 13.000 U/min und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand gesammelt, der entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert wurde.

### TN-101-Puffer

0,5 % TritonTM TN-101 werden in 1x TBS pH 7,0 gelöst und bei 4 °C gelagert. Der Puffer kann bis zu einer Woche gelagert werden.

### Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentrationen der Zelllysate zu bestimmen wurde das *Pierce® BCA Protein Assay Kit* gemäß Herstellerangaben verwendet. Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe (2 mg/ml; 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml, 0,025 mg/ml und 0,0 mg/ml) mit bovinem Serumalbumin (BSA) in TN-101-Puffer angesetzt. Es wurden jeweils 12,5 µl der Verdünnungen mit 100 µl der Arbeitslösung des Kits vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm im ND-1000 gemessen. Mit den daraus ermittelten Werten wurde eine Standardkurve erstellt, mithilfe derer die Proteinkonzentrationen von unbekannten Proteinproben unter Verwendung des Kits bestimmt werden konnten. Als Leerwert dienten die Pufferlösungen.

## 2.5.5 RT-PCR

Im Vorfeld wurde die RNA mit dem *iScript™ cDNA Synthese Kit* gemäß Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Der cDNA Gehalt wurde mit dem ND1000 gemessen und die Konzentrationen entsprechend mit ddH<sub>2</sub>O angeglichen. Alle PCRs wurden in Thermocyclern der Firma Biometra mit der GoTaq® Flexi DNA Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur (X) variierte je nach Oligonukleotidpaar. Alle Proben wurden anhand der Expression von

GAPDH normiert. Als Positivkontrolle diente cDNA, die aus humaner fetaler Hirn-RNA (*Agilent Technologies/540157*) synthetisiert wurde.

Die Reaktionskomponenten und Zykluskonditionen waren wie folgt:

1x Reaktionsansatz:

Green GoTaq® Flexi Puffer	1x	94 °C	2 min	
dNTPs (10 mM)	0,4 mM	94 °C	30 s	
Oligonukleotid-Mix (100 µM)	8,0 µM	X °C	30 s	
cDNA	6 ng	72 °C	30 s	
GoTaq® DNA Polymerase	1,25 U	72 °C	10 min	
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl	4 °C	∞	

30-36  
Zyklen

Zur Darstellung der amplifizierten PCR-Produkte wurde die DNA über ein 1,5 %iges (in 1 x TAE-Puffer + 1 ng/ml Ethidiumbromid) Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert.

50 x Tris-Acetat EDTA (TAE)-Puffer

2 M Tris, 50 mM EDTA pH 8,0, 1 M Eisessig

Reagenzien in H<sub>2</sub>O lösen bzw. mischen und bei RT lagern, für Einfachkonzentrierung 1:50 mit H<sub>2</sub>O verdünnen.

0,5 M EDTA Lösung (für 50 x TAE)

0,5 M EDTA in ddH<sub>2</sub>O bei alkalischem pH (NaOH Plättchen) lösen, pH-Wert mit 1 M HCl auf 8,0 einstellen, Volumen auf 1 l mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

## 2.5.6 Einzelnukleotid-Polymorphismus Analyse

Für die SNP-Analyse wurde die genomische DNA wie in Punkt 2.5.3 beschrieben isoliert. Der Elutionsschritt wurde anstatt mit dem zur Verfügung gestellten Puffer mit TE-4-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde der DNA-Gehalt mit Hilfe des ND-1000 gemessen und die Konzentration der DNA auf 60 ng/µl eingestellt. Die SNP-Analyse wurde am Institut für Humangenetik der Universität Bonn durchgeführt. Die genomische DNA wurde fragmentiert und an sequenzspezifische Oligomere, die an *Beads* an einem *HumanCytoSNP-12 DNA Analysis BeadChip* von Illumina® gebunden waren, hybridisiert. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der von Illumina® bereitgestellten Software *BeadStudio* und *GenomeStudio*.

TE-4-Puffer

10 mM Tris base, 0,1 mM EDTA

Reagenzien in H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert auf 8,0 einstellen, bei 4 °C lagern.

## 2.5.7 Sequenzierung der Mutationen im ARSA-Gen

Die Mutationen im ARSA-Gen der MLD-Patienten, die vom *Coriell Institute for Medical Research* (USA) erhalten wurden, waren nicht bekannt. Sie wurden wie folgt ermittelt:

Das ARSA-Gen liegt auf Chromosom 22 (22q13.33) und beinhaltet 8 Exons (Kreysing *et al*, 1990). Aufgrund der Größe von 3 kb der kodierenden Region wurden zunächst fünf Oligonukleotidpaare, die die gesamte Sequenz, einschließlich Stop- und Start-Codon sowie Exons und Introns abdecken, konstruiert (Quelle: NG\_009260.2, NCBI; Kreysing *et al*, 1990). Die Oligonukleotidpaare wurden unter bestimmten Bedingungen generiert. Das 5'- und 3'-Ende sollte mit der Base C oder G beginnen bzw. enden, wobei das 3'-Ende nicht mehr als drei Basen der Base C bzw. G beinhalten sollte. Die Länge eines Oligonukleotids sollte zwischen 18 und

22 bp liegen und die Hybridisierungstemperatur zwischen 52 und 58 °C, wobei die Temperaturen zwischen den beiden Oligonukleotidpaaren nicht mehr als 2 °C voneinander abweichen sollten. Ein weiteres Kriterium war der Gehalt an GCs, der zwischen 40 und 60 % liegen sollte. Die Lage der Oligonukleotide eines Paares in der Gensequenz sollte so gewählt werden, dass sie mindestens 500 bp auseinander liegen. Wenn Oligonukleotidpaare mit Hilfe dieser Kriterien im ARSA-Gen ermittelt worden waren, wurden sie zusätzlich auf zweifache Basenwiederholungen und lange Reihe an einzelnen Basen überprüft, wobei beides ein Ausschlusskriterium darstellte. Um die Oligonukleotide zu erstellen, wurden verschiedene Programme, wie ApE, Primer BLAST (NCBI) und *Oligonucleotide Properties Calculator* verwendet. Unter Berücksichtigung der genannten Kriterien ergaben sich folgende Oligonukleotidpaare für die Sequenzierung des gesamten ARSA-Gens:

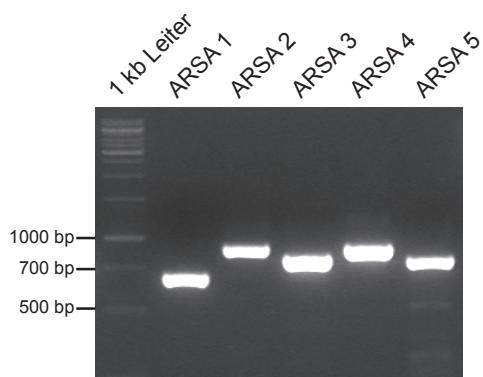
Name	Sequenz	Hybridisierungs-temperatur	Produktgröße
ARSA 1	5'-AGAGCCTGCTGGAGCCAAGTAG-3' 5'-GTGGTTCCCTACCTGGTCGTG-3'	60 °C	680 bp
ARSA 2	5'-CTCTACCACCTCCAACCTGGAC-3' 5'-CTGAAC TGAGGGTAGTGGGTGTG-3'	58 °C	908 bp
ARSA 3	5'-CAGTGCTAACTCCAGTCTTGC-3' 5'-AAGGTGACATTGGGCAGTGG-3'	60 °C	820 bp
ARSA 4	5'-GGTCTCTTGCAGGTGGAAAGG-3' 5'-CAGGTTGAGTTCTCACCAGGGTC-3'	62 °C	896 bp
ARSA 5	5'-CCTCGGCAGTCTCTCTTCTC-3' 5'-TCAAATCCCAGCCCCAACCTC-3'	60 °C	816 bp

Um die Mutation der einzelnen Patienten im ARSA-Gen zu überprüfen, wurde aus den Hautfibroblasten die genomische DNA wie in Punkt 2.5.3 isoliert und anschließend unter folgenden Bedingungen mit den Oligonukleotidpaaren ARSA 1-5 mittels PCR amplifiziert. Die Reaktionskomponenten und Zyklenkonditionen waren wie folgt:

1x Reaktionsansatz:

LongAmp® Puffer	5x	94 °C	30 s	
dNTPs (10 mM)	0,3 mM	94 °C	20 s	
Oligonukleotid-Mix (100 µM)	8 µM	60 °C	35 s	
DNA (100 ng/µl)	100 ng	65 °C	2 min	
LongAmp® Taq	1 µl	65 °C	10 min	
H <sub>2</sub> O	Ad 25 µl	4 °C	∞	
				34 Zyklen

In Abb. 9 ist beispielhaft das Ergebnis einer PCR einer Patientenlinie dargestellt. Hierfür wurden jeweils 1/5 der entstandenen PCR-Amplifikate verwendet und mit 10 x Agarosegel Probenpuffer versetzt. Alle Banden der fünf Amplifikate ließen auf der richtigen Höhe (Abb. 9). Im nächsten Schritt wurden die übriggebliebenen 4/5 der PCR-Amplifikate mittels *DNA Clean & Concentrator™-5 Kit* aufgereinigt und in mindestens 10 µl DNA Waschpuffer eluiert.



**Abb. 9: PCR-Amplifikate der Oligonukleotide ARSA 1-5.**

Die PCR wurde beispielhaft an der genomischen DNA des Patienten liMLD-4 dargestellt. Anhand der Basenpaarlänge und dem Vergleich mit der 1 kb DNA-Leiter kann festgestellt werden, ob die Oligonukleotide die richtigen DNA-Fragmente erkannt haben. Oligonukleotidpaar ARSA 1 bildet ein 680 bp großes Amplifikat, ARSA 2 ein 908 bp, ARSA 3 ein 820 bp, ARSA 4 ein 896 bp und ARSA 5 ein 816 bp.

Für die abschließende Sequenzierung (durchgeführt von Seqlab) wurde das aufgereinigte PCR-Produkt wie folgt eingesetzt:

Ansatz pro Oligonukleotid:

Tris-HCl 0,1 M, pH 8,4	0,7 $\mu$ l
Oligonukleotid (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
DNA (200-300 ng)	4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1,3 $\mu$ l

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse wurden mit Hilfe der *Lasergene 11* Software von DNASTar® für jede Patientenlinie einzeln zusammengefügt. Es wurden kodierende und nicht-kodierende Sequenzen ab dem Start- bis zum Stopcodon berücksichtigt. Unter Verwendung eines Nukleotid BLAST Programms (NCBI) und dem Vergleich zur wildtypischen humanen ARSA-Sequenz konnten so Veränderungen in der Basensequenz festgestellt werden und vor allem Mutationen an Schnittstellen von Exons und Introns aufgedeckt werden. Zur weiteren Identifizierung von Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führten, wurden die Sequenzen der Patientenlinien unter ausschließlicher Berücksichtigung der kodierenden Sequenzen mit Hilfe des *EMBOSS Transeq Tool* (EMBL-EBI) in die entsprechenden Aminosäure- bzw. Proteinsequenz umgewandelt. Der Vergleich zur wildtypischen humanen ARSA-Proteinsequenz mittels eines Protein BLAST Programms (NCBI) konnte Austausch, Deletion und Duplikation von Aminosäuren aufdecken. Wenn alle Mutationen der Patientenlinie bekannt waren, wurden die Sequenzen erneut in der *Lasergene 11* Software auf Homo- bzw. Heterozygotie der Mutationen überprüft. Eine Mutation ist dann heterozygot, wenn die Kurve der Base der Mutation im Elektropherogramm zwei Basen anzeigt. Eine der Basen sollte der wildtypischen Sequenz entsprechen. Zusätzlich wurden die aufgedeckten Mutationen mit Datenbanken für bereits bekannte Mutationen im ARSA-Gen abgeglichen (ARSA-Datenbank, 2016, The Human Gene Mutation Database ARSA, 2016).

0,1 M Tris/HCl Puffer pH 8,4

0,1 M Tris base in H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert mit 1 M HCl auf 8,4 einstellen, Volumen entsprechend mit H<sub>2</sub>O auffüllen, bei RT lagern

### 2.5.8 Bestimmung der ARSA-Enzymaktivität

Die Proteinisolation der Zellen erfolgte wie in Punkt 2.5.4 beschrieben. Das Protokoll zur Bestimmung der ARSA-Enzymaktivität wurde von Prof. Gieselmann (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und in dieser Arbeit entsprechend angepasst und optimiert. Um die ARSA-Aktivität zu messen, wurden 96-Well-Platten (Corning® #3599) verwendet. Die Proteinlysate wurden in Duplikaten auf Eis auftragen, und es wurden 10 µl Proteinlösung pro Ansatz eingesetzt. Als Leerwert diente der TN-101-Puffer. Mit einer Multipipette wurden 100 µl/Ansatz des ARSA-Substrats *4-Nitrocatechol sulfate dipotassium salt* (pNCS) hinzugefügt und das 96-Well im Anschluss bei 37 °C für 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Substratumssetzung mit 100 µl/Ansatz 1 M NaOH gestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Spektrophotometer bei 515 nm. Bei niedrigen bzw. hohen Enzymaktivitäten wurden die Volumina bzw. Inkubationszeiten entsprechend variiert. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Leerwert abgezogen und folgende Gleichung angewendet:

$$A \text{ (mU/ml)} = \frac{V \times 10^6 \times 1000}{t \times \epsilon \times d \times v} \times OD515nm$$

A:	Enzymaktivität in mU/ml
V:	Gesamtvolumen in ml
$10^6$ :	Faktor zur Umrechnung von mol in $\epsilon$ (mol/l <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup> ) auf µmol in U (µmol/min)
1000:	Faktor zur Umrechnung in mU
t:	Inkubationszeit in min
$\epsilon$ :	Extinkionskoeffizient in (mol/l <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup> ), für ARSA $12,4 \times 10^6$
d:	Schichtdicke in cm; bei 96-Well Platte Corning und 10 µl Proteinlösung: 0,6325
v:	Volumen der Proteinlösung, standardmäßig 10 µl
OD515nm:	Absorption bzw. optische Dichte bei 515 nm abzüglich des Leerwertes

Um die gesamte Enzymaktivität ( $A_{Ges}$ ) in mU/mg zu bestimmen, wurde die Enzymaktivität auf die Gesamtproteinmenge wie folgt bezogen:

$$A_{Ges} \text{ (mU/mg)} = \frac{A \text{ (mU/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

0,5 M Na-Acetat Puffer pH 5  
0,5 M Na-Acetat wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst,  
der pH auf 5,0 eingestellt und mit ddH<sub>2</sub>O  
aufgefüllt.

1 x TBS pH 7,0  
10 mM Tris base  
150 mM NaCl  
in ddH<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert mit 1 M HCl auf  
7,0 einstellen und bei 4 °C lagern.

1 M NaOH  
1 M NaOH in ddH<sub>2</sub>O lösen.

ARSA-Substrat  
10 mM pNCS und 10 % (w/v) NaCl in  
0,5 M Na-Acetat Puffer (pH 5,0) lösen,  
aliquotieren und lichtgeschützt bei -20 °C  
lagern.

## 2.5.9 Immunzytochemische Färbungen

Alle immunzytochemischen Analysen wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei RT durchgeführt, und zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Zellen 3 x für je 10 min mit PBS gewaschen. Zu Beginn wurden die lebenden Zellen zuerst mit PBS gewaschen, bevor sie in 4 % Paraformaldehyd für 15 min fixiert wurden. Bei Verwendung von Antikörpern, die an ein intrazelluläres Epitop binden, wurden zuerst die Zellmembranen für 10 min permeabilisiert. Anschließend wurden bei allen Färbungen die unspezifischen Bindungsstellen für 30 min mit einer Blocklösung abgesättigt. Nachfolgend wurde der Primärantikörper in Blocklösung verdünnt für mindestens 2 h (bei RT) bis ü. N. (bei 4 °C) inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in Blocklösung für 1 h inkubiert. Zellkerne wurden für 1 min mit DAPI (1:10.000 in PBS) angefärbt und die Zellen schließlich mit Mowiol unter einem Deckgläschen eingedeckelt.

### 4 % Paraformaldehydlösung

4 % Paraformaldehyd zusammen mit 3-4 NaOH-Plättchen in 500 ml PBS auf einem Magnetrührer lösen, pH-Wert auf 7,4 mit 1 M HCl einstellen, Lösung durch Filterpapier filtrieren, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

### PBS/Azid

0,5 g Natrium-Azid (0,1 %) in 500 ml PBS lösen und bei RT lagern.

### Blocklösung

5 % NGS bzw. 1 % BSA in PBS/Azid

### Permeabilisierungslösung

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

### Mowiol

2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerol (ca. 4,8 ml), 6 ml H<sub>2</sub>O. Reagenzien 2 h auf Magnetrührer mischen, dann 0,2 M Tris pH 8,5 hinzufügen und ü. N. auf Magnetrührer mischen, bei 5000 x g 15 min zentrifugieren, Überstand abnehmen und mit 0,1 % (w/v) DABCO versetzen, mischen, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

### 0,2 M Tris/HCl Puffer pH 8,5

0,2 M Tris base in H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert mit 1 M HCl auf 8,5 einstellen, Volumen entsprechend mit H<sub>2</sub>O auffüllen, bei RT lagern.

## 2.5.10 Transplantationen und Gewebeaufarbeitung

Alle Tierversuche wurden nach den Richtlinien der Universität Bonn sowie des Tierschutzgesetzes des Landes Nordrhein-Westfalen durchgeführt. Die Teratomtransplantationen sind im Tierversuchsantrag "Transplantation humaner pluripotenter Stammzellen in Labornagetieren" vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz unter dem Aktenzeichen 8.87-50.10.37.09.290 genehmigt. Alle weiteren durchgeführten Tierversuche sind im Tierversuchsantrag "Transplantation iPS-Zell-abgeleiteter neuraler und glialer Vorläuferzellen in das Nervensystem Arylsulfatase A-defizienter Mäuse (MLD Transplantate)" (Aktenzeichen 84-02.04.2013.A247) genehmigt. Die Tierhaltung und -pflege erfolgte nach Standards des Hauses für Experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Bonn.

### Teratomanalyse

Die Bildung von Teratomen diente der Überprüfung der pluripotenten Eigenschaften der hiPSCs *in vivo*. Teratome sind Tumore, die Derivate aller drei Keimblätter beinhalten können. Es wurden Rag2<sup>-/-</sup>-Mäuse (immundefizient) verwendet, um eine mögliche Abstoßung der humanen Zellen *in vivo* zu verhindern. Zuerst wurden die hiPSCs so lange kultiviert bis sie große und andifferenzierte Kolonien gebildet hatten. Eine komplette 6-Well Zellkulturplatte einer Linie wurde mittels Kollagenase Typ IV wie in Punkt 2.4.6 beschrieben abgelöst und bei 4 °C und 130 x g für 3 min abgesetzt. Anschließend wurden die intakten Kolonien in 500 µl PBS aufgenommen und die

Lösung in einen Hoden einer  $\text{Rag2}^{-/-}$ -Maus injiziert. Nach 6-8 Wochen wurden die Teratome präpariert und in 4 % Paraformaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet, geschnitten und mittels Hämalaun-Eosin(HE)-Färbung angefärbt (durchgeführt von Prof. Torsten Pietsch, Diagnostiklabor, Institut für Neuropathologie, Universität Bonn).

### Genotypisierung der Mausstämme

Um den transgenen Phänotyp eines Mausstammes zu bestimmen, wurde die genomische DNA der Tiere aus Schwanzspitzen unter der Verwendung des *REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kits* gemäß Herstellerangaben isoliert. Die DNA-Lösung wurde im weiteren Verlauf in entsprechenden PCR-Reaktionen eingesetzt. Um den  $\text{Arsa}^{-/-}$ -Phänotyp zu überprüfen, wurden je 0,75  $\mu\text{l}$  der DNA-Lösung als Vorlage für die PCR eingesetzt. Mit Hilfe des *REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix* und zwei Paaren von Oligonukleotiden konnten sowohl ein endogenes Kontroll-Produkt von 480 bp Größe (sense/anti) als auch ein DNA-Fragment der Mutation von 1100 bp Größe (anti/neo) amplifiziert werden.

ARSA<sub>sense</sub>: 5'-TAGGGTGGAAAGTTACCCTAGA-3'  
 ARSA<sub>anti</sub>: 5'-TGACCCAGGCCTGTTCCCAT-3'  
 ARSA<sub>neo</sub>: 5'-GGAGAGGCTATTGGCTATGAC-3'

Die Reaktionskomponenten und Zykluskonditionen der  $\text{Arsa}^{-/-}$ -PCR sind wie folgt:

#### Reaktionsansatz:

REDTaq Mix	10 $\mu\text{l}$	94 °C	3 min	31 Zyklen
ARSA <sub>sense/anti/neo</sub> (100 $\mu\text{M}$ )	0,75 $\mu\text{l}$	94 °C	30 s	
DNA-Lösung	0,75 $\mu\text{l}$	56 °C	30 s	
$\text{H}_2\text{O}$	8,5 $\mu\text{l}$	72 °C	1min	
		72 °C	3 min	
		4 °C	$\infty$	

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 %igem Agarosegel (in 1 x TAE Puffer + 1 ng/ml Ethidiumbromid) mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert. Zur Größenkontrolle wird ein 100 bp DNA-Leiter verwendet. Proben von Wildtyp-Tieren zeigten das 480 bp große Kontrollfragment, während Proben von homozygoten  $\text{Arsa}^{-/-}$ -Mäusen ein 1100 bp großes Fragment zeigten. PCR-Produkte von heterozygoten Tieren wiesen beide Fragmente auf.

Der transgene Shiverer-Phänotyp wurde gemäß den Anleitungen von Jackson Laboratory bestimmt. Hierfür wurden je 2  $\mu\text{l}$  der DNA-Lösung als Vorlage für die PCR genutzt, in der mittels Taq DNA Polymerase und zwei Oligonukleotidpaaren sowohl ein endogenes Kontroll-Produkt von 200 bp Größe (IMR0015/0016) als auch ein DNA Fragment der Mutation von 308 bp Größe (IMR0968/0969) amplifiziert werden konnten.

IMR0015: 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGT-3'  
 IMR0016: 5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTT-3'  
 IMR0968: 5'-ACCGTCCTGAGACCATTGTC-3'  
 IMR0969: 5'-GTGCTTATCTAGTGTATGCCTGTG-3'

Die Reaktionskomponenten und Zyklenkonditionen der Shiverer-PCR waren wie folgt:

Reaktionsansatz:

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

35 Zyklen

Auch hier wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert. Das 200 bp große Kontrollfragment wurde in Proben von Wildtyp-Tieren angezeigt, während Proben von homo- und heterozygoten Tieren ein 308 bp großes Fragment aufwiesen. Homozygote Tiere konnten nur phänotypisch identifiziert werden. Bereits nach 2 Wochen entwickelten die Tiere einen Tremor, der durch Zittern der Hinterbeine deutlich zu erkennen war.

10 x Agarosegel Probenpuffer

250 mg Bromphenol Blau, 250 mg Xylene Cyanol

in 33 ml 150 mM Tris/HCl pH 7,6 lösen und 60 ml Glycerol und 7 ml ddH<sub>2</sub>O hinzufügen und bei RT lagern.

150 mM Tris/HCl Puffer pH 7,6

150 mM Tris base in H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert mit 1 M HCl auf 7,6 einstellen, Volumen entsprechend mit H<sub>2</sub>O auffüllen und bei RT lagern.

Neonatale Transplantation und Gewebeaufarbeitung

RGL-NPCs wurden mittels TE und TI von den Schalen gelöst, gezählt und in PBS mit 0,1 % BSA und 20 µg/ml DNase auf 50.000 Zellen/µl konzentriert. Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>- bzw. Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden 1-2 Tage nach der Geburt für die Transplantationen herangezogen. Die Tiere wurden durch Hypothermie (2 min in Eis) anästhesiert. In jede Hemisphäre wurde je 1 µl der Zellsuspension mit einer gezogenen Glaskapillare transplantiert (100.000 Zellen/Tier). Die transplantierten Mäuse wurden bis zum vollständigen Erwachen bei 37 °C beobachtet und anschließend zum Muttertier zurückgesetzt. Im Alter von 3 Wochen wurden die Tiere abgesetzt und regelmäßig kontrolliert.

Die transplantierten Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden nach 2, 8 und 12 Wochen nach Transplantation analysiert und Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Mäuse nach 8 Wochen. Letztere haben keine hohen Lebenserwartungen und werden in der Regel nicht älter als 9 Wochen. Alle Mäuse wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten durch eine intraperitoneale Injektion von 0,9 mg Ketanest und 0,18 mg Rompun je 10 g Körpergewicht anästhesiert und mit 40 ml PBS, gefolgt von 45 ml 4 % Paraformaldehydlösung transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen, ü. N. in 4 % Paraformaldehydlösung postfixiert und anschließend bis zum Absinken bei 4 °C in 30 % Saccharoselösung inkubiert. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die kryoprotoktierten Gehirne in *Tissue-Tek*® eingebettet und bei -80 °C eingefroren. Mit einem Kryostaten wurden 20 µm-dicke Schnitte auf Objektträgern angefertigt, die im weiteren Verlauf histologisch analysiert wurden.

#### 4 % Paraformaldehydlösung

4 % Paraformaldehyd zusammen mit 3-4 NaOH-Plättchen in 500 ml PBS auf einem Magnetrührer lösen, pH-Wert auf 7,6 mit 1 M HCl einstellen, Lösung durch Filterpapier filtrieren, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

#### 30 % Saccharoselösung

150 g Saccharose in 400 ml PBS/Azid lösen, anschließend auf 500 ml auffüllen und bei RT lagern.

### **2.5.11 Histologie**

Alle histologischen Färbungen an Hirnschnitten wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei RT in einer Feuchtkammer durchgeführt. Zu Beginn wurden die eingefrorenen Hirnschnitte für 10 min aufgetaut und für weitere 10 min mit PBS rehydriert. Anschließend konnte mit der gewünschten Färbemethode begonnen werden.

#### Immunhistochemie

Nach Rehydrierung der Hirnschnitte wurden sie 1 x mit PBS gewaschen und die Schnitte für 10 min mit 0,5 %iger Triton X-100-Lösung inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden alle unspezifischen Bindungsstellen 5 min mit einer Blocking-Lösung (Zytomed) abgedeckt. Anschließend wurden die Schnitte mindestens 2 x mit PBS gewaschen. Der 1. Antikörper wurde in 0,1 %iger Triton X-100-Lösung verdünnt und 2 h (bei RT) oder ü. N. (bei 4 °C) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut 2 x mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem entsprechenden 2. Antikörper erfolgte auch in 0,1 %iger Triton X-100-Lösung für 2 h. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellkerne für 2 min mit DAPI angefärbt. Abschließend wurden die Schnitte wiederholt mit PBS gewaschen und schließlich mit Mowiol unter einem Deckgläschen eingedeckelt.

#### 0,1 %ige und 0,5 %ige Triton X-100-Lösung

0,1 % bzw. 0,5 % Triton-X 100 in PBS lösen, bei RT lagern.

#### Immunohistochemischer Nachweis von Sulfatid

Sulfatid wurde unter der Verwendung des Sulph1-Antikörpers (zur Verfügung gestellt von Prof. Jan-Eric Måansson, *Sahlgrenska University Hospital*, Göteborg, Schweden; Fredman *et al*, 1988) auf Gehirnschnitten nachgewiesen. Hierzu wurden die Hirnschnitte nach Rehydrierung in 0,05 %iger Glycin-Lösung für 30 min behandelt. Danach folgte für 3-4 h eine Inkubation mit der BSA-Blocklösung I, bevor der primäre Sulph1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 in BSA-Blocklösung II bei 4 °C ü. N. inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 3 h bei RT inkubiert. Nach einer 2-msinütigen DAPI-Kernfärbung wurden die Schnitte erneut mehrfach gewaschen und schließlich mit Mowiol eingedeckelt. Zusätzlich zum Sulph1 Antikörper konnten auch andere Primärantikörper mit dieser Färbemethode eingesetzt werden.

#### 0,05 %ige Glycin-Lösung

0,05 % Glycin in PBS

#### BSA-Blocklösung I

0,05 % Tween-20 und 1 %  
BSA in PBS

#### BSA-Blocklösung II

0,01 % Tween-20 und 1 %  
BSA in PBS

### Alcian Blau-Färbung

Mit der Alcian Blau-Färbung wurde histologisch die Akkumulation von Sulfatid nachgewiesen (Wittke *et al*, 2004; Ramakrishnan *et al*, 2007). Die Färbung beruht darauf, dass Alcian Blau sich an die negative Ladung des Sulfatids im Gewebe bindet. Es ist wichtig, den pH-Wert von 5,7 genau einzuhalten.

Zuerst wurden die gefrorenen Hirnschnitte aufgetaut. Das PBS wurde abgenommen und die Schnitte für insgesamt 24 h mit Scott-Lösung inkubiert, wobei die Lösung mindestens 3 x gewechselt wurde. Nach 24 h wurden die Schnitte mit 0,025 %iger Alcian Blau-Lösung für 3-4 h angefärbt und im Anschluss für weitere 24 h mehrmals mit Scott-Lösung gewaschen, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu verringern. Nach der Alcian Blau-Färbung wurden die Hirnschnitte mehrmals mit PBS gewaschen und falls gewünscht, die humanen Zellen mittels DAB-Färbung detektiert. Hierfür wurden im ersten Schritt die endogenen Peroxidasen mittels 1 %iger  $H_2O_2$ -Lösung in ddH<sub>2</sub>O gehemmt. Die Schnitte wurden im Anschluss 2 x 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min mit 0,5 %iger Triton X-100-Lösung behandelt. Nach einem erneuten zweimaligen Waschschritt wurden alle unspezifischen Bindungsstellen 5 min mit einer Blocking-Lösung (Zytomed) abgedeckt und der Primärantikörper Stem121<sup>TM</sup> für 1 h inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Schnitte für 30 min mit einem HRP-gekoppelten Antikörper (Zytomed) inkubiert. Die Detektion mit DAB erfolgte nach zweimaligem Waschen und unter Verwendung des *DAB-Substrate Kit High Contrast* nach Herstellerangaben. Direkt im Anschluss wurden die Schnitte für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und in PBS überführt. Nach einer Dehydrierung (Schwenken in 100 % EtOH, erneut 100 % EtOH, Isopropanol, jew. 2 min in Xylol, erneut Xylol) wurden die Schnitte mit *Cytoseal<sup>TM</sup> XYL* eingedeckelt.

#### 2.5 M MgCl<sub>2</sub> Lösung

2,5 M MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (trocken gelagert) in entsprechendem Volumen H<sub>2</sub>O lösen und sofort verwenden.

#### Scott-Lösung

2,5 % Glutaraldehyd  
0,3 M MgCl<sub>2</sub>  
25 mM Na-Acetat Puffer pH 5,7

#### 0,1 M Na-Acetat Puffer pH 5,7

0,1 M Na-Acetat in entsprechendem Volumen H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert auf 5,7 einstellen und bei RT lagern.

#### 0,025 %ige Alcian Blau Lösung

0,025 % Alcian Blue 8GX in Scott-Lösung unter Verwendung eines Ultraschallbads lösen. Anschließend Lösung filtrieren, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

## 2.6 Software

Software	Hersteller	Anwendung
A Plasmid Editor 2.0.39 M (ApE)	Wayne Davis	Sequenzanalyse
AxioVision 40 4.5.0.0	Carl Zeiss	Aufnahmen ApoTome
AxioVision Rel. 4.6/8	Carl Zeiss	Aufnahmen Axioskop 2/200M
EMBOSS Transeq Tool	EMBL-EBI	Sequenzanalyse
Excel 2008	Microsoft	Auswertung
FlowJo 8.7	Tree Star	Datenerfassung FACS <sup>®</sup> Calibur
GenomeStudie	Illumina	Auswerfung SNP Daten
Illustrator CS3	Adobe	Bildbearbeitung
ImageJ 1.42q	NIH	Bildbearbeitung

Software	Hersteller	Anwendung
LAS AF	Leica	Aufnahmen Leica Live Cell DMI6000 B
LAS V3.3.0	Leica	Aufnahmen Leica DM IL LED
Lasergene 11	DNAstar®	Sequenzanalyse
NanoDrop 1000	PEQLAB	NanoDrop
Nukleotid BLAST	NCBI	Sequenzanalyse
Oligonucleotide Properties Calculator	Northwestern University	Primer Design
Photoshop CS3	Adobe	Bildbearbeitung
Primer Blast	NCBI	Primer Design
Prism6	Graphpad	Statistik
Protein BLAST	NCBI	Sequenzanalyse
Quantity One 4.6.8	Biorad	Datenerfassung GelDoc
SOFTmax Pro	Molecular Devices	Datenerfassung ARSA-Assay
Word 2011	Microsoft	Textbearbeitung

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 MLD-spezifische Hautfibroblasten weisen distinkte Mutationen im ARSA-Gen auf

Für die Generierung von hiPSCs wurden Hautfibroblasten verwendet, die von Spendern stammten, die an unterschiedlichen Formen der MLD erkrankt sind. Als Kontrollen dienten Hautfibroblasten von nicht MLD-spezifischen Spendern (*Control*, Ctrl), die auch in hiPSCs reprogrammiert wurden (siehe Tabelle 1).

Die Fibroblasten der Spenderin aMLD wurden von Prof. Volkmar Gieselmann (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Patientin leidet an der adulten Form der MLD (aMLD), die durch eine homozygote (-/-) Mutation (p.P426L) im ARSA-Gen ausgelöst wird (siehe Tabelle 1; Polten *et al*, 1991). Ein Basenaustausch von C zu T führt in der Aminosäuresequenz (p) an Position 426 zu einem Austausch von Prolin (P) durch Leucin (L; Abb. 10). Das verursacht eine Fehlfaltung im Protein, wodurch ARSA verfrüht abgebaut wird. Die Funktionalität des Enzyms ist nicht beeinträchtigt. Ein geringer Anteil des Proteins entgeht dem vorzeitigen Abbauprozess und gelangt ins Lysosom. Somit kann eine Restenzymaktivität von ARSA in aMLD-Patienten bestehen (von Figura *et al*, 1983; von Bülow *et al*, 2002).

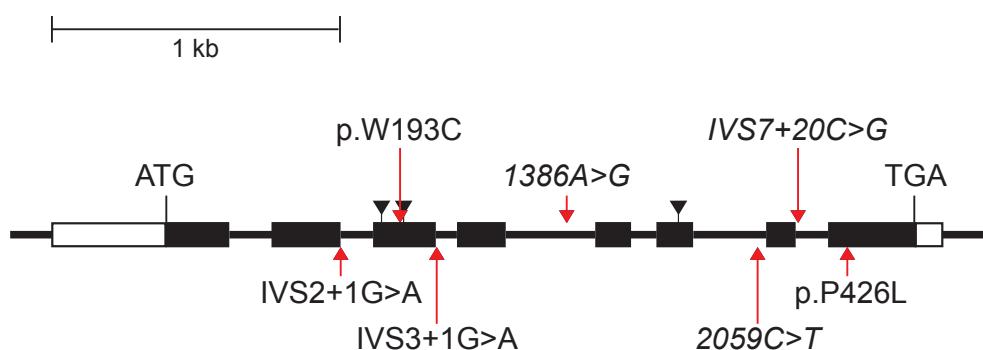
**Tabelle 1: Überblick der humanen Hautfibroblasten und deren Eigenschaften.**

Spender	Geschlecht	Alter	Beginn der MLD	MLD-Form	Mutation/en im ARSA-Gen	ARSA-Aktivität
aMLD	w	14	> 16 Jahre	adult	p.P426L (-/-)	niedrig
liMLD-2	m	3	< 2 Jahre	spätaufstabil	IVS2 +1 (-/-); p.W193C (-/-)	keine
liMLD-3*	m	4	< 2 Jahre	spätaufstabil	IVS3 +1(+/-); p.P426L (+/-)	keine
liMLD-4	m	5	< 2 Jahre	spätaufstabil	p.P426L (-/-)	keine
Ctrl-1	w	23	/	/	keine	normal
Ctrl-2	w	28	/	/	keine	normal
Ctrl-3*	m	5	/	/	keine	normal

\*Geschwister

Alle weiteren MLD-spezifischen Spender leiden an der spätaufstabilen Form der MLD (*late infantile* MLD; liMLD-2, -3 und -4) und weisen keine ARSA-Enzymaktivität auf

(siehe Tabelle 1). Die durch die Mutationen ausgelösten strukturellen Veränderungen im Protein führen zu einem sofortigen proteasomalen Abbau der ARSA und kein funktionelles Enzym erreicht das Lysosom (Poeppel *et al*, 2005, 2010). Die Fibroblasten der liMLD-Patienten und die der Kontrolle Ctrl-3, wurden vom *Coriell Institute for Medical Research* (USA) bezogen. Spender Ctrl-3, dessen Zellen in der vorliegenden Arbeit als Hauptkontrolle dienten, ist verwandt mit Spender liMLD-3 (angezeigt durch \* in Tabelle 1). Da die MLD-verursachenden Mutationen der liMLD-spezifischen Spender im Vorfeld nicht bekannt waren, wurde das gesamte ARSA-Gen dieser Fibroblasten sequenziert.



**Abb. 10: Aufbau des humanen ARSA-Gens mit Kennzeichnung der MLD-verursachenden Mutationen.**

Der Aufbau des humanen ARSA-Gens ist schematisch dargestellt. Die Positionen der Mutationen sind mit roten Pfeilen angezeigt. Die Polymorphismen sind kursiv geschrieben. (Exons: Balken; Introns: Linien; kodierende Sequenz: schwarz; 5' bzw. 3' untranslatierte Region: weiß; Start-/Stopp-Codon: ATG/TGA, N-Glycolisierungsmodifikationen: schwarze Dreiecke). Modifiziert nach Gieselmann *et al*, 1994.

Der Patient liMLD-2 trägt eine homozygote Mutation an einer Schnittstelle zwischen Exon 2 und Intron 2 (*Intervening Sequence 2*, IVS2; Abb. 10). Durch den Basenaustausch von G zu A wird die eigentliche Schnittstelle um eine Stelle (+1) verschoben (IVS2+1G>A; Polten *et al*, 1991; Zlotogora *et al*, 1994). Zusätzlich tritt durch einen Basenaustausch in der ARSA-Gensequenz (842G>T) eine weitere Veränderung in der Proteinstruktur an Position 193 auf. Die Aminosäure Tryptophan (W) wird durch Cystein (C) ersetzt (p.W193C; Abb. 10). Diese Mutation würde alleine die adulte Form der MLD auslösen (Polten *et al*, 1991; Ricketts *et al*, 1996).

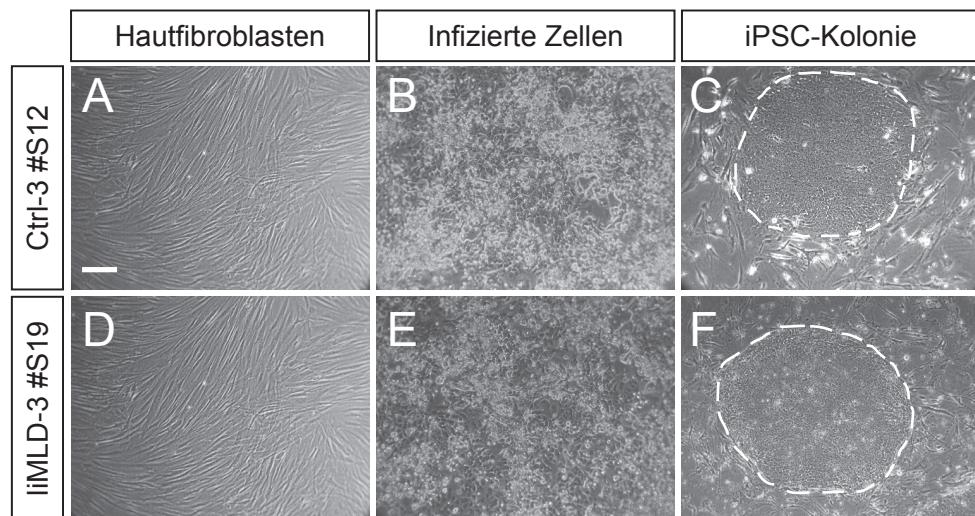
Der Spender liMLD-3 trägt neben der p.P426L-Mutation in heterozygoter (+/-) Form eine weitere heterozygote Mutation an einer Schnittstelle in Intron 3 (IVS3+1G>A, Abb. 10). Diese wird mit der spätaffilen MLD in Verbindung gebracht (Barth *et al*, 1995).

Patient liMLD-4 leidet gemäß den Informationen vom *Coriell Institute for Medical Research* auch an der spätaffilen Form der MLD (Coriell GM00197, 2016). Die

Sequenzierung des ARSA-Gens ergab, dass dieser Spender die p.P426L-Mutation (-/-) trägt (Abb. 10). Diese hat zwar einen Effekt auf die ARSA-Proteinstruktur, wird aber eher mit einem mildereren Phänotypen der MLD (aMLD) assoziiert (Polten *et al*, 1991). Zusätzlich besitzt der Patient noch drei weitere Mutationen (1386A>G, 2059C>T und IVS7+20; Abb. 10), bei denen es sich aber um bereits bekannte Polymorphismen handelt (ARSA-Datenbank, 2016; Coulter-Mackie & Gagnier, 1997; Gort *et al*, 1999).

### 3.2 MLD-spezifische Hautfibroblasten können in iPSCs reprogrammiert werden

Die Reprogrammierung der in Tabelle 1 aufgelisteten Hautfibroblasten wurde mit Hilfe des *CytoTune<sup>TM</sup>-iPS Sendai Reprogramming Kit* durchgeführt. Es basiert auf der Reprogrammierung von somatischen Zellen unter der Verwendung nicht-integrativer Sendaiviren (SeV; Fusaki *et al*, 2009). Die Viren kodieren für die Transkriptionsfaktoren *c-MYC*, *KLF4*, *OCT-4* und *SOX2*. Die Hautfibroblasten (Abb. 11 A, D) wurden mit den beschriebenen SeV infiziert. Die Generierung und Validierung der hiPSC-Linien wird beispielhaft jeweils für eine Kontrolllinie (Ctrl-3 #S12) und eine MLD-spezifische Linie (iIMLD-3 #S19) dargestellt.



**Abb. 11: Reprogrammierung von Hautfibroblasten zu hiPSCs.**

Die Hautfibroblasten von Kontroll- (Ctrl-3 #S12; **A**) und MLD-spezifischen (iIMLD-3 #S19; **D**) Spendern wurden unter der Verwendung des *CytoTune<sup>TM</sup>-iPS Sendai Reprogramming Kit* mit nicht-integrativen Sendaiviren infiziert. Nach 7 Tagen wurden die infizierten Zellen (**B, E**) auf *Feeder*-Zellen umgesetzt. Die entstandenen hiPSCs formten runde, definierte Kolonien (**C, F**, gestrichelte Linien). Maßstabsbalken: A-F: 100 µm.

Die infizierten Zellen veränderten wenige Tage nach der Infektion ihre Morphologie, von einer länglichen ellipsoiden zu einer kompakteren kugeligen Form, wobei viele Zellen starben (Abb. 11 B, E). Nachdem die infizierten Zellen auf einen Rasen von

*Feeder*-Zellen umgesetzt wurden, bildeten sich nach wenigen Wochen dicht gepackte Kolonien. Diese wiesen morphologische Charakteristika von Stammzellkolonien auf. Die *Feeder*-Zellen sind für den Erhalt der Pluripotenz von Stammzellen wichtig, da sie die dafür notwendigen Faktoren in das Medium sezernieren (Lim & Bodnar, 2002). Die neu entstandenen iPSC-Kolonien wurden mechanisch isoliert und auf einen frischen *Feeder*-Rasen gesetzt. Dort formten die gewonnenen Zellen rundlich abgegrenzte und kompakte Kolonien (Abb. 11 C, F). Für jede Spenderlinie wurden drei iPSC-Klone nach morphologischen Kriterien ausgewählt und für die weitere Validierung herangezogen (Tabelle 2).

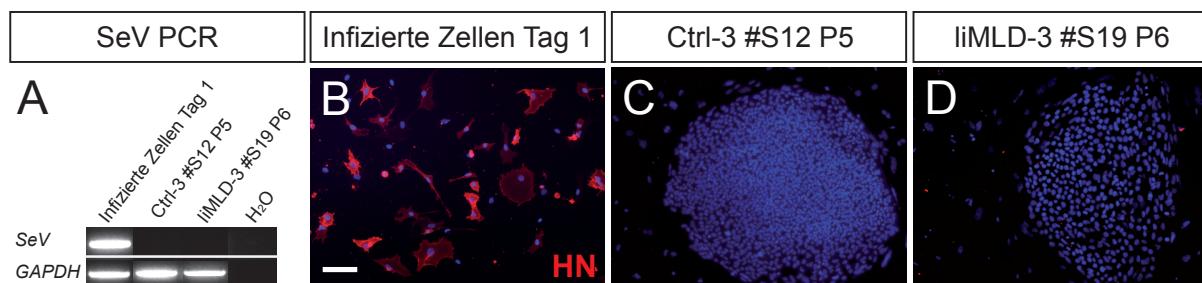
**Tabelle 2: Überblick der generierten hiPSC-Klone und deren Validierung sowie Differenzierung in RGL-NPCs.**

Linie	iPSCs	Klone für Validierung	SeV	Pluri-potenz	Keimblatt <i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	SNP-Analyse	RGL-NPCs
aMLD	✓	#S5, 15, 17	frei	✓	✓	✓	✓	#S5, 15
liMLD-2	✓	#S1, 4	frei	✓	✓	✓	✓	#S1, 4
liMLD-3	✓	#S10, 17, 19	frei	✓	✓	✓	✓	#S10, 17, 19
liMLD-4	✓	#S1, 4, 6, 12	frei	✓	✓	✓	✓	#S1, 4, 6, 12
Ctrl-1	✓	#S9, 10, 24	frei	✓	✓	✓	✓	#S9, 10
Ctrl-2*	✓	#8*	frei	✓	✓	✓	✓	#8*
Ctrl-3	✓	#S1, 8, 11, 12	frei	✓	✓	✓	✓	#S1, 8, 11, 12

Es ist dargestellt, welche Klone (#) von welcher Linie verwendet wurden, welche Validierungsprozesse (weiße Überschriften) sie durchlaufen haben und aus welchen Linien schließlich RGL-NPCs gewonnen wurden. Die iPSCs und RGL-NPCs der Linie Ctrl-2 wurden von Julia Fischer (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) generiert und charakterisiert (gekennzeichnet mit \*).

Im Rahmen der Validierung wurde zu Beginn überprüft, ob die ausgewählten iPSC-Klone noch SeV enthalten. Die SeV sind nicht-integrativ und werden nach Entstehung der Stammzellkolonien nach einigen Passagen aus den Zellen ausgeschleust. Außerdem können sie sich im Zytoplasma der Zellen nicht replizieren, da sie durch die Deletion des F-Gens keine infektiösen Partikel bilden können. Anhand einer RT-PCR und entsprechenden Oligonukleotiden, die das SeV-Transkript erkennen, konnte überprüft werden, ob in den Zellen noch SeV existieren.

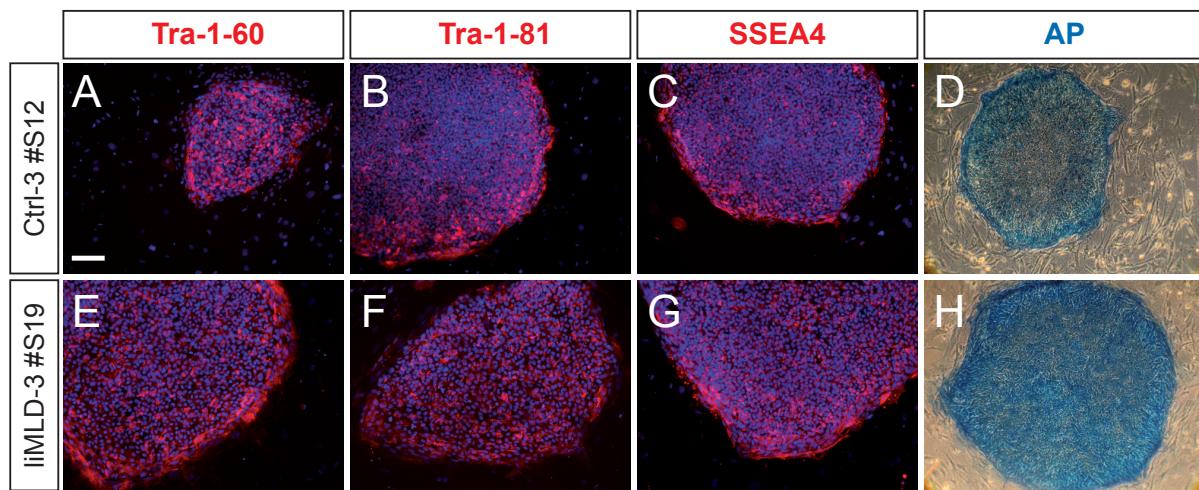
Zusätzlich konnte die Expression des membranständigen Hämagglutinin-Neuraminidase (HN)-Proteins Aufschluss über die Existenz der Viren in den Zellen geben. HN befindet sich nur auf der Zelloberfläche, wenn die Zellen noch Viren enthalten. In Kontroll- und MLD-spezifischen hiPSCs konnten nach wenigen Passagen (P) im Vergleich zu den frisch infizierten Zellen (1 Tag nach Infektion) sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene keine SeV mehr nachgewiesen werden (Abb. 12 A-D).



**Abb. 12: Nachweis der Sendaiviren in den generierten iPSCs.**

Anhand einer RT-PCR mit spezifischen SeV-Oligonukleotiden (A) und einer immunzytochemischen Anfärbung des Hämagglutinin-Neuraminidase(HN)-Proteins (B-D) konnten im Vergleich zu den frisch infizierten Zellen (Tag 1; A, B) in den entstandenen hiPSCs keine SeV detektiert werden. In der isolierten RNA von Kontroll- (Ctrl-3 #S12; Passage (P) 5) und MLD-spezifischen (liMLD-3 #S19; P 6) hiPSCs konnte mit Hilfe einer RT-PCR keine SeV-RNA nachgewiesen werden (A). Beide hiPSC-Klone zeigten auf der Zelloberfläche keine HN-Expression mehr (C, D). A: Der Nachweis des GAPDH-Transkripts diente als Ladekontrolle. B-D: Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 100 µm.

Die Pluripotenz ist eine wichtige Eigenschaft von ESCs und iPSCs und kann anhand der Expression von verschiedenen humanen pluripotenzassoziierten Zelloberflächenmarkern nachgewiesen werden. Die hiPSC-Kolonien von MLD-spezifischen und Kontrollspendern zeigten eine positive Immunkontrolle für Tra-1-60, Tra-1-81 und SSEA-4 (Abb. 13 A-C, E-G). Zusätzlich wurden diese Ergebnisse durch eine positive Anfärbung für die Alkalische Phosphatase (AP) untermauert (Abb. 13 D, H). AP wird auch von undifferenzierten pluripotenten Stammzellen exprimiert.

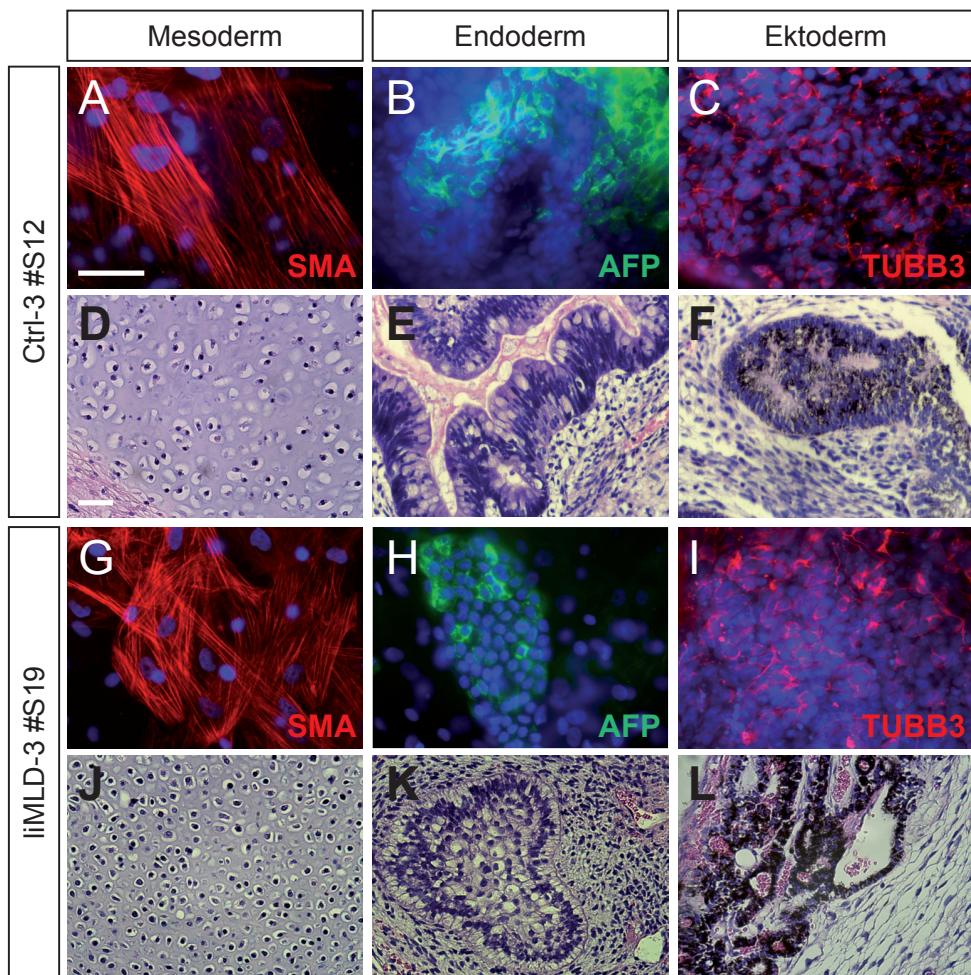


**Abb. 13: Expression pluripotenzassozierter Proteine in hiPSCs.**

Die generierten Kontroll- (Ctrl-3 #S12) und MLD-spezifischen (iMLD-3 #S19) hiPSCs exprimierten neben den pluripotenzassoziierten Oberflächenantigenen Tra-1-60, Tra-1-81 und SSEA-4 (A-C; E-G) auch die Alkalische Phosphatase (AP; D, H). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (A-C, E-G). Maßstabsbalken: 100 µm.

Weiterhin konnte die Pluripotenz durch eine ungerichtete Differenzierung der generierten hiPSCs in die Zellen der drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm *in vitro* und *in vivo* überprüft werden. *In vitro* wurden aus den hiPSCs EBs generiert, die nach Plattieren, Differenzieren und Auswachsen von Zellen hinsichtlich ihrer Differenzierung in die verschiedenen Keimblattderivate analysiert wurden. Zur Identifizierung von meso-, endo- und ektodermalen Zelltypen wurden die Marker *smooth muscle actin* (SMA), *alpha-fetoprotein* (AFP) bzw.  $\beta$ III-tubulin (TUBB3) herangezogen und konnten sowohl in den Kontroll- als auch in MLD-spezifischen Linien detektiert werden (Abb. 14 A-C, G-I).

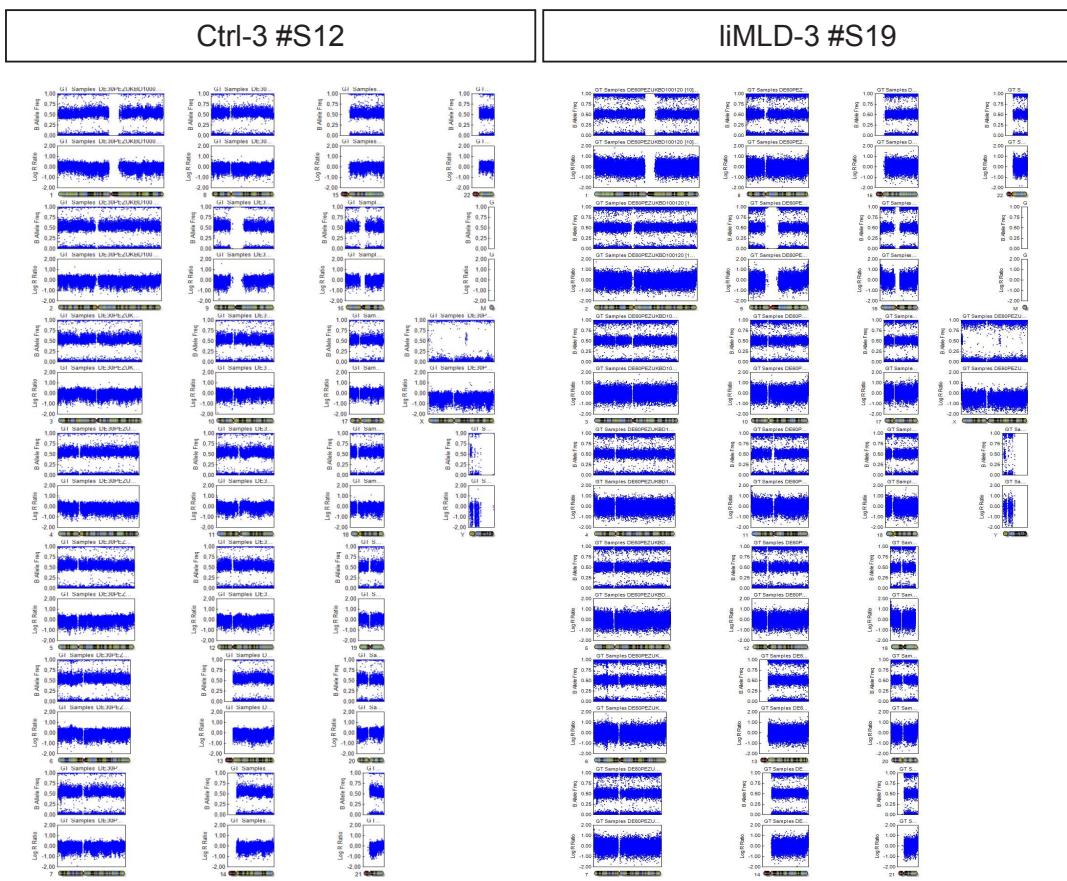
Für den *in vivo*-Nachweis wurden die hiPSCs jeweils in einen Hoden von immundefizienten Mäusen injiziert. 6-8 Wochen später hatten sich Teratome geformt, die hinsichtlich der Differenzierung in die verschiedenen Keimblätter untersucht wurden. Nach einer HE-Färbung (Prof. Torsten Pietsch, Institut für Neuropathologie, Universität Bonn) konnten in allen überprüften und aus hiPSCs entstandenen Teratomen Derivate der Keimblätter, wie Knorpel (Mesoderm, Abb. 14 D, J), Drüsengewebe (Endoderm, Abb. 14 E, K) oder Pigmentepithel (Ektoderm, Abb. 14 F, L) morphologisch nachgewiesen werden.



**Abb. 14: *In vitro*- und *in vivo*-Keimblattdifferenzierung der hiPSCs.**

Die generierten Kontroll- (Ctrl-3 #S12) und MLD-spezifischen (iiMLD-3 #S19) hiPSCs konnten *in vitro* über die ungerichtete Differenzierung von plattierten EBs in Zellen aller drei Keimblätter differenziert werden, in Mesoderm (SMA; **A, G**), Endoderm (AFP; **B, H**) und Ektoderm (TUBB3; **C, I**). In Teratomanalysen in immundefizienten Mäusen konnte *in vivo* die Differenzierung in die verschiedenen Keimblattdervate, wie Knorpelgewebe (Mesoderm; **D, J**), Drüsengewebe (Endoderm; **E, K**) und pigmentiertes Epithel (Ektoderm; **F, L**) anhand einer HE-Färbung nachgewiesen werden. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (A-C, G-I). Maßstabsbalken: A-C, G-I: 50 µm; D-F, J-L: 100 µm.

Die genomische Integrität der generierten hiPSC-Klone wurde mit Hilfe einer SNP-Analyse überprüft. Hierfür wurde die genomische DNA der hiPSCs isoliert und mittels hochauflösender SNP-Microarrays analysiert. Mit dieser Methode konnten die Frequenzen einzelner Allele quantitativ bestimmt und Abweichungen der Anzahl der Kopien eines bestimmten DNA-Abschnittes innerhalb des Genoms, wie Deletionen oder Duplikationen, festgestellt werden. In den ausgewählten hiPSC-Klonen von Kontroll- und MLD-spezifischen Spendern konnten im Vergleich zu den entsprechenden Fibroblastenlinien keine neuen genetischen Aberrationen detektiert werden (Abb. 15).



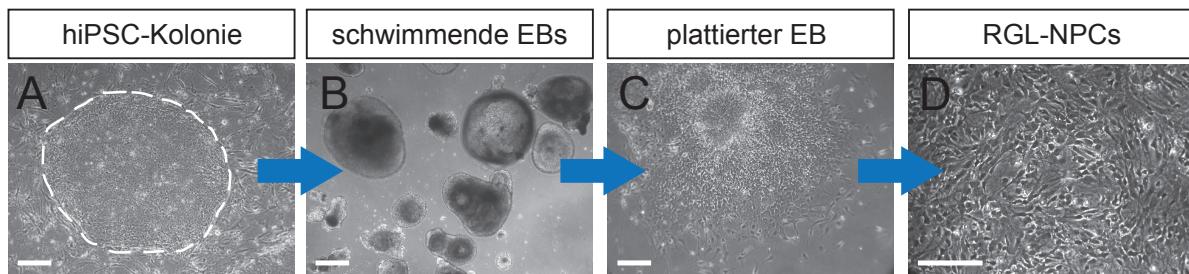
**Abb. 15: Genomische Integrität der hiPSCs.**

Die genomische Integrität wurde mir Hilfe einer SNP-Analyse überprüft. Für jedes einzelne Chromosom der ausgewählten Patienten sind die B-Allelfrequenz (*B Allele Freq*; oben), die den Genotyp anzeigt, und der *LogR ratio*, der Aufschluss über den DNA-Gehalt gibt (unten), dargestellt. Durch die Reprogrammierung sind in den hier beispielhaft gezeigten Kontroll- (Ctrl-3 #S12) und MLD-spezifischen (liMLD-3 #S19) hiPSCs keine weiteren genetischen Aberrationen aufgetreten.

### 3.3 MLD-spezifische iPSCs können unter definierten Medienbedingungen in RGL-NPCs differenziert werden

Die neurale Differenzierung von Kontroll- und MLD-spezifischen hiPSCs in RGL-NPCs erfolgte anhand eines an humanen ESCs etablierten Protokolls (Gorris *et al*, 2015). In diesem EB-basierten Protokoll wurden die hiPSCs über einen Zeitraum von 4 Wochen unter schrittweiser Reduktion von ATRA zunächst neuralisiert und im weiteren Verlauf zu RGL-NPCs differenziert und angereichert. Zu Beginn wurden die hiPSC-Kolonien (Abb. 16 A) abgelöst und in Suspension gebracht, um die Bildung der EBs zu initiieren (Abb. 16 B). Die Medienbedingungen waren so gewählt, dass die Entstehung neuraler und insbesondere glialer Zellen begünstigt und die Differenzierung in Zellen anderer Keimblätter unterdrückt wurde. Die EBs wurden einer hohen Konzentration an ATRA ausgesetzt, die im Verlauf des Differenzierungsprotokolls von 4 Wochen reduziert wurde. Schließlich wurden die EBs plattiert. Sie enthielten sowohl proliferierende als auch ausdifferenzierte Zellen. Um die

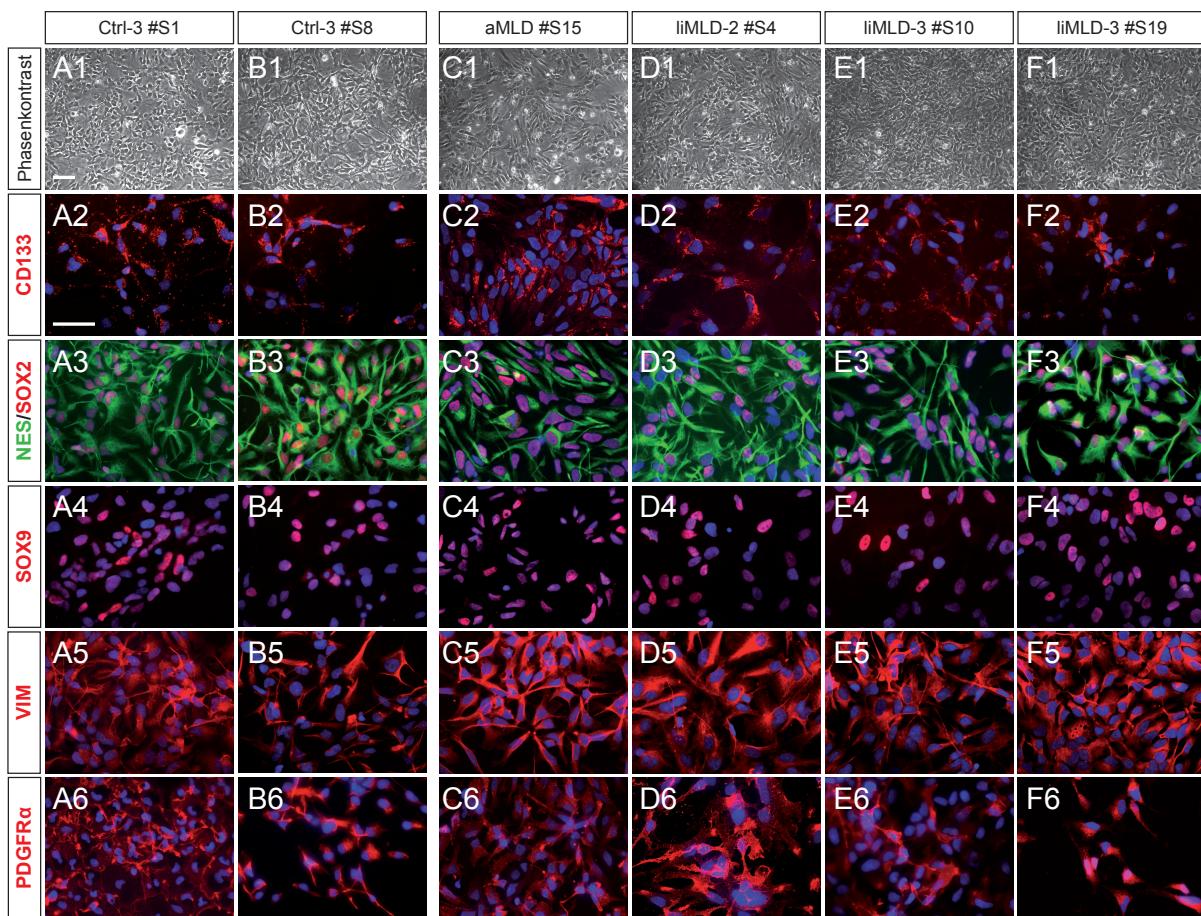
Proliferation der auswachsenden Zellen zu stimulieren, wurden sie unter Zusatz der Wachstumsfaktoren *epidermal growth factor* (EGF), FGF-2 und dem Schilddrüsenhormon T3 kultiviert. Die aus den plattierten EBs auswachsenden Zellen bildeten eine heterogene Kultur unterschiedlicher Zelltypen, zwischen denen Zellen mit bipolarer, neuraler Morphologie beobachtet werden konnten (Abb. 16 C).



**Abb. 16: Neurale Differenzierung von hiPSCs in RGL-NPCs.**

Die neurale Differenzierung von hiPSCs in RGL-NPCs wird beispielhaft dargestellt. Die runden, abgegrenzten hiPSC-Kolonien (**A**; gestrichelte Linie) wurden in Suspension gebracht und formten schwimmende EBs (**B**). Diese wurden über 4 Wochen Faktoren ausgesetzt, die eine neurale und gliale Differenzierung der Zellen begünstigten. Anschließend wurden sie plattiert und die auswachsenden Zellen (**C**) mittels FACS zu bipolaren RGL-NPCs (**D**) angereichert. Maßstabsbalken: A, C-D: 100 µm; B: 200 µm.

Aufgrund der starken Heterogenität der auswachsenden Zellen wurden die RGL-NPCs mittels FACS und einem Antikörper, der den neuralen Stammzellmarker CD133 erkennt, angereichert. Die isolierten RGL-NPCs bildeten eine adhärente und homogene Zellpopulation, die stabil unter dem Einfluss von EGF und FGF-2 proliferierte. In Tabelle 2 ist aufgeführt, aus welchen hiPSC-Klonen erfolgreich RGL-NPCs gewonnen werden konnten. Im weiteren Verlauf wurden die generierten RGL-NPCs anhand von typischen neuralen Stammzell- und radialen Gliazellmarkern charakterisiert. Die Ergebnisse werden beispielhaft an zwei Kontroll- (Ctrl-3 #S1/8) und an mehreren MLD-spezifischen Linien (aMLD #S15, liMLD-2 #S4, liMLD-3 #S10/19) dargestellt. Alle generierten RGL-NPC-Linien zeigten eine typische bipolare Zellmorphologie (Abb. 17 A1-F1).



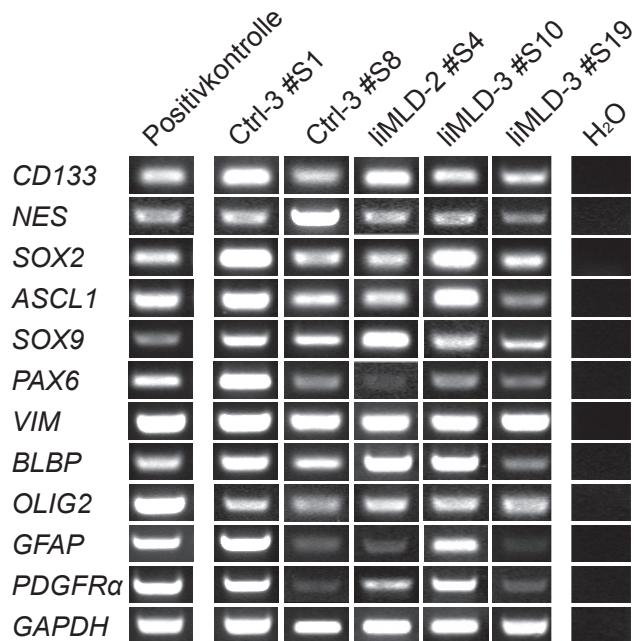
**Abb. 17: Expressionsprofil der RGL-NPCs auf Proteinebene.**

Die Kontroll- (Ctrl-3 #S1/8) und MLD-spezifischen (aMLD #S15, iiMLD-2 #S4, iiMLD-3 #S10/19) RGL-NPCs wiesen eine bipolare Morphologie auf (**A1-F1**). Sie exprimierten neurale Stammzellmarker, wie CD133, Nestin (NES), SOX2 und SOX9 (**A2-F4**) und den radialen Gliazellmarker Vimentin (VIM; **A5-F5**) sowie PDGFR $\alpha$ , einen frühen Oligodendrozytenmarker (**A6-F6**). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: A1-F1: 100  $\mu$ m; A2-F6: 50  $\mu$ m.

Die Proteinexpression wurde mittels immunzytochemischer Analysen überprüft. Die generierten Kontroll- und MLD-spezifischen RGL-NPC-Linien exprimierten neben CD133 auch weitere typische neurale Stammzellmarker, wie Nestin (NES), SOX2 und SOX9 (Abb. 17 A2-F4). Zusätzlich konnte die Expression des radialen Gliazellmarkers Vimentin (VIM) und des frühen OPC-Markers PDGFR $\alpha$  in allen Linien detektiert werden (Abb. 17 A5-F6).

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Analysen konnten auf Transkriptions-ebene mit einer semiquantitativen RT-PCR bestätigt werden (Abb. 18). Der neurale Stammzellcharakter der generierten RGL-NPC-Linien wurde erneut durch die Expression von *CD133*, *Nestin* (NES), *SOX2* und *SOX9*, wie auch durch die Expression von *ASCL1* und *paired box (PAX) 6* demonstriert. Neben *Vimentin* (VIM) konnte eine Expression der charakteristischen radialen Gliazellmarker *BLBP* und *glial fibrillary acidic protein (GFAP)* nachgewiesen werden. Die RGL-NPCs

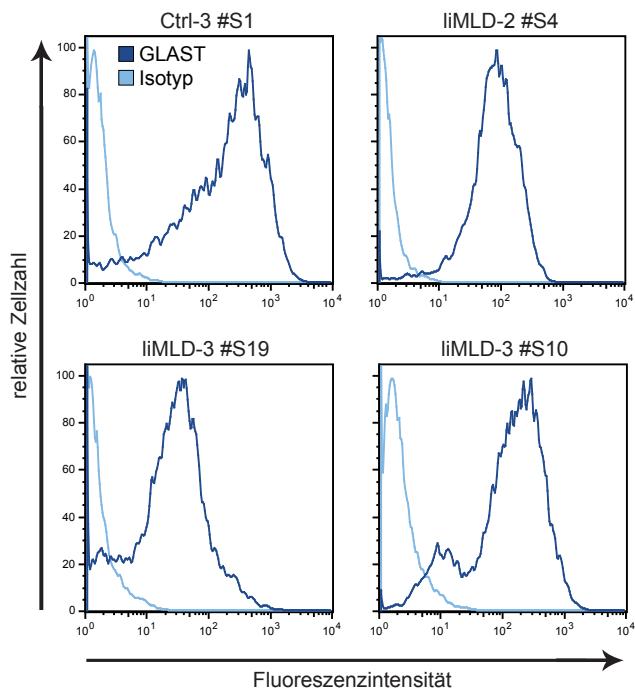
exprimierten auch *PDGFR $\alpha$*  und den Transkriptionsfaktor *OLIG2*, der wichtig für die Oligodendrozytenentwicklung ist. Ein teilweise variables Expressionsmuster, wie z. B. bei *PAX6*, *GFAP* und *PDGFR $\alpha$* , ist vermutlich auf linienspezifische Unterschiede zurückzuführen.



**Abb. 18: Expressionsprofil der RGL-NPCs auf Transkriptionsebene.**

Das Genexpressionsprofil von Kontroll- (Ctrl-3 #S1, #S8) und MLD-spezifischen (liMLD-2 #S4, liMLD-3 #S10/19) RGL-NPCs zeigte, dass alle Linien neurale Stammzell- bzw. radiale Gliazellmarker wie *CD133*, *Nestin* (*NES*), *SOX2*, *ASCL1*, *SOX9*, *PAX6*, *Vimentin* (*VIM*), *BLBP*, *OLIG2*, *GFAP* und *PDGFR $\alpha$*  exprimierten. Der Nachweis des *GAPDH*-Transkripts diente als Ladekontrolle. Als Positivkontrolle wurde die cDNA von humanem, fetalen Hirn und als Negativkontrolle Wasser eingesetzt.

Die Expression des humanen radialen Gliazellmarkers GLAST wurde mittels quantitativer FACS-Analyse detektiert. In Abb. 19 ist zu erkennen, dass die Kontroll- und MLD-spezifischen RGL-NPCs eine hohe Immunreakтивität für diesen Marker aufwiesen (Abb. 19).



**Abb. 19: Quantitative FACS-Analyse der GLAST-Expression in RGL-NPCs.**

Kontroll- (Ctrl-3 #S1) und MLD-spezifische (liMLD-2 #S4, liMLD-3 #S10/19) RGL-NPCs zeigten eine starke Expression des Glutamat-Transporters GLAST (dunkelblau). Die Fluoreszenzintensität von GLAST wird relativ zur Zellzahl angezeigt und mit einer Isotypkontrolle (hellblau) für jede Zelllinie verglichen.

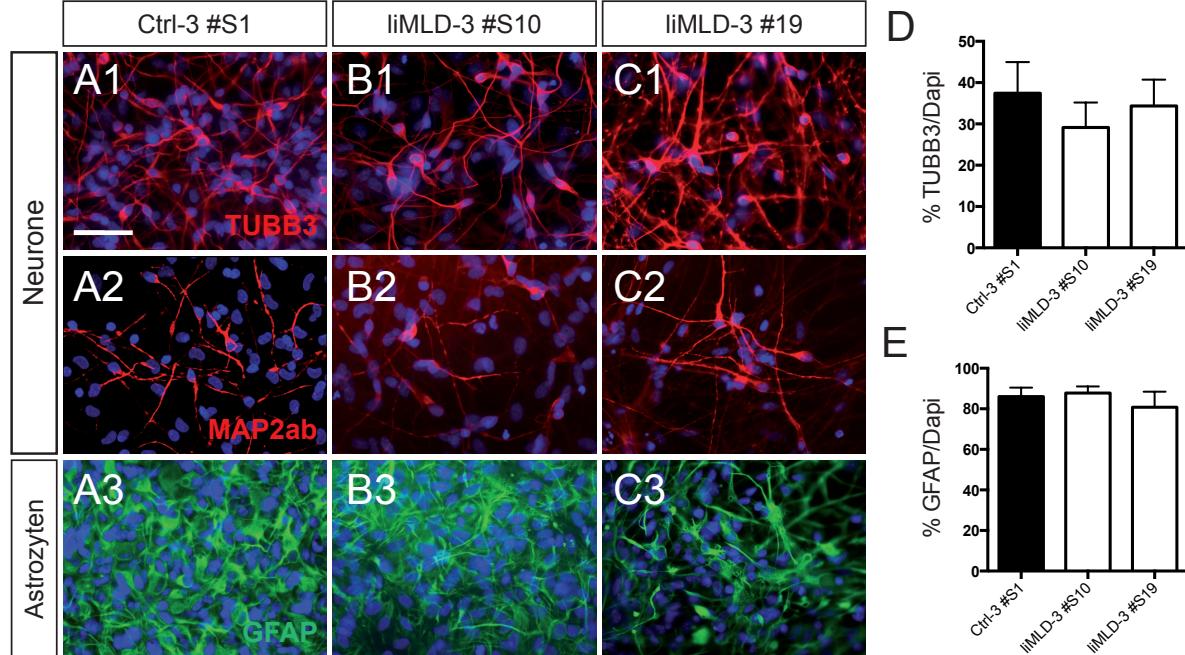
### 3.4 RGL-NPCs differenzieren unter bestimmten Kulturbedingungen in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten

Im Folgenden wurde das tripotente Differenzierungspotential der Kontroll- und MLD-spezifischen RGL-NPCs in die drei Hauptzelltypen des ZNS, in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten, untersucht. Für eine gerichtete Differenzierung der RGL-NPCs wurden den Zellen die Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 entzogen und Faktoren entsprechend der Differenzierung hinzugefügt. Die Ergebnisse werden beispielhaft an einer Kontroll- (Ctrl-3 #S1) und an zwei MLD-spezifischen Linien (liMLD-3 #S10/19) dargestellt.

Um die RGL-NPCs von Kontroll- und MLD-spezifischen Spendern in neuronale Zelltypen zu differenzieren, wurden sie unter dem Einfluss von *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) kultiviert. Dieser Faktor stimuliert die Differenzierung, das Wachstum und das Überleben von Neuronen (Vicario-Abejón *et al*, 1995). Nach 4 Wochen konnten in den Kulturen Zellen detektiert werden, die immunpositiv für den panneuronalen Marker TUBB3 und den reifen Neuronenmarker MAP2ab waren (Abb. 20 A1-C2). Die Anzahl der TUBB3-positiven Neurone war zwischen den Kontroll- und MLD-abgeleiteten Kulturen mit ca. 35 % ähnlich (Abb. 20 D). Mögliche

Schwankungen in der Zellzahl sind dabei eher auf linienspezifische als auf MLD-spezifische Unterschiede zurückzuführen.

Die Differenzierung in Astrozyten konnte unter Einfluss von 10 % FCS induziert werden. Es ist bekannt, dass FCS neben BMPs auch den *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) enthält. Diese begünstigen die astrogiale Differenzierung und führen zu der Expression des astrozytären Markers GFAP (Chiang *et al*, 1996; Mabie *et al*, 1997). Die Kontroll- und MLD-spezifischen Kulturen enthielten nach 2 Wochen ca. 80 % GFAP-positive Astrozyten (Abb. 20 A3-C3, E).

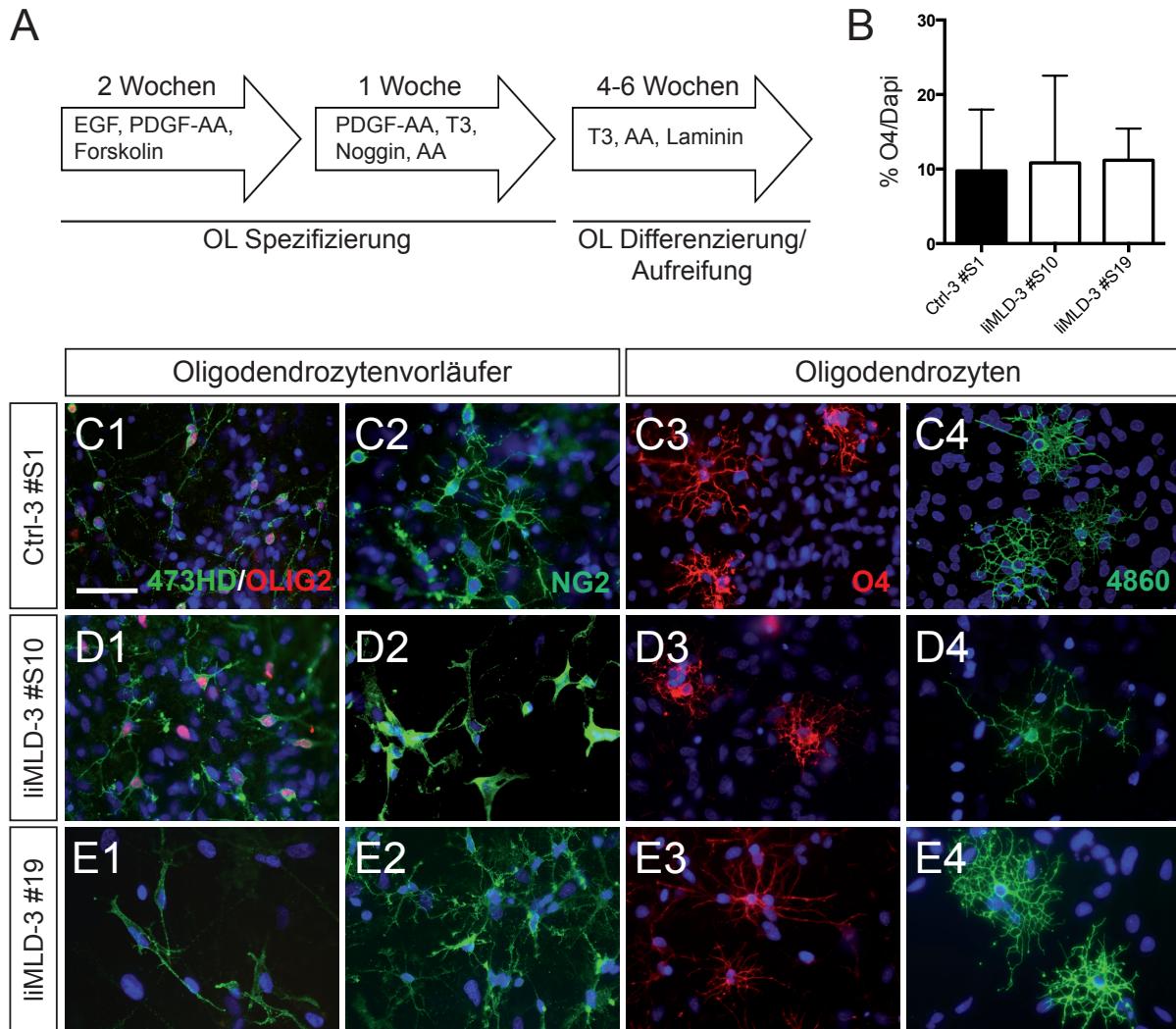


**Abb. 20: Astrogliale und neuronale Differenzierung der RGL-NPCs.**

**A-C:** Kontroll- (Ctrl-3 #S1) und MLD-spezifische (iIMLD-3 #S10/19) RGL-NPCs konnten unter der Zugabe von BDNF in Neurone differenziert werden und exprimierten nach 4 Wochen den panneuronalen Marker TUBB3 (**A1-C1**) sowie den reifen Neuronenmarker MAP2ab (**A2-C2**). Die Differenzierung in Astrozyten (2 Wochen) wurde durch FCS initiiert und durch eine positive GFAP-Färbung bestätigt (**A3-C3**). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 50 µm. **D, E:** Die differenzierten Kulturen der Kontroll- (Ctrl-3 #S1; schwarz) und MLD-spezifischen Linien (iIMLD-3 #S10, #S19; weiß) wurden quantifiziert. In den neuronalen Kulturen (4 Wochen) wurden die TUBB3-positiven (**D**) und in den astrogialen Kulturen (2 Wochen) die GFAP-positiven Zellen gezählt (**E**). Die Anzahl der Zellen ist im Verhältnis zur Gesamtzellzahl (DAPI-positive Zellkerne) angegeben. Die Werte sind in Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

Für die gerichtete Differenzierung der Kontroll- und MLD-spezifischen RGL-NPCs in Oligodendrozyten wurde ein komplexes Differenzierungsprotokoll verwendet. Es wurde zuvor an humanen ESCs etabliert (Gorris *et al*, 2015). Zu Beginn wurde die Proliferation von Oligodendrozytenvorläufern unter Einfluss von PDGF-AA, EGF und Forskolin für 2 Wochen induziert (Abb. 21 A). Zur Unterstützung der Proliferation dieser Vorläuferzellen wurden sie anschließend in Gegenwart von PDGF-AA, T3, Ascorbinsäure (*ascorbic acid*; AA) und dem BMP-Antagonisten Noggin für 1 Woche

kultiviert (Abb. 21 A). Die terminale Ausreifung der Zellen in Oligodendrozyten erfolgte unter Einfluss von T3, AA und Laminin für weitere 4-6 Wochen (Abb. 21 A).



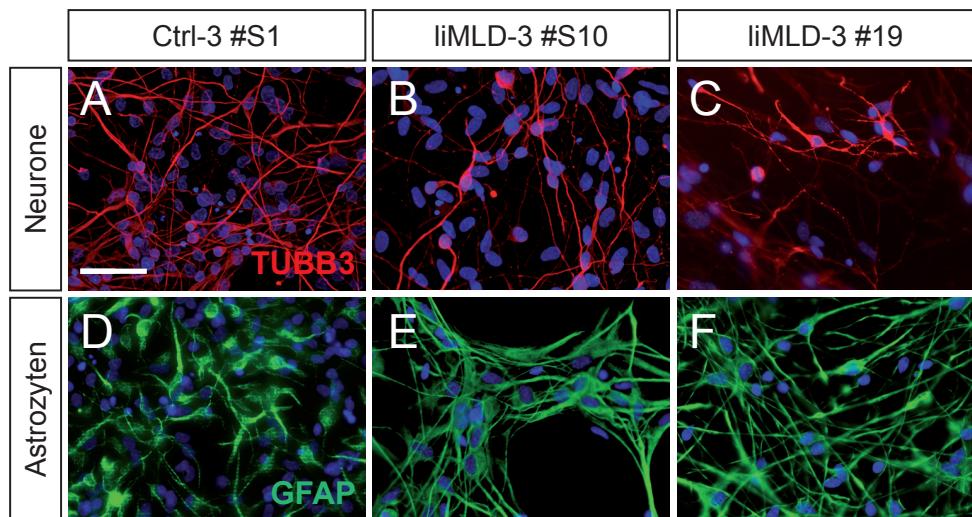
**Abb. 21: Oligodendrogliale Differenzierung der RGL-NPCs.**

**A:** Schematische Darstellung der oligodendroglialen Differenzierung nach Gorris *et al.* 2015. Die RGL-NPCs wurden zunächst für 2 Wochen in der Gegenwart von EGF, PDGF-AA und Forskolin zur Induktion glialer Zelltypen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für eine weitere Woche unter Einfluss von PDGF-AA, T3, AA und Noggin kultiviert, um die Proliferation oligodendroglialer Zellen zu unterstützen, bevor diese für 4-6 Wochen in der Gegenwart von T3, AA und Laminin terminal zu Oligodendrozyten (OL) differenziert und ausgereift wurden. **B:** In den oligodendroglialen Kulturen (4 Wochen terminal) der Kontroll- (Ctrl-3 #S1; schwarz) und der MLD-spezifischen Spendern (iIMLD-3 #S10/19; weiß) wurden die O4-positiven Zellen quantifiziert. Die Anzahl der Zellen ist im Verhältnis zur Gesamtzellzahl (DAPI-positive Zellkerne) angegeben. Die Werte sind in Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. **C-E:** Aus den Kontroll- (Ctrl-3 #S1) und MLD-spezifischen (iIMLD-3 #S10/19) RGL-NPCs konnten über Oligodendrozytenvorläufer (473HD, OLIG2; 3 Wochen; **C1-E1**), frühe Oligodendrozyten (NG2; 4 Wochen terminal; **C2-E2**) bis hin zu reiferen Oligodendrozyten (O4; 4 Wochen terminal; **C3-E3**), die eine immer mehr verzweigte Morphologie ausbildeten (4860; 6 Wochen terminal; **C4-E4**), generiert werden. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 50 µm.

Die einzelnen Entwicklungsschritte konnten immunzytochemisch in den differenzierten Kulturen nachverfolgt werden. Nach 3 Wochen wurden bereits

Oligodendrozytenvorläufer detektiert. Sie waren positiv für OLIG2 und 473HD (Abb. 21 C1-E1). Eine Ausnahme war bei der Linie iIMLD-3 #S19 festzustellen, die kein positives OLIG2-Signal zeigte (Abb. 21 E1), aber dennoch in der Lage war, Oligodendrozyten zu bilden (Abb. 21 E2-E4). 473HD ist ein monoklonaler Antikörper (mAB), der an die Oberfläche von frühen Oligodendrozyten der Maus bindet (Faissner *et al*, 1994; Karus *et al*, 2016). Karus *et al* zeigten, dass dieser auch humane Oligodendrozyten eines frühen Stadiums erkennen kann. Nach 4 Wochen terminaler Ausreifung konnten neben Oligodendrozytenvorläuferzellen und Pre-Oligodendrozyten, die rudimentär verzweigte bipolare Fortsätze hatten und NG2 exprimierten (Abb. 21 C2-E2), auch reifere O4-positive Oligodendrozyten in den Kulturen nachgewiesen werden (Abb. 21 C3-E3). Letztere bildeten eine komplexere Morphologie mit multiplen Fortsätzen aus. Die Anzahl der O4-positiven Oligodendrozyten in den oligodendroglialen Kulturen war bei den ausgewerteten Linien sehr variabel, lag aber im Durchschnitt bei ca. 11 % (Abb. 21 B).

Nach einer terminalen Ausreifung von 6 Wochen wiesen die Oligodendrozyten einen noch höheren Grad an Verzweigung auf und exprimierten das Epitop für den mAB 4860 (Abb. 21 C4-E4). Gorris *et al* demonstrierten bereits, dass mit diesem Marker neben murinen auch humane Oligodendrozyten detektiert werden können (Gorris *et al*, 2015). In der Erstbeschreibung des Antikörpers markierte dieser komplex verzweigte und MBP-exprimierende Oligodendrozyten der Maus (Czopka *et al*, 2009). Neben den Oligodendrozyten fanden sich trotz gerichteter Differenzierung auch Neurone und Astrozyten in den Kulturen (Abb. 22). Es handelt sich daher um Mischkulturen, die im weiteren Verlauf als oligodendrogliale Kulturen bezeichnet werden.

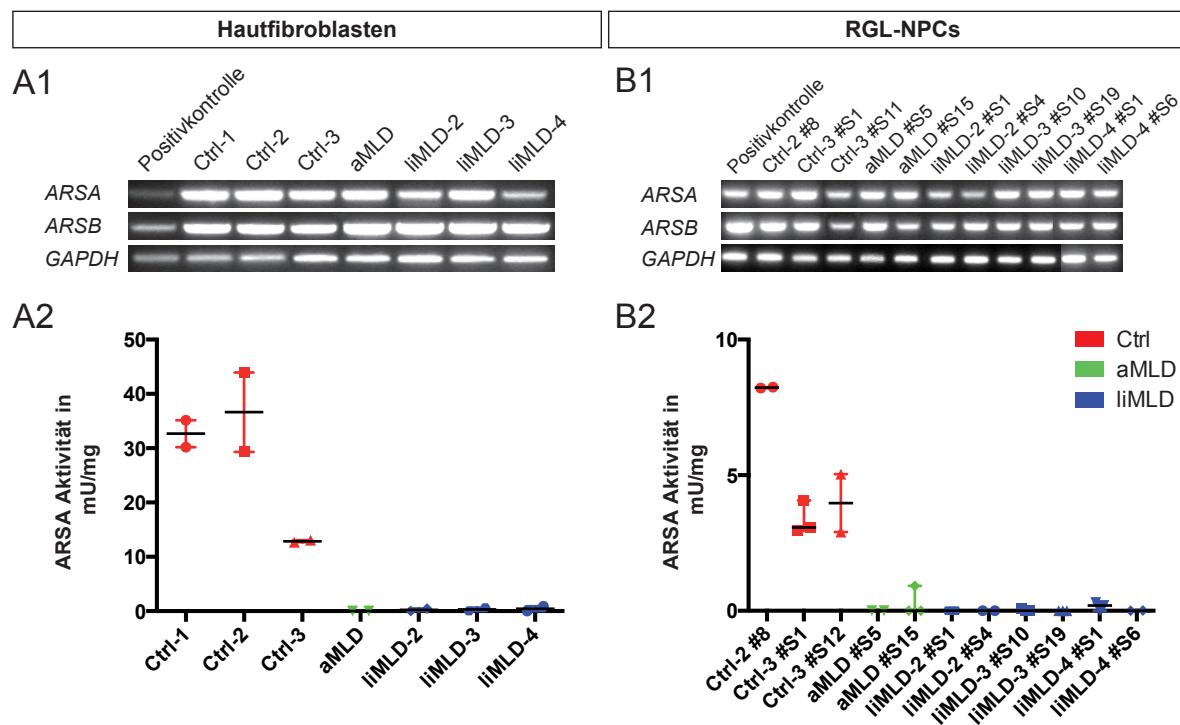


**Abb. 22: Neurone und Astrozyten in oligodendroglialen Kulturen.**

In den 4 Wochen terminal differenzierten oligodendroglialen Kulturen von Kontroll- (Ctrl-3 #S1) und MLD-spezifischen (liMLD-3 #S10/19) Zellen konnten neben den Oligodendrozyten (Abb. 21) auch TUBB3-positive Neurone (A-C) und GFAP-positive Astrozyten (D-F) detektiert werden. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 50 µm.

### 3.5 MLD-spezifische Zellen sind ARSA-defizient

Die Hauptursache der MLD ist ein Defekt im ARSA-Gen. Das kann zu einer eingeschränkten oder dem vollständigen Verlust ARSA-Enzymaktivität führen. Diese Defizienz kann mit Hilfe eines pNCS-basierten Enzymaktivitätsassays überprüft werden (Baum *et al*, 1959; Lee-Vaupel & Conzelmann, 1987). Für diesen Assay werden die intrazellulären löslichen Proteine aus den gewünschten Zellen isoliert und dem künstlichen ARSA-Substrat pNCS ausgesetzt. Die Umsetzung des Substrates kann anhand des Farbumschlags mit einem Spectrophotometer gemessen werden. Die patientenspezifischen Zellen stammten von Spendern, die an unterschiedlichen Formen der MLD erkrankt waren und eine niedrige bis gar keine ARSA-Enzymaktivität aufweisen sollten. Es wurde überprüft, ob die Hautfibroblasten und die daraus abgeleiteten RGL-NPCs gemäß ihrer Krankheitsform die zu erwartenden Enzymaktivitäten *in vitro* zeigten. In Abb. 23 ist zu sehen, dass die Zellen, die von MLD-Patienten (grün, blau) gewonnen wurden, zwar das ARSA-Transkript exprimierten (Abb. 23 A1, B1), aber im Vergleich zu den Kontrollzellen (rot) kaum eine intrazelluläre Enzymaktivität aufwiesen (Abb. 23 A2, B2).

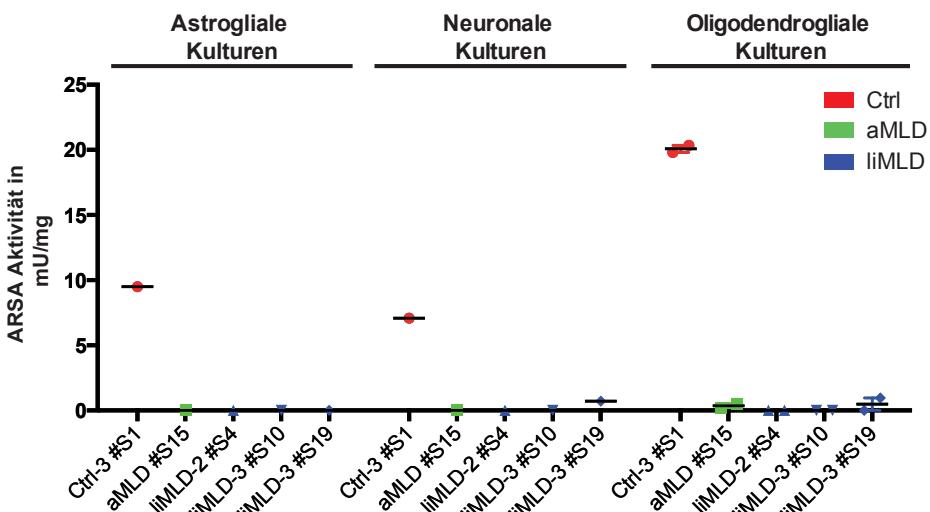


**Abb. 23: Expression und Enzymaktivität von ARSA in Hautfibroblasten und RGL-NPCs.**

**A1, B1:** Anhand einer RT-PCR konnte festgestellt werden, dass alle untersuchten Hautfibroblasten und RGL-NPC-Linien, sowohl von MLD-spezifischen als auch von Kontrollspendern, das Transkript von ARSA und ARSB exprimierten. Der Nachweis des GAPDH-Transkripts diente als Ladekontrolle und die cDNA von humanem, fetalen Hirn diente als Positivkontrolle. **A2, B2:** Der ARSA-Enzymaktivitätsassay zeigte, dass bei den Hautfibroblasten (A2) und den RGL-NPCs (B2) die MLD-spezifischen Zellen (grün, blau) eine niedrige bis keine intrazelluläre Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen (rot) aufwiesen. Die ARSA-Enzymaktivität ist angegeben in mU/mg. Es sind Mediane und Einzelwerte dargestellt.

Eine gemessene ARSA-Enzymaktivität in den MLD-spezifischen Zellen (grün, blau) ist möglicherweise auf die Expression der *Arylsulfatase B* (ARSB) zurückzuführen, welche auch das ARSA-Substrat im Enzymaktivitäts-Assay metabolisieren kann (Lee-Vaupel & Conzelmann, 1987). ARSB wird von allen Kontroll- und MLD-abgeleiteten Zelllinien exprimiert (Abb. 23 A1, B1).

Neben den Hautfibroblasten und RGL-NPCs wurden auch die astroglial, neuronal und oligodendroglial differenzierten Kulturen hinsichtlich ihrer Fähigkeit das ARSA-Substrat umzusetzen, untersucht. Erneut konnte in den MLD-abgeleiteten Kulturen (grün, blau) eine niedrige bis keine intrazelluläre ARSA-Enzymaktivität im Vergleich zu den Kontrollkulturen (rot) gemessen werden (Abb. 24).



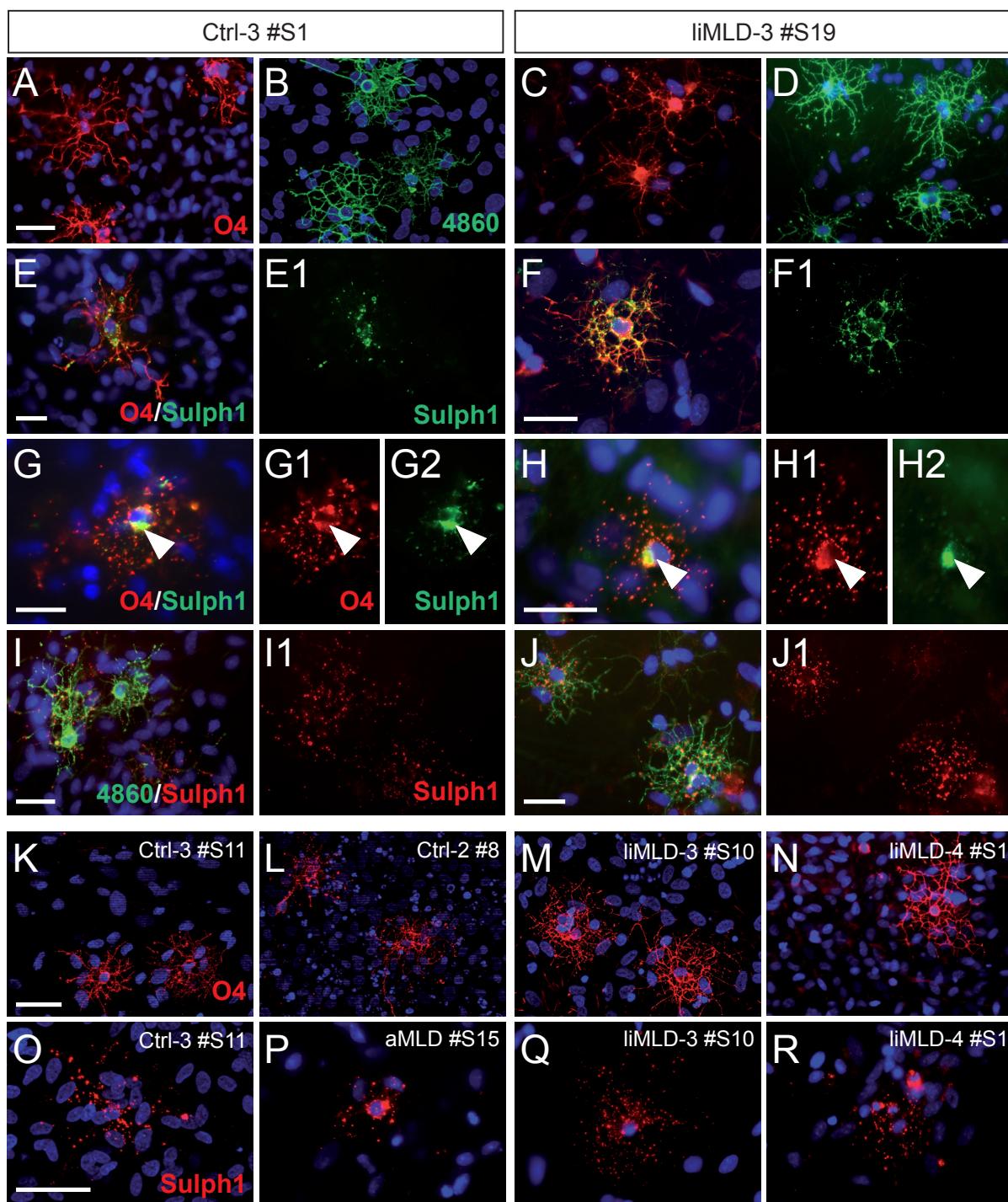
**Abb. 24: ARSA-Aktivität in astroglialen, neuronalen und oligodendroglialen Kulturen.**

Die astroglialen, neuronalen und oligodendroglialen Kulturen der MLD-spezifischen Zellen (grün, blau) zeigten eine niedrige bis keine intrazelluläre ARSA-Enzymaktivität im Vergleich zu Kulturen von Kontrollzellen (rot). Die ARSA-Enzymaktivität ist angegeben in mU/mg. Es sind Mediane und Einzelwerte dargestellt.

### 3.6 MLD-spezifische und Kontroll-Oligodendrozyten zeigen eine ähnliche Differenzierung sowie einen vergleichbaren Nachweis von Sulfatid

Im Krankheitsverlauf der MLD kann aufgrund der ARSA-Defizienz Sulfatid nicht abgebaut werden und lagert sich intralysosomal ab. Da Sulfatid ein Hauptbestandteil des Myelins ist, kommen die pathologischen Anhäufungen vorwiegend in den myelinbildenden Zellen des ZNS, den Oligodendrozyten, vor. In dem hier vorgestellten *in vitro*-Kultursystem war es möglich, MLD-abgeleitete Oligodendrozyten zu generieren. Es wurde überprüft, ob in diesen Zellen, entsprechend der fehlenden ARSA-Enzymaktivität, *in vitro* ebenfalls prominente Sulfatidablagerungen sowie daraus resultierende Defekte in der Oligodendrozyten-differenzierung detektiert werden können.

In Abb. 25 A-D ist mit Hilfe der oligodendrozytenspezifischen Marker zu erkennen, dass es zu den untersuchten Zeitpunkten keinen erkennbaren Unterschied im Differenzierungsverhalten der Oligodendrozyten zwischen Kontroll- und MLD-abgeleiteten Zellen gab. Nach 4 Wochen terminaler Ausreifung bildeten sich in beiden oligodendroglialen Kulturen O4-positive Oligodendrozyten mit multiplen Fortsätzen (Abb. 25 A, C). Nach 6 Wochen differenzierten die Zellen weiter aus und 4860-positive und reich verzweigte Oligodendrozyten konnten bei beiden dargestellten Linien detektiert werden (Abb. 25 B, D).



**Abb. 25: Vergleich der Kontroll- und MLD-spezifischen Oligodendrozyten *in vitro*.**

Nach terminaler Ausreifung von 4 (O4; **A**; **C**) bzw. 6 Wochen (4860; **B**, **D**) konnten Oligodendrozyten von Kontroll- (Ctrl-3 #S1) und MLD-spezifischen (liMLD-3 #S19) Spendern generiert werden. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers für Sulfatid (Sulph1) wurde in 4 und 6 Wochen terminal differenzierten Oligodendrozyten (Kontrolle und MLD-abgeleitet) ein positives Sulph1-Signal festgestellt (**E-J**). Eine intrazelluläre Kofärbung von Sulph1 mit O4, welcher auch Sulfatide erkennt, bestätigte ein spezifisches Signal für den Sulph1-Antikörper (**G**, **H**, Pfeile). Nach terminaler Ausreifung von 4-6 Wochen konnten auch in weiteren Kontroll- und MLD-abgeleiteten oligodendroglialen Kulturen O4- (**K-N**) sowie Sulph1-positive Zellen (**O-R**) detektiert werden. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: A-D; K-R: 50 µm; E-J: 25 µm.

Auch im Vergleich zu weiteren Kontroll- und MLD-abgeleiteten O4-positiven Oligodendrozyten konnte kein Unterschied in der Morphologie oder Quantität der

Zellen festgestellt werden (Abb. 21 B, Abb. 25 K-N). Um die Sulfatidablagerungen sichtbar zu machen, wurde Sulfatid mit Hilfe des spezifischen Antikörpers Sulph1 intrazellulär angefärbt (Fredman *et al*, 1988). Die Kontroll- und MLD-abgeleiteten Oligodendrozyten zeigten ein vergleichbares Sulph1-Signal, sowohl nach 4 Wochen in einer Kofärbung mit O4 (Abb. 25 E, F), als auch nach 6 Wochen in einer Kofärbung mit 4860 (Abb. 25 I, J). Um eine Kreuzreaktion des O4-Antikörpers mit Sulph1 auszuschließen, wurde die Färbung unter Anwendung von Triton-X-100 wiederholt. Dadurch wurden die Zellmembranen aufgebrochen und intrazelluläre Epitope freigelegt. Die Färbung bestätigte ein spezifisches Signal für den Sulph1-Antikörper, welches nicht O4-positiv war (Abb. 25 G, H; Pfeile). Es konnte kein Unterschied zwischen den Kontroll- und MLD-spezifischen Oligodendrozyten festgestellt werden. Die intrazelluläre Immunreakтивität für Sulph1 konnte auch in weiteren Kontroll- und MLD-abgeleiteten Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Abb. 25 O-R).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es in den hier untersuchten Differenzierungszeitpunkten der Oligodendrozyten in den oligodendroglialen Mischkulturen (4-6 Wochen) keinen offensichtlichen Unterschied zwischen Kontroll- und MLD-abgeleiteten Zellen gab. In den MLD-abgeleiteten Zellen konnten, bis auf die ARSA-Defizienz, keine weiteren Charakteristika der MLD festgestellt werden.

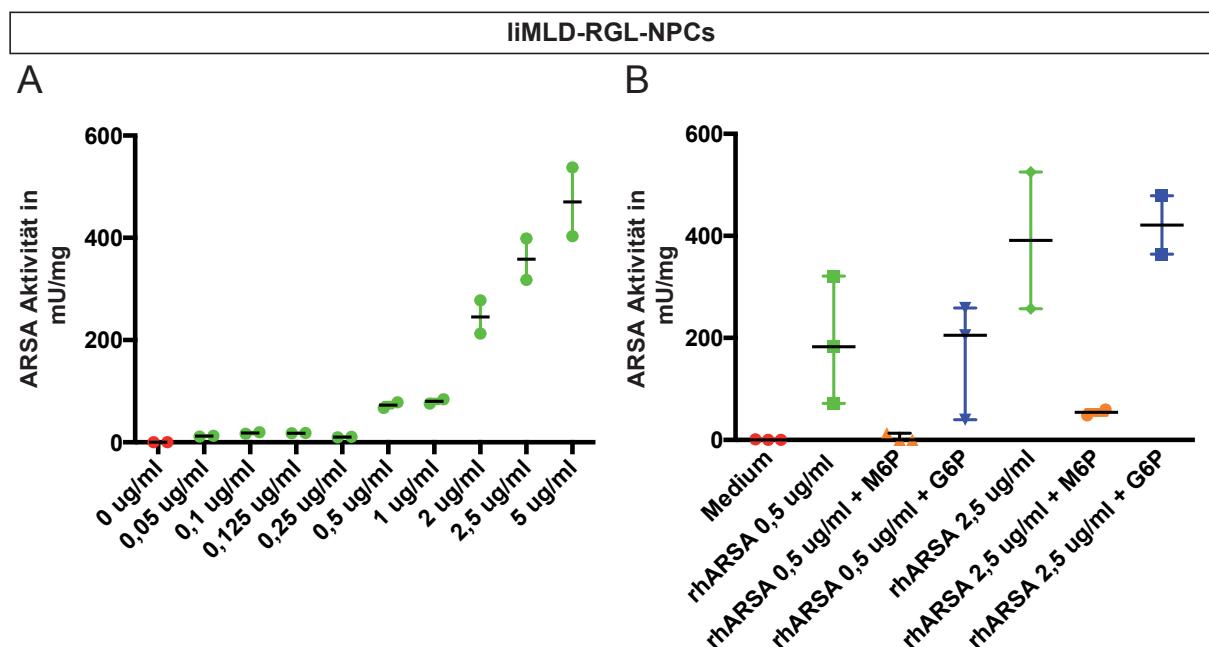
### **3.7 RGL-NPCs als humanes Zellkulturmodell für die Aufnahme extrazellulärer ARSA**

Extrazelluläre ARSA kann über M6P-Rezeptoren von ARSA-defizienten Zellen aufgenommen und zum Lysosom transportiert werden, um dort die Enzymaktivität wiederherzustellen. Dieser Vorgang der Kreuzkorrektur ist ein wichtiger Angriffspunkt für Therapieansätze der MLD, die darauf beruhen, das defekte Enzym zu ersetzen (Platt & Lachmann, 2009; Matzner & Gieselmann, 2005). In diesem Teil der Arbeit wurde überprüft, ob die ARSA-defizienten Zellen exogene ARSA aufnehmen können. Ein entsprechendes *in vitro*-Modell kann für Vorversuche für entsprechende Therapiestrategien von großem Nutzen sein.

#### **3.7.1 RGL-NPCs nehmen extrazelluläre rhARSA abhängig von M6P-Rezeptoren auf**

In einem ersten Versuch wurde überprüft, ob die generierten humanen MLD-abgeleiteten Zellen fähig sind, exogene ARSA aufzunehmen. Dafür wurden die MLD-spezifische RGL-NPCs (iMLD-2 #S4) mit rhARSA (zur Verfügung gestellt von Dr.

Ulrich Matzner, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn) in verschiedenen Konzentrationen für 24 h behandelt. Um sicherzustellen, dass ausschließlich die Enzymaktivität von intrazellulären löslichen Proteinen gemessen wurde, wurden die Zellen vor der Isolation mit einem sauren Waschpuffer behandelt. Dadurch wird das rhARSA-Protein, welches nach der Behandlung noch an der Zelloberfläche haftet und nicht aufgenommen wurde, entfernt (Bockenhoff *et al*, 2014; Matthes *et al*, 2011). Anschließend wurde die ARSA-Enzymaktivität gemessen. In allen behandelten liMLD-spezifischen Zellen (grün) konnte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (0 µg/ml, rot) eine Wiederherstellung der intrazellulären ARSA-Aktivität demonstriert werden (Abb. 26 A).



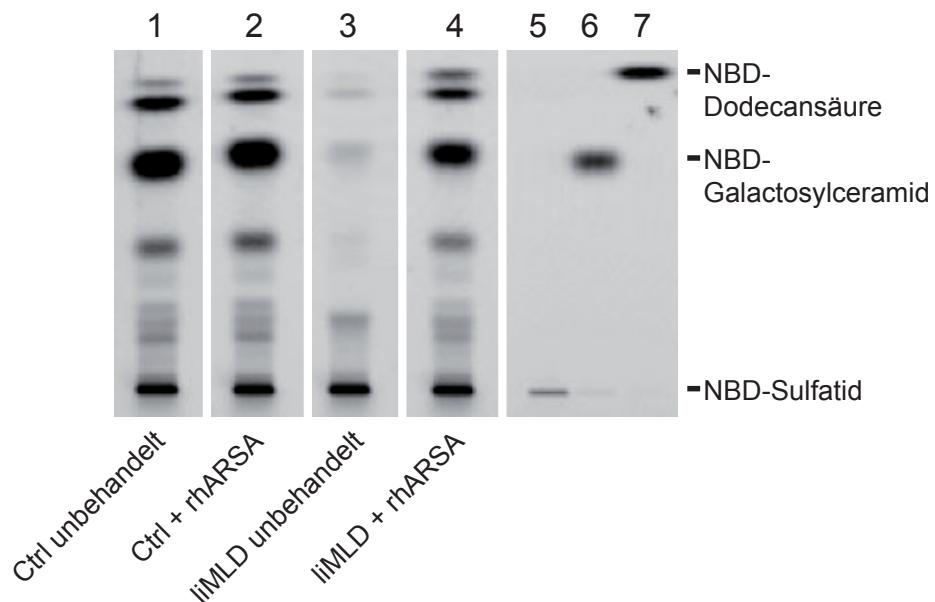
Die Aufnahme von rhARSA findet über Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) statt (Klein *et al*, 2009; Bockenhoff *et al*, 2014). Die MPRs können *in vitro* über die Zugabe von M6P blockiert werden. Um in der vorliegenden Arbeit eine MPR-abhängige Aufnahme von ARSA zu demonstrieren, wurde bei der Verabreichung von rhARSA in einem weiteren Experiment M6P hinzugegeben. Durch die Bindung von M6P an die MPRs soll verhindert werden, dass rhARSA aufgenommen werden kann.

Abb. 26 B zeigt, dass die ARSA-Aufnahme durch die kompetitive Hemmung der MPRs unterdrückt werden konnte. Das bestätigt eine MPR-abhängige Aufnahme von rhARSA in die Zellen. Die Zugabe von Glukose-6-Phosphat (G6P), einem weiteren phosphorylierten Zuckermolekül, hatte keinen negativen Effekt auf die ARSA-Aufnahme (Abb. 26 B, blau). Die verminderte ARSA-Aufnahme durch M6P ist demnach spezifisch und nicht durch unspezifische Effekte, wie z. B. durch die Veränderungen der Osmolarität des Mediums, entstanden. Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass die ARSA-defizienten RGL-NPCs grundsätzlich in der Lage sind, extrazelluläre ARSA über M6P-Rezeptoren aufzunehmen.

### 3.7.2 Funktionelle Wiederherstellung der ARSA-Enzymaktivität in RGL-NPCs

Mit Hilfe des ARSA-Enzymaktivitätsassays wird die intrazelluläre Aktivität der Zellen gemessen. Das in den Zellen befindliche ARSA-Protein setzt in isolierter Form das künstliche ARSA-Substrat pNCS um. Um sicherzustellen, dass das von den MLD-Zellen aufgenommene ARSA-Protein seine physiologische Funktion erfüllt und Sulfatid bei saurem pH-Wert im Lysosom abbaut, wurde der Sulfatidmetabolismus in den Zellen genauer analysiert (durchgeführt von Dr. Ulrich Matzner, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn). Hierfür wurden die unbehandelte und behandelte Kontroll- und MLD-spezifischen RGL-NPCs mit dem fluoreszenzmarkiertem Sulfatidanalogen NBD-Sulfatid inkubiert (nach Monti *et al*, 1992; Abb. 30 B). NBD-Sulfatid wird von den Zellen aufgenommen und abhängig von der intrazellulären Funktionalität der ARSA metabolisiert. Die möglich anfallenden Abbauprodukte, wie NBD-Galactosylceramid und NBD-Dodecansäure, werden durch die hohe Wasserlöslichkeit des angehängten Fluorophors in das Medium der Zellen abgegeben und können anschließend gemessen werden. Dazu werden sie aus dem Medium isoliert, anhand einer Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit einem entsprechenden Fluoreszenzscanner bei einer bestimmten Wellenlänge sichtbar gemacht. Mit Hilfe entsprechender Standards gibt der Gehalt der Abbauprodukte Aufschluss über die funktionelle ARSA-Enzymaktivität in den Zellen. Im Medium von unbehandelten Kontroll-RGL-NPCs konnten neben NBD-Galactosylceramid und NBD-Dodecansäure auch weitere NBD-markierte Lipide detektiert werden (Abb. 27, Spur 1). Das bestätigt, dass NBD-Sulfatid effizient intrazellulär im lysosomalen Kompartiment der Zellen hydrolysiert worden ist. Der

Anteil an hydrolysiertem NBD-Sulfatid wurde durch die Behandlung der Zellen mit rhARSA (0,5 µg/ml) nicht erhöht (Abb. 27, Spur 2).



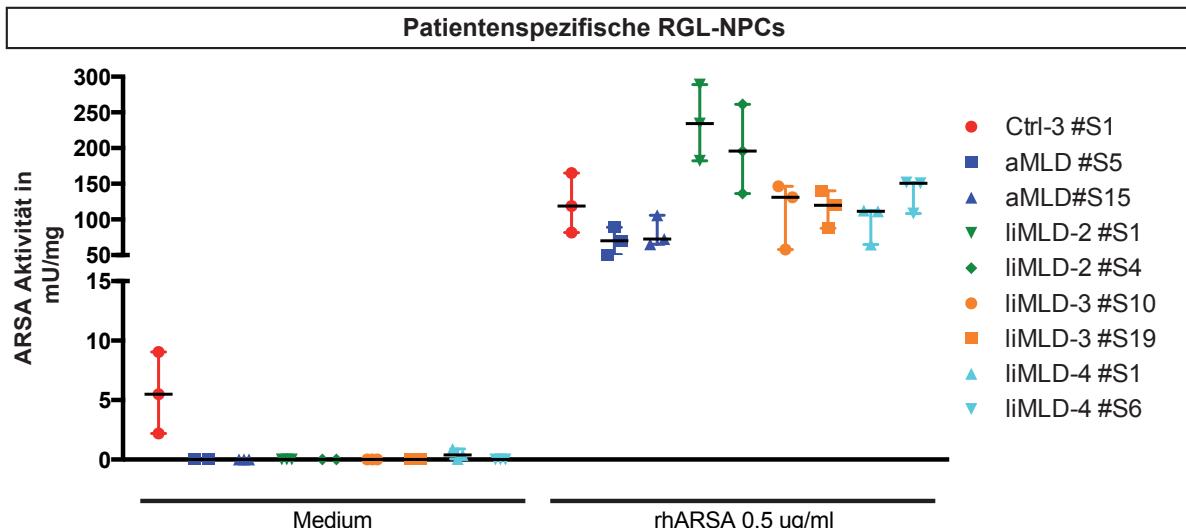
**Abb. 27: Analyse des Sulfatidmetabolismus.**

Der Fluoreszenzscan zeigt die Dünnschichtchromatographie der fluoreszierenden Abbauprodukte im Medium von Kontroll- bzw. liMLD-spezifischen RGL-NPCs ohne Behandlung (1, 3) und behandelt mit 0,5 µg/ml rhARSA (2, 4) und nach Inkubation (6 h) mit NBD-Sulfatid. Als Kontrollen liefern bei der Dünnschichtchromatographie NBD-Sulfatid (2 pmol, Spur 5), NBD-Galactosylceramid (2 pmol, Spur 6) und NBD-Dodecansäure (2 pmol, Spur 7) mit.

Im Vergleich zu den Kontrollzellen produzierten liMLD-spezifische RGL-NPCs nur Spuren von NBD-Galactosylceramid und anderen NBD-markierten Lipiden (Abb. 27, Spur 3). Das bestätigt eine stark reduzierte ARSA-Enzymaktivität in diesen Zellen. Diese Defizienz konnte durch die Behandlung der Zellen mit rhARSA ausgeglichen werden (Abb. 27, Spur 4). Im Fluoreszenzscan der Dünnschichtchromatographie sind die Abbauprodukte von Sulfatid deutlich zu erkennen. Das bestätigt nicht nur die intrazelluläre Präsenz von ARSA, sondern auch die funktionelle Wiederherstellung der ARSA-Enzymaktivität.

### 3.7.3 Patientenspezifische Unterschiede bei der Aufnahme von exogener rhARSA in MLD-RGL-NPCs

Die Aufnahme von exogener rhARSA wurde auch in weiteren liMLD-spezifischen RGL-NPC-Linien überprüft (Abb. 28). Neben einer Kontrolllinie (Ctrl-3 #S1, rot) wurden von den vier zur Verfügung stehenden MLD-Patienten (siehe Tabelle 1, 2) jeweils zwei RGL-NPC-Linien für 24 h mit rhARSA (0,5 µg/ml) behandelt.



**Abb. 28: ARSA-Aktivität in rhARSA-behandelten MLD-spezifischen RGL-NPCs.**

Es wurden RGL-NPCs von einer Kontrolle (Ctrl-3 #S1, rot) und vier verschiedenen MLD-Patienten (jeweils 2 NPC-Klone) für 24 h mit rhARSA (0,5 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde die ARSA-Enzymaktivität gemessen. Die Ergebnisse wurden mit nicht behandelten (Medium) Kulturen verglichen. Die ARSA-Enzymaktivität ist angegeben in mU/mg. Es sind Einzelwerte und Mediane dargestellt.

Es wurden drei unabhängige Experimente für jede Patientenlinie durchgeführt (Abb. 28). Ein p-Wert  $< 0,2$  und  $> 0,05$  wurde unter Berücksichtigung der Streuung, die beim Vergleichen von unabhängigen biologischen Präparaten zu erwarten ist, als potentiell biologisch relevant erachtet;  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. In Tabelle 3 sind die p-Werte der einzelnen Vergleichspaare aufgeführt. Zwischen den einzelnen NPC-Klonen eines Patienten liegt weitestgehend keine interklonale Variabilität vor (siehe fettgedruckte Werte in Tabelle 3). Es sind aber durchaus relevante Unterschiede zwischen den Patienten zu erkennen. Hierbei fällt insbesondere die Linie liMLD-2 auf, die im Vergleich zu den anderen Patienten mehr ARSA-Enzym aufzunehmen scheint (Abb. 28, grün).

**Tabelle 3: P-Werte zu den ARSA-Enzymaktivitätsmessungen an patientenspezifischen RGL-NPCs nach rhARSA-Behandlung.**

p-Werte	aMLD #S15	liMLD-2 #S1	liMLD-2 #S4	liMLD-3 #S10	liMLD-3 #S19	liMLD-4 #S1	liMLD-4 #S6
aMLD #S5	<b>0,539</b>	0,007	0,028	0,229	0,072	0,244	0,021
aMLD #S15	-	0,010	0,038	0,366	0,154	0,244	0,042
liMLD-2 #S1		-	<b>0,475</b>	0,040	0,026	0,016	0,045
liMLD-2 #S4			-	0,130	0,104	0,061	0,191
liMLD-3 #S10				-	<b>0,903</b>	0,647	0,040
liMLD-3 #S19					-	0,421	0,369
liMLD-4 #S1						-	<b>0,127</b>

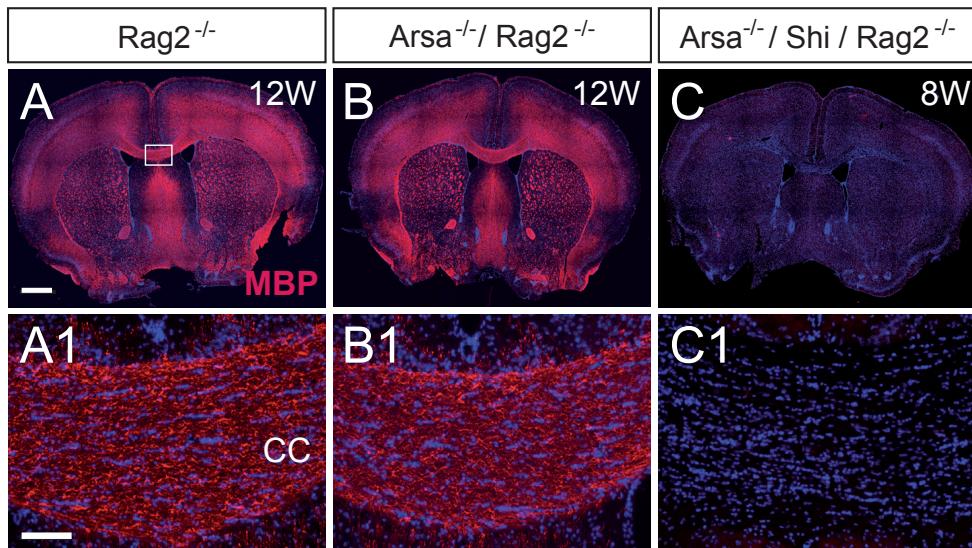
Die statistische Auswertung wurde mittels t-Tests durchgeführt. Es sind die p-Werte zu den ARSA-Enzymaktivitätsmessungen an patientenspezifischen RGL-NPCs, die mit 0,5 µg/ml rhARSA behandelt wurden, aufgelistet. Kursive p-Werte sind statistisch signifikant mit  $p < 0,05$  und fettgedruckte Werte stellen interklonale Übereinstimmungen dar.

### **3.8 Das Verhalten von *in vitro*-generierten MLD-spezifischen Zellen in einem Arsa- und myelindefizienten Milieu**

Es gibt kein natürlich vorkommendes Tiermodell für die MLD. Um dennoch die molekularen Pathomechanismen und insbesondere mögliche Therapieansätze *in vivo* evaluieren zu können, wurde die Arsa<sup>-/-</sup>-Maus mittels homologer Rekombination generiert (Hess *et al*, 1996). Durch die Arsa-Defizienz entstehen pathologische Sulfatidablagerungen, die mit dem Alter zunehmen. Dennoch entwickelt die Arsa<sup>-/-</sup>-Maus einen milderen Phänotyp im Vergleich zum Menschen, ohne weitreichende Demyelinisierung und mit schwächeren neurologischen Symptomen. Um ein Tiermodell mit einem zusätzlichen myelindefizienten Milieu zu schaffen, wurde für diese Arbeit der genetische Hintergrund der Shiverer-Maus in den der Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus eingekreuzt. Durch die Deletion im *Mbp*-Gen wird bei Homozygotie im ZNS der Mäuse kein kompaktes Myelin gebildet (Molineaux *et al*, 1986; Dupouey *et al*, 1979). Aufgrund des Rag2-Hintergrunds wird eine Abstoßungsreaktion auf die transplantierten Zellen vermieden. Damit wurden Mäuse geschaffen, welche Arsa-defizient sind, kein Sulfatid abbauen und kein Myelin ausbilden können. Dieses Modell soll genutzt werden, um oligodendrogliale ARSA-defiziente Zellen *in vivo* zu studieren und therapeutische Anwendungen zu evaluieren.

### 3.8.1 Die Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus ist myelindefizient und weist Sulfatidablagerungen im Gehirn auf

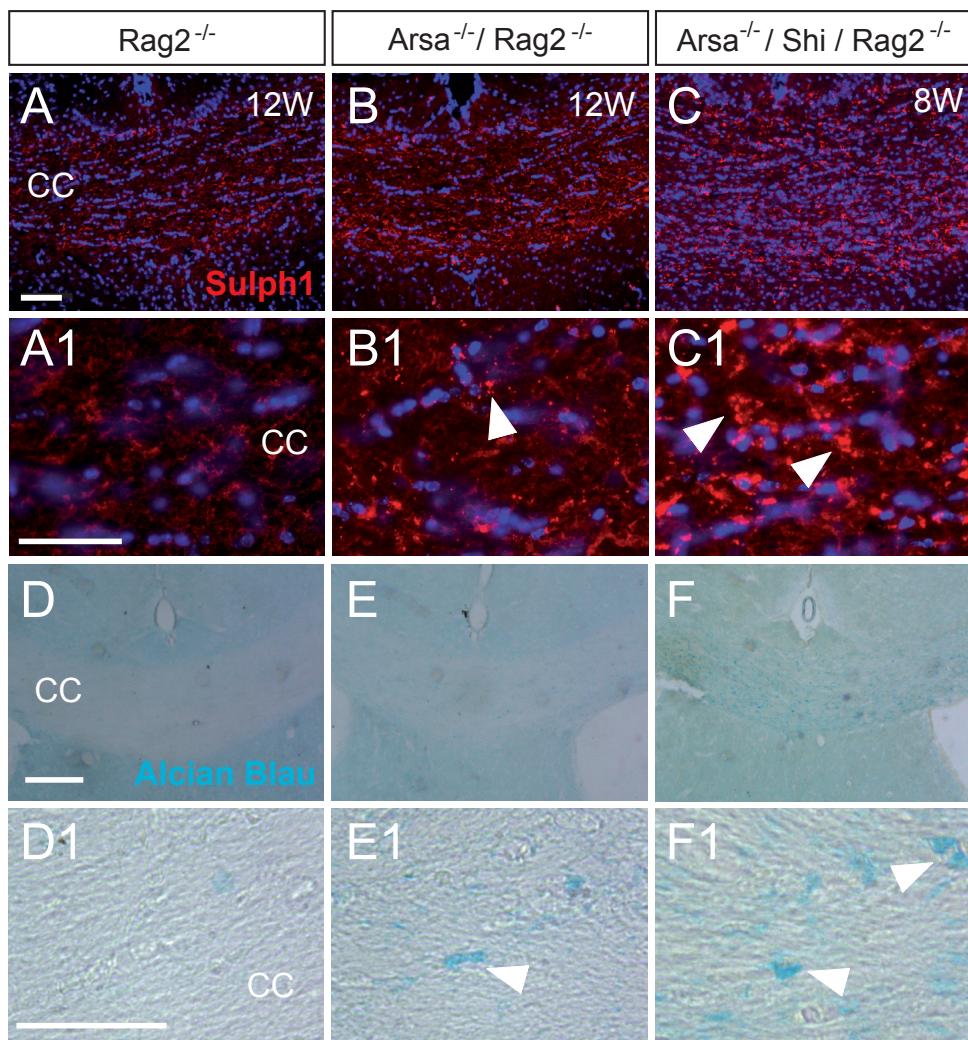
Die Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>- und die Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus wurden im Vergleich zur immundefizienten (Rag2<sup>-/-</sup>) Maus, die als Kontrolle diente, zuerst immunhistochemisch hinsichtlich der MBP-Expression analysiert. In der neu generierten Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus konnte im Gegensatz zur Rag2<sup>-/-</sup>- und zur Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus im gesamten Gehirn keine MBP-Immunreaktivität festgestellt werden (Abb. 29).



**Abb. 29: MBP-Expression *in vivo*.**

In der 8 Wochen (W) alten Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus (C, C1) konnte im Vergleich zu den 12 Wochen alten Rag2<sup>-/-</sup>- (A, A1) bzw. Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>-Mäuse (B, B1) kein positives MBP-Signal festgestellt werden. Das Kästchen zeigt an, welcher Bereich vergrößert dargestellt worden ist. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. CC = *Corpus callosum*. Maßstabsbalken: A-C: 1000 µm; A1-C1: 100 µm.

Neben der MBP-Expression wurden auch die Sulfatidablagerungen in den verschiedenen Tiermodellen über den Sulfatid-spezifischen Antikörper Sulph1 histologisch analysiert und verglichen (Abb. 30 A-C). Beispielhaft wurde das *Corpus callosum* (CC) genauer betrachtet. Es ist zu erkennen, dass die Immunreaktivität für den Antikörper in der Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>- und der Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus gegenüber der Rag2<sup>-/-</sup>-Maus stärker ausgeprägt war (Abb. 30 A-C1). Ein vergleichbares Ergebnis lieferte auch eine Alcian Blau-Färbung, die ebenfalls spezifisch angereicherte Sulfatide anfärbt (Abb. 30 D-F1; Wittke *et al*, 2004; Ramakrishnan *et al*, 2007). Die Alcian Blau-positiven Akkumulationen traten vorwiegend in den Arsa-defizienten Mausmodellen auf (Abb. 30 E1, F1, Pfeile). Bei genauerer Betrachtung der beispielhaft untersuchten Präparaten schienen die Sulph1- und Alcian Blau-positiven Ablagerungen in der Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus (Abb. 30 C1, F1, Pfeile) prägnanter zu sein als in der Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus (Abb. 30 B1, E1, Pfeile).



**Abb. 30: Sulfatidablagerungen *in vivo*.**

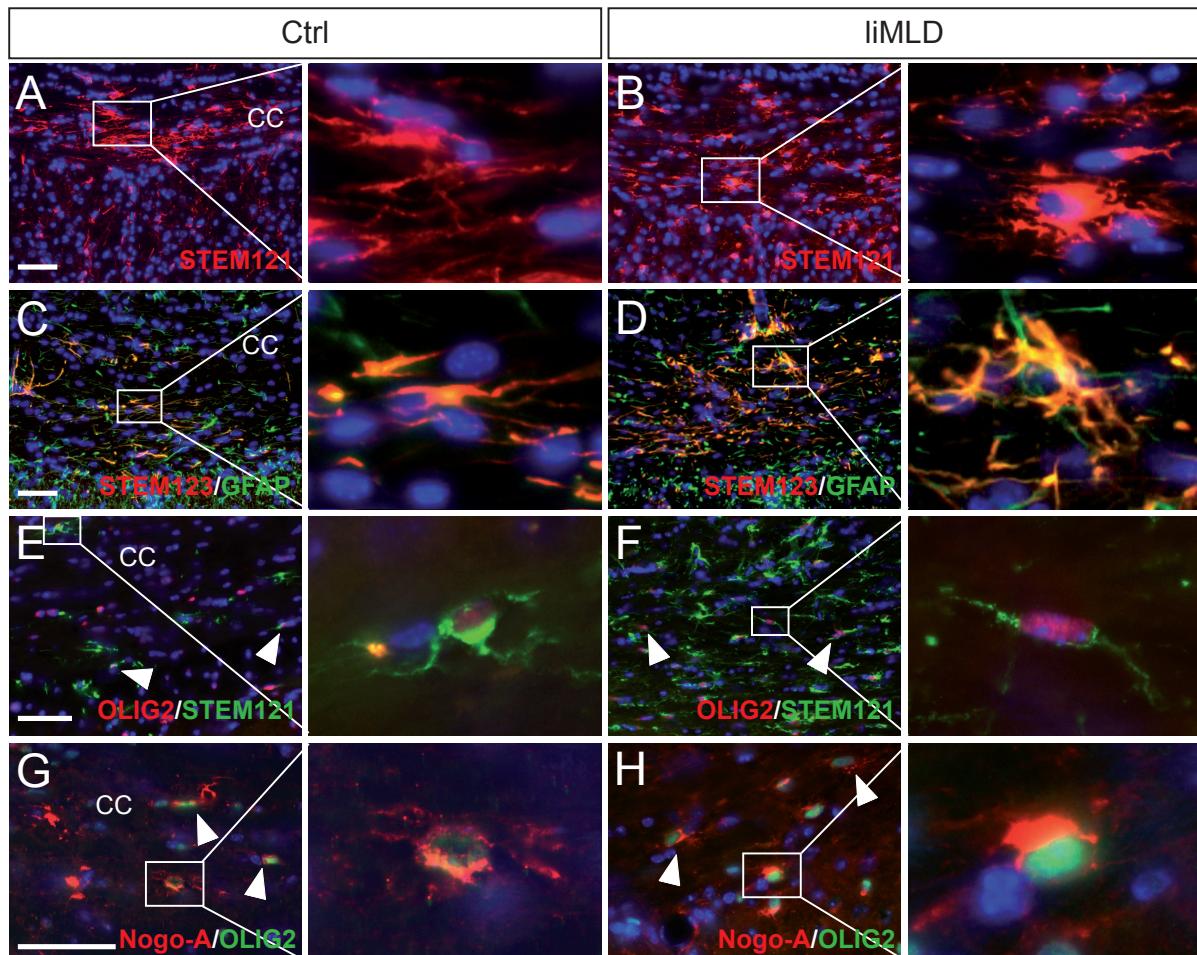
Im Gegensatz zur Rag2<sup>-/-</sup>-Maus (12 Wochen; **A**, **D**) konnten in der Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>- und in der Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus nach 12 bzw. 8 Wochen (W) deutliche Sulfatidablagerungen detektiert werden (**B-C1**, **E-F1**). Die Ablagerungen sind mit Hilfe einer Sulph1- (**A-C1**) bzw. einer Alcian Blau-Färbung (**D-F1**) dargestellt. Pfeile deuten auf Sulfatidakkumulationen. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. CC = *Corpus callosum*. Maßstabsbalken: A-C: 100 µm; A1-C1, D-F1: 10 µm.

Insgesamt waren in der Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>- und Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus die Sulph1-positiven Ablagerungen hauptsächlich im *Corpus callosum*, im Striatum, sowie in schwächerer Ausprägung im Cortex zu finden. Alcian Blau-positive Akkumulationen wurden neben dem *Corpus callosum* auch in weiteren Fasersträngen der weißen Substanz, wie Commisura anterior und Fimbria detektiert.

### 3.8.2 RGL-NPCs überleben in der Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus und differenzieren in gliale Subtypen

Die nachfolgend beschriebenen Transplantationsexperimente in der Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus dienten dazu, das Überleben und die Differenzierung der transplantierten Zellen *in vivo* zu untersuchen. Die Kontroll- (Ctrl-3 #S1, Ctrl) und liMLD-spezifische (liMLD-2 #S4, liMLD) RGL-NPCs wurden in die anterioren Anlagen des *Corpus*

*callosum* beider Hemisphären von neugeborenen *Arsa*<sup>-/-</sup>/*Rag2*<sup>-/-</sup>-Mäusen transplantiert. Die Gehirne wurden nach 8 Wochen analysiert (Abb. 31). Durch die ARSA-Defizienz wurde ausgeschlossen, dass es in den MLD-abgeleiteten Zellen zu einer Kreuzkorrektur des ARSA-Enzyms durch das Mausgewebe kommt.



**Abb. 31: Analyse der transplantierten RGL-NPCs *in vivo*.**

Es wurden RGL-NPCs von Kontroll- (Ctrl) und liMLD-spezifischen (liMLD) Spendern in die beiden Hemisphären von neonatalen *Arsa*<sup>-/-</sup>/*Rag2*<sup>-/-</sup>-Mäusen transplantiert. 8 Wochen später wurden die transplantierten Zellen analysiert. Der Fokus wurde auf das *Corpus callosum* (CC) gelegt, da hier von Beginn an STEM121-positive Zellen gefunden wurden (A, B). Sowohl unter den Ctrl- als auch unter den liMLD-Zellen konnten Zellen detektiert werden, die doppelpositiv für GFAP/STEM123 (C, D) sowie für OLIG2 und den humanspezifischen Marker STEM121 bzw. Nogo-A waren (E-H; Pfeile deuten beispielhaft auf doppelpositive Zellen). Die weißen Kästchen zeigen den vergrößerten Bildausschnitt an. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 10 µm.

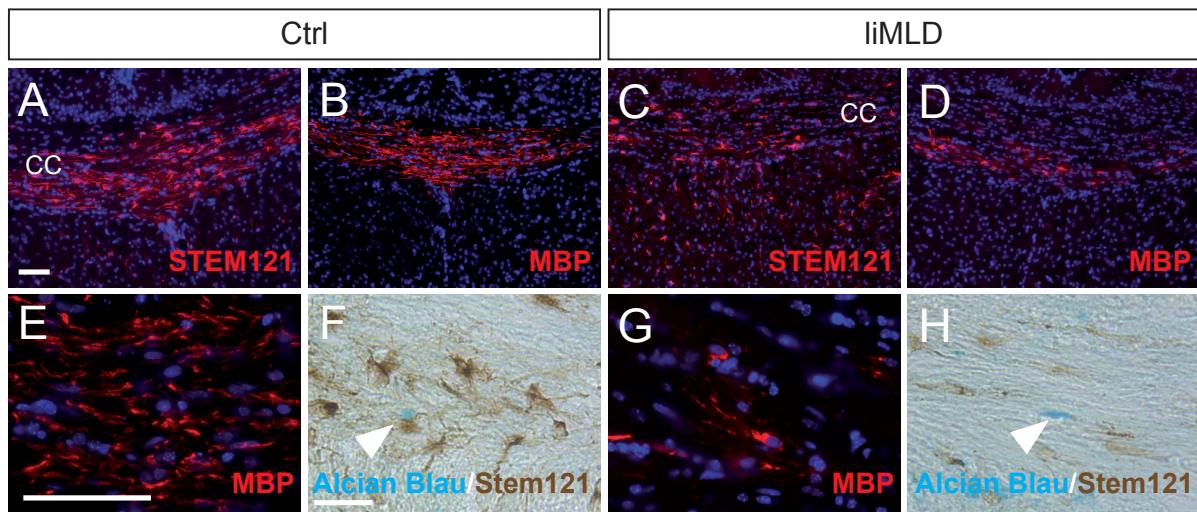
Die transplantierten Zellen wurden mit Hilfe des Antikörpers STEM121, der spezifisch humanes Zytoplasma markiert, identifiziert. 8 Wochen nach der Transplantation konnten die humanen Zellen (Ctrl und liMLD) hauptsächlich im Bereich des *Corpus callosum* und in den darunterliegenden Strukturen des Striatums beobachtet werden (Abb. 31 A, B). Sowohl unter den Kontroll- als auch unter den liMLD-abgeleiteten Zellen konnten neben GFAP- und STEM123-positiven Zellen, einem Marker für humane Astrozyten (Abb. 31 C, D), auch STEM121-positive Zellen, die gleichzeitig

ein positives Signal für OLIG2 zeigten (Abb. 31 E, F), detektiert werden. OLIG2 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Entwicklung der Oligodendrozyten. Darüber hinaus waren auch Nogo-A (*Neurite outgrowth inhibition protein A*)- und OLIG2-positive Oligodendrozyten zu finden (Abb. 31 G, H). Der Nogo-A-Antikörper ist humanspezifisch und wird unter anderem von Oligodendrozyten exprimiert (Chen *et al*, 2000).

Mit diesem Ergebnis konnte demonstriert werden, dass sowohl die Kontroll- als auch die MLD-spezifischen transplantierten RGL-NPCs in dem Tiermodell überlebten und bereits nach 8 Wochen gliale Zelltypen ausbildeten.

### **3.8.3 RGL-NPCs differenzieren in der Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus in reife Oligodendrozyten**

Nachdem das Überleben und Differenzierungsverhalten der transplantierten Zellen *in vivo* studiert wurde, wurde ein weiteres Transplantationsexperiment durchgeführt. Mit Hilfe dieses Experimentes sollte überprüft werden, ob das Tiermodell zur Evaluierung möglicher Charakteristika der MLD, wie Sulfatidakkumulationen und Defekte im Myelinmetabolismus, sowohl in den transplantierten Zellen als auch in dem umliegenden Mausgewebe, herangezogen werden kann. Dazu wurden Kontroll- und MLD-spezifische RGL-NPCs in neugeborene Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Mäuse transplantiert. 8 Wochen nach der Transplantation wurden die Mäuse analysiert. Die humanen Zellen wurden mit STEM121 detektiert (Abb. 32 A, C). Die Zellen siedelten sich hauptsächlich im *Corpus callosum* an. Die Bildung von Myelin wurde durch die immunhistochemische Anfärbung von MBP dargestellt. Durch den Genotyp der Shiverer-Maus in der Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus ist das *Mbp*-Gen nicht intakt (Molineaux *et al*, 1986). Demzufolge wird im Maushirn kein MBP gebildet. Ein detektiertes MBP-Signal kann somit nur von den eingebrachten humanen Zellen stammen (Molineaux *et al*, 1986; Dupouey *et al*, 1979). Sowohl die iMLD-Zellen als auch die Kontrollzellen exprimierten nach der Transplantation MBP im Gehirn der Mäuse (Abb. 32 B, E, D, G). Mögliche Sulfatidablagerungen wurden mit Hilfe einer Alcian Blau-Färbung visualisiert (Abb. 32 F, H). Bei beiden Transplantationsexperimenten konnten Alcian Blau-positive Akkumulationen detektiert werden (Abb. 32 F, H, Pfeile).



**Abb. 32: MBP-Expression und Sulfatidnachweis in transplantierten humanen Zellen und im Gewebe der  $\text{Arsa}^{-/-}/\text{Shi}/\text{Rag2}^{-/-}$ -Maus.**

8 Wochen nach neonataler Transplantation von Kontroll- (Ctrl) und liMLD-spezifischen (liMLD) RGL-NPCs in die  $\text{Arsa}^{-/-}/\text{Shi}/\text{Rag2}^{-/-}$ -Maus wurden die humanen Zellen mit Hilfe von STEM121 identifiziert (A, C). Sowohl die Ctrl- als auch liMLD-Zellen exprimierten MBP (B, E; D, G). Mit Hilfe der Alcian Blau-Färbung konnten im Mausgehirn Sulfatidablagerungen festgestellt werden (F, H). Humane Zellen wurden mit STEM121 angefärbt und Pfeile zeigen Alcian Blau-angefärbte und sulfatidreiche Akkumulationen an. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: A-D: 100  $\mu\text{m}$ ; E-H: 10  $\mu\text{m}$ .

Diese Ergebnisse zeigen, dass die  $\text{Arsa}^{-/-}/\text{Shi}/\text{Rag2}^{-/-}$ -Maus prinzipiell dazu herangezogen werden kann mögliche MLD-spezifische Merkmale nicht nur in den eingebrachten Zellen, sondern auch im umliegenden Mausgewebe zu studieren. Dabei können sowohl die Ausbildung von Myelin als auch die Ablagerungen von Sulfatid analysiert werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 MLD-spezifische oligodendrogliale Kulturen dienen als Grundlage für ein humanes MLD-spezifisches *in vitro*-Modell

In einem *in vitro*-Krankheitsmodell können sowohl die zugrundeliegenden Pathomechanismen studiert als auch mögliche Therapieansätze getestet werden. Für die MLD existieren verschiedene Zellkulturmodelle, die für unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt werden. Fibroblasten von MLD-Patienten wurden z. B. genutzt, um die Mutationen im ARSA-Gen sowie Fehlfunktionen des Proteins zu untersuchen (Polten *et al*, 1991; Berger *et al*, 1997; von Figura *et al*, 1983, 1986). Aus der Arsa<sup>-/-</sup>-Maus wurden primäre Zellen, wie Nierenzellen, Schwann-Zellen oder auch neurale Vorläuferzellen, isoliert (Pituch *et al*, 2015; Saravanan *et al*, 2007, 2004; Klein *et al*, 2005, 2009; Matzner *et al*, 2009a). Diese wurden zur Erforschung der molekularen Mechanismen der MLD herangezogen. Trotzdem sind die bisherigen *in vitro*-Modelle der MLD entweder nicht humanspezifisch und/oder spiegeln aufgrund des gewählten Zelltyps bzw. der Spezies nicht alle Krankheitsmerkmale wider (Klein *et al*, 2005, 2009; Polten *et al*, 1991; Saravanan *et al*, 2007, 2004; von Figura *et al*, 1986, 1983; Berger *et al*, 1997; Pituch *et al*, 2015). In der vorliegenden Arbeit sollte ein humanes und MLD-spezifisches *in vitro*-Modell generiert werden. Dieses sollte nicht nur einen geeigneten Zelltyp beinhalten, sondern auch entsprechende Krankheitsmerkmale aufweisen. Als Zielzellpopulation wurden Oligodendrozyten gewählt. Dieser Zelltyp ist neben den Schwann-Zellen hauptsächlich in der MLD betroffen.

#### 4.1.1 Mit den MLD-RGL-NPCs steht eine Quelle für humane MLD-spezifische Oligodendrozyten zur Verfügung

Die iPSC-Technologie ermöglicht es, patientenspezifische Zellkulturmodelle zu entwickeln. Mit entsprechenden Differenzierungsprotokollen können aus den iPSCs die gewünschten Zelltypen generiert werden und für die Untersuchung von Pathomechanismen herangezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden MLD-spezifische Hautfibroblasten als Ausgangszellpopulation genutzt und mit Hilfe nicht-integrativer Sendaiviren in iPSCs reprogrammiert. Die iPSCs wiesen die für pluripotente Stammzellen charakteristischen Merkmale auf (siehe Tabelle 2). Die weitere Differenzierung der Stammzellen in MLD-abgeleitete Oligodendrozyten erfolgte anhand eines in unserem

Labor etablierten Differenzierungsprotokolls (Gorris *et al*, 2015). Das Protokoll beinhaltet als Zwischenschritt eine stabile Zellpopulation an RGL-NPCs. Diese Zellen haben den Vorteil, dass sie als neurale Stammzellpopulation die Eigenschaft besitzen, sich selbst zu erneuern. Wenn sie einmal zur Verfügung stehen, können sie immer wieder erneut als Quelle für Oligodendrozyten eingesetzt werden. Darüber hinaus besitzen sie ein tripotentes Differenzierungspotential. Das erlaubt neben der Differenzierung der Zellen in Oligodendrozyten auch eine Differenzierung in Astrozyten und Neurone. In dieser Arbeit konnten von jeder Fibroblastenlinie nach erfolgreicher Reprogrammierung RGL-NPCs generiert werden. Die neuralen Vorläuferzellen wiesen eine charakteristische bipolare Morphologie auf und exprimierten typische Marker einer radialgliaähnlichen Stammzellpopulation auf Transkript- und Proteinebene (Abb. 17-19; Gorris *et al*, 2015). Die Differenzierung in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neurone wurde mit Hilfe von zelltypspezifischen Differenzierungsprotokollen erreicht und anhand charakteristischer Marker überprüft bzw. demonstriert (Abb. 20, 21; Gorris *et al*, 2015). Bei den ausdifferenzierten Kulturen, ob oligodendroglial, astroglial oder neuronal, handelte es sich um Mischkulturen. Neben dem gewünschten Zelltyp konnten auch andere neurale Zellen in den Kulturen detektiert werden. Das wurde in immunzytochemischen Analysen qualitativ und quantitativ beobachtet (Abb. 20-22). Beispielsweise waren in den oligodendroglialen Kulturen neben den Oligodendrozyten auch Neurone und Astrozyten zu finden (Abb. 22). Der Vorteil ist, dass die Interaktion zwischen den Zelltypen untersucht und zusätzliche Kokulturen vermieden werden können. Das ist für bestimmte Fragestellungen von Nutzen. In der MLD sind auch Neurone und Astrozyten beeinträchtigt und können Sulfatidakkumulationen aufweisen (Molander-Melin *et al*, 2004; Hess *et al*, 1996; Peng & Suzuki, 1987). Dagegen können einzelne Zellpopulationen, z. B. die Oligodendrozyten, nur bedingt separat studiert werden. Bei immunzytochemischen Untersuchungen stellt das keine Schwierigkeit dar. Aber bei Versuchen, die es erfordern, aus bestimmten Zellen RNA oder Protein zu isolieren, ist es nicht möglich zwischen den einzelnen Zelltypen zu differenzieren. Es wird, wie in der vorliegenden Arbeit, ein Gemisch aus den drei Zelltypen untersucht. Um dem entgegenzuwirken, können die Oligodendrozyten in einer frühen Phase der Differenzierung durch spezifische Oberflächenmarker, wie A2B5, CD140a oder O4, angereichert werden (Cizkova *et al*, 2009; Fischer *et al*, in Bearbeitung; Ogawa *et al*, 2011a; Sim *et al*, 2011; Sommer & Schachner, 1981). Entweder können sie danach weiter kultiviert oder die isolierten Zellen direkt für weitere Analysen herangezogen

werden. Allerdings sind die Verfahren zur Anreicherung von spezialisierten Zellen herausfordernd. In dieser Arbeit enthielten die oligodendroglialen Kulturen ca. 11 % O4-positive Zellen (Abb. 21 B). Bei der Verwendung von O4 als Marker für die Isolation, würde eine hohe Gesamtzellzahl benötigt werden, um final genügend isolierte Zellen verfügbar zu haben. Außerdem muss ein geeignetes Differenzierungsstadium der Zellen gewählt werden, wenn die Zellen nach der Anreicherung weiter kultiviert werden sollen. Sind die Oligodendrozyten zu reif und haben viele Fortsätze ausgebildet, können sie sich unter Umständen nach der Isolierung nicht mehr kultivieren lassen.

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl von den Kontroll- als auch von den MLD-spezifischen Spendern *in vitro* humane Oligodendrozyten generiert werden. Auch wenn die Anzahl der Zellen gering ist, steht ein humanes Zellkulturmodell zur Verfügung. Es enthält MLD-spezifische Oligodendrozyten und kann als zelluläre Grundlage für weitere Krankheitsspezifische Untersuchungen in Bezug auf die MLD herangezogen werden.

Im Vergleich zu Gorris *et al* (ca. 53 % O4-positive Oligodendrozyten) war die Anzahl der Oligodendrozyten in den oligodendroglialen Kulturen dieser Arbeit nicht sehr hoch (ca. 11 % O4-positive Zellen; Abb. 21 B). Diese Differenz kann aufgrund der unterschiedlichen Ausgangszellpopulationen zustande gekommen sein. Bei Gorris *et al* wurden für die Quantifizierung ESC-abgeleitete Kulturen verwendet, in der vorliegenden Arbeit wurden iPSC-basierte Kulturen herangezogen.

#### **4.1.2 Das generierte *in vitro*-Modell weist MLD-spezifische Veränderungen auf**

Um als Zellkulturmodell für eine Krankheit von Nutzen zu sein, sollten neben einem geeigneten Zelltyp auch die Merkmale einer Erkrankung reflektiert werden. In der MLD sind vorwiegend die myelinbildenden Zellen, die Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, betroffen. In diesen Zellen führt die Defizienz von ARSA zu intralysosomalen Ablagerungen von Sulfatid und im weiteren Verlauf zu einer weitreichenden Demyelinisierung im Nervensystem. In der vorliegenden Arbeit wurden die generierten MLD-spezifischen Zellen hinsichtlich eines krankheitsspezifischen Phänotyps untersucht.

PNCS-basierter ARSA-Enzymaktivitätsassay bestätigt ARSA-Defizienz in MLD-spezifischen Zellen

Der Verlust der ARSA-Enzymaktivität konnte sowohl in den Fibroblasten der MLD-Patienten als auch in den daraus abgeleiteten RGL-NPCs und differenzierten Kulturen festgestellt werden (Abb. 23 A2, B2; Abb. 24). Um den Aktivitätsverlust zu messen, wurde ein pNCS-basierter Enzymassay herangezogen (Baum *et al*, 1959; Lee-Vaupel & Conzelmann, 1987). Dieser Assay wird schon lange in der MLD-Forschung eingesetzt, um zum einen die Krankheit nachzuweisen (Porter *et al*, 1969; Berger *et al*, 1997; Waheed *et al*, 1982; Rip & Gordon, 1998; Luzi *et al*, 2013), aber auch um mögliche Therapieansätze zu evaluieren (Matzner *et al*, 2000a, 2000b, 2002; Sevin *et al*, 2006; Biffi *et al*, 2004, 2006; Rommerskirch *et al*, 1991; Matthes *et al*, 2011). Der Assay beruht auf der Umsetzung des künstlichen ARSA-Substrats pNCS bei einer festgelegten Zeit und Temperatur. Die Metabolisierung des Substrats wird anhand des Farbumschlags in einem Spectrophotometer gemessen. Der Vorteil des Assays liegt in der schnellen und einfachen Durchführung. Dagegen ist die Methode weniger sensitiv, und es treten leicht Schwankungen in den Ergebnissen auf (McKhann, 1984). In der vorliegenden Arbeit zeigten z. B. die Zellen der Patientin aMLD kein einheitliches Ergebnis in der ARSA-Aktivität (Abb. 23 A2, B2, grün). Generell kann in adulten MLD-Patienten eine ARSA-Restaktivität von bis 4 % im Vergleich zur normalen Enzymaktivität gemessen werden (Gieselmann & Krägeloh-Mann, 2010). Allerdings wiesen die aMLD-spezifischen Fibroblasten in dieser Arbeit keine ARSA-Aktivität auf. Dagegen konnte in den daraus abgeleiteten RGL-NPC-Linien teilweise eine Restaktivität von ca. 2,5 % im Vergleich zur Enzymaktivität der Kontrollzellen detektiert werden. Diese Unregelmäßigkeiten in den Aktivitätsmessungen innerhalb verschiedener Zelltypen und -linien eines Spenders können durch verschiedene Faktoren ausgelöst worden sein. Das Enzym ARSB, welches ebenfalls das künstliche Substrat pNCS im Aktivitätsassay umzusetzen kann (Lee-Vaupel & Conzelmann, 1987), kann diese Abweichungen in der Aktivitätsmessung verursacht haben. Die Aktivität von ARSB ist in der MLD nicht beeinträchtigt (Porter *et al*, 1969) und das Enzym wird von jeder Patientenlinie exprimiert (Abb. 23 A1, B1). Zusätzlich kann die Messung der Enzymaktivität durch den Zelltyp, die Passage einer Zelllinie oder sogar durch das Alter des Spenders beeinflusst werden (McKhann, 1984). Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit nicht nur Schwankungen in den Werten von verschiedenen Zelllinien eines Patienten, sondern auch in den

Einzelwerten einer einzelnen Zelllinie festgestellt (Abb. 23 A2, B2). Die Ergebnisse der ARSA-Aktivitätssmessungen sind einheitlich mit Hilfe des Medians und den Einzelwerten dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass die Werte teilweise auseinander liegen (siehe Abb. 23 A2: Ctrl-1/-2, B2: Ctrl-3 #S1/12, aMLD #S15). Neben den bereits genannten Faktoren, die die Aktivitätssmessungen beeinflussen können, können auch äußere Umstände auf das Ergebnis Einfluss nehmen. Dazu zählen z. B. die Raumtemperatur, unterschiedliche Chargen des ARSA-Substrats oder der Probenumfang einer Aktivitätssmessung. Trotzdem konnte anhand der gemessenen ARSA-Enzymaktivitäten deutlich zwischen den Kontroll- und MLD-spezifischen Zellen unterschieden werden (Abb. 23 A2, B2). Es war jedoch nicht möglich, mit Hilfe des pNCS-basierten ARSA-Enzymaktivitätsassays die drei MLD-Formen zu unterscheiden (Abb. 23 A2, B2; grüne und blaue Werte). Dafür müssen andere Diagnoseverfahren herangezogen werden. Eine Methode stellt die Bestimmung des intrazellulären Sulfatidmetabolismus mit Hilfe von radio- oder fluoreszenzmarkiertem Sulfatid dar (McKhann, 1984; Porter *et al*, 1972; Monti *et al*, 1992; Kudoh & Wenger, 1982). Bei diesem Verfahren korreliert der intrazelluläre Umsatz des verabreichten Sulfatids mit den drei Formen der MLD: spätauf 0-10 %, juvenil 15-30 % und adult 30-50 % (McKhann, 1984). Demnach kann leicht ein Rückschluss auf die Form der MLD gezogen werden.

Sulfatid kann sowohl in Kontroll- als auch in MLD-abgeleiteten Oligodendrozyten detektiert werden

Durch die Defizienz von ARSA kann Sulfatid in den Zellen nicht abgebaut werden. Es lagert sich intralysosomal ab. Diese Ablagerungen wurden in den MLD-abgeleiteten Oligodendrozyten immunzytochemisch mit dem Antikörper Sulph1, der spezifisch Sulfatid erkennt, visualisiert (Fredman *et al*, 1988). Allerdings konnte sowohl in den Kontroll- als auch in den MLD-abgeleiteten terminal differenzierten Kulturen nach 4 bzw. 6 Wochen ein intrazelluläres Sulph1-Signal in den Oligodendrozyten detektiert werden (Abb. 25 E-J). Dabei wiesen die MLD-spezifischen gegenüber den Kontroll-Oligodendrozyten keine höhere Immunreakтивität für den Antikörper auf. Sulfatid kommt als Hauptbestandteil der Myelinmembran schon während der Differenzierung in unreifen Oligodendrozyten physiologisch vor (Pfeiffer *et al*, 1993). Das erklärt, warum es in beiden Kulturen detektiert werden konnte. Es verdeutlicht aber auch, wie schwierig es ist, pathologische Sulfatidablagerungen in myelinbildenden Zellen zu analysieren. Die Schwierigkeit ist, physiologisches von pathologischen Sulfatid zu

unterscheiden. *In vitro*-Modelle, die keine myelinisierenden Zellen beinhalten, z. B. primäre Nierenzellen, haben dieses Problem nicht (Saravanan *et al*, 2004). Physiologisch enthalten sie kein Sulfatid, aber in der MLD weisen sie Sulfatidakkumulationen auf (Gieselmann *et al*, 1998; Hess *et al*, 1996; Lüllmann-Rauch *et al*, 2001). Um festzustellen, ob es sich bei dem detektierten Sulfatid in den MLD-Oligodendrozyten um pathologische Akkumulationen handelt, wurde eine Kofärbung mit dem Antikörper O4 durchgeführt (Abb. 25 G, H). O4 bindet neben weiteren Epitopen auch an Sulfatid. In der Regel wird er für Antigene eingesetzt, die sich an der Zelloberfläche befinden (Sommer & Schachner, 1981). In einer intrazellulären Färbung von Sulfatid mit O4 konnte ein spezifisches Signal für den Sulfatid-Antikörper identifiziert werden (Abb. 25 G, H). Dieses Signal war allerdings sowohl in MLD-abgeleiteten als auch Kontroll-Oligodendrozyten zu finden. Demzufolge ist das detektierte Sulfatid in den MLD-Zellen vermutlich nicht pathologisch.

### Kontroll- und MLD-abgeleitete RGL-NPCs zeigen eine vergleichbare Differenzierung in Oligodendrozyten

Die pathologischen Ablagerungen von Sulfatid führen in den myelinbildenden Zellen in weiterer Konsequenz zu Defekten im Myelinmetabolismus. Das lässt *in vitro* ein Defizit in der Differenzierung bzw. Reifung dieser Zellen vermuten. In der vorliegenden Arbeit konnte in den MLD-spezifischen Oligodendrozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen allerdings kein Unterschied im Differenzierungsverhalten und in der Morphologie der Zellen festgestellt werden. In beiden terminal differenzierten Kulturen konnten nach 4 Wochen O4-positive bzw. nach 6 Wochen 4860-positive und reich verzweigte Oligodendrozyten detektiert werden (Abb. 21 C-E; Abb. 25 A-D). Kleinere Unterschiede, die im Erscheinungsbild der Oligodendrozyten zu erkennen waren, sind als linienspezifisch zu betrachten. Selbst die Kontroll-Oligodendrozyten zeigten untereinander Abweichungen in der Morphologie auf (Abb. 25 A, K, L). Die Quantifizierung der O4-positiven Zellen lieferte ebenfalls ein vergleichbares Ergebnis zwischen den MLD- und Kontrollzellen (Abb. 21 B). Dagegen demonstrierte eine Studie an murinen Arsa-defizienten neuralen Vorläuferzellen ein anderes Resultat. Nach Einleitung der Differenzierung wurde eine geringere Anzahl an O4-positiven Oligodendrozyten im Vergleich zu den Kontrollkulturen beobachtet (Pituch *et al*, 2015). Es handelte sich hierbei allerdings um murine Zellen, deren Differenzierung erfahrungsgemäß kürzer als bei humanen Zellen dauert. Demzufolge ist die

Ausbildung von Krankheitsmerkmalen schon nach wenigen Tagen möglich. In einem in unserem Labor etablierten Protokoll können innerhalb von 4-8 Tagen aus murinen neuralen Vorläuferzellen reife Oligodendrozyten generiert werden (Glaser *et al*, 2007, 2005). Die Differenzierung der humanen RGL-NPCs in Oligodendrozyten dauert dagegen bis zu 7 Wochen, wobei es sich dann immer noch um ein jüngeres Differenzierungsstadium der humanen Zellen gegenüber dem der murinen handelt.

#### Kritische Bewertung des generierten MLD-spezifischen Zellkulturmodells

In der vorliegenden Arbeit konnten mit den verwendeten Methoden in den MLD-abgeleiteten Oligodendrozyten neben der ARSA-Defizienz keine weiteren Krankheitsmerkmale, wie pathologische Sulfatidablagerungen, morphologische Unterschiede oder Differenzierungsdefekte der Oligodendrozyten, aufgedeckt werden. Ein Grund dafür kann das Reifestadium der Oligodendrozyten in den oligodendroglialen Kulturen sein. Zu den untersuchten Zeitpunkten waren die Zellen nicht lange differenziert (7-9 Wochen) und somit sehr jung. Im Menschen treten die ersten OPCs in der 10. Schwangerschaftswoche auf und die ersten Myelinisierungsanzeichen können nach 28 Wochen detektiert werden (Barateiro & Fernandes, 2014). Die Oligodendrozyten sind möglicherweise nicht reif genug, um über die ARSA-Defizienz hinaus weitere Charakteristika der MLD zu entwickeln. Die Sulfatidakkumulationen sind eines der ersten Krankheitsanzeichen. Damit diese pathologischen Ansammlungen in den Oligodendrozyten entstehen können, muss das Sulfatid zuvor in die Stoffwechselprozesse eingegliedert worden sein und anschließend abgebaut werden. Voraussetzung hierfür ist, dass Sulfatid zuvor in der Myelinmembran integriert worden ist, deren Aufbau zuerst erfolgt sein muss. Zusätzlich ist die Metabolisierungsrate von Sulfatid im Myelin allgemein sehr langsam (Davison & Gregson, 1966; Jungalwala, 1974). Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass pathologische Sulfatidablagerungen in dem hier vorgestellten *in vitro*-System erst detektiert werden können, wenn Myelin ausgebildet worden ist und eine Metabolisierung von Sulfatid stattgefunden hat. In den oligodendroglialen Kulturen konnten zu den untersuchten Zeitpunkten keine Anzeichen von reifem Myelin detektiert werden, wie z. B. die Expression von MBP (Daten nicht gezeigt). Demnach ist das in den iPSC-abgeleiteten Oligodendrozyten detektierte Sulfatid physiologisch und eher an Aufbauprozesse der Myelinmembranen in den Zellen beteiligt (Pfeiffer *et al*, 1993), als ein pathologisches Anzeichen der MLD.

Um einen höheren Reifegrad der Oligodendrozyten zu erzielen, können die Zellen länger als 9 Wochen differenziert werden. Das ist allerdings schwierig, da die differenzierten Kulturen auf dem verwendeten Zellkultursubstrat meist nicht länger als 9-11 Wochen kultivierbar waren. Der Zellrasen löste sich meist nach mehr als 9 Wochen oligodendroglialer Differenzierung ab. Um diese Problematik zu umgehen, können die Zellen in Suspension als oligodendrogliale Sphären differenziert werden. Es ist grundsätzlich möglich, die RGL-NPCs als Sphären zu kultivieren (Gorris *et al*, 2015). Eine andere Möglichkeit ist, die Zellen in einem 3D-Kultursystem aus einer basalmembranartigen Matrix zu kultivieren (Choi *et al*, 2014). Dort können sie länger ausreifen und sich nicht verfrüht von der Zellkulturschale ablösen. Des Weiteren können die Zellen auch in ein entsprechendes Tiermodell transplantiert und dort *in vivo* in einem MLD-spezifischen Milieu länger differenziert werden (siehe Punkt 4.3).

Die linienspezifischen Unterschiede des vorgestellten Zellkultursystems stellen einen weiteren Nachteil dar. Von der Ausgangszellpopulation der Hautfibroblasten bis hin zu den Oligodendrozyten ist es eine lange Differenzierungsphase (bis zu 7 Monaten). In dieser Zeit werden die Zellen durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Dazu zählen z. B. die Handhabung der Zellen, verschiedene Chargen der Zellkulturkomponenten oder unterschiedliche Temperaturen im Labor. Diese Faktoren können dazu führen, dass sich einzelne Zelllinien anderes verhalten und Unterschiede in den Ergebnissen zeigen, obwohl die Zellen von Kontrollspendern oder von dem selben Patienten abstammen. So unterscheiden sich z. B. die RGL-NPCs unterschiedlich stark in ihrem Expressionsmuster (Abb. 18). Dabei ist auch zu beachten, dass diese Daten mit Hilfe einer semiquantitativen PCR generiert wurden, die lediglich eine qualitative Aussage darüber liefert, ob ein Gen transkribiert wird. Zusätzlich konnten auch in den oligodendroglialen Kulturen linienabhängige Unterschiede festgestellt werden. Dabei unterschieden sich sogar die Oligodendrozyten der verschiedenen Kontrollkulturen in ihrer Morphologie (Abb. 25 A, K, L). Das erschwert, insbesondere bei der Generierung eines krankheitsspezifischen Zellkulturmodells, minimale Unterschiede zwischen den Kontroll- und MLD-abgeleiteten Zellen aufzudecken. Um dem entgegenzuwirken, können isogene Zelllinien generiert werden (siehe Punkt 1.3.1; An *et al*, 2012; Corti *et al*, 2012; Reinhardt *et al*, 2013b; Ryan *et al*, 2013; Sanders *et al*, 2014; Soldner *et al*, 2011). Diese Zellen sind bis auf den Gendefekt genetisch identisch. Abweichungen, die aufgrund von äußeren Einflüssen entstehen, können so minimiert werden. Der Gendefekt sollte in die RGL-NPCs eingefügt bzw.

entfernt werden. Dieser Zelltyp ist leichter zu kultivieren als die iPSCs und muss keine lange Differenzierungsphasen (von Fibroblasten über iPSCs hin zu RGL-NPCs) mehr durchlaufen.

Neben dem jungen Reifegrad der Oligodendrozyten und den linienspezifischen Unterschieden erschwert zusätzlich der genetische Hintergrund jedes einzelnen Patienten die Bedingungen, ein *in vitro*-Modell zu generieren. Die MLD ist trotz der Monogenie genetisch sehr heterogen. Viele MLD-Patienten besitzen mehrere Mutationen im ARSA-Gen. Diese beeinflussen unterschiedlich stark und möglicherweise abhängig vom Zusammenspiel der auftretenden Mutationen die Entstehung der Krankheit. Auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Patienten unterschieden sich in ihrem Genotyp und in der Ausprägung der MLD (Tabelle 1; Abb. 10). Der Patient liMLD-4 zeigte zusätzlich ein widersprüchliches Bild. Laut *Coriell Institute for Medical Research* leidet er an der spätinfantilen Form der MLD (Coriell GM00197, 2016). Genetisch betrachtet und entsprechend der Literatur müsste er dagegen die adulte Form entwickeln. Er trägt neben der bereits bekannten und mit der adulten MLD-assoziierten Mutation p.P426L (Polten *et al*, 1991) zusätzlich drei ebenfalls bekannte Polymorphismen (Abb. 10; ARSA-Datenbank, 2016; Coulter-Mackie & Gagnier, 1997; Gort *et al*, 1999). Diese würden alleine nicht zum Ausbruch der MLD führen. Möglicherweise ist gerade die Kombination dieser vier Mutationen Auslöser für die spätinfantile Form der MLD in diesem Patienten. Darüber hinaus können auch noch bisher unbekannte genetische oder epigenetische Faktoren einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf der MLD gehabt haben (Gieselmann, 2008). Bei Geschwistern, die die selben MLD-verursachenden Mutationen im ARSA-Gen trugen, konnte ein unterschiedlicher Verlauf der MLD beobachtet werden (Arbour *et al*, 2000). Das spricht dafür, dass neben dem Defekt im ARSA-Gen weitere Einflüsse auf die Entstehung der MLD wirken. Da diese Einflüsse nicht bekannt sind, können sie bei der Generierung eines MLD-spezifischen Zellkulturmodells nicht berücksichtigt werden. Das kann unter Umständen die Aufdeckung von MLD-spezifischen Merkmalen im Zellkultursystem erschweren.

In der vorliegenden Arbeit konnten in den bislang untersuchten frühen Stadien des generierten Zellkulturmodells neben der ARSA-Defizienz keine weiteren Krankheitsmerkmale der MLD festgestellt werden. Trotzdem stellt dieses *in vitro*-Modell eine gute zelluläre Grundlage dar. Das Differenzierungsprotokoll von Gorris *et al* bietet mit den RGL-NPCs eine stabile Population an Vorläuferzellen. Diese Zellen können

wiederholt genutzt werden, um Oligodendrozyten zu generieren. Um jedoch die Oligodendrozyten als Modell für die MLD verwenden zu können, bedarf es weiterer Optimierungsmaßnahmen. Die Oligodendrozyten müssen einen höheren Reifegrad erreichen und die linienspezifischen Unterschiede sollten minimiert werden. Letzteres kann durch die Generierung isogener Linien erreicht werden. Voraussichtlich würden sich dann auch in den MLD-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen minimale krankheitsspezifische Unterschiede in den Kulturen detektieren lassen. Außerdem können mit Hilfe der isogenen Zelllinien möglicherweise bisher unbekannte genetische Faktoren, die außerhalb des ARSA-Gens liegen und den Ausbruch oder den Verlauf der MLD beeinflussen, aufgedeckt werden.

#### **4.2 MLD-spezifische RGL-NPCs nehmen exogene ARSA auf und eignen sich als humanes neurales Zellkulturmodell, um entsprechende Therapieansätze zu evaluieren**

Ein wesentlicher Bestandteil vieler MLD-spezifischer Therapieansätze ist, das defekte ARSA-Enzym zu ersetzen, wie z. B. bei der Enzymersatz- oder der *in vivo* Gentherapie (ERT: Matthes *et al*, 2012; Matzner *et al*, 2005, 2009b; *in vivo* Gentherapie: Colle *et al*, 2009; Consiglio *et al*, 2001; Kurai *et al*, 2007; Miyake *et al*, 2014; Piguet *et al*, 2012; Rosenberg *et al*, 2014; Zerah *et al*, 2015). Die Therapien basieren auf dem Mechanismus, dass extrazelluläre ARSA über Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR), die sich an der Zelloberfläche befinden, aufgenommen werden kann. Wenn ARSA einmal in der Zelle ist, wird es zum Lysosom transportiert. Dort kann dann durch die Bereitstellung des funktionellen Enzyms der metabolische Defekt in den ARSA-defizienten Zellen korrigiert werden (Platt & Lachmann, 2009; Matzner & Gieselmann, 2005). Schon im Jahr 1971 zeigten Porter und Kollegen, dass extrazelluläre ARSA im Medium von MLD-abgeleiteten Fibroblasten aufgenommen und die Enzymaktivität wiederhergestellt werden kann (Porter *et al*, 1971). Auch die bisherigen Therapieansätze zur Enzymersatztherapie (ERT) in der *Arsa*<sup>-/-</sup>-Maus klingen sehr vielversprechend (Matthes *et al*, 2012; Matzner *et al*, 2005, 2009b). Durch eine wiederholte Verabreichung von rekombinanter ARSA konnte in der *Arsa*<sup>-/-</sup>-Maus eine Verbesserung der Krankheitsmerkmale erzielt werden. Ebenso wurde bereits 2001 mit Hilfe von lentiviralen Vektoren eine Überexpression von ARSA im Gehirn von *Arsa*<sup>-/-</sup>-Mäuse erreicht und eine erfolgreiche *in vivo* Gentherapie zur Behandlung der MLD demonstriert (Consiglio *et al*, 2001). Die anhaltende Expression von ARSA führte in den Mäusen zu einer Reduktion der Sulfatid-

ablagerungen. Trotzdem werden weiterhin *in vitro*-Modelle zur Optimierung dieser Therapiestrategien herangezogen. Zum Beispiel nutzten Bockenhoff *et al* murine Arsa-defiziente Fibroblasten, um die Aufnahme verschiedener künstlich modifizierter ARSA-Proteine zu evaluieren (Bockenhoff *et al*, 2014). Matzner und Kollegen testeten in Zellen der Arsa<sup>-/-</sup>-Maus die retrovirale Überexpression humaner ARSA und zeigten eine Korrektur des metabolischen Defekts in diesen Zellen (Matzner *et al*, 2000a). Sie stellten mit dem retroviralen Vektor ein potentielles Instrument für die Entwicklung von Gentherapien zur Behandlung der MLD in Arsa-defizienten Mäusen vor (Matzner *et al*, 2000b, 2001, 2002).

Das in der vorliegenden Arbeit generierte liMLD-spezifische Zellkulturmodell kann ebenfalls für Experimente zur Evaluierung entsprechender Therapien genutzt werden. In den liMLD-RGL-NPCs konnte die ARSA-Enzymaktivität sowohl durch eine Überexpression von ARSA mit Hilfe lentiviraler Vektoren (Daten nicht gezeigt) als auch durch die Zugabe von humaner rekombinanter ARSA (rhARSA) funktionell wiederhergestellt werden (Abb. 26, 27). Die Aufnahme von rhARSA konnte durch die Zugabe von Mannose-6-Phosphat (M6P) blockiert werden (Abb. 26). Das beweist eine MPR-abhängige Aufnahme von ARSA und, dass das vorgestellte Zellkultursystem durch äußere Faktoren modelliert werden kann. Die Verabreichung von M6P ist eine gängige Methode, um die ARSA-Aufnahme über diese Rezeptoren zu evaluieren. Weitere Studien zeigten ebenfalls eine Blockierung der ARSA-Aufnahme durch M6P in verschiedenen Zellkultursystemen (Klein *et al*, 2009; Matzner & Gieselmann, 2005; Matthes *et al*, 2011; Bockenhoff *et al*, 2014; Matzner *et al*, 2008). In den ARSA-Enzymaktivitätsmessungen der Hautfibroblasten und RGL-NPCs konnten in den Einzelwerten einzelner Zelllinien Schwankungen festgestellt werden (Abb. 23 A2, B2). Derartige Abweichungen wurden auch bei den Aufnahmeexperimenten mit rhARSA detektiert (Tabelle 4; Abb. 26 B, grüne und blaue Werte). Das erschwert eine statistische Auswertung. Trotzdem lieferte jedes der Experimente, unabhängig voneinander betrachtet, das gleiche Ergebnis. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Enzymaktivität im Vergleich zu den unbehandelten liMLD-RGL-NPCs (Medium) durch die Verabreichung von rhARSA (0,5 bzw. 2,5 µg/ml) zunimmt und die Aufnahme durch M6P reduziert werden konnte (Tabelle 4; Abb. 26 B).

Zusammenfassend zeigen die Aufnahmeexperimente, dass die liMLD-RGL-NPCs rhARSA abhängig von MPRs aufnehmen können und diese Aufnahme modelliert werden kann. Somit können die Zellen für die Evaluation verschiedener Therapieansätze eingesetzt werden. Zum Beispiel können Wirkstoffe getestet werden, die den

Prozess der Aufnahme von ARSA positiv beeinflussen. Bockenhoff *et al* überprüften verschiedene Peptid-Vektoren in Arsa-defizienten Mauszellen, um eine verbesserte Aufnahme der ARSA zu erzielen (Bockenhoff *et al*, 2014). Auch Moleküle, die einen verfrühten Abbau des Enzyms verhindern sollen, können in den MLD-RGL-NPCs untersucht werden. Es wurde bereits in Fibroblasten von aMLD-Patienten gezeigt, dass der Abbau von ARSA durch die Verabreichung von Proteinaseinhibitoren verhindert werden kann (von Bülow *et al*, 2002; von Figura *et al*, 1983, 1986). Darüber hinaus kann das generierte *in vitro*-Modell auch verwendet werden, um potentielle patientenspezifische Therapien zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass es patientenspezifische Unterschiede in der ARSA-Aufnahme geben kann (Abb. 28). Die RGL-NPCs abgeleitet von Patient liMLD-2 nahmen im Vergleich zu den anderen MLD-spezifischen Linien mehr rhARSA auf.

**Tabelle 4: Einzelwerte der ARSA-Enzymaktivitäten von liMLD-RGL-NPCs nach rhARSA-Behandlung**

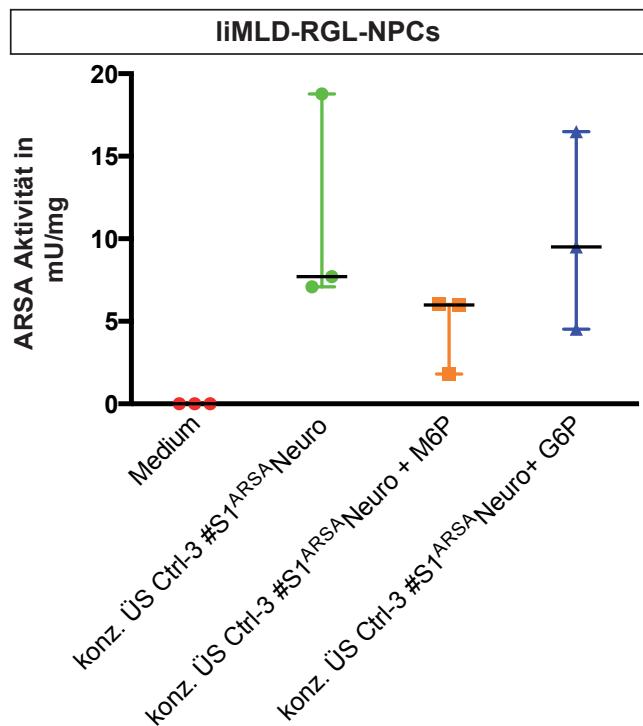
liMLD-2 #S4	Experiment	---	+ M6P	+ G6P
Medium	1	0		
	2	1,46	/	/
	3	0		
+ 0,5 µg/ml rhARSA	1	182,87	13,22	205,41
	2	321,09	0	258,83
	3	72	0	39,59
+ 2,5 µg/ml rhARSA	1	525,24	59,94	364,01
	2	348,68	48,08	478,71

Es sind die Einzelwerte der intrazellulären ARSA-Aktivitäten (in mU/mg) von unbehandelten (Medium) und rhARSA-behandelten (0,5 bzw. 2,5 µg/ml) liMLD-spezifischen Zellen (liMLD-2 #S4) ohne (---) und mit Zugabe von M6P bzw. G6P dargestellt.

Der Vorgang der Kreuzkorrektur durch benachbarte Zellen stellt eine weitere Therapiemöglichkeit dar, die in einem entsprechenden Zellkulturmodell evaluiert werden kann. Es ist bekannt, dass Zellen während der Generierung von lysosomalen Proteinen einen Teil davon in den Extrazellulärraum abgeben (Chao *et al*, 1990). Bei ARSA sind das bis zu 10 % der neu synthetisierten Proteine (Waheed *et al*, 1982; von Figura *et al*, 1983). Das ausgeschleuste Protein kann dann von den defizienten Zellen aufgenommen werden. Auf diesem Prinzip basieren z. B. die hämatopoetische Stammzelltherapie (HSCT; Biffi *et al*, 2004, 2006, 2013) oder Zelltherapien (Doerr *et al*, 2015; Givogri *et al*, 2008, 2006; Kawabata *et al*, 2006; Klein *et al*, 2006). Die transplantierten Zellen wandern in das Gehirn ein (HSCT) oder werden direkt am Wirkungsort platziert (Zelltherapie). Dort geben sie kontinuierlich funktionelle ARSA

in das ARSA-defiziente Gewebe ab. *In vitro* wurde der Vorgang der Kreuzkorrektur durch benachbarte Zellen erstmals von Sangalli und Kollegen demonstriert. Sie kultivierten murine ARSA-überexprimierende Fibroblasten zusammen mit Oligodendrozytenvorläufern und Schwann-Zellen von Kontrollratten. Es konnte eine erfolgreiche Aufnahme der sekretierten ARSA demonstriert werden (Sangalli *et al*, 1998).

In ersten Experimenten wurde dieser Vorgang auch an den liMLD-spezifischen RGL-NPCs überprüft (Abb. 33). Die Kultivierung von ARSA-defizienten Zellen mit konditioniertem Medium bzw. Überstand (ÜS) von Kontroll-RGL-NPCs (für 6 Tage) war jedoch nicht ausreichend, um die ARSA-Enzymaktivität in den MLD-Zellen wiederherzustellen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wurde von den Kontroll-RGL-NPCs nicht genügend ARSA in das Medium abgegeben. Deshalb wurde nicht nur ARSA in den Zellen überexprimiert, sondern auch neuronal differenzierte Kulturen (3-5 Wochen) herangezogen. Diese wiesen eine höhere ARSA-Aktivität als die RGL-NPCs auf und konnten im Gegensatz zu den astroglialen oder oligodendroglialen Kulturen unter serumfreien Bedingungen bzw. in kürzerer Zeit kultiviert werden. Das konditionierte Medium der ARSA-überexprimierenden und neuronal differenzierten Kulturen wurde aufkonzentriert. Anschließend wurden die liMLD-RGL-NPC mit dem konzentrierten Überstand (konz. ÜS) kultiviert. Bereits nach 24 Stunden konnte eine Wiederherstellung der ARSA-Enzymaktivität in den liMLD-spezifischen RGL-NPCs erzielt werden (Abb. 33, grün). Die Aufnahme von ARSA aus dem Überstand konnte nur teilweise durch M6P geblockt werden (Abb. 33, orange). Das lässt vermuten, dass in diesem Experiment ein Teil der Enzyme unabhängig von den MPRs über andere Rezeptoren aufgenommen wurde.



**Abb. 33: Wiederherstellung der ARSA-Enzymaktivität in iIMLD-spezifischen Zellen durch die Kultivierung mit konzentriertem Überstand von neuronal differenzierten und ARSA-überexprimierenden Kulturen.**

Dargestellt wird die intrazelluläre ARSA-Enzymaktivität von unbehandelten iIMLD-spezifischen RGL-NPCs (Medium, rot) und von iIMLD-RGL-NPCs, die 24 Stunden mit konzentrierten Überstand (konz. ÜS) von neuronal differenzierten Kontroll-Kulturen (Ctrl-3 #S1<sup>ARSA</sup> Neuro; 3-5 Wochen; grün) behandelt wurden. Die wiederhergestellte Enzymaktivität konnte durch die Zugabe von M6P (orange), aber nicht von G6P (blau), reduziert werden. Die ARSA-Enzymaktivität ist angeben in mU/mg. Es sind Einzelwerte und Mediane dargestellt.

Zusammenfassend zeigen diese vorläufigen Ergebnisse, dass der Vorgang der Kreuzkorrektur *in vitro* in den iIMLD-spezifischen Zellen studiert werden kann. Die ARSA-defizienten Zellen nehmen das von den Kontrollzellen sezernierte ARSA auf. Somit können sie für Experimente zur Evaluation von zellbasierten Therapien herangezogen werden. In zukünftigen Versuchen sollte zusätzlich der Überstand von oligodendroglialen Kulturen getestet werden, da die Oligodendrozyten vermutlich die Zellen sind, die bei einer Zelltherapie neben dem Ersatz von Gewebe bzw. der Myelinmembran auch funktionelle ARSA bereitstellen sollen. Aufgrund der niedrigen Fallzahl in den vorgestellten Kreuzkorrektur-Experimenten, sowohl mit rekombinanter (Abb. 26) als auch mit von Kontrollzellen sezernierter ARSA (Abb. 33), sind weitere Experimente notwendig, um die Ergebnisse zu untermauern.

#### **4.3 Die Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus eignet sich als *in vivo*-Modell zur Überprüfung der Funktionalität MLD-spezifischer Oligodendrozyten sowie für die Evaluation zellbasierter Therapien**

Um *in vitro* generierte Zellen *in vivo* zu studieren, aber auch um mögliche Therapieansätze zur Behandlung der MLD zu evaluieren, sollte ein geeignetes Tiermodell verwendet werden. Ein entsprechendes Modell für die MLD stellt die Arsa<sup>-/-</sup>-Maus dar (Hess *et al*, 1996). Sie wurde künstlich durch die Inaktivierung des Arsa-Gens generiert. Dadurch kann die Maus kein Arsa-Protein bilden, und Sulfatid wird nicht mehr metabolisiert. Das überschüssige Sulfatid lagert sich pathologisch in verschiedenen Geweben ab, z. B. in Zellen der Niere, der Gallenblase oder des Gehirns. Diese Ablagerungen nehmen mit dem Alter der Maus zu. Im Gegensatz zum Menschen entsteht keine weitreichende Demyelinisierung im Nervensystem. Lediglich der Durchmesser der myelinisierten Axone ist verringert (Hess *et al*, 1996). Trotzdem wird die Arsa<sup>-/-</sup>-Maus vielfach in der MLD-Forschung eingesetzt. Zahlreiche Therapieansätze, wie die HSCT oder ERT, wurden bereits in diesem Tiermodell getestet. So zeigten Biffi *et al* durch die Transplantation von ARSA-überexprimierenden hämatopoetischen Stammzellen eine deutliche Verminderung der Sulfatidakkumulationen im ZNS und PNS der Arsa-defizienten Mäuse (Biffi *et al*, 2006, 2004). Eine aufgrund dieser Resultate eingeleitete klinische Studie demonstrierte bereits erste Erfolge in 11 MLD-Patienten (Biffi *et al*, 2013; Clinical Trial NCT01560182, 2016). Zelltherapien, die neben einem funktionellen Ersatz des ARSA-Enzyms auch das Gewebe ersetzen sollen, können dagegen weniger gut in der Arsa<sup>-/-</sup>-Maus studiert werden. Die Arsa-defiziente Maus zeigt keine Demyelinisierung im Gehirn. Somit kann in diesem Tiermodell die Neubildung von Myelin durch die eingebrachten Zellen nur erschwert analysiert werden. Am besten kann eine Remyelinisierung in einem myelindefizienten Tiermodell studiert werden. Dafür existieren bereits entsprechende *in vivo*-Modelle. Die Shiverer(Shi)-Maus wird bevorzugt für diese Fragestellungen eingesetzt. Durch die Deletion im *Mbp*-Gen kann in dieser Maus kein kompaktes Myelin gebildet werden (Molineaux *et al*, 1986; Dupouey *et al*, 1979). Somit wird eine optimale Grundlage geschaffen, um eine Remyelinisierung durch transplantierte Zellen zu untersuchen. Gorris *et al* nutzten die Shi-Maus, um die Funktionalität der RGL-NPC-abgeleiteten oligodendroglialen Zellen zu demonstrieren (Gorris *et al*, 2015). Eine weitere Arbeitsgruppe transplantierte hiPSC-abgeleitete Oligodendrozytenvorläuferzellen in dieses Tiermodell. Sie konnten

eine Myelinausbildung im gesamten Gehirn zeigen, die zu einer höheren Lebenserwartung der Tiere führte (Wang *et al*, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden beschriebenen Tiermodelle miteinander kombiniert. Durch die Arsa<sup>-/-</sup>-Maus wird ein Arsa-defizientes Milieu bereitgestellt und eine Kreuzkorrektur von Arsa durch das Mausgewebe vermieden. Aufgrund des Shi-Hintergrunds wird kein kompaktes Myelin im Gehirn gebildet. Zusätzlich wurde ein Rag2<sup>-/-</sup>-Hintergrund in das Mausmodell eingekreuzt, wodurch eine Immunreaktion auf die transplantierten Zellen unterdrückt werden sollte.

In der neu gezüchteten Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus konnte im Gegensatz zu der Rag2<sup>-/-</sup>- und Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus keine Expression von MBP im gesamten Gehirn detektiert werden (Abb. 29). Demzufolge wurde in diesem Tiermodell kein kompaktes Myelin gebildet. Die Sulph1- und Alcian Blau-positiven Sulfatidakkumulationen wurden vorwiegend in den Arsa-defizienten Mausmodellen detektiert (Abb. 30). Dabei schienen die Ablagerungen in den beispielhaft gezeigten Präparaten der Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus im Vergleich zu den Präparaten der Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus ausgeprägter zu sein. Das steht möglicherweise im Zusammenhang mit der zusätzlichen Deletion im *Mbp*-Gen in der Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus. Durch das fehlende MBP kann keine kompakte Myelinmembran gebildet werden (Molineaux *et al*, 1986; Dupouey *et al*, 1979). Das Sulfatid, welches in die Membran eingebaut werden soll, ist demnach überschüssig und muss abgebaut werden. Aufgrund der fehlenden Funktionalität von Arsa ist das nicht möglich und Sulfatid häuft sich verfrüht pathologisch an.

Erste Transplantationsexperimente in die Arsa<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>- bzw. Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus demonstrierten, dass die eingebrachten Kontroll- und MLD-abgeleitete RGL-NPCs *in vivo* überlebten, sich in das Mausgewebe integrierten und die Zellen oligodendroglial differenzierten (Abb. 31, 32). Sie exprimierten spezifische Marker für Oligodendrozyten, wie OLIG2, Nogo-A oder MBP. OLIG2 stellt einen wichtigen Transkriptionsfaktor der Oligodendrozytenentwicklung dar (Lu *et al*, 2000; Zhou *et al*, 2000). Das Transmembranprotein Nogo-A wird von Oligodendrozyten exprimiert und inhibiert das Axonwachstum (Chen *et al*, 2000). MBP ist als Myelinprotein ein wichtiger Bestandteil der Myelinmembran und ein Anzeichen für die Bildung der Isolierschicht (Campagnoni, 1988; Aggarwal *et al*, 2011).

Zusammenfassend stellt die neu generierte Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus ein geeignetes Instrument dar, um *in vivo* den Phänotyp von *in vitro* generierten humanen MLD-spezifischen oligodendroglialen Zellen zu untersuchen. Das Tiermodell erlaubt eine

Differenzierung und Reifung von Oligodendrozyten in einem Arsa-defizienten Umfeld. So können mögliche Defekte in der Myelinisierung im Zusammenhang mit den pathologischen Sulfatidakkumulationen analysiert werden. Die Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus kann außerdem für die Evaluation von zellbasierten Therapien herangezogen werden. Doerr *et al* beschrieben bereits die Transplantation von ARSA-überexprimierenden humanen MLD-spezifischen neuralen und astroglialen Vorläuferzellen in die Arsa-defiziente Maus. Dadurch konnte eine Reduktion der Sulfatidakkumulationen erzielt werden (Doerr *et al*, 2015). In der Arsa<sup>-/-</sup>/Shi/Rag2<sup>-/-</sup>-Maus kann neben dem funktionellen Ersatz (ARSA-Substitution) auch ein Gewebeersatz durch die eingebrachten Zellen (Remyelinisierung) studiert werden.

Für zukünftige Transplantationsexperimente sollten noch weitere Untersuchungsmethoden herangezogen werden. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen können sowohl die Myelinstrukturen als auch die Sulfatidakkumulationen detaillierter analysiert werden. Sulfatidspeichernde Lysosomen beinhalten charakteristische lamellenartige Strukturen (Wittke *et al*, 2004; Klein *et al*, 2005; Ramakrishnan *et al*, 2007). Kompaktes Myelin ist durch die Dicke der Myelinscheiden gekennzeichnet. Human- und zelltypspezifische Marker können zusätzliche Informationen darüber liefern, in welchen Zelltypen sich die Sulfatidablagerungen genau befinden. Reifes und funktionelles Myelin kann durch weitere Myelinmarker sichtbar gemacht werden. Zum Beispiel liefert das *contactin-associated protein* (Caspr) Hinweise für kompaktes Myelin. Auf unmyelinisierten Axonen wird Caspr eher diffus exprimiert. Kurz nach Beginn der Myelinisierung lokalisiert sich das Protein in den Ranvier-Schnürringen (Einheber *et al*, 1997).

#### 4.4 Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich iPSC-abgeleitete und MLD-spezifische RGL-NPCs und Oligodendrozyten generiert. Das Ziel war, diese Zellen zu nutzen, um die lysosomale Speichererkrankung MLD *in vitro* studieren zu können. Auch wenn in den MLD-abgeleiteten Oligodendrozyten aktuell neben der ARSA-Enzymdefizienz keine weiteren krankheitsspezifischen Merkmale nachgewiesen werden konnten, stellen diese Zellen eine gute zelluläre Basis für nachfolgende Forschungsansätze dar. Mit den RGL-NPCs ist eine Quelle von neuralen Stammzellen verfügbar, aus denen immer wieder neue MLD-spezifische Oligodendrozyten generiert werden können. Im Hinblick auf die Oligodendrozyten muss dieses Zellkultursystem verbessert werden. Wenn die Zellen einen höheren

Reifegrad erlangen, können möglicherweise Sulfatidablagerungen oder Defekte in der Reifung sowie im Myelinmetabolismus detektiert werden. Zusätzlich kann die Generierung von isogenen Zelllinien die linienabhängigen Unterschiede minimieren und eine Identifizierung krankheitsspezifischer Merkmale *in vitro* erleichtern.

Darüber hinaus wurde demonstriert, dass die MLD-spezifischen RGL-NPCs als humanes neurales Zellkultursystem verwendet werden können, um die Mechanismen der ARSA-Aufnahme sowie die intrazelluläre ARSA-Aktivität zu studieren. Es können Therapieansätze, die den Abbau des Enzyms verhindern oder das Enzym ersetzen sollen, eingehend in den humanen MLD-spezifischen Zellen evaluiert werden.

Mit der *Arsa*<sup>-/-</sup>/*Shi*/*Rag2*<sup>-/-</sup>-Maus wurde ein Tiermodell vorgestellt, welches sich dazu eignet, *in vitro* generierte oligodendrogliale MLD-spezifische Zellen *in vivo* zu studieren. Erste Transplantationsexperimente zeigten, dass die Zellen überleben und in gliale Zellen differenzieren. Mit den zur Verfügung stehenden Methoden konnte bereits demonstriert werden, dass auch Sulfatid mit Hilfe spezifischer Färbungen und die Myelinausbildung anhand der MBP-Expression in dem Modell dargestellt werden können. Die *Arsa*<sup>-/-</sup>/*Shi*/*Rag2*<sup>-/-</sup>-Maus kann zusammen mit den RGL-NPCs genutzt werden, um zellbasierte Therapien zu evaluieren. Im Tiermodell kann nach Transplantation der Kontrollzellen sowohl der Abbau von Sulfatid als auch der Prozess der Remyelinisierung studiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Metachromatische Leukodystrophie (MLD) wird verursacht durch eine funktionelle Defizienz des metabolischen Enzyms Arylsulfatase A (ARSA). Unter physiologischen Bedingungen baut ARSA das Membranlipid 3'-O-Sulfo-Galaktosylceramid (Sulfatid) im Lysosom ab. In MLD-Patienten wird Sulfatid nicht degradiert und akkumuliert überwiegend in den myelinbildenden Zellen des Nervensystems, den Oligodendrozyten und Schwann-Zellen. Das führt zu einer Demyelinisierung und zu schwerwiegenden neurologischen Symptomen. Bislang sind die zugrunde liegenden Pathomechanismen unzureichend geklärt. Ein *in vitro*-Modell, welches den Phänotyp der Krankheit widerspiegelt, kann neue Erkenntnisse über die Krankheitsmechanismen liefern. Das neu entwickelte Verfahren, induziert pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) herzustellen, bietet die Möglichkeit, aus somatischen Zellen patientenspezifische Kultursysteme zu generieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Hautfibroblasten von vier MLD-Patienten mit distinkten Mutationen im ARSA-Gen erfolgreich mit Hilfe von nicht-integrierenden Sendaiviren in iPSCs reprogrammiert. Anschließend wurden die vollständig validierten MLD-spezifischen iPSCs in radialgliaähnliche neurale Vorläuferzellen (*radial glia-like neural precursor cells*, RGL-NPC) differenziert. Diese sind multipotent und konnten nach Entzug der Wachstumsfaktoren in Astrozyten, Neurone und Oligodendrozyten differenziert werden. Eine ARSA-Enzymaktivitätsmessung bestätigte die funktionelle Defizienz des Enzyms in den MLD-RGL-NPCs sowie deren ausdifferenzierten neuralen Subtypen. In den untersuchten Differenzierungsstadien der MLD-abgeleiteten Oligodendrozyten konnten im Vergleich zu Kontrollzellen sowohl bei der Ablagerung von Sulfatid als auch in der Morphologie und im Differenzierungsverhalten der Zellen kein Unterschied festgestellt werden.

Zusätzlich wurde in den ARSA-defizienten RGL-NPCs die Aufnahme von exogener ARSA studiert. Die Verabreichung von ARSA führte in den MLD-spezifischen Zellen zu einer Wiederherstellung der intrazellulären ARSA-Enzymaktivität. Die MLD-RGL-NPCs eignen sich somit als humanes neurales *in vitro*-Kultursystem, um die Mechanismen der ARSA-Aufnahme und die intrazelluläre ARSA-Aktivität zu studieren, sowie mögliche Wirkstoffe, die diese Prozesse beeinflussen können, zu evaluieren.

Um die Funktionalität sowie mögliche Sulfatidakkumulationen und Myelinisierungsdefekte in den MLD-abgeleiteten Oligodendrozyten *in vivo* zu untersuchen, wurden die Zellen in ein krankheitsspezifisches Milieu eingebracht. Hierfür wurde ein Mausmodell generiert, welches die ARSA-Defizienz mit einer Myelin-Defizienz kombiniert. Mit Hilfe histologischer Analysen konnten prominente Sulfatidablagerungen besonders in den myelindefizienten faserreichen Strukturen des Gehirns demonstriert werden. Erste Transplantationsstudien in neonatale Mäuse zeigten, dass die RGL-NPCs für mindestens 8 Wochen überlebten, sich in das Empfängergewebe integrierten und in gliale Subtypen differenzierten. Die transplantierten Zellen waren in der Lage, MBP-positive Oligodendrozyten zu bilden. Dieses Xenotransplantat-Modell kann Aufschluss über mögliche oligodendrogliale Fehlfunktionen im Zusammenhang mit der ARSA-Defizienz und den Sulfatidablagerungen geben.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aasen T & Izpisúa Belmonte JC (2010) Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **5**: 371–82
- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S & Izpisúa Belmonte JC (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* **26**: 1276–84
- Agarwal S, Holton KL & Lanza R (2008) Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* **26**: 1117–1127
- Aggarwal S, Yurlova L & Simons M (2011) Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* **21**: 585–93
- An MC, Zhang N, Scott G, Montoro D, Wittkop T, Mooney S, Melov S & Ellerby LM (2012) Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **11**: 253–63
- Ananiev G, Williams EC, Li H & Chang Q (2011) Isogenic pairs of wild type and mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from Rett syndrome patients as in vitro disease model. *PLoS One* **6**: e25255
- Arbour LT, Silver K, Hechtman P, Treacy EP & Coulter-Mackie MB (2000) Variable onset of metachromatic leukodystrophy in a Vietnamese family. *Pediatr. Neurol.* **23**: 173–6
- ARSA-Datenbank (2016) Available at: <http://www.biochemgenetics.ca/asa/view.php> [Accessed March 23, 2016]
- Asheuer M, Pflumio F, Benhamida S, Dubart-Kupperschmitt A, Fouquet F, Imai Y, Aubourg P & Cartier N (2004) Human CD34+ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 3557–62
- Baier W & Harzer K (1983) Sulfatides in prenatal metachromatic leukodystrophy. *J. Neurochem.* **41**: 1766–8
- Barateiro A & Fernandes A (2014) Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**: 1917–29
- Barres BA, Lazar MA & Raff MC (1994) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* **120**: 1097–108
- Barry DS, Pakan JMP & McDermott KW (2014) Radial glial cells: key organisers in CNS development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **46**: 76–9
- Barth ML, Fensom A & Harris A (1995) Identification of seven novel mutations associated with metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mutat.* **6**: 170–6
- Baum H, Dodgson KS & Spencer B (1959) The assay of arylsulphatases A and B in human urine. *Clin. Chim. Acta* **4**: 453–5
- Beck M (2010) Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life* **62**: 33–40
- Berg G & Schachner M (1981) Immuno-electron-microscopic identification of O-antigen-bearing oligodendroglial cells in vitro. *Cell Tissue Res.* **219**: 313–25
- Berger J, Löschl B, Bernheimer H, Lugowska A, Tylki-Szymanska A, Gieselmann V & Molzer B (1997) Occurrence, distribution, and phenotype of arylsulfatase A mutations in patients with metachromatic leukodystrophy. *Am. J. Med. Genet.* **69**: 335–40
- Biffi A, Capotondo A, Fasano S, del Carro U, Marchesini S, Azuma H, Malaguti MC, Amadio S, Brambilla R, Grompe M, Bordignon C, Quattrini A & Naldini L (2006) Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J. Clin. Invest.* **116**: 3070–82
- Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, Baldoli C, Martino S, Calabria A, Canale S, Benedicenti F, Vallanti G, Biasco L, Leo S, Kabbara N, Zanetti G, Rizzo WB, Mehta NAL, Cicalese MP, Casiraghi M, et al (2013) Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* **341**: 1233158
- Biffi A, De Palma M, Quattrini A, Del Carro U, Amadio S, Visigalli I, Sessa M, Fasano S, Brambilla R, Marchesini S, Bordignon C & Naldini L (2004) Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified

- hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.* **113**: 1118–29
- Blakemore WF, Eames RA, Smith KJ & McDonald WI (1977) Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lysolecithin. *J. Neurol. Sci.* **33**: 31–43
- Bockenhoff A, Cramer S, Wolte P, Knieling S, Wohlenberg C, Gieselmann V, Galla H-J & Matzner U (2014) Comparison of Five Peptide Vectors for Improved Brain Delivery of the Lysosomal Enzyme Arylsulfatase A. *J. Neurosci.* **34**: 3122–3129
- Braulke T & Bonifacino JS (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**: 605–14
- Braulke T, Gartung C, Hasilik A & von Figura K (1987) Is movement of mannose 6-phosphate-specific receptor triggered by binding of lysosomal enzymes? *J. Cell Biol.* **104**: 1735–42
- Bredius RG, Laan LA, Lankester AC, Poorthuis BJ, van Tol MJ, Egeler RM & Arts WF (2007) Early marrow transplantation in a pre-symptomatic neonate with late infantile metachromatic leukodystrophy does not halt disease progression. *Bone Marrow Transplant.* **39**: 309–10
- Briggs R & King TJ (1952) Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **38**: 455–63
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM & Ericson J (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**: 435–45
- Brüstle O, Choudhary K, Karram K, Hüttner A, Murray K, Dubois-Dalcq M & McKay RD (1998) Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. *Nat. Biotechnol.* **16**: 1040–4
- Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID & McKay RD (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* **285**: 754–6
- Buchet D & Baron-Van Evercooren A (2009) In search of human oligodendroglia for myelin repair. *Neurosci. Lett.* **456**: 112–9
- von Bülow R, Schmidt B, Dierks T, Schwabauer N, Schilling K, Weber E, Usón I & von Figura K (2002) Defective oligomerization of arylsulfatase a as a cause of its instability in lysosomes and metachromatic leukodystrophy. *J. Biol. Chem.* **277**: 9455–61
- Burkhardt MF, Martinez FJ, Wright S, Ramos C, Volfson D, Mason M, Garnes J, Dang V, Lievers J, Shoukat-Mumtaz U, Martinez R, Gai H, Blake R, Vaisberg E, Grskovic M, Johnson C, Irion S, Bright J, Cooper B, Nguyen L, et al (2013) A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **56**: 355–64
- Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M & Qiu M (2005) Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron* **45**: 41–53
- Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X, Guo Y, Ding M & Deng H (2007) Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* **45**: 1229–39
- Campagnoni AT (1988) Molecular biology of myelin proteins from the central nervous system. *J. Neurochem.* **51**: 1–14
- Casper KB & McCarthy KD (2006) GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**: 676–84
- Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A & Bhatia M (2003) Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* **102**: 906–15
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M & Studer L (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* **27**: 275–80
- Chambers SM, Qi Y, Mica Y, Lee G, Zhang X-J, Niu L, Bilsland J, Cao L, Stevens E, Whiting P, Shi S-H & Studer L (2012) Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat. Biotechnol.* **30**: 715–20
- Chao HH, Waheed A, Pohlmann R, Hille A & von Figura K (1990) Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *EMBO J.* **9**: 3507–13

- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F & Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* **403**: 434–9
- Chernoff GF (1981) Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency. *J. Hered.* **72**: 128
- Cheung AYL, Horvath LM, Grafodatskaya D, Pasceri P, Weksberg R, Hotta A, Carrel L & Ellis J (2011) Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 2103–2115
- Chiang YH, Silani V & Zhou FC (1996) Morphological differentiation of astroglial progenitor cells from EGF-responsive neurospheres in response to fetal calf serum, basic fibroblast growth factor, and retinol. *Cell Transplant.* **5**: 179–89
- Cho CH-H, Hannan NR-F, Docherty FM, Docherty HM, João Lima M, Trotter MWB, Docherty K & Vallier L (2012) Inhibition of activin/nodal signalling is necessary for pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Diabetologia* **55**: 3284–95
- Choi SH, Kim YH, Hebisch M, Sliwinski C, Lee S, D'Avanzo C, Chen H, Hooli B, Asselin C, Muffat J, Klee JB, Zhang C, Wainger BJ, Peitz M, Kovacs DM, Woolf CJ, Wagner SL, Tanzi RE & Kim DY (2014) A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* **515**: 274–8
- Cizkova D, Cizek M, Nagyova M, Slovinska L, Novotna I, Jergova S, Radonak J, Hlucilova J & Vanicky I (2009) Enrichment of rat oligodendrocyte progenitor cells by magnetic cell sorting. *J. Neurosci. Methods* **184**: 88–94
- Clinical Trial NCT01510028 (2016) Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01510028> [Accessed March 23, 2016]
- Clinical Trial NCT01560182 (2016) Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01560182> [Accessed March 23, 2016]
- Clinical Trial NCT02464956 (2016) Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02464956> [Accessed March 24, 2016]
- Colle M-A, Piguet F, Bertrand L, Raoul S, Bieche I, Dubreil L, Sloothaak D, Bouquet C, Moullier P, Aubourg P, Cherel Y, Cartier N & Sevin C (2010) Efficient intracerebral delivery of AAV5 vector encoding human ARSA in non-human primate. *Hum. Mol. Genet.* **19**: 147–58
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA & Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**: 819–23
- Consiglio A, Quattrini A, Martino S, Bensadoun JC, Dolcetta D, Trojani A, Benaglia G, Marchesini S, Cestari V, Oliverio A, Bordignon C & Naldini L (2001) In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. *Nat. Med.* **7**: 310–6
- Coriell GM00197 (2016) Available at: [https://catalog.coriell.org/0/Sections/Search/Sample\\_Detail.aspx?Ref=GM00197&Product=CC](https://catalog.coriell.org/0/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=GM00197&Product=CC) [Accessed March 23, 2016]
- Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Nardini M, Ronchi D, Donadoni C, Salani S, Riboldi G, Magri F, Menozzi G, Bonaglia C, Rizzo F, Bresolin N & Comi GP (2012) Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Sci. Transl. Med.* **4**: 165ra162
- Coulter-Mackie M & Gagnier L (1997) Two new polymorphisms in the arylsulfatase A gene and their haplotype associations with normal, metachromatic leukodystrophy and pseudodeficiency alleles. *Am. J. Med. Genet.* **73**: 32–5
- Csiza CK & de Lahunta A (1979) Myelin deficiency (md): a neurologic mutant in the Wistar rat. *Am. J. Pathol.* **95**: 215–24
- Cui Q-L, D'Abate L, Fang J, Leong SY, Ludwin S, Kennedy TE, Antel J & Almazan G (2012) Human fetal oligodendrocyte progenitor cells from different gestational stages exhibit substantially different potential to myelinate. *Stem Cells Dev.* **21**: 1831–7
- Czepiel M, Balasubramaniyan V, Schaafsma W, Stancic M, Mikkers H, Huisman C, Boddeke E & Copray S (2011) Differentiation of induced pluripotent stem cells into functional oligodendrocytes. *Glia* **59**: 882–92
- Czopka T, Hennen E, von Holst A & Faissner A (2009) Novel conserved oligodendrocyte

- surface epitope identified by monoclonal antibody 4860. *Cell Tissue Res.* **338**: 161–70
- Davison AN & Gregson NA (1966) Metabolism of cellular membrane sulpholipids in the rat brain. *Biochem. J.* **98**: 915–922
- Desnick RJ & Schuchman EH (2002) Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 954–66
- Desnuelle C, Dib M, Garrel C & Favier A (2001) A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **2**: 9–18
- Devine MJ, Ryten M, Vodicka P, Thomson AJ, Burdon T, Houlden H, Cavaleri F, Nagano M, Drummond NJ, Taanman J-W, Schapira AH, Gwinn K, Hardy J, Lewis PA & Kunath T (2011) Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the  $\alpha$ -synuclein locus. *Nat. Commun.* **2**: 440
- Dias J, Gumenyuk M, Kang H, Vodyanik M, Yu J, Thomson JA & Slukvin II (2011) Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* **20**: 1639–47
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE & Eggan K (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**: 1218–21
- Doerr J, Böckenhoff A, Ewald B, Ladewig J, Eckhardt M, Gieselmann V, Matzner U, Brüstle O & Koch P (2015) Arylsulfatase A Overexpressing Human iPSC-derived Neural Cells Reduce CNS Sulfatide Storage in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. *Mol. Ther.* **23**: 1519–31
- Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, Sekiguchi K, Nakagawa M, Parmar M & Takahashi J (2014) Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem cell reports* **2**: 337–50
- Douvaras P, Wang J, Zimmer M, Hanchuk S, O'Bara MA, Sadiq S, Sim FJ, Goldman J & Fossati V (2014) Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells. *Stem cell reports* **3**: 250–9
- Duan L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Pan L, Miller RJ & Kessler JA (2014) Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death. *Mol. Neurodegener.* **9**: 3
- Dupouey P, Jacque C, Bourre JM, Cesselin F, Privat A & Baumann N (1979) Immunohistochemical studies of myelin basic protein in shiverer mouse devoid of major dense line of myelin. *Neurosci. Lett.* **12**: 113–8
- Ebert AD, Yu J, Rose FF, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA & Svendsen CN (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* **457**: 277–80
- Ebihara Y, Ma F & Tsuji K (2012) Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion. *Int. J. Hematol.* **95**: 610–6
- Eckhardt M, Hedayati KK, Pitsch J, Lüllmann-Rauch R, Beck H, Fewou SN & Gieselmann V (2007) Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci.* **27**: 9009–21
- Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, et al (2012) Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci. Transl. Med.* **4**: 145ra104
- Einheber S, Zanazzi G, Ching W, Scherer S, Milner TA, Peles E & Salzer JL (1997) The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J. Cell Biol.* **139**: 1495–506
- Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V & Studer L (2008) Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage.

- Genes Dev.* **22**: 152–65
- Erceg S, Ronaghi M, Oriá M, Roselló MG, Aragó MAP, Lopez MG, Radojevic I, Moreno-Manzano V, Rodríguez-Jiménez F-J, Bhattacharya SS, Cordoba J & Stojkovic M (2010) Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection. *Stem Cells* **28**: 1541–9
- Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, Li W, Weng Z, Chen J, Ni S, Chen K, Li Y, Liu X, Xu J, Zhang S, Li F, He W, Labuda K, Song Y, Peterbauer A, et al (2010) Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **6**: 71–9
- Evans MJ & Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154–156
- Faissner A, Clement A, Lochter A, Streit A, Mandl C & Schachner M (1994) Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell Biol.* **126**: 783–99
- Falk A, Koch P, Kesavan J, Takashima Y, Ladewig J, Alexander M, Wiskow O, Tailor J, Trotter M, Pollard S, Smith A & Brüstle O (2012) Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. *PLoS One* **7**: e29597
- Fan J-Q (2008) A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biol. Chem.* **389**: 1–11
- von Figura K, Gieselmann V & Jaecken J (2001) Metachromatic Leukodystrophy. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS & Valle D (eds) pp 3695–3724. McGraw-Hill, New York
- von Figura K, Steckel F, Conary J, Hasilik A & Shaw E (1986) Heterogeneity in late-onset metachromatic leukodystrophy. Effect of inhibitors of cysteine proteinases. *Am. J. Hum. Genet.* **39**: 371–82
- von Figura K, Steckel F & Hasilik A (1983) Juvenile and adult metachromatic leukodystrophy: partial restoration of arylsulfatase A (cerebroside sulfatase) activity by inhibitors of thiol proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 6066–70
- Fogarty M, Richardson WD & Kessaris N (2005) A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development* **132**: 1951–9
- Fredman P, Mattsson L, Andersson K, Davidsson P, Ishizuka I, Jeansson S, Måansson JE & Svennerholm L (1988) Characterization of the binding epitope of a monoclonal antibody to sulphatide. *Biochem. J.* **251**: 17–22
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyne D, Joung JK & Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* **31**: 822–6
- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K & Hasegawa M (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **85**: 348–62
- Futerman AH & van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 554–65
- Gadisseux JF & Evrard P (1985) Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial glial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus. *Dev. Neurosci.* **7**: 12–32
- Ganat YM, Silbereis J, Cave C, Ngu H, Anderson GM, Ohkubo Y, Ment LR & Vaccarino FM (2006) Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. *J. Neurosci.* **26**: 8609–21
- Gieselmann V (2008) Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatr.* **97**: 15–21
- Gieselmann V & Krägeloh-Mann I (2010) Metachromatic Leukodystrophy – An Update. *Neuropediatrics* **41**: 1–6
- Gieselmann V, Matzner U, Hess B, Lüllmann-Rauch R, Coenen R, Hartmann D, D'Hooge R, DeDeyn P & Nagels G (1998) Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and

- an animal model. *J. Inherit. Metab. Dis.* **21**: 564–74
- Gieselmann V, Polten A, Kreysing J & von Figura K (1994) Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *J. Inherit. Metab. Dis.* **17**: 500–9
- Giorgetti A, Montserrat N, Rodriguez-Piza I, Azqueta C, Veiga A & Izpisúa Belmonte JC (2010) Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2. *Nat. Protoc.* **5**: 811–20
- Givogri MI, Bottai D, Zhu HL, Fasano S, Lamorte G, Brambilla R, Vescovi A, Wrabetz L & Bongarzone E (2008) Multipotential neural precursors transplanted into the metachromatic leukodystrophy brain fail to generate oligodendrocytes but contribute to limit brain dysfunction. *Dev. Neurosci.* **30**: 340–57
- Givogri MI, Galbiati F, Fasano S, Amadio S, Perani L, Superchi D, Morana P, Del Carro U, Marchesini S, Brambilla R, Wrabetz L & Bongarzone E (2006) Oligodendroglial progenitor cell therapy limits central neurological deficits in mice with metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci.* **26**: 3109–19
- Glaser T, Perez-Bouza A, Klein K & Brüstle O (2005) Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells. *FASEB J.* **19**: 112–4
- Glaser T, Pollard SM, Smith A & Brüstle O (2007) Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PLoS One* **2**: e298
- Gore A, Li Z, Fung H-L, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, Canto I, Giorgetti A, Israel MA, Kiskinis E, Lee J-H, Loh Y-H, Manos PD, Montserrat N, Panopoulos AD, Ruiz S, Wilbert ML, Yu J, Kirkness EF, Izpisúa Belmonte JC, et al (2011) Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**: 63–7
- Görg M, Wilck W, Granitzny B, Suerken A, Lukacs Z, Ding X, Schulte-Markwort M & Kohlschütter A (2007) Stabilization of juvenile metachromatic leukodystrophy after bone marrow transplantation: a 13-year follow-up. *J. Child Neurol.* **22**: 1139–1142
- Gorris R, Fischer J, Erwes KL, Kesavan J, Peterson DA, Alexander M, Nöthen MM, Peitz M, Quandel T, Karus M & Brüstle O (2015) Pluripotent stem cell-derived radial glia-like cells as stable intermediate for efficient generation of human oligodendrocytes. *Glia* **63**: 2152–67
- Gort L, Coll MJ & Chabás A (1999) Identification of 12 novel mutations and two new polymorphisms in the arylsulfatase A gene: haplotype and genotype-phenotype correlation studies in Spanish metachromatic leukodystrophy patients. *Hum. Mutat.* **14**: 240–8
- Groeneveld GJ, Veldink JH, van der Tweel I, Kalmijn S, Beijer C, de Visser M, Wokke JHJ, Franssen H & van den Berg LH (2003) A randomized sequential trial of creatine in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **53**: 437–45
- Guffon N, Souillet G, Maire I, Dorche C, Mathieu M & Guibaud P (1995) Juvenile metachromatic leukodystrophy: neurological outcome two years after bone marrow transplantation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **18**: 159–61
- Gumpel M, Lachapelle F, Gansmuller A, Baulac M, Baron van Evercooren A & Baumann N (1987) Transplantation of human embryonic oligodendrocytes into shiverer brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **495**: 71–85
- Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK & Hall ED (1996) Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **39**: 147–57
- Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Han DW, Glage S, Miller K, Fischer P, Schöler HR & Martin U (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* **5**: 434–41
- Han F, Wang W, Chen B, Chen C, Li S, Lu X, Duan J, Zhang Y, Zhang YA, Guo W & Li G (2015) Human induced pluripotent stem cell-derived neurons improve motor asymmetry in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Cyotherapy* **17**: 665–79
- Hartfuss E, Galli R, Heins N & Götz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* **229**: 15–30
- Heim P, Claussen M, Hoffmann B, Conzelmann E, Gärtner J, Harzer K, Hunneman DH, Köhler W, Kurlemann G & Kohlschütter A (1997) Leukodystrophy incidence in Germany.

- Am. J. Med. Genet. 71*: 475–8
- Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lüllmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C & Gieselmann V (1996) Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 14821–6
- Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKelver RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B, Meng X, Miller JC, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD & Jaenisch R (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **27**: 851–857
- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD & Jaenisch R (2011) Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.* **29**: 731–4
- Hu B-Y, Du Z-W & Zhang S-C (2009) Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **4**: 1614–1622
- Huang JK, Jarjour AA, Nait Oumesmar B, Kerninon C, Williams A, Krezel W, Kagechika H, Bauer J, Zhao C, Baron-Van Evercooren A, Champon P, Ffrench-Constant C & Franklin RJM (2011) Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat. Neurosci.* **14**: 45–53
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W & Melton D a (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* **26**: 1269–75
- Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, Ng S, Sourour M, Hämäläinen R, Olsson C, Lundin K, Mikkola M, Trokovic R, Peitz M, Brüstle O, Bazett-Jones DP, Alitalo K, Lahesmaa R, Nagy A & Otonkoski T (2011) Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* **471**: 58–62
- Imaiizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, et al (2012) Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and  $\alpha$ -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol. Brain* **5**: 35
- Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M & Narumiya S (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol. Pharmacol.* **57**: 976–83
- Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, Hefferan MP, Van Gorp S, Nazor KL, Boscolo FS, Carson CT, Laurent LC, Marsala M, Gage FH, Remes AM, Koo EH & Goldstein LSB (2012) Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* **482**: 216–20
- Izrael M, Zhang P, Kaufman R, Shinder V, Ella R, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Chebath J & Revel M (2007) Human oligodendrocytes derived from embryonic stem cells: Effect of noggin on phenotypic differentiation in vitro and on myelination in vivo. *Mol. Cell. Neurosci.* **34**: 310–23
- Jang J, Kang H-C, Kim H-S, Kim JY, Huh YJ, Kim D-S, Yoo J-E, Lee J-A, Lim B, Lee J, Yoon T-M, Park I-H, Hwang D-Y, Daley GQ & Kim D-W (2011) Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Ann. Neurol.* **70**: 402–9
- Joosten E, Hoes M, Gabreëls-Festen A, Hommes O, Schuurmans Stekhoven H & Slooff JL (1975) Electron microscopic investigation of inclusion material in a case of adult metachromatic leukodystrophy; observations on kidney biopsy, peripheral nerve and cerebral white matter. *Acta Neuropathol.* **33**: 165–71
- Judson RL, Babiarz JE, Venere M & Blelloch R (2009) Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* **27**: 459–61
- Jungalwala FB (1974) Synthesis and turnover of cerebroside sulfate of myelin in adult and developing rat brain. *J. Lipid Res.* **15**: 114–123
- Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P & Woltjen K (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* **458**: 771–5
- Kang S-M, Cho MS, Seo H, Yoon CJ, Oh SK, Choi YM & Kim D-W (2007) Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**: 419–424

- Kapaun P, Dittmann RW, Granitzny B, Eickhoff W, Wulbrand H, Neumaier-Probst E, Zander A & Kohlschüetter A (1999) Slow progression of juvenile metachromatic leukodystrophy 6 years after bone marrow transplantation. *J. Child Neurol.* **14**: 222–8
- Karumbayaram S, Novitch BG, Patterson M, Umbach JA, Richter L, Lindgren A, Conway AE, Clark AT, Goldman S a, Plath K, Wiedau-Pazos M, Kornblum HI & Lowry WE (2009) Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells* **27**: 806–11
- Karus M, Ulc A, Ehrlich M, Czopka T, Hennen E, Fischer J, Mizhorova M, Qamar N, Brüstle O & Faissner A (2016) Regulation of oligodendrocyte precursor maintenance by chondroitin sulphate glycosaminoglycans. *Glia* **64**: 270–86
- Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R & Thomson JA (2001) Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 10716–21
- Kawabata K, Migita M, Mochizuki H, Miyake K, Igarashi T, Fukunaga Y & Shimada T (2006) Ex vivo cell-mediated gene therapy for metachromatic leukodystrophy using neurospheres. *Brain Res.* **1094**: 13–23
- Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K & Steward O (2005) Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **25**: 4694–705
- Keller GM (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 862–869
- Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M & Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* **9**: 173–9
- Kidd D, Nelson J, Jones F, Dusoir H, Wallace I, McKinstry S & Patterson V (1998) Long-term stabilization after bone marrow transplantation in juvenile metachromatic leukodystrophy. *Arch. Neurol.* **55**: 98–9
- Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Saiki H, Miyamoto S & Takahashi J (2011) Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease. *J. Parkinsons. Dis.* **1**: 395–412
- Kim D, Kim C-H, Moon J-I, Chung Y-G, Chang M-Y, Han B-S, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R & Kim K-S (2009a) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* **4**: 472–6
- Kim H, Walczak P, Kerr C, Galpoththawela C, Gilad AA, Muja N & Bulte JWM (2012) Immunomodulation by transplanted human embryonic stem cell-derived oligodendroglial progenitors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* **30**: 2820–9
- Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H & Schöler HR (2009b) Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* **461**: 649–3
- Kim JB, Lee H, Araúzo-Bravo MJ, Hwang K, Nam D, Park MR, Zaehres H, Park KI & Lee S-J (2015) Oct4-induced oligodendrocyte progenitor cells enhance functional recovery in spinal cord injury model. *EMBO J.* **34**: 2971–83
- Klein D, Büssow H, Fewou SN & Gieselmann V (2005) Exocytosis of storage material in a lysosomal disorder. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**: 663–7
- Klein D, Schmandt T, Muth-Köhne E, Perez-Bouza A, Segschneider M, Gieselmann V & Brüstle O (2006) Embryonic stem cell-based reduction of central nervous system sulfatide storage in an animal model of metachromatic leukodystrophy. *Gene Ther.* **13**: 1686–95
- Klein D, Yaghootfam A, Matzner U, Koch B, Bräulke T & Gieselmann V (2009) Mannose 6-phosphate receptor-dependent endocytosis of lysosomal enzymes is increased in sulfatide-storing kidney cells. *Biol. Chem.* **390**: 41–8
- Koch P, Breuer P, Peitz M, Jungverdorben J, Kesavan J, Poppe D, Doerr J, Ladewig J, Mertens J, Tütting T, Hoffmann P, Klockgether T, Evert BO, Wüllner U & Brüstle O (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* **480**: 543–6
- Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J & Brüstle O (2009) A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic

- integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 3225–30
- Kolodny EH & Moser HW (1983) Sulfatide lipidosis: Metachromatic leukodystrophy. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Stanbury JB Wyngaarden B Fredrickson DS Goldstein L & Brown FS (eds) pp 881–905. New York, NY: McGraw-Hill
- Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kuroki Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoma C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, et al (2013) Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* **12**: 487–96
- Kreitzer FR, Salomonis N, Sheehan A, Huang M, Park JS, Spindler MJ, Lizarraga P, Weiss WA, So P & Conklin BR (2013) A robust method to derive functional neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Am. J. Stem Cells* **2**: 119–31
- Kreysing J, von Figura K & Gieselmann V (1990) Structure of the arylsulfatase A gene. *Eur. J. Biochem.* **191**: 627–31
- Krivit W, Aubourg P, Shapiro E & Peters C (1999) Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome. *Curr. Opin. Hematol.* **6**: 377–82
- Kudoh T & Wenger DA (1982) Diagnosis of metachromatic leukodystrophy, Krabbe disease, and Farber disease after uptake of fatty acid-labeled cerebroside sulfate into cultured skin fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **70**: 89–97
- Kurai T, Hisayasu S, Kitagawa R, Migita M, Suzuki H, Hirai Y & Shimada T (2007) AAV1 mediated co-expression of formylglycine-generating enzyme and arylsulfatase a efficiently corrects sulfatide storage in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Ther.* **15**: 38–43
- Ladewig J, Mertens J, Kesavan J, Doerr J, Poppe D, Glaue F, Herms S, Wernet P, Kögler G, Müller F-J, Koch P & Brüstle O (2012) Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat. Methods* **9**: 575–8
- Lee-Vaupel M & Conzelmann E (1987) A simple chromogenic assay for arylsulfatase A. *Clin. Chim. Acta* **164**: 171–80
- Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ & Studer L (2010) Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **5**: 688–701
- Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M & Studer L (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* **461**: 402–6
- Lee G, Ramirez CN, Kim H, Zeltner N, Liu B, Radu C, Bhinder B, Kim YJ, Choi IY, Mukherjee-Clavin B, Djaballah H & Studer L (2012) Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat. Biotechnol.* **30**: 1244–8
- Li W, Sun W, Zhang Y, Wei W, Ambasudhan R, Xia P, Talantova M, Lin T, Kim J, Wang X, Kim WR, Lipton S a, Zhang K & Ding S (2011) Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 8299–304
- Li X-J, Du Z-W, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA & Zhang S-C (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**: 215–21
- Lim JWE & Bodnar A (2002) Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics* **2**: 1187–203
- Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson JA, Evans RM & Ecker JR (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**: 68–73
- Liu H, Ye Z, Kim Y, Sharkis S & Jang Y-Y (2010) Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* **51**: 1810–9
- Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakrabortty S, Holekamp TF & McDonald JW (2000) Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and

- after spinal cord transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 6126–6131
- Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT & Plath K (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 2883–8
- Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD & Rowitch DH (2002) Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* **109**: 75–86
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD & Rowitch DH (2000) Sonic hedgehog–regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25**: 317–29
- Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, Südhof TC & Wernig M (2012) Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 2527–32
- Lüllmann-Rauch R, Matzner U, Franken S, Hartmann D & Giesemann V (2001) Lysosomal sulfoglycolipid storage in the kidneys of mice deficient for arylsulfatase A (ASA) and of double-knockout mice deficient for ASA and galactosylceramide synthase. *Histochem. Cell Biol.* **116**: 161–9
- Luzi P, Rafi MA, Rao HZ & Wenger DA (2013) Sixteen novel mutations in the arylsulfatase A gene causing metachromatic leukodystrophy. *Gene* **530**: 323–8
- Mabie PC, Mehler MF, Marmur R, Papavasiliou A, Song Q & Kessler JA (1997) Bone morphogenetic proteins induce astroglial differentiation of oligodendroglial-astroglial progenitor cells. *J. Neurosci.* **17**: 4112–20
- Malatack JJ, Consolini DM & Bayever E (2003) The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease. *Pediatr. Neurol.* **29**: 391–403
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE & Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**: 823–6
- Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, Zou J & Cheng L (2008) Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* **26**: 1998–2005
- Malm G, Ringdén O, Winiarski J, Gröndahl E, Uyebrant P, Eriksson U, Håkansson H, Skjeldal O & Månsson JE (1996) Clinical outcome in four children with metachromatic leukodystrophy treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **17**: 1003–8
- Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH & Muotri AR (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* **143**: 527–39
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 7634–8
- Matthes F, Stroobants S, Gerlach D, Wohlenberg C, Wessig C, Fogh J, Giesemann V, Eckhardt M, D'Hooge R & Matzner U (2012) Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age. *Hum. Mol. Genet.* **21**: 2599–2609
- Matthes F, Wölte P, Böckenhoff A, Hüwel S, Schulz M, Hyden P, Fogh J, Giesemann V, Galla HJ & Matzner U (2011) Transport of arylsulfatase A across the blood-brain barrier in vitro. *J. Biol. Chem.* **286**: 17487–17494
- Matzner U, Breiden B, Schwarzmüller G, Yaghootfam A, Flutharty AL, Hasilik A, Sandhoff K & Giesemann V (2009a) Saposin B-dependent reconstitution of arylsulfatase A activity in vitro and in cell culture models of metachromatic leukodystrophy. *J. Biol. Chem.* **284**: 9372–9381
- Matzner U & Giesemann V (2005) Gene therapy of metachromatic leukodystrophy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **5**: 55–65
- Matzner U, Habetha M & Giesemann V (2000a) Retrovirally expressed human arylsulfatase A corrects the metabolic defect of arylsulfatase A-deficient mouse cells. *Gene Ther.* **7**: 805–12
- Matzner U, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Coenen R, Rother F, Månsson J-E, Fredman P, D'Hooge R, De Deyn PP & Giesemann V (2002) Bone marrow stem cell-based gene

- transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: effects on visceral and nervous system disease manifestations. *Gene Ther.* **9**: 53–63
- Matzner U, Harzer K, Learish RD, Barranger JA & Gieselmann V (2000b) Long-term expression and transfer of arylsulfatase A into brain of arylsulfatase A-deficient mice transplanted with bone marrow expressing the arylsulfatase A cDNA from a retroviral vector. *Gene Ther.* **7**: 1250–7
- Matzner U, Herbst E, Hedayati KK, Lüllmann-Rauch R, Wessig C, Schröder S, Eistrup C, Möller C, Fogh J & Gieselmann V (2005) Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **14**: 1139–52
- Matzner U, Lüllmann-Rauch R, Stroobants S, Andersson C, Weigelt C, Eistrup C, Fogh J, D'Hooge R & Gieselmann V (2009b) Enzyme replacement improves ataxic gait and central nervous system histopathology in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Ther.* **17**: 600–6
- Matzner U, Matthes F, Weigelt C, Andersson C, Eistrup C, Fogh J & Gieselmann V (2008) Non-inhibitory antibodies impede lysosomal storage reduction during enzyme replacement therapy of a lysosomal storage disease. *J. Mol. Med.* **86**: 433–442
- Matzner U, Schestag F, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, D'Hooge R, De Deyn PP & Gieselmann V (2001) Bone marrow stem cell gene therapy of arylsulfatase A-deficient mice, using an arylsulfatase A mutant that is hypersecreted from retrovirally transduced donor-type cells. *Hum. Gene Ther.* **12**: 1021–1033
- McKhann GM (1984) Metachromatic leukodystrophy: clinical and enzymatic parameters. *Neuropediatrics* **15 Suppl**: 4–10
- Mertens J, Stüber K, Wunderlich P, Ladewig J, Kesavan JC, Vandenbergh R, Vandenbulcke M, van Damme P, Walter J, Brüstle O & Koch P (2013) APP processing in human pluripotent stem cell-derived neurons is resistant to NSAID-based  $\gamma$ -secretase modulation. *Stem cell reports* **1**: 491–8
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD & Rebar EJ (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* **29**: 143–8
- Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, Mandal PK, Vera E, Shim J, Kriks S, Taldone T, Fusaki N, Tomishima MJ, Krainc D, Milner TA, Rossi DJ & Studer L (2013) Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* **13**: 691–705
- Miyake N, Miyake K, Asakawa N, Yamamoto M & Shimada T (2014) Long-term correction of biochemical and neurological abnormalities in MLD mice model by neonatal systemic injection of an AAV serotype 9 vector. *Gene Ther.* **21**: 427–33
- Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y & Mori M (2011) Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* **8**: 633–8
- Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K & Nakafuku M (2001) Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* **31**: 757–71
- Mo Z & Zecevic N (2009) Human fetal radial glia cells generate oligodendrocytes in vitro. *Glia* **57**: 490–8
- Molander-Melin M, Pernber Z, Franken S, Gieselmann V, Månnsson J-E & Fredman P (2004) Accumulation of sulfatide in neuronal and glial cells of arylsulfatase A deficient mice. *J. Neurocytol.* **33**: 417–27
- Molineaux SM, Engh H, de Ferra F, Hudson L & Lazzarini RA (1986) Recombination within the myelin basic protein gene created the dysmyelinating shiverer mouse mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 7542–6
- Monaco MCG, Maric D, Bandeian A, Leibovitch E, Yang W & Major EO (2012) Progenitor-derived oligodendrocyte culture system from human fetal brain. *J. Vis. Exp.*: 1–8
- Monti E, Preti A, Novati A, Aleo MF, Clemente ML & Marchesini S (1992) Uptake and

- metabolism of a fluorescent sulfatide analogue in cultured skin fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1124**: 80–7
- Morest DK & Silver J (2003) Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* **43**: 6–18
- Najm FJ, Lager AM, Zaremba A, Wyatt K, Caprariello A V, Factor DC, Karl RT, Maeda T, Miller RH & Tesar PJ (2013) Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* **31**: 426–33
- Navarro C, Fernández JM, Domínguez C, Fachal C & Alvarez M (1996) Late juvenile metachromatic leukodystrophy treated with bone marrow transplantation; a 4-year follow-up study. *Neurology* **46**: 254–6
- Nguyen HN, Byers B, Cord B, Shcheglovitov A, Byrne J, Gujar P, Kee K, Schüle B, Dolmetsch RE, Langston W, Palmer TD & Pera RR (2011) LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* **8**: 267–80
- Nishiyama A, Chang A & Trapp BD (1999) NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**: 1113–24
- Nistor GI, Totoiu MO, Haque N, Carpenter MK & Keirstead HS (2005) Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* **49**: 385–96
- Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ruggieri M, Salani S, Riboldi G, Faravelli I, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP & Corti S (2014) Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDHHiSSC<sup>+</sup>VLA4<sup>+</sup> neural stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model. *Hum. Mol. Genet.* **23**: 342–54
- Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD & Riddle P (1988) Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* **333**: 560–2
- Novitch BG, Chen AI & Jessell TM (2001) Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* **31**: 773–89
- Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T & Okano H (2014) Involvement of ER stress in dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 missense mutations shown by iPSC-derived oligodendrocytes. *Stem cell reports* **2**: 648–61
- O'Brien JS & Sampson EL (1965) Myelin Membrane: a molecular abnormality. *Science* **150**: 1613–1614
- Ogawa S, Tokumoto Y, Miyake J & Nagamune T (2011a) Immunopanning selection of A2B5-positive cells increased the differentiation efficiency of induced pluripotent stem cells into oligodendrocytes. *Neurosci. Lett.* **489**: 79–83
- Ogawa S, Tokumoto Y, Miyake J & Nagamune T (2011b) Induction of oligodendrocyte differentiation from adult human fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **47**: 464–9
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T & Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**: 949–53
- Ono K, Kagawa T, Tsumori T, Yokota S & Yasui Y (2001) Morphological changes and cellular dynamics of oligodendrocyte lineage cells in the developing vertebrate central nervous system. *Dev. Neurosci.* **23**: 346–55
- Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, Citri A, Sebastian V, Marro S, Südhof TC & Wernig M (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* **476**: 220–3
- Parenti G, Pignata C, Vajro P & Salerno M (2013) New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (review). *Int. J. Mol. Med.* **31**: 11–20
- Park I, Arora N, Huo H, Maherli N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K & Daley GQ (2008) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134**: 877–86
- Patil SA & Maegawa GHB (2013) Developing therapeutic approaches for metachromatic

- leukodystrophy. *Drug Des. Devel. Ther.* **7**: 729–45
- Paz Soldán MM & Pirko I (2012) Biogenesis and significance of central nervous system myelin. *Semin. Neurol.* **32**: 9–14
- Peng L & Suzuki K (1987) Ultrastructural study of neurons in metachromatic leukodystrophy. *Clin. Neuropathol.* **6**: 224–30
- Pera MF (2011) Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature* **471**: 46–7
- Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL & Studer L (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 12543–8
- Pfeiffer SE, Warrington AE & Bansal R (1993) The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol.* **3**: 191–7
- Piao J, Major T, Auyeung G, Pollicarpio E, Menon J, Droms L, Gutin P, Uryu K, Tchieu J, Soulet D & Tabar V (2015) Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitors Remyelinate the Brain and Rescue Behavioral Deficits following Radiation. *Cell Stem Cell* **16**: 198–210
- Pick M, Azzola L, Mossman A, Stanley EG & Elefanti AG (2007) Differentiation of human embryonic stem cells in serum-free medium reveals distinct roles for bone morphogenetic protein 4, vascular endothelial growth factor, stem cell factor, and fibroblast growth factor 2 in hematopoiesis. *Stem Cells* **25**: 2206–14
- Piguet F, Sondhi D, Piraud M, Fouquet F, Hackett NR, Ahouansou O, Vanier M-T, Bieche I, Aubourg P, Crystal RG, Cartier N & Sevin C (2012) Correction of brain oligodendrocytes by AAVrh.10 intracerebral gene therapy in metachromatic leukodystrophy mice. *Hum. Gene Ther.* **23**: 903–14
- Pituch KC, Moyano AL, Lopez-Rosas A, Marottoli FM, Li G, Hu C, van Breemen R, Måansson JE & Givogri MI (2015) Dysfunction of Platelet-derived Growth Factor Receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) Represses the Production of Oligodendrocytes from Arylsulfatase A-deficient Multipotential Neural Precursor Cells. *J. Biol. Chem.* **290**: 7040–7053
- Platt FM & Lachmann RH (2009) Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**: 737–45
- Poeppel P, Abouzied MM, Völker C & Gieselmann V (2010) Misfolded endoplasmic reticulum retained subunits cause degradation of wild-type subunits of arylsulfatase A heteromers. *FEBS J.* **277**: 3404–14
- Poeppel P, Habetha M, Marcão A, Büssow H, Berna L & Gieselmann V (2005) Missense mutations as a cause of metachromatic leukodystrophy. Degradation of arylsulfatase A in the endoplasmic reticulum. *FEBS J.* **272**: 1179–88
- Polito A & Reynolds R (2005) NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J. Anat.* **207**: 707–16
- Polten A, Fluharty AL, Fluharty CB, Kappler J, von Figura K & Gieselmann V (1991) Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy. *N. Engl. J. Med.* **324**: 18–22
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE & van Diggelen OP (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum. Genet.* **105**: 151–6
- Popko B (2003) Myelin: not just a conduit for conduction. *Nat. Genet.* **33**: 327–8
- Porter MT, Fluharty AL & Kihara H (1969) Metachromatic leukodystrophy: arylsulfatase-A deficiency in skin fibroblast cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **62**: 887–91
- Porter MT, Fluharty AL & Kihara H (1971) Correction of abnormal cerebroside sulfate metabolism in cultured metachromatic leukodystrophy fibroblasts. *Science* **172**: 1263–5
- Porter MT, Fluharty AL, De la Flor SD & Kihara H (1972) Cerebroside sulfatase determination in cultured human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **258**: 769–78
- Pouya A, Satarian L, Kiani S, Javan M & Baharvand H (2011) Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination. *PLoS One* **6**: e27925
- Pringle NP, Mudhar HS, Collarini EJ & Richardson WD (1992) PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development* **115**: 535–51
- Pryor PR & Luzio JP (2009) Delivery of endocytosed membrane proteins to the lysosome.

- Biochim. Biophys. Acta* **1793**: 615–24
- Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J, Fu H, Rao M, Sussel L, Rubenstein J & Qiu M (2001) Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* **128**: 2723–33
- Qiu M, Shimamura K, Sussel L, Chen S & Rubenstein JL (1998) Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. *Mech. Dev.* **72**: 77–88
- Ramakrishnan H, Hedayati KK, Lüllmann-Rauch R, Wessig C, Fewou SN, Maier H, Goebel H-H, Gieselmann V & Eckhardt M (2007) Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci.* **27**: 9482–90
- Ran FA, Hsu PD, Lin C, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y & Zhang F (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**: 1380–9
- Ranscht B, Clapshaw PA, Price J, Noble M & Seifert W (1982) Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**: 2709–13
- Reinhardt P, Glatza M, Hemmer K, Tsytsyura Y, Thiel CS, Höing S, Moritz S, Parga JA, Wagner L, Bruder JM, Wu G, Schmid B, Röpke A, Klingauf J, Schwamborn JC, Gasser T, Schöler HR & Sterneckert J (2013a) Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling. *PLoS One* **8**: e59252
- Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF, Schöndorf DC, Wagner L, Glatza M, Höing S, Hargus G, Heck SA, Dhingra A, Wu G, Müller S, Brockmann K, Kluba T, Maisel M, Krüger R, Berg D, Tsytsyura Y, Thiel CS, Psathaki O-E, et al (2013b) Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell* **12**: 354–67
- Rhee Y-H, Ko J-Y, Chang M-Y, Yi S-H, Kim D, Kim C-H, Shim J-W, Jo A-Y, Kim B-W, Lee H, Lee S-H, Suh W, Park C-H, Koh H-C, Lee Y-S, Lanza R, Kim K-S & Lee S-H (2011) Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* **121**: 2326–35
- Richardson WD, Kessaris N & Pringle N (2006) Oligodendrocyte wars. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**: 11–8
- Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermark B & Dubois-Dalcq M (1988) A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* **53**: 309–19
- Richardson WD, Pringle NP, Yu WP & Hall AC (1997) Origins of spinal cord oligodendrocytes: possible developmental and evolutionary relationships with motor neurons. *Dev. Neurosci.* **19**: 58–68
- Ricketts MH, Amsterdam JD, Park DS, Yang RS, Poretz RD, Zhang X, Fanale M, Baddoo A & Manowitz P (1996) A novel arylsulfatase A protein variant and genotype in two patients with major depression. *J. Affect. Disord.* **40**: 137–147
- Rip JW & Gordon BA (1998) A simple spectrophotometric enzyme assay with absolute specificity for arylsulfatase A. *Clin. Biochem.* **31**: 29–31
- Robinton DA & Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* **481**: 295–305
- Rommerskirch W, Fluharty AL, Peters C, von Figura K & Gieselmann V (1991) Restoration of arylsulphatase A activity in human-metachromatic-leucodystrophy fibroblasts via retroviral-vector-mediated gene transfer. *Biochem. J.* **280 ( Pt 2)**: 459–61
- Rosenberg JB, Sondhi D, Rubin DG, Monette S, Chen A, Cram S, De BP, Kaminsky SM, Sevin C, Aubourg P & Crystal RG (2014) Comparative efficacy and safety of multiple routes of direct CNS administration of adeno-associated virus gene transfer vector serotype rh.10 expressing the human arylsulfatase A cDNA to nonhuman primates. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **25**: 164–77
- Rowitch DH (2004) Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 409–19

- Ryan SD, Dolatabadi N, Chan SF, Zhang X, Akhtar MW, Parker J, Soldner F, Sunico CR, Nagar S, Talantova M, Lee B, Lopez K, Nutter A, Shan B, Molokanova E, Zhang Y, Han X, Nakamura T, Masliah E, Yates JR, et al (2013) Isogenic human iPSC Parkinson's model shows nitrosative stress-induced dysfunction in MEF2-PGC1 $\alpha$  transcription. *Cell* **155**: 1351–64
- Saher G & Simons M (2010) Cholesterol and myelin biogenesis. *Subcell. Biochem.* **51**: 489–508
- Sánchez-Danés A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carballo I, Jiménez-Delgado S, Caig C, Mora S, Di Guglielmo C, Ezquerra M, Patel B, Giralt A, Canals JM, Memo M, Alberch J, López-Barneo J, Vila M, Cuervo AM, Tolosa E, Consiglio A & Raya A (2012) Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol. Med.* **4**: 380–95
- Sanders LH, Laganière J, Cooper O, Mak SK, Vu BJ, Huang YA, Paschon DE, Vangipuram M, Sundararajan R, Urnov FD, Langston JW, Gregory PD, Zhang HS, Greenamyre JT, Isacson O & Schüle B (2014) LRRK2 mutations cause mitochondrial DNA damage in iPSC-derived neural cells from Parkinson's disease patients: reversal by gene correction. *Neurobiol. Dis.* **62**: 381–6
- Sangalli A, Taveggia C, Salviati A, Wrabetz L, Bordignon C & Severini GM (1998) Transduced fibroblasts and metachromatic leukodystrophy lymphocytes transfer arylsulfatase A to myelinating glia and deficient cells in vitro. *Hum. Gene Ther.* **9**: 2111–2119
- Saravanan K, Büssow H, Weiler N, Gieselmann V & Franken S (2007) A spontaneously immortalized Schwann cell line to study the molecular aspects of metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci. Methods* **161**: 223–33
- Saravanan K, Schaefer-Wiemers N, Klein D, Sandhoff R, Schwarz A, Yaghootfam A, Gieselmann V & Franken S (2004) Specific downregulation and mistargeting of the lipid raft-associated protein MAL in a glycolipid storage disorder. *Neurobiol. Dis.* **16**: 396–406
- Satoh T, Suzuki H, Monma N, Satodate R, Tanaka H & Yajima H (1988) Metachromatic leukodystrophy. Report of siblings with the juvenile type of metachromatic leukodystrophy. *Acta Pathol. Jpn.* **38**: 1041–51
- Seibler P, Graziotto J, Jeong H, Simunovic F, Klein C & Krainc D (2011) Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J. Neurosci.* **31**: 5970–6
- Seilhean D, Gansmüller A, Baron-Van Evercooren A, Gumpel M & Lachapelle F (1996) Myelination by transplanted human and mouse central nervous system tissue after long-term cryopreservation. *Acta Neuropathol.* **91**: 82–8
- Sevin C, Benraiss A, Van Dam D, Bonnin D, Nagels G, Verot L, Laurendeau I, Vidaud M, Gieselmann V, Vanier M, De Deyn PP, Aubourg P & Cartier N (2006) Intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer in rapidly progressive forms of metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **15**: 53–64
- Sharp J, Frame J, Siegenthaler M, Nistor G & Keirstead HS (2010) Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after cervical spinal cord injury. *Stem Cells* **28**: 152–63
- Shefner JM, Cudkowicz ME, Schoenfeld D, Conrad T, Taft J, Chilton M, Urbinelli L, Qureshi M, Zhang H, Pestronk A, Caress J, Donofrio P, Sorenson E, Bradley W, Lomen-Hoerth C, Pioro E, Rezania K, Ross M, Pascuzzi R, Heiman-Patterson T, et al (2004) A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology* **63**: 1656–61
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F & Stall a M (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**: 855–67
- Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S & Duncan SA (2010a) Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* **51**: 297–305
- Si-Tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Lough JW & Duncan S a (2010b) Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev. Biol.* **10**: 81
- Sim FJ, McClain CR, Schanz SJ, Protack TL, Windrem MS & Goldman SA (2011) CD140a

- identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* **29**: 934–41
- Simard AR & Rivest S (2004) Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* **18**: 998–1000
- Simons R & Riordan JR (1990) The myelin-deficient rat has a single base substitution in the third exon of the myelin proteolipid protein gene. *J. Neurochem.* **54**: 1079–81
- Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A & Chandra R (2015) Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**: 1–18
- Solders G, Celsing G, Hagenfeldt L, Ljungman P, Isberg B & Ringdén O (1998) Improved peripheral nerve conduction, EEG and verbal IQ after bone marrow transplantation for adult metachromatic leukodystrophy. *Bone Marrow Transplant.* **22**: 1119–1122
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O & Jaenisch R (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* **136**: 964–77
- Soldner F, Laganière J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, Khurana V, Golbe LI, Myers RH, Lindquist S, Zhang L, Guschin D, Fong LK, Vu BJ, Meng X, Urnov FD, Rebar EJ, Gregory PD, Zhang HS & Jaenisch R (2011) Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* **146**: 318–31
- Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN & Mostoslavsky G (2009) Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* **27**: 543–9
- Sommer I & Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytochemical study in the central nervous system. *Dev. Biol.* **83**: 311–27
- Stacpoole SRL, Spitzer S, Bilican B, Compston A, Karadottir R, Chandran S & Franklin RJM (2013) High yields of oligodendrocyte lineage cells from human embryonic stem cells at physiological oxygen tensions for evaluation of translational biology. *Stem cell reports* **1**: 437–50
- Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G & Hochedlinger K (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**: 945–9
- Steinman L (1999) Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. *Neuron* **24**: 511–4
- Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U & Wegner M (2002) Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev.* **16**: 165–70
- Stroobants S, Gerlach D, Matthes F, Hartmann D, Fogh J, Gieselmann V, D'Hooge R & Matzner U (2011) Intracerebroventricular enzyme infusion corrects central nervous system pathology and dysfunction in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 2760–9
- Sun T, Pringle NP, Hardy AP, Richardson WD & Smith HK (1998) Pax6 influences the time and site of origin of glial precursors in the ventral neural tube. *Mol. Cell. Neurosci.* **12**: 228–39
- Sun Y, Pollard S, Conti L, Toselli M, Biella G, Parkin G, Willatt L, Falk A, Cattaneo E & Smith A (2008) Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol. Cell. Neurosci.* **38**: 245–258
- Sundberg M, Hyysalo A, Skottman H, Shin S, Vemuri M, Suuronen R & Narkilahti S (2011) A xeno-free culturing protocol for pluripotent stem cell-derived oligodendrocyte precursor cell production. *Regen. Med.* **6**: 449–60
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N & Tada T (2001) Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* **11**: 1553–8
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K & Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861–72
- Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse

- embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663–76
- Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K & Nabeshima Y (2002) The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr. Biol.* **12**: 1157–63
- Tamaki S, Eckert K, He D, Sutton R, Doshe M, Jain G, Tushinski R, Reitsma M, Harris B, Tsukamoto A, Gage F, Weissman I & Uchida N (2002) Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J. Neurosci. Res.* **69**: 976–86
- The Human Gene Mutation Database ARSA (2016) Available at:  
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=ARSA> [Accessed March 23, 2016]
- Thier M, Wörnsdörfer P, Lakes YB, Gorris R, Herms S, Opitz T, Seiferling D, Quandt T, Hoffmann P, Nöthen MM, Brüstle O & Edenhofer F (2012) Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* **10**: 473–9
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145–7
- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan T V, Tsukamoto AS, Gage FH & Weissman IL (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 14720–5
- Vallstedt A, Klos JM & Ericson J (2005) Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* **45**: 55–67
- Vicario-Abejón C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D & McKay RD (1995) Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* **15**: 105–14
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC & Wernig M (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**: 1035–41
- Vitner EB, Platt FM & Futterman AH (2010) Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J. Biol. Chem.* **285**: 20423–7
- Waheed A, Hasilik A & von Figura K (1982) Synthesis and processing of arylsulfatase A in human skin fibroblasts. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie* **363**: 425–30
- Wang S, Bates J, Li X, Schanz S, Chandler-Militello D, Levine C, Maherali N, Studer L, Hochedlinger K, Windrem M & Goldman SA (2013) Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell* **12**: 252–64
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y-H, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM & Rossi DJ (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**: 618–30
- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K & Sasai Y (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **25**: 681–6
- Wernig M, Zhao J-P, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O & Jaenisch R (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 5856–61
- Wesselschmidt RL (2011) The teratoma assay: An in vivo assessment of pluripotency. *Methods Mol. Biol.* **767**: 231–241
- Wilmut L, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ & Campbell KH (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**: 810–3
- Wilson HC, Onischke C & Raine CS (2003) Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors. *Glia* **44**: 153–65
- Wilson L & Maden M (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev. Biol.* **282**: 1–13
- Windrem MS, Nunes MC, Rashbaum WK, Schwartz TH, Goodman RA, McKhann G, Roy NS & Goldman SA (2004) Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat. Med.* **10**: 93–7
- Windrem MS, Schanz SJ, Guo M, Tian G-F, Washco V, Stanwood N, Rasband M, Roy NS, Nedergaard M, Havton LA, Wang S & Goldman SA (2008) Neonatal chimerization with

- human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. *Cell Stem Cell* **2**: 553–65
- Windrem MS, Schanz SJ, Morrow C, Munir J, Chandler-Militello D, Wang S & Goldman SA (2014) A competitive advantage by neonatally engrafted human glial progenitors yields mice whose brains are chimeric for human glia. *J. Neurosci.* **34**: 16153–61
- Wittke D, Hartmann D, Gieselmann V & Lüllmann-Rauch R (2004) Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: Cellular alterations and topographic distribution. *Acta Neuropathol.* **108**: 261–271
- Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung H-K & Nagy A (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**: 766–70
- Wong AP & Rossant J (2013) Generation of Lung Epithelium from Pluripotent Stem Cells. *Curr. Pathobiol. Rep.* **1**: 137–145
- Woodruff RH & Franklin RJ (1999) Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: a comparative study. *Glia* **25**: 216–28
- Yabut O & Bernstein HS (2011) The promise of human embryonic stem cells in aging-associated diseases. *Aging (Albany. NY.)* **3**: 494–508
- Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H & Suzuki N (2011) Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 4530–9
- Yahata N, Asai M, Kitaoka S, Takahashi K, Asaka I, Hioki H, Kaneko T, Maruyama K, Saido TC, Nakahata T, Asada T, Yamanaka S, Iwata N & Inoue H (2011) Anti-A $\beta$  drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One* **6**: e25788
- Yan Y, Yang D, Zarnowska ED, Du Z, Werbel B, Valliere C, Pearce RA, Thomson JA & Zhang S-C (2005) Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**: 781–90
- Yang N, Zuchero JB, Ahlenius H, Marro S, Ng YH, Vierbuchen T, Hawkins JS, Geissler R, Barres BA & Wernig M (2013) Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nat. Biotechnol.* **31**: 434–9
- Ye Z, Zhan H, Mali P, Dowey S, Williams DM, Jang Y, Dang C V, Spivak JL, Moliterno AR & Cheng L (2009) Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* **114**: 5473–80
- Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, Lee-Messer C, Dolmetsch RE, Tsien RW & Crabtree GR (2011) MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* **476**: 228–31
- Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T & Yamanaka S (2009) Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **5**: 237–41
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II & Thomson JA (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* **324**: 797–801
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir G a, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II & Thomson J a (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**: 1917–20
- Zerah M, Piguet F, Colle M-A, Raoul S, Deschamps J-Y, Deniaud J, Gautier B, Toulgoat F, Bieche I, Laurendeau I, Sondhi D, Souweidane MM, Cartier-Lacave N, Moullier P, Crystal RG, Roujeau T, Sevin C & Aubourg P (2015) Intracerebral Gene Therapy Using AAVrh.10-hARSA Recombinant Vector to Treat Patients with Early-Onset Forms of Metachromatic Leukodystrophy: Preclinical Feasibility and Safety Assessments in Nonhuman Primates. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **26**: 113–24
- Zhang P-L, Izrael M, Ainbinder E, Ben-Simchon L, Chebath J & Revel M (2006) Increased myelinating capacity of embryonic stem cell derived oligodendrocyte precursors after treatment by interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor fusion protein. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**: 387–98
- Zhang SC (2001) Defining glial cells during CNS development. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**: 840–3
- Zhang SC, Ge B & Duncan ID (2000) Tracing human oligodendroglial development in vitro. *J. Neurosci.* **20**: 7773–83

- Neurosci. Res.* **59**: 421–9
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L & Ding S (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* **4**: 381–4
- Zhou J, Su P, Li D, Tsang S, Duan E & Wang F (2010) High-efficiency induction of neural conversion in human ESCs and human induced pluripotent stem cells with a single chemical inhibitor of transforming growth factor beta superfamily receptors. *Stem Cells* **28**: 1741–50
- Zhou Q & Anderson DJ (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* **109**: 61–73
- Zhou Q, Wang S & Anderson DJ (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* **25**: 331–43
- Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J, Wang Y, Zhang Y, Zhuang Q, Li Y, Bao X, Tse H-F, Grillari J, Grillari-Voglauer R, Pei D & Esteban M a (2012) Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat. Protoc.* **7**: 2080–9
- Zhou W & Freed CR (2009) Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **27**: 2667–74
- Zhu Q, Whittemore SR, Devries WH, Zhao X, Kuypers NJ & Qiu M (2011) Dorsally-derived oligodendrocytes in the spinal cord contribute to axonal myelination during development and remyelination following focal demyelination. *Glia* **59**: 1612–21
- Zlotogora J, Furman-Shaharabani Y, Harris A, Barth ML, von Figura K & Gieselmann V (1994) A single origin for the most frequent mutation causing late infantile metachromatic leucodystrophy. *J. Med. Genet.* **31**: 672–4

## 7. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir persönlich, selbständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Die Daten, die im Rahmen einer Kooperation gewonnen wurden, sind ausnahmslos gekennzeichnet. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten, Abbildungen und Konzepte sind unter Angabe der jeweiligen Quelle gekennzeichnet.

Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Bonn, im April 2016

Kim Lina Erwes