

**Mechanismen der Proteinaggregation  
in Neuronen von Patienten  
der Machado-Joseph Erkrankung**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Johannes Christopher Jungverdorben**

aus Dormagen

Bonn 2015

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie.

1. Gutachter Prof. Dr. Oliver Brüstle

2. Gutachter Prof. Dr. Michael Hoch

Tag der Promotion: 04. April 2016

Erscheinungsjahr: 2016

---

3-MA	3-Methyladenin
Abb.	Abbildung
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ALLN	N-Azetyl-Leu-Leu-Norleucinal
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
APP	<i>amyloid precursor proteins</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure/n
AscA	<i>L-ascorbic-acid-2-phosphate</i>
AFP	<i>α-fetoprotein</i>
ATG	<i>autophagy related</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATXN3	Ataxin-3
βIII-Tub	βIII-Tubulin
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BECN1	Beclin-1
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP-4	<i>bone morphogenic protein 4</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CBP	<i>cAMP-response element binding (CREB)-binding protein</i>
CK2	Caseinkinase 2
CMA	Chaperon medierte Autophagie
c-MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CPA	<i>cyclopiazonic acid</i> ,Cyclopiazonsäure
CREB	<i>cAMP-response element binding</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
d	Tag
DACH1	<i>dachshund family transcription factor 1</i>
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4,6-Diamindino-2-phenylindol
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
D-APV	D(-)-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
db-cAMP	di-butyryl-cAMP
DBHQ	2,5-Di-(tert-butyl)-,4-Benzohydroquinon
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DRPLA	Dentatorubro-Pallidoluyische Atrophie

## II Abkürzungsverzeichnis

---

DUB	deubiquitinierendes Enzyme
EB	<i>embryoid body</i> , Embryoidkörper
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(e)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGR	<i>early growth response</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EpiSCs	Epiblast-Stammzellen
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
EschG	Embryonenschutzgesetz
FA	<i>formic acid</i> , Ameisensäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälber-Serum
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> , auch FGF-2
FLAG-Tag	8 Aminosäuren lange basische Sequenz (DYKDDDDK)
Fn	Fibronectin
FRDA	Friedreich-Ataxie
<i>g</i>	<i>g-force</i> , g-Kraft
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i> , $\gamma$ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>glial derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GM	<i>glial maturation medium</i>
h	Stunde
HD	<i>Huntington's disease</i> , Chorea Huntington
HDL2	Huntington's disease like 2
HDAC	Histondeazetylase
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N2-Ethansulfonsäure
(h)ES-Zelle	(humane) embryonale Stammzellen
HHR23	<i>human homologs of the yeast DNA repair protein Rad23</i>
HIF	<i>hypoxia induced factor</i>
HUGO	<i>Human Genome Organization</i>
HRP	<i>horsereddish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HTT	Huntingtin
ICM	<i>inner cell mass</i> , Innere Zellmasse
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IL-4	Interleukin-4
IMPase	Inositolmonophosphatase
IP3	Inositoltriphosphat
IP3R	IP3-Rezeptor
iPSCs	induced pluripotent stem cells
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ITPR1	Inositoltriphosphatrezeptor 1
IVF	<i>in vitro</i> -Fertilisation
KA	<i>kainic acid</i>

---

kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
l	Liter
LB	Luria Bertani Medium
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
Ln	Laminin
lt-NES-Zellen	<i>long term neuroepithelial stem</i> -Zellen
LTP	<i>long-term potentiation</i>
M	Mol pro Liter
mM	Millimolar
mA	Milliampère
MAP2ab	<i>microtubule-associated protein2 a+b</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> , embryonale Fibroblasten der Maus
mES-Zellen	murine ES-Zellen
mg	Milligramm
min	Minuten
MJD	<i>Machado-Joseph disease</i> , Machado-Joseph Erkrankung
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MTOC	<i>microtubule-organizing center</i> , Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)</i>
$\mu$ M	Mikromolar
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dion
NCOR1	<i>nuclear receptor co-repressor 1</i>
NCX	$Na^+/Ca^{2+}$ exchanger, $Na^+/Ca^{2+}$ -Antiporter
NEDD8	<i>neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 8</i>
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kernexportsignal
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NGM	<i>neural growth medium</i>
NII	<i>neuronal intranuclear inclusion</i> , neuronale intranukleäre Inklusion
nm	Nanometer
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
NSCs	<i>neural stem cells</i>
NS-Zellen	Neurale Stammzellen
NTRK2	<i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i>
OCT4	<i>octamer-binding transcription factor-4</i>
OD	Optische Dichte
P	Passage
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCAF	<i>p300/CBP associated factor</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd

## IV Abkürzungsverzeichnis

---

PID	Präimplantationsdiagnostik
PIK3C3	Klasse III Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIPES	<i>Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
PLC	Phospholipase C
PLIC1	<i>protein linking IAP to the cytoskeleton 1</i>
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zinc finger</i>
PMCA	Plasmamembran $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase
PO	Poly-L-Ornithin
polyQ	Polyglutamin
PSCs	pluripotente Stammzellen
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RA	Retinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RyR	Ryanodinerezeptor
SAG	<i>smoothend agonist</i>
SBMA	spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy
SCA	<i>Spinocerebellar ataxia</i> , Spinozerebelläre Ataxie
SDM	<i>short differentiation medium</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SERCA	sarco/endoplasmatische Reticulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SMA	spinale Muskelatrophie (Krankheit) ; <i>smooth muscle actin</i> (Protein)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOX2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
SSEA	<i>stage-specific embryonic antigen</i>
STR	<i>single tandem repeat</i>
StZG	Stammzellgesetz
KOSR	<i>Knockout Serum Replacement</i>
TAF4	<i>TBP-associated factor 4</i>
TALEN	<i>transcription activator-like effector nucleases</i>
TBP	<i>TATA box-binding protein</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TERT	Telomerase
TG	Thapsigargin
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TJP1	<i>tight junction protein 1</i>
TLDA	<i>TaqMan Low Density Array</i>
TRA	<i>tumor related antigen</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
U	Unit
UIM	<i>ubiquitin interacting motif</i> , Ubiquitin interagierendes Motiv
ULK	<i>Unc51-like kinase</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>

---

UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
ÜN	Übernacht
v	Volumen
V	Volt
VCP	<i>AAA-ATPase valosin-containing protein</i>
w	Gewicht
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO-1	<i>zona occludens 1</i>

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 DIE MACHADO-JOSEPH ERKRANKUNG ODER SPINOZEREPELLÄRE ATAXIE TYP 3</b>	<b>1</b>
1.1.1 KLINISCHE MANIFESTATION UND NEUROPATHOLOGIE VON MJD	1
1.1.2 PRÄVALENZ UND GENETISCHE URSACHE VON MJD	3
1.1.3 PHYSIOLOGISCHE UND ZELLULÄRE FUNKTION VON ATAXIN-3	6
1.1.4 MOLEKULARE DYSFUNKTIONEN ALS URSACHE FÜR MJD	11
1.1.5 PROTEOLYSE VON ATAXIN-3 UND DIE TOXIC FRAGMENT-THEORIE	14
<b>1.2 PLURIPOTENTE STAMMZELLEN ALS PLATTFORM ZUR MODELLIERUNG VON MJD</b>	<b>15</b>
1.2.1 HUMANE EMBRYONALE STAMMZELLEN	16
1.2.2 INDUZIERTER PLURIPOTENTER STAMMZELLEN	19
1.2.3 HUMANE NEURALE STAMMZELLEN	20
<b>1.3 CA<sup>2+</sup>-MODULIERENDE SIGNALE IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM</b>	<b>21</b>
1.3.1 GLUTAMATERGE SIGNALE IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM	21
1.3.2 PURINERGE SIGNALE IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM	23
<b>1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>26</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
<b>2.1 GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN, ZELLINIEN, CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE WERKSTOFFE</b>	<b>28</b>
2.1.1 GERÄTE	28
2.1.2 SOFTWARE	29
2.1.3 PLASTIKWARE	29
2.1.4 CHEMIKALIEN, ALLGEMEIN	30
2.1.5 INHIBITOREN	32
2.1.6 ENZYME	32
2.1.7 KITS	32
2.1.8 ANTIKÖRPER	33
2.1.9 PLASMIDE	33
2.1.10 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE	34
2.1.11 BAKTERIENSTÄMME	34
2.1.12 BEZOGENE MURINE UND HUMANE ZELLINIEN	35
2.1.13 PARENTALE FIBROBLASTENLINIEN UND IPS-ZELLINIEN	35
2.1.14 LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR	35
2.1.15 LÖSUNGEN FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ	36
2.1.16 BAKTERIENNÄHRMEDIEN	37
2.1.17 PUFFER UND LÖSUNGEN ZUR ARBEIT MIT NUKLEINSÄUREN	37
2.1.18 PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR DIE PROTEINBIOCHEMIE	38
2.1.19 ZELLKULTURMEDIEN	38
<b>2.2 METHODEN</b>	<b>41</b>
2.2.1 METHODEN ZUR ARBEIT MIT NUKLEINSÄUREN	41
2.2.1.1 Generierung von Transformations-kompetenten <i>E.Coli</i>	41
2.2.1.2 Transformation von kompetenten <i>E.Coli</i> (nach Inoue <i>et al.</i> , 1990)	41
2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	41
2.2.1.4 Präparation von genomischer DNS aus Gewebekulturen	42
2.2.1.5 Präparation von RNA	42
2.2.1.6 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	42
2.2.1.7 Synthese von komplementärer DNS (complementary DNA, cDNA)	42
2.2.1.8 Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	42
2.2.1.9 Elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel	43
2.2.1.10 Quantitative Echtzeit-PCR ( <i>quantitative real-time PCR</i> , qRT-PCR)	44

2.2.1.11	Quantitative Expressionsanalyse mittels TLDA-Array	44
2.2.2	PROTEINBIOCHEMIE	44
2.2.2.1	Präparation von Proteinlysaten und Fraktionierung nach Löslichkeit	44
2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Smith <i>et al.</i> , 1985)	45
2.2.2.3	Herstellung von SDS-Gelen	45
2.2.2.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.2.2.5	Immunblot ( <i>wet</i> ) (nach Towbin <i>et al.</i> , 1979)	46
2.2.3	ZELLKULTUR	47
2.2.3.1	Beschichtungen	47
2.2.3.2	Inkulturnahme von adulten humanen Fibroblasten	48
2.2.3.3	Kultivierung von adulten humanen Fibroblasten, PlatA- und Phoenix-GP-Zellen	48
2.2.3.4	Einfrieren und Auftauen von Fibroblasten, Plat-A- und Phoenix-GP-Zellen	49
2.2.3.5	Zählen von Zellen	49
2.2.3.6	Retrovirusproduktion in Phoenix-GP-Zellen	50
2.2.3.7	Retrovirusproduktion in Plat-A-Zellen	50
2.2.3.8	Infektion der zu reprogrammierenden Fibroblasten	51
2.2.3.9	Induktion der Pluripotenz und Isolation primärer iPS-Zellkolonien	51
2.2.3.10	Aussaat von mitotisch inaktivierten MEF-Zellen (Feedern)	52
2.2.3.11	Kultivierung humaner pluripotenter Stammzellen (Thomson <i>et al.</i> , 1998)	52
2.2.3.12	Einfrieren und Auftauen humaner pluripotenter Stammzellen	52
2.2.3.13	Spontane <i>in vitro</i> -Differenzierung von iPS-Zellen	53
2.2.3.14	Teratom-Assay: <i>in vivo</i> -Differenzierung der iPS-Zellen	53
2.2.3.15	Modifiziertes Protokoll zur Generierung von It-NES-Zellen	53
2.2.3.16	Kultivierung von It-NES-Zellen	54
2.2.3.17	Einfrieren und Auftauen von It-NES-Zellen	54
2.2.3.18	Neuronale Langzeitkulturen von It-NES-Zellen	55
2.2.3.19	Glutamatstimulation von neuronalen Langzeitkulturen	55
2.2.3.20	Induktion neuronaler Kurzzeitkulturen aus It-NES-Zellen	55
2.2.3.21	Stimulation neuronaler Kurzzeitkulturen mit ATP, Coffein und DBHQ	56
2.2.3.22	Modulation der Medienbedingungen neuronaler Kurzzeitkulturen	56
2.2.3.23	Gliale Differenzierung von It-NES-Zellen (Hucke <i>et al.</i> , 2012; Serio <i>et al.</i> , 2013)	56
2.2.3.24	Stimulation von Fibroblasten, iPS- und glialen Zellen	57
2.2.4	IMMUNZYTOCHEMIE UND IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	57
2.2.4.1	Fixieren von Zellen	57
2.2.4.2	Enzymatischer Nachweis von alkalischer Phosphatase	57
2.2.4.3	Immunfluoreszenz	57
2.2.5	SPEKTROFLUOMETRISCHE $Ca^{2+}$ -MESSUNG	58
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>VALIDIERUNG DER INDUZIERTEN PLURIPOTENTEN STAMMZELLINIEN</b>	<b>59</b>
3.1.1	DIE GENERIERTEN IPS-ZELLINIEN EXPRIEMIEREN MARKERPROTEINE CHARAKTERISTISCH FÜR HUMANE, PLURIPOTENTE STAMMZELLEN	59
3.1.2	DIE RETROVIRALEN TRANSGENE SIND IN DEN GENERIERTEN IPS-ZELLINIEN INAKTIVIERT	61
3.1.3	DIE GENERIERTEN IPS-ZELLINIEN BESITZEN EINEN INTAKTEN KARYOTYP NACH <i>SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP)</i> -ARRAY	62
3.1.4	UNGERICHTETE <i>IN VITRO</i> -DIFFERENZIERUNG GENERIERT ZELLTYPEN ALLER DREI KEIMBLÄTTER	64
3.1.5	DIE GENERIERTEN IPS-ZELLINIEN BILDEN TERATOME IN IMMUNDEFIZIENTEN MÄUSEN	66

<b>3.2</b>	<b>NEURALE DIFFERENZIERUNG</b>	<b>67</b>
3.2.1	ETABLIERUNG UND VALIDIERUNG EINES OPTIMierten LT-NES-ZELGENERIERUNGSPROTOKOLLS	68
3.2.2	DIE AUS IPS-ZELLEN ABGELEITETEN LT-NES-ZELLINIEN EXPRIEMEN CHARAKTERISTISCHE NEURALE STAMMZELLMARKER	73
3.2.3	DIE LÄNGE DES POLYGLUTAMINKODIERENDEN BEREICHS IN IPS- UND LT-NES-ZELLEN IST STABIL	75
3.2.4	EXPRESSION VON EXPANDIERTEM ATAXIN-3 IN LT-NES-ZELL ABGELEITETEN NEURONALEN LANGZEITKULTUREN	76
<b>3.3</b>	<b>STIMULATION DER AGGREGATION VON MUTIERTEM ATAXIN-3 IN NEURONALEN KULTUREN VON MJD-PATIENTEN</b>	<b>78</b>
3.3.1	GLUTAMAT INDUZIERT MIKROAGGREGATION VON ATAXIN-3 IN NEURONALEN MJD-LANGZEITKULTUREN	78
3.3.2	NEURONALE KURZZEITKULTUREN EXPRIEMEN FUNKTIONELLE PURINERGE REZEPTOREN	82
3.3.3	ATP INDUZIERT MIKROAGGREGATE VON ATAXIN-3 IN UNREIFEN NEURONALEN ZELLEN VON MJD-PATIENTEN	84
3.3.4	ATP INDUZIERT MIKROSKOPISCH SICHTBARE ATAXIN-3-POSITIVE MAKROAGGREGATE IN JUNGEN MJD-NEURONEN	85
3.3.5	DIE ATP-INDUZIERTE MAKROAGGREGATION VON ATAXIN-3 IST SPEZIFISCH FÜR MJD-NEURONE	86
3.3.6	CHARAKTERISIERUNG DER ATP-INDUZIERTEN ATAXIN-3-POSITIVEN MAKROAGGREGATE	87
3.3.6.1	Ataxin-3-positive Makroaggregate sind im Nukleus lokalisiert	88
3.3.6.2	Co-Lokalisation von Ubiquitin mit Ataxin-3-positiven NIIs	89
3.3.7	COFFEIN-STIMULATION INDUZIERT ATAXIN-3-POSITIVE NIIS	89
3.3.8	REVERSIBLE SERCA-INHIBITION INDUZIERT ATAXIN-3-POSITIVE NIIS IN JUNGEN MJD-NEURONEN	91
3.3.9	INDUZIERTE INTRAZELLULÄRE $Ca^{2+}$ -FREISETZUNG FÜHRT NICHT ZU ATAXIN-3-POSITIVEN NIIS IN NICHT-NEURONALEN ZELLEN	93
<b>3.4</b>	<b>AUTOPHAGIE ALS EIN ZENTRALER MODULATOR DER ATAXIN-3-AGGREGATION IN JUNGEN MJD-NEURONEN</b>	<b>95</b>
3.4.1	PHARMAKOLOGISCHE AUTOPHAGIEINHIBITION INDUZIERT ATAXIN-3- POSITIVE NIIS IN JUNGEN MJD-NEURONEN	95
3.4.2	MODULATION VON AUTOPHAGIE-REGULIERENDEN SIGNALWEGEN INDUZIERT ATAXIN-3-POSITIVE NIIS	97
3.4.3	AUTOPHAGIEMODULATION INDUZIERT ATAXIN-3-POSITIVE NIIS SPEZIFISCH IN JUNGEN MJD-NEURONEN	101
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>103</b>
<b>4.1</b>	<b>GENERIERUNG UND VALIDIERUNG VON IPS-ZELLEN UND VERWANDTER KONTROLLEN</b>	<b>103</b>
<b>4.2</b>	<b>LT-NES-ZELLEN ALS UNLIMITIERTE RESSOURCE ZUR GENERIERUNG VON MJD-NEURONEN</b>	<b>106</b>
<b>4.3</b>	<b>EXZITATION UND INTRAZELLULÄRE <math>Ca^{2+}</math>-FREISETZUNG INDUZIEREN ATAXIN-3-AGGREGATION IN MJD-NEURONEN</b>	<b>108</b>
4.3.1	ERREGUNGSVERMITTELTE AGGREGATION VON EXPANDIERTEM ATAXIN-3 IN NEURONALEN MJD-LANGEZEITKULTUREN	108
4.3.2	$Ca^{2+}$ -FREISETZUNG AUS DEM ER INDUZIERT ATAXIN-3-POSITIVE MIKROAGGREGATE SOWIE INKLUSIONEN IN JUNGEN MJD-NEURONEN	111
<b>4.4</b>	<b>MODULATION DER AUTOPHAGIE INDUZIERT ATAXIN-3-POSITIVE NIIS IN JUNGEN MJD-NEURONEN</b>	<b>116</b>

---

<b>4.5</b>	<b>Ca<sup>2+</sup>-VERMITTELTE CALPAINAKTIVITÄT UND AUTOPHAGIE</b>	<b>120</b>
<b>4.6</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>124</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>126</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>128</b>
<b>7.</b>	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN</b>	<b>153</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>154</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Machado-Joseph Erkrankung oder Spinozerebelläre Ataxie Typ 3

Die Machado-Joseph Erkrankung (Machado-Joseph disease, MJD), auch als Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (Spinocerebellar ataxia type 3, SCA3) bezeichnet, ist eine autosomal-dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung. Obwohl die offizielle Bezeichnung der Human Genome Organization (HUGO) für die Erkrankung MJD lautet, werden in der Literatur aus historischen Gründen häufig die Termini SCA3 oder MJD/SCA3 gleichermaßen verwendet.

MJD wurde zuerst in vier nordamerikanischen Familien, die von den Azoren immigriert waren, als vier unterschiedliche Erkrankungen beschrieben. Aus den Bezeichnungen „*Machado disease*“ (Nakano *et al.*, 1972), „*nigro-spino-dentatal-degeneration with nuclear ophthalmoplegia*“ (Woods und Schaumburg, 1972), „*Joseph disease*“ (Rosenberg *et al.*, 1992) und „*Azorean disease of the nervous system*“ (Romanul *et al.*, 1977), wurde nach eingehender Untersuchung der vier Familien und weiteren Fällen mit ebenfalls divergierenden Bezeichnungen - wie „*Autosomal dominant striatonigral degeneration*“ (Rosenberg *et al.*, 1976) und „*Autosomal dominant system degeneration*“ (Coutinho und Andrade, 1978) - schließlich aufgrund der Hypothese, dass diese Erkrankungen dieselbe Störung mit einer ungewöhnlich hohen Variabilität in der klinischen Manifestation darstellen, die Bezeichnung „*Machado-Joseph disease*“ vorgeschlagen (Coutinho und Andrade, 1978). Die Bezeichnung Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 wurde bei der Suche nach der genetischen Ursache für eine autosomal-dominant vererbte spinozerebelläre Ataxie in deutschen und französischen Familien, die nicht auf die bekannten SCA-Loci für Typ 1 und Typ 2 zurückzuführen war, gewählt (Gispert *et al.*, 1993). Wegen ihrer unterschiedlichen, klinischen Präsentation wurde sie zuerst nicht mit MJD assoziiert, später allerdings als genetisch identisch mit MJD identifiziert (Durr *et al.*, 1996; Haberhausen *et al.*, 1995; Matilla *et al.*, 1995).

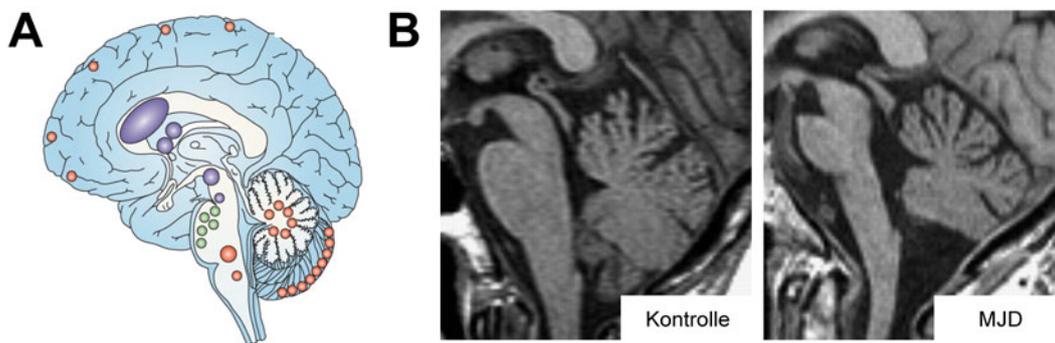
### 1.1.1 Klinische Manifestation und Neuropathologie von MJD

Wie die diversen, historischen Bezeichnungen für MJD schon indizieren, ist die klinische Präsentation von MJD von einem hohen Grad an Pleomorphismus gekennzeichnet. Diese klinische Heterogenität tritt dabei auch zwischen Patienten derselben Familie auf. Das

Hauptmerkmal und in der Mehrzahl der Fälle das erste Symptom von MJD ist eine progressiv verlaufende Ataxie (Beeinträchtigung der Bewegungskoordination, z.B. Stelzgang), die auf eine Dysfunktion des *Cerebellums* und des *Truncus cerebri* zurückzuführen ist (Sequeiros und Coutinho, 1993). Diese Ataxie ist allerdings nie das einzige neurologische Symptom. Eine Vielzahl an weiteren klinischen Auffälligkeiten spiegelt die progressive Dysfunktion weiterer Teile des zentralen Nervensystems (ZNS) wie dem okulomotorischen, dem pyramidalen und extrapyramidalen System, den ventralen Motoneuronen und dem peripheren Nervensystem wider. Typischerweise liegt die Manifestation der ersten Symptome zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr mit einem Durchschnitt um das 40. Lebensjahr (Sequeiros und Coutinho, 1993). Der früheste bekannte Zeitpunkt wurde mit vier, der älteste mit 70 Jahren beschrieben (Carvalho *et al.*, 2008; Sequeiros und Coutinho, 1993). Die Manifestation in den mittleren Lebensdekaden zeigt sich in einer fortschreitenden Ataxie, die von Gleichgewichtsstörungen und Sprachschwierigkeiten begleitet wird. Im weiteren Krankheitsverlauf tritt eine Vielzahl an visuellen und okulomotorischen Beeinträchtigungen auf, die u.a. Nystagmus (Augenzittern), Ophthalmoplegie (Augenmuskellähmung), sakkadische Intrusionen (Fixationsstörungen) und diskonjugierte Augenbewegung beinhalten. In fortgeschrittenen Stadien der Krankheit können die Patienten auf Rollstühle angewiesen sein und leiden unter schwerer Dysphagie (Schluckstörung) und Dysarthrie (Sprachstörung). Weitere Symptome sind Amyotrophie (Muskelschwund), Spastik, Intentionstremor (Zittern bei zielgerichteter Bewegung), Dystonie (Verkrampfungen), Restless-Legs-Syndrom, Schlafstörungen und Rigor (Muskelstarre) (Cancel *et al.*, 1995; Durr *et al.*, 1996; Friedman, 2002; Friedman *et al.*, 2003; Iranzo *et al.*, 2003; Lin und Soong, 2002; Matsumura *et al.*, 1996a; Rüb *et al.*, 2002a,b; Rüb *et al.*, 2003; Rüb *et al.*, 2004a,b; Sasaki *et al.*, 1995; Schöls *et al.*, 1996; Sequeiros und Coutinho, 1993; Soong *et al.*, 1997; Takiyama *et al.*, 1994; Van Alfen *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1997). Trotz der ausgeprägten Neurodegeneration ist Demenz kein typisches Symptom in MJD, selbst in weit fortgeschrittenen Stadien, auch wenn Anhaltspunkte für subkortikale Dysfunktion und milde kognitive Beeinträchtigungen existieren (Burk *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2004; Maruff *et al.*, 1996; Zawacki *et al.*, 2002). Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Einsetzen der Krankheit beträgt 20 bis 25 Jahre, mit einer gemessenen niedrigsten von sieben und einer höchsten von 29 Jahren (Kieling *et al.*, 2007; Klockgether *et al.*, 1998).

Entgegen der Klassifizierung von MJD als spinozerebelläre Ataxie zeigten **M**agnetresonanz**t**omographie (MRT) und neuropathologische Studien, dass die Neurodegeneration über das *Cerebellum* und den *Truncus cerebri* hinausgeht. Eine Depigmentierung der *Substantia nigra* sowie neuronaler Verlust im *Striatum*, *Thalamus*, *Nuclei pontis*, *Medulla spinalis* und den Hirnnerven III. bis XII. (einschließlich des *Locus*

*coeruleus* und den *Nuclei vestibulari*) wurde beschrieben. Weiterhin sind visuelle, auditive, vestibulare, somatosensorische und vegetative Systeme betroffen. Im Gegensatz dazu bleiben die *Cortices cerebri* und *cerebelli*, der *Nucleus olivaris inferior* und die Purkinjezellen weitgehend erhalten (Abb. 1.1, A) (Alves *et al.*, 2008; Coutinho und Andrade, 1978; Durr *et al.*, 1996; Evert *et al.*, 2000; Kanda *et al.*, 1989; Iwabuchi *et al.*, 1999; Lin und Soong, 2002; Rosenberg, 1992; Rüb *et al.*, 2008; Sudarsky und Coutinho, 1995). Im MRT konnte eine Atrophie der *Pons*, der zerebellären *Vermis* und der Hemisphären, der Basalganglien (*Globus pallidus*, *Nucleus caudatus* und des *Putamens*), des *Mesencephalons* und der *Medulla oblongata* beobachtet werden (Abb. 1.1, B) (Etchebehere *et al.*, 2001; Klockgether *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 1998; Taniwaki *et al.*, 1997; Yoshizawa *et al.*, 2003).



**Abb. 1.1: Von der Neurodegeneration betroffene Hirnareale in MJD**

Sagittale MRT-Aufnahme des *Mesencephalons*, der *Pons*, des *Cerebellums* und der *Medulla oblongata* eines MJD-Patienten und eines Kontroll-Patienten ohne neurologische Erkrankungen (A). Schematische Darstellung der von Neurodegeneration betroffenen Regionen in MJD (B). Die Punkte zeigen neuronalen Verlust an, blau kennzeichnet extrapyramidale Nuclei und grün betroffene Hirnnerven. (Abb. verändert nach Eichler *et al.*, 2011 und Taroni und DiDonato, 2004)

Der neuronale Verlust und die Atrophie resultieren in einer signifikant verringerten Hirnmasse von MJD-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung im Vergleich zu Individuen ohne neurologische oder psychiatrische Erkrankungen (Iwabuchi *et al.*, 1999). Weitere Merkmale der betroffenen Regionen sind Astrogliose sowie eine Aktivierung von Mikroglia (Evert *et al.*, 2000; Hoche *et al.*, 2008; Paulson *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1998; Rüb *et al.*, 2008).

### 1.1.2 Prävalenz und genetische Ursache von MJD

Die kalkulierte, generelle Prävalenz von spinocerebellären Ataxien variiert von 0,3 bis 2 von 100.000 (van de Warrenburg *et al.*, 2002), wobei MJD die am häufigsten vorkommende Form darstellt (Ranum *et al.*, 1995; Riess *et al.*, 2008; Schöls *et al.*, 2004). Die Häufigkeit variiert dabei stark je nach ethnischen Hintergrund. Der relative Anteil an spinocerebellären Ataxien ist höher in Ländern wie Brasilien (69-92%) (Jardim *et al.*, 2001; Teive *et al.*, 2008), Portugal (74%) (Silveira *et al.*, 1998), Singapur (53%) (Zhao *et al.*, 2002), China (48-49%) (Jiang *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2000), den Niederlanden (44%) (van de

Warrenburg *et al.*, 2002), Deutschland (42%) (Schöls *et al.*, 1997) und Japan (28-63%) (Maruyama *et al.*, 2002; Shibata-Hamaguchi *et al.*, 2009). Weniger hoch ist der Anteil in Kanada (24%) (Kraft *et al.*, 2005), den USA (21%) (Moseley *et al.*, 1998), Mexiko (12%) (Alonso *et al.*, 2007), Australien (12%) (Storey *et al.*, 2000) und Indien (5-14%) (Krishna *et al.*, 2007; Saleem *et al.*, 2000). Relativ gering ist hingegen der Anteil in Südafrika (4%) (Bryer *et al.*, 2003) und Italien (1%) (Brusco *et al.*, 2004).

Im Jahre 1993 wurde der mit MJD assoziierte Gen-Lokus auf dem langen Arm des Chromosoms 14 q24.3–q32.2 lokalisiert (Takiyama *et al.*, 1993). Ein Jahr später konnte gezeigt werden, dass das für MJD verantwortliche Gen bei 14q32.1 lokalisiert und eine Expansion des Basentriplets CAG, welches für die Aminosäure Glutamin kodiert, die Ursache bei allen von MJD betroffenen Individuen einer Familie darstellt (Kawaguchi *et al.*, 1994). Das als Ataxin-3 (*ATXN3*) bezeichnete Gen umfasst eine Region von 48 kb und besteht aus elf Exons mit dem CAG-Bereich in Exon 10. (Ichikawa *et al.*, 2001). Vier verschiedene Transkripte, die ubiquitär im Nervensystem und nicht-neuronalen Geweben exprimiert sind, konnten nachgewiesen werden (Ichikawa *et al.*, 2001; Schmitt *et al.*, 1997; Trottier *et al.*, 1998). Diese verschiedenen Transkripte entstehen vermutlich durch alternatives Spleißen der Exone 2, 10 und 11 in Kombination mit unterschiedlichen Polyadenylierungssignalen (Goto *et al.*, 1997; Ichikawa *et al.*, 2001; Kawaguchi *et al.*, 1994). Die Expression einer der Ataxin-3-Isoformen konnte durch einen spezifischen Antikörper in den betroffenen Arealen belegt werden (Schmidt *et al.*, 1998). MJD und das verursachende Proteinprodukt Ataxin-3 konnten somit der Klasse der Polyglutaminerkrankungen, bei denen eine expandierte CAG-Wiederholung in einem verlängerten Polyglutaminbereich resultiert, zugeordnet werden.

Zu den Polyglutaminerkrankungen gehören neben MJD die spinocerebellären Ataxien Typ 1, 2, 6, 7 und 17, die spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy (SBMA), Chorea Huntington (Huntington's disease, HD), Dentatorubro-Palliduysische Atrophie (DRPLA) und Huntington's disease like 2 (HDL2) (Gatchel und Zoghbi, 2005; Shao und Diamond, 2007; Zoghbi und Orr, 2000). Alle Polyglutaminerkrankungen sind in ihrem Erbgang autosomal-dominant mit Ausnahme der SBMA, die X-chromosomal-rezessiv vererbt wird. Der neuronale Verlust ist jeweils selektiv, begleitet von physischen und psychologischen Symptomen, die eine gewisse Variabilität, allerdings auch gemeinsame Charakteristika aufweisen (Gatchel und Zoghbi, 2005). Die mutierten Proteine hingegen besitzen außerhalb des Polyglutaminbereiches keine Homologie und zeigen keinerlei strukturelle oder funktionale Relation zueinander (Gatchel und Zoghbi, 2005). Die neuronale Toxizität des expandierten Polyglutaminbereiches konnte durch zwei Mausmodelle bestätigt werden, bei denen die Expression eines Polyglutaminpeptides mit 79 Wiederholungen bzw. Insertion eines expandierten Polyglutaminbereiches in ein nicht-pathogenes Protein zu

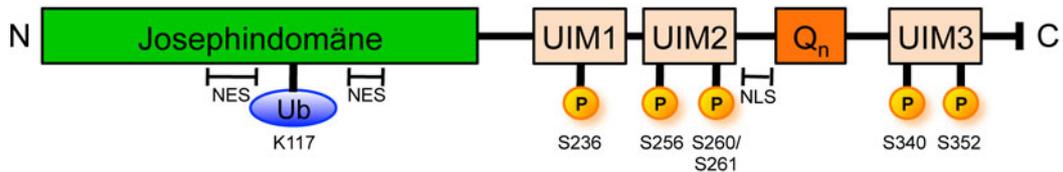
neurodegenerativen Phänotypen führte (Ikeda *et al.*, 1996; Ordway *et al.*, 1997).

Der expandierte Polyglutaminbereich in Ataxin-3 ist eine nahezu homogene Wiederholung von Glutaminen, die lediglich einmal durch für Lysin kodierenden AAG-Codons am 5'-Ende des Bereiches in *ATXN3* 5'- (CAG)<sub>2</sub> CAA AAG (CAG)<sub>n</sub> -3' unterbrochen wird (Kawaguchi *et al.*, 1994). Bei gesunden Individuen variiert die Wiederholung des CAG-Trinukleotids von 10 bis 44, wohingegen MJD-Patienten 55 bis 87 Wiederholungen aufweisen (Cummings und Zoghbi, 2000; Lima *et al.*, 2005; Maciel *et al.*, 2001). Über 90% der nicht-expandierten Allele besitzen weniger als 31 CAG-Wiederholungen (Rubinsztein *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1995; Gaspar *et al.*, 2001). Wiederholungen mit 45 bis 54 CAGs zeigen eine verringerte Penetranz und unterschiedliche, nicht-klassische, aber mit MJD assoziierte Phänotypen wie Restless-Legs-Syndrom und autonome Neuropathie oder Polyneuropathie (Gu *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2001; Padiath *et al.*, 2005; Paulson, 2007; Takiyama *et al.*, 1997; van Alfen *et al.*, 2001; van Schaik *et al.*, 1997). Homozygote MJD-Patienten sind extrem selten, leiden allerdings an einer schwereren und juvenilen Manifestation, die auf einen Gendosiseffekt schließen lässt (Carvalho *et al.*, 2008; Fukutake *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 1994; Lerer *et al.*, 1996; Sobue *et al.*, 1996; Takiyama *et al.*, 1995). Eine höhere Frequenz von expandierten, aber nicht-pathologischen Allelen in der japanischen Bevölkerung könnte mit der hohen Prävalenz in dieser Population assoziiert sein. Diese Allele könnten den Ausgangspunkt neuer, pathologischer Expansionen darstellen (Takano *et al.*, 1998), wohingegen in den meisten Ländern selten eine pathologische Expansion ohne familiäre Historie festgestellt werden kann (Moseley *et al.*, 1998; Schöls *et al.*, 1995). Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass die mit 72% weltweit häufigste mit MJD-assoziierte single nucleotide polymorphism (SNP)-Kombination A-C-A der drei intragenischen SNPs A<sup>669</sup>TG/G<sup>669</sup>TG, C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG und TAA<sup>1118</sup>/TAC<sup>1118</sup> in der single tandem repeat (STR)-Analyse ihre höchste Diversität in Japan erreicht und auf einen asiatischen Gründereffekt vor 5.774 ± 1,116 Jahren und eine spätere Einführung in Europa, den USA und Kanada hindeutet (Gaspar *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007). Zusammen mit einem zweiten Gründereffekt, wahrscheinlich auf den Azoren/Portugal vor 1.416 ± 434 Jahren, assoziiert mit der SNP-Kombination G-G-C, machen die zwei Haplotypen A-C-A und G-G-C zusammen 94% aller MJD-Familien weltweit aus (Gaspar *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2007). Spezifische SNPs in der Nähe des CAG-Bereiches können *cis*- und *trans*-Effekte auf die Instabilität der CAG-Wiederholungslänge ausüben (Igarashi *et al.*, 1996; Maciel *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2008; Matsumura *et al.*, 1996b). Diese Effekte sind mit einer intergenerationalen Instabilität der CAG-Wiederholungslänge verbunden, die bei über der Hälfte der Eltern-Kind-Transmissionen instabil ist und bei 75% eine weitere Expansion des CAG-Bereiches in der nächsten Generation aufweist. Dabei ist die paternale Transmission leicht instabiler als die maternale (Igarashi *et al.*, 1996; Maciel *et al.*, 1995;

Maruyama *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1995). Als Mechanismus für die Instabilität und Expansion der CAG-Wiederholungen wird eine Ausbildung von DNS-Sekundärstrukturen während der Meiose oder ein Verrutschen der DNS-Polymerase während der Replikation (*gene slippage*) diskutiert (Martins *et al.*, 2006; Sinden, 1999). Nicht-expandede Allele besitzen hingegen nicht diese Instabilität (Bettencourt *et al.*, 2008). Dies ist insofern relevant, als dass die Länge des CAG-Bereiches, wie auch bei anderen Polyglutaminerkrankungen, invers mit dem Zeitpunkt der klinischen Manifestation und direkt mit der Schwere der Erkrankung und der Symptome korreliert (Durr *et al.*, 1996; Jardim *et al.*, 2001; Maciel *et al.*, 1995; Maruyama *et al.*, 1995; Matilla *et al.*, 1995; Schöls *et al.*, 1996). In Kombination mit der intergenerationalen Instabilität führt diese Korrelation wahrscheinlich zu dem als Antizipation bezeichneten Phänomen in einigen MJD-Familien, bei dem beim betroffenen Nachwuchs eine frühere klinische Manifestation mit schwereren Symptomen als in der parentalen Generation zu beobachten ist (Bettencourt *et al.*, 2007; Coutinho und Sequeiros, 1981; Durr *et al.*, 1996; Sequeiros und Coutinho, 1993; Takiyama *et al.*, 1995). Unterschiedliche Längen der CAG-Expansion können ebenfalls in verschiedenen Zellen desselben Individuums auftreten, was als somatisches Mosaik bezeichnet wird (Hashida *et al.*, 1997; Lopez-Cendes *et al.*, 1997; Maciel *et al.*, 1997). Längere Wiederholungen sind dabei nicht bevorzugt mit betroffenen Hirnarealen assoziiert, sodass dies keine Erklärung für die selektive Neurodegeneration bietet.

### 1.1.3 Physiologische und zelluläre Funktion von Ataxin-3

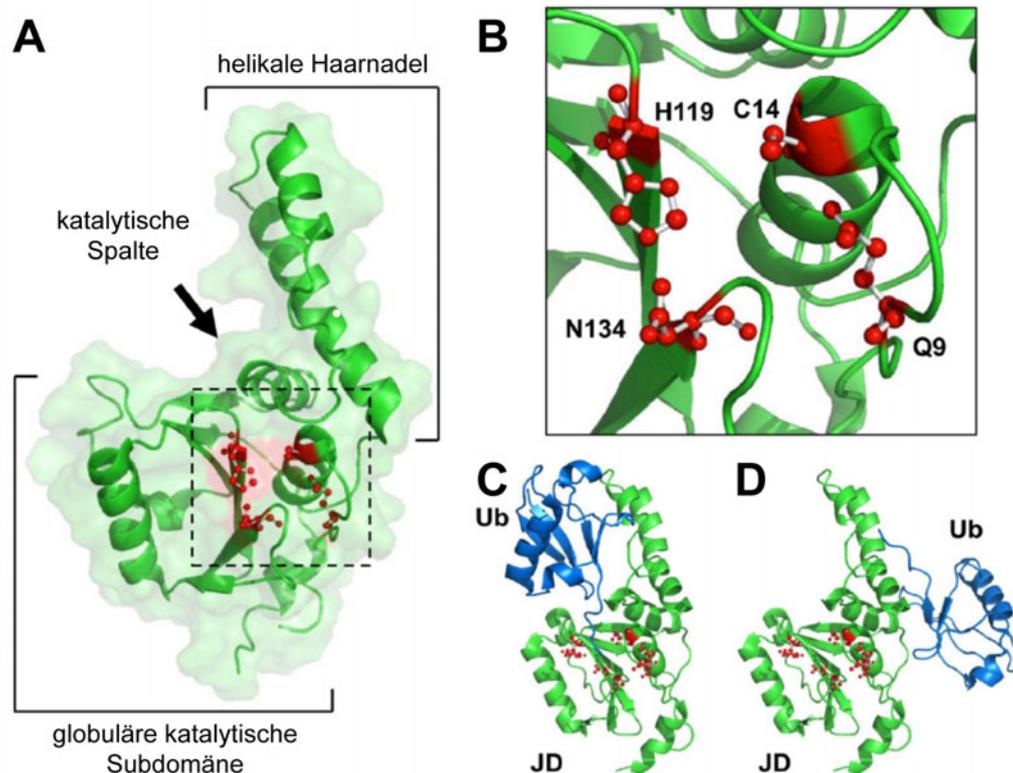
Ataxin-3 hat ein Molekulargewicht von ungefähr 42 kDa, abhängig von der Größe des polymorphen Polyglutaminbereiches, und ist ein evolutionär konserviertes Protein mit Orthologen in Eukaryoten von Protozoen über Pflanzen und Pilze bis zu tierischen Organismen wie Nematoden, Arthropoden und Vertebraten (Costa *et al.*, 2004; Linhartova *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 1997). Die Expression von Ataxin-3 ist dabei ubiquitär in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben in vielen verschiedenen Zelltypen zu finden, auch wenn sie in ihrer Expressionsstärke variiert (Costa *et al.*, 2004; Ichikawa *et al.*, 2001; Paulson *et al.*, 1997a; Schmidt *et al.*, 1998; Trottier *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997). Strukturell besteht humanes Ataxin-3 aus einer globulären, N-terminalen Domäne von 182 Aminosäuren, der sogenannten Josephin-Domäne, benannt nach ihrer Homologie zu den Proteinen Josephin 1 und 2, und einem flexiblen, unstrukturierten C-Terminus, der den Polyglutaminbereich und je nach Isoform zwei oder drei mit Ubiquitin interagierende Motive (***ubiquitin interacting motifs***, UIM) enthält (Abb. 1.2) (Gales *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 1997; Masino *et al.*, 2003). Die am besten studierten Isoformen bestehen aus dem Protein der vollen Länge und unterscheiden sich nur durch die Sequenz ihres C-Terminus und werden



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der 3UIM-Isoform von Ataxin-3**

Ataxin-3 besteht aus der N-terminalen Josephindomäne mit De-Ubiquitinase-(DUB)-Aktivität und einem flexiblen C-Terminus mit zwei oder drei UIMs je nach Isoform und einem Polyglutaminbereich ( $Q_n$ ) variabler Länge. Fünf Serinreste, lokalisiert in den UIMs, wurden als Phosphorylierungs- (S236, S256, S260/S261, S340, S352, P) und ein Lysin in der Josephindomäne als Ubiquitinierungsstelle (K117, Ub) identifiziert. Ein funktionelles nuclear localization signal (NLS) verbindet das zweite UIM mit dem Polyglutaminbereich und zwei nuclear export signals (NES) sind in der Josephindomäne lokalisiert (Schema nach Matos *et al.*, 2011).

aufgrund ihrer Anzahl an UIMs auch als 2UIM- bzw. 3UIM-Isoform bezeichnet (Goto *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1998). Die durch eine integrative, bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz von Ataxin-3 vorausgesagte Ubiquitinproteaseaktivität, also die Fähigkeit zwischen Ubiquitinmonomeren zu schneiden (Scheel *et al.*, 2003), konnte durch biochemische Experimente mit Modells substraten und Ubiquitinproteaseinhibitoren bestätigt werden (Burnett *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2005; Nicastro *et al.*, 2005; Weeks *et al.* 2011). Zusammen mit anderen die Josephindomäne enthaltenden Proteinen konnte Ataxin-3 damit der Klasse der deubiquitinierenden Enzyme (DUB) zugeordnet werden (Burnett *et al.*, 2003; Scheel *et al.*, 2003; Tzvetkov und Breuer, 2007).



**Abb. 1.3: 3D-Strukturmodell der Josephindomäne von Ataxin-3**

Die globale, katalytische Subdomäne und helikale Haarnadel der Josephindomäne mit der katalytischen Spalte (A). Vergrößerung des katalytischen Zentrums mit den essentiellen Aminosäureresten in rot (B). Die Josephindomäne kann an zwei Stellen mit Ubiquitin (Ub) interagieren: Einmal nahe der katalytischen Spalte (C) und einmal an der gegenüberliegenden Oberfläche (D). (Abb. verändert nach Matos *et al.*, 2011)

Die Josephindomäne setzt sich aus zwei Subdomänen zusammen; der globulären, katalytischen Subdomäne und einer helikalen Haarnadel (*helical hairpin*) (Abb. 1.3, A) (Mao *et al.*, 2005; Nicastro *et al.*, 2005; Nicastro *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2010). Die Ubiquitinproteaseaktivität ist in der katalytischen Subdomäne lokalisiert, die das katalytische Zentrum mit den essentiellen Aminosäuren Q9, C14, H119 und N134 enthält (Abb. 1.3, B), von denen die katalytische Triade Cystein, Histidin und Asparagin charakteristisch für Papain-ähnliche Cysteinproteasen ist (Albrecht *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2005; Nicastro *et al.*, 2006; Nicastro *et al.*, 2009). Weiterhin enthält die Josephindomäne zwei Bindestellen für Ubiquitin (Abb. 1.3, C und D). Deletion des C14 führt zu einem kompletten Verlust der Ubiquitinproteaseaktivität (Berke und Paulson, 2003; Burnett *et al.*, 2003; Chai *et al.*, 2004).

Polyubiquitinketten müssen aus mindestens vier Ubiquitinen bestehen, um von Ataxin-3 *in vitro* prozessiert zu werden, wobei eine Präferenz für an K63 gegenüber K48 verbundene Ketten besteht (Winborn *et al.*, 2008; Nicastro *et al.*, 2009). Die UIMs des C-Terminus vermitteln zusammen mit den Ubiquitinbindestellen der Josephindomäne die Affinität und Spezifität für Polyubiquitinketten, sind allerdings für die Katalyse nicht entscheidend (Burnett *et al.*, 2003; Chai *et al.*, 2004; Donaldson *et al.*, 2003; Winborn *et al.*, 2008). Die proteolytische Aktivität von Ataxin-3 *in vitro* zeigt eine sehr langsame Kinetik (Chow *et al.*, 2004; Winborn *et al.*, 2008), was darauf hindeutet, dass weitere Faktoren für eine effiziente Proteolyse benötigt werden (Chow *et al.*, 2004; Reyes-Turcu und Wilkinson, 2009). Die beiden Isoformen 2UIM und 3UIM unterscheiden sich dabei nicht in ihrer proteolytischen Aktivität (Chai *et al.*, 2004). Ataxin-3 selbst kann mono- und polyubiquitiniert werden, wobei der Großteil monoubiquitiniert vorliegt und diese Ubiquitinierung die proteolytische Aktivität von Ataxin-3 steigert (Abb. 1.2) (Berke *et al.*, 2005; Todi *et al.*, 2009). Die Ubiquitinierung von Ataxin-3 wird dabei nicht durch die eigene DUB-Aktivität reguliert, Ataxin-3 de-ubiquitiniert sich also nicht selbst (Todi *et al.*, 2007).

Ein *Knockout* des humanen Ataxin-3 Orthologs in der Maus oder *Caenorhabditis elegans* zeigte jeweils keinen offensichtlichen Phänotyp außer der Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen, was vermutlich auf funktionell redundante DUBs und adaptive Modifikationen zurückzuführen ist (Rodrigues *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2007). Diese Akkumulation und die Eigenschaft als DUB deuten auf eine Beteiligung von Ataxin-3 im **U**biquitin-**P**roteasom-**S**ystem (UPS) hin. An K48 verbundene Polyubiquitinketten von vier und mehr Monomeren vermitteln die Degradation von geschädigten Proteinen oder Proteinen mit kurzer Halbwertszeit durch das Proteasom (Burnett *et al.*, 2003; Doss-Pepe *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2005; Schmitt *et al.*, 2007; Winborn *et al.*, 2008). Durch Editieren der Polyubiquitinketten konnte Ataxin-3 *in vitro* die proteasomale Degradation des Modellproteins <sup>125</sup>I-Lysozym inhibieren (Burnett und Pittman, 2005). Die Polyubiquitinketten werden durch Ataxin-3 dabei nur verkürzt und nicht komplett degradiert, was eine weitere Modifikation der

Proteine durch Ubiquitinaddition erlaubt (Burnett *et al.*, 2003; Burnett und Pittman, 2005, Winborn *et al.*, 2008). K63 verbundene Ubiquitinketten z.B. fungieren im Gegensatz zu K48 nicht als ein Signal zur proteasomalen Degradation, sondern regulieren subzelluläre Lokalisation von Proteinen, Vesikeltransport, DNS-Reparatur und Translation (Glickman und Ciechanover, 2002; Weissman, 2001; Woelk *et al.*, 2007). Ataxin-3 interagiert mit verschiedenen E3-Ubiquitinligasen (CHIP, Parkin, E4B, Hrd1, gp78 und MITOL) und wird von diesen polyubiquitiniert (mit Ausnahme von Hrd1) und durch das Proteasom degradiert (Duncan *et al.*, 2012; Jana *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2005; Scaglione *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; Ying *et al.*, 2009). Ausgehend von den Erkenntnissen von anderen E3-Ubiquitinligasen und den mit ihnen interagierenden DUBs kann spekuliert werden, dass es eine wechselseitige Regulation zwischen Ataxin-3 und seinen Bindungspartnern gibt, bei der die E3-Ubiquitinligasen die Stabilität bzw. Degradation durch Polyubiquitinierung von Ataxin-3 regulieren und Ataxin-3 im Gegenzug die Polyubiquitinketten anderer E3-Ubiquitinligasesubstrate oder direkt den Ubiquitinierungsstatus der E3-Ubiquitinligasen selbst editiert. (Reyes-Turcu *et al.*, 2009; Todi *et al.*, 2009; Wada und Kamitani, 2006). Eine direkte Assoziation von Ataxin-3 durch seine N-terminale Region an das Proteasom konnte gezeigt werden (Doss-Pepe *et al.*, 2003), auch wenn eine weitere Studie diese Assoziation als nicht besonders stark oder nur indirekt beschrieb (Todi *et al.*, 2007).

Eine direkte Interaktion geht Ataxin-3 über ein Arginin/Lysin-Motiv (AS 277-291) im C-Terminus mit der AAA-ATPase *valosin-containing protein* bzw. ATPase p97 (VCP/p97) ein (Boeddrich *et al.*, 2006; Hirabayashi *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2004; Zhong und Pittman, 2006). Ebenso binden die *human homologs of the yeast DNA repair protein Rad23* (HHR23)A und HHR23B direkt über die Ubiquitinbindestelle 2 in der Josephindomäne an Ataxin-3 (Nicastro *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2000). Sowohl VCP/p97 als auch HHR23A und HHR23B wurden mit einer Funktion bei der Weiterleitung von polyubiquitinierten Substraten zum Proteasom im Kontext der *endoplasmic reticulum-associated degradation* (ERAD), bei der ubiquitinierte, fehlgefaltete Proteine aus dem ER in das Zytosol exportiert und vom Proteasom degradiert werden, in Verbindung gebracht (Doss-Pepe *et al.*, 2003; Elsasser *et al.*, 2004; Jarosch *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2001). Die gesammelten Evidenzen deuten darauf hin, dass Ataxin-3 in Interaktion mit VCP/p97, HHR23A, HHR23B, Ubiquilin/PLIC1 und ER-spezifischen E3-Ubiquitinligasen die Dislokation und Degradation von missgefalteten Proteinen aus dem ER reguliert, wobei widersprüchliche Daten dazu existieren, ob Ataxin-3 die Degradation fördert oder verringert (Albrecht *et al.*, 2004; Burnett *et al.*, 2003; Doss-Pepe *et al.*, 2003; Heir *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Zhong und Pittman, 2006).

Eine weitere Funktion in der Qualitätskontrolle der Zelle nimmt Ataxin-3 in der Aggresom-Bildung ein. Aggresome sind Aggregate aus missgefalteten Proteinen, die sich am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (*microtubule-organizing center*, MTOC) bilden, wenn das Proteasom mit einer von ihm nicht zu bewältigenden Masse an fehlgefalteten Proteinen konfrontiert wird, die zur Erhaltung der zellulären Homöostase von Lysosomen degradiert werden (Garcia-Mata *et al.*, 2002; Markossian und Kurganov, 2004). *Knockdown* von Ataxin-3 reduziert die Aggresom-Bildung, und Ataxin-3 mit mutierten UIMs kann diese Funktion nicht wiederherstellen (Burnett und Pittman, 2005). Ataxin-3 co-lokalisiert mit Aggresomen und präaggresomalen Partikeln und interagiert mit den an dem Transport der fehlgefalteten Proteine zum MTOC beteiligten Proteinen Dynein, Histondeazetylase 6 (HDAC6) und *protein linking IAP to the cytoskeleton 1* (PLIC1) sowie mit den Mikrotubuli selbst (Burnett und Pittman, 2005; Heir *et al.*, 2006; Mazzucchelli *et al.*, 2009). So ist Ataxin-3 maßgeblich beim Abbau mutierter SOD1 über das Aggresom beteiligt (Wang *et al.*, 2012).

Ataxin-3 prozessiert als Substrat darüber hinaus das *neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 8* (NEDD8) (Ferro *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 2005), das eine ähnliche Struktur wie Ubiquitin aufweist. Durch Konjugation von NEDD8 an Proteine, genannt Neddylierung, wird ähnlich zur Ubiquitinierung die Funktion von Proteinen reguliert (Hochstrasser, 2000; Whitby *et al.*, 1998), wodurch Ataxin-3 Einfluss auf Prozesse ausüben kann, bei denen NEDD8 involviert ist.

Ein weiterer Aspekt der Funktion von Ataxin-3 betrifft seine Beteiligung in der Regulation der Transkription als transkriptioneller Co-Repressor (Li *et al.*, 2002). Durch Interaktion über den C-terminalen Teil mit dem *TATA box-binding protein (TBP)-associated factor 4* (TAF4), dem *cAMP-response element binding (CREB)-binding protein* (CBP), p300, und dem *p300/CBP associated factor* (PCAF) inhibiert Ataxin-3 die CREB-vermittelte Transkription (Chai *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; McCampbell *et al.*, 2000; Shimohata *et al.*, 2000). Ataxin-3 reguliert zusätzlich die Histonazetylierung durch Inhibition der p300-vermittelten Histonazetylierung und Verstärkung der Histondeazetylierung durch Interaktion mit dem *nuclear receptor co-repressor 1* (NCOR1) und der *Histondeazetylase 3* (HDAC3) über die UIMs und mit Histonen über die N-terminale Domäne, wodurch Histonazetylierungsstellen blockiert werden (Evert *et al.*, 2006a; Nicastro *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002). Obwohl Ataxin-3 über ein putatives *basic leucine zipper*-Motiv im C-Terminus (AS 223-270) direkt an die DNS binden kann, vermittelt durch die Konsensussequenz GAGGAA (Landschulz *et al.*, 1988), agiert Ataxin-3 vermutlich nicht als klassischer Repressor, sondern durch Inhibition der Histonazetylierung im Verbund mit HDAC3 und NCOR1 und Stabilisierung von Repressorkomplexen durch seine DUB-Aktivität (Evert *et al.*, 2006a). Das Substrat und die genaue Funktion von Ataxin-3 im Komplex sind allerdings noch nicht abschließend untersucht. Der Einfluss von Ataxin-3 auf die Transkription konnte zusätzlich in

einem *knockout* von Ataxin-3 durch eine differentielle Expression einer Vielzahl von Genen im Vergleich zu Kontrollen gezeigt werden (Rodrigues *et al.*, 2007).

Neben der ubiquitären Expression in Geweben ist Ataxin-3 auf zellulärer Ebene ebenfalls ubiquitär, aber abhängig vom Zelltyp unterschiedlich stark in subzellulären Kompartimenten lokalisiert und konnte in Zytoplasma, Nukleus und Mitochondrien nachgewiesen werden (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009; Paulson *et al.*, 1997a; Pozzi *et al.*, 2008; Tait *et al.*, 1998; Trottier *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997). Ataxin-3 ist im Zytoplasma und Nukleus äußerst mobil, wobei die Diffusion durch den aktiven Transport über die Kernhülle in beide Richtungen limitiert wird (Antony *et al.*, 2009; Chai *et al.*, 2002; Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009). Der Transport über die Kernhülle wird zum Teil durch ein schwaches Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) C-terminal vom Polyglutaminbereich (282-RKRR-285) und zwei Kernexportsignale (nuclear export signal, NES) ohne Konsensussequenz im N-terminalen Bereich (I77-Y99 und E141-E158) reguliert (Abb. 1.2), wobei das zweite NES chromosome region maintenance 1 (CRM1)/Exportin-abhängig ist (Antony *et al.*, 2009; Boeddrich *et al.*, 2006; Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009; Tait *et al.*, 1998). Das erste NES überlappt mit der ersten Ubiquitinbindestelle und könnte die Bindung von Ubiquitin und damit die zelluläre Lokalisation beeinflussen. Unter physiologischen Bedingungen wird die Lokalisation von Ataxin-3 hauptsächlich durch die Phosphorylierung an S236 im ersten UIM und an S340/S352 im dritten UIM, vermittelt durch die Caseinkinase 2 (Abb. 1.2) (CK2), reguliert (Müller *et al.*, 2009). Eine Pseudophosphorylierung an diesen Serinresten führt zu einer erhöhten nukleären Lokalisation von Ataxin-3, wohingegen eine pharmakologische Inhibition der CK2 die nukleäre Lokalisation reduziert (Müller *et al.*, 2009).

Zusammenfassend besitzt Ataxin-3 eine DUB- und De-Neddylase-Aktivität, partizipiert in der ERAD und Aggresom-Bildung, wirkt als transkriptioneller Co-Repressor und wird in seiner zellulären Lokalisation vorwiegend durch Phosphorylierung reguliert.

#### **1.1.4 Molekulare Dysfunktionen als Ursache für MJD**

Die genauen Mechanismen der molekularen Pathogenese in MJD sind trotz intensiver Forschung und Fortschritten seit der Charakterisierung der ursächlichen Mutation im Polyglutaminbereich von Ataxin-3 weiterhin unbekannt. Es existieren allerdings Hinweise auf eine Reihe von Veränderungen, die mit der Expression von expandiertem Ataxin-3 assoziiert sind und potentiell zur Pathologie beitragen können.

Eine der betroffenen Funktionen von Ataxin-3 scheint seine Rolle als transkriptioneller Co-Repressor zu sein. Überexpression von expandiertem Ataxin-3 missreguliert eine Vielzahl von Genen im Vergleich zu wildtypischem Ataxin-3 (Chou *et al.*, 2006; Evert *et al.*,

2003; Tsai *et al.*, 2004), und transkriptionelle Dysregulation konnte ebenfalls in einem Mausmodell von MJD sowie Patientengewebe nachgewiesen werden (Chou *et al.*, 2008; Evert *et al.*, 2001; Evert *et al.*, 2006b; Wen *et al.*, 2003). Diese Dysregulation könnte durch eine verstärkte Histonazetylierung (Evert *et al.*, 2003) und eine erhöhte Bindung von expandiertem Ataxin-3 an CBP, p300 und PCAF verursacht werden (Li *et al.*, 2002).

Obwohl sich die DUB-Aktivität zwischen nicht-expandiertem und expandiertem Ataxin-3 nicht unterscheidet (Berke *et al.*, 2004; Burnett *et al.*, 2003; Winborn *et al.*, 2008), konnte eine Reduktion von ubiquitinierten Proteinen in Zellmodellen mit expandiertem Ataxin-3 beobachtet werden (Winborn *et al.*, 2008). Weiterhin bindet expandiertes Ataxin-3 stärker an VCP/p97 als nicht-expandiertes und interferiert mit der ERAD (Boeddrich *et al.*, 2006; Doss-Pepe *et al.*, 2003; Hirabayashi *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000; Zhong und Pittman, 2006), was die längere Halbwertszeit von expandiertem Ataxin-3 erklären könnte (Matsumoto *et al.*, 2004).

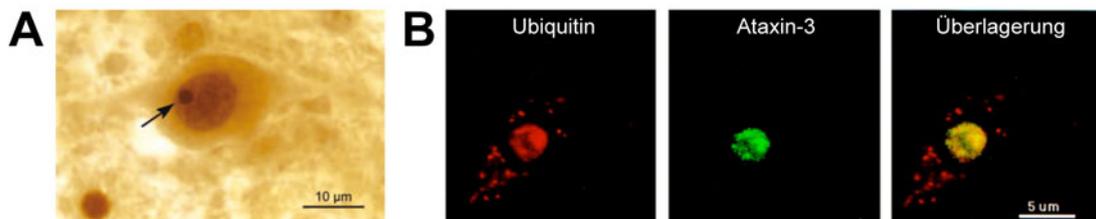
Überexpression von expandiertem Ataxin-3 beeinträchtigt weiterhin die Funktionalität von Mitochondrien, resultierend in verstärkter mitochondrialer DNS-Schädigung sowie einer Reduktion von antioxidativen Enzymen und verringerter Energieversorgung (Yu *et al.*, 2009a). Weiterhin konnte eine verringerte Kopienanzahl der mitochondrialen DNS in den überexprimierenden Zellen und in MJD-Patientengewebe festgestellt werden.

Eine weiterer Effekt von expandiertem Ataxin-3 ist eine Dysregulation der Ionenhomöostase. Neurone mit expandiertem Ataxin-3 zeigen eine erhöhte Sensitivität des Inositoltriphosphatrezeptors 1 (ITPR1) gegenüber intrazellulär appliziertem Inositoltriphosphat (IP3), was zu vermehrtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zytosol führt. Dies ist vermutlich auf eine Bindung von expandiertem Ataxin-3 an den ITPR1 zurückzuführen, die bei nicht-expandiertem Ataxin-3 nicht vorliegt (Chen *et al.*, 2008a). Neben der Dysregulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase wurde eine Dysfunktion von Kaliumkanälen und ein depolarisiertes Ruhepotential in neuronalen Zellen, die expandiertes Ataxin-3 überexprimierten, nachgewiesen (Jeub *et al.*, 2006).

Das prominenteste Kennzeichen der molekularen Pathologie von MJD ist die Aggregation von expandiertem Ataxin-3. Diese Aggregate sind durch ihre Unlöslichkeit gegenüber dem Detergens sodium dodecyl sulfate (SDS) gekennzeichnet und in Zellkultursystemen mit Überexpression von expandiertem Ataxin-3, MJD-Mausmodellen und Patientengeweben als hochmolekulare Komplexe im Immunblot gegen Ataxin-3 nachzuweisen (Berke *et al.*, 2004; Chai *et al.*, 2001; Goti *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 1996; Paulson *et al.*, 1997b; Perez *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2009). Die Detektion dieser SDS-unlöslichen Mikroaggregate *in vitro* und in einem MJD-Mausmodell geht dabei den histopathologisch detektierbaren neuronalen intranukleären Inklusionen (neuronal intranuclear inclusions, NIs) voraus (Chai *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2009), die ein

Schlüsselkennzeichen der Pathologie von MJD in Patientengewebe sind (Abb. 1.4, A) (Paulson *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1998).

NILs des mutierten Proteins kommen bei fast allen Polyglutaminerkrankungen vor und sind ein Indiz für zumindest zum Teil ähnliche pathologische Mechanismen (DiFiglia *et al.*, 1997; Gatchel und Zoghbi, 2005; Holmberg *et al.*, 1998; Igarashi *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Shao und Diamond, 2007; Skinner *et al.*, 1997; Zoghbi und Orr, 2000). Ataxin-3-positive NILs in MJD besitzen als weitere charakteristische Eigenschaft eine Co-Lokalisation mit Ubiquitin (Abb. 1.4, B) (Paulson *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1998). Weiterhin werden verschiedene



**Abb. 1.4: Ataxin-3-positive neuronale intranukleäre Inklusionen in MJD-Patienten**

(A) Immunhistochemische Färbung der *Pons* eines MJD-Patienten zeigt eine Ataxin-3-positive Inklusion im Zellkern eines Neurons (Pfeil). (B) Immunfluoreszenzfärbung gegen Ubiquitin (rot) und Ataxin-3 (grün) zeigt eine Co-Lokalisation in einem pontinen Neuron. (Abb. verändert nach Paulson *et al.*, 1997b und Riess, 2008).

Proteine in NILs rekrutiert, darunter Komponenten des Proteasoms und molekulare Chaperone, was eventuell auf die Missfaltung des expandierten Ataxin-3 und als zelluläre Antwort darauf zurückzuführen ist (Chai *et al.*, 1999a; Chai *et al.*, 1999b; Muchowski *et al.*, 2000; Paulson *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 2002; Warrick *et al.*, 1999). Verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter TBP und CBP, werden ebenfalls *in vitro* und in MJD-Patientengewebe in NILs rekrutiert (Chai *et al.*, 2002; McCampbell *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 1998; van Roon-Mom *et al.*, 2005). Diese Rekrutierung könnte über die Proteasomkomponenten die Proteinhomöostase, über die Transkriptionsfaktoren die Genexpression und über die massive Ubiquitinierung die Interaktion von Ubiquitin-bindenden Proteinen (Donaldson *et al.*, 2003) missregulieren. Zusätzlich werden andere Polyglutaminenthaltende Proteine wie Ataxin-1, Ataxin-2 und TBP ebenfalls in NILs rekrutiert (Perez *et al.*, 1998; Uchihara *et al.*, 2001), deren Funktionsverlust die Überlappung einiger Symptome der Polyglutaminerkrankungen erklären könnte. Die Toxizität von expandiertem Ataxin-3, ebenso wie seine Tendenz zur Aggregation korreliert hierbei mit der nukleären Lokalisation (Bichelmeier *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 1999). Die Wichtigkeit der intranukleären Lokalisation für die neuronale Toxizität konnte ebenfalls in Mausmodellen für HD und SCA1 beobachtet werden (Klement *et al.*, 1998; Saudou *et al.*, 1998)

Eine Korrelation von Hirnarealen mit NILs und denen mit der stärksten Neurodegeneration in MJD ist nicht vollständig gegeben (Evert *et al.*, 2006b; Paulson *et al.*, 1997b; Ross und Poirier, 2004; Trottier *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2001). Dies führte zur

Annahme, dass die NlIs nicht die eigentliche toxische Spezies in MJD darstellen, sondern die kleineren, mobileren Mikroaggregate diese Funktion einnehmen (Shao und Diamond, 2007; Williams und Paulson, 2008). Diese Beobachtung wurde dadurch untermauert, dass striatale Neurone, die NlIs bilden, eine höhere Überlebensrate in einem HD-Überexpressionsmodell besitzen (Arrasate *et al.*, 2004) und ein HD-Mausmodell existiert, bei dem trotz prominenter NlIs keine Neurodegeneration im Striatum zu detektieren ist (Slow *et al.*, 2005). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die fehlende Neurodegeneration im HD-Mausmodell auf die Wahl des exprimierten Huntingtinfragmentes zurückzuführen war, da eine minimale Länge Voraussetzung für die vom expandierten Huntingtin induzierte Exzitotoxizität ist (Okamoto *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008). Die auf Exzitotoxizität zurückzuführende Neurodegeneration in HD wurde bisher nicht bei MJD oder anderen Polyglutaminerkrankungen beschrieben, sodass eine Diskriminierung von Neurodegeneration und NlIs in MJD nicht notwendigerweise gegeben ist. Die nicht vollständige Übereinstimmung von vorhandenen NlIs und Neurodegeneration in MJD könnte stattdessen auf bereits degenerierte und von Mikroglia phagozytierte, zuvor aber für NlIs positive Neurone zum Zeitpunkt der Untersuchung zurückzuführen sein. Für diese Hypothese würde das präsymptomatische Auftreten von NlIs in einem MJD-Mausmodell und einem MJD-Patienten sprechen, bei denen jeweils keine signifikante Neurodegeneration festgestellt werden konnte (Boy *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2004).

### 1.1.5 Proteolyse von Ataxin-3 und die *toxic fragment*-Theorie

Eine generelle Hypothese für die Aggregation und Toxizität bei Polyglutaminerkrankungen basiert auf der Entstehung von proteolytischen Fragmenten der expandierten Proteine, die eine höhere Neigung zur Aggregation zeigen (Tarlac und Storey, 2003; Wellington *et al.*, 1998). Neben Zellkultur- und Mausmodellen von HD und SCA1, die eine Toxizität für die Expression von den Polyglutaminbereich enthaltenden Fragmenten zeigten (Klement *et al.*, 1998; Mangiarini *et al.*, 1996), konnte dies *in vitro* und *in vivo* ebenfalls für MJD gezeigt werden (Haacke *et al.*, 2006; Haacke *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2003; Paulson *et al.*, 1997b; Yasuda *et al.*, 1999). Die den Polyglutaminbereich enthaltenden, C-terminalen Ataxin-3-Fragmente zeigten eine verstärkte Bildung von SDS-unlöslichen Mikroaggregaten und intranukleären Inklusionen und inkorporierten nicht-expandiertes Ataxin-3 (Haacke *et al.*, 2006; Paulson *et al.*, 1997b). Weiterhin konnte ein C-terminales Ataxin-3-Fragment inklusive Polyglutaminbereich, das proximal der AS 190 proteolytisch prozessiert wurde, mit einer Größe von ca. 36 kDa in Lysaten von betroffenen Gehirnarealen in einem MJD-Mausmodell und MJD-Patientengewebe detektiert werden, wohingegen nicht betroffene Hirnareale und gesunde

Kontrollen dieses Fragment nicht aufwiesen (Colomer Gould *et al.*, 2007; Goti *et al.*, 2004). Für die Proteolyse von Ataxin-3 kommen die an der Apoptose beteiligten Cysteinproteasen der Caspase-Familie, die an spezifischen Aspartatmotiven schneiden (Earnshaw *et al.*, 1999), in Betracht, die eine unterschiedliche Rolle bei verschiedenen Polyglutaminerkrankungen spielen (Ellerby *et al.*, 1999a; Ellerby *et al.*, 1999b; Graham *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2001; Ona *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1999). Ataxin-3 wird *in vitro* von der Caspase-1 und -3 proteolytisch gespalten (Berke *et al.*, 2004; Wellington *et al.*, 1998). So führt die Aktivierung von Caspasen durch Staurosporin in Zellen zur Proteolyse von Ataxin-3 vorwiegend durch Caspase-1, und Inhibition der Caspaseaktivität oder Mutation der Caspaseschnittstellen reduziert bis inhibiert die Bildung von SDS-unlöslichen Mikroaggregaten in Zellen und in einem *Drosophila*-Modell für MJD, in welchem zusätzlich die Toxizität reduziert wird (Berke *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2009). Neben den Proteasen der Caspase-Familie konnten die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Calpaine als Proteasen von Proteinen mit expandierten Polyglutaminbereichen identifiziert werden (Gafni *et al.*, 2004; Goffredo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Namura *et al.*, 2002). Ataxin-3 wird *in vitro* von Calpainen proteolysiert und ein durch Ionomycin vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom induziert die Spaltung von Ataxin-3, die durch Calpaininhibition unterbunden werden kann (Haacke *et al.*, 2007). Calpaininhibition reduziert darüber hinaus die Bildung von SDS-unlöslichen Mikroaggregaten bei Überexpression von expandiertem Ataxin-3 (Haacke *et al.*, 2007). Welche Proteasenfamilie eine Schlüsselrolle bei der Aggregation und Toxizität von expandiertem Ataxin-3 bei MJD einnimmt, ist unklar, ebenso die genaue Relevanz etwaiger proteolytischer Fragmente. Es ist durchaus möglich, dass neben Caspasen und Calpainen weitere Enzyme für eine schrittweise Proteolyse und Prozessierung von Ataxin-3 verantwortlich sind und diese Fragmente als Kristallisationspunkt die Aggregation beschleunigen können.

## 1.2 Pluripotente Stammzellen als Plattform zur Modellierung von MJD

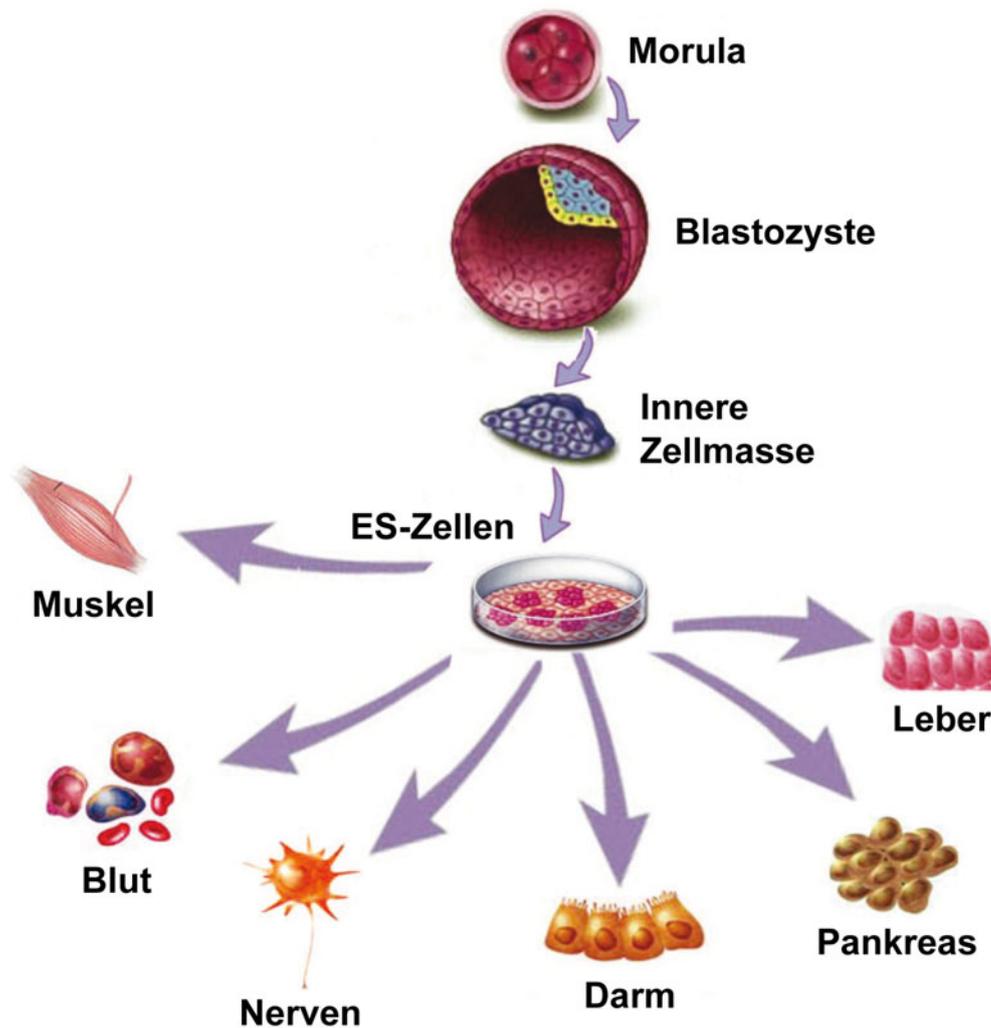
Die etablierten Zellkultursysteme und transgenen Mäuse zur Modellierung von MJD basieren alle auf einer Überexpression von expandiertem Ataxin-3. Dies kann zu toxischen Effekten führen, die nicht repräsentativ für die molekulare Pathogenese von MJD sind und die Entwicklung von Therapeutika negativ beeinflussen könnten. Darüber hinaus ist die Zusammensetzung von miteinander interagierenden Proteinen mit Polyaminosäurewiederholungen zwischen den Spezies äußerst unterschiedlich, wobei Polyglutaminwiederholungen mit mindestens 64 Proteinen die häufigste Art der Wiederholung beim Menschen darstellen. Ataxin-3 und das in *post mortem*-Gewebe von

MJD-Patienten in N11s detektierte TBP in Mäusen weisen allerdings keine ausreichenden CAG-Wiederholungen auf (Alba und Guigo, 2004; Butland *et al.*, 2007; Faux *et al.*, 2005). Die Mehrheit der Proteine mit einer Aminosäurewiederholung partizipieren an großen Multiproteinkomplexen oder Protein/Nukleinsäurekomplexen (Faux *et al.*, 2005; Hancock und Simon, 2005), und die flankierenden Regionen des expandierten Polyglutaminbereichs üben einen Effekt auf das Aggregationsverhalten aus (de Chiara *et al.*, 2005; Gales *et al.*, 2005; Bhattacharyya *et al.*, 2006; Saunders und Bottomley, 2009; Matos *et al.*, 2011; Pastore und Temussi, 2012; Tam *et al.*, 2009; Thakur *et al.*, 2009). Für SCA1, SCA17 und HD konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der nativen Interaktionen zu unterschiedlichen toxischen Mechanismen führten, die sogar zelltypspezifisch sein können (Friedman *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007a; Lim *et al.*, 2008). Authentische, humane Neurone, die ein endogenes Expressionslevel von expandiertem Ataxin-3 aufweisen und das spezifische, humane Interaktom besitzen, sind deswegen zur Untersuchung der molekularen Pathogenese von MJD gegenüber Überexpressionssystemen und anderen Spezies sowie Zelltypen zu bevorzugen.

### 1.2.1 Humane embryonale Stammzellen

Humane embrionale Stammzellen (hES-Zellen, *human embryonic stem cells*, hESCs) konnten das erste Mal im Jahre 1998 aus bei der *in vitro*-Fertilisation (IVF) überzähligen Blastocysten generiert werden (Thomson *et al.*, 1998). Zuvor konnten bereits 1981 ES-Zellen der Maus etabliert werden (Evans und Kaufman, 1981; Martin *et al.*, 1981). hES-Zellen sind als *in vitro*-Artefakt der Inneren Zellmasse (*inner cell mass*, ICM) der Blastozyste anzusehen, aus der sie hervorgehen (Abb. 1.5). Die ICM bildet den Embryo, wohingegen das Trophektoderm die Plazenta bildet (Cross *et al.*, 1994; Ilgren, 1983). Die Fähigkeit, alle somatischen Zelltypen der drei Keimblätter, aus denen ein Embryo besteht, zu generieren, wird als Pluripotenz bezeichnet. hES-Zellen teilen die Eigenschaft der Pluripotenz mit der ICM, weswegen sie der Gruppe der pluripotenten Stammzellen zugeordnet werden. Neben der Pluripotenz zeichnen sich hES-Zellen durch eine hohe Telomeraseaktivität aus, die die zelluläre Seneszenz inhibiert und eine theoretisch unbegrenzte Proliferation *in vitro* ermöglicht (Übersicht: Smith, 2001).

Die Regulation der Pluripotenz von hES-Zellen unterliegt einem Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, die zueinander autoregulatorisch in Beziehung stehen und hunderte Gene positiv regulieren, deren Transkription mit der Pluripotenz und Zellteilung assoziiert ist. Gene hingegen, die mit der Differenzierung assoziiert sind, werden reprimiert und auf diese Weise der pluripotente Zustand aufrecht erhalten (Babaie *et al.*, 2007; Boiani und Schöler, 2005; Boyer *et al.*, 2005). Zu den für die Erhaltung der Pluripotenz essentiellen Faktoren



**Abb: 1.5: Schema der Generierung und des Differenzierungspotentials von hES-Zellen**

hES-Zellen werden aus der isolierten ICM der Blastozyste gewonnen. Die Eigenschaft der Pluripotenz ermöglicht eine Differenzierung in alle Zelltypen des Organismus (Abb. verändert nach Meregalli *et al.*, 2011)

zählen die Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF2 und 4, c-MYC, und NANOG sowie das RNA-bindende Protein LIN28, deren Missregulation eine Differenzierung von hES-Zellen initiiert (Avilion *et al.*, 2003; Chambers *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008b; Hall *et al.*, 2009; Mitsui *et al.*, 2003; Niwa *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 2004; Viswanathan *et al.*, 2008).

Für den Erhalt der Pluripotenz und eine fortlaufende Propagierung in der Zellkultur sind spezifische Mediumbedingungen notwendig. Die ersten hES-Zelllinien wurden auf mitotisch inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF), die als sogenannte Feeder („Fütterzellen“) fungieren, in Anwesenheit von von fetal calf serum (FCS) und basic fibroblast growth factor (bFGF) generiert (Reubinoff *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 1998). Das FCS wurde später in der Kultivierung, aber auch zur Generierung von hES-Zellen durch Knockout Serum Replacement (KOSR) ersetzt (Amit *et al.*, 2000; Amit *et al.*, 2002), welches ursprünglich für murine ES-Zellen entwickelt wurde (Price *et al.*, 1998). Die Co-Kultivierung mit Feedern konnte durch von Feedern konditioniertes Medium (Xu *et al.*, 2001) und schließlich durch Medien ersetzt werden, die gänzlich aus rekombinanten Faktoren

bestehen, wie das mTeSR1-Medium (Ludwig *et al.*, 2006). Die Etablierung solcher Kulturbedingungen ist für die Hochskalierung und Stabilität der hES-Zellen von entscheidender Bedeutung, damit diese als Ressource für auf anderem Wege nicht zugängliches oder limitiertes humanes Zellmaterial für *in vitro*-Modellierung oder eine potentielle Zellersatztherapie dienen können.

Die Pluripotenz von hES-Zellen ermöglicht deren gezielte Differenzierung *in vitro* in Zellen aller drei Keimblätter (Abb. 1.5), darunter Zelltypen wie Kardiomyozyten (Zweigerdt *et al.*, 2003) und Insulin-produzierende Zellen (Lumelsky *et al.*, 2001), für die ein besonderes Interesse im Kontext der Zellersatztherapie besteht. Ebenso konnten neurale Zelltypen generiert (Reubinoff *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), wie auch spezifische Protokolle zur Differenzierung bestimmter neuronaler Subtypen wie spinaler Motoneurone (Li *et al.*, 2005) und dopaminerg, mesencephalischer Neurone etabliert werden (Perrier *et al.*, 2004; Kriks *et al.*, 2011). hES-Zellen können somit als nahezu unlimitierte Ressource für humane Neurone *in vitro* dienen.

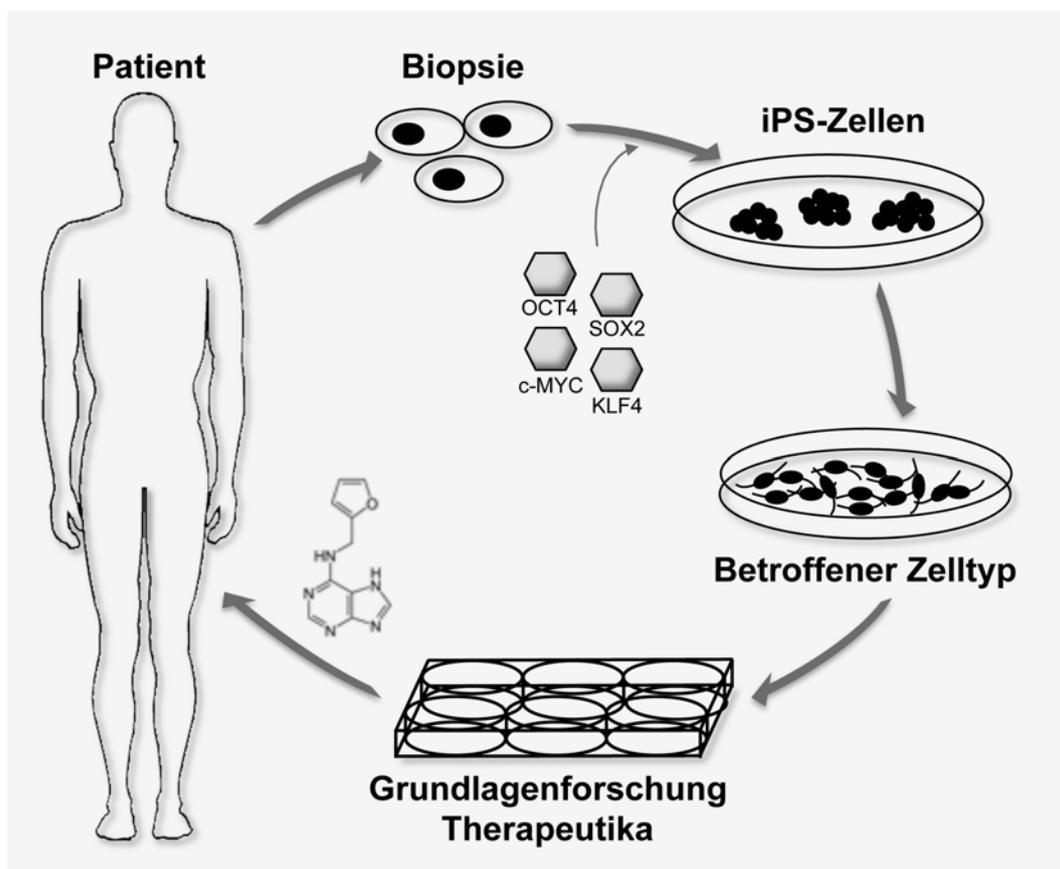
Um eine monogenetische Erkrankung wie MJD physiologisch zu modellieren, müsste allerdings ein *gene targeting* durch homologe Rekombination zur Inserierung der Mutation in hES-Zellen erfolgen. Die genetische Manipulation von hES-Zellen gestaltete sich allerdings als schwierig (Übersicht: Giudice und Trounson, 2008 sowie Menendez *et al.*, 2005) und es konnten im Vorfeld dieser Arbeit nur wenige homolog rekombinante Linien hergestellt werden (Irion *et al.*, 2007; Urbach *et al.*, 2004; Zwaka und Thomson, 2003).

Als Alternative zur homologen Rekombination käme theoretisch noch die Verwendung von durch die Präimplantationsdiagnostik (PID) ausselektierten IVF-Morulae, die die entsprechende Mutation aufweisen, und eine Generierung von hES-Zellen mit der entsprechenden Mutation in Frage (Ben-Yosef *et al.*, 2008; Stephenson *et al.*, 2009). Für die monogenetischen, neurologischen Erkrankungen Charcot-Marie-Tooth-Syndrom, amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Fragiles-X-Syndrom, HD, Neurofibromatose Typ 1 und Adrenoleukodystrophie wurden bereits erfolgreich solche hES-Zelllinien generiert (Eiges *et al.*, 2007; Mateizel *et al.*, 2006; Verlinsky *et al.*, 2005). Die geringe Prävalenz von MJD (vgl. 1.1.2) sowie die rechtlichen Beschränkungen in der Bundesrepublik Deutschland hinsichtlich der Generierung von hES-Zelllinien, der PID und auch der Einfuhr von hES-Zellen (Embryonenschutzgesetz, ESchG; Stammzellgesetz, StZG), erschweren bis verhindern diese Option zur Modellierung von MJD. Außerdem sind die ethischen Bedenken eines solchen Vorgehens nicht zu vernachlässigen und Gegenstand einer andauernden wissenschaftlichen, politischen und gesellschaftlichen Debatte (Bongaerts und Severijnen, 2007; Denker, 2008; Holm, 2008; Takala und Häyry, 2007; Testa *et al.*, 2007; Weissmann, 2006). Trotz der generellen Möglichkeit, hES-Zellen zur *in vitro*-Modellierung von MJD zu nutzen, scheiden sie daher als zu bevorzugende Option aus.

## 1.2.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Eine innovative Möglichkeit zur Generierung von pluripotenten Stammzellen ohne die Nutzung der ICM von Blastozysten wurde 2006 von Takahashi und Yamanaka publiziert. Basierend auf dem Kenntnis von für die Pluripotenz essentiellen Faktoren konnten durch virale Überexpression von initial 24 ausgewählten Genen adulte murine Fibroblasten in ein murines ES-Zellen ähnliches Stadium überführt werden. Die vier Faktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc waren dabei für die erfolgreiche Reprogrammierung essentiell (Takahashi und Yamanaka, 2006). Diese sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen, *induced pluripotent stem cells*, iPSCs) teilen mit ES-Zellen Eigenschaften wie Morphologie, Proliferation, Kulturbedingungen sowie das Differenzierungspotential in Zelltypen aller drei Keimblätter *in vitro* und die Bildung von Teratomen *in vivo*.

Der Transfer dieser Technologie auf humane Zellen konnte wenig später ebenfalls gezeigt werden (Takahashi *et al.*, 2007). Virale Überexpression von OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC in humanen Fibroblasten generierte Zellen, die hES-Zellen glichen (Lowry *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008a; Takahashi *et al.*, 2007). Alternativ konnte die Reprogrammierung von humanen Fibroblasten in iPS-Zellen mit der Faktorenkombination OCT4, SOX2, NANOG



**Abb. 1.6: Patientenspezifische iPS-Zellmodelle als potentielle Plattform für die Genese von Therapeutika**  
(Abb. verändert nach Peitz, Jungverdorben & Brüstle, 2013)

und LIN28 gezeigt werden (Yu *et al.*, 2007), was mit der autoregulatorischen Komponente des Pluripotenznetzwerks erklärt werden kann, bei der sich Faktoren gegenseitig positiv regulieren (vgl. 1.2.1). Unabhängig von der gewählten Faktorkombination wiesen die generierten iPS-Zellen mit hES-Zellen vergleichbare Morphologie, Proliferation und Abhängigkeit von spezifischen Kulturbedingungen auf, exprimierten spezifische Oberflächenmarker und besaßen ein vergleichbares Differenzierungspotential (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007).

Weiterhin wurde die iPS-Zelltechnologie auf Donorzellen von Patienten mit monogenetischen Erkrankungen angewendet. Auf diese Weise konnten iPS-Zelllinien generiert werden, die Mutationen für Adenosin-Desaminase vermittelte Immundefizienz, ALS, Gaucher-Syndrom, Duchenne-Muskelatrophie, Becker-Muskelatrophie, Down-Syndrom, Shwachman-Bodian-Diamond-Syndrom und HD tragen (Dimos *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008b). Darüber hinaus konnte eine Differenzierung in den für die Erkrankung spezifischen neuronalen Subtyp erfolgreich durchgeführt werden (Dimos *et al.*, 2008). Aus iPS-Zellen von Patienten mit spinaler Muskelatrophie (SMA) und familiärer Dysautonomie konnten nicht nur die degenerierenden, neuronalen Subtypen differenziert, sondern sogar in den abgeleiteten Neuronen für die Krankheit spezifische zelluläre Phänotypen detektiert und durch bereits bekannte Therapeutika abgemildert werden (Abb. 1.6) (Ebert *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009). Trotz früher Verfügbarkeit von Patienten-spezifischen ALS-Motoneuronen (Dimos *et al.*, 2008) konnten erst kürzlich spezifische molekulare Pathologien *in vitro* modelliert werden (Chen *et al.*, 2014; Kiskinis *et al.*, 2014). Eine Generierung von iPS-Zellen aus Donorzellen von MJD-Patienten und aus diesen abgeleitete Neurone könnte im Kontext dieser Ergebnisse eine wertvolle Plattform zur *in vitro*-Modellierung von MJD darstellen.

### 1.2.3 Humane neurale Stammzellen

Die neuronale Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen (PSCs) wird in den meisten Protokollen über eine ungerichtete Spontandifferenzierung und anschließende manuelle Isolation von neuronalen Rosetten erreicht (Reubinoff *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Zhang, 2006). Dieser Prozess ist recht ineffizient, zudem arbeits- und zeitaufwändig, da zehn bis vierzehn Tage für die Genese der Rosetten und weitere drei bis vier Wochen für die neuronale Differenzierung benötigt werden. Für jede neuronale Differenzierung müssen alle Arbeitsschritte erneut durchlaufen werden. Zudem erschweren die erreichten Effizienzen von Neuronen sowie Kontamination mit nicht-neuronalen Zelltypen die Verwendung in Experimenten (Li *et al.*, 2005; Perrier *et al.*, 2004; Zhang, 2006). Diese Limitierungen könnten durch ein aus pluripotenten Stammzellen abgeleitetes, neurales und stabiles Intermediat, das die für die initiale neurale Differenzierung notwendige Zeit einspart

und eine reine, von Kontaminationen freie und homogene Population darstellt, umgangen werden.

**N**eurale **S**tamm**z**ellen (NS-Zellen, *neural stem cells*, NSCs) sind selbsterneuernde multipotente Zellpopulationen des ZNS (Götz und Huttner, 2005; Temple, 2001). Ihre Multipotenz ist durch ihr Differenzierungspotential in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten charakterisiert. Eine Differenzierung von hES-Zellen in homogene Populationen von NSCs wurde von verschiedenen Gruppen publiziert, allerdings besitzen die jeweiligen generierten Populationen ein variables neurogenes Potential und differenzieren primär in gliale Zelltypen (Conti *et al.*, 2005; Elkabetz *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2006; Tabar *et al.*, 2005). Am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie wurde deswegen intensiv an einer Alternative geforscht. Als Resultat dieser Arbeiten konnte eine klonale, neuroepitheliale Stammzellpopulation (*long term neuroepithelial stem cells*, lt-NES cells), die auch über eine fortlaufende Kultur ihr hohes neurogenes Potential beibehält, etabliert werden (Koch *et al.*, 2009). Die regionale Identität dieser Zellen ist anhand von Markergenen im ventralen Rhombenzephalon zu verorten, sie sprechen allerdings weiterhin auf Morphogene an und können hinsichtlich ihrer positionellen Identität und neuronalen Subspezifizierung durch entsprechende Signalmoleküle sowohl in Motoneurone der *Medulla spinalis* als auch in dopaminerge Neurone des ventralen *Mesencephalon* differenziert werden (Koch *et al.*, 2009). Eine Generierung von lt-NES-Zellen aus MJD-spezifischen iPS-Zellen würde demnach eine nahezu unlimitierte Plattform für die *in vitro*-Modellierung von MJD anhand von humanen Neuronen bieten.

### 1.3 Ca<sup>2+</sup>-modulierende Signale im zentralen Nervensystem

Calpaine und Caspasen, die zwei Proteasefamilien, die mit einer die Aggregation beschleunigenden Proteolyse von expandiertem Ataxin-3 assoziiert sind (vgl. 1.1.5), werden durch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration reguliert (Übersicht: Clapham, 2007). Die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase modulierende Signale im ZNS könnten demnach Einfluss auf die Aggregation von expandiertem Ataxin-3 und auf die Pathologie von MJD ausüben. Die zwei Neurotransmitter Glutamat und **A**denosin**t**ri**p**hosfat (ATP), die die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase von Neuronen modulieren, ihre Rezeptoren und ihre physiologische Relevanz sollen im Folgenden beschrieben werden.

#### 1.3.1 Glutamaterge Signale im zentralen Nervensystem

Die ersten Indizien, dass Glutamat als exzitatorischer Neurotransmitter fungiert, waren epileptische Anfälle nach direkter Injektion von Glutamat ins Gehirn von Hunden

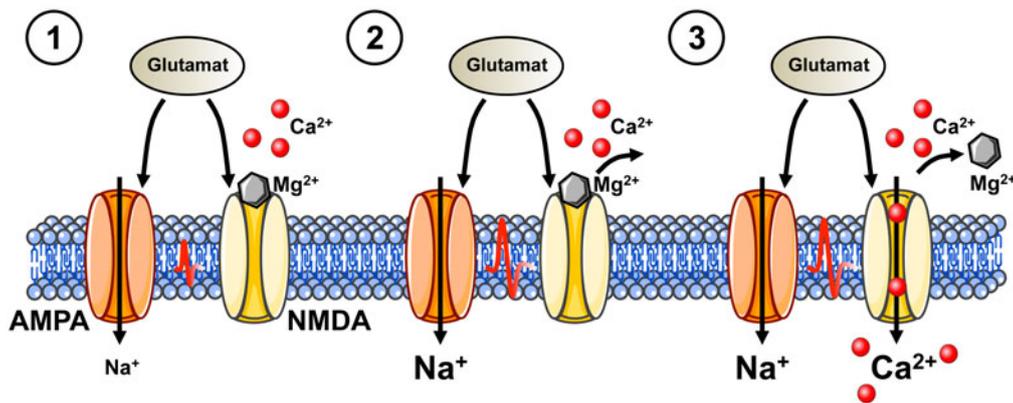
(Hayashi, 1954). Darüber hinaus induzierte eine iontophoretische Applikation von Glutamat in der *Medulla spinalis*, dem *cerebralen* und *cerebellaren Cortex* eine Depolarisation und Aktionspotentiale in Neuronen (Curtis und Watkins, 1963; Krnjevic und Phillis, 1963). Eine allgemeine Akzeptanz als der hauptsächlichste, exzitatorische Neurotransmitter im ZNS erlangte Glutamat allerdings erst zwei Dekaden später (Übersicht: Watkins und Jane, 2006).

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind in der Plasmamembran lokalisiert. Ihre Hauptfunktion ist die postsynaptische, exzitatorische Transmission durch Depolarisation (Michaelis, 1998). Anhand ihrer Spezifität für verschiedene Agonisten werden sie in die Familien der **N-methyl-D-aspartic acid** (NMDA)-Rezeptoren, der  **$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid** (AMPA)-Rezeptoren und der **kainic acid** (KA)-Rezeptoren unterteilt (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1980; Watkins, 1991). Weiterhin existieren noch metabotrope, G-Protein gekoppelte Glutamatrezeptoren, die je nach Subtyp die Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (**cyclic adenosine monophosphate**, cAMP) aktivieren ( $G_s$ -Familie) oder inhibieren ( $G_{i/o}$ -Familie). Daneben existiert die  $G_{q/11}$ -Familie, die über Produktion von IP3 durch **Phospholipase C** (PLC) und dessen Bindung an die im ER lokalisierten **IP3-Rezeptoren** (IP3R) einen  $Ca^{2+}$ -Efflux aus dem ER ins Zytosol induziert (Bockaert *et al.*, 1993; Schoepp und Conn, 1993; Sladeczek *et al.*, 1985;).  $G_{q/11}$ -gekoppelte Glutamatrezeptoren sind allerdings nicht sehr abundant (Anwyl, 1999).

KA-Rezeptoren bestehen aus tetrameren Homo- oder Heteromeren der fünf verschiedenen Untereinheiten KA1, KA2 und GluR5 bis GluR7, deren Zusammensetzung die Permeabilität und Funktion des Rezeptors bestimmt und sind gewöhnlich permeabel für  $Na^+$  und  $K^+$ , aber nicht für  $Ca^{2+}$  (Jane *et al.*, 2009; Pinheiro und Mülle, 2006). KA-Rezeptoren sind vorzugsweise präsynaptisch lokalisiert und regulieren die Neurotransmitterfreisetzung.

Die vier verschiedenen Untereinheiten GluR1 bis GluR4 bilden als tetrameres Heteromer die AMPA-Rezeptoren, die nicht spezifisch für spezielle Kationen sind, deren Permeabilität für  $Ca^{2+}$  aber von ihrer Zusammensetzung abhängig ist (Kwak und Weiss, 2006; Seeburg *et al.*, 2001). Posttranskriptionelle Modifikation der GluR2-mRNA bewirkt durch einen Aminosäureaustausch eine Impermeabilität gegenüber  $Ca^{2+}$  bei Heteromeren, die die modifizierte GluR2-Untereinheit besitzen, was beides für die Mehrzahl der AMPA-Rezeptoren gilt (Isaac *et al.*, 2007; Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1997; Wenthold *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zu den anderen ionotropen Glutamatrezeptoren besitzen NMDA-Rezeptoren neben einer Permeabilität für  $Na^+$  und  $K^+$  eine hohe Affinität und Permeabilität für  $Ca^{2+}$ . Sie bestehen aus einem Tetramer, welches sich als Homo- oder Heteromer aus den Untereinheiten NR1, NR2A bis NR1D und NR3 zusammensetzt (Cull-Candy *et al.*, 2001).



**Abb. 1.7: Schema der NMDA-Rezeptoraktivierung**

Im Ruhepotential sind die NMDA-Rezeptoren durch Bindung von Mg<sup>2+</sup> an ihre Pore blockiert und es findet trotz Glutamatstimulation kein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom statt, wohingegen durch AMPA-Rezeptoren ein Einstrom von Na<sup>+</sup> und eine partielle Depolarisation stattfindet (1). Wiederholte Stimulation der AMPA-Rezeptoren mit Glutamat depolarisiert die Membran soweit, dass das Mg<sup>2+</sup> aus der Pore der NMDA-Rezeptoren dissoziiert (2). Durch Entfernung des Mg<sup>2+</sup> kann Ca<sup>2+</sup> durch die NMDA-Rezeptoren in die Zellen einströmen (3).

NMDA-Rezeptoren sind im Ruhemembranpotential durch Bindung von Mg<sup>2+</sup> an ihre Pore blockiert und reagieren auf Glutamatstimulation nicht mit einer Öffnung (Abb. 1.7, (1)) (Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984). Repetitive Aktivierung von AMPA-Rezeptoren führt zu einer partiellen Depolarisierung, die die Blockade durch Mg<sup>2+</sup> aufhebt (Abb. 1.7, (2)) und zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup> in das Zytosol führt (Abb. 1.7, (3)) (Dingledine *et al.*, 1999; Michaelis, 1998). Dieser Einstrom ist essentiell für die *long-term potentiation* (LTP), die in Verbindung mit der Lern- und Gedächtnisfunktion steht (Artola und Singer, 1987; Cotman *et al.*, 1988). Weiterhin aktiviert die durch Öffnung der NMDA-Rezeptoren verstärkte Depolarisation spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, die zu einem weiteren Einstrom von Ca<sup>2+</sup> in das Zytosol führen (Hofmann *et al.*, 1999).

Demnach bildet Glutamatstimulation von NMDA-Rezeptoren in Verbindung mit spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen den wichtigsten exzitatorischen Mechanismus für einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Neuronen.

### 1.3.2 Purinerge Signale im zentralen Nervensystem

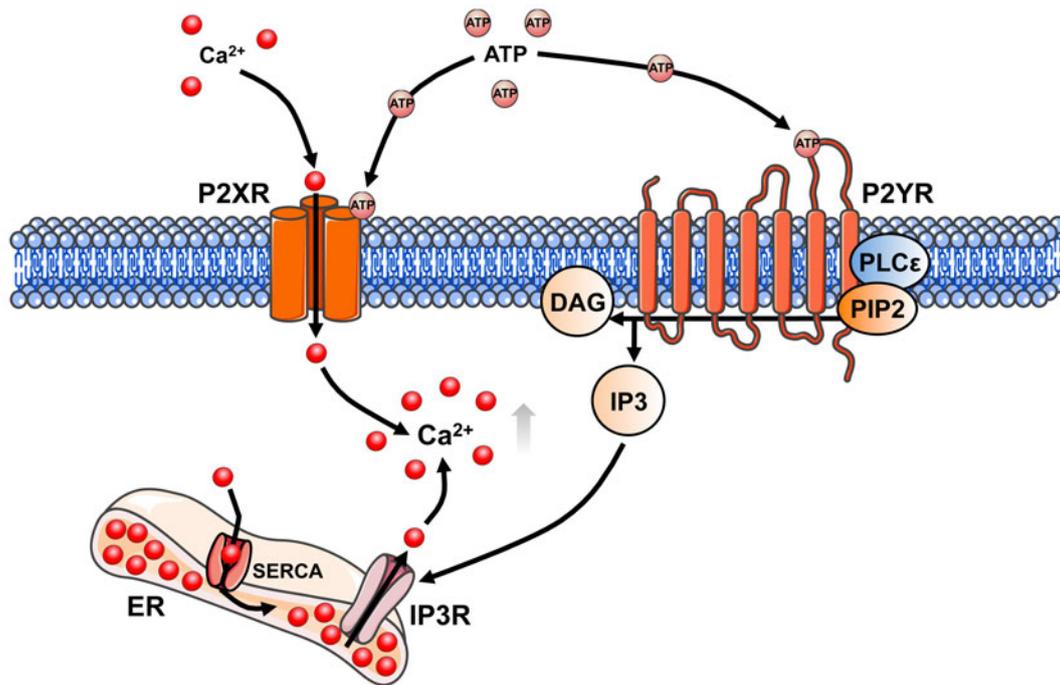
Die Hypothese der purinergen Signale wurde erstmals 1972 formuliert, nachdem die Funktion von ATP als Neurotransmitter in inhibitorischen Neuronen der *taenia coli* des Meerschweinchens gezeigt werden konnte (Burnstock, 1972). Die Identifizierung von ATP als Co-Transmitter im sympathischen und parasympathischen Nervensystem erfolgte kurze Zeit später (Burnstock, 1976). Dabei zeigte sich, dass das Konzept der Co-Transmission an Synapsen sich auf weitere Neurotransmitter neben ATP erstreckt, wobei Co-Transmission nicht notwendigerweise Vesikel mit beiden Neurotransmittern bezeichnet, wie auch die Transmitterfreisetzung nicht absolut zeitgleich erfolgen muss (Burnstock, 2004). Die ATP-

Konzentration im Zytoplasma von Neuronen beträgt ~2-5 mM (Zimmermann, 1994) und kann in synaptischen Vesikeln bis zu 1000 mM erreichen (Fields und Burnstock, 2006; Zalk und Shoshan-Barmatz, 2006). Eine Co-Transmission von ATP im ZNS konnte mit den Neurotransmittern Azetylcholin (Potter und White, 1980; Richardson und Brown, 1987),  $\gamma$ -Aminobuttersäure (***gamma-aminobutyric acid***, GABA) (Jo und Schlichter, 1999; Jo und Role, 2002, Labrakakis *et al.*, 2003), Glutamat (Illes *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001), Noradrenalin (Sperlágh *et al.*, 1998) und Dopamin (Krügel *et al.*, 2003) gezeigt werden. Darüber hinaus wurde auch eine alleinige ATP-Transmission in Bereichen des *Cortex* und der medialen *Habenula* beobachtet (Pankratov *et al.*, 2006; Pankratov *et al.*, 2007). Das vermittelte Signal kann bei einer Co-Transmission von ATP erregend (Jahr und Jessel, 1983) oder hemmend sein (Redman und Silinsky, 1994). Ursache hierfür ist die große Diversität von purinergen Rezeptoren.

In 1978 wurden verschiedene membranständige Rezeptoren für Adenosin (P1-Rezeptoren) und ATP (P2-Rezeptoren) entdeckt und die P2-Rezeptoren später anhand ihres Transduktionsmechanismus weiter in die Gruppen der ionotropen **P2X**- und metabotropen **P2Y**-Rezeptoren (P2RX, P2RY) unterteilt (Abbraccio und Burnstock, 1994; Brake *et al.*, 1994; Dubyak, 1991; Lustig *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1993).

Die vier verschiedenen P1-Rezeptoren  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  und  $A_3$  sind G-Protein gekoppelte, metabotrope Rezeptoren, von denen  $A_1$  und  $A_3$  an die  $G_{i/o}$ -Familie koppeln und die Produktion von cAMP inhibieren, wohingegen  $A_{2A}$  und  $A_{2B}$  an die  $G_s$ -Familie gekoppelt sind und die cAMP-Produktion stimulieren (Fredholm, 2001; Ralevic und Burnstock, 1998). Da die P1-Rezeptoren keinen zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Anstieg induzieren, werden sie im Weiteren nicht näher betrachtet.

Die P2X-Rezeptoren sind klassische kationische, Liganden-induzierte Kanäle, die bei ATP-Bindung ihre für  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Ca^{2+}$  permeable Pore öffnen (Abb. 1.8). Ein P2X-Rezeptor besteht dabei aus einem Trimer, das sich als Homo- oder Heteromer aus sieben verschiedenen Untereinheiten, die nach der Historie ihrer Klonierung schlicht als P2RX1-P2RX7 bezeichnet werden, zusammensetzen kann (Nicke *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 2006; North, 2002). Homomere P2X7-Rezeptoren werden erst bei ATP-Konzentrationen von 100-1000  $\mu$ M aktiviert, wohingegen alle anderen P2X-Rezeptoren eine  $EC_{50}$  von ~1-10  $\mu$ M besitzen (Abbraccio *et al.*, 2009). Alle P2X-Rezeptoren sind permeabel für  $Ca^{2+}$  und das Verhältnis der Permeabilität von  $Ca^{2+}$  gegenüber  $Na^+$  und  $K^+$  beträgt je nach Untereinheitenkombination 1 bis zu > 5-10 (Egan *et al.*, 2006; Pankratov *et al.*, 2009). Als Resultat beteiligen sich P2X-Rezeptoren an der schnellen, synaptischen Transmission (Khakh, 2001). Dies konnte zuerst in der medialen *Habenula* experimentell nachgewiesen (Edwards *et al.*, 1992), aber auch in anderen Bereichen des ZNS wie der *Medulla spinalis*, dem *Locus coeruleus*, dem *Hippocampus* und dem somatosensorischen *Cortex* beobachtet



**Abb. 1.8: P2X- und P2Y-Rezeptor vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg im Zytosol**

Bindung von ATP an die trimeren P2X-Rezeptoren führt zu einer Öffnung der Pore und Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum ins Zytosol. Produktion von IP<sub>3</sub> nach Bindung von ATP an die P2Y-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> oder P2Y<sub>11</sub> induziert einen Ausstrom aus dem durch die SERCA mit  $\text{Ca}^{2+}$  geladenem ER durch IP<sub>3</sub>R ins Zytosol. (SERCA = sarco/endoplasmatische Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; DAG = Diacylglycerin; PIP<sub>2</sub> = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat)

werden (Bardoni *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 2001; Pankratov *et al.*, 1999; Pankratov *et al.*, 2002). P2X-Rezeptoren können im Ruhepotential, bei dem NMDA-Rezeptoren durch  $\text{Mg}^{2+}$ -blockiert sind, die bedeutendste Möglichkeit für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Zytosol bieten (Pankratov *et al.*, 2003), obwohl ihr Gesamtanteil an den postsynaptischen Erregungsströmen nur 5-15% beträgt (North und Verkhratsky, 2006; Pankratov *et al.*, 2009). Zudem können präsynaptische P2X-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale die Freisetzung von Neurotransmittern aus Vesikeln induzieren (Sperlágh *et al.*, 2007). Eine Kooperation von NMDA- und P2X-Rezeptoren in der Regulation der LTP in CA1-Neuronen des *Hippocampus*, die mit Lern- und Gedächtnisleistung assoziiert ist, konnte nachgewiesen (Fujii *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2001) und ein durch P2X-Rezeptoren vermittelter Anstieg von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  nach ATP-Stimulation in einer Vielzahl von Neuronen, z.B. *neocorticalen* und *cerebellaren* Neuronen, detektiert werden (Lalo *et al.*, 1998; Phillis und Wu, 1981; Prothero *et al.*, 2000; Salter und Hicks, 1994; Stone und Taylor, 1978). Weiterhin können P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren durch eine Daueraktivierung und anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle Apoptose induzieren (Delarasse *et al.*, 2009; Ferrari *et al.*, 1999).

Alle P2Y-Rezeptoren teilen die typische Siebentransmembrandomänentopologie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und können phylogenetisch in zwei Untergruppen bestehend aus den Rezeptoren P2RY<sub>1</sub>, P2RY<sub>2</sub>, P2RY<sub>4</sub>, P2RY<sub>6</sub> und P2RY<sub>11</sub> sowie

P2RY12, P2RY13 und P2RY14 eingeteilt werden (Abbraccio *et al.*, 2006). Die Rezeptoren der ersten Untergruppe sind vorwiegend an Proteine der  $G_q/G_{11}$ -Familie gekoppelt, die einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem ER, welches kontinuierlich über die sarco/endoplasmatische Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) mit  $Ca^{2+}$  aus dem Zytosol beladen wird, zurück ins Zytosol induzieren (Abb. 1.8) (Verkhratsky, 2005), wohingegen die zweite Untergruppe fast ausschließlich an  $G_{i/o}$  gekoppelt ist und die Synthese von cAMP inhibiert und Ionenkanäle moduliert (Abbraccio *et al.*, 2006). Der P2RY11-Rezeptor nimmt dabei eine Sonderrolle ein, da er neben  $G_{q/11}$  zusätzlich an Proteine der  $G_s$ -Familie gekoppelt ist und nach ATP-Stimulation die cAMP-Produktion aktiviert (Communi *et al.*, 1999). Weiterhin induziert eine Stimulation des P2RY11-Rezeptors mit UTP einen Auström von  $Ca^{2+}$  aus dem ER ohne einen Anstieg von cAMP oder IP3, was auf Agonist-spezifische Konformationen und Signalweiterleitung hindeutet (White *et al.*, 2003) und für weitere P2Y-Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden kann. P2Y-Rezeptoren regulieren in Neuronen vielfältige Zielproteine wie Integrine (Erb *et al.*, 2001), die Prozessierung des amyloid precursor proteins (APP) (Camden *et al.*, 2005), den nerve growth factor (NGF)-Signalweg (Arthur *et al.*, 2005) sowie die Expression der Azetylcholinesterase und der early growth response (EGR)-Familie (McKee *et al.*, 2006; Siow *et al.*, 2005). Weiterhin konnte ein mit ATP induzierter, durch P2Y-Rezeptoren vermittelter, intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Anstieg in Neuronen des *Cortex*, des *Cerebellums*, der *Medulla spinalis* und *Medulla oblongata* beobachtet werden (Chessell *et al.*, 1997; Ikeuchi *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 2006; Lalo *et al.*, 1998; Prothero *et al.*, 2000).

Purinerge Signale nehmen demnach vielfältige physiologische Aufgaben im ZNS wahr, von denen einige über einen Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration vermittelt werden.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Übergeordnetes Gesamtziel dieser Arbeit war die iPS-Zell-basierte Modellierung der molekularen Pathogenese der Machado-Joseph Erkrankung.

Die Erforschung der erblichen, neurodegenerativen Machado-Joseph Erkrankung, die momentan nur symptomatisch behandelt werden kann, ist durch die mangelnde Verfügbarkeit von patientenspezifischen Neuronen limitiert. Pluripotente Stammzellen bieten durch ihr Proliferations- und Differenzierungspotential die Möglichkeit *in vitro* nahezu unbegrenzt Neurone zu generieren. Erstes Ziel dieser Dissertation war deswegen die Reprogrammierung von aus MJD-Patienten und nicht betroffenen Kontrollpersonen gewonnenen Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen. Die Qualität der etablierten MJD-iPS-Zelllinien sollte durch eine stringente Kontrolle ihrer Stammzell- und

Differenzierungseigenschaften gewährleistet werden.

Zur beschleunigten und standardisierten, neuronalen Differenzierung sollten die den Qualitätsmerkmalen entsprechenden iPS-Zelllinien durch Adaption eines bestehenden Protokolls in die neurale Stammzellpopulation der It-NES-Zellen differenziert werden. Eine Analyse von spezifischen It-NES-Markern und des neurogenen Differenzierungspotentials sollte die erfolgreiche Generierung sicherstellen.

Schließlich sollte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in aus It-NES-Zellen abgeleiteten Neuronen durch Glutamat- und ATP-Stimulation moduliert und deren Einfluss auf die Aggregation von expandiertem Ataxin-3 zu SDS-unlöslichen Mikroaggregaten und mikroskopisch detektierbaren NIs analysiert werden. Auf diese Weise sollten Einblicke in molekulare Pathomechanismen von MJD anhand eines humanisierten *in vitro*-Modells auf Basis der iPS-Zelltechnologie gewonnen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Zelllinien, chemische und biologische Werkstoffe

#### 2.1.1 Geräte

Im Folgenden findet sich eine nach Alphabet geordnete Auflistung der in dieser Dissertation verwendeten Geräte inklusive des Herstellers und seines Firmensitzes.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Autoklav	DX-150	Systec	Wettenberg
Binokular	SMZ 1500	Nikon GmbH	Düsseldorf
Brutschrank	HERAcell 150	Heraeus	Hanau
Chemieluminszenzdetektion	ChemiDocXRS	Bio-Rad	München
Digitalkamera	3CCD Color Video Canon Power Shot G5	Sony Canon	Köln Krefeld
Einfrierbehälter	“Mr. Frosty” 5100 Cryo 1°C	Nalgene	Roskilde, Dänemark
Fluoreszenzkamera	Axiocam MRc CCD Camera	Carl Zeiss TILL Photonics	Jena Planegg
Fluoreszenzlampe	HAL100	Carl Zeiss	Jena
Fluoreszenzmikroskop	Axiobserver.Z1 Axioskop 2 Axiovert 200M Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss	Jena
Gefrierschrank -20°C/-80°C	HERAfreeze	Kendro	Hanau
Geldokumentation	Geldoc2000	Bio-Rad	München
Gelelektrophoresekammer	Agagel Mini XCell SureLock Mini-Cell Protean III Mini Gel System	Biometra Life Technologies  Bio-Rad	Göttingen Darmstadt  München
Inverses Lichtmikroskop	Axiovert 40C	Carl Zeiss	Jena
Konfokales Mikroskop	laser scanning Microscope Eclipse Ti	Nikon	Tokio, Japan
Kühlschrank 4°C	KGEE36A G 2013 Comfort	Bosch Liebherr	Gerlingen Lindau
Magnetrührer	SB162	Stuart Scientific	Staffordshire, GB
Mikropipette	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg
PCR-Block	Triblock T3000	Biometra	Göttingen
pH-Meter	FE20 Five Easy	Mettler Toledo	Gießen
Photometer	Smart Spec 3000	Bio-Rad	München
Pipettierhilfe	Accu-Jet	Brand	Wertheim
Real time Thermocycler	iCycler realplex mastercycler	Bio-Rad Eppendorf	München Hamburg
S2-Zentrifuge	Megafuge 16R	Thermo Scientific	Waltham, USA
Schüttelinkubator	Innova 4300	New Brunswick Sci.	Nürtingen
Schüttler	Roto-Shake Genie Vortex-2 Genie	Scientific Industries	New York, USA
Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000	Peqlab	Erlangen
Sterile Werkbank (horizontal)	HERAGuard	Kendro	Hanau
Sterile Werkbank (vertikal)	HERAsafe	Kendro	Hanau
Stickstofftank	MVE 611	Chart Industries	Burnsville, USA
Thermomixer	Thermomixer Compact	Eppendorf	Hamburg

Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg
TLDA-Array-Reader	ViiA 7	Life Technologies	Darmstadt
Ultrazentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	Kendro	Hanau
UZ-Rotor	Sorvall SS-34	Kendro	Hanau
Vakuum-Absaugpumpe	Vacuubrand	Brand	Wertheim
Vakuum-Konzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf	Hamburg
Waagen	LA310S BL610	Satorius Satorius	Göttingen Göttingen
Wasserbad	W22	Medien-GKS	Dresden
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Faust	Halle
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Kendro	Hanau
Zentrifugenbecher	Ultra Cone Polyallomer	Seton	Petaluma, USA

## 2.1.2 Software

Die folgende Liste bildet eine Zusammenstellung der bei der Erstellung dieser Dissertation verwendeten Software, des Herstellers und seines Firmensitzes.

Software	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems Inc.	Berkeley, USA
	Adobe Illustrator CS3	Adobe Systems Inc.	Berkeley, USA
	Axiovision LE	Carl Zeiss	Jena
	Excel	Microsoft	Redmond, USA
	ImageJ	Wayne Rasband	USA
	NIS elements AR 3.2	Nikon	Tokio, Japan
	OpenLab	PerkinElmer	Hamburg
	Origin8	OriginLab Corporation	Northampton, USA
	Powerpoint	Microsoft	Redmond, USA
	Servier Medical Art ppt image bank	Servier Laboratories Ltd.	Paris, Frankreich
ZEN	Carl Zeiss	Jena	
Primerdesign	Primer3	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/</a>	
qRT-PCR-Analyse	Excel q96gene Makro	Microsoft	Redmond, USA
	iCycler analysis software realplex analysis software	Bio-Rad Eppendorf	München Hamburg
Western-Blot- und Agarose-Gel-Dokumentation	Quantity One	Bio-Rad	München

## 2.1.3 Plastikware

Plastikware	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Einfrierröhrchen	Cryovials 1 ml, 1,8 ml	Nunc	Wiesbaden
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon tubes	BD Biosciences Corning Greiner Bio	Heidelberg Kaiserslautern Frickenhäuser
Parafilm	Parafilm	Pechinery	Chicago, USA
PCR-Platte (96 well)	Standard 96 Well PCR Plate	Peqlab	Erlangen
PCR-Plattenfilm	Adhesive PCR Film	Peqlab	Erlangen
PCR-Reaktionsgefäßstreifen (0,2 ml)	PCR Tube Stripes 0,2 ml		
Petri-Schalen (6 cm)	BD Falcon Petri Dishes	BD Biosciences	Heidelberg
Petri-Schalen (10 cm)	VWR Petri Dishes	VWR International	West Chester, USA
Plastikspritzen	Syringe	BD Biosciences	Heidelberg
Serologische Pipetten (2 ml, 5ml, 10 ml, 25 ml)	<u>Serological Pipettes</u>	SarstedtNümbrecht	Nümbrecht

Sterilfilter (Flaschen)	SteriTop	Merck Millipore	Darmstadt
Sterilfilter (Spritzen)	syringe filter (0,2 µm) syringe filter (0,45 µm)	PALL Corporation Whatman Schleicher & Schuell	Dreieich Dassel
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Reaction Tubes	Sarstedt	Nürnbrecht
Zellkulturflasche (T75, T175)	Tissue culture flask	Corning	Kaiserslautern
Zellkulturplatte (6-Well, 12-Well)	6-well plate, 12-well plate	Nunc	Wiesbaden
Zellkulturplatte (24-Well, 96-Well)	Costar 24-well plate Costar 96-well plate	Corning	Kaiserslautern
Zellkulturschale (3,5 cm, 6 cm)	Falcon tissue culture dish	BD Biosciences	Heidelberg
Zellkulturschale (15 cm)	Tissue culture dish	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Costar cell scraper	Corning	Kaiserslautern
Zellsieb	Cellsieve Cell Strainer 40 µM Nylon	BD Biosciences	Heidelberg

### 2.1.4 Chemikalien, allgemein

Sofern möglich wurden die Chemikalien in einer für Analysezwecken ausreichenden Reinheit bezogen. Für die Zellkultur wurden, wenn verfügbar, als „cell culture tested“ deklarierte Reagenzien verwendet.

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
3-Methyladenin	Sigma-Aldrich	Hamburg
Agarose	Peqlab	Erlangen
Adenosintriphosphat Magnesiumsalz	Sigma-Aldrich	Hamburg
Advanced DMEM	Life Technologies	Darmstadt
ALLN	Enzo Life Sciences	Lörrach
Ameisensäure ( <i>formic acid</i> , FA)	Carl Roth	Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth	Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth	Karlsruhe
B27 Supplement	Life Technologies	Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Proteinbiochemie) Life Technologies (Zellkultur)	Karlsruhe Darmstadt
BDNF (rhBDNF)	R&D Systems	Wiesbaden
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth	Karlsruhe
BSA Fraction V	Carl Roth	Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth	Karlsruhe
Carbenicillin Dinatriumsalz	Carl Roth	Karlsruhe
Chloroquin	Sigma-Aldrich	Hamburg
Coffein	Sigma-Aldrich	Hamburg
Collagenase Typ IV	Life Technologies	Darmstadt
DAPI	Sigma-Aldrich	Hamburg
DAPT	Sigma-Aldrich	Hamburg
DNA Ladder (100 bp)	New England Biolabs	Frankfurt
DNA Ladder (1 kb)	New England Biolabs	Frankfurt
db-cAMP	Enzo Life Sciences	Lörrach
D-Glucose	Sigma-Aldrich	Hamburg
DMEM/F-12 (1:1)	Life Technologies	Darmstadt
DMEM high glucose	Life Technologies	Darmstadt
DMSO	Fluka (Molekularbiologie) Sigma-Aldrich (Zellkultur)	Bad Homburg Hamburg
EDTA	Sigma-Aldrich	Hamburg
EGTA	Sigma-Aldrich	Hamburg
EGF	R&D Systems	Wiesbaden
Essigsäure	Carl Roth	Karlsruhe
Ethanol	Merck Millipore	Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich	Hamburg
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	Life Technologies	Darmstadt
bFGF (=FGF-2)	R&D Systems	Wiesbaden
bFGF (=FGF-2)	Life Technologies	Darmstadt

Fibronektin (Fn)	Sigma-Aldrich	Hamburg
Forskolin	Sigma-Aldrich	Hamburg
Fluorescein (1 mM)	Bio-Rad	München
FuGENE HD transfection reagent	Roche	Penzberg
Fura-2-AM	Life Technologies	Darmstadt
G-MEM (+ Pyruvat)	Life Technologies	Darmstadt
GDNF (rhGDNF)	R&D Systems	Wiesbaden
Gelatine	Sigma-Aldrich	Hamburg
Gentamicin	Carl Roth	Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth	Karlsruhe
Glycin	Carl Roth	Karlsruhe
ddH <sub>2</sub> O (Ampuwa, steriles Wasser)	Fresenius Kabi	Bad Homburg
Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail, EDTA-free (100X)	Pierce	Bonn
HBSS Puffer	Life Technologies	Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth	Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich	Hamburg
HEPES	Sigma-Aldrich	Hamburg
Holo-Transferrin	Merck Millipore	Darmstadt
IGF-1 (rhIGF-1)	R&D Systems	Wiesbaden
Insulin	Sigma-Aldrich	Hamburg
Interleukin-4	R&D Systems	Wiesbaden
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich	Hamburg
Knockout DMEM	Life Technologies	Darmstadt
Knockout Serum Replacement (KOSR)	Life Technologies	Darmstadt
L-Ascorbic-Acid-2-Phosphat (Asc)	Sigma-Aldrich	Hamburg
Laminin (Ln)	Life Technologies Sigma-Aldrich	Darmstadt Hamburg
L-Glutamin	Life Technologies	Darmstadt
Magnesiumchlorid Sesquihydrat	Fluka	Bad Homburg
Magnesiumsulfat Hydrat	Carl Roth	Karlsruhe
Manganchlorid	Carl Roth	Karlsruhe
Matrigel	BD Biosciences	Heidelberg
Methanol	Carl Roth	Karlsruhe
Methylpyruvat	Sigma-Aldrich	Hamburg
Mowiol 4-88	Merck Millipore	Darmstadt
mTeSR1	STEMCELL Technologies	Köln
N2 Supplement	PAA	Cölbe
Natriumazid	Merck Millipore	Darmstadt
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich	Hamburg
Natriumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumselenit	Sigma-Aldrich	Hamburg
Neurobasal Medium	Life Technologies	Darmstadt
Non-essential amino acids (NEAA)	Life Technologies	Darmstadt
Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard	Life Technologies	Darmstadt
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X)	Life Technologies	Darmstadt
NuPAGE® Novex® 10% Bis-Tris Protein Gels, 1.5 mm, 10 well	Life Technologies	Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich	Hamburg
Opti-MEM	Life Technologies	Darmstadt
Phosphate buffered saline (PBS)	Life Technologies	Darmstadt
PeqGOLD dNPT set	Peqlab	Erlangen
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies	Darmstadt
PIPES	Sigma-Aldrich	Hamburg
Polybren	Sigma-Aldrich	Hamburg
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich	Hamburg
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich	Hamburg
Pyruvat (Na <sup>+</sup> )	Life Technologies	Darmstadt
Retinsäure (RA)	Sigma-Aldrich	Hamburg

RNase A	Life Technologies	Darmstadt
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth	Karlsruhe
SDS	Fluka	Bad Homburg
SYBR-green I	Sigma-Aldrich	Hamburg
3,3',5-Triiodo-L-thyronin (T3)	Sigma-Aldrich	Hamburg
TEMED	Fluka	Bad Homburg
Tris Base	Sigma-Aldrich	Hamburg
Tris-HCl	Sigma-Aldrich	Hamburg
Triton-X100	Sigma-Aldrich	Hamburg
Trypan Blau	Life Technologies	Darmstadt
Trypsin-EDTA	Life Technologies	Darmstadt
Trypsin-Inhibitor	Life Technologies	Darmstadt
Trypton	Carl Roth	Karlsruhe
Xylenyanol	Carl Roth	Karlsruhe

### 2.1.5 Inhibitoren

Die folgende Liste stellt die verwendeten Inhibitoren und den von ihnen modulierten Signalweg sowie den Hersteller mit Firmensitz zusammen.

Bezeichnung	Inhibierter Signalweg	Hersteller	Firmensitz
CHIR99021	GSK3 WNT Agonist	Stemgent	Bergisch Gladbach
Dorsomorphin	BMP/SMAD 1,5,8	Sigma-Aldrich	Hamburg
Purmorphamin	Patched Smoothend Agonist	Merck Millipore	Darmstadt
SAG	Patched Smoothend Agonist	Merck Millipore	Darmstadt
SB431542	TGFb/SMAD 2,3	Sigma-Aldrich	Hamburg
WNT-C59	Porcupin/WNT	Xcess Biosciences Inc.	San Diego, USA
Y-27632	RhoA/ROCK	Merck Millipore	Darmstadt

### 2.1.6 Enzyme

Die zur Restriktionsanalyse von Plasmiden genutzten Endonukleasen wurden alle von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Im Folgenden eine Liste der weiteren Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Collagenase Typ IV	Life Technologies	Darmstadt
Dispase	Life Technologies	Darmstadt
DNase I (Zellkultur)	Worthington (Cell Systems)	St. Katharinen
GoTag DNS Polymerase	Promega	Mannheim
iScript Reverse Transkriptase	Bio-Rad	München
RQ1 RNase-free DNase	Promega	Mannheim

### 2.1.7 Kits

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Alkaline Phosphatase Substrate Kit III SK-5300	Vector Laboratories	Burlingame, USA
BCA Protein Assay Reagent	Pierce	Bonn
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	Hilden
GoTag Flexi DNA polymerase Kit	Promega	Mannheim
NucleoBond® Xtra EF	Macherey-Nagel	Düren
RNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	Hilden
RQ1 DNase I kit	Promega	Mannheim
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce	Bonn

## 2.1.8 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Firmensitz
$\alpha$ -AFP (Kaninchen, IgG)	1 : 100	Dako	Hamburg
$\alpha$ -Ataxin-3 (3UIM) (Kaninchen, IgG)	1 : 100	Schmidt <i>et al.</i> , 1998	Tübingen
$\alpha$ - $\beta$ III-Tubulin (Kaninchen, IgG)	1 : 1000	Covance	Denver, USA
$\alpha$ - $\beta$ III-Tubulin (Maus, IgG)	1 : 1000-4000	Covance	Denver, USA
$\alpha$ -CD13 PE (Maus, IgG)	1 : 50	BioLegend	Fell
$\alpha$ -DACH1 (Kaninchen, IgG)	1 : 100	Proteintech	Herford
$\alpha$ -GABA (Kaninchen, IgG)	1 : 300	Sigma-Aldrich	Hamburg
$\alpha$ -GFAP 488 (GA5) Konjugat (Maus, IgG)	1 : 100	Cell Signaling	Danvers, USA
$\alpha$ -MAB2ab (Maus, IgG)	1 : 500	Sigma-Aldrich	Hamburg
$\alpha$ -Nestin (Kaninchen, IgG)	1 : 200	Millipore	Schwalbach
$\alpha$ -PLZF (Maus, IgG)	1 : 25	Calbiochem	Läufelfingen
$\alpha$ -SMA (Maus, IgG)	1 : 100	Dako	Hamburg
$\alpha$ -SOX2 (Maus, IgG)	1 : 500	R&D Systems	Wiesbaden
$\alpha$ -SSEA-3 (Ratte, IgM)	1 : 80	ESTOOLS Konsortium	Sheffield
$\alpha$ -SSEA-4 (Maus, IgG)	1 : 80	ESTOOLS Konsortium	Sheffield
$\alpha$ -TRA-1-60 (Maus, IgM)	1 : 500	Millipore	Schwalbach
$\alpha$ -TRA-1-81 (Maus, IgM)	1 : 500	Millipore	Schwalbach
$\alpha$ -Ubiquitin (Maus, IgG)	1 : 25	Cell Signaling	Danvers, USA
$\alpha$ -ZO-1 (Kaninchen, IgG)	1 : 100	Life Technologies	Darmstadt

Sekundäre Antikörper (Konjugat)	Verdünnung	Hersteller	Firmensitz
$\alpha$ -Maus IgG (Alexa 488) (Ziege, IgG)	1 : 500-1000	Life Technologies	Darmstadt
$\alpha$ -Maus IgG (Alexa 555) (Ziege, IgG)	1 : 500-1000	Life Technologies	Darmstadt
$\alpha$ -Maus IgM (Alexa 555) (Ziege, IgG)	1 : 1000	Life Technologies	Darmstadt
$\alpha$ -Ratte IgM (Cy3) (Ziege, IgG)	1 : 200	Jackson/Dianova	Hamburg
$\alpha$ -Kaninchen IgG (Alexa 488) (Ziege, IgG)	1 : 1000	Life Technologies	Darmstadt
$\alpha$ -Kaninchen IgG (Alexa 555) (Ziege, IgG)	1 : 250-1000	Life Technologies	Darmstadt

Die folgenden Antikörper wurden für Immunblotanalysen verwendet.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Firmensitz
$\alpha$ -Ataxin-3 (1H9) (Maus, IgG)	1 : 1000	Millipore	Schwalbach
$\alpha$ -Ataxin-3 (986) (Kaninchen, IgG)	1 : 5000	Haacke <i>et al.</i> , 2006	Martinsried

Sekundäre Antikörper (Konjugat)	Verdünnung	Hersteller	Firmensitz
$\alpha$ -Maus IgG (HRP) (Ziege, IgG)	1 : 1000	Pierce	Bonn
$\alpha$ -Kaninchen IgG (HRP) (Ziege, IgG)	1 : 1000	Pierce	Bonn

## 2.1.9 Plasmide

Alle Plasmide wurden von Addgene (Cambridge, USA) bezogen.

Name	Addgene- Nummer	Referenz
pMXs-hOCT4	17217	Takahashi <i>et al.</i> , 2007
pMXs-hSOX2	17218	Takahashi <i>et al.</i> , 2007
pMXs-hKLF4	17219	Takahashi <i>et al.</i> , 2007
pMXs-hc-MYC	17220	Takahashi <i>et al.</i> , 2007
pMSCV-Flag-hOCT4	20072	Aasen <i>et al.</i> , 2008
pMSCV-Flag-hSOX2	20073	Aasen <i>et al.</i> , 2008
pMSCV-Flag-hKLF4	20074	Aasen <i>et al.</i> , 2008

pMSCV-Flag-hc-MYC T58A	20075	Aasen <i>et al.</i> , 2008
pMD2.G	12259	Labor von Didier Trono

### 2.1.10 Synthetische Oligonukleotide

Alle selbst entworfenen Primer wurden mit Primer3 erstellt und von der Firma Life Technologies (Darmstadt) in lyophilisierter, entsalzter Form bezogen. Die Stocklösungen wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µM eingestellt. Für die Arbeitslösungen wurde eine gemischte 1:30 Verdünnung von *forward* (fw) und *reverse* (rev) Primer erstellt.

Transkript		Sequenz	T <sub>anneal</sub> [°C]	Referenz
Ataxin-3 (genomisch)	fw rev	CCAGTGACTACTTTGATTTCG CATGATGAATGGTGAGCAGG	54	Sun <i>et al.</i> , 2011
c-MYC endo	fw rev	TTCGGGTAGTGAAAAACCAC CCTCCTCGTCGCAGTAGAAA	60	Diese Arbeit
c-MYC total	fw rev	AAGACTCCAGCGCCTTCTCT TCTTGTTCTCCTCAGAGTCG	60	Diese Arbeit
GAPDH	fw rev	TGACAACCTTTGGTATCGTGGA CCAGTAGAGGCAGGGATGAT	60	Borghese <i>et al.</i> , 2010
KLF4 endo	fw rev	GACCAGGCACTACCGTAAACA CTGGCAGTGTGGGTCATATC	60	Diese Arbeit
KLF4 total	fw rev	CCCAATTACCCATCCTTCT ACGATCGTCTTCCCTCTTT	60	Diese Arbeit
OCT4 endo	fw rev	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAG GTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC	60	Takahashi <i>et al.</i> , 2007
OCT4 total	fw rev	GTGGAGGAAGCTGACAACAA ATTCTCCAGGTTGCCTCTCA	60	Babaie <i>et al.</i> , 2007
P2RX4	fw rev	CACCCACAGCAACGGAGTCT TTTGATGGG GCTGTGGAGAG	55	Lee <i>et al.</i> , 2010
P2RX7	fw rev	ATACAGTTTCCGTGCGCTTG AACGGATCCCGAAGACTTTT	51	Feng <i>et al.</i> , 2006
P2RY1	fw rev	ATTCATGGCCCGCGCGAA CGGAAAAGCCAGCGAGCGGA	60	Diese Arbeit
P2RY2	fw rev	GACGGCACCTGAGAGGAGAAG TGCAGGGAAGTCTGCGGGAAA	60	Diese Arbeit
P2RY11	fw rev	GGCTGAGGATCGGCACGGGAG ATGCTGAAGCGGTACAGGGCCA	60	Diese Arbeit
SOX2 endo	fw rev	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC	60	Babaie <i>et al.</i> , 2007
SOX2 total	fw rev	GCCGAGTGAAACTTTTCTCG GCAGCGTGTACTTATCCTTCTT	60	Bourguignon <i>et al.</i> , 2008

### 2.1.11 Bakterienstämme

Zur Amplifikation der retroviralen Vektoren wurde der *E.-coli* Stamm Stbl3, für die Amplifikation des Plasmids zur Virushüllproduktion der Stamm DH5α genutzt. Eine Auflistung der genotypischen Eigenschaften findet sich folgend.

Stamm	Addgene- Nummer	Referenz/Hersteller
DH5α	F <sup>-</sup> , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) <i>supE44</i> , λ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983/ Life Technologies
Stbl3	F <sup>-</sup> <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>xyI-5 λ<sup>-</sup> leu mtl-1</i>	Chakiath und Esposito, 2007/ Life Technologies

### 2.1.12 Bezogene murine und humane Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden zur Virusproduktion (Phoenix-GP, Plat-A) bzw. die humanen ES-Zellen (H9, I3) als Referenzlinien genutzt. Die murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) des Mausstamms CD1 wurden als Feeder für die Kultur der humanen pluripotenten Stammzellen verwendet.

Bezeichnung	Artikelnummer	Referenz	Hersteller/Quelle	Firmensitz
CD1	Strain Code: 022	/	Charles River	Sulzfeld
H9	/	Thomson <i>et al.</i> , 1998	Jones Lab	Madison, USA
I3	/	Amit <i>et al.</i> , 2002	Itzkovitz-Eldor Lab	Haifa, Israel
Phoenix-GP	CRL-3215	/	ATCC	Wesel
Platinum-A (Plat-A)	RV-102	/	Cell Biolabs Inc.	San Diego, USA

### 2.1.13 Parentale Fibroblastenlinien und iPS-Zelllinien

Die Fibroblastenlinien dieser Arbeit wurden unter technischer Assistenz von Viola Poppe (geb. Dobberahn) zu iPS-Zelllinien reprogrammiert. Die Fibroblastenlinie iLB-C31f wurde von Matthias Brandt reprogrammiert; ihre Validierung wird an anderer Stelle publiziert. Die in dieser Arbeit aus Vereinfachungsgründen als Ctrl6 bezeichnete Linie ist die hES-Zelllinie I3.

Name in dieser Arbeit	polyQ-Länge	SARA	Alter Diagnose	Alter Biopsie	Life&Brain-Kennung	Fibroblasten	♀/♂	Vektor-system
Ctrl1-12	n.b.	-	-	34	iLB-C1-30m-r12	iLB-C1-30m	♂	pMXs
Ctrl1-17	n.b.	-	-	34	iLB-C1-30m-r17	iLB-C1-30m	♂	pMXs
Ctrl2-2	n.b.	-	-	68	iLB-C2-36m-r2	iLB-C2-36m	♂	pMSCV
Ctrl2-8	n.b.	-	-	68	iLB-C2-36m-r8	iLB-C2-36m	♂	pMSCV
Ctrl5-3	n.b.	-	-	24	iLB-C31f-r3	iLB-C31f	♀	pMXs
MJD1-9	74/22	22,5	31	38	iLB-MJD1-32m-r9	iLB-MJD1-32m	♂	pMXs
MJD1-11	74/22	22,5	31	38	iLB-MJD1-32m-r11	iLB-MJD1-32m	♂	pMXs
MJD2-2	74/21	23,0	30	40	iLB-MJD2-29m-r2	iLB-MJD2-29m	♂	pMSCV
MJD2-9	74/21	23,0	30	40	iLB-MJD2-29m-r9	iLB-MJD2-29m	♂	pMSCV
MJD3-5	73/27	12	28	42	iLB-MJD3-33f-r5	iLB-MJD3-33f	♀	pMSCV
MJD3-8	73/27	12	28	42	iLB-MJD3-33f-r8	iLB-MJD3-33f	♀	pMSCV
MJD4-1	73/20	10,5	26	41	iLB-MJD4-34m-r1	iLB-MJD4-34m	♂	pMSCV
MJD4-8	73/20	10,5	26	41	iLB-MJD4-34m-r8	iLB-MJD4-34m	♂	pMSCV

Ctrl1 ist der nicht-betroffene Bruder von MJD1. Ctrl2 der nicht betroffene Vater von MJD2. MJD3 und MJD4 sind Cousins ersten Grades. SARA = Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (möglicher Bereich von 0-40). n.b. = nicht bestimmt.

### 2.1.14 Lösungen für die Zellkultur

Die folgende Liste gibt die Konzentration der Stocklösungen für die Arbeit in der Zellkultur und das dazugehörige Lösungsmittel an.

Stocklösung	Konzentration	Lösungsmittel
Asc	221 mM	ddH <sub>2</sub> O
B27 Supplement	50x	/
BDNF	10 µg/ml	ddH <sub>2</sub> O + 0,1% BSA
CHIR99021	10 mM	DMSO
Chloroquin	25 mM	ddH <sub>2</sub> O

Coffein	100 mM	N2-Medium
CNTF	10 µg/ml	ddH <sub>2</sub> O + 0,1% BSA
DAPT	10 mM	DMSO
db-cAMP	100 mM	ddH <sub>2</sub> O
D-Glucose	160 mg/ml	DMEM/F12 (GlutaMAX, sterilfiltriert)
DNase	10 mg/ml	HBSS -Mg <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> , sterilfiltriert
Dorsomorphin	5 mM	DMSO
EGF	10 µg/ml	ddH <sub>2</sub> O + 0,1% BSA + 10 mM Essigsäure (anhydrat)
FGF2	10 µg/ml	ddH <sub>2</sub> O + 0,1% BSA
Fibronektin	1 mg/ml	PBS
Forskolin	10 mM	DMSO
GDNF	10 µg/ml	ddH <sub>2</sub> O + 0,1% BSA
Gentamicin	50 mg/ml	ddH <sub>2</sub> O
IGF-1	100 µg/ml	ddH <sub>2</sub> O + 0,1% BSA
IL-4	20 µg/ml	ddH <sub>2</sub> O + 0,1% BSA
Insulin	5 mg/ml	1% Essigsäure
Methylpyruvat	10 M (1,13 g/ml)	/
N2 Supplement	100x	/
Laminin	1 mg/ml	ddH <sub>2</sub> O
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	100x	/
Polybren	4 mg/ml	ddH <sub>2</sub> O
Poly-D-Lysin	1 mg/ml	ddH <sub>2</sub> O
Poly-L-Ornithin	1,5 mg/ml	ddH <sub>2</sub> O
Purmorphamin	10 mM	DMSO/Ethanol 1:1
Retinsäure	1 mM	DMSO/Ethanol 1:100
SAG	1 mM	ddH <sub>2</sub> O
SB431542	50 mM	DMSO
T3	45 µM	30 mM NaOH
Y-27632	10 mM	ddH <sub>2</sub> O
WNT-C59	1 mM	DMSO
Wortmannin	1 mM	DMSO

Die folgenden Arbeitslösungen wurden in der Zellkultur verwendet.

Lösung	Konzentration	Lösungsmittel
3-Methyladenin	10 mM	DMEM/F12 (L-Glutamin), sterilfiltriert
Collagenase Typ IV	1 mg/ml	Knockout-DMEM
Dispase	0,15 mg/ml	N2-Medium, sterilfiltriert
Gelatine	0,1%	ddH <sub>2</sub> O, autoklaviert
Matrigel	/	Knockout-DMEM
Poly-D-Lysin	10 µg/ml	PBS
Poly-L-Ornithin	15 µg/ml	ddH <sub>2</sub> O
Trypsin-EDTA	1x	PBS
Trypsin-Inhibitor	0,5 mg/ml	PBS

### 2.1.15 Lösungen für die Immunfluoreszenz

Lösung	Konzentration	Lösungsmittel
DAPI	0,1 µg/ml	HBSS +Mg <sup>2+</sup> +Ca <sup>2+</sup> + 0,1% Natriumazid
Mowiol 4-88	0,415 g/ml	ddH <sub>2</sub> O + 1 g/ml Glycerin : 2(v) Tris-HCl (pH 8,5)
PFA	4%	PBS
Triton-X-100	10%	PBS

Blockierungslösung	Finale Konzentration
HBSS +Mg <sup>2+</sup> +Ca <sup>2+</sup>	89,9%(88,9%)
FCS	10%
Natriumazid	0,1%
10% Triton-X-100*	(0,1%)

Detektionslösung	Finale Konzentration
HBSS +Mg <sup>2+</sup> +Ca <sup>2+</sup>	94,9%(93,9%)
FCS	5%
Natriumazid	0,1%
10% Triton-X-100*	(0,1%)

\*Triton-X-100 wird nur bei intrazellulären Epitopen hinzugegeben, um die Zellmembran zu permeabilisieren.

### 2.1.16 Bakteriennährmedien

Alle Bakteriennährmedien wurden zu Sterilisation vor Gebrauch 20 min autoklaviert (121°C, 1000 hPa). Der TB-Puffer wurde mit einem 0,2 µm-Sterilfilter filtriert.

(Luria-Bertani; Sambrook et al., 1989)

LB-Medium	Finale Konzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

mit NaOH auf pH 7,5  
zu 1 l mit ddH<sub>2</sub>O

TB-Puffer	Finale Konzentration
PIPES	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	250 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM

mit KOH auf pH 6,7  
sterilfiltrieren

(Hanahan, 1983)

SOB-Medium	Finale Konzentration
Trypton	2%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

für SOC-Medium nach Autoklavieren  
D-Glucose bis 20 mM final dazugeben

### 2.1.17 Puffer und Lösungen zur Arbeit mit Nukleinsäuren

TAE (50x)	
242 g	Tris Base
57,1 ml	Essigsäure
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O und bei RT lagern

PCR-Supermix (2x)	
1520 µl	ddH <sub>2</sub> O
2000 µl	5 × GoTaq Flexi Buffer Green
1000 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
80 µl	dNTPs (100 mM je 20 µl)
400 µl	DMSO

PCR-Mix Alleltest Ataxin-3 (2x)	
2520	ddH <sub>2</sub> O
2000 µl	5 × GoTaq Flexi Buffer Green
400	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
80 µl	dNTPs (100 mM je 20 µl)

qRT-PCR-Supermix (2x)	
1511,5 µl	ddH <sub>2</sub> O
2000 µl	5 × GoTaq Flexi Buffer (farblos)
1000 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
80 µl	dNTPs (100 mM je 20 µl)
400 µl	DMSO
7,5 µl	SYBR-green I (1000 ×)
1 µl	Fluorescein (100 µM)

TE <sup>4</sup>	
1 ml	Tris (1 M, pH 8.0)
20 µl	EDTA (0.5 M, pH 8.0)

auf 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O

DNS-Ladepuffer (10x)	
30%	Glycerin
0,05 g	Bromophenolblau NaCl
0,05 g	Xylenyanol

auf 50 ml mit ddH<sub>2</sub>O

Die Supermixe werden aliquotiert und bei -20°C gelagert. 20 µl 100 mM von jedem einzelnen dNTP (dATP/dCTP/dGTP/dTTP) im Supermix ergibt final eine Konzentration von 0,4 mM im Reaktionsansatz.

## 2.1.18 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie

4x SDS-Sammelgel-Puffer (pH 6,8)	
0,5 M	Tris Base (pH 6,8)
0,4%	SDS

4x SDS-Laufgel-Puffer (pH 8,8)	
1,5 M	Tris Base (pH 8,8)
0,4%	SDS

10x SDS-PAGE-Laufpuffer	
0,25 M	Tris Base (pH 8,3)
1,92 M	Glycin
1%	SDS

SDS-PAGE-Sammelgel 4% (für 4 Gele)	
960 µl	Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)
1,8 ml	4x SDS-Sammelgel-Puffer (pH 6,8)
4,16 ml	ddH <sub>2</sub> O
4,32 µl	TEMED (99%)
79,8 µl	10% APS

10x Tris buffered saline (TBS)-Puffer	
250 mM	Tris Base (pH 7,4)
1,5 M	NaCl

TBS-T	
100 ml	10x TBS-Puffer (pH 7,4)
899 ml	ddH <sub>2</sub> O
1 ml	Tween-20

RIPA-TX	
50 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
0,2 %	Triton-X 100
25 mM	EDTA

4x Laemmli-Ladepuffer	
277,8 mM	Tris Base (pH 6,8)
8,9%	SDS
44,4%	Glycerin
0,02%	Bromphenolblau NaCl

frisch 10% [v/v] β-Mercaptoethanol dazugeben

SDS-PAGE-Trenngel 10% (für 4 Gele)	
6,66 ml	Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)
5 ml	4x SDS-Laufgel-Puffer (pH 8,8)
8,1 ml	ddH <sub>2</sub> O
12 µl	TEMED (99%)
228 µl	10% APS

10x Immunblot-Transferpuffer	
0,25 M	Tris Base
1,92 M	Glycin

für 1x 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O und 10% [v/v] Methanol

Immunblot-Blockierungspuffer	
10%	Milchpulver [w/v]
90%	TBS-T

Immunblot-Detektionspuffer	
0,1%	Milchpulver [w/v]
99,9%	TBS-T

RIPA-SDS	
50 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
0,2 %	Triton-X 100
25 mM	EDTA
2%	SDS [w/v]

## 2.1.19 Zellkulturmedien

MEF-Medium	
88%	DMEM high glucose
10%	FCS
1%	NEAA
1%	Pyruvat (Na <sup>+</sup> )

2% Advanced MEF-Medium	
96%	Advanced DMEM
2%	FCS
1%	NEAA
1%	Pyruvat (Na <sup>+</sup> )

5% Advanced MEF-Medium	
93%	Advanced DMEM
5%	FCS
1%	NEAA
1%	Pyruvat (Na <sup>+</sup> )

hESC-Medium	
79%	Knockout DMEM
20%	KOSR
1%	NEAA
1 mM	L-Glutamin
0,1 mM	β-Mercaptoethanol
6 ng/ml	bFGF (Life Technologies)

Reprogrammierungsmedium	
79%	DMEM/F12 (L-Glutamin)
20%	KOSR
1%	NEAA
0,1 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
6 ng/ml	bFGF (Life Technologies)

EB1-Medium	
79%	Knockout DMEM
20%	KOSR
1%	NEAA
1 mM	L-Glutamin

EB2-Medium	
89%	GMEM (Pyruvat)
10%	KOSR
1%	NEAA
2 mM	L-Glutamin
1%	N2 Supplement
1 $\mu$ M	Dorsomorphin
5 $\mu$ M	SB431542

It-NES-Medium	
99,9%	N2-Medium
0,1%	B27 Supplement
10 ng/ml	bFGF (R&D)
10 ng/ml	EGF
im Verlauf der Arbeit wurde zusätzlich addiert:	
1 $\mu$ M	SAG
0,5 $\mu$ M	CHIR

Short Differentiation Medium (SDM) basal	
100%	N2-Medium (L-Glutamin)
15 ng/ml	BDNF
15 ng/ml	GDNF
15 ng/ml	IGF-1
10 $\mu$ M	DAPT
10 $\mu$ M	Y-27632
15 $\mu$ M	SB431542
221 $\mu$ M	Asc

SDM initial (d0-d2/4)	
100%	SDM basal
1 $\mu$ M	SAG
200 nM	RA

an d3 wurde 1  $\mu$ M WNT-C59 für d3-d4 addiert

N2-Medium	
97,5%	DMEM/F12 (L-Glutamin)
1%	N2 Supplement
0,5%	Insulin Stock
1%	D-Glucose Stock

Neural Induction Medium (NIM)	
100%	N2-Medium
1 $\mu$ M	Dorsomorphin
10 ng/ml	bFGF (R&D)

Neural Sphere Medium (NSM)	
100%	N2-Medium
20 ng/ml	bFGF (R&D)

Neural Expansion Medium (NEM)	
100%	N2-Medium
1 $\mu$ M	Dorsomorphin
10 ng/ml	bFGF (R&D)
0,8 $\mu$ M	Purmorphamin

Neural Growth Medium (NGM)	
50%	N2-Medium
49%	Neurobasal Medium
1%	B27 Supplement
1 mM	L-Glutamin

SDM Bedingung I.	
100%	N2-Medium (GlutaMAX)
15 ng/ml	BDNF
15 ng/ml	GDNF
15 ng/ml	IGF-1
10 $\mu$ M	DAPT
10 $\mu$ M	Y-27632
15 $\mu$ M	SB431542
1 $\mu$ M	SAG
200 nM	RA

an d3 wurde 1  $\mu$ M WNT-C59 für d3-d4 addiert

SDM Bedingung II.	
100%	N2-Medium (GlutaMAX)
15 ng/ml	BDNF
15 ng/ml	GDNF
15 ng/ml	IGF-1
10 $\mu$ M	DAPT
10 $\mu$ M	Y-27632
15 $\mu$ M	SB431542
221 $\mu$ M	Asc
1 $\mu$ M	SAG
200 nM	RA

an d3 wurde 1  $\mu$ M WNT-C59 für d3-d4 addiert

SDM Stimulation (d5-d8)	
100%	N2-Medium (GlutaMAX)
50 ng/ml	BDNF
15 ng/ml	GDNF
100 ng/ml	IGF-1
10 $\mu$ M	DAPT
10 $\mu$ M	Y-27632
15 $\mu$ M	SB431542
8 mM	Methylpyruvat
20 ng/ml	IL-4
1 mM	dbcAMP

Gliales Induktionsmedium (GI)	
90%	N2-Medium
10%	FCS
30 ng/ml	CNTF
45 nM	T3

Gliales Proliferationsmedium (GP)	
90%	N2-Medium
10%	FCS
20 ng/ml	bFGF (R&D)
20 ng/ml	EGF
45 nM	T3

nach P>2 wurden 10  $\mu$ M Forskolin addiert

Gliales Maturationsmedium (GM)	
97,8%	Neurobasal Medium
0,2%	B27 Supplement
1%	NEAA
1%	GlutaMAX
10 ng/ml	CNTF

Buffered Salt Solution (BSS)	
25 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
120 mM	NaCl
5,4 mM	KCl
15 mM	D-Glucose
1,8 mM	CaCl <sub>2</sub>
0,8 mM	MgCl <sub>2</sub>

It-NES-Freezing Medium	
65%	KOSR
25%	N2-Medium
10%	DMSO

SDM Bedingung III.	
100%	N2-Medium (GlutaMAX)
50 ng/ml	BDNF
15 ng/ml	GDNF
100 ng/ml	IGF-1
10 $\mu$ M	DAPT
10 $\mu$ M	Y-27632
15 $\mu$ M	SB431542
1 $\mu$ M	SAG
200 nM	RA

an d3 wurde 1  $\mu$ M WNT-C59 für d3-d4 addiert

SDM Bedingung IV.	
100%	N2-Medium (GlutaMAX)
50 ng/ml	BDNF
15 ng/ml	GDNF
100 ng/ml	IGF-1
10 $\mu$ M	DAPT
10 $\mu$ M	Y-27632
15 $\mu$ M	SB431542
221 $\mu$ M	Asc
1 $\mu$ M	SAG
200 nM	RA

an d3 wurde 1  $\mu$ M WNT-C59 für d3-d4 addiert

Ca <sup>2+</sup> -Imaging-Puffer (CIP)	
10 mM	HEPES (pH 7,2)
146 mM	NaCl
4 mM	KCl
10 mM	D-Glucose
2 mM	CaCl <sub>2</sub>
für Messung ohne CaCl <sub>2</sub> folgende Änderungen:	
147,5 mM	NaCl
5 mM	EGTA
0 mM	CaCl <sub>2</sub>

MEF-Freezing Medium	
90%	FCS
10%	DMSO

iPS-Freezing Medium	
90%	KOSR
10%	DMSO

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden zur Arbeit mit Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Generierung von Transformations-kompetenten *E.Coli*

Pipetten und Falcon Röhrchen sollten bei -20°C vorgekühlt und die Arbeiten in einem 4°C-Kühlraum durchgeführt werden.

*E.Coli*-Bakterien können über ein Protokoll von Inoue und Kollegen Transformations-kompetent gemacht werden (Inoue *et al.*, 1990). Von einer *E.Coli*-Kolonie wurde eine ÜN-Kultur in LB-Medium angeimpft. Von dieser wurden drei Kolben mit 250 SOB-Medium mit je 1 ml, 1,5 ml oder 2 ml der LB-Kultur versehen und bei 18-20°C in 250 ml SOB-Medium ohne Antibiotika vermehrt bis eine der Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreichte. Diese Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und die Bakterien bei 4000 rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und anschließend wieder bei 4000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Bakterien wurden vorsichtig in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und tropfenweise 1,4 ml DMSO zugegeben. Die kompetenten Zellen wurden in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.1.2 Transformation von kompetenten *E.Coli* (nach Inoue *et al.*, 1990)

Ein Aliquot der kompetenten *E.Coli*-Bakterien wurde 10 min auf Eis aufgetaut und 100 ng der Plasmid-DNS hinzupipettiert. Für die retroviralen Plasmide wurden Stb13, für pMD.2G DH5α verwendet. Durch leichtes Klopfen an das Reaktionsgefäß wurde die Lösung gemischt. Die Bakterien wurden weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C im Wasserbad induziert und die Bakterien für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C auf einem Thermomixer bei 500 rpm inkubiert.

#### 2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNS aus *E. coli*

250 ml LB-Medium mit dem der Plasmidresistenz entsprechenden Antibiotikum wurden mit einem Transformationsansatz angeimpft. Inkubation erfolgte in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen ÜN bei 37°C und 120 rpm. Die Bakterien wurden am nächsten Tag mittels Zentrifugation geerntet und die DNS über das NucleoBond® Xtra EF-Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.1.4 Präparation von genomischer DNS aus Gewebekulturen

Genomische DNS wurde aus 2-3 Millionen Zellen mit Hilfe des Qiagen DNeasy Blood & Tissue-Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Zur Entfernung von RNA-Kontamination wurde zusätzlich RNase A von Life Technologies verwendet. Lagerung erfolgte bei 4°C oder -20°C.

#### 2.2.1.5 Präparation von RNA

RNA wurde mittels Säulenaffinitätschromatographie über das RNeasy Blood & Tissue Kit aufgereinigt. Die eluierte mRNA wurde anschließend zur Beseitigung von genomischen DNS-Kontaminationen mit der RQ1 DNase für 1 h bei RT inkubiert und die Reaktion anschließend wie vom Hersteller angegeben abgestoppt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### 2.2.1.6 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Eine DNA-Lösung kann durch die Bestimmung der OD einer Wellenlänge von 260 nm in einem Photometer quantifiziert werden. Eine DNS-Konzentration von 50 µg/ml entspricht einer OD<sub>260</sub> von 1. Über den Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> kann die Reinheit der DNA bestimmt werden, wobei ein Quotient von  $\geq 1,8$  einer hinreichend reinen DNS-Lösung entspricht. Eine Erniedrigung des Quotienten zeigt eine Kontamination der DNS durch Proteine an, da die aromatischen Aminosäuren von Proteinen vorwiegend Licht der Wellenlänge von 280 nm absorbieren.

RNA-Lösungen hingegen werden bei einer Wellenlänge von 230 nm quantifiziert. Eine OD<sub>230</sub> von 1 entspricht 40 µg/ml RNA-Konzentration. Durch Bestimmung der OD<sub>280</sub> kann über den Quotienten OD<sub>230</sub>/OD<sub>280</sub> analog zur DNS die Reinheit der RNA bzw. deren Kontamination mit Proteinen bestimmt werden. Ein Quotient von 2 lässt auf eine ausreichend reine RNA-Lösung schließen.

Die Messungen wurden mit dem Spektrophotometer Nanodrop ND-1000 ausgeführt.

#### 2.2.1.7 Synthese von komplementärer DNS (complementary DNA, cDNA)

1 µg RNA wurde über die reverse Transkriptase iScript (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers in cDNS umgeschrieben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und 1 µl je PCR-Reaktion eingesetzt.

#### 2.2.1.8 Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Die PCR dient der Amplifikation von doppelsträngiger DNS-Fragmente (Saiki *et al.*, 1985). Ein typisches PCR-Programm besteht aus drei Schritten: Einem Denaturierungs-, einem Hybridisierungs- und einem Elongationsschritt. Die DNS-Doppelstränge werden bei hoher Temperatur (96-98°C) in zwei Einzelstränge denaturiert. Im folgenden

Hybridisierungsschritt hybridisieren zwei kurze synthetische Oligonukleotide (Primer) durch Abkühlen zu einer für sie spezifischen *annealing*-Temperatur ( $T_{\text{anneal}}$ ) an die Einzelstränge. Die Primer sind zur Sequenz der Ränder des zu synthetisierenden Abschnitts komplementär. Von den 3'-Enden beider Primer ausgehend wird durch die DNS-Polymerase bei 72°C ein neues doppelsträngiges Fragment synthetisiert. Als Templat kann sowohl genomische als auch cDNA aus der RT-Reaktion verwendet werden. Die semi-quantitative RT- und genomische PCR wurden in einem Triblock T3000 von Biometra durchgeführt.

semi-quantitaver PCR-Ansatz	
12,5 µl	PCR-Supermix (2x)
1 µl	Primermix (fw/rev)
1 µl	cDNS
0,125 µl	GoTaq
10,375 µl	ddH <sub>2</sub> O

genomischer PCR-Ansatz	
12,5 µl	PCR-Mix Alleltest Ataxin-3 (2x)
1 µl	Primermix (fw/rev)
x µl	genomische cDNS (80-100 ng)
0,2 µl	GoTaq
mit ddH <sub>2</sub> O zu 25 µl auffüllen	

Reaktionszyklus eines PCR-Programms
1. Denaturieren 98°C 5 min
2. Denaturieren 98°C 30 sec
3. Hybridisieren T je nach Primer 30 sec
4. Elongation 72°C 40 sec
5. Elongation 72°C 5 min
Schritte 2-4 mit x Zyklen

gefährdete Zyklen	
25	GAPDH
50	Ataxin-3 (genomisch)
35	alle anderen Reaktionen

### 2.2.1.9 Elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel

Durch die Agarosegel-Elektrophorese werden DNS-Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt. Das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNS bewegt sich im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes seines DNA-Fragmentes. Unter kurzwelligem UV-Licht (254 nm) kann die DNS durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid visualisiert werden. Durch Auftragung von Längenstandards kann die Größe des jeweiligen DNS-Fragmentes bestimmt werden. Je nach Größe und gewünschter Auftrennung der Fragmente wurden 0,5 – 3 % [m/v] Agarose durch Aufkochen in 1 x TAE gelöst und nach Abkühlen bis auf Handtemperatur 1:10.000 Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung zum Aushärten in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer mit 1 x TAE überführt und die DNS aus den PCR-Reaktionen mit 1:10 DNS-Ladepuffer in die Taschen gegeben. Der DNS-Ladepuffer enthält die zwei Farbstoffe Bromphenolblau (dunkelblau) und Xylencyanol (türkis), die abhängig von der Agarosekonzentration mit definierten Fragmentgrößen comigrieren und auf diese Weise einen Anhaltspunkt für das Fortschreiten des Auftrennprozesses geben. Der GoTaq Flexi Puffer Green enthält zwei andere Farbstoffe sowie Glycerin, sodass für das Beladen mit ihm hergestellter PCR-Reaktion kein DNS-Ladepuffer notwendig war. Die Analyse der Gele erfolgte über den GelDoc2000.

### 2.2.1.10 Quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real-time PCR*, qRT-PCR)

Alle qRT-PCR-Ansätze wurden im Triplikat in einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  je Reaktion im iCycler (Bio-Rad) oder mastercycler realplex (Eppendorf) durchgeführt. Die Spezifität der verwendeten Primer wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse nach Ablauf der Reaktion vorgenommen. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt über eine Fluoreszenzmessung des mit den PCR-Fragmenten interkalierenden Farbstoffs SYBR-green I. Diese wird während jeden Zyklus erfasst und nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Quantifizierung anhand der  $c_t$ -Werte während der exponentiellen Phase vorgenommen. GAPDH diente hierbei als *housekeeping gene*, auf das die anderen Werte normiert wurden. Auswertung erfolgte über das Excel Makro qgene96.

qRT-PCR-Ansatz	
12,5 $\mu\text{l}$	qRT-PCR-Supermix (2x)
1 $\mu\text{l}$	Primermix (fw/rev)
1 $\mu\text{l}$	cDNS
0,125 $\mu\text{l}$	GoTaq
10,375 $\mu\text{l}$	ddH <sub>2</sub> O

PCR-Programm iCycler
1. Denaturieren 98°C 5 min
2. Denaturieren 98°C 60 sec
3. Hybridisieren 60°C 60 sec
4. Elongation 72°C 40 sec
5. Elongation 72°C 5 min
Schritte 2-4 mit 40 Zyklen

PCR-Programm mastercycler realplex
1. Denaturieren 98°C 2 min
2. Denaturieren 98°C 30 sec
3. Hybridisieren 60°C 30 sec
4. Elongation 72°C 50 sec
5. Elongation 72°C 10 min
Schritte 2-4 mit 40 Zyklen

### 2.2.1.11 Quantitative Expressionsanalyse mittels TLDA-Array

Der Taqman Low-Density (TLDA)-Array stellt im Prinzip eine vorgefertigte, standardisierte Plattform für die qRT-PCR dar. 2  $\mu\text{g}$  RNA je Probe wurden nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben und jede Probe auf einen TLDA-Array durch Zentrifugation geladen. Reaktion und Quantifizierung erfolgte im ViiA-Cycler (Life Technologies). Normierung gegen 18S und Auswertung der  $c_t$ -Werte wurde mit dem Excel Makro qgene96 vorgenommen.

## 2.2.2 Proteinbiochemie

### 2.2.2.1 Präparation von Proteinlysaten und Fraktionierung nach Löslichkeit

Für die Präparation eines Proteinlysates eines Experimentes wurde die Zellen je 1x6-Well einer 6-Well-Zellkulturplatte bzw. eine 3,5cm-Schale bei Langzeit- und eine 6cm-Schale bei Kurzzeitkulturen verwendet. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem BSS gewaschen und in BSS mit einem Zellschaber abgelöst. Nach Überführung und Pelletierung durch

Zentrifugation in einem Eppendorfreaktionsgefäß wurde das BSS abgenommen, die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu weiteren Prozessierung bei -80°C gelagert.

Das Pellet wurde in RIPA-TX supplementiert mit 1:100 Halt Protease Inhibitor Cocktail auf Eis lysiert, wobei 500 µl für Langzeit- und in 250 µl für Kurzzeitkulturen verwendet wurden. Zur besseren Homogenisierung wurde das Pellet durch eine 0,5x40 mm-Kanüle mit Hilfe einer 1ml-Plastikspritze auf- und abpipettiert. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei 20.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Triton-X 100-lösliche Fraktion abgenommen und bei -80°C gelagert oder für Immunblotanalyse der Ataxin-3-Expression verwendet. Das wurde in 150 µl RIPA-SDS resuspendiert und anschließend für 30 min bei 20.000g und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als SDS-lösliche Fraktion abgenommen, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert. Das verbliebene Pellet wurde in 50 µl 100% Ameisensäure (*formic acid*, FA) aufgelöst und bei RT für 16 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Ameisensäure in einem Vakuum-Konzentrator bei 30°C für 30-50 min abgedampft. Das Pellet wurde in 50 µl 1x Laemmli-Puffer aufgenommen und der pH-Wert durch Zugabe von 2 M Tris Base-Lösung neutralisiert.

#### **2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Smith et al., 1985)**

Die Proteinkonzentration der Triton-X 100-löslichen Fraktion wurde über das BCA Protein Assay Reagent-Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt. Der Nachweis basiert hierbei auf einer Reduktion von zweifach geladenen Cu-Ionen zu einfach geladenen Cu-Ionen durch die Proteine in einem quantitativem Verhältnis und der Bindung der einfach geladenen Cu-Ionen an Bicinchoninsäure. Diese Bindung verursacht einen Farbumschlag, der photometrisch bei 562 nm gemessen werden kann.

#### **2.2.2.3 Herstellung von SDS-Gelen**

Zur Herstellung von SDS-Gelen wurde Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) und als Gelsystem das Protean III Mini Gel System verwendet. Zuerst wurde SDS-PAGE-Trenngel 10% gegossen und vor der Polymerisation zur Entstehung einer nivellierten Oberfläche mit Isopronal überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das SDS-PAGE-Sammelgel 4% über das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Unter feuchter Atmosphäre wurden die Gele bis maximal zwei Wochen bei 4°C bis zur Verwendung gelagert. Alternativ wurden vorgefertigte SDS-Gele des NuPAGE-Systems (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 2.2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erlaubt die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dieser Prozess wird durch die Eigenschaft von SDS als starkem anionischen Detergens ermöglicht, welches die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine auflöst und gleichzeitig die Eigenladung der Proteine maskiert und sie ihrer Größe nach negativ lädt (1,4 g SDS/1 g Protein). Disulfidbrücken werden durch das Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgelöst. Die Auftrennung erfolgte mit der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli, 1970. Hierbei wird eine Aggregation der Proteine beim Eintritt in das Gel durch Verwendung eines grobporigem Sammelgels, das zusätzlich zur Konzentrierung der Proteine durch Stapellauf zwischen Leit- (Cl<sup>-</sup>) und Folgion (Glycin) dient, verhindert. Das engporige Trenngel trennt die Proteine nach ihrer Molekularmasse auf. Durch den basischen pH-Wert von 8,8 im Trenngel wird das Glycin negativ geladen und verliert seinen bremsenden Effekt. Die Kombination der unterschiedlichen Vernetzungsgrade zwischen Sammel- und Trenngel sowie die Konzentrierung über Glycin erlauben eine besonders scharfe Proteinauftrennung.

Vor Beladung wurde das SDS-Gel mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden in final 1x Laemmli-Puffer 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend zentrifugiert. Zusammen mit den Proben wurde eine Tasche mit Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard geladen. Von der SDS-Fraktion wurden 20  $\mu$ g Protein in final 50  $\mu$ l 1x Laemmli-Puffer, von der SDS-löslichen Fraktion 37,5  $\mu$ l in final 1x Laemmli-Puffer und von der SDS-unlöslichen FA-Fraktion die gesamten 50  $\mu$ l geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 50-200 V für 45 min bis 3 h. Für die längere Laufzeit wurde die Gelkammer auf Eis gestellt.

#### 2.2.2.5 Immunblot (wet) (nach Towbin *et al.*, 1979)

Der Immunblot (auch als Western Blot bezeichnet) ist eine chromatographische oder elektroforetische Übertragung von Proteinen aus einer SDS-PAGE auf eine Membran (Nitrozellulose oder PVDF) zur anschließenden Detektion mit spezifischen Antikörpern und Nachweis über radiometrische oder chemilumineszente Verfahren. In der elektroforetischen Übertragung wandern die durch das SDS mit negativer Ladung maskierten Proteine dabei im elektrischen Feld zur Anode und binden an die Membran.

Hierzu wurde zuerst das SDS-Gel aus der SDS-PAGE 10 min in 1x Immunblot-Transferpuffer inkubiert. Vier Lagen Whatmanpapier, zwei saugfähige Schwämme und die Membran wurden in Immunblot-Transferpuffer angefeuchtet. Bei Verwendung einer PVDF-Membran wurde diese zuvor für 30-60 sec in Methanol aktiviert. Der Aufbau zur Übertragung der Proteine ausgehend von der Kathode ausgehend war wie folgt: zuunterst ein saugfähiger Schwamm, zwei Lagen Whatmanpapier, das SDS-Gel, die Membran, zwei Lagen Whatmanpapier und ein saugfähiger Schwamm. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen mit dem Transfer interferieren konnten. Der Aufbau wurde in eine bis zum Rand

mit Immunblot-Transferpuffer (*wet*) gefüllte Kammer gegeben, die mit Eis gekühlt wurde. Die elektrische Stromstärke wurde mit 400 mA für 1 h angelegt.

Nach Transfer wurde die Membran in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und 5 min in TBS-T unter Rotation, bei der alle Schritte abliefen, gewaschen. Zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperreaktionen wurde die Membran 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C in Immunblot-Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 10 ml TBS-T für 5 min gewaschen und der primäre Antikörper gemäß seiner Verdünnung in 3 ml Immunblot-Detektionspuffer für 2 h bei RT oder ÜN bei 4°C in das Röhrchen gegeben. Nach Inkubation wurde die Membran dreimal 5 min mit 10 ml TBS-T gewaschen. Der zum Primärantikörper korrespondierende Sekundärantikörper wurde seiner Verdünnung entsprechend in 3 ml TBS-T ins Röhrchen gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal 5 min mit 10 ml TBS-T und anschließend mit 5 min mit 20 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers wurde durch Chemilumineszenz über das SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate unter Detektion mittels des ChemiDoc XRS Systems aufgenommen. Die Bilder wurden mit Quantity One als TIF-Dateien gespeichert.

## 2.2.3 Zellkultur

### 2.2.3.1 Beschichtungen

#### *Gelatine*

Für eine Gelatinebeschichtung von Zellkulturschalen und –flaschen wurden diese für 10-20 min mit 0,1%iger Gelatine-Lösung bei 37°C inkubiert. Die Gelatine wurde direkt vor Plattierung der Zellen abgenommen.

#### *Matrigel*

Das Matrigel wurde auf Eis 6 h bis ÜN aufgetaut und mit bei -20°C vorgekühlten Pipetten in eiskaltem Knockout DMEM 1:20-30 verdünnt. Zellkulturschalen wurden mit der Matrigellösung überschichtet und mind. 2 h bei 4°C inkubiert. Vor Gebrauch wurde die Matrigellösung abgenommen. Für längere Lagerung bei 4°C wurden die Schalen mit Parafilm abgedichtet.

#### *Poly-D-Lysin (PDL)*

Für eine PDL-Beschichtung wurden die Zellkulturschalen mit 1x PDL-Lösung für 1 h bei 37°C inkubiert. Das PDL wurde abgenommen und die Schalen einmal mit PBS gewaschen, bevor Zellen darauf ausgesät wurden.

*Poly-L-Ornithin (PO)*

Die Zellkulturschalen wurden mit PO-Lösung überschichtet und mind. 1 h bis 24 h bei 37°C inkubiert. Bevor eine folgende Beschichtung durchgeführt wurde, wurden die Schalen mind. zweimal mit PBS gewaschen.

*PO/Fibronektin (PO/Fn)*

Die Fibronektin-Stocklösung wurde 1:250 in PBS verdünnt (= 4 µg/ml) und zuvor PO-beschichtete Schalen damit für mind. 4 h bei 37°C oder ÜN bei 4°C überschichtet. Für ÜN und längere Lagerung bei 4°C (max. 7 Tage) wurden die Schalen mit Parafilm abgedichtet. Vor Gebrauch wurde die Lösung abgenommen.

*PO/Laminin (PO/Ln)*

Für die Kultur von It-NES-Zellen wurde die Laminin-Stocklösung 1:667 (= 1,5 µg/ml), 1:250 (4 µg/ml) für das Plattieren von Neurosphären und für die Kultur von Neuronen 1:100 (= 10 µg/ml) in PBS verdünnt und zuvor PO-beschichtete Schalen damit für mind. 2 h bei 37°C oder ÜN bei 4°C überschichtet. Für ÜN und längere Lagerung bei 4°C (max. 7 Tage) wurden die Schalen mit Parafilm abgedichtet. Vor Gebrauch wurde die Lösung abgenommen.

**2.2.3.2 Inkulturnahme von adulten humanen Fibroblasten**

Die Biopsie für die Inkulturnahme von adulten humanen Fibroblasten wurde an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Bonn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Tüting vorgenommen. Die Hautstanzen wurden unter einer Horizontalsterilwerkbank mit einem Skalpell zerkleinert und auf einem mit Gelatine beschichteten 6-Well einer 6-Well-Platte in MEF-Medium, welches zusätzlich 20 ng/ml bFGF und 20 ng/ml EGF sowie 1:100 Pen/Strep enthielt, ausgesät. Um eine bessere Adhärenz zu gewährleisten, wurden die Gewebestücke mit einem Deckgläschen an den Boden gedrückt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt bis die auswachsenden Fibroblasten das 6-Well konfluent bedeckten. Das 6-Well wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinierung wurde 1:1 mit MEF-Medium gestoppt, die Zellen abgespült und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen in frischem MEF-Medium auf einer mit Gelatine-beschichteten T75-Zellkulturflasche ausgesät. Danach erfolgte eine Kultivierung nach Standardfibroblastkulturprotokoll (s.u.).

**2.2.3.3 Kultivierung von adulten humanen Fibroblasten, PlatA- und Phoenix-GP-Zellen**

Abgesehen von wenigen Details ähnelt sich die Kultur von adulten humanen Fibroblasten (im Folgenden kurz als Fibroblasten bezeichnet), Plat-A- und Phoenix-GP-Zellen, weswegen sie hier zusammen beschrieben wird. Alle Zellen wurden auf

Zellkulturflaschen in MEF-Medium kultiviert, wobei diese für Plat-A- und Phoenix-GP-Zellen zur besseren Adhärenz vorher mit Gelatine beschichtet wurden. Bei 80-90% Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von MEF-Medium im Verhältnis 1:1 abgestoppt und die Zellen bei 1000 rpm für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in frischem MEF-Medium resuspendiert und Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

#### **2.2.3.4 Einfrieren und Auftauen von Fibroblasten, Plat-A- und Phoenix-GP-Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen einer konfluenten Zellkulturschale wie unter 2.2.3.3 beschrieben trypsinisiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 1 ml pro angedachtem 1,8ml-Einfrierröhrchen-Aliquot eiskaltem MEF-Freezing Medium resuspendiert und in Einfrierbehältern bei -80°C ÜN weggefroren. Die Menge der aliquotierten Einfrierröhrchen und damit das Volumen des MEF-Freezing Mediums bestimmt sich aus der Menge der weggefrorenen Zellen (Verhältnis 1:2 bis 1:3). Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war, unverzüglich in 5 ml vorgewärmtes MEF-Medium überführt und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in MEF-Medium resuspendiert und auf einer Zellkulturschale ausgesät.

#### **2.2.3.5 Zählen von Zellen**

30 µl einer Zellsuspension wurden mit 30 µl der Trypan Blau-Lösung gemischt. Lebende Zellen nehmen kein Trypan Blau auf, wohingegen tote Zellen durch Verlust ihrer Zellmembranintegrität den Farbstoff aufnehmen. Durch diesen Effekt erscheinen lebende Zellen unter dem Lichtmikroskop mit einem hellen Kontrast, tote Zellen hingegen blau. Ungefähr 20 µl der Mischung wurden auf eine mit einem Deckglas versehene Fuchs-Rosenthal-Kammer gegeben und die Mischung durch die Kapillarkräfte hineingezogen. Eine Fuchs-Rosenthal-Kammer besteht aus 16 großen Quadratfeldern, die wiederum aus 16 kleinen Quadratfeldern bestehen. Es wurden die lebenden Zellen in drei bis vier großen Quadratfeldern ausgezählt und durch die Anzahl der gezählten Felder geteilt. Die Zellzahl berechnet sich daraus wie folgt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Durchschnitt der gezählten Quadratfelder} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellen/ml} \times \text{Gesamtvolumen der gemessenen Zellsuspension}$$

### 2.2.3.6 Retrovirusproduktion in Phoenix-GP-Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $7 \times 10^6$  Phoenix-GP-Zellen pro PDL-beschichteter 10cm-Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Morgen wurde das Medium zu 2% Advanced MEF-Medium gewechselt. Zwei Stunden später wurden die Zellen mit FuGENE HD transfection reagent transfiziert. Hierzu wurden 2,37  $\mu\text{g}$  der retroviralen und 7,4  $\mu\text{g}$  der Hüllprotein-Plasmid-DNS in 500  $\mu\text{l}$  Opti-MEM vorgelegt und 30  $\mu\text{l}$  FuGENE HD hinzugegeben. Nach starkem Mischen wurde der Transfektionsansatz 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Zellen mit Chloroquin zu einer finalen Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  supplementiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese in einen Inkubator des S2-Bereichs überführt. Nach 5 h wurde das Medium zu 5% Advanced MEF-Medium und 24 h später zu frischem Medium gewechselt. 30 h nach der Transfektion wurde der Überstand abgenommen und frisches Medium auf die Zellen gegeben. Der Überstand mit den viralen Partikeln wurde für 5 min bei 4500g zentrifugiert, durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Filter filtriert und in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Diese wurden ausbalanciert und in einer Ultrazentrifuge bei 50000g für 1  $\frac{1}{2}$  h zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Umdrehen der Röhrchen abgeschüttet und die verbleibende Flüssigkeit abgenommen, wobei die Röhrchen mit ihrer Unterseite nach oben gerichtet blieben. Die Röhrchen wurden in ihre normale Orientierung zurückgebracht, zweifach mit Parafilm versiegelt, kurz gevortext und für 1-2 h bei 4°C inkubiert. Das Viruspellet wurde in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert, in ein 1,5ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert um verbleibenden Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit MEF-Medium für das für die Infektion benötigte Volumen aufgefüllt, wobei zusätzlich Polybren zu einer finalen Konzentration von 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hinzugegeben wurde. Der Infektionsmix wurde kurz gevortext, heruntergefugt und direkt zur Infektion verwendet. Die Virusernte und Konzentration wurde am nächsten Tag für eine zweite Infektion der Zielzellen wiederholt.

### 2.2.3.7 Retrovirusproduktion in Plat-A-Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $7 \times 10^6$  Plat-A-Zellen pro PDL-beschichteter 10cm-Zellkulturschale in MEF-Medium ausgesät. Vor der Transfektion wurde das MEF-Medium durch 5 ml vorgewärmtes 5% Advanced MEF-Medium ersetzt. Der Transfektionsansatz bestand aus 500  $\mu\text{l}$  Opti-MEM, in das 37  $\mu\text{g}$  retroviraler und 7,4  $\mu\text{g}$  Hüllprotein-Plasmid-DNS verdünnt und 133  $\mu\text{l}$  FuGENE HD tropfenweise dazugegeben wurden. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde Chloroquin zu einer finalen Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  zum Medium hinzugegeben. Nachdem der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben

wurde, wurden diese in einen Inkubator im S2-Bereich überführt. Fünf Stunden nach Transfektion wurde das Medium durch 13 ml 5% Advanced MEF-Medium ersetzt. Am nächsten Morgen wurde das Medium zu 7,5ml Advanced MEF-Medium gewechselt. 24 und 48 h später wurde jeweils der Überstand gesammelt und frisches Medium auf die Zellen gegeben. Der virale Überstand wurde durch einen 0,45µm-Filter filtriert und mit 10 ng/ml bFGF und 6 µg/ml Polybren supplementiert. 1 ml jedes der Überstände der vier viralen Reprogrammierungsfaktoren wurde zu einem 6-Well mit zu reprogrammierenden Fibroblasten gegeben. Die 6-Well-Platte wurde mit Parafilm versiegelt und bei 750g für 45 min bei 32°C zentrifugiert. Der Virusüberstand wurde weiter ÜN inkubiert und am nächsten Tag durch MEF-Medium mit 20 ng/ml bFGF ersetzt. Die Virusernte und Infektion wurde ein zweites Mal für dieselben Zielzellen wiederholt.

### **2.2.3.8 Infektion der zu reprogrammierenden Fibroblasten**

Für die Reprogrammierungsansätze für von mit Phoenix-GP-Zellen produziertem Virus wurden  $4 \times 10^4$  Fibroblasten in einem 12-Well einer 12-Well-Platte in MEF-Medium, supplementiert mit 20 ng/ml bFGF, 221 µM Asc und 0,1 mM β-Mercaptoethanol, ausgesät. Nach 6-8 h wurde das Medium entfernt und 350 µl Infektionsmix mit allen vier Reprogrammierungsfaktoren, supplementiert mit 4 µg/ml Polybren und 20 ng/ml bFGF, auf die Zellen gegeben. Am nächsten Morgen wurde die Prozedur wiederholt.

Bei Retrovirus, der von Plat-A-Zellen produziert wurde, wurden  $8 \times 10^4$  Fibroblasten pro 6-Well einer 6-Well-Platte in MEF-Medium mit 20 ng/ml bFGF ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und Virusüberstand, supplementiert mit 20 ng/ml bFGF und 5 µg/ml Polybren bei 750g für 45 min auf die Zellen zentrifugiert. Am darauffolgenden Tag wurde der virale Überstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die zweite Infektion wurde 6-7 h nach dem Medienwechsel vorgenommen.

### **2.2.3.9 Induktion der Pluripotenz und Isolation primärer iPS-Zellkolonien**

Die infizierten Fibroblasten wurden nach der ersten Infektion in MEF-Medium supplementiert mit 20 ng/ml bFGF, 221 µM Asc und 0,1 mM β-Mercaptoethanol kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Sobald die infizierten Fibroblasten nach 5-6 Tagen ca. 90% Konfluenz erreichten, wurden sie trypsinisiert und auf zwei bis drei mit Feedern beschichteten 10cm-Schalen im gleichen Medium ausgesät. Sieben Tage nach Infektion wurde das Medium zu Reprogrammierungsmedium gewechselt, welches täglich erneuert wurde. Alle 5-7 Tage wurde 1/5 der ursprünglich ausgesäten Feeder neu auf die Platten gegeben.

Sich bildende iPS-Zellkolonien konnten durch ihre charakteristische Morphologie ab ca. Tag 20 nach Infektion identifiziert werden. In der Regel wurden sie von Tag 22 ab mechanisch isoliert. Hierzu wurde die zu isolierende iPS-Zellkolonie mit einer 100µl-

Eppendorfpipette vorsichtig von der Platte gelöst, aufgenommen, in einem 96-Well durch heftiges Auf- und Abpipettieren zerkleinert und in einem mit Feedern beschichteten 12-Well in Reprogrammierungsmedium mit 10  $\mu\text{M}$  Y-26732 ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium zu hESC-Medium gewechselt und die Zellen nach hESC-Protokoll weiterkultiviert.

#### **2.2.3.10 Aussaat von mitotisch inaktivierten MEF-Zellen (Feedern)**

Einfrierröhrchen mit  $3 \times 10^6$  murinen embryonalen Fibroblasten (MEF), die für die Co-Kultur von humanen pluripotenten Stammzellen als Fütterzellen (kurz: Feeder) benötigt werden, wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut bis nur ein kleiner Eisklumpen zu sehen war. Anschließend wurden die Zellen unverzüglich in 9 ml MEF-Medium überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen auf Gelatinebeschichteten Zellkulturformaten in einer Dichte von  $3-4 \times 10^4/\text{cm}^2$  ausgesät.

#### **2.2.3.11 Kultivierung humaner pluripotenter Stammzellen (Thomson *et al.*, 1998)**

hES- und hiPS-Zellen wurden in hESC-Medium auf mit Feedern beschichteten Zellkulturplatten kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Kolonien durch Inkubation mit Collagenase bei 37°C für 45-60 min von den Feedern abgelöst. Die abgelösten Kolonien wurden mit hESC-Medium ab gespült und bei 800 rpm für 3 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Kolonien mechanisch durch eine 1000 $\mu\text{l}$ -Eppendorfpipette in 1 ml hESC-Medium zerkleinert bis kleine Aggregate zurückblieben. Die Aggregate wurden danach in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 zum Ursprungsformat auf Feeder-beschichtete Platten ausgesät.

#### **2.2.3.12 Einfrieren und Auftauen humaner pluripotenter Stammzellen**

Für das Einfrieren wurden die Zellen für 10-15 min bei 37°C mit Alfacym inkubiert und die sich ablösenden Einzelzellen und kleinen Aggregate mit hESC-Medium ab gespült. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in je 1 ml eiskaltem hESC-Freezing Medium pro angedachtem Einfrierröhrchen resuspendiert und in die Einfrierröhrchen aliquotiert. Diese wurden unverzüglich in Einfrierbehältern bei -80°C weggefroren. Am nächsten Tag wurden die Einfrierröhrchen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Zum Auftauen wurde das Einfrierröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis nur ein kleiner Eisklumpen zurückblieb. Die Zellen wurden sofort in 9 ml vorgewärmten hESC-Medium verdünnt und bei 1000 rpm für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde entsprechend der weggefrorenen Zellmenge in hESC-Medium resuspendiert und auf das passende Format Feeder-beschichteter Platten ausgesät. Das hESC-Medium zur Aussaat wurde mit 10  $\mu\text{M}$  Y-27632 supplementiert. Am nächsten Tag wurde das Medium zu un-supplementiertem hESC-Medium gewechselt.

### 2.2.3.13 Spontane *in vitro*-Differenzierung von iPS-Zellen

Die iPS-Zellen wurden mittels Collagenase als Kolonien von den Feedern abgelöst und bei 800 rpm für 3 min zentrifugiert. Die pelletierten Kolonien wurden in EB1-Medium ohne mechanische Zerkleinerung auf Petrischalen transferiert, um die Differenzierung in *embryoid bodies* (EBs) in der Suspensionskultur zu induzieren. Das Medium wurde durch Pelletierung der EBs bei 800 rpm für 3 min und anschließendes Resuspendieren in EB1 und Zurückführung auf die Petrischale an jedem zweiten Tag gewechselt. Fünf Tage nach Ablösen der Kolonien wurden die EBs in N2-Medium supplementiert mit 5% FCS auf PO/Fn ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium zu N2-Medium mit 10 ng/ml bFGF gewechselt und jeden Tag erneuert. Abhängig von der Konfluenz wurden die Kulturen 4-7 Tage nach Plattieren für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert.

### 2.2.3.14 Teratom-Assay: *in vivo*-Differenzierung der iPS-Zellen

Die Zellen wurden 1 h in hESC-Medium mit 10  $\mu$ M Y-27632 inkubiert und darauf wie zur *in vitro*-Differenzierung abgelöst und zentrifugiert. Die Zellen einer gesamten 6-Well-Platte wurden in 1,5 ml PBS resuspendiert. Männliche immundefiziente SCID/beige-Mäuse wurden anästhesiert und iPS-Zellen in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l in die Testes injiziert. Die Analyse der Teratome erfolgte 6-8 Wochen nach Transplantation. Operation, Transplantation und Isolierung des Teratoms wurden von Anke Leinhaas durchgeführt. Die isolierten Teratome wurden in PFA fixiert und in Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn geschnitten und gefärbt.

### 2.2.3.15 Modifiziertes Protokoll zur Generierung von It-NES-Zellen

Das ursprüngliche Protokoll zur Generierung der *long term-neuroepithelial stem cells* (It-NES cells, It-NES-Zellen) wurde in der Publikation Koch *et al.*, 2009 *en detail* beschrieben. In dieser Arbeit wurde ein im Folgenden aufgeführtes, modifiziertes Protokoll verwendet.

Die iPS-Zellen wurden mit Collagenase als Kolonien abgelöst und pelletiert. Anschließend wurden sie für fünf Tage auf Petri-Schalen als EBs in EB2-Medium kultiviert, und das Medium während dieser Zeit zweimal gewechselt. Am Tag 6 wurden die Zellen auf PO/Fn-beschichteten 6cm-Zellkulturschalen in Neural Induction Medium (NIM) supplementiert mit 4  $\mu$ g/ml Fibronectin ausplattiert und bei täglichem Medienwechsel in NIM für sieben Tage kultiviert. Danach wurden die neuralen Rosetten durch Inkubation mit Dispase für 5-10 min bei 37°C herausgelöst, wobei das Herauslösen durch leichtes Antippen der Schalen forciert wurde. Die neuralen Rosetten wurden mit N2-Medium abgespült und bei 800 rpm für 3 min pelletiert. Das Pellet wurde in Neural Sphere Medium (NSM) resuspendiert und die neuralen Rosetten auf 6cm-Petri-Schalen gegeben. Die Zellen wurden am nächsten Tag erneut pelletiert und in NSM auf frische 6cm-Petri-Schalen überführt. Bei vermehrtem Zelltod wurde vor der Pelletierung 1:100 DNase in die Schalen hinzupipettiert. Am folgenden

Tag wurden die Neurosphären auf PO/Ln-beschichteten 6cm-Schalen in Neural Expansion Medium (NEM) supplementiert mit 4 µg/ml Laminin ausplattiert und bei täglichem Medienwechsel für sieben Tage in NEM kultiviert. Die Zellen wurden anschließend durch Inkubation mit Trypsin-EDTA mit 10 µg/ml DNase für 10 min bei 37°C abgelöst und das Trypsin durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor im Verhältnis 1:1 inaktiviert. Durch Abspülen mit It-NES-Medium wurden die Zellen in ein 15ml-Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 3 ml It-NES-Medium mit 10 µg/ml DNase mechanisch mit einer 1000µl-Eppendorfpipette zerkleinert bis eine homogene Suspension entstand. Es wurden weitere 7 ml It-NES-Medium hinzugegeben, die Suspension durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl abgenommen. Während die Zellzahl bestimmt wurde, wurden die Zellen bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde It-NES-Medium zum Erreichen einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$ /ml hinzugegeben, wobei das Pellet zuvor mit 1 ml It-NES-Medium und einer 1000µl-Eppendorfpipette resuspendiert wurde. 1ml der Zellsuspension wurde auf einem mit PO/Ln-beschichteten 6-Well, das zuvor mit 0,5 ml It-NES-Medium überschichtet wurde, ausgesät. Am nächsten Tag wurden 0,5 ml/6-Well It-NES-Medium mit zusätzlichen 15 ng/ml bFGF, 15 ng/ml EGF und 1,5 µl B27 hinzupipettiert. Abhängig von der Zelldichte wurden die Zellen gemäß der Standard-It-NES-Kultivierung weiterkultiviert.

#### **2.2.3.16 Kultivierung von It-NES-Zellen**

Die It-NES-Zellen wurden alle zwei bis drei Tage in einem Verhältnis 1:2 bis 1:3 passagiert. Hierzu wurden die Zellen 3-5 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA vereinzelt, die Reaktion mit Trypsin-Inhibitor im Verhältnis 1:1 abgestoppt und die Zellen mit N2-Medium abgespült. Nach Pelletierung bei 1200 rpm für 3 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in It-NES-Medium auf PO/Ln-beschichteten Zellkulturschalen ausgesät. Das Medium wurde, abhängig von der Dichte der Zellen, täglich voll, halb oder gar nicht gewechselt, sondern nur die Faktoren bFGF, EGF und B27 erneuert. Nach der routinemäßigen Zugabe von 0,5 µM CHIR99021 und 1 µM SAG zum It-NES-Medium wurde dazu übergegangen das Medium täglich zu wechseln.

#### **2.2.3.17 Einfrieren und Auftauen von It-NES-Zellen**

Zum Einfrieren von It-NES-Zellen wurden diese wie zur Passagierung behandelt und nach der Zentrifugation und Abnahme des Überstandes in eiskaltem It-NES-Freezing Medium in Einfrier Röhrchen überführt. Die Anzahl der 1 ml-Aliquots für jeweils ein Einfrier Röhrchen bestimmte sich aus dem Verhältnis zur Passagierung. Bei einem Split-Verhältnis von 1:2 wurden zwei Aliquots weggefroren. Die Aliquots wurden unverzüglich in Einfrierbehälter bei -80°C überführt und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurde ein Einfrierröhrchen mit It-NES-Zellen im Wasserbad bei 37°C erwärmt bis nur noch ein kleiner Eisklumpen verblieb und die Zellen sofort in 4 ml It-NES-Medium überführt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen zuerst in 1 ml It-NES-Medium durch eine 1000µl-Eppendorfpipette resuspendiert und anschließend das für die Aussaat korrespondierende Mediumvolumen hinzugegeben. Danach wurden die Zellen auf PO/Ln-beschichteten Zellkulturplatten ausgesät.

#### **2.2.3.18 Neuronale Langzeitkulturen von It-NES-Zellen**

Für die neuronale Differenzierung und Langzeitkultivierung von It-NES-Zellen wurden diese wie für die Passagierung behandelt, ausgezählt und in einer Dichte von  $6 \times 10^6$ /6-Well bzw. 3,5cm-Schale in It-NES-Medium ausgesät. Das Medium wurde am nächsten Tag zu Neural Growth Medium (NGM) gewechselt und alle 2-3 Tage erneuert. Das NGM wurde zum Medienwechsel im Inkubator bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> vorequibriert um einen alkalischen und Temperaturschock für die Zellen zu vermeiden.

#### **2.2.3.19 Glutamatstimulation von neuronalen Langzeitkulturen**

Neuronale Langzeitkulturen wurden für mindestens vier Wochen differenziert, bevor sie mit Glutamat behandelt wurden. Für den Glutamatstimulus wurden die Kulturen mit im Wasserbad bei 37°C vorgewärmten BSS zweimal gewaschen. Anschließend wurden 100 µM Glutamat final in BSS für 30 min bei 37°C auf die Zellen gegeben. Nach dieser Zeit wurde das BSS abgenommen und durch vorequibriertes NGM ersetzt. Nach einer Ruhezeit von 30 min wurde die Stimulation exakt wie beim ersten Stimulus wiederholt und nach 30 min Inkubation bei 37°C erneut zu NGM gewechselt. Die Proteinlysate der Zellen für die Fraktionierung und Bestimmung der SDS-unlöslichen Aggregate wurden mindestens 16 h bis maximal 24 h nach dem zweiten Stimulus präpariert.

Für die Experimente mit Inhibitoren gilt, dass diese immer 30 min vor dem ersten Stimulus appliziert wurden und während der gesamten Stimulationsprozedur präsent blieben. Beim letzten Medienwechsel zu NGM wurden die Inhibitoren nicht weiter dazugegeben.

#### **2.2.3.20 Induktion neuronaler Kurzzeitkulturen aus It-NES-Zellen**

Für die Induktion von neuronalen Kurzzeitkulturen aus It-NES-Zellen wurden die Zellen äquivalent wie für die Langzeitkulturen ausgesät, nur dass neben Matrigel-beschichteten Zellkulturschalen in einigen Experimenten PO/Ln-beschichtete Schalen verwendet wurden. Am Tag nach der Aussaat wurde das Medium von It-NES-Medium zu SDM initial für 2-4 Tage gewechselt. Bei einer Kultivierung für vier Tage im SDM initial wurde an d2 final 1 µM WNTC59 bis zum Medienwechsel an d4 hinzugegeben. Das Medium wurde bis auf d3 täglich erneuert.

### 2.2.3.21 Stimulation neuronaler Kurzzeitkulturen mit ATP, Coffein und DBHQ

Induzierte neuronale Kurzzeitkulturen wurden an d2 für ATP und an d4 für Coffein und DBHQ initial stimuliert. Hierzu wurden 500  $\mu\text{M}$  ATP, 10 mM Coffein bzw. 50  $\mu\text{M}$  DBHQ direkt in das noch nicht erneuerte Medium pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min für ATP und Coffein bzw. 5 min für DBHQ bei 37°C wurde das Medium abgenommen und durch vorgewärmtes Short Differentiation Medium (SDM) ersetzt. Die Stimulation wurde an den drei darauffolgenden Tagen exakt wiederholt und die Zellen am vierten Tag nach der initialen Stimulation zur Analyse lysiert oder fixiert.

### 2.2.3.22 Modulation der Medienbedingungen neuronaler Kurzzeitkulturen

Die It-NES-Zellen wurden wie zuvor für die Induktion von neuronalen Kurzzeitkulturen ausgesät, nur dass für diese Experimente ausschließlich PO/Ln-beschichtete Zellkulturschalen verwendet wurden. Einen Tag nach der Aussaat wurde das Medium zu SDM Bedingung I. – IV. gewechselt. An d2 wurde final 1  $\mu\text{M}$  WNT-C59 hinzugegeben und an d3 kein Medienwechsel durchgeführt. Das Medium wurde an d4 bei allen Bedingungen zu SDM Stimulation gewechselt und bis zur Analyse an d8 täglich erneuert.

### 2.2.3.23 Gliale Differenzierung von It-NES-Zellen (Hucke *et al.*, 2012; Serio *et al.*, 2013)

Für die gliale Differenzierung wurden It-NES-Zellen wie für die Passagierung vereinzelt und in einer Dichte von  $5 \times 10^5/3,5\text{cm}$ -Schale in It-NES-Medium auf Matrigel-beschichteten Schalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium zu Glialem Induktionsmedium (GI) gewechselt. Das Medium wurde jeden Tag erneuert und die Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von 90-95%, gewöhnlich Tag 5-6, passagiert. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit HBSS (- $\text{Mg}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ ) gewaschen und bei 37°C für 5 min mit Trypsin-EDTA inkubiert. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe von Glialem Proliferationsmedium (GP) im Verhältnis 1:1 gestoppt und die Zellen mit N2-Medium abgespült und in ein 15ml-Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min wurde der Überstand abgenommen und die in GP auf eine mit Gelatine-beschichtete 6cm-Schale pro vorheriger 3,5cm-Schale ausgesät. Das GP wurde jeden zweiten Tag erneuert und die Zellen bei 80-90% Konfluenz ca. alle 5-6 Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:3 wie zuvor passagiert.

Für die finale Maturierung wurden Zellen, die mindestens fünf Passagen in GP kultiviert wurden, in einer Dichte von  $4 \times 10^5/3,5\text{cm}$ -Schale auf Matrigel-beschichteten Schalen ausgesät und am nächsten Tag das Medium zu Glialem Maturationsmedium (GM) gewechselt. Die Zellen wurden weitere sechs Wochen in GM kultiviert, wobei das Medium jeden zweiten Tag erneuert wurde.

#### **2.2.3.24 Stimulation von Fibroblasten, iPS- und glialen Zellen**

Die Stimulation von Fibroblasten, iPS- und glialen Zellen mit ATP, Coffein und DBHQ erfolgte äquivalent zu der Stimulation von neuronalen Kurzzeitkulturen, was die Dauer des Stimulus, die Konzentration und die Medienwechsel betrifft. Für die Stimulation der glialen Zellen wurden Zellen verwendet, die sechs Wochen final maturiert waren. Von den Fibroblasten wurden  $4 \times 10^4$  Zellen auf einer Gelatine-beschichteten 3,5cm-Zellkulturschale ausgesät. Die erste Stimulation erfolgte zwei Tage nach Aussaat. Die iPS-Zellen wurden wie für das Einfrieren mit Alfazym vereinzelt und in einer Dichte von  $8 \times 10^4/3,5\text{cm}$ -Schale in mTeSR1 supplementiert mit  $10 \mu\text{M}$  Y-27632 auf Matrigel-beschichteten Schalen ausgesät. Bei einer Konfluenz von 40-50% wurde mit der ersten Stimulation begonnen.

### **2.2.4 Immunzytochemie und Immunfluoreszenzfärbung**

#### **2.2.4.1 Fixieren von Zellen**

Bei der Fixierung von Zellen bleibt durch eine Quervernetzung der Strukturproteine die Zellmorphologie weitestgehend erhalten. Zur Fixierung wurden die Zellen 10 min bei RT in 4% PFA (für den Nachweis von GABA plus 0,04% Glutaraldehyd) inkubiert und anschließend einmal mit PBS oder HBSS (+Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup>) gewaschen.

#### **2.2.4.2 Enzymatischer Nachweis von alkalischer Phosphatase**

Die Färbung von alkalischer Phosphatase-Aktivität durch Substratumwandlung wurde mit dem Alkaline Phosphatase Kit III nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Inkubation von 30 min im Dunkeln wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Bei der Verwendung dieses Nachweises ist darauf zu achten, dass Natriumazid die Enzymaktivität irreversibel inhibiert.

#### **2.2.4.3 Immunfluoreszenz**

Für den Nachweis von Proteinen auf zellulärer Ebene wurde die Immunfluoreszenz genutzt. Hierbei bindet ein spezifischer Primärantikörper an ein Epitop des Zielproteins. Dieser Primärantikörper wird von einem gegen seine Spezies und Immunklasse gerichteten Sekundärantikörper gebunden, an den ein Fluorophor gebunden ist, welches durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden kann.

Die fixierten Zellen wurden 30 min bei RT in Blockierungslösung inkubiert, bei intrazellulären Epitopen plus 0,1% Triton-X-100. Anschließend wurde der Primärantikörper gemäß seiner Verdünnung in Detektionslösung 1 ½ bis 2 h bei RT auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation wurde der Primärantikörper abgenommen und einmal mit HBSS (+Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup>) gewaschen. Danach folgte eine Inkubation des korrespondierenden Sekundärantikörpers in Detektionslösung für 30-45 min bei RT. Die DNS wurde durch

Gegenfärbung mit DAPI-Lösung für 3 min bei RT für die Fluoreszenzmikroskopie markiert. Hiernach wurden die Zellen dreimal für 5 min mit HBSS (+Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup>) gewaschen und mit Mowiol 4-88 eingedeckelt. Aufnahmen wurden mit allen genannten Fluoreszenzmikroskopen und der dazugehörigen Software gemacht.

### 2.2.5 Spektrofluometrische Ca<sup>2+</sup>-Messung

Für die spektrofluometrische Ca<sup>2+</sup>-Messung wurden Glasplättchen in 3,5cm-Zellkulturschalen positioniert und mit Matrigel überschichtet. Auf dieses wurden It-NES-Zellen äquivalent zur Induktion neuronaler Kurzzeitkulturen ausgesät und differenziert. Die Analyse wurde für die ATP-Stimulation an d2, für die Coffein- und DBHQ-Stimulation an d4 durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit 2 µM des Ca<sup>2+</sup>-Indikators Fura-2-AM für 15 min bei RT in N2-Medium supplementiert mit 20 ng/ml BDNF und 20 ng/ml GDNF inkubiert, zweimal mit N2-Medium supplementiert mit 20 ng/ml BDNF und 20 ng/ml GDNF gewaschen und 20 min bei 37°C weiterinkubiert. Die auf dem Glasplättchen gewachsenen Zellen wurden anschließend in eine Temperatur-kontrollierte Aufnahmekammer (35 ± 2°C) eingebracht, bei der ein schneller Wechsel bei der Perfusion des elektrophysiologischen Puffers möglich war, der den Austausch von Stimulanzien und deren Auswaschen innerhalb von 50 ms ermöglichte. Die Ca<sup>2+</sup>-Messung wurde durch ein computergesteuertes monochromatisches Anregungslicht (340, 380 nm) durchgeführt. Das emittierte Licht wurde durch einen 470 nm Langpassfilter, gekoppelt an ein inverses Mikroskop, von einer gekühlten Digital-CCD-Kamera aufgenommen. Alle verwendeten Substanzen (500 µM ATP, 10 mM Coffein, 50 µM DBHQ, 1 µM Thapsigargin) wurden direkt zum Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Puffer (CIP) gegeben und die entsprechende Perfusion konnte über verschiedene Reservoirs gesteuert werden. Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte alle 50 oder 200 ms, abhängig vom Experiment. Die Daten wurden mit Origin8 analysiert und sind als 340nm/380nm *ratio* nach Hintergrundbereinigung dargestellt. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Daniela Malan und Prof. Philipp Sasse durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

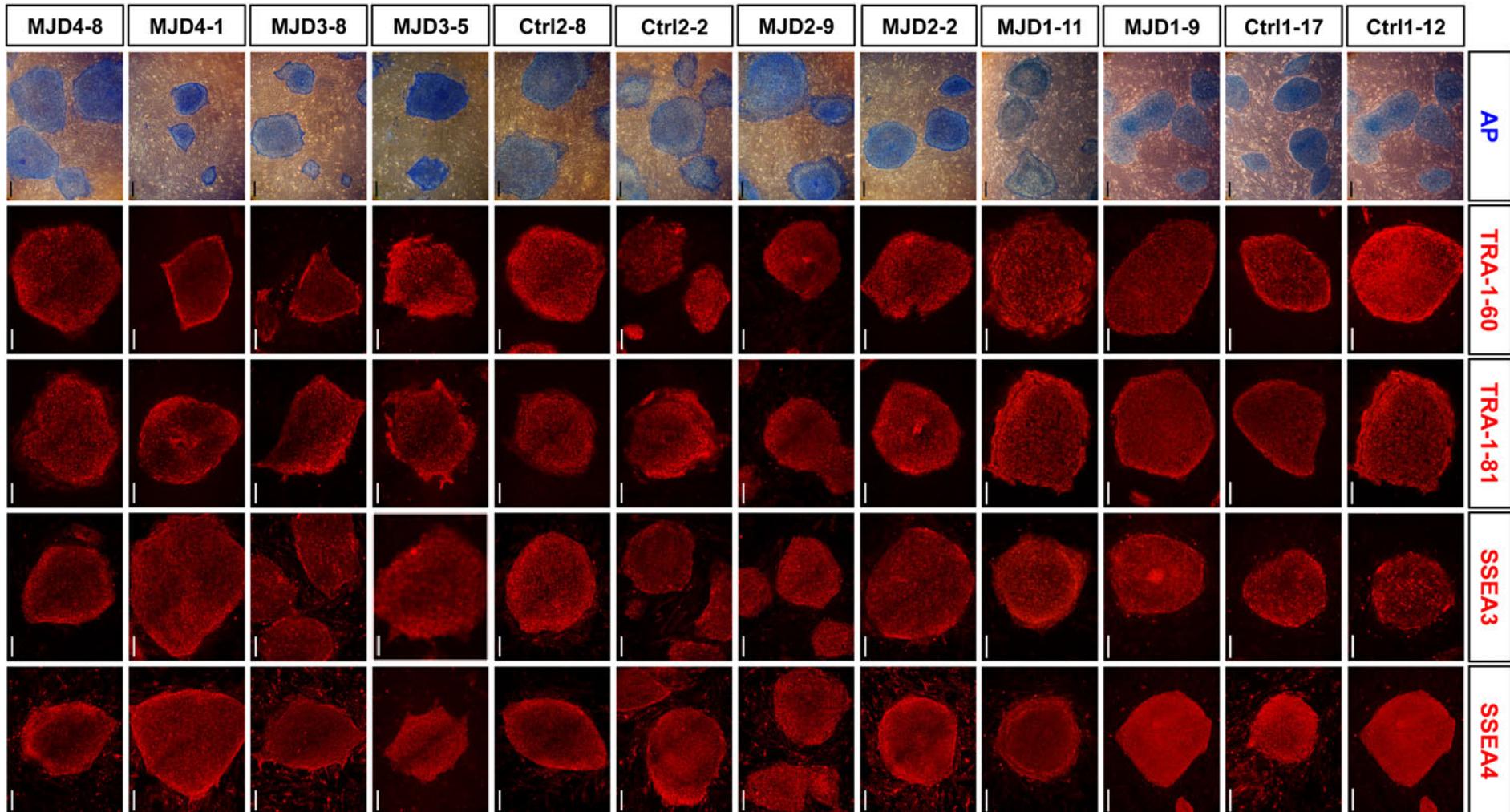
Ziel dieser Arbeit war die Krankheitsmodellierung der Machado-Joseph-Krankheit auf der Grundlage von aus Patientenfibroblasten gewonnenen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) abgeleiteten Neuronen. Hierzu war die Etablierung der Reprogrammierungstechnologie für humane Fibroblasten nach Yamanaka (Takahashi *et al.*, 2007) essentiell. Zur Sicherstellung der Qualität der generierten iPSC-Linien wurden diese auf die Expression von Pluripotenzmarkern, ein Silencing der retroviralen Transgene, die genomische Integrität sowie auf ihr Differenzierungspotential *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die den Qualitätsstandards entsprechenden iPSC-Linien wurden auf der Grundlage von einem im Institut generiertem Protokoll (Koch *et al.*, 2009) in neuroepitheliale Stammzellen (It-NES-Zellen) differenziert. It-NES-Zellen bilden ein stabiles, proliferierendes, neurales Derivat, das nach Wachstumsfaktorentzug in eine homogene Population von Neuronen differenziert und als Ausgangspunkt für weitergehende Experimente genutzt wurde.

### 3.1 Validierung der induzierten pluripotenten Stammzelllinien

Pluripotente Stammzellen besitzen spezifische Eigenschaften (Markerexpression, Differenzierungspotential etc.). Zum Nachweis dieser Merkmale wurden die iPS-Zellen im Folgenden verschiedenen Analysen (Immunfluoreszenz für Pluripotenzmarker, Teratomassay etc.) unterzogen, um anhand dieser Standards die Äquivalenz zu humanen embryonalen Stammzellen und damit die Qualität der iPS-Zelllinien zu gewährleisten. Pro parentaler Fibroblastenlinie wurden je zwei iPS-Linien eingehender validiert.

#### 3.1.1 Die generierten iPS-Zelllinien exprimieren Markerproteine charakteristisch für humane, pluripotente Stammzellen

Humane pluripotente Stammzellen exprimieren ein charakteristisches Profil von Markerproteinen. Neben den für den Erhalt der Pluripotenz essentiellen transkriptionellen Netzwerke, bestehend aus Transkriptionsfaktoren wie OCT4, NANOG, SOX2, REX1 und TCF3, sind die Oberflächenantigene *tumor rejection antigen* (TRA)-1-60 und TRA-1-81 sowie die *stage-specific embryonic antigens* (SSEA)-3 und SSEA-4 auf pluripotenten Zellen exprimiert (Andrews *et al.*, 1984; Kannagi *et al.*, 1983; Thomson *et al.*, 1998). Ein weiteres Kennzeichen ist eine aktive alkalische Phosphatase (Niwa *et al.*, 2001).



**Abb. 3.1: Expression von pluripotenten Markerproteinen in patientenspezifischen iPSC-Zelllinien**

Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP)-Aktivität mit einer Farbreaktion. Positive iPSC-Kolonien erscheinen blau. Immunfluoreszenzfärbung gegen die Pluripotenzmarker TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA3 und SSEA4 (rot). Skalierungsbalken = 200 µm.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde durch eine farbspezifische Substratumwandlung nachgewiesen. Alle Kolonien der etablierten iPS-Zelllinien zeigten nach Inkubation mit der Substratlösung eine blaue Färbung (Abb. 3.1).

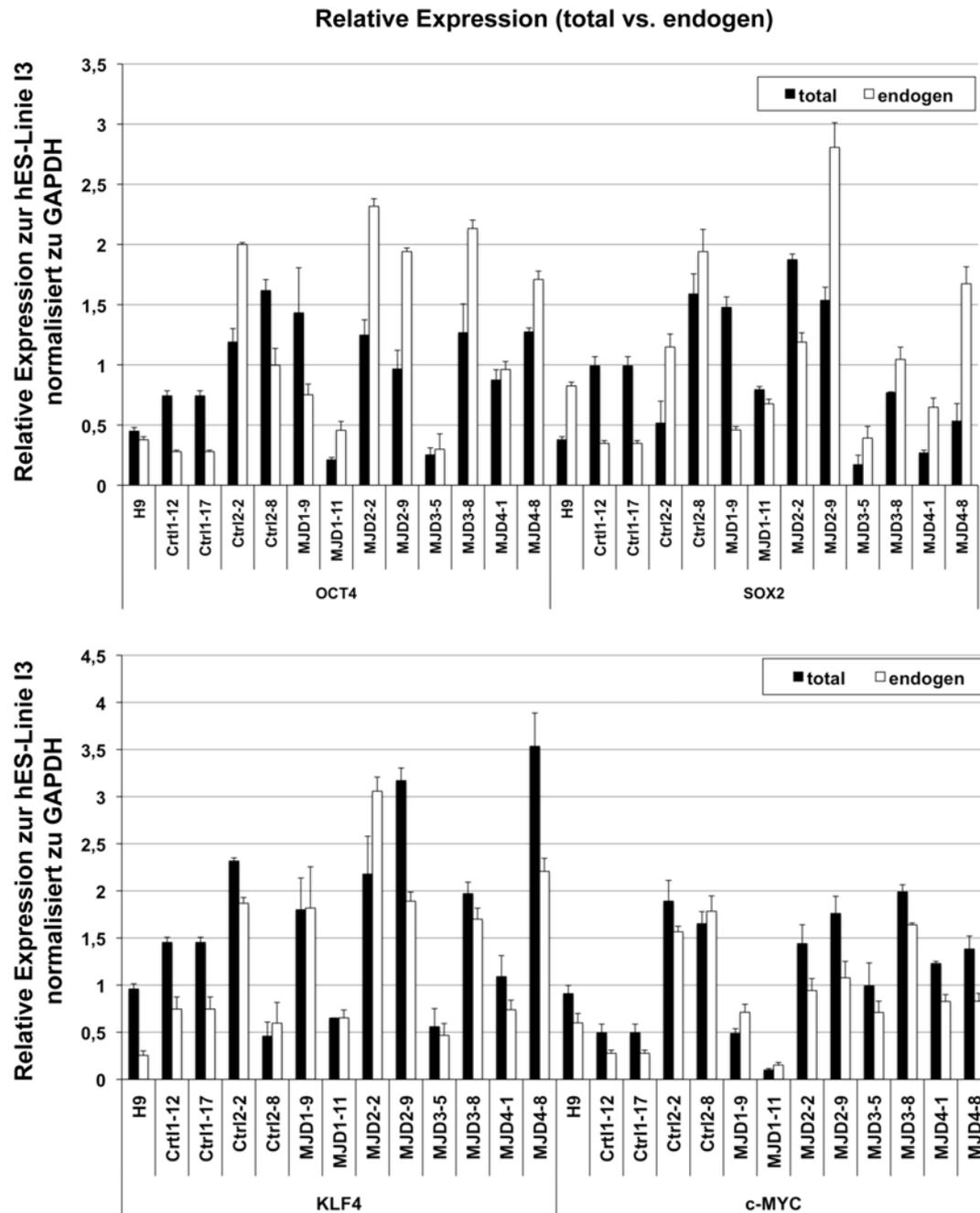
TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-3 und SSEA-4 sind in der äußeren Plasmamembran von pluripotenten Stammzellen lokalisiert. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten ein positives Signal für alle vier Marker in allen untersuchten iPS-Zelllinien (Abb. 3.1).

### **3.1.2 Die retroviralen Transgene sind in den generierten iPS-Zelllinien inaktiviert**

Die Reprogrammierung in humane iPS-Zellen kann mit verschiedenen Vektorsystemen erreicht werden. Im Kontext der Reprogrammierung ist nach Erreichen des pluripotenten Zustandes ein *silencing* der retroviralen Transgene erforderlich, da durch eine fortwährende Expression der Pluripotenzfaktoren das Differenzierungspotential der gewonnenen iPS-Zellen beeinträchtigt werden könnte. Weiterhin kann eine anhaltende Überexpression der beiden Proto-Onkogene KLF4 und c-MYC zu einer Hyperproliferation in von iPS-Zell-abgeleiteten, somatischen Zelltypen führen und somit weitere Experimente beeinträchtigen.

Das *silencing* der retroviralen Transgentranskripte kann durch verschiedene PCR-Strategien validiert werden. Ein Vergleich der Expression von Transgen-spezifischen Produkten der iPS-Zellen zu einer überexprimierenden Kontrolle (Takahashi *et al.*, 2007) oder der Vergleich von PCR-Amplifikaten, die sowohl Transgen als auch Endogen als Templat haben (*total*), zu PCR-Amplifikaten, die spezifisch endogene Transkripte als Templat verwenden (*endogen*) (Yu *et al.*, 2007). Letztere Methode bietet den Vorteil, dass sie unabhängig von der Sequenz des eingesetzten Vektorsystems ist und der relative Anteil der Transgenexpression an der gesamten Expression ermittelt werden kann. Eine geringe Differenz von endogen zu total weist dabei auf ein effizientes *silencing* hin.

Eine quantitative RT-PCR Analyse der RNA aller etablierten iPS-Zelllinien zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen endogenem und totalem Transkriptionslevel der vier Reprogrammierungsfaktoren (Abb. 3.2). Die hES-Zelllinie H9 wurde neben der Referenz-hES-Zelllinie I3 als interne Kontrolle verwendet, um die Variabilität der Methode abschätzen zu können, da hier die Expression von total und endogen mangels Transgenen keine Differenz anzeigen sollte.

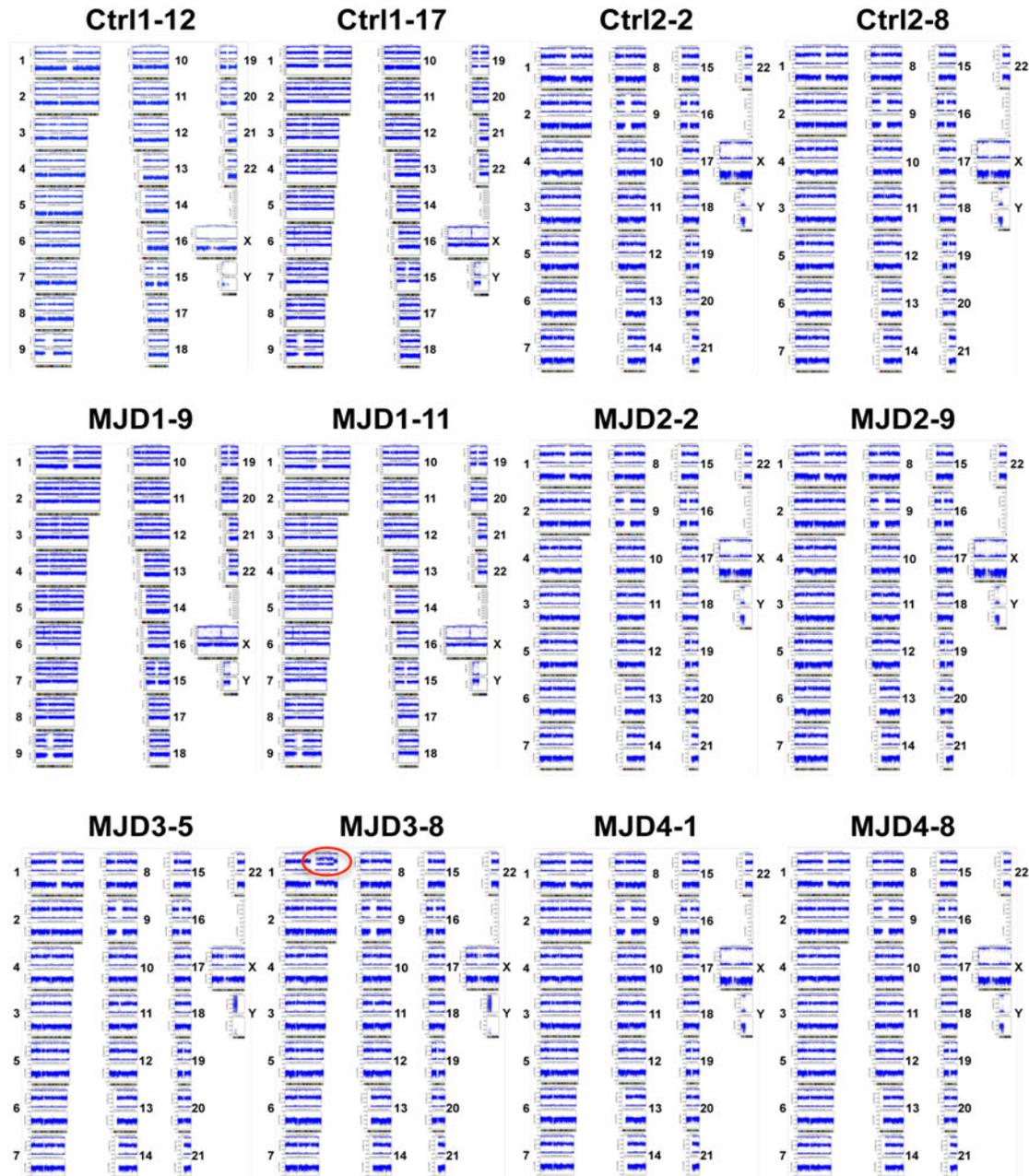


**Abb. 3.2: Quantitative RT-PCR Analyse der iPS-Zelllinien zur Bestimmung der *silencing*-Effizienz**  
 Quantitative Analyse der Expression von OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC total *versus* endogen der iPS-Zelllinien und der ES-Zelllinie H9 als transgenfreie Kontrolle. Schwarze Balken repräsentieren das totale Expressionslevel, weiße Balken das endogene. Die Expression wurde zu GAPDH normalisiert und als relative Expression zur hES-Zelllinie I3 als 1 definiert. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung eines Triplikats.

### 3.1.3 Die generierten iPS-Zelllinien besitzen einen intakten Karyotyp nach *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Array

Humane ES-Zellen unterliegen *in vitro* einem ständigem Selektionsprozess, der schnell proliferierende Zellen präferiert und dessen Einflussstärke von den verwendeten Kulturbedingungen abhängig ist (Maitra *et al.*, 2005; Menendez *et al.*, 2005). Da humane

iPS-Zellen unter denselben Bedingungen wie hES-Zellen kultiviert werden, unterliegen sie ebenfalls diesem Prozess, der genetisch aberrante Zellen mit Proliferationsvorteil bevorzugt. Zusätzlich könnten während des Reprogrammierungsprozesses genomische Aberrationen auftreten, die auf insertionale Mutagenese der viralen Transgene oder andere zelluläre Prozesse, die die Reprogrammierung begleiten, zurückzuführen sein können.



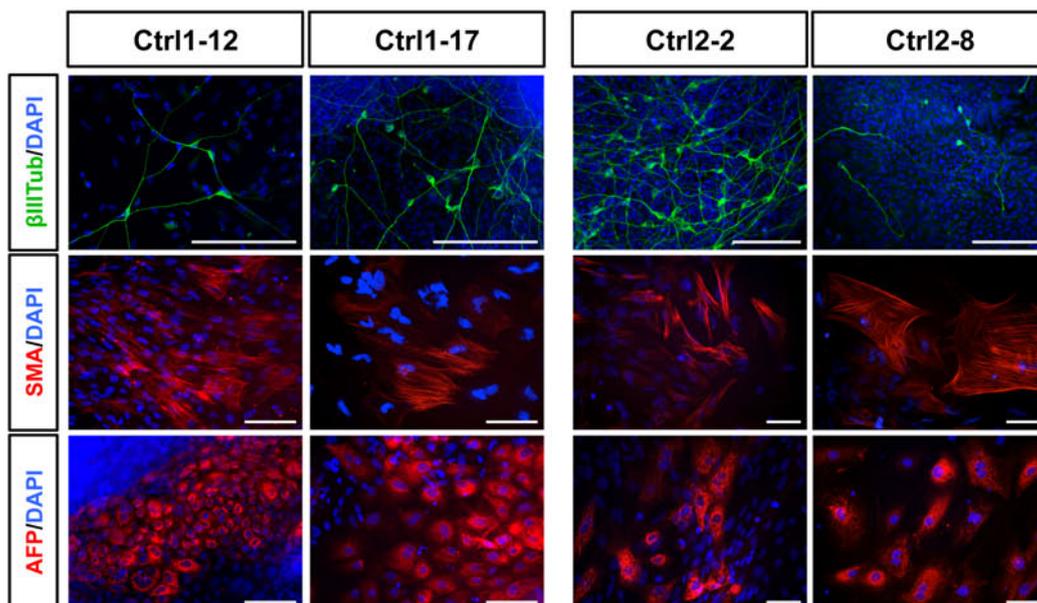
**Abb. 3.3: Genomische Analyse der etablierten iPS-Zelllinien mit SNP-Array**

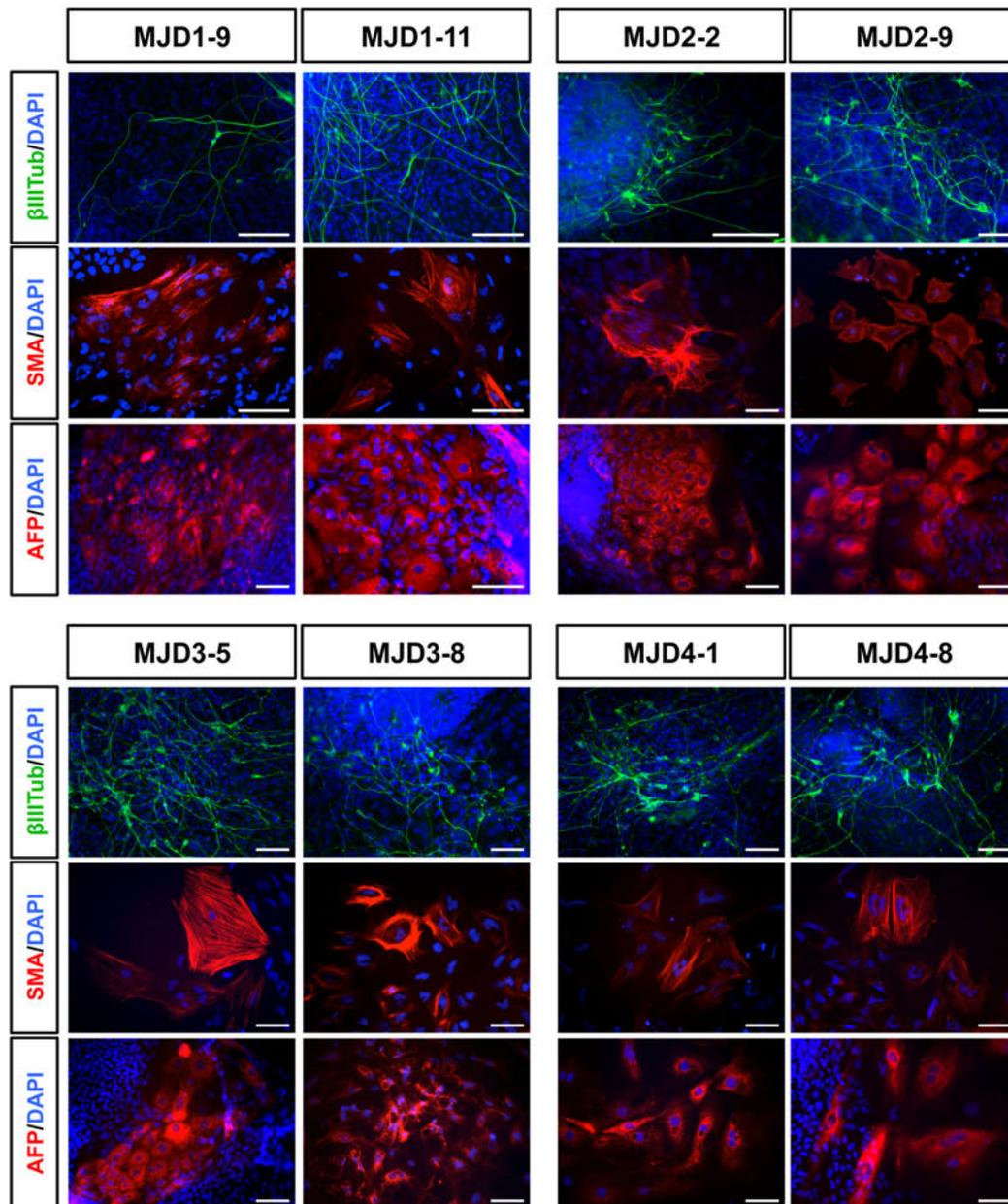
Die genomische DNS der iPS-Zellen wurde isoliert und die SNP für das gesamte Genom genotypisiert. Die Daten wurden mit dem Illumina BeadStudio prozessiert und sind als Log R Verhältnis (oberes Bild jedes Chromosoms) und B Allel-Frequenz (unteres Bild jedes Chromosoms) dargestellt. SNPs von intakten Chromosomen besitzen ein Log R Verhältnis von 0 und eine B Allel-Frequenz von 0, 0,5 oder 1. Heterozygote Deletionen würden in einem Log R Verhältnis  $<0$  und einer B Allel-Frequenz von ausschließlich 0 oder 1 resultieren. Eine Duplikation in einem Chromosom würde sich durch ein Log R Verhältnis von  $>0$  und einer B Allel-Frequenz von 0, 1/3, 2/3 oder 1 manifestieren. Mit Ausnahme von einer Duplikation im langen Arm von Chromosom 1 in der iPS-Zelllinie MJD3-8 (roter Kreis), zeigten die iPS-Zelllinien keine größeren Aberrationen.

Um genomische Aberrationen in den etablierten iPS-Zelllinien auszuschließen, wurde genomische DNS aller iPS-Zelllinien extrahiert und mit einem *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Array am Institut für Humangenetik der Universität Bonn analysiert. Mit Ausnahme der iPS-Zelllinie MJD3-8, die eine Duplikation des langen Arms des Chromosoms 1 zeigte (roter Kreis, Abb. 3.3), waren alle iPS-Zelllinien frei von größeren genomischen Abnormalitäten wie Duplikationen und Deletionen. Eventuelle Translokationen können mit der Methode des SNP-Arrays nicht detektiert werden.

### 3.1.4 Ungerichtete *in vitro*-Differenzierung generiert Zelltypen aller drei Keimblätter

Das Schlüsselcharakteristikum von hES- und iPS-Zellen ist ihr Differenzierungspotential. Werden die zum Erhalt des pluripotenten Zustandes benötigten Faktoren wie Feeder-basierte Kultur und *basic fibroblast growth factor* (bFGF) entzogen, differenzieren die pluripotenten Stammzellen spontan. Führt man diese spontane Differenzierung in Form von Zellaggregaten in Suspension durch, so bilden sich sogenannte Embryoidkörper (*embryoid bodies*, EBs) (Martin und Evans, 1974; Thomson *et al.*, 1998). Diese EBs enthalten schon nach kurzer Differenzierungsdauer Derivate aller drei embryonalen Keimblätter: Endo-, Meso- und Ektoderm. Spezifische Zelltypen für das jeweilige Keimblatt können über entsprechende Marker in der Immunfluoreszenz identifiziert werden.





**Abb. 3.4: *In vitro*-Differenzierung der iPS-Zelllinien in Derivate aller drei Keimblätter**

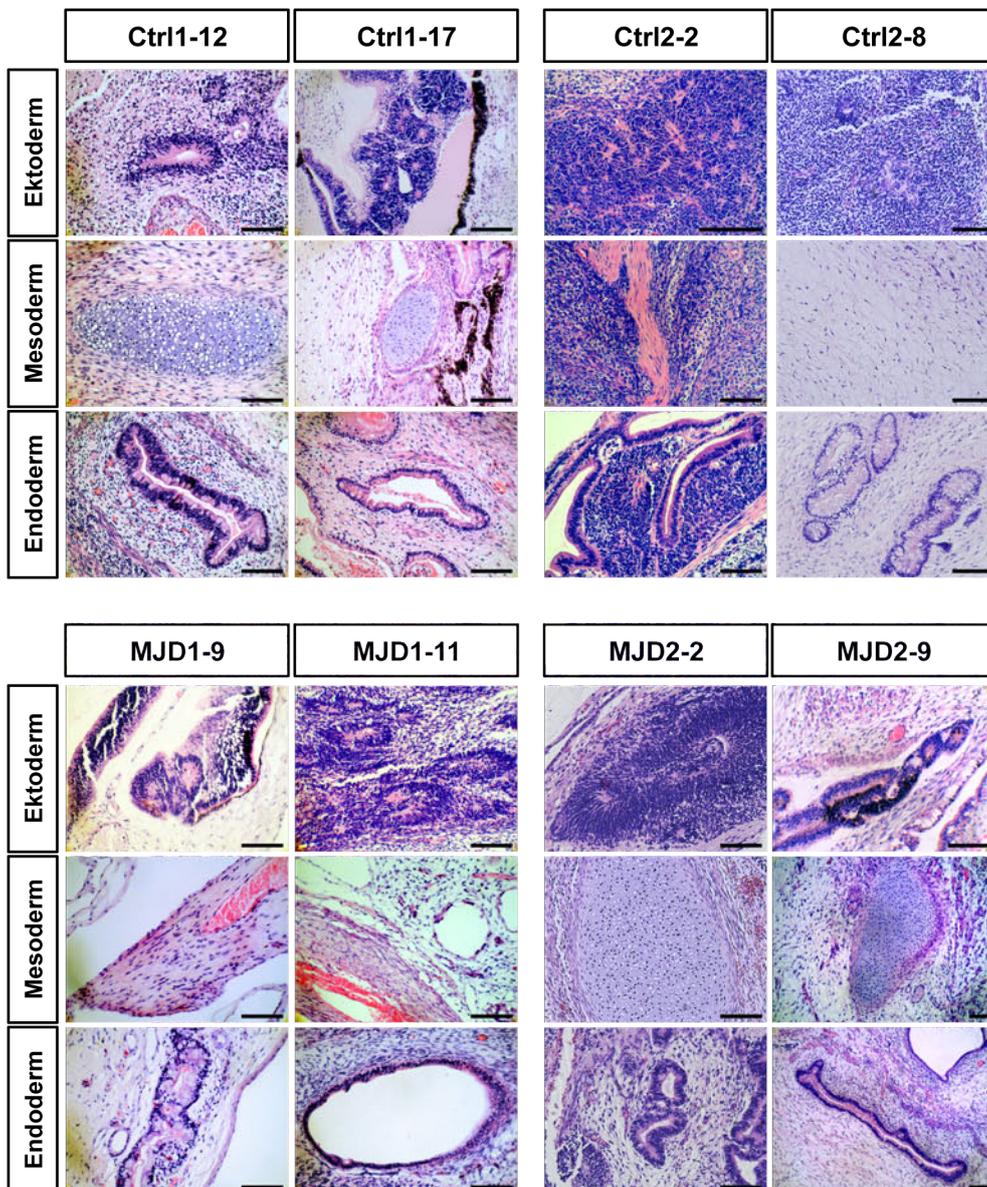
Aggregate der iPS-Zellen wurden fünf Tage ohne bFGF in Suspension kultiviert, um spontane Differenzierung zu induzieren. Die Kulturen wurden sieben Tage nach Plattierung fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung für Marker aller drei Keimblätter durchgeführt.  $\beta$ III-Tubulin ( $\beta$ III-Tub, grün), *smooth muscle actin* (SMA, rot),  $\alpha$ -fetoprotein (AFP, rot). DNS mit DAPI gefärbt (blau). Skalierungsbalken = 100  $\mu$ m.

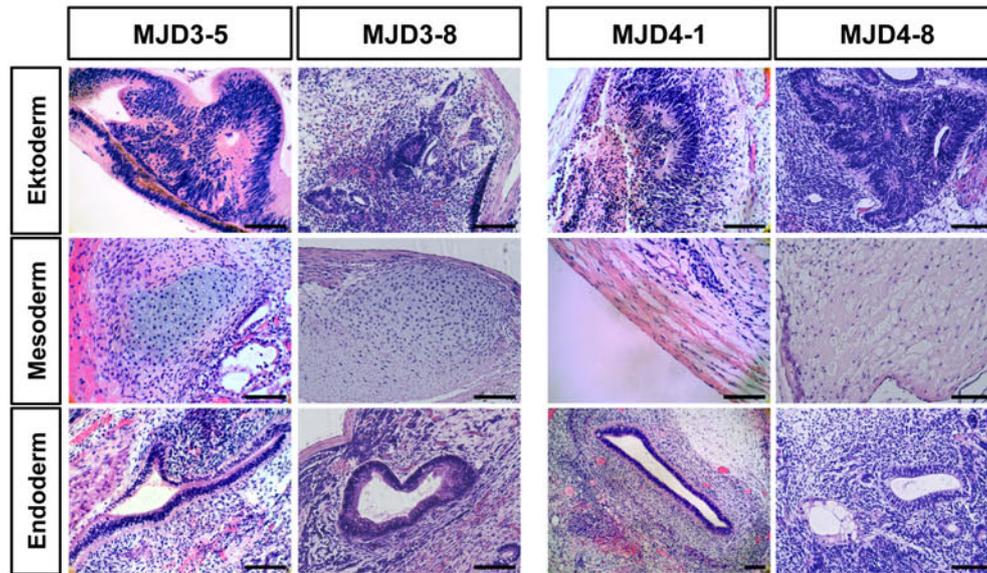
iPS-Zellen aller etablierten Linien wurden für fünf Tage als EBs kultiviert und danach auf PO/Fn-beschichteten Schalen plattiert. Die plattierten EBs wurden für weitere sieben Tage kultiviert, um ein Auswachsen der differenzierten Zellen aus den plattierten Aggregaten zu ermöglichen. Färbung und Analyse mittels Immunfluoreszenz auf die Keimblattspezifischen Marker  $\beta$ III-Tubulin ( $\beta$ III-Tub; Ektoderm), *smooth muscle actin* (SMA; Mesoderm) und  $\alpha$ -fetoprotein (AFP; Endoderm) zeigte Derivate aller drei Keimblätter in EBs aller untersuchten iPS-Zelllinien.

### 3.1.5 Die generierten iPS-Zelllinien bilden Teratome in immundefizienten Mäusen

Der Goldstandard zur Bestimmung der Pluripotenz von humanen Zellen ist der Nachweis des Differenzierungspotentials als Teratomassay *in vivo* (Thomson *et al.*, 1998).

Für einen Teratomassay werden iPS-Zellen in die Testis, intramuskulär oder in die Nierenkapsel von immundefizienten SCID/beige-Mäusen transplantiert, um eine allogene Abstoßung zu vermeiden. Dort beginnen die Zellen in unkontrollierter Weise zu differenzieren und formen eine Tumorstruktur, die Gewebe aus Derivaten aller drei embryonalen Keimblätter (Ekto-, Endo- und Mesoderm) enthält.





**Abb. 3.5: Analyse der in den iPS-Zell-generierten Teratomen enthaltenen Gewebetypen**

iPS-Zellen wurden in die Testis von SCID/beige-Mäusen injiziert und die resultierenden Teratome nach 6-8 Wochen extrahiert. Die Parafinschnitte der Teratome wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung zur histologischen Analyse gefärbt. Skalierungsbalken = 200 µm.

iPS-Zellen der zu validierenden Linien wurden als Aggregate in die Testes von immundefizienten SCID/beige-Mäusen transplantiert und die entstandenen Teratome nach 6-8 Wochen analysiert. Alle iPS-Zelllinien zeigten Gewebestrukturen der drei Keimblätter (Abb. 3.5) wie Neuroepithel (Ektoderm, alle Linien), Knorpel (Mesoderm, Ctrl1-12, Ctrl11-17, MJD2-2, MJD2-9, MJD3-5, MJD3-8), glatte Muskulatur (Mesoderm, Ctrl2-2, MJD1-9, MJD1-11, MJD4-1), Fettgewebe (Mesoderm, Ctrl2-8, MJD4-8) sowie glanduläre Strukturen und Darm-ähnliches Epithel (Endoderm, alle Linien).

## 3.2 Neurale Differenzierung

Humane iPS-Zellen offerieren attraktive Perspektiven für die *in vitro*-Krankheitsmodellierung von neurodegenerativen Erkrankungen ebenso wie für die Zellersatztherapie von Zellen des ZNS. Einige Limitierungen, wie eine aufwändige Zellkultur und ineffiziente Differenzierungsprotokolle, erschweren hingegen die *in vitro*-Krankheitsmodellierung. Zur Umgehung dieser Limitierungen bietet sich eine stabile, aus humanen iPS-Zellen abgeleitete neurale Stammzellpopulation als Alternative an.

### 3.2.1 Etablierung und Validierung eines optimierten It-NES-Zellgenerierungsprotokolls

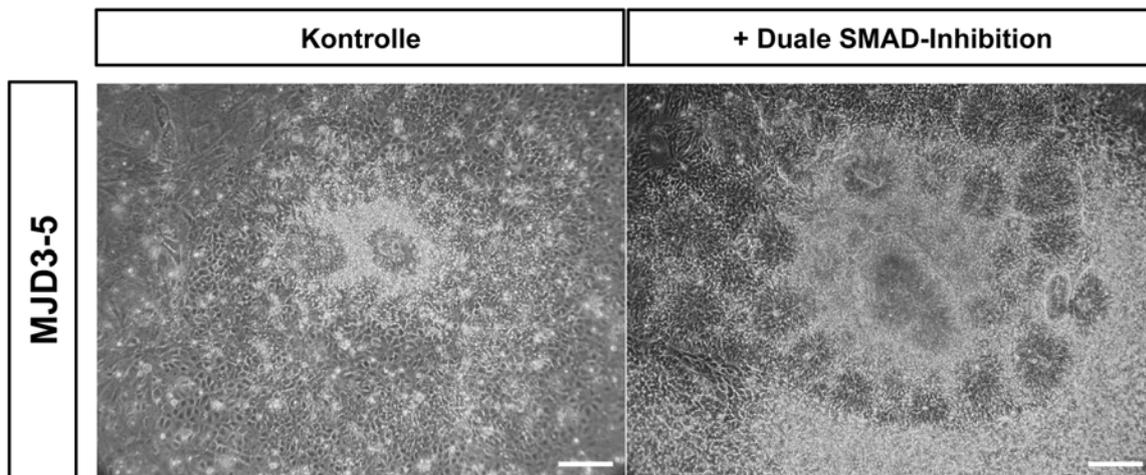
Stabile humane neurale Stammzellen (*neural stem cells*, NSCs) mit einem hohen neurogenen Differenzierungspotential waren zu Beginn dieser Arbeit nicht etabliert. Die bislang publizierten Population besaßen ein geringes neuronales Potential und differenzierten primär in gliale Zelltypen (Conti *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2006; Tabar *et al.*, 2005). Am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie wurde deswegen an einer neurogeneren Alternative geforscht. Als Resultat dieser Anstrengungen konnte eine klonale, neuroepitheliale Stammzellpopulation (*long term neuroepithelial stem cells*, It-NES cells), die stabil ihr hohes neurogenes Potential beibehält, etabliert werden (Koch *et al.*, 2009).

Das von Koch *et al.* etablierte Protokoll zur Generierung von It-NES-Zellen basiert auf einer spontanen *in vitro*-Differenzierung von pluripotenten Stammzellen als EBs, folgend von einer Kultivierungsperiode in N2-Medium, welches neuroinduktiv und restriktiv auf die Proliferation anderer Zelltypen wirkt (Bottenstein und Harvey, 1985; Barker, 1983) und bereits für die neurale Induktion von humanen ES-Zellen etabliert war (Reubinoff *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Hierbei bilden sich distinkte morphologische Strukturen, sogenannte neurale Rosetten, die einer *in vitro*-Rekapitulation der Neurulation entsprechen (Kawata *et al.*, 1991). Diese neuronalen Rosetten werden manuell isoliert und über einen enzymatischen Verdau mittels Trypsin vereinzelt. Die Einzelzellen werden in hoher Zelldichte auf PO/Laminin ausgesät und bei Beibehaltung der hohen Dichte weiterkultiviert, wobei sie ihr neurogenes Potential und Rosetten-ähnliche Strukturen konservieren.

Eine Adaption dieses Protokolls auf die iPS-Zelllinien zeigte eine ineffiziente neurale Induktion im ersten Schritt der spontanen *in vitro*-Differenzierung, die in nur wenigen neuronalen Rosetten nach Plattierung der EBs resultierte (Abb. 3.6). Die hauptsächlich für die Etablierung des It-NES-Generierungsprotokolls nach Koch *et al.*, 2009 im Institut für Rekonstruktive Neurobiologie verwendete humane ES-Zelllinie H9 besitzt ein intrinsisch hohes neuronales Differenzierungspotential (Schwartz *et al.*, 2008), wodurch keine Limitierung in der Generierung ausreichender Mengen von neuronalen Rosetten besteht, um mit dem Protokoll fortzufahren.

Zur Erhöhung der Induktion von neuronalen Rosetten in den iPS-Zelllinien wurde deswegen eine duale SMAD-Inhibition (*dual SMAD inhibition*) während der EB-Phase durch die Inhibitoren SB431542 und Dorsomorphin getestet. Die duale SMAD-Inhibition des *tumor growth factor* (TGF)-beta- und des *bone morphogenic proteins* (BMPs)-Signalweg wurde zuvor in einem adhärennten Protokoll zur effizienten neuronalen Induktion mit den Molekülen SB431542 (TGFbeta) und Noggin (BMP) beschrieben (Chambers *et al.*, 2009). Dorsomorphin ist ein pharmakologisches Nogginsubstitut, welches schon erfolgreich für die

cardiale Differenzierung von murinen ES-Zellen genutzt wurde (Hao *et al.*, 2008) und aus ökonomischen Gründen anstelle von Noggin verwendet wurde.

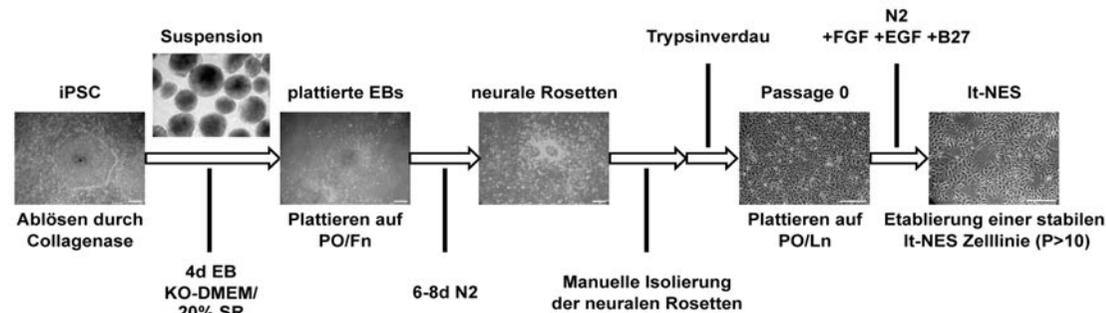
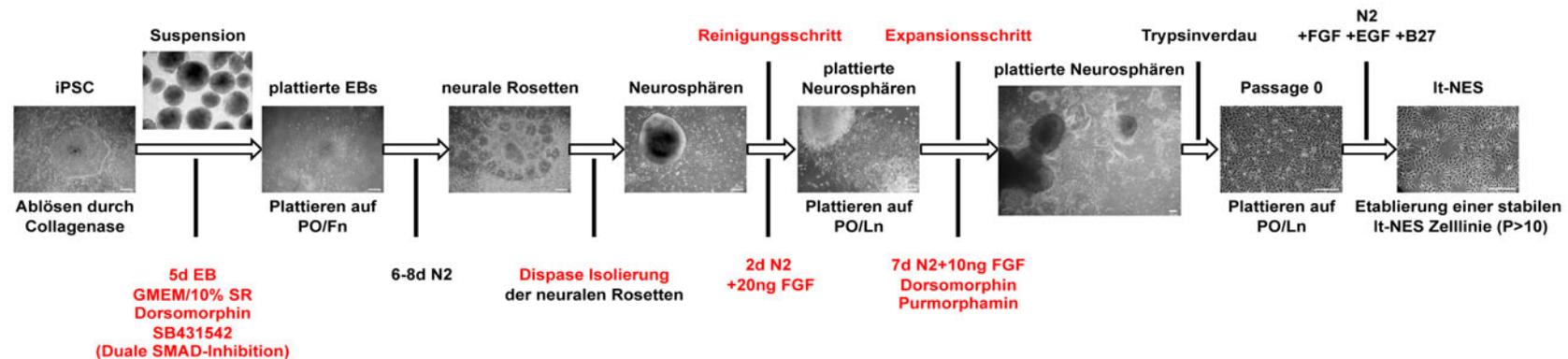


**Abb. 3.6: Effizienzerhöhung der Induktion von neuralen Rosetten durch duale SMAD-Inhibition**  
Phasenkontrast der neuralen Induktion der iPS-Zelllinie MJD3-5 an d11. EBs wurden mit und ohne SB431542 und Dorsomorphin für 5d kultiviert und anschließend auf PO/Ln plattiert. Die plattierten EBs wurden weitere 6d mit und ohne Dorsomorphin in N2 +10 ng/ml bFGF kultiviert. Skalierungsbalken = 100 µm.

Implementierung der dualen SMAD-Inhibition in das EB-basierte Protokoll zur It-NES-Differenzierung resultierte in einer vermehrten Bildung von neuralen Rosetten (Abb. 3.6).

Weiterhin wurde die zeitaufwändige und ausschließlich auf morphologischen Aspekten basierende manuelle Isolation der neuralen Rosetten durch ein selektives, enzymatisches Ablösen vom Substrat mit Dispase ersetzt (Zhang *et al.*, 2001). Die Beseitigung von nicht-neuronalen Zellen wurde durch einen Reinigungsschritt, der auf unterschiedlichen Adhärenzeigenschaften beruht, erreicht (Abb. 3.7, Neurospären).

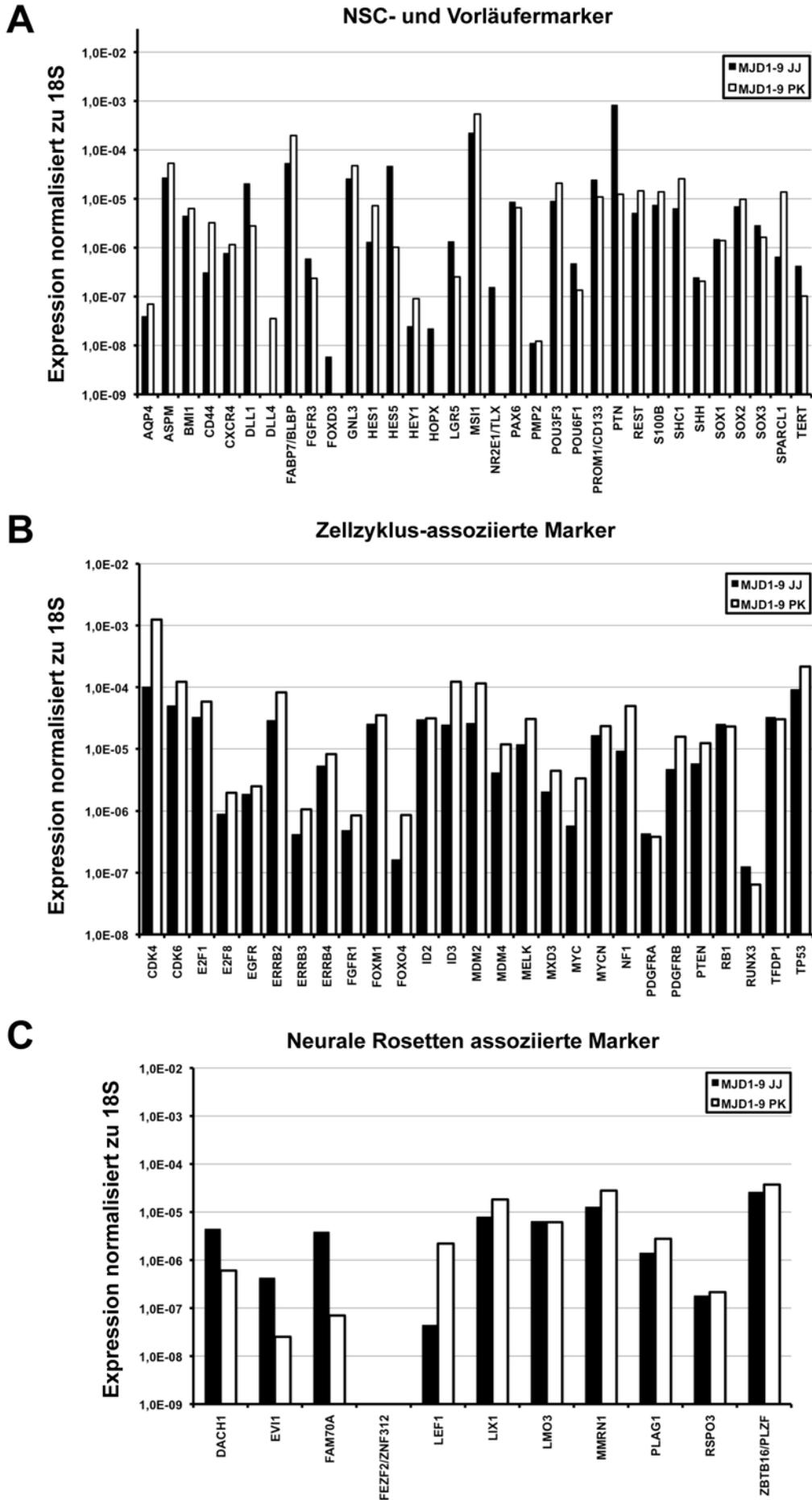
Zur Erhöhung des Zellmaterials vor dem Trypsinverdau wurde ein zusätzlicher Expansionschritt eingeführt (Abb. 3.7), bei dem der mitogene Einfluss des *sonic hedgehog* (SHH)-Signalwegs auf die symmetrische Zellteilung in aus hES-Zellen abgeleiteten neuralen Rosetten (Elkabetz *et al.*, 2008) genutzt wurde. Hierzu wurde der pharmakologische SHH-Agonist Purmorphamin hinzugegeben, dessen Tauglichkeit als Ersatz für SHH-Protein in einem Protokoll für die Generierung von spinalen Motoneuronen aus hES-Zellen bereits gezeigt werden konnte (Li *et al.*, 2008).

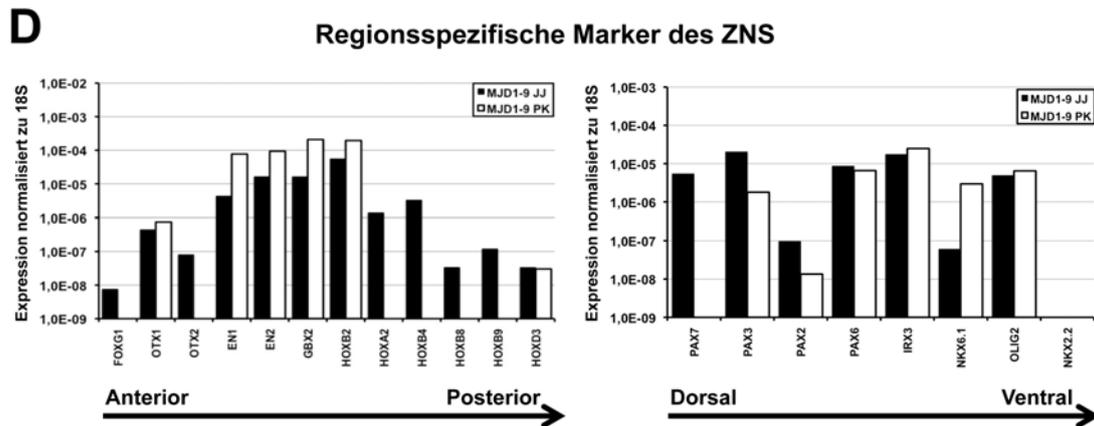
It-NES-Protokoll nach Koch et al., 2009:Modifikationen innerhalb dieser Arbeit:**Abb. 3.7: Schemata für die Generierung von It-NES-Zellen**

Lt-NES-Zellen-Generierungsprotokoll nach Koch *et al.* (links): It-NES-Zellen werden aus PS-Zellen initial über EB-Formation differenziert, aus denen sich nach Plattierung neurale Rosetten bilden. Diese werden isoliert und nach Vereinzellung durch Trypsin in einer hohen Zelldichte ausplattiert. Innerhalb dieser Arbeit wurde dieses Generierungsprotokoll modifiziert (rechts, Änderungen in rot): Das Medium der initialen EB-Formation wurde zum Basalmedium GMEM verändert und mit 10% *Knockout Serum Replacement* (KOSR) anstelle von 20% supplementiert. Zusätzlich wurden die Moleküle Dorsomorphin und SB431542 hinzugegeben. Während der Plattierungsphase wurden zusätzlich 10 ng/ml bFGF supplementiert und die Applikation von Dorsomorphin beibehalten. Die Isolierung der neuronalen Rosetten wurde nicht manuell, sondern enzymatisch mittels Dispase vollzogen. Anstatt die erhaltenen neuronalen Rosetten direkt zu vereinzeln, wurden sie zwei Tage in Suspension als Neurosphären in Anwesenheit von 20 ng/ml kultiviert, um nicht-neurale Kontaminationen über selektive Adhärenz zu eliminieren. Die Neurosphären wurden einer zweiten Plattierungsphase auf PO/Laminin (Ln) unterzogen und in Anwesenheit der Moleküle Dorsomorphin und Purmorphamin sowie 10 ng/ml FGF expandiert. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsin vereinzelt und in hoher Dichte auf PO/Ln ausgesät. (Auswahl der Bilder zur Verdeutlichung der Schemata ohne speziellen Experimentbezug) Skalierungsbalken = 100 µm.

Durch die verwendeten Modifikationen ergab sich die Fragestellung nach der Äquivalenz der generierten It-NES-Zelllinien. Um eventuelle Unterschiede in der Zellidentität der generierten It-NES-Zelllinien zu untersuchen, wurde die Expression von Schlüsselgenen von zwei It-NES-Zelllinien desselben genetischen iPS-Zell-Hintergrundes (MJD1-9), eine generiert von Philipp Koch (PK) und eine generiert nach modifiziertem Protokoll (JJ), mittels *TaqMan Low Density Arrays* (TLDA) miteinander verglichen. Die untersuchten Schlüsselgene wurden in die Kategorien NSC- und Vorläufermarker, Zellzyklus-assoziierte Marker, Marker assoziiert mit neuronalen Rosetten und regionalspezifische Marker des ZNS unterteilt.

Essentielle Marker für humane NS-Zellen wie SOX2, FABP7/BLBP und PAX6 zeigten nahezu identische Expressionslevel (Abb. 3.8, A). Die Expression von Telomerase (TERT) ist ein Charakteristikum von It-NES-Zellen (Koch *et al.*, 2009) und war in beiden Populationen auf einem vergleichbaren Niveau vorhanden (Abb. 3.8, A). Die Zellzyklus-assoziierten Marker zeigten ein ähnliches Expressionslevel, worunter die Rezeptoren FGFR1 und EGFR fallen (Abb. 3.8, B). Diese sind für die Funktionalität der für die Proliferation der It-NES-Zellen essentiellen Mitogene bFGF und *epidermal growth factor* (EGF) unabdingbar. Spezifische Marker für die entwicklungsbiologischen Stufe der neuronalen Rosetten wie DACH1 und ZBTB16/PLZF (Elkabetz *et al.*, 2008), die in It-NES-Zellen im Gegensatz zu anderen humanen NS-Zellen exprimiert sind (Koch *et al.*, 2009), waren in ihrem Expressionslevel bei beiden Populationen vergleichbar (Abb. 3.8, C). Die regionalspezifischen Marker des ZNS zeigten für beide Zellpopulationen eine vorwiegende Lokalisierung im ventralen *Rhombencephalon* (Abb. 3.8, D). Die nach dem modifizierten Protokoll generierte It-NES-Zelllinie JJ zeigte im regionalen Profil dabei eine leicht erhöhte Heterogenität gegenüber der It-NES-Linie PK. Die Expression von FOXP1, einem zerebralen Marker, und PAX7, einem dorsalen Marker, ist in frühen Passagen von It-NES-Zellen detektierbar und nimmt über die Passagen bis zur Undetektierbarkeit ab (Koch *et al.*, 2009), war jedoch in der Linie JJ in Passage 23 noch detektierbar (Abb. 3.8, D). Weiterhin zeigte die Linie JJ eine Expression der HOX-Gene HOXA2, HOXB4, HOXB8 und HOXB9 im Gegensatz zur Linie PK und damit eine stärkere Posteriorisierung innerhalb des *Rhombencephalons* (Abb. 3.8, D).





**Abb. 3.8: Expression von Schlüsselgenen zum Vergleich der It-NES-Generierungsprotokolle**

Die Expression von Schlüsselgenen der beiden Zellpopulationen MJD1-9 PK und MJD1-9 JJ der Passage 23 wurde über einen TLDA analysiert. Die Expression wurde zur Expression der ribosomalen RNA 18S normalisiert und die Expression der Marker in verschiedene Kategorien eingeordnet dargestellt.

### 3.2.2 Die aus iPS-Zellen abgeleiteten It-NES-Zelllinien exprimieren charakteristische neurale Stammzellmarker

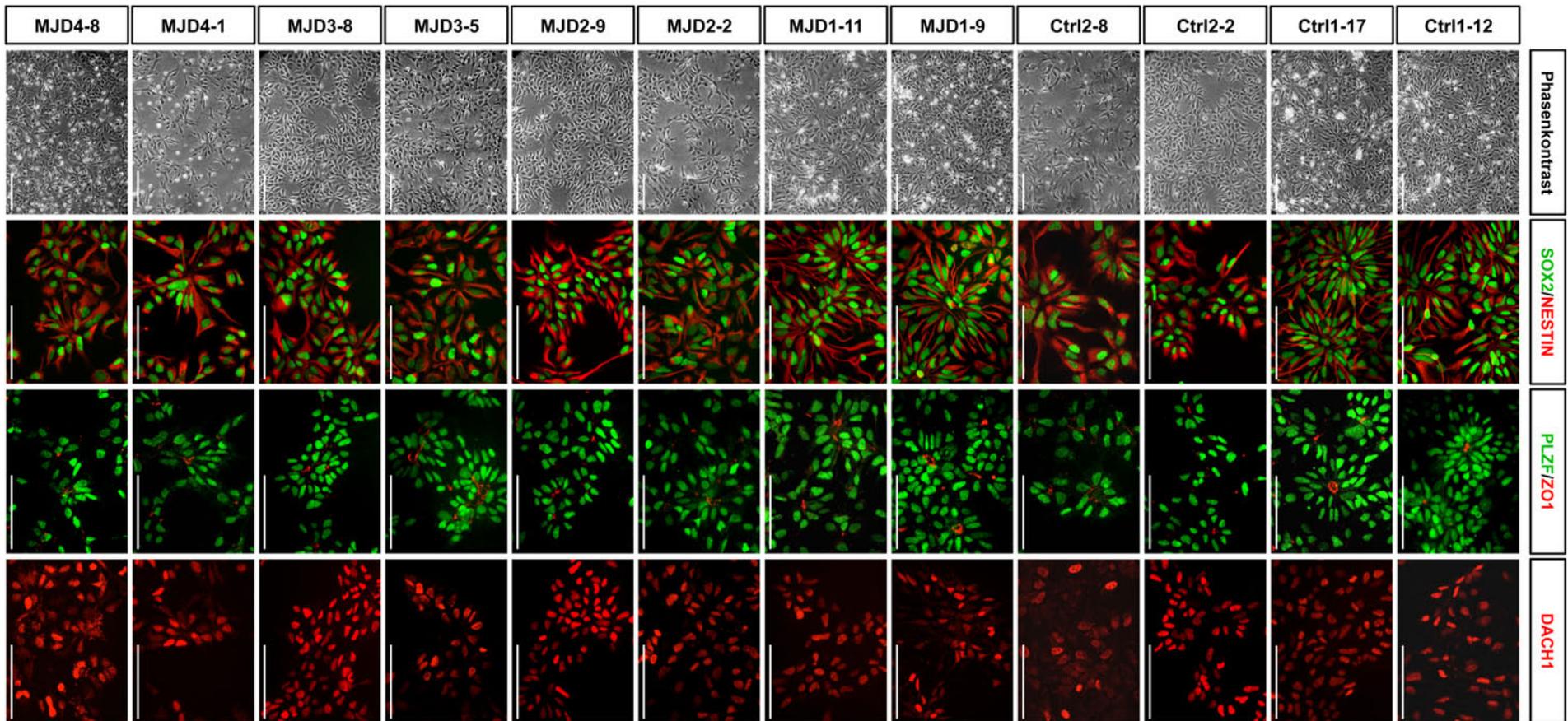
Neben einer exemplarischen Validierung der It-NES-Zelllinie MJD1-9 aus den etablierten iPS-Zellen auf mRNA-Expressionsniveau wurde die Identität aller Zellpopulationen anhand von Morphologie und der Expression von Markerproteinen durch Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

Lt-NES-Zellen sind polare Zellen und bilden in der Zellkultur rosettenartige Strukturen (Koch *et al.*, 2009). Diese charakteristische Morphologie konnte in allen generierten It-NES-Zelllinien detektiert werden (Abb. 3.9).

Schlüsselfaktoren für NS-Zellen sind der Transkriptionsfaktor SOX2 (Ferri *et al.*, 2004) und das Filamentprotein Nestin (Lendahl *et al.*, 1990). Beide Marker zeigten eine homogene Expression in allen generierten It-NES-Zelllinien (Abb. 3.9).

Eine asymmetrische, apikal-laterale Lokalisation des *tight junction*-Markers *zona occludens 1* (ZO-1; *tight junction protein 1*, TJP1) in der Rosettenstruktur ist charakteristisch für rosettenartige NS-Zellen (Elkabetz *et al.* 2008) und auch in It-NES-Zellen nachweisbar (Koch *et al.*, 2009). Alle It-NES-Zelllinien zeigten diese asymmetrische Lokalisation in ihren Rosettenstrukturen (Abb. 3.9).

Rosettenartige NS-Zellen exprimieren zudem die Transkriptionsfaktoren *promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF; *zinc finger and BTB domain containing 16*, ZBTB16) und *dachshund family transcription factor 1* (DACH1) (Elkabetz *et al.*, 2008) und werden ebenfalls in It-NES-Zellen exprimiert (Koch *et al.*, 2009). Die homogene Expression und nukleäre Lokalisation von PLZF und DACH1 konnte durch Immunfluoreszenz in allen It-NES-Zelllinien bestätigt werden (Abb. 3.9, PLZF/ZO-1, DACH1).

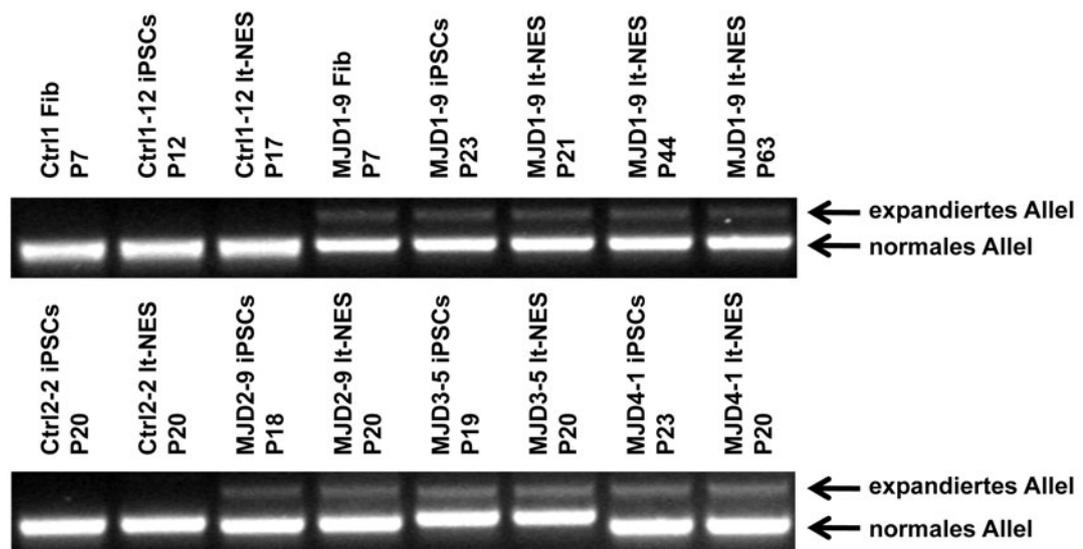


**Abb. 3.9: Morphologische Charakterisierung und Immunfluoreszenzfärbung der generierten It-NESCs**

Morphologie und Markerexpression der etablierten It-NES-Zelllinien (P13-15). Phasenkontrast zur Analyse der It-NES-Zellmorphologie. Immunfluoreszenzfärbung gegen die neuralen Stammzellmarker SOX2 (grün) und Nestin (rot), den *tight junction* Marker ZO-1 (rot) und die rosetten-spezifischen Marker PLZF (grün) und DACH1 (rot). Skalierungsbalken = 100  $\mu$ m.

### 3.2.3 Die Länge des polyglutaminkodierenden Bereichs in iPS- und It-NES-Zellen ist stabil

Für den polyglutaminkodierenden CAG-Bereich, dessen Expansion für MJD ursächlich ist, ist in der mutierten, expandierten Form eine intergenerationale Instabilität beschrieben, die in der paternalen Transmission prominenter als in der maternalen ist (Maruyama *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1995), d.h. die Länge der Expansion kann über die Generationen zunehmen. Zusätzlich existiert in MJD das Phänomen des somatischen Mosaiks, bei dem Zellen desselben Individuums unterschiedliche Längen der CAG-Expansion besitzen (Hashida *et al.*, 1997; Lopez-Cendes *et al.*, 1997; Maciel *et al.*, 1997). Ob das Phänomen des instabilen CAG-Bereichs im Zuge der *in vitro*-Proliferation auftritt, sollte durch eine genomische PCR in verschiedenen Passagen, die den CAG-Bereich überspannt und so Produkte unterschiedlicher Basenlänge für die Allele des *ATXN3* erzeugt, untersucht werden.



**Abb. 3.10: Analyse der CAG-Expansionsstabilität in iPS- und It-NES-Zellen durch genomische PCR**

Genomische DNS wurde isoliert und mit den CAG-Bereich überspannenden Primern amplifiziert und die Produkte elektrophoretisch auf einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt.

Genomische DNS von iPS- und It-NES-Zellen von Kontrollen und MJD-Patienten wurde zu unterschiedlichen Passagen isoliert, die beiden Allele mittels PCR amplifiziert und über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Weder in iPS- noch It-NES-Zellen aller untersuchten MJD-Patienten konnte trotz extensiver Passagierung und Kultivierungsperiode keine Instabilität und Zunahme des CAG-Bereichs detektiert werden (Abb. 3.10).

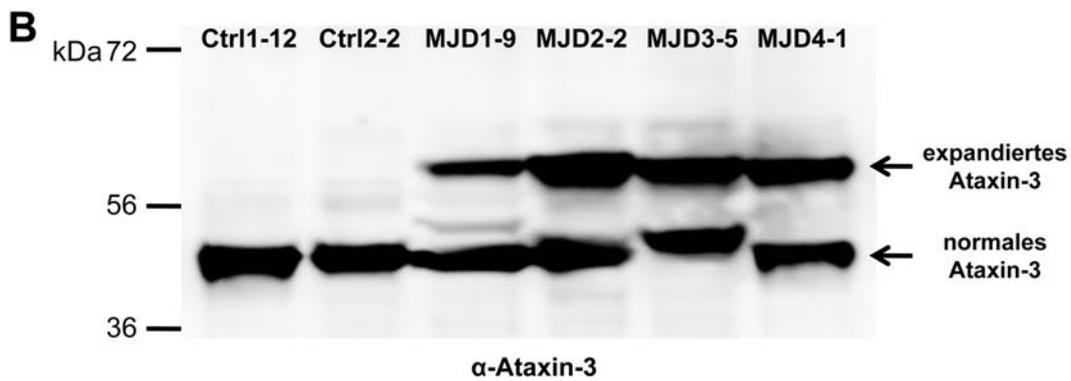
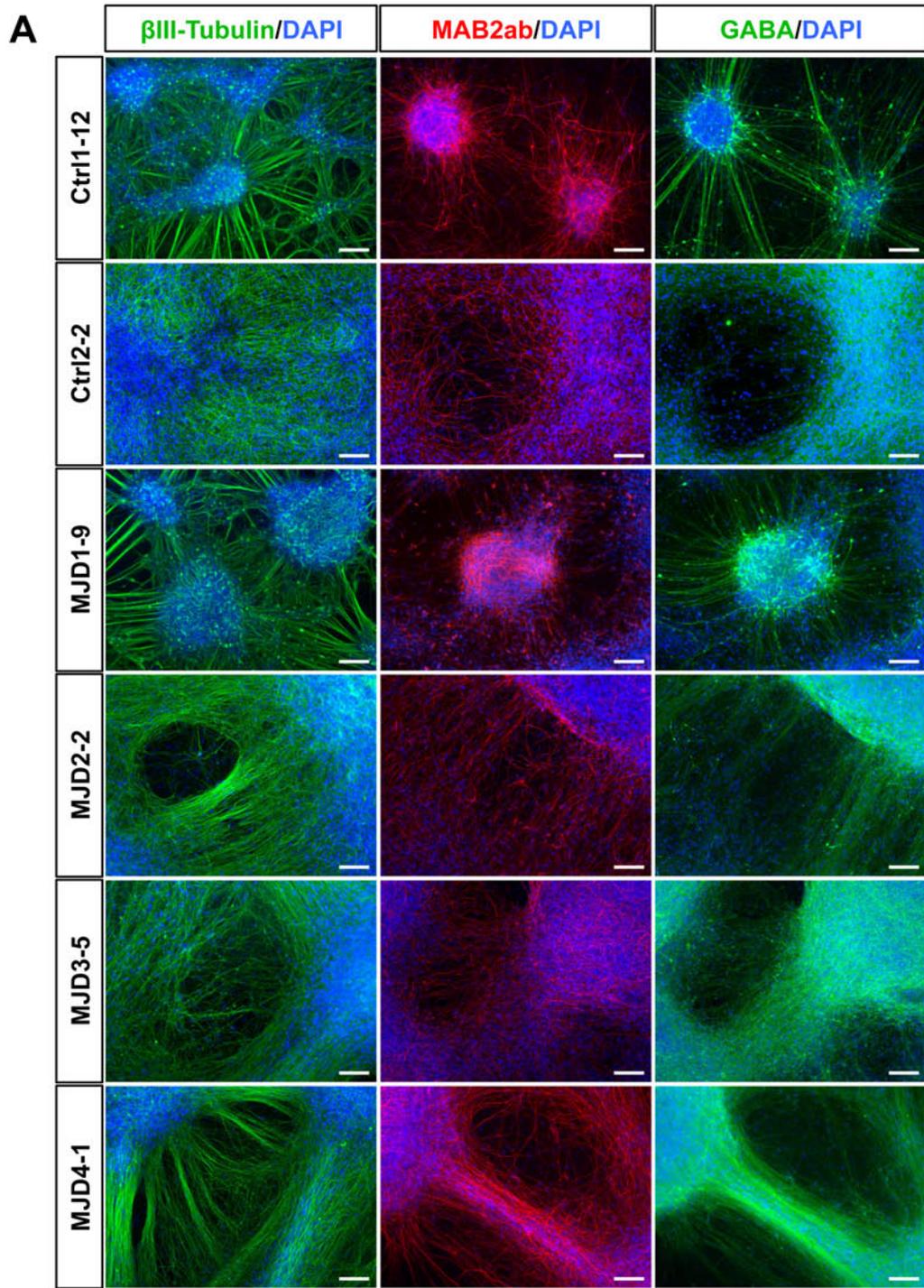
### 3.2.4 Expression von expandiertem Ataxin-3 in It-NES-Zell abgeleiteten neuronalen Langzeitkulturen

It-NES-Zellen differenzieren bei Entzug der Wachstumsfaktoren bFGF und EGF in homogene, neurale Kulturen, wobei der neuronale Anteil über 80% beträgt und überwiegend aus  $\gamma$ -Aminobuttersäure (*gamma-aminobutyric acid*, GABA) positiven Interneuronen besteht (Koch *et al.*, 2009).

Um die generierten It-NES-Zelllinien auf funktioneller Ebene zu charakterisieren, wurden It-NES-Zellen je eines Kontroll- und MJD-Patienten-Klons auf mit Matrigel beschichteten Platten ausgesät und ohne Wachstumsfaktoren in *neural growth medium* (NGM) für vier Wochen kultiviert. Während der zweiten Woche der Differenzierung wurde zusätzlich der  $\gamma$ -Secretase Inhibitor DAPT hinzugegeben, der die Differenzierung von neuronalen Stammzellen durch Blockade des Notch-Signalwegs beschleunigt (Borghese *et al.*, 2010; Elkabetz *et al.*, 2008). Immunfluoreszenzfärbungen zeigten die Expression des neuronalspezifischen Markers  $\beta$ III-Tubulin (Caccamo *et al.*, 1989) (Abb. 3.11, A).

Weiterhin exprimierte ein Großteil der Zellen mit dem *microtubule-associated protein 2 a+b* (MAP2ab) einen Marker für Neurone eines fortgeschrittenen Reifungsgrades (Izant *et al.*, 1980) (Abb. 3.11, A). Der Neurotransmitter GABA konnte in der Immunfluoreszenz in aus den generierten It-NES-Zelllinien differenzierten Neuronen nachgewiesen werden (Abb. 3.11, A), was ein Merkmal für GABAerge Interneurone ist, die als hauptsächlich vorkommender neuronaler Subtyp für differenzierte It-NES-Zellen beschrieben sind (Koch *et al.*, 2009).

Zur Analyse der Expression von normalen und expandiertem Ataxin-3 in Neuronen auf Proteinebene wurden Lysate von vier Wochen alten neuronalen Kulturen durch SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot mit einem Antikörper gegen Ataxin-3 inkubiert. Detektion durch Chemilumineszenz zeigte eine Doppelbande für Ataxin-3 bei  $\sim 42$  kDa in Kontrollneuronen und zwei distinkte Banden mit einer Bande für normales Ataxin-3 bei  $\sim 42$  kDa und bei  $\sim 60$  kDa für das expandierte Protein in MJD-Neuronen (Abb. 3.11, B).



**Abb. 3.11: MJD It-NES-Zellen differenzieren in GABAerge Neurone und exprimieren expandiertes Ataxin-3**  
 It-NES-Zellen (Passagen 15-18) wurden durch Entzug der Wachstumsfaktoren für vier Wochen differenziert. **(A):** It-NES-Zell-abgeleitete Neurone exprimieren die neuronalen Marker  $\beta$ III-Tubulin (grün) und MAP2ab (rot). Immunfluoreszenzfärbung gegen GABA (grün). Zellkerne mit DAPI angefärbt (blau). **(B):** Immunblot gegen Ataxin-3 mit  $\alpha$ -Ataxin-3 (1H9). Skalierungsbalken = 100  $\mu$ m.

### **3.3 Stimulation der Aggregation von mutiertem Ataxin-3 in neuronalen Kulturen von MJD-Patienten**

Eine Kernfrage der Krankheitsmodellierung mit iPS-Zell-abgeleiteten Neuronen ist, inwiefern sich Krankheiten *in vitro* modellieren lassen, deren klinische Manifestation in die späteren Lebensdekaden fällt. Für Krankheiten mit einem späteren Manifestationszeitpunkt kann es allerdings für die Detektion eines Phänotyps *in vitro* notwendig sein die Patienten-Neurone einem Stimulus auszusetzen, der erst einen Unterschied zu gesunden Kontroll-Neuronen erkennbar werden lässt.

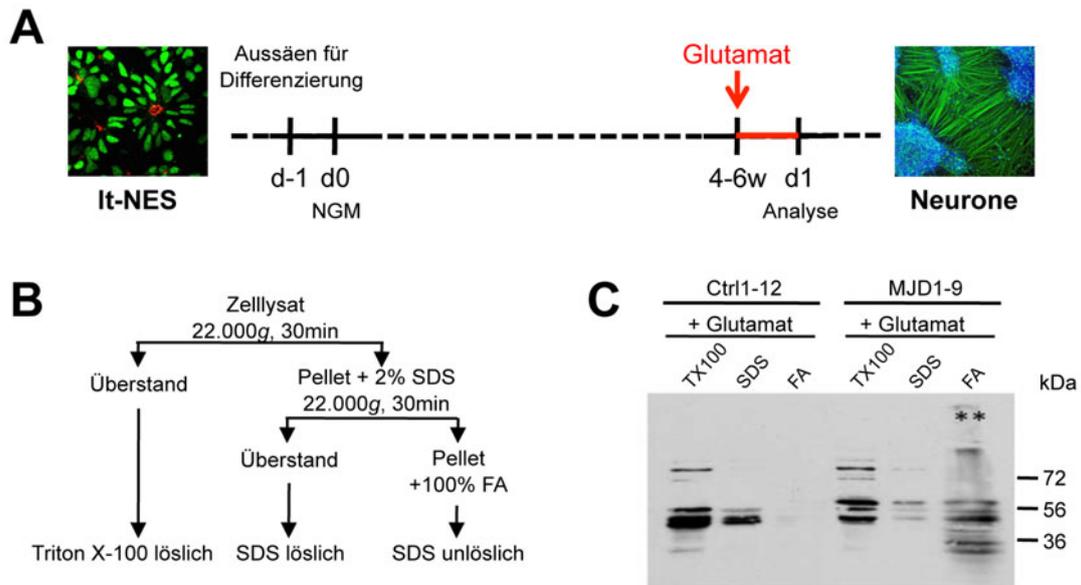
Dieser Hypothese folgend wurden MJD- und Kontroll-Neurone verschiedenen Stimuli ausgesetzt und untersucht, ob sich ein unterschiedliches Aggregationsverhalten von Ataxin-3 zwischen normalen und expandierten Ataxin-3 einstellt.

#### **3.3.1 Glutamat induziert Mikroaggregation von Ataxin-3 in neuronalen MJD-Langzeitkulturen**

Sowohl Calpaine (Haacke *et al.*, 2007) als auch Caspasen (Wellington *et al.*, 1998) prozessieren Ataxin-3 proteolytisch *in vitro* und ein expandiertes C-terminales Ataxin-3-Fragment zeigt eine verstärkte Neigung zur Aggregation im Vergleich zum Protein der vollen Länge. Eine Aktivierung dieser  $Ca^{2+}$ -abhängigen Proteasefamilien durch transiente Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -konzentration durch erregungsvermittelte Depolarisation, könnte demnach einen frühen Schritt in der Neuronen-spezifischen Pathologie von MJD darstellen.

In Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Koch vom Institut für Rekonstruktive Neurobiologie und Dr. Peter Breuer von der Klinik für Neurologie der Universitätsklinik Bonn wurden auf Basis der in dieser Arbeit etablierten MJD- und Kontroll-iPS-Zellen und den aus diesen abgeleiteten It-NES-Zellen die Auswirkungen eines exzitatorischen Glutamatstimulus auf das Aggregationsverhalten von expandiertem Ataxin-3 in aus It-NES-Zellen generierten Neuronen untersucht, da eines der Schlüsselkennzeichen der MJD Pathologie die Bildung von SDS-unlöslichen, Ataxin-3-enthaltenden Aggregaten ist (Ikeda *et al.*, 1996).

Hierzu wurden It-NES-Zellen auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät und für vier bis sechs Wochen in NGM differenziert (Abb. 3.12, A). Diese Differenzierungszeit ist für die Reifung aus It-NES-Zellen abgeleiteten Neurone notwendig, um elektrophysiologisch aktiv zu werden und funktionelle Glutamatrezeptoren zu exprimieren (Koch *et al.*, 2009). Die neuronalen Kulturen wurden zwei Mal je 30 min, mit einer Ruhezeit von ebenfalls 30 min zwi-



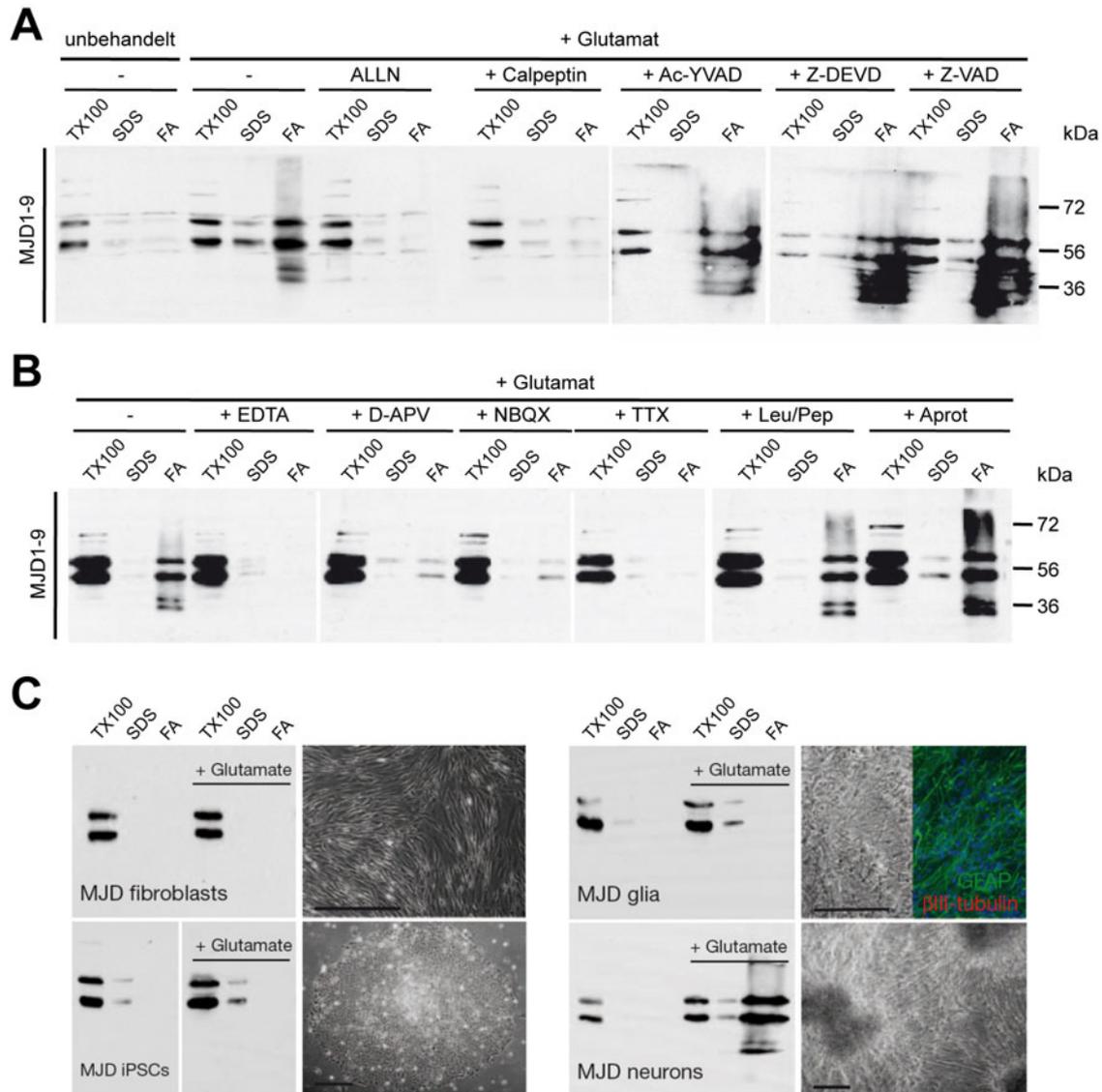
**Abb. 3.12: Glutamatstimulation induziert Mikroaggregation von expandiertem Ataxin-3 in MJD-Neuronen**  
**(A)** Von iPS-Zellen abgeleitete It-NES-Zellen wurden für vier bis sechs Wochen in NGM zu neuronalen Kulturen differenziert. Glutamat behandelte Kulturen wurden 24 h nach Stimulus lysiert. **(B)** Die Proteinlysate wurden sequentiell nach differentieller Löslichkeit in den Detergentien Triton-X 100 (TX-100), SDS und Ameisensäure (FA) durch Zentrifugation fraktioniert. **(C)** Immunblot mit  $\alpha$ -Ataxin-3 (986) nach Glutamatstimulation.

schen den Stimuli, mit 100  $\mu$ M Glutamat in BSS-Puffer stimuliert und direkt (Abb. 3.12, C) oder 24 h später (Abb. 3.13, A, B und C) lysiert. Die Zellysate der neuronalen Kulturen wurden einem Fraktionierungsprotokoll unterzogen, um Ataxin-3-Spezies mit unterschiedlicher Löslichkeit in spezifischen Detergentien im Immunblot detektieren zu können (Abb. 3.12, B). SDS-unlösliche Ataxin-3-Spezies sind charakteristisch für die molekulare Pathogenese von MJD. Die SDS-unlösliche Fraktion wurde vor dem Auftragen mit Ameisensäure (*formic acid*, FA) solubilisiert.

In der SDS-unlöslichen Fraktion der Kontroll-It-NES-Linie Ctrl1-12 konnte nach Glutamatstimulation kein Signal für Ataxin-3 detektiert werden (Abb. 3.12 C). Glutamatstimulierte neuronale Kulturen von MJD1-9 zeigten hingegen verschiedene, markante Fragmente von 25-45 kDa und hochmolekularen Schmier positiv für Ataxin-3 in der SDS-unlöslichen Fraktion (Abb. 3.12 C). Ohne Glutamatstimulus konnte hingegen kein Ataxin-3 in der SDS-unlöslichen Fraktion in neuronalen Kulturen der MJD-It-NES-Patientenlinie MJD1-9 nachgewiesen werden (Abb. 3.13, A). Das Phänomen der SDS-unlöslichen, Ataxin-3-positiven Mikroaggregate nach Glutamatstimulation konnte konsistent in allen von MJD-It-NES-Zellen abgeleiteten Neuronen der verschiedenen Patienten dargestellt werden, wohingegen die SDS-unlösliche Fraktion von neuronalen Kontrollpopulationen durchgehend negativ für Ataxin-3 war (Koch *et al.*, 2011).

Um der Frage nachzugehen, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteasen (Calpaine, Caspasen oder beide) für die Prozessierung und Aggregation von expandiertem Ataxin-3 verantwortlich sind, wurde der Einfluss von spezifischen, pharmakologischen Inhibitoren

gegen diese Proteasen untersucht. Für die Inhibition von Calpainaktivität wurden Calpeptin (200  $\mu\text{M}$ ) und N-Azetyl-Leu-Leu-Norleucinal (ALLN, 100  $\mu\text{M}$ ) und für Caspaseaktivität der



**Abb. 3.13: Exzitiation-vermittelte Calpain-Aktivität induziert Mikroaggregation von expandiertem Ataxin-3** (A) Immunblot mit  $\alpha$ -Ataxin-3 (986) nach Glutamatstimulation mit gleichzeitiger Calpaininhibition durch Calpeptin (200  $\mu\text{M}$ ) und ALLN (100  $\mu\text{M}$ ) sowie Caspaseinhibition durch Ac-YVAD, Z-DEVD und z-VAD-fmk (alle 10  $\mu\text{M}$ ). (B) Proteaseinhibition durch Leupeptin/Pepstatin A (Leu/Pep, 200/20  $\mu\text{M}$ ) und Aprotinin (Aprot, 2  $\mu\text{M}$ ) während Glutamatstimulation und Immunblot mit  $\alpha$ -Ataxin-3 (986) Blockade der Signalkaskade zur Aktivierung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch EDTA (500  $\mu\text{M}$ ), D-APV (50  $\mu\text{M}$ ), NBQX (10  $\mu\text{M}$ ) oder TTX (0,3  $\mu\text{M}$ ) im Kontext der Glutamatstimulation. (C) Immunblot mit  $\alpha$ -Ataxin-3 (986) von mit Glutamat stimulierten MJD1-9-Fibroblasten, MJD1-9-iPS-Zellen und MJD1-9-Gliazellen (C). Phasenkontrastbilder zur morphologischen Charakterisierung der verschiedenen Zelltypen, Immunfluoreszenzfärbung gegen GFAP (grün) und  $\beta$ III-Tubulin (rot) zur Validierung der glialen Natur der Kultur. Stimulation durchgeführt von Dr. Philipp Koch, Fraktionierung und Immunblot von Dr. Peter Breuer. (Abb. verändert nach Koch *et al.*, 2011) Skalierungsbalken = 250  $\mu\text{m}$ .

pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk, der Caspase-1-Inhibitor Ac-YVAD und der Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD (alle 10  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Die Kulturen wurden vor Glutamatstimulus jeweils 30 min mit dem entsprechenden Inhibitor vorinkubiert und die Inhibition während der gesamten Stimulationsdauer und Ruhezeit aufrecht gehalten. Sowohl Calpeptin als auch ALLN konnten vollständig eine Generierung von Ataxin-3-positiven, SDS-unlöslichen

Mikroaggregaten inhibieren (Abb. 3.13, A). Im Gegensatz dazu zeigte keiner der verwendeten Caspaseinhibitoren einen reduzierenden Einfluss auf die Generierung der Ataxin-3-enthaltenden, SDS-unlöslichen Mikroaggregate (Abb. 3.13 A).

Neben der Beteiligung von Caspasen und Calpainen wurden zusätzlich weitere Proteasefamilien auf ihren Einfluss auf die Mikroaggregation von Ataxin-3 untersucht. Hierzu wurde die Kombination der Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren Leupeptin/Pepstatin A (Leu/Pep, 200/20  $\mu\text{M}$ ) und der Serinproteaseinhibitor Aprotinin (Aprot, 2  $\mu\text{M}$ ) getestet. Keiner der getesteten Inhibitoren konnte der Induktion von Ataxin-3-positiven Mikroaggregaten entgegenwirken (Abb. 3.13 B).

Die Symptome von MJD sind hauptsächlich auf die Beeinträchtigung und Degeneration von Neuronen zurückzuführen. Zur Untersuchung der neuronalen Spezifität der Glutamat-induzierten Mikroaggregation wurden nicht-neuronale Zelltypen mit Glutamat stimuliert. Glutamatstimulation von MJD-Fibroblasten, iPS-Zellen oder für den glialen Marker **glial fibrillary acidic protein** (GFAP)-positiven Kulturen (Bignami *et al.*, 1972) resultierte in keinem der untersuchten Zelltypen in einem Ataxin-3-positiven Signal in der SDS-unlöslichen Fraktion (Abb. 3.13, C).

Ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren werden nicht ausschließlich in Neuronen sondern ebenfalls in glialen Zelltypen exprimiert.  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx durch Glutamatrezeptoren induziert in Neuronen im Gegensatz zu Gliazellen eine über Kalium- und Natriumkanäle-vermittelte Depolarisation, die spannungsabhängige Calciumkanäle aktiviert, was in einem stark potenzierten Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle im Vergleich zu einem alleine durch Glutamatrezeptoren vermittelten Influx resultiert. Blockade dieser Kaskade mittels Chelatkomplexierung von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch EDTA (500  $\mu\text{M}$ ) inhibierte die Bildung von SDS-unlöslichen Ataxin-3-Mikroaggregaten (Abb. 3.13, B). Ebenso reduzierte die pharmakologische Inhibition von ionotropen NMDA bzw. AMPA-Rezeptoren durch **D(-)-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure** (D-APV, 50  $\mu\text{M}$ ) bzw. **2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo[f]quinoxaline-2,3-dion** (NBQX, 10  $\mu\text{M}$ ) die Stärke des Ataxin-3-Signals in der SDS-unlöslichen Fraktion (Abb. 3.13, B). Interessanterweise verhinderte die Blockade der Membrandepolarisation durch Inhibition der dazu benötigten Natriumkanäle mittels **Tetrodotoxin** (TTX, 0,3  $\mu\text{M}$ ) vollständig eine Induktion von Ataxin-3-positiven Mikroaggregaten. Trotz dieses frühen und deutlichen Aggregationsphänotyps in MJD-Neuronen konnte in der Immunfluoreszenzfärbung für Ataxin-3 keine Formation von mikroskopisch sichtbaren neuronalen, intranukleären Inklusionen (NIs) oder Makroaggregaten detektiert werden (Koch *et al.*, 2011).\*

---

\*Die in den Abbildungen 3.12 und 3.13 gezeigten Daten wurden während der Anfertigung dieser Arbeit in der Publikation „Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado–Joseph disease“ (Koch *et al.*, 2011) bei geteilter Erstautorenschaft von Dr. Philipp Koch, Dr. Peter Breuer, Dr. Michael Peitz und Johannes Jungverdorben veröffentlicht. Die oben im Text erwähnten, hier nicht präsentierten Daten (weitere untersuchte Kontroll- und MJD-Linien, Immunfluoreszenz zur Detektion von NIs) sind in den Supplements zu Koch *et al.*, 2011 publiziert worden.

### 3.3.2 Neuronale Kurzzeitkulturen exprimieren funktionelle purinerge Rezeptoren

Für die Ataxin-3-Aggregation durch Glutamatstimulation müssen die Neurone einen zeitaufwändigen Reifeprozess von wenigstens vier Wochen durchlaufen. Erst nach dieser Zeit exprimieren sie funktionelle Glutamatrezeptoren. Eine Verkürzung dieses notwendigen Differenzierungszeitraums ist für eine potentielle Verwendung in pharmakologischen Screenings auf die Aggregation modifizierende Wirkstoffe von großem Interesse. Im Folgenden wurde deswegen der Fragestellung nachgegangen, ob durch die Wahl eines anderen Stimulus anstelle Glutamats, die für die Induktion von SDS-unlöslichen Ataxin-3-positiven Aggregaten notwendige Zeit reduziert werden kann.

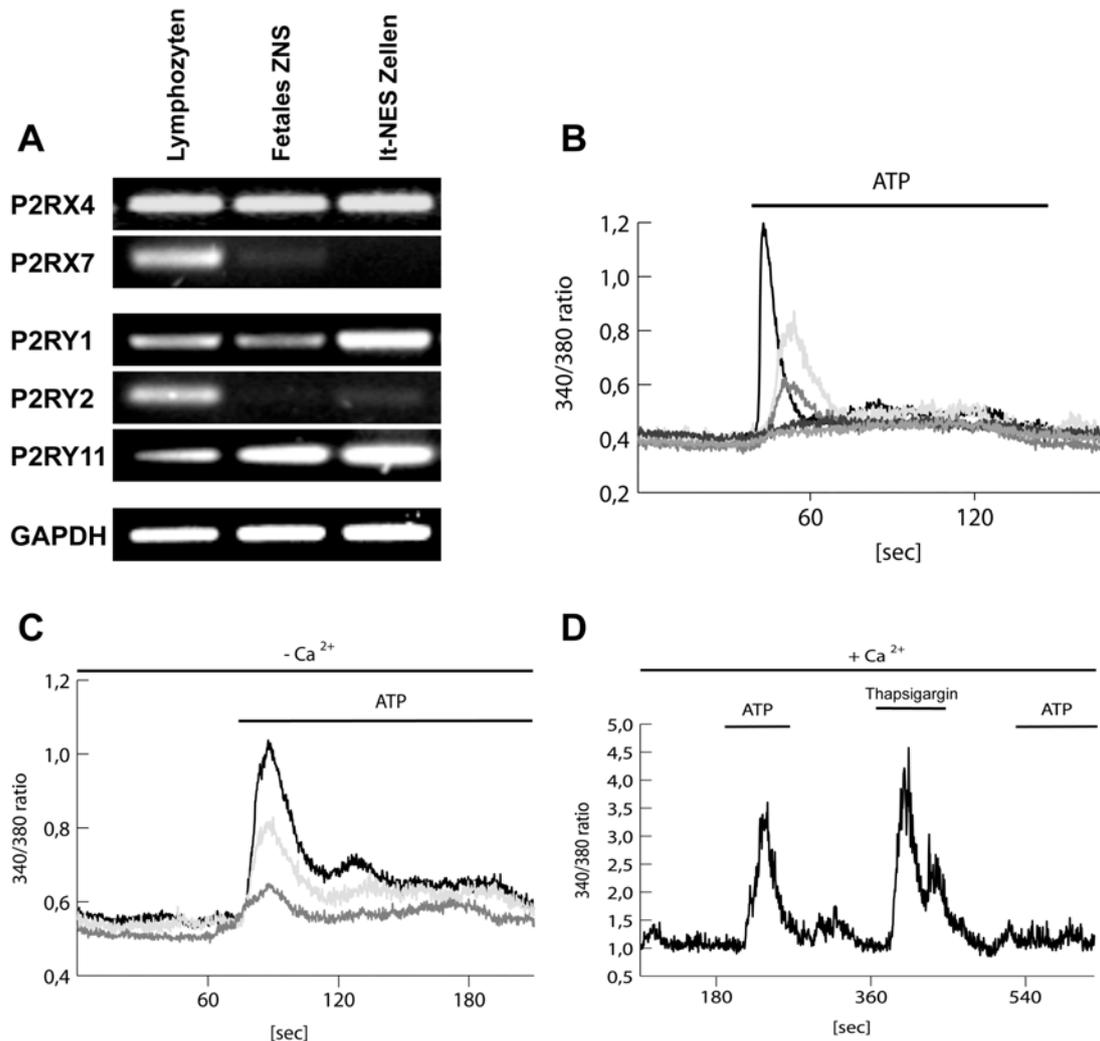
ATP ist nicht nur der Hauptenergieträger der Zelle, sondern kann ebenfalls eine Funktion als Signalmolekül über spezifische Rezeptoren, die ionotropen P2X und die metabotropen P2Y-Rezeptoren, wahrnehmen und unter anderem einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration induzieren (s. 1.3.2). P2-Rezeptoren wurden in murinen ES-Zellen, neuralen Progenitoren und aus murinen ES-Zellen abgeleiteten GABAergen Neuronen nachgewiesen (Delarasse *et al.*, 2009; Khaira *et al.*, 2009).

Zur Überprüfung der Expression von P2-Rezeptoren im frühen Differenzierungsstadium der It-NES-Zellen wurde eine RT-PCR-Analyse für eine Auswahl von P2-Rezeptoren durchgeführt. Hierbei konnte die Expression der P2-Rezeptoren P2X4, P2Y1 und P2Y11, mit einem schwachen Signal auch P2Y2, nachgewiesen werden (Abb. 3.14, A). Der Nachweis eines Transkriptes allein erlaubt keine Aussage über die Funktionalität der P2-Rezeptoren. Um diesen funktionellen Nachweis zu erbringen, wurden It-NES-Zellen für zwei Tage differenziert. Danach wurde die Änderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf ATP-Applikation mittels dualer spektrofluometrischer Analyse der Exzitation von Fura-2-AM bei 340/380 nm gemessen. ATP-Applikation induzierte einen Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  in kurzzeitig differenzierten, neuralen Zellen (Abb. 3.14 B).

Abhängig von den involvierten, funktionellen P2-Rezeptoren, den ionotropen P2X oder metabotropen P2Y-Rezeptoren, kann  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum oder aus intrazellulären Speichern in das Zytosol gelangen. Zum Nachweis einer Beteiligung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  beim ATP-induzierten Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  wurde die ATP-Stimulation in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt. Bei dem von ATP-induzierten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg konnte kein Effekt des Entzuges von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet werden, was auf eine Herkunft aus intrazellulären Speichern und eine Beteiligung der metabotropen P2Y-Rezeptoren hindeutet (Abb. 3.14, C).

Um eine Beteiligung von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und damit von P2X-Rezeptoren beim ATP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg auszuschließen, wurden die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher in

Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  irreversibel durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin entleert. Damit stehen die intrazellulären Speicher als Ressource für einen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg nicht mehr zur Verfügung. Anschließend wurden die Zellen mit ATP stimuliert. Die Eliminierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher als Ressource für den ATP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg durch Thapsigargin führte zu einem kompletten Ausbleiben der ATP-Antwort in zuvor auf ATP-Stimulation reagierenden Zellen (Abb. 3.14, D).



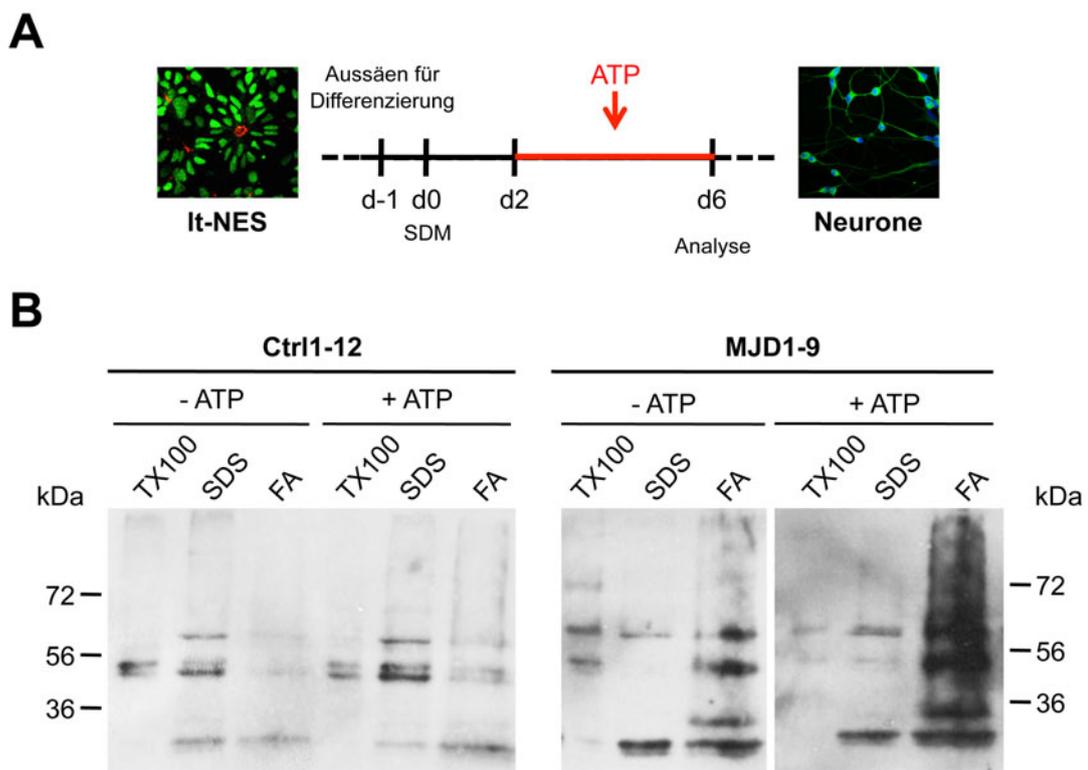
**Abb. 3.14: It-NES-Zellen exprimieren funktionelle P2-Rezeptoren**

Untersuchung der Expression und Funktionalität von P2-Rezeptoren in It-NES-Zellen. **(A)** Semiquantitative RT-PCR von MJD1-9 It-NES-Zellen der P2-Rezeptoren P2RX4, P2RX7, P2RY1, P2RY2 und P2Y11. Lymphozyten- und fetale RNA des ZNS als Positivkontrolle. GAPDH als Ladekontrolle. **(B)** MJD1-9 It-NES-Zellen wurden für 2 Tage auf Matrigel-beschichteten Platten differenziert, anschließend für 30 min mit 2  $\mu\text{M}$  Fura-2-AM geladen und mit 500  $\mu\text{M}$  ATP in HSB bei 37°C stimuliert. Der Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  wurde durch duale spektrofluometrische Analyse der Exzitation bei 340 und 380 nm (340/380 ratio) über die Zeit (sec) bestimmt. **(C)** Entzug von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch Anwesenheit von 5 mM EGTA. **(D)** Irreversibles Entleeren der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ) und wiederholte ATP-Stimulation nach Entleerung.

### 3.3.3 ATP induziert Mikroaggregate von Ataxin-3 in unreifen neuronalen Zellen von MJD-Patienten

Die in 4-6 Wochen alten MJD-Neuronen durch Glutamat induzierten, Ataxin-3-positiven Mikroaggregate basierten auf dem Influx von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  (Abb. 3.13, B). Ob der Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  durch ATP-Stimulation aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern durch metabotrope P2Y-Rezeptoren in nur wenige Tage alten MJD-Neuronen, die noch keine funktionellen Glutamatrezeptoren besitzen (im Weiteren als „junge MJD-Neurone“ bezeichnet), ebenfalls Ataxin-3-positive Mikroaggregate generieren kann, sollte im Folgenden untersucht werden.

Lt-NES-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät und in *short differentiation medium* (SDM) unter Zugabe von DAPT für zwei Tage differenziert. Ab Tag 2 wurden die Zellen für vier Tage im Abstand von 24 h für je 30 min mit ATP in SDM stimuliert und nach weiteren 24 h an Tag 6 lysiert (Abb. 3.15, A).



**Abb. 3.15: ATP-Stimulation induziert SDS-unlösliche Ataxin-3-positive Mikroaggregate**

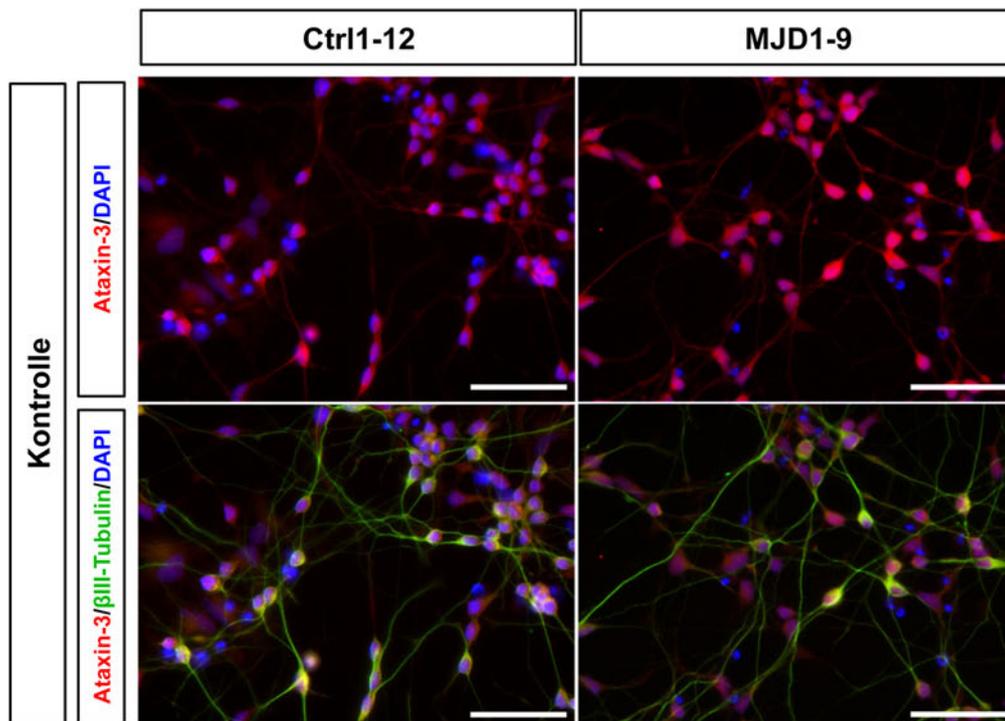
**(A)** Lt-NES-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät. 24 h später wurde das Medium zu SDM gewechselt (d0). Nach 48 h wurden die Zellen mit 500  $\mu\text{M}$  ATP in SDM für 30 min inkubiert und anschließend wurde das Medium zu frischem SDM gewechselt (d2). Dieser Prozess wurde drei Mal nach je 24 h wiederholt. An Tag 6 wurden die Zellen lysiert (d6). **(B)** Fraktionierung und anschließender Immunblot mit  $\alpha$ -Ataxin-3 (986) der jungen Neuronen. Fraktionierung der Zelllysate und Immunblot wurden in Kooperation mit Dr. Peter Breuer ausgeführt.

Nach Fraktionierung der Zelllysate (Abb. 3.12, B) zeigte die Immunblot-Analyse ein stark positives Signal für Ataxin-3 in der SDS-unlöslichen FA-Fraktion von mit ATP-stimulierten jungen MJD-Neuronen, wohingegen in unstimulierten Zellen ein schwächeres Signal zu detektieren war (Abb. 3.15, B). Stimulation von jungen Kontrollneuronen mit ATP führte zu keiner Induktion von Ataxin-3-positiven SDS-unlöslichen Mikroaggregaten. Behandelte und unbehandelte Kontrollkulturen zeigten ein sehr schwaches Signal für Ataxin-3 in der FA-Fraktion (Abb. 3.15, B).

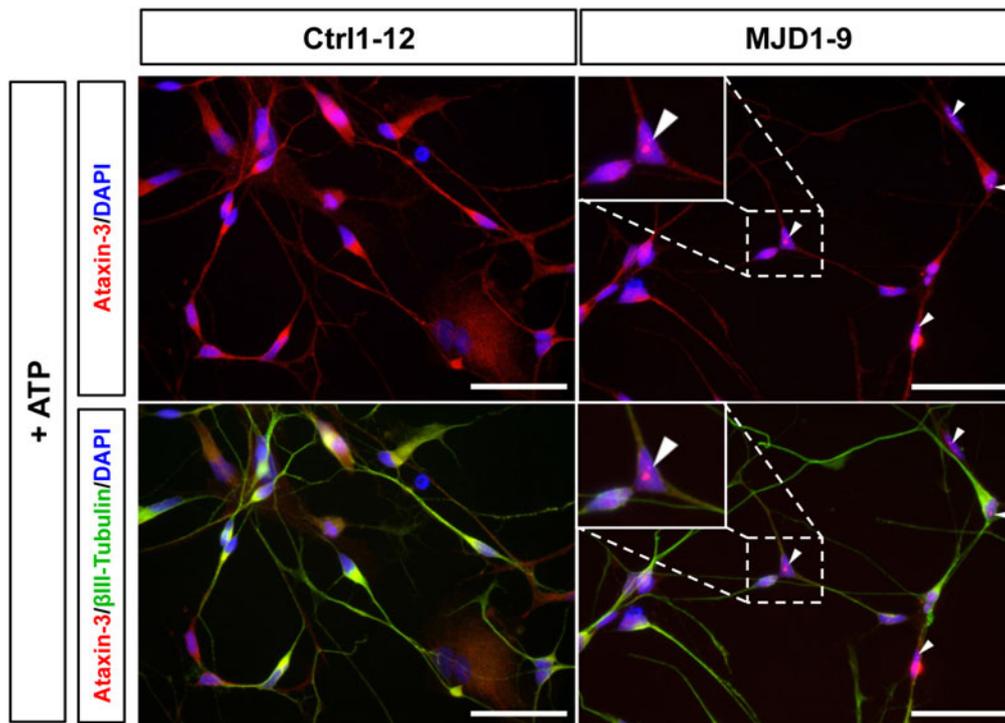
### 3.3.4 ATP induziert mikroskopisch sichtbare Ataxin-3-positive Makroaggregate in jungen MJD-Neuronen

Die erfolgreiche Induktion von Ataxin-3-positiven SDS-unlöslichen Mikroaggregaten in jungen MJD-Neuronen durch ATP-Stimulation motivierte eine Untersuchung auf eventuell auftretende Ataxin-3-positive Makroaggregate oder neuronale intranukleäre Inklusionen (NIIs) mittels Immunfluoreszenzfärbung.

It-NES-Zellen wurden äquivalent wie in 3.3.3 ausgesät, differenziert und mit ATP stimuliert. An Tag 6 wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Ataxin-3 und  $\beta$ III-Tubulin durchgeführt, um den neuronalen Charakter der differenzierten It-NES-Zellen zu verifizieren. In unstimulierten Kontroll- und MJD-Zellen konnten jeweils keine Makroaggregate oder NIIs detektiert werden (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Unstimulierte junge MJD-Neuronen zeigen keine Ataxin-3-positiven Makroaggregate**  
It-NES-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät und das Medium 24 h später zu SDM gewechselt. An Tag 6 wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\beta$ III-Tubulin (grün) und Ataxin-3 (rot) durchgeführt. DAPI (blau). Skalierungsbalken = 50  $\mu$ m.



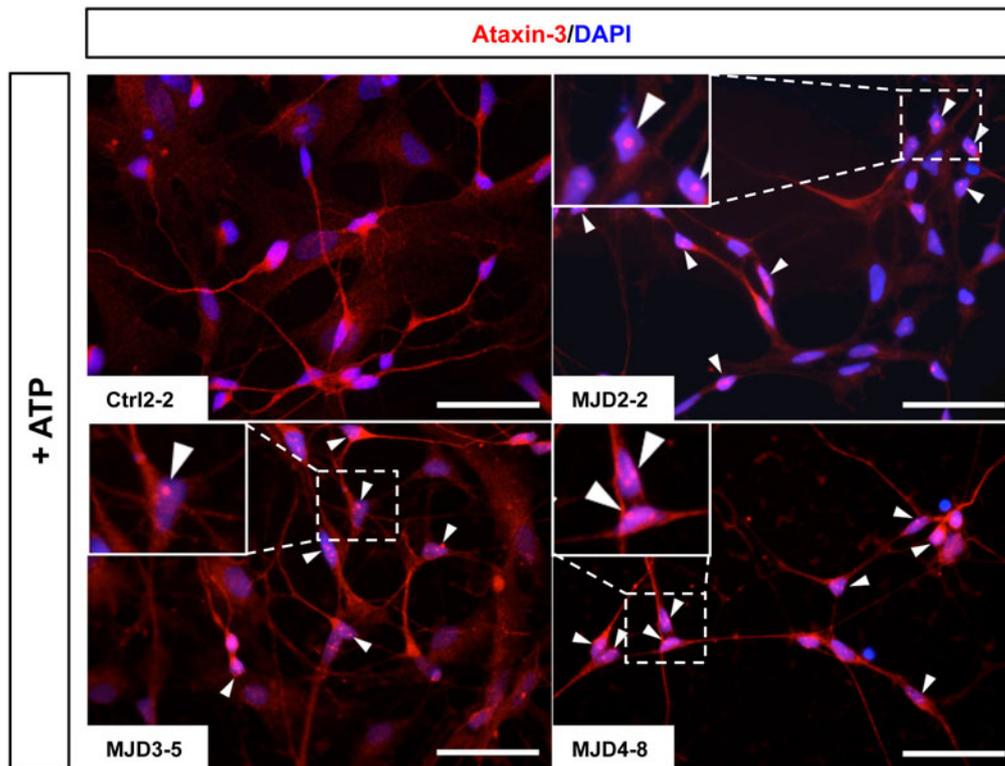
**Abb. 3.17: ATP-Stimulation von jungen MJD-Neuronen induziert Ataxin-3-positive-Makroaggregate**  
 It-NES-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät. 24 h später wurde das Medium zu SDM gewechselt. ATP-Stimulation erfolgte wie in Abb. 3.14 angegeben. An Tag 6 wurden die Zellen fixiert und anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\beta$ III-Tubulin (grün) und Ataxin-3 (rot) durchgeführt. DAPI (blau). Makroaggregate positiv für Ataxin-3 (weiße Blockpfeile). Einsatz: Vergrößerung eines MJD1-9-Neurons mit Ataxin-3-Aggregat. Skalierungsbalken = 50  $\mu$ m.

ATP-stimulierte Kontroll-Neurone zeigten ebenfalls keine detektierbare Aggregation von Ataxin-3 in der Immunfluoreszenz (Abb. 3.17). In MJD-Neuronen, die mit ATP stimuliert wurden, konnten hingegen deutlich sichtbare, bis zu mehreren Mikrometern große Ataxin-3-positive Aggregate detektiert werden (Abb. 3.17, weiße Blockpfeile). ATP-Stimulation von jungen MJD-Neuronen ist demnach hinreichend um Ataxin-3-Makroaggregate in  $\beta$ III-Tubulin-positiven, neuronalen Zellen zu induzieren. Die Effizienz der Induktion variierte hierbei zwischen <1-23% Neuronen mit Ataxin-3-positiven Makroaggregaten in unabhängigen Experimenten.

### 3.3.5 Die ATP-induzierte Makroaggregation von Ataxin-3 ist spezifisch für MJD-Neurone

Die Verwendung einer nicht-isogenen Kontrolle könnte zur Beobachtung von vermeintlichen Phänotypen führen, die in Wirklichkeit nicht auf das mutierte Gen selbst zurückzuführen sind, sondern in der genetischen Varianz begründet liegen.

Dieser Problematik wurde im Folgenden dadurch begegnet, dass der Effekt von ATP-Stimulation auf die Makroaggregation von Ataxin-3 in jungen Neuronen drei weiterer MJD-Patienten und einer weiteren, unbetroffenen Kontrolle untersucht wurde.



**Abb. 3.18: Die ATP-induzierte Makroaggregation von Ataxin-3 ist spezifisch für neuronale MJD-Kulturen**  
 Lt-NES-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät und das Medium 24 h später zu SDM gewechselt. ATP-Stimulation erfolgte wie in Abb. 3.14 angegeben. Immunfluoreszenzfärbung an Tag 6 gegen Ataxin.3 (rot). DAPI (blau). Makroaggregate positiv für Ataxin-3 (weiße Blockpfeile). Einsatz: Vergrößerung von MJD-Neuronen mit Ataxin-3-Aggregat. (Skalierungsbalken = 50  $\mu\text{m}$ )

Das Experiment wurde wie in 3.3.3 beschrieben durchgeführt. Die Kulturen wurden an Tag 6 fixiert und Ataxin-3 durch Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. Die zusätzliche Kontrolllinie Ctrl2-2 zeigte nach ATP-Stimulation keine Ataxin-3-Aggregate in der Immunfluoreszenz (Abb. 3.18). In jungen Neuronen der drei weiteren MJD-Linien MJD2-2, MJD3-5 und MJD4-8 konnten hingegen mikroskopisch sichtbare Ataxin-3-positive Makroaggregate detektiert werden (Abb. 3.18).

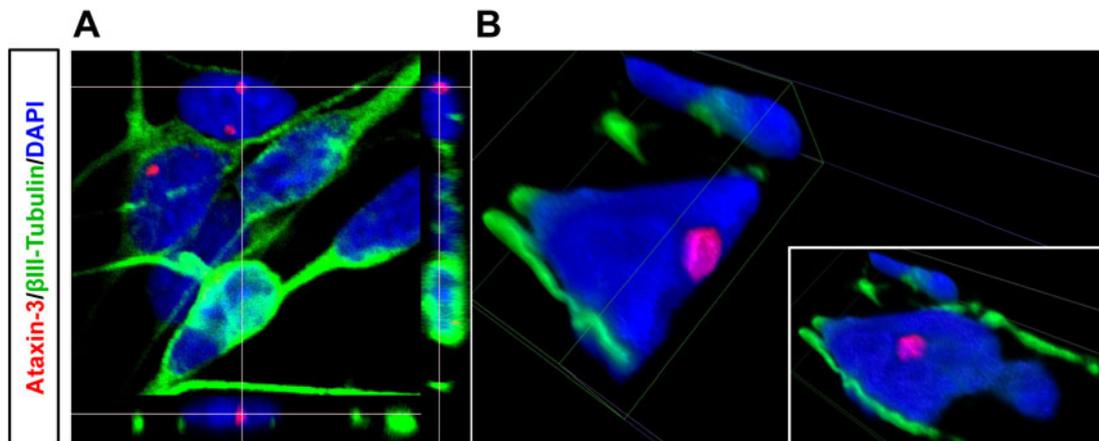
### 3.3.6 Charakterisierung der ATP-induzierten Ataxin-3-positiven Makroaggregate

Ataxin-3-positive Makroaggregate, die mit der *in vivo* Pathologie von MJD assoziiert sind, besitzen weitere für sie charakteristische Eigenschaften wie eine vorwiegend nukleäre Lokalisation und Co-Lokalisation mit Ubiquitin. Durch eine detailliertere Charakterisierung der in der Immunfluoreszenz detektierbaren, Ataxin-3-positiven Makroaggregate in den jungen Neuronen sollte untersucht werden inwiefern sie mit den *in vivo* zu findenden Aggregaten vergleichbar sind, und ob sie somit eine Rekapitulation eines mit der Pathologie von MJD assoziierten Phänotyps darstellen.

### 3.3.6.1 Ataxin-3-positive Makroaggregate sind im Nukleus lokalisiert

Eines der Schlüsselkennzeichen der *in vivo* Pathologie von MJD ist die Bildung prominenter neuronaler, intranukleärer Inklusionen (neuronal intranuclear inclusions, NIIs), die positiv für Ataxin-3 sind (Paulson *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1998). Transiente Überexpression von mutiertem Ataxin-3 führt dagegen primär zu einer zytosolischen Aggregation von Ataxin-3 mit Aggresomcharakter (Kobayashi *et al.*, 2003).

Zur Untersuchung der genauen zellulären Lokalisation der Ataxin-3-positiven Makroaggregate und zur Beantwortung der Frage, ob sie eher den Charakter eines Aggresoms oder einer NII aufweisen, wurden junge Neuronen wie in 3.3.3 ausgeführt mit ATP-stimuliert und an Tag 6 fixiert. Nach einer anschließenden Immunfluoreszenzfärbung gegen Ataxin-3 und  $\beta$ III-Tubulin wurden die Zellen an einem konfokalen Laserscannmikroskop auf die zelluläre Lokalisation der Ataxin-3-positiven Makroaggregate untersucht. Eine Z-Ebenenaufnahme und -rekonstruktion zeigte eine eindeutige nukleäre Lokalisation der Ataxin-3-positiven Makroaggregate (Abb. 3.19, A). Dieses Phänomen wurde durch eine 3D-Animationsmodellierung eines Neurons mit einem Ataxin-3-positiven Makroaggregat und einem visuellen Schnitt durch die Y-Ebene dieses Aggregates weiter verdeutlicht (Abb. 3.19, B). Bis auf wenige Ausnahmen ( $\sim 2\%$ ) waren alle konfokal untersuchten Ataxin-3-positiven Makroaggregate im Zellkern lokalisiert.



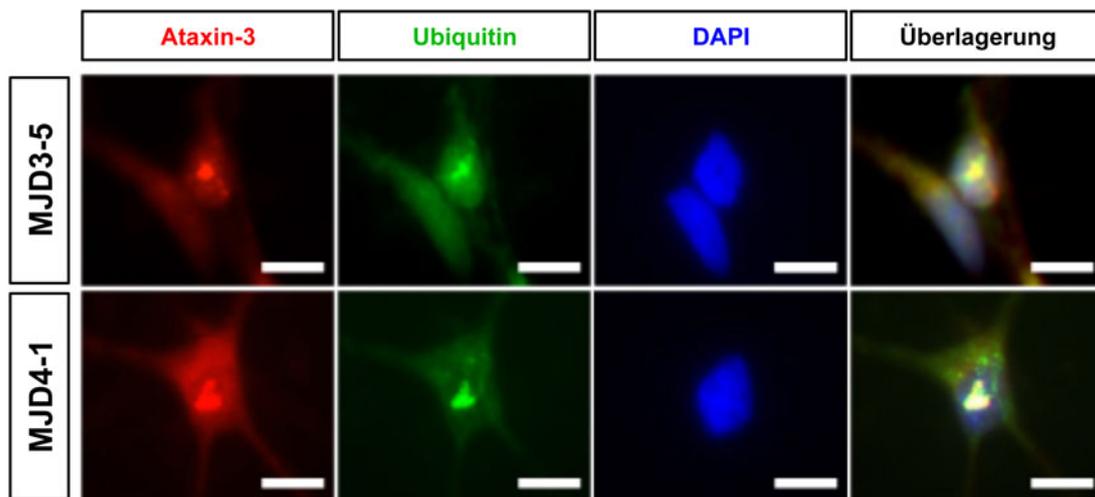
**Abb. 3.19: ATP-induzierte Ataxin-3-positive Makroaggregate entsprechen NIIs.**

(A) Z-Ebenenaufnahme und -rekonstruktion von mit ATP-stimulierten jungen MJD-Neuronen der Linie MJD1-9. Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\beta$ III-Tubulin (grün) und Ataxin-3 (rot). DAPI (blau). Auswahl der Position eines Ataxin-3-positiven Makroaggregates. (B) Schrägansicht von oben einer 3D-Animationsmodellierung eines Neurons mit Ataxin-3-positivem Makroaggregat im Zentrum des Nukleus. Dargestellt ist ein Schnitt durch die Y-Ebene des Aggregates, der die zentrale, nukleäre Lokalisation verdeutlicht. Einsatz: Neuron ohne Schnitt durch die Y-Ebene.

### 3.3.6.2 Co-Lokalisation von Ubiquitin mit Ataxin-3-positiven Nlls

Ein weiteres Charakteristikum von neuronalen intranukleären Ataxin-3-Inklusionen ist die Ubiquitinierung dieser Inklusionen, die in *post mortem* Gewebeschnitten von MJD-Patienten nachweisbar ist (Paulson *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1998).

Zur Untersuchung der Co-Lokalisation der durch ATP-Stimulus induzierten Nlls mit Ubiquitin in jungen MJD-Neuronen wurden diese wie in 3.3.3 beschrieben behandelt und an Tag 6 fixiert. Die Analyse einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen Ubiquitin und Ataxin-3 zeigte in weniger als 1% der Nlls enthaltenen Zellen eine Co-Lokalisationen von Ubiquitin und Ataxin-3-positiven Nlls in ATP-stimulierten jungen MJD-Neuronen (Abb. 3.20).



**Abb. 3.20: Ubiquitin co-lokalisiert mit Ataxin-3-positiven Nlls in jungen MJD-Neuronen**

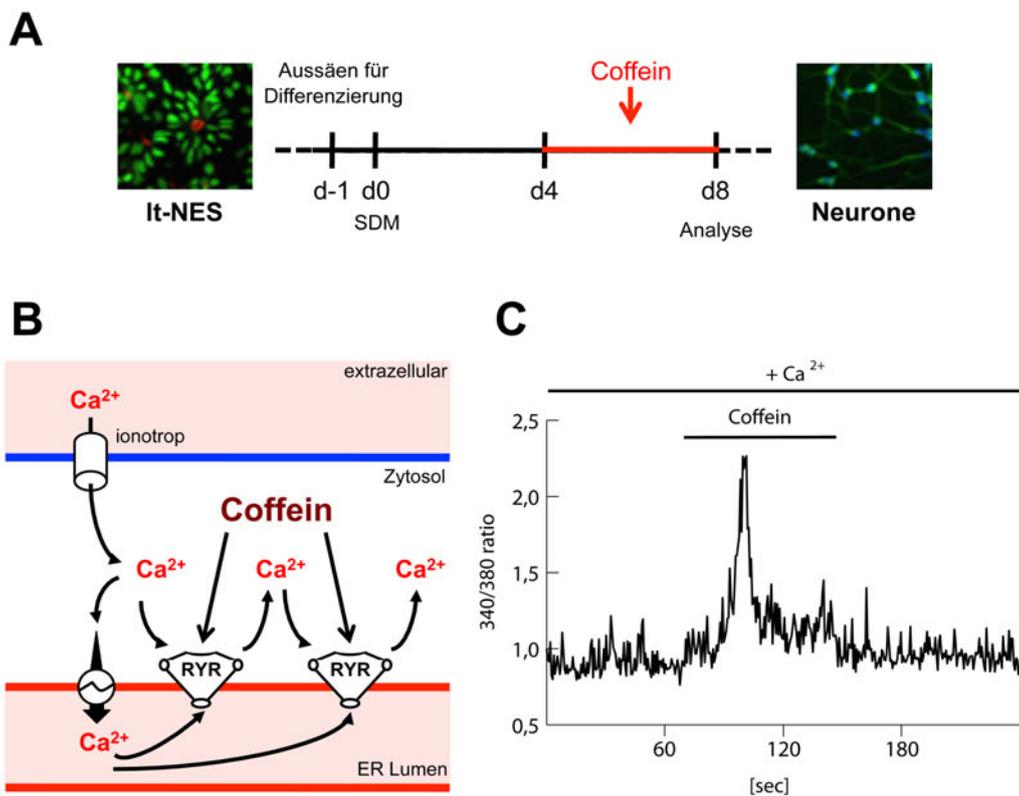
Junge MJD-Neurone wurden wie in 3.3.3 erläutert generiert und mit ATP-stimuliert. Immunfluoreszenzfärbung gegen Ubiquitin (grün) und Ataxin-3 (rot) an Tag 6. DAPI (blau). Überlagerung der Fluoreszenzkanäle zeigt Co-Lokalisation von Ataxin-3 und Ubiquitin (gelb). Skalierungsbalken = 10  $\mu$ m.

### 3.3.7 Coffein-Stimulation induziert Ataxin-3-positive Nlls

Die Ergebnisse aus 3.3.2 legten als Quelle für den ATP-vermittelten, zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Anstieg intrazelluläre Speicher nahe, die durch metabotrope P2Y-Rezeptoren reguliert werden. Der Hauptspeicher für intrazelluläres  $Ca^{2+}$  in Neuronen ist das endoplasmatische Reticulum (ER) (Übersicht: Berridge, 1998). Um zu prüfen, ob eine direkt vermittelte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER über einen alternativen Stimulus möglich und für die Induktion von Ataxin-3-positiven Nlls ausreichend ist, wurden junge Kontroll- und MJD-Neurone mit Coffein stimuliert (Abb. 3.21, A).

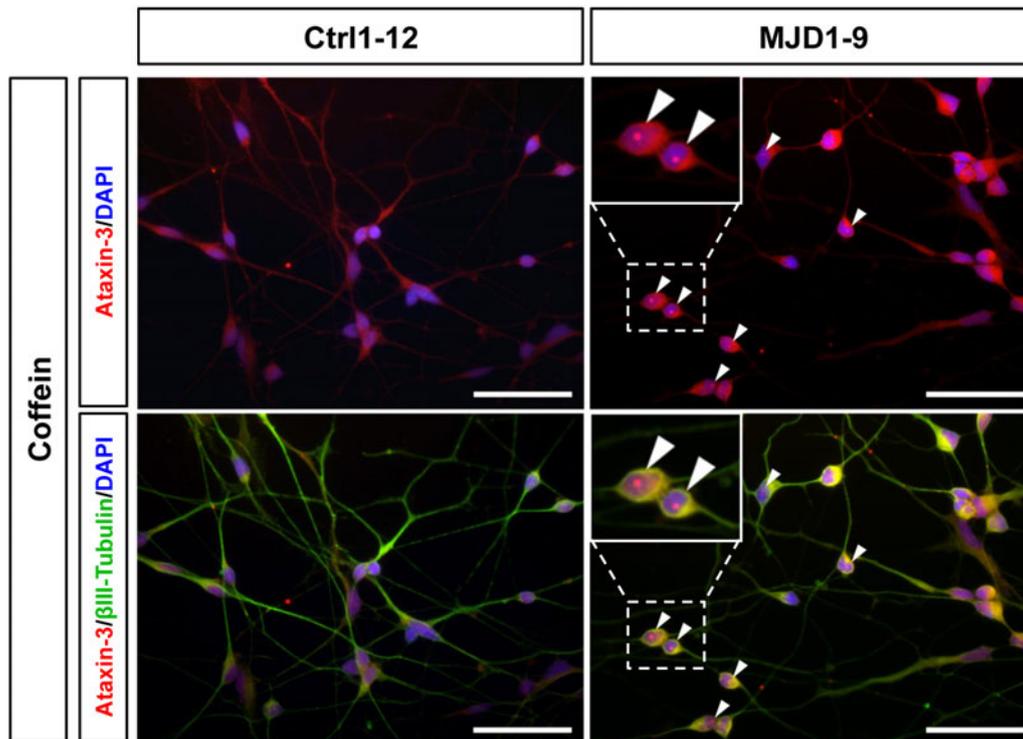
Coffein aktiviert in Muskelzellen durch die im ER lokalisierten  $Ca^{2+}$ -permissiven Ryanodinerezeptoren (RyRs) eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung ins Zytosol (Verkhatsky 2005; Weber, 1968). Dieser Effekt konnte ebenfalls in Neuronen beobachtet werden (Kuba und Nishi, 1976; Verkhatsky, 2005) (Abb. 3.21, B).

Die Induktion eines zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieges durch Coffein-Stimulus wurde durch duale spektrofluometrische Analyse der Exzitation von Fura-2-AM bei 340/380 nm (Fura-2-AM-Messung) verifiziert. Coffein-Applikation induzierte einen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an Tag vier der Differenzierung in jungen MJD-Neuronen, indikativ für funktionelle RyR-Rezeptoren zu diesem Zeitpunkt (Abb. 3.21, C). Für die Induktion von Ataxin-3-positiven NfIs wurden die jungen Neurone an Tag vier (d4) mit Coffein für 30 min inkubiert und anschließend zu frischem SDM gewechselt. Diese Prozedur wurde drei Mal nach je 24 h wiederholt.



**Abb. 3.21: Coffeine-Stimulation induziert einen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in jungen MJD-Neuronen**  
**(A)** Lt-NES-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät und in SDM für vier Tage differenziert. Stimulation mit 10 mM Coffein für 30 min an d4, d5, d6 und d7, Fixierung an d8 **(B)** Schema der Coffeinstimulation: Coffein stimuliert durch Sensibilisierung für zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER durch RyRs. **(C)** Junge MJD-Neurone wurden an d4 für 30 min mit 2  $\mu\text{M}$  Fura-2-AM geladen und mit 10 mM Coffein in HSB bei 37°C stimuliert. Der Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  wurde durch duale spektrofluometrische Analyse der Exzitation bei 340 und 380 nm (340/380 ratio) über die Zeit (sec) bestimmt.

Eine Immunfluoreszenzanalyse an Tag acht (d8) zeigte keine Ataxin-3-positiven NfIs nach Coffein-Stimulation in jungen Kontrollneuronen (Abb. 3.22). Im Gegensatz dazu konnten in jungen MJD-Neuronen Ataxin-3-positive NfIs detektiert werden (Abb. 3.22). Die Effizienz der Induktion von Neuronen mit Ataxin-3-positiven NfIs variierte hierbei zwischen 4-20% in unabhängigen Experimenten.

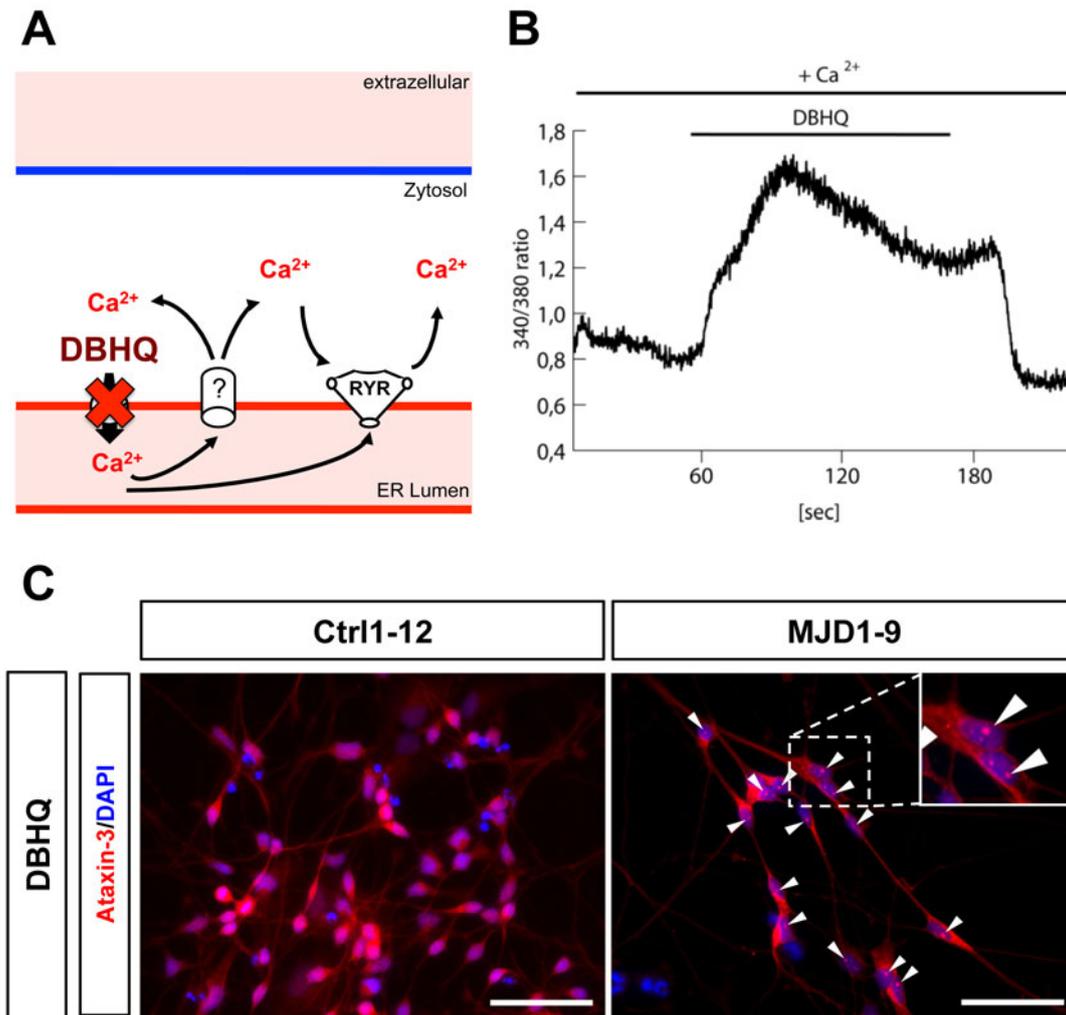


**Abb. 3.22: Coffein-Stimulation induziert Ataxin-3-positive Nils in jungen MJD-Neuronen**

Lt-NES-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät und in SDM für vier Tage differenziert. Stimulation mit 10 mM Coffein für 30 min an d4, d5, d6 und d7, Fixierung an d8. Immunfluoreszenzfärbung gegen Ataxin-3 (rot) und  $\beta$ III-Tubulin (grün). DAPI (blau). Ataxin-3-positive Nils (weiße Blockpfeile). Einsatz: Vergrößerung von Neuronen mit Ataxin-3-positiven Nils. Skalierungsbalken = 50  $\mu$ m.

### 3.3.8 Reversible SERCA-Inhibition induziert Ataxin-3-positive Nils in jungen MJD-Neuronen

Neben der Plasmamembran Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) und dem Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporter (Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCX), die Ca<sup>2+</sup> vom Zytosol in den extrazellulären Raum transportieren (Schatzmann, 1973; Tasaki, 1963), ist die weitere treibende Kraft für die niedrige Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytosol die Familie der sarco/endoplasmatische Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPasen (SERCAs), die unter ATP-Verbrauch Ca<sup>2+</sup> aus dem Zytosol in das ER transportieren (Lytton und MacLennan, 1988). Irreversible Inhibition der SERCAs durch Thapsigargin (TG) (Lytton *et al.*, 1991) oder reversible Inhibition durch Cyclopiazonsäure (cyclopiazonic acid, CPA) (Demaurex *et al.*, 1992) oder 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-Benzohydroquinon (DBHQ) (Kass *et al.*, 1989) induziert eine Depletion des Ca<sup>2+</sup> aus dem ER ins Zytosol durch bisher nicht vollständig verstandene Mechanismen (Abb. 3.23, A (?)) (Camello *et al.*, 2002) und damit zu einem Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Abb. 3.23, A). Das aus dem ER austretende Ca<sup>2+</sup> kann zur Signalverstärkung zusätzlich die Ca<sup>2+</sup>-sensitiven RyR aktivieren (Abb. 3.23, A). Damit stellt die SERCA-Inhibition einen potentiellen Mechanismus dar, um durch einen zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg Ataxin-3-positive Nils in jungen MJD-Neuronen zu induzieren.



**Abb. 3.23: DBHQ-Stimulation induziert Ataxin-3-positive NII in jungen MJD-Neuronen**

It-NES-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät und in SDM für vier Tage differenziert. Stimulation mit 50  $\mu\text{M}$  DBHQ für 5 min in SDM an d4, d5, d6 und d7, Fixierung an d8. Schema der SERCA-Inhibition durch DBHQ und Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER (**A**). Junge MJD-Neurone wurden an d4 für 30 min mit 2  $\mu\text{M}$  Fura-2-AM geladen und mit 50  $\mu\text{M}$  DBHQ in HSB bei 37°C stimuliert. Der Anstieg von Ca<sup>2+</sup> wurde durch Fura-2-AM-Messung (340/380 ratio) über die Zeit (sec) bestimmt. DBHQ-Stimulation induzierte eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung ins Zytosol der Zellen (**B**). Immunfluoreszenzfärbung gegen Ataxin-3 (rot). DAPI (blau). Ataxin-3-positive NII (weiße Blockpfeile). Einsatz: Vergrößerung von Neuronen mit Ataxin-3-positiven NII. Skalierungsbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

Um die Funktionalität der SERCA-Inhibition für die Induktion von NII in jungen MJD-Neuronen zu untersuchen, wurden Kontroll- und MJD-It-NES-Zellen äquivalent wie in 3.3.7 für die Stimulation mit DBHQ vorbereitet (Abb. 3.21, A). DBHQ wurde von den verfügbaren SERCA-Inhibitoren aufgrund seiner höheren thermalen Stabilität im Vergleich zu CPA und TG ausgewählt. Die Funktionalität des DBHQ-Stimulus zur Induktion eines zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Anstieges durch SERCA-Inhibition wurde durch Fura-2-AM-Messung an Tag vier verifiziert. DBHQ-Applikation induzierte einen Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Abb. 3.23, B). Für die Induktion von Ataxin-3-positiven NII wurden die jungen Neurone an Tag vier (d4) mit DBHQ für 5 min inkubiert und anschließend zu frischem SDM gewechselt. Diese Prozedur wurde drei Mal nach je 24 h wiederholt.

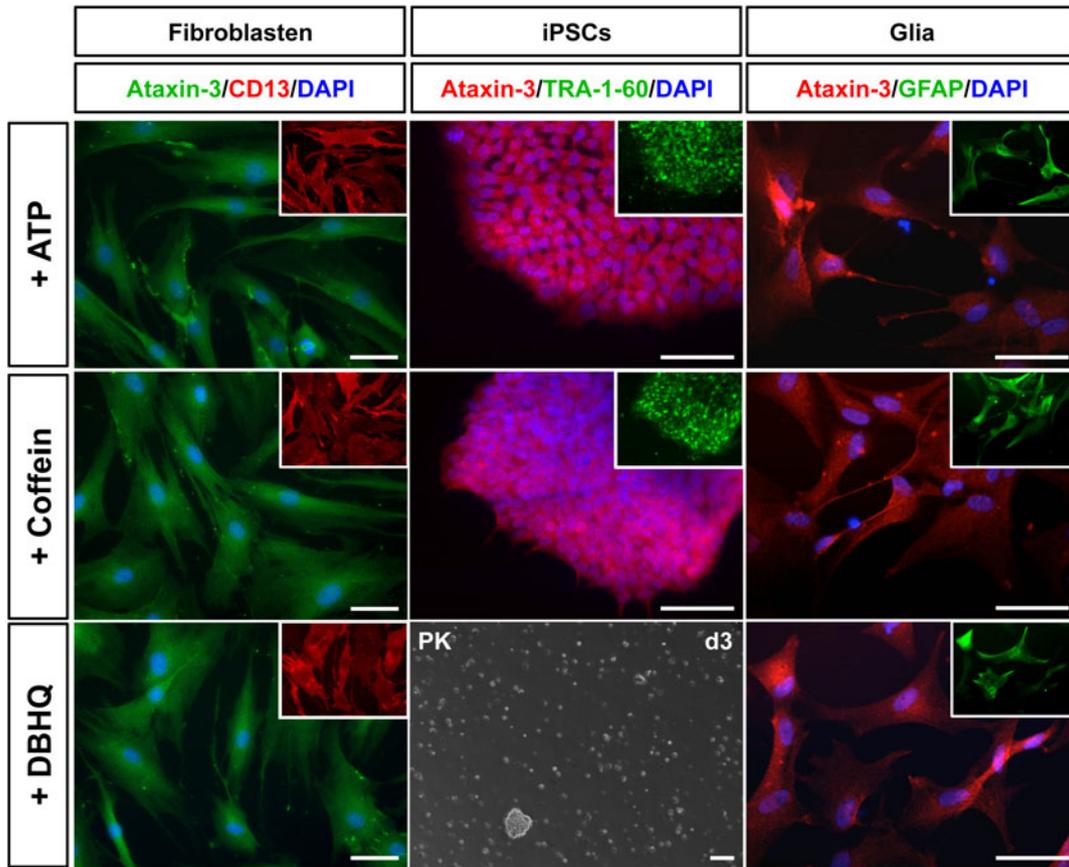
Die DBHQ-induzierte SERCA-Inhibition der jungen Neuronen der Kontrollzelllinie Ctrl1-12 resultierte in keiner Generierung von Ataxin-3-positiven NIs in der Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 3.23 C). In den Kulturen der Zelllinie MJD1-9 hingegen bildeten sich nach wiederholter, kurzzeitiger SERCA-Inhibition durch DBHQ-Applikation Ataxin-3-positiv NIs (Abb. 3.23 C). Bei der Effizienz der Induktion von Ataxin-3-positiven NIs zeigte sich hierbei eine hohe Variabilität zwischen unabhängigen Experimenten zwischen <1-83%.

### **3.3.9 Induzierte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung führt nicht zu Ataxin-3-positiven NIs in nicht-neuronalen Zellen**

Die Glutamat-induzierte Mikroaggregation von SDS-unlöslichen Ataxin-positiven Aggregaten war abhängig von einer funktionalen Signalkaskade bis hin zu spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen, wie sie charakteristisch für elektrophysiologisch aktive Neurone, aber nicht für Fibroblasten, iPS-Zellen oder Gliazellen ist (Abb. 3.13 B,C).

Die Expression von funktionellen ATP-sensitiven, metabotropen P2Y-Rezeptoren ist nicht auf Neurone beschränkt (Übersicht: Burnstock, 2007; Delarasse *et al.*, 2009; Khaira *et al.*, 2009; 1.3.2). Weiterhin sind die drei Subtypen der RyRs in vielen Geweben und die SERCA-Familie in verschiedener Komposition ubiquitär exprimiert (Übersicht: Verkhratsky, 2005). Dies wirft die Frage auf, ob die breit wirkenden Stimuli ATP, Coffein und DBHQ eine Bildung von Ataxin-3-positiven, nukleären Makroaggregaten in anderen Zelltypen als Neuronen induzieren können. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Fibroblasten, iPS-Zellen und gliale Zellen mit allen drei Stimuli behandelt und auf Ataxin-3-positiv nukleäre Makroaggregate analysiert.

MJD-Fibroblasten wurden auf mit Gelatine beschichteten Schalen in MEF-Medium ausgesät und in diesem 24 h später stimuliert. Stimulation mit ATP und Coffein wurde für 30 min, für DBHQ 5 min durchgeführt und danach zu frischem MEF-Medium gewechselt. Diese Prozedur wurde drei Mal nach je 24 h wiederholt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Ataxin-3 und den Fibroblasten-spezifischen Marker CD13 (Sorrell *et al.*, 2003) durchgeführt. Bei keinem der drei Stimuli konnte ein Auftreten von zytoplasmatischen oder nukleären Ataxin-3-positiven Makroaggregaten in CD13-positiven Fibroblasten beobachtet werden (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24: Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung führt nicht zu Ataxin-3-positiven Nils in nicht-neuronalen Zellen** MJD1-Fibroblasten, iPS-Zellen der Linie MJD1-9 und aus It-NES-Zellen der Linie MJD1-9 abgeleitete Gliazellen wurden an je vier konsekutiven Tagen entweder mit 500  $\mu\text{M}$  ATP für 30 min, 10 mM Coffein für 30 min oder 50  $\mu\text{M}$  DBHQ für 5 min stimuliert. Stimulationsmedium für Fibroblasten = MEF, iPS-Zellen = mTeSR, Gliazellen = GM. Die Zellen wurden 24 h nach dem letzten Stimulus fixiert und auf einen zelltypspezifischen Marker und Ataxin-3 mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Fibroblasten CD13 (rot) und Ataxin-3 (grün). iPSCs TRA-1-60 (grün) und Ataxin-3 (rot). Gliazellen GFAP (grün) und Ataxin-3 (rot). DAPI (blau). Einsatz: Verkleinerung zelltypspezifischer Marker. Mit DBHQ stimulierte iPSCs zeigten an d3 der Stimulation massiven Zelltod (PK d3) und konnten nicht bis zum Endzeitpunkt der Analyse weitergeführt werden. PK = Phasenkontrast. Skalierungsbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

MJD-iPS-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen in mTeSR-Medium ausgesät und zwei Tage nach Aussat stimuliert. Die Stimulation erfolgte ebenfalls in mTeSR-Medium. ATP, Coffein und DBHQ wurden nach dem gleichen Vorgehen wie bei der Stimulation der Fibroblasten appliziert und die Zellen ebenfalls 24 h nach dem letzten Stimulus analysiert. Immunfluoreszenzfärbung des Pluripotenzmarker TRA-1-60 (Andrews *et al.*, 1984) wurde für die Validierung der pluripotenten Stammzellidentität durchgeführt. Sowohl ATP- als auch Coffein-Stimulation zeigte keine Induktion von Ataxin-3-positiven, nukleären Makroaggregaten in TRA-1-60-positiven Zellen (Abb. 3.24). Stimulation mit DBHQ induzierte massiven Zelltod, sodass schon an Tag drei (d3) der Stimulation nur wenige Zellen auf der Schale verblieben und bis zum Ende der Stimulationszyklus keine Zellen mehr zur Analyse vorhanden waren (Abb. 3.24).

Gliale MJD-Zellen wurden wie in Hucke *et al.*, 2012 beschrieben aus MJD-It-NES-Zellen durch CNTF, FCS und T3 abgeleitet, auf Matrigel ausgesät und zusätzlich sechs

Wochen nach Serio *et al.*, 2013 mit CNTF maturiert. Das Stimulationsparadigma entsprach den für Fibroblasten und iPS-Zellen verwendetem und wurde in glialem Maturationsmedium (GM) durchgeführt. 24 h nach dem letzten der vier Stimuli erfolgte eine Analyse der glialen Kultur durch GFAP- und Ataxin-3-Immunfluoreszenzfärbung. Ataxin-3-positive, nukleäre Makroaggregate konnten bei keinem der drei Stimuli in GFAP-positiven, glialen Zellen detektiert werden (Abb. 3.24).

## **3.4 Autophagie als ein zentraler Modulator der Ataxin-3-Aggregation in jungen MJD-Neuronen**

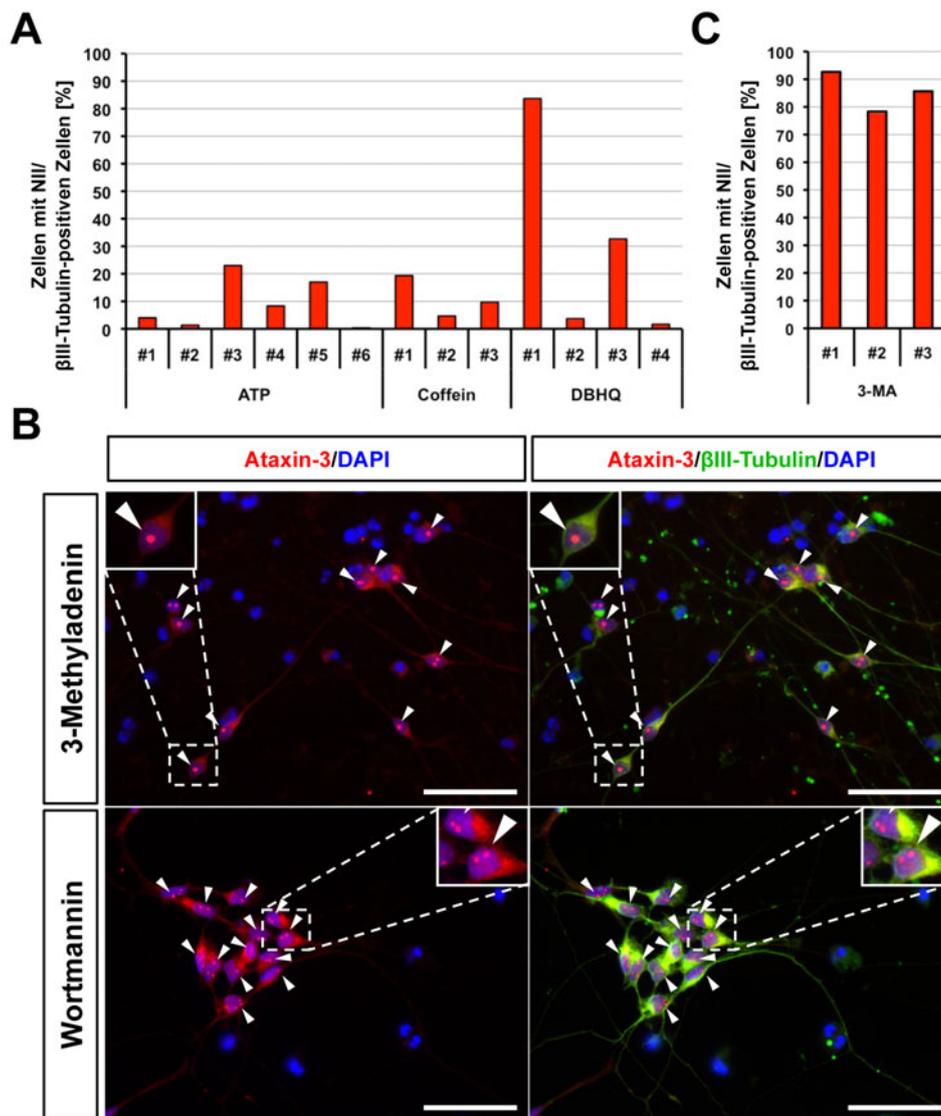
### **3.4.1 Pharmakologische Autophagieinhibition induziert Ataxin-3-positive NIs in jungen MJD-Neuronen**

Eine Quantifizierung der Experimente zur Induktion von Ataxin-3-positiven NIs in jungen MJD-Neuronen zeigte eine hohe Variabilität des Anteils von  $\beta$ III-Tubulin-positiven Zellen, die wenigstens eine Ataxin-3-positive Inklusion besitzen, unabhängig vom verwendeten Stimulus zwischen einzelnen, unabhängigen Experimenten. Die Spanne reichte dabei von unter 1% bis über 80% aller Neurone (Abb. 3.25, A). Coffein und DBHQ als Zelltyp- und Signalweg-unabhängige, universelle Stimulantien waren nicht in der Lage, diese Varianz zwischen den einzelnen Experimenten zu reduzieren (Abb. 3.25, A). Dieser Befund warf die Frage auf, ob eine dynamische Regulation von zellulären Abbauprozessen zum Zeitpunkt des jeweiligen Experimentes ursächlich sein könnte.

Die beiden Hauptsysteme der eukaryotischen Proteindegradation sind das Proteasom und das Lysosom. Das **U**biquitin-**P**roteasom-**S**ystem (UPS) degradiert die meisten löslichen, zytosolischen Proteine (Ciechanover, 2005; Ciechanover, 2006). Das Lysosom hingegenprozessiert die meisten Membran- und endozytierten Proteine (Ciechanover, 2006; Luzio *et al.*, 2007), degradiert aber ebenfalls zytosolische Proteine durch den Prozess der Autophagie (Pillay *et al.*, 2002).

Autophagie (von griechisch αὐτό- auto „selbst-“ und φαγεῖν phageín „essen“) ist ein Überbegriff für mehrere Prozesse mit den drei Hauptarten **C**haperon-**m**ediierte **A**utophagie (CMA) (Dice, 1990), Mikroautophagie (Ahlberg *et al.*, 1982) und Makroautophagie. Die Makroautophagie unterscheidet sich durch das zusätzliche Ausbilden einer Membranstruktur, der Phagophore, von den anderen Arten. Die Phagophore umschließt durch Expansion einen Teil des Zytosols, um als reifes Autophagosom mit Lysosomen zu fusionieren (Arstila *et al.*, 1968).

Eine direkte Verbindung zwischen Makroautophagie, intrazellulären Proteinenaggregaten und Neurodegeneration konnte eindrucksvoll durch zwei *knockout*-Studien im Modellsystem Maus gezeigt werden. Selektive Deletion eines der beiden für die Makroautophagie essentiellen Gene *autophagy related* (ATG)5 oder ATG7 im ZNS führte zu einem neurodegenerativen Phänotyp mit hochgradig ubiquitinierten Proteinaggregaten (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006). Basierend auf diesen Beobachtungen sollte untersucht werden, ob und inwiefern eine pharmakologische Inhibition der Makroautophagie (im Folgenden als Autophagie bezeichnet) einen modulierenden Einfluss auf die Generierung von Ataxin-3-positiven NIIs in jungen MJD-Neuronen ausübt.



**Abb. 3.25: Pharmakologische Autophagie-Inhibition induziert Ataxin-3-positive NIIs**

Für die Quantifizierung wurden je 300 βIII-Tubulin-positive Zellen pro Experiment auf Ataxin-3-positive Inklusionen untersucht. Von der MJD-It-NES-Linie MJD1-9 wurden sechs Experimente mit ATP-, drei Experimente mit Coffein- und vier Experimente mit DBHQ-Stimulation ausgezählt (A). MJD-It-NES-Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät und 4 Tage in SDM differenziert. Ab Tag 4 erfolgte eine Supplementierung des SDM mit 10 mM 3-MA bzw. 400 nM Wortmannin, die beim täglichen Medienwechsel erneuert wurde. Immunfluoreszenzfärbung an Tag 8 gegen Ataxin-3 (rot) und βIII-Tubulin (grün). DAPI (blau). Ataxin-3-positive NIIs (weiße Blockpfeile). Einsatz: Vergrößerung von Neuronen positiv für Ataxin-3-positive NIIs (B). Quantifizierung der Induktion von Ataxin-3-positiven NIIs in jungen MJD-Neuronen durch 3-MA in drei unabhängigen Experimenten (C). Skalierungsbalken = 50 μm.

**3-Methyladenine** (3-MA) und Wortmannin sind strukturell nicht verwandte Inhibitoren der Klasse III **Phosphatidylinositol-3-Kinase** (PIK3C3), die für die initiale Bildung der Phagoophore essentiell ist und blockieren auf diese Weise die Autophagie (Blommaert *et al.*, 1997; Petiot *et al.*, 2000). Für die Analyse des Effektes von 3-MA und Wortmannin auf junge MJD-Neurone ohne weitere Stimulation wurden MJD-It-NES-Zellen auf mit Matrigel beschichteten Schalen ausgesät und für vier Tage in SDM differenziert. Beim Wechsel des Mediums an Tag vier wurde 3-MA bzw. Wortmannin ins SDM supplementiert und beim Medienwechsel täglich erneuert. Bei Analyse an Tag acht konnten im Großteil der  $\beta$ III-Tubulin-positiven Zellen Ataxin-3-positive NIIIs detektiert werden (Abb. 3.25, B). Eine Quantifizierung unabhängiger Experimente mit 3-MA zeigte eine konstant hohe Effizienz in der Induktion von Ataxin-3-positiven NIIIs (Abb. 3.25, C). Die Applikation von 3-MA und Wortmannin wurde allerdings von Zelltoxizität begleitet, erkennbar an fragmentierten Zellkernen und einer  $\beta$ III-Tubulin-Fragmentierung in den Neuriten (Abb. 3.25, B).

### **3.4.2 Modulation von Autophagie-regulierenden Signalwegen induziert Ataxin-3-positive NIIIs**

Zusammengefasst führt die Inhibition der Autophagie durch 3-MA oder Wortmannin ohne zusätzliche Stimulation einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER zur Induktion Ataxin-3-positiver NII in jungen MJD-Neuronen (Abb. 3.21, B). Der o.g. Befund führt zu der Frage, ob auch eine Modulation von Autophagie-regulierenden Signalwegen zur Generierung von Ataxin-3-positiven NIIIs führen kann. Hierzu wurde zuerst die Zusammensetzung des SDM hinsichtlich potentiell Autophagie-regulierender Komponenten überprüft.

Die Halbwertszeit von Glutamin in Zellkulturmedien beträgt bei 4°C näherungsweise zwei Wochen. Der Grund hierfür ist eine chemische Dekomposition, bei der Glutamin in Lösung in Glutamat und Ammoniak zerfällt. Ammoniak kann abhängig von der Konzentration eine aktivierende oder inhibierende Wirkung auf die Autophagie ausüben (Cheong *et al.*, 2011; Eng *et al.*, 2010). Zur Prävention der Ammoniakbildung wurde im SDM Glutamin durch GlutaMAX ersetzt. GlutaMAX ist ein Dipeptid aus Alanin und Glutamin, das durch von Zellen ins Medium sezernierte Aminopeptidasen stetig hydrolysiert wird und so für einen niedrigen, aber intakten Glutaminspiegel im Kulturmedium sorgt (Christie und Butler, 1994).

Der neuroprotektive **brain derived neurotrophic factor** (BDNF) aktiviert das antiapoptotische **B-cell lymphoma 2 protein** (Bcl-2) in Neuronen (Allsopp *et al.*, 1993; Allsopp *et al.*, 1995) und Aktivierung von Bcl-2 inhibiert über seine Bindung an **Beclin-1** (BECN1) die Bildung der Phagoophore (Pattingre *et al.*, 2005). Eine Erhöhung der BDNF-Konzentration könnte demnach Autophagie-inhibierend wirken.

*Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) hat wie BDNF eine neuroprotektive Funktion, die über Aktivierung der beiden Kinasen AKT1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) und mTOR (*mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)*) vermittelt wird (Dudek *et al.*, 1997; Rommel *et al.*, 2001). mTOR-Aktivierung inhibiert neben anderen Funktionen den für die Autophagieinitiation essentiellen ULK (*Unc51-like kinase*)-Komplex (Chan *et al.*, 2009a; Mizushima, 2010). Eine Erhöhung der IGF-1-Konzentration würde demnach über verstärkte mTOR-Aktivierung eine Inhibition der Autophagie induzieren.

Die als einziges Antioxidans im SDM enthaltene Ascorbinsäure stimuliert durch eine Stabilisierung des lysosomalen pH-Wertes die Autophagie (Martin *et al.*, 2002) und eine Eliminierung von Ascorbinsäure aus der SDM-Zusammensetzung könnte einen Autophagie-inhibierenden Effekt besitzen.

Zusätzlich zur Modulation der bereits im SDM enthaltenen Komponenten wurden die weiteren, vermutlich Autophagie-inhibierend wirkenden Substanzen Methylpyruvat, Interleukin-4 und di-butyryl-cAMP hinzugegeben, deren Wirkmechanismus im Folgenden kurz beschrieben ist (Abb. 3.26):

Methylpyruvat stimuliert als ein zellpermeables Pyruvatderivat die Katalyse von AMP zu ATP und inhibiert eine Aktivierung der **AMP**-aktivierten **K**inase (AMPK) und damit eine Induktion der Autophagie über Aktivierung des ULK-Komplexes (Cheong *et al.*, 2011; Shang und Wang, 2011; Vazquez *et al.*, 2012).

Das anti-inflammatorische Zytokin **I**nter**l**eukin-**4** (IL-4) inhibiert die Autophagie in Makrophagen über AKT1-mTOR-Aktivierung (Harris *et al.*, 2007, Harris *et al.*, 2008).

**D**i-**b**utyryl-**c**AMP (dbcAMP) ist ein zellpermeables Analog des intrazellulären Signalmoleküls cAMP und erhöht über eine Aktivierung der **P**hosphol**i**pase **C** (PLC) die IP3-Konzentration, welche zu einer Inhibition der Autophagie führt (Williams *et al.*, 2008).

Mediumkomponente	Autophagie aktivierend/inhibierend	beschriebener Wirkmechanismus	Publikationen
Glutamin (Ammoniak)	konzentrationsabhängig aktivierend o. inhibierend	lysosomaler pH	Eng <i>et al.</i> , 2010 Cheong <i>et al.</i> , 2011 Christie und Butler, 1994
BDNF	inhibierend	Bcl-2/Beclin1	Allsopp <i>et al.</i> , 1993 Allsopp <i>et al.</i> , 1995 Pattinre <i>et al.</i> , 2005
IGF	inhibierend	AKT1/mTOR/ULK	Dudek <i>et al.</i> , 1997 Rommel <i>et al.</i> , 2001
Ascorbinsäure	aktivierend	lysosomaler pH	Martin <i>et al.</i> , 2002
Methylpyruvat	inhibierend	AMPK/ULK	Cheong <i>et al.</i> , 2011 Vazquez <i>et al.</i> , 2012
Interleukin-4	inhibierend	AKT1/mTOR/ULK	Harris <i>et al.</i> , 2007 Harris <i>et al.</i> , 2008
dbcAMP	inhibierend	cAMP/PLC/IP3	Williams <i>et al.</i> , 2008

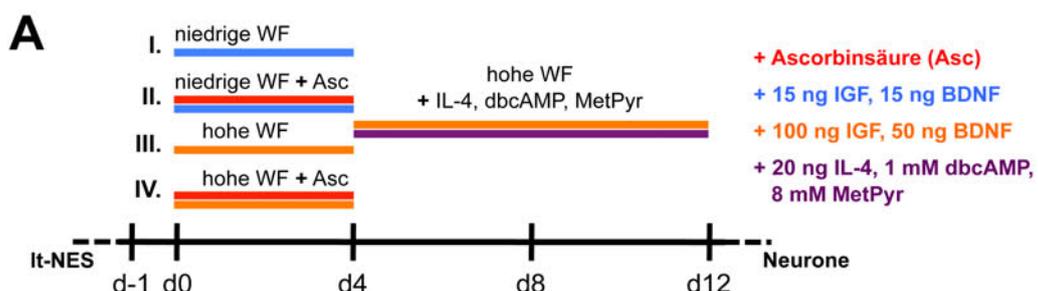
Abb. 3.26: Beschriebener Einfluss von Zellkulturmedienkomponenten auf die Autophagie.

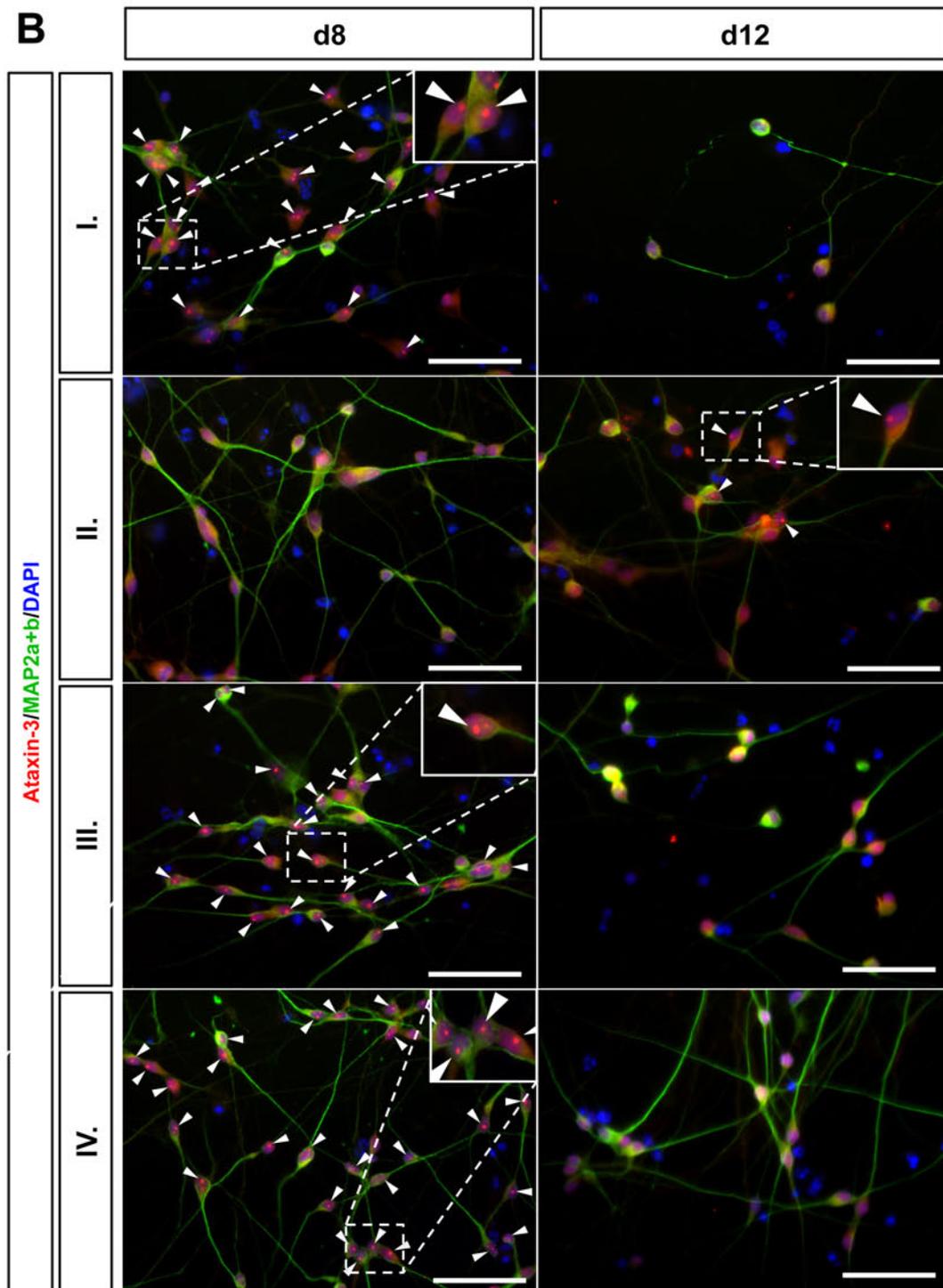
Auf Grundlage dieser beschriebenen Effekte sollte im Folgenden untersucht werden, inwiefern sich verschiedene Konzentrationen der im SDM bereits befindlichen, die Autophagie potentiell regulierenden Komponenten BDNF, IGF-1 und Ascorbinsäure in den initialen vier Tagen der Differenzierung auf die Bildung von Ataxin-3-positiven NIIs auswirken. Hohe Konzentrationen von BDNF und IGF-1 sollten hierbei durch verstärkte Aktivierung ihres korrespondierenden Signalweges eine stärkere Autophagie-inhibierende Wirkung als niedrige Konzentrationen zeigen. Für die erfolgreiche Induktion von Ataxin-3-positiven NIIs in jungen MJD-Neuronen wurde in den vorangegangenen Experimenten eine Stimulierungsphase von vier Tagen verwendet (vgl. Abb. 3.15, A u. Abb. 3.21, A). Für eine äquivalente Stimulierungsphase im Anschluss an die initiale Differenzierungsphase wurde die Kombination mit der größtmöglichen Autophagie-inhibierenden Wirkung zur Induktion von Ataxin-3-positiven NIIs gewählt.

MJD-It-NES-Zellen wurden auf mit PO/Ln beschichteten Schalen ausgesät und 24 h später in vier verschiedenen Kombinationen von BDNF, IGF-1 und Ascorbinsäure in SDM für vier Tage differenziert. Danach wurden die Zellen unter aller vier initialen Bedingungen vier bis acht weitere Tage ohne Ascorbinsäure, dafür mit Methylpyruvat, IL-4 und dbcAMP kultiviert (Abb. 3.27, A). Um eine mögliche Zeitverzögerung für die Genese der Ataxin-3-positiven NIIs allein durch die gewählten Medienbedingungen im Gegensatz zu einer aktiv durch intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Freisetzung induzierten Genese zu untersuchen, wurden die Zellen an Tag acht und zusätzlich an Tag zwölf analysiert (Abb. 3.27, A).

Die Kombination von niedriger IGF-1- und BDNF-Konzentration in Anwesenheit von Ascorbinsäure (II.) resultierte in keinen Ataxin-3-positiven NIIs an Tag acht (d8) (Abb. 3.27, B). Alle drei anderen Kombinationen (I., III. und IV.) hingegen induzierten Ataxin-3-positiv NIIs in MAP2ab-positiven Zellen zu diesem Zeitpunkt (Abb. 3.27, B). Bei Bedingung I. war dabei eine verringerte Zellviabilität zu beobachten (Abb. 3.27, B, I.).

Analyse an Tag zwölf (d12) ergab einen negativen Befund für die an Tag acht zuvor für NII-positiven Bedingungen I., III. und IV.. Im Gegensatz dazu zeigte Bedingung III. vereinzelte Ataxin-3-positiv NIIs in MAP2ab-positiven Neuronen (Abb. 3.27, B, d12). In allen Ansätzen war an d12 eine Abnahme der Zellviabilität zu beobachten (Abb. 3.27, B, d12).





**Abb. 3.27: Modulation von Autophagie-inhibierenden Signalwegen induziert Ataxin-3-positive Nils**

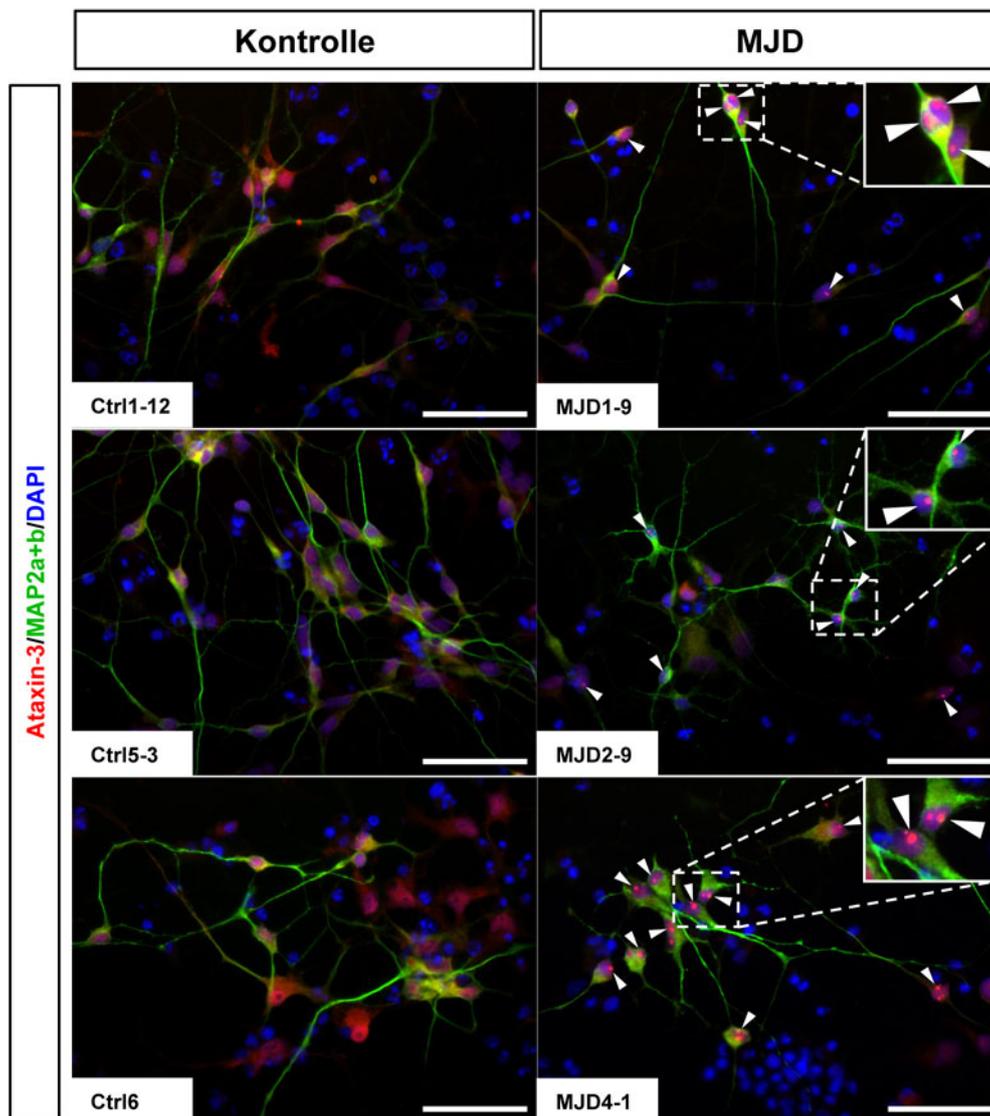
**(A)** Schema der verschiedenen Kombinationen von BDNF, IGF-1 und Ascorbinsäure (Asc) bis d4. **(B)** It-NES-Zellen der Linie MJD1-9 wurden auf PO/Ln ausgesät und wie in (A) angezeigt kultiviert. Analyse an d8 und d12. Immunfluoreszenzfärbung gegen Ataxin-3 (rot) und MAP2ab (grün). DAPI (blau). MAP2ab-positive Zellen mit für Ataxin-3-positiven Nils (weiße Blockpfeile).

I.: 15 ng/ml BDNF, 15 ng/ml IGF-1. II.: 15 ng/ml BDNF, 15 ng/ml IGF-1, 221  $\mu$ M Asc. III.: 50 ng/ml BDNF, 100 ng/ml IGF-1. IV.: 50 ng/ml BDNF, 100 ng/ml IGF-1, 221  $\mu$ M Asc. Medium von d4 bis d12 mit 50 ng/ml BDNF, 100 ng/ml IGF-1. Zusätzlich: 10 ng/ml IL-4, 8 mM Methylpyruvat, 1 mM dbcAMP.

WF = Wachstumsfaktoren; Asc = Ascorbinsäure; MetPyr = Methylpyruvat. Skalierungsbalken = 50  $\mu$ m.

### 3.4.3 Autophagiemodulation induziert Ataxin-3-positive NIIIs spezifisch in jungen MJD-Neuronen

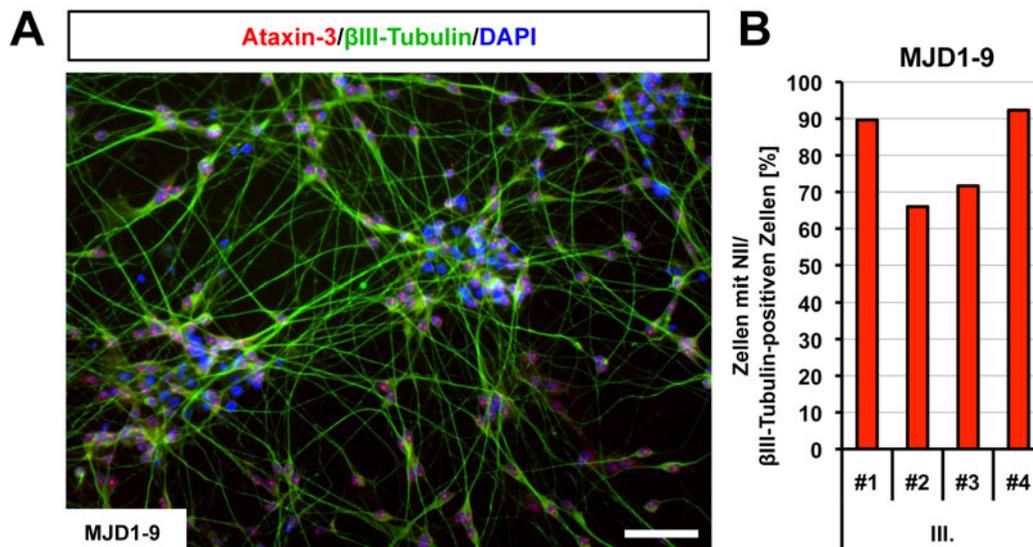
Im Folgenden sollte geprüft werden, ob durch die in 3.4.1 gefundenen, Autophagie-inhibierenden Mediumbedingungen eine Bildung von Ataxin-3-positiven NIIIs selektiv in jungen MJD-Neuronen induzieren. Hierzu wurden die zwei weiteren MJD-Linien MJD2-9 und MJD4-1 sowie drei zuvor nicht in die Analyse miteinbezogene Kontrollen untersucht. Zur Induktion der Ataxin-3-positiven NIIIs wurde die Bedingung III. aus 3.4.1 gewählt.



**Abb. 3.28: Kultivierung unter Autophagie-inhibierenden Medienbedingungen induziert NIIIs spezifisch in jungen MJD-Neuronen**

It-NES-Zellen der MJD-Linien MJD1-9, MJD2-9 und MJD4-1 sowie der Kontrolllinien Ctrl1-12, Ctrl5-3 und Ctrl6 wurden auf PO/Ln ausgesät und wie bei der Bedingung III. in Abb 3.23, (A) angegeben kultiviert. Analyse an d8. Immunfluoreszenzfärbung gegen Ataxin-3 (rot) und MAP2ab (grün). DAPI (blau). MAP2ab-positive Zellen mit für Ataxin-3-positiven NIIIs (weiße Blockpfeile). Skalierungsbalken = 50 µm.

Alle untersuchten Kontrolllinien zeigten unter den genannten Autophagie-inhibierenden Kulturbedingungen keine für Ataxin-3-positiven NfLs an d8 (Abb. 3.28). In jungen Neuronen der zwei weiteren MJD-Linien MJD2-9 und MJD4-1 und der bereits zuvor verwendeten Linie MJD1-9 konnten hingegen Ataxin-3-positiv NfLs detektiert werden (Abb. 3.28). Die Linien Ctrl2-2, Ctrl6 und MJD4-1 zeigten unter diesen Kulturbedingungen eine verringerte Zellviabilität ( ~30-70% kondensierte Zellkerne) (Abb. 3.28).



**Abb. 3.29: Autophagie-inhibierende Medienbedingungen resultieren in hoher und robuster Effizienz bei der Induktion von Ataxin-3-positiven NfLs**

(A) Ausgewählte Reproduktion des Experiments aus (Abb. 3.28) mit der MJD-Linie MJD1-9. Immunfluoreszenzfärbung gegen Ataxin-3 (rot) und βIII-Tubulin (grün) in kleinerer Vergrößerung zur besseren Übersicht. (B) Quantifizierung von unabhängigen Folgeexperimenten der Bedingung III. mit der MJD-Linie MJD1-9. Skalierungsbalken = 50 μm.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der durch die Mediumkomponenten vermittelten Autophagiemodulation induzierten Generierung der Ataxin-3-positiven NfLs in jungen MJD-Neuronen wurde an der MJD-Linie MJD1-9 eine Quantifizierung weiterer, unabhängiger Experimente durchgeführt. Diese zeigten bei der Induktion reproduzierbar eine robuste und hohe Effizienz von 60-90% von jungen Neuronen mit Ataxin-3-positiven NfLs (Abb. 3.29, A und B).

## 4. Diskussion

### 4.1 Generierung und Validierung von iPS-Zellen und verwandter Kontrollen

Die Machado-Joseph Krankheit oder spinozerebelläre Ataxie Typ 3 ist die häufigste Form der hereditären, monogenetischen Ataxien, deren Ursache eine Verlängerung des Polyglutaminbereiches im C-Terminus des *ATXN3*-Gens ist. Ziel dieser Arbeit war die Generierung und Validierung von MJD-spezifischen iPS-Zellen sowie die *in vitro* Krankheitsmodellierung anhand von aus iPS-Zellen abgeleiteten Neuronen.

Die in dieser Arbeit generierten iPS-Zelllinien wurden alle mehreren Validitätstest unterzogen um ihre Qualität hinsichtlich Pluripotenz, Differenzierungspotential, genetischer Integrität und Silencing der inserierten Transgene zu kontrollieren. Alle generierten humanen iPS-Zellen exprimierten die hES-Zell-typischen Marker TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA3 und SSEA4 auf Ebene der Immunfluoreszenz sowie die alkalische Phosphatase, nachgewiesen über eine Substrat-spezifische Farbreaktion. Im Zuge der Verbreitung der iPS-Zelltechnologie wurde die Validität und Spezifität der etablierten hES-Zell-Marker eingehenderen Untersuchungen unterzogen. Hierbei wurde TRA-1-60 als Marker für einen vollständig reprogrammierten Zustand identifiziert, wohingegen SSEA4 und alkalische Phosphatase allein unzureichende Marker sind (Chan *et al.*, 2009b).

Die Reprogrammierung der Fibroblasten zur Erzeugung der iPS-Zelllinien erfolgte mittels inserierender retroviraler pMXs-Vektoren (Takahashi *et al.*, 2007) für die Linien Ctrl1-12, Ctrl1-17, MJD1-9 und MJD1-11. Die restlichen iPS-Zelllinien wurden mit dem ebenfalls inserierenden retroviralen pMSCVpuro-Vektor (Aasen *et al.*, 2008) reprogrammiert. Die Expression der retroviralen Transgene wird in der Regel innerhalb der ersten Passagen der Etablierung einer iPS-Zelllinie durch Histonmodifikationen und DNS-Methylierung in der LTR-Promotorregion des Virus inaktiviert (Hotta und Ellis, 2008). Diese Inaktivierung, auch als *silencing* bezeichnet, wurde mittels einer quantitativen RT-PCR überprüft. Hierzu wurde die endogene Expression durch Primer, die in der 5'- bzw. 3'-UTR der mRNA binden und die totale Expression durch Primer, die im *open reading frame* binden und damit endogenes und exogenes Transkript erkennen, ermittelt. Der Vergleich der totalen zur endogenen Expression der Reprogrammierungsfaktoren zeigte keine signifikanten Differenzen, die auf ein unzureichendes *silencing* schließen lassen würden. Die als interne Referenz verwendete hES-Zelllinie H9 zeigte einen Schwankungsbereich zwischen totalen und endogenen KLF4-Expressionlevel, obwohl sie kein Transgen für KLF4 aufweist und keine Differenz zeigen

sollte. Aus diesem Grund wurde eine vergleichbare Differenz in der Expression von KLF4 der Linien MJD2-9 und MJD4-8 als innerhalb der Schwankungen und Sensitivität des Assays betrachtet. Der gemessene Unterschied zwischen totalem und endogenem Expressionslevel für eine positive Bewertung des *silencings* steht zudem im Einklang mit der ersten Verwendung der Methode (Yu *et al.*, 2007), in der ähnliche Unterschiede auftraten. Um die Problematik eines ineffizienten *silencings*, späterer Reaktivierung der Transgene und insertionaler Mutagenese zu umgehen, wurde während der Arbeit an dieser Dissertation von anderen Gruppen bereits eine Reihe von nicht-integrativen, episomalen und viralen Systemen wie Eppstein-Barr (Yu *et al.*, 2009b), Adenoviren (Stadtfield *et al.*, 2008; Okita *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009a) und Sendaivirus (Fusaki *et al.*, 2009) sowie Transduktion von Proteinen (Kim *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009b) und Transfektion von mRNA publiziert (Warren *et al.*, 2010). Zur Zeit finden episomale Plasmid- und Sendaivirus-basierte Systeme sowie die Transfektion von mRNA die breiteste Verwendung.

Eine zentrale Frage, die sich aus dem klonalen Ursprung der iPS-Zelllinien ergibt, ist, inwiefern die generierten iPS-Zelllinien ein intaktes Genom besitzen. Die reprogrammierten Zellen könnten Aberrationen besitzen oder es könnten während der Reprogrammierung Schäden aufgetreten sein. Aberrationen könnten experimentelle Probleme verursachen (wie Detektion von nicht mit der Krankheit assoziierten Phänotypen, eingeschränktes Differenzierungspotential etc.) und sollten deswegen ausgeschlossen werden. Zur Analyse der genomischen Integrität wurde genomische DNS aller iPS-Zelllinien mittels eines SNP-Arrays am Institut für Humangenetik der Universität Bonn prozessiert. Bis auf die Linie MJD3-8, die eine ca. 100 Mbp Duplikation des langen Arms des Chromosoms 1 zeigte, waren alle Linien frei von größeren Aberrationen. Ein SNP-Array besitzt eine Auflösung von 5-10 kb im Gegensatz zur in den meisten Publikationen zur Reprogrammierung verwendeten klassischen G-Band-Analyse von Chromosomen in der Metaphase (z.B. Takahashi *et al.*, 2007; Raya *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2010), die nur eine Auflösung von 5-10 Mb besitzt, allerdings chromosomale Translokationen detektieren kann (Kirchhoff *et al.*, 2001). Die SNP-Analyse besitzt damit eine um den Faktor 1000 höhere Auflösung. Erste Untersuchungen zur genomischen Integrität und Selektion während der Reprogrammierung deuteten auf somatische Mutationen vor Allem in mit der Onkogenese assoziierten Genen und eine Selektion hin (Gore *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2012). Allerdings konnten *next generation sequencing*-Analysen zeigen, dass ein Großteil der detektierten Mutationen bereits in der parentalen Zellpopulation vorliegt und man deswegen mit mehreren Klonen arbeiten sollte (Abyzov *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl der gewählte Donorzelltyp als auch die mutierten Gene keinen oder nur geringen Einfluss auf die Reprogrammierung besitzen (Ruiz *et al.*, 2013).

Ein Schlüsselcharakteristikum von pluripotenten Zellen ist ihr Potential in alle Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Entzug der pluripotenzerhaltenden Wachstumsfaktoren und Kulturbedingungen in einem EB-Formations-Assay, bei dem iPS-Zellkolonien initial in Suspension kultiviert und nach 5-8 Tagen zum Auswachsen und zur Analyse plattiert werden, resultierte in spontaner Differenzierung der iPS-Zellen. Eine Immunfluoreszenzfärbung auf spezifische Marker der drei Keimblätter zeigte das *in vitro* Differenzierungspotential aller generierten iPS-Zelllinien in Derivate aller drei Keimblätter.

Zum Zeitpunkt der Validierung der generierten iPS-Zelllinien war der stringenteste Nachweis für die Pluripotenz von humanen pluripotenten Stammzellen der Teratomassay *in vivo* (Thomson *et al.*, 1998). Nach Transplantation in immundefiziente SCID/beige-Mäuse bildeten alle iPS-Zelllinien Teratome bestehend aus Geweben aller drei Keimblätter und erfüllten damit den Nachweis ihrer Pluripotenz. Trotz dieses Pluripotenznachweises gibt es Befunde, die auf eine unvollständige Reprogrammierung von humanen iPS-Zellen hindeuten. Humane iPS-Zellen besitzen demnach ein somatisches, epigenetisches Gedächtnis (*somatic, epigenetic memory*), das mit ihrem somatischen Ursprungszelltyp korreliert (Chin *et al.*, 2009; Hargus *et al.*, 2014; Lister *et al.*, 2011; Neveu *et al.*, 2010; Ohi *et al.*, 2011; Polo *et al.*, 2010) und zu einem erhöhten Differenzierungspotential in diesen Zelltyp führt (Bar-Nur *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011a). Dieses Phänomen scheint unabhängig von der verwendeten Reprogrammierungstechnik zu sein (Ohi *et al.*, 2011). Ursächlich für dieses Phänomen könnte der epiblastäre Ursprung von humanen, pluripotenten Stammzellen sein. Humane ES- und iPS-Zellen entsprechen in ihren Charakteristika eher murinen **Epi**blast-**S**tammzellen (EpiSCs) (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007) und von murinen Fibroblasten reprogrammierte EpiSCs besitzen ebenfalls ein somatisches, epigenetisches Gedächtnis (Han *et al.*, 2011). Murine EpiSCs können alleine durch Veränderung der Kulturbedingungen (Chambers *et al.*, 2007; Ying *et al.*, 2008) in das ES-Zellstadium überführt werden (Bao *et al.*, 2009). Inwiefern ein zu murinen ES-Zellen äquivalentes Derivat für humane Zellen existiert und dieses als Zielzustand der Reprogrammierung kein somatisches, epigenetisches Gedächtnis aufweist, müssen weitere Untersuchungen ergeben. Erste Studien bieten Hinweise in diese Richtung (Gafni *et al.*, 2013; Takashima *et al.*, 2014; Theunissen *et al.*, 2014). Obwohl die Teratomformation auf absehbare Zeit der stringenteste Nachweis für die Pluripotenz von humanen Zellen bleiben wird, so können aus Ressourcengründen nicht alle generierten iPS-Zellen auf diese Weise untersucht werden. Abhilfe kann hier die Bioinformatik mit Genexpressionanalysen schaffen, die eine zuverlässige Analyse der Pluripotenz (Pluritest) und des Differenzierungspotentials (Score Card) ermöglicht (Bock *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2011).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass erfolgreich Kontroll- und MJD-iPS-Zelllinien generiert wurden, die den aktuellen Qualitätsstandards entsprechen.

## 4.2 It-NES-Zellen als unlimitierte Ressource zur Generierung von MJD-Neuronen

Im Zuge der It-NES-Zellgenerierung aus den validierten iPS-Zelllinien wurde beobachtet, dass die neurale Induktion in ihrer Effizienz stark variierte. Das Phänomen einer bevorzugten Differenzierung von ES- und iPS-Zelllinien in bestimmte somatische Derivate, und damit auch einer unterschiedlichen Effizienz der neuralen Induktion, wurde bereits von anderen Gruppen beschrieben (Bock *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Durch Modifikation des Protokolls nach Koch *et al.*, 2009, bei der das zuvor verwendete EB-Medium ersetzt (Osakada *et al.*, 2009), ein enzymatisches Herauslösen der neuralen Rosetten durch Dispase (Zhang *et al.*, 2001) anstelle des vorherigen manuellen Vorgehens benutzt, ein zusätzlicher Plattierungs- und Expansionsschritt eingefügt sowie duale SMAD-Inhibition (Chambers *et al.*, 2009) mit SB431542 und Dorsomorphin verwendet wurde, konnte diese starke Variabilität beseitigt werden (s. Abb. 3.6 und 3.7). Dass die duale SMAD-Inhibition die Effizienz der neuralen Induktion in iPS-Zelllinien, die spontan mit geringer Effizienz in neurale Derivate differenzieren, dramatisch erhöhen kann, konnte von anderen Gruppen bestätigt werden (Boulting *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010). Eine bevorzugte Differenzierung der hES-Zelllinie H9 in Neuroektoderm ist ebenfalls beschrieben (Hu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Die in dieser Arbeit erfolgte Substitution von Noggin in der dualen SMAD-Inhibition durch pharmakologische Inhibitoren (Dorsomorphin oder LDN193189), erfuhr im Feld der neuralen Differenzierung bereits eine breite Verbreitung (Boulting *et al.*, 2011; Chambers *et al.*, 2012; Fasano *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Kriks *et al.*, 2011). Eine molekulare Ursache für die Variabilität der neuralen Induktion könnte eine hohe Expression der miRNA-371-3 sein, die die neuronale Differenzierung durch eine erhöhte Sensibilität gegenüber BMPs blockiert, wohingegen Zelllinien mit einer niedrigen miRNA-371-3 Expression selbst bei Zugabe von BMP4 partiell weiter in Neuroektoderm differenzieren (Kim *et al.*, 2011b). Übereinstimmend mit ihrem bevorzugtem neuralen Differenzierungspotential wurde bei der hES-Zelllinie H9 eine niedrige miRNA-371-3 Expression festgestellt (Kim *et al.*, 2011b). Eine Analyse der generierten iPS-Zelllinien auf die Expression der miRNA-371-3 könnte zeigen, ob diese Korrelation auch für diese Linien gilt.

Der Vergleich von zwei It-NES-Zelllinien desselben iPS-Zellhintergrundes, eine klassisch generiert nach Koch *et al.*, 2009, die andere nach o.g. modifizierten Protokoll, zeigte im TLDA keine signifikanten Unterschiede in den *gene ontology*-Kategorien NSC- und Vorläufermarker, Zellzyklus-assoziierte Marker, mit neuralen Rosetten assoziierte Marker und regionalspezifische Marker des ZNS. Die Schwankungen zwischen den beiden Linien lagen hierbei im Toleranzbereich einer großangelegten Analyse von isogenen, in

unterschiedlichen Laboren generierten It-NES-Zelllinien mittels TLDA (Falk *et al.*, 2012). Analysen der Morphologie und Expression der It-NES-Zell-typischen Marker ZBTB1/PLZF und DACH1 sowie der klassischen NSC-Marker SOX2 und Nestin auf Proteinebene zeigten eine rosetten-ähnliche Morphologie aller generierten Linien und eine homogene Expression der o.g. Marker, was für die It-NES-Zellidentität der Zellen spricht. Ein Entzug der Wachstumsfaktoren und anschließende Differenzierung ergab homogene, für die neuronalen Marker  $\beta$ III-Tubulin und MAP2ab-positive Kulturen, mit vorwiegend GABA-positiven Neuronen, womit das Differenzierungspotential auf dieser Ebene vergleichbar mit dem für It-NES-Zellen publizierten ist (Koch *et al.*, 2009).

Die mit modifiziertem Protokoll generierten It-NES-Zellen sind in ihrer Zellidentität somit vergleichbar zu klassisch etablierten Linien. Weiterhin konnte wie erwartet die Expression von expandiertem Ataxin-3 in aus MJD-It-NES-Zellen abgeleiteten Neuronen detektiert werden, womit sie als unlimitierte Ressource für die *in vitro*-Modellierung von MJD herangezogen werden können.

Der polyglutaminkodierende CAG-Bereich in MJD zeigt in der mutierten, expandierten Form eine intergenerationale Instabilität, d.h. die Länge der Expansion ist über die Generationen nicht stabil, sondern kann zunehmen. Gleichzeitig können Zellen des gleichen Individuums unterschiedliche Längen der CAG-Expansion aufweisen, was als somatisches Mosaik bezeichnet wird. In iPS-Zellen der Triplet-Wiederholungserkrankung **Friedreich-Ataxie** (FRDA), bei der eine Hyperexpansion der Basentriplets GAA TTC im ersten Intron des *FXN*-Gens vorliegt, konnte eine Expansion der Wiederholungen allein bei verlängerter Passagierung und Kultivierung der iPS-Zellen beobachtet werden, als deren Ursache eine erhöhte Expression des DNS-Basenfehlpaarungsreparaturproteins MSH2 festgestellt werden konnte (Ku *et al.*, 2010). iPS-Zellen sind damit *per se* für eine Modellierung von Expansionsvergrößerungen geeignet. Eine Analyse des CAG-Bereiches in MJD-iPS-Zellen zeigte allerdings keine Expansion über die Passagen (Abb. 3.10 und Koch *et al.*, 2011). Die Analyse der CAG-Expansion in einem iPS-Zell-basierten Modell der Polyglutaminerkrankung Chorea Huntington, die mit einem expandierten CAG-Bereich im *HTT*-Gen eine vergleichbare molekulare Ursache zu MJD aufweist, offenbarte eine Verlängerung der Expansion in aus iPS-Zellen abgeleiteten NSCs einer iPS-Zelllinie mit 110 CAG-Wiederholungen (HD Consortium, 2012). Eine weitere iPS-Zelllinie, die eine noch längere Expansion (180 CAGs) trug, zeigte hingegen keine Zunahme im CAG-Bereich in höheren NSC-Passagen (HD Consortium, 2012), sodass sich kein konsistentes Bild ergibt. In Übereinstimmung mit dem Fehlen einer Zunahme der CAG-Expansion in HD-NSCs mit einer intermediären Anzahl an CAG-Wiederholungen, konnte in MJD-It-NES-Zellen, die 71 bzw. 72 CAG-Wiederholungen tragen, ebenfalls keine Zunahme der CAG-Wiederholungen bis Passage 64 der Kultivierung als It-NES-Zellen beobachtet werden. Zur Untersuchung der

intergenerationalen Instabilität von MJD *in vitro* könnte eine Differenzierung der iPS-Zellen in Gameten (Kee *et al.*, 2009; Panula *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2009) und insbesondere Spermien notwendig sein, da die Instabilität in der paternalen Transmission prominenter als in der maternalen ist (Maruyama *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1995) und dies für einen für die Spermatogenese spezifischen Mechanismus sprechen könnte.

### **4.3 Exzitation und intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung induzieren Ataxin-3-Aggregation in MJD-Neuronen**

Die initialen Mechanismen, die nach vielen Lebensjahren schließlich in der Manifestation der Pathologie münden, sind für Polyglutaminerkrankungen und andere Aggregopathien allgemein unbekannt. Basierend auf der Hypothese, dass eine proteolytische Prozessierung der mutierten Proteine hierbei einen entscheidenden Schritt darstellt, wurden aus It-NES-Zellen abgeleitete neuronale Kulturen verschiedenen Stimuli ausgesetzt, die durch eine Aktivierung von Proteasen diesen Schritt katalysieren und eine Aggregation von expandiertem Ataxin-3 initiieren sollten.

#### **4.3.1 Erregungsvermittelte Aggregation von expandiertem Ataxin-3 in neuronalen MJD-Langezeitkulturen**

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob eine Stimulation von MJD-Neuronen mit Glutamat durch einen Glutamatrezeptor-vermittelten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum ins Zytosol und eine nachfolgende Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteasen Calpaine und Caspasen zur Bildung von SDS-unlöslichen, Ataxin-3-haltigen Proteinaggregaten, sogenannten Mikroaggregaten, führt. Calpaine und Caspasen prozessieren beide Ataxin-3 proteolytisch *in vitro* (Haacke *et al.*, 2007; Wellington *et al.*, 1998) und könnten bei der Entstehung von Mikroaggregaten beteiligt sein, die eines der biomolekularen Charakteristika der MJD-Pathologie darstellen (Ikeda *et al.*, 1996).

Eine Fraktionierung nach differentieller Löslichkeit von unstimulierten neuronalen MJD-Langezeitkulturen zeigte in der SDS-unlöslichen Fraktion kein positives Signal für Ataxin-3. Eine spontane Aggregation konnte demnach nicht detektiert werden, was für die Notwendigkeit von Aggregation-initiiierenden Prozessen spricht. Demgegenüber war nach Stimulation mit Glutamat ein Ataxin-3-positives Signal in der SDS-unlöslichen Fraktion von neuronalen MJD-Neuronen zu detektieren, wohingegen Kontroll-Neurone nach Stimulation keine Mikroaggregate zeigten. Dieser Unterschied im Aggregationsverhalten könnte somit eine biomolekulare Ursache für die Pathologie von MJD darstellen.

Durch eine selektive, pharmakologische Inhibition von Calpainen und Caspasen sollte deren Beteiligung im Prozess der Mikroaggregation analysiert werden. Eine Applikation von Caspase-Inhibitoren zeigte keine Blockade der Mikroaggregation. Eine Inhibition der Calpainaktivität mit ALLN oder Calpeptin führte hingegen zu einer vollständigen Abwesenheit von Mikroaggregaten nach Glutamatstimulation in MJD-Neuronen. Weiterhin war die Inhibition von weiteren Proteaseklassen (Serin-, Cystein- und hydrolytischen Proteasen) nicht in der Lage die Mikroaggregation von expandiertem Ataxin-3 zu verhindern. Aufgrund dieser Befunde ist anzunehmen, dass Calpaine die hauptsächlich an der Glutamat-induzierten Mikroaggregation von expandierten Ataxin-3 beteiligten Proteasen darstellen. Unterstützt wird diese Hypothese durch ein MJD-Mausmodell, in dem der *knockout* des zellulären Calpaininhibitors Calpastatin zu einer verstärkten Proteolyse von Ataxin-3, einer Zunahme der Ataxin-3-Aggregation und von NlIs sowie einer Forcierung der motorischen Symptome führte (Hübener *et al.*, 2013). Umgekehrt zeigte eine orale Applikation des Calpaininhibitors BDA-410 eine Reduktion von aggregiertem Ataxin-3 sowie NlIs und eine Milderung der neurologischen Symptome in einem MJD-Mausmodell (Simoes *et al.*, 2014).

Durch die neurodegenerative Natur der Pathologie von MJD stellte sich die Frage nach der Neuroselektivität des Glutamatstimulus. Stimulation von MJD-Fibroblasten, -iPS- und -Gliazellen mit Glutamat zeigte jeweils keine SDS-unlöslichen Ataxin-3-positiven Aggregate. Im Gegensatz zu Fibroblasten und iPS-Zellen besitzen Gliazellen ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren, sodass die Abwesenheit von SDS-unlöslichen Ataxin-3-positiven Mikroaggregaten nach Glutamatstimulus auf das Fehlen einer weiteren, essentiellen Komponente für deren Induktion in Gliazellen hindeutete. Spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle potenzieren in Neuronen, im Gegensatz zu Gliazellen, den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Membrandepolarisation, die durch Aktivierung von Kalium- und Natriumkanälen vermittelt wird, die wiederum durch AMPA- und NMDA-Rezeptoren (D-APV/NBQX) induziert werden. Unterbrechung dieser Kaskade, die ultimativ in der Aktivierung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle mündet, durch AMPA- bzw. NMDA-Rezeptorinhibition oder Prävention der Depolarisation durch Blockade der Natriumkanäle mittels TTX, verhinderte die Bildung von Ataxin-3-positiven Mikroaggregaten in MJD-Neuronen. In Übereinstimmung mit der essentiellen Funktion der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bei der Mikroaggregatinduktion führte Chelatkomplexierung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Pools durch EDTA ebenfalls zu einer Prävention der Aggregatgenese. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Aktivität der NMDA-Rezeptoren partiell ebenfalls auf einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx beruht, sodass nicht auszuschließen ist, dass die Kaskade durch EDTA bereits an der Stelle der NMDA-Rezeptoren unterbrochen wird (Abb. 4.1).

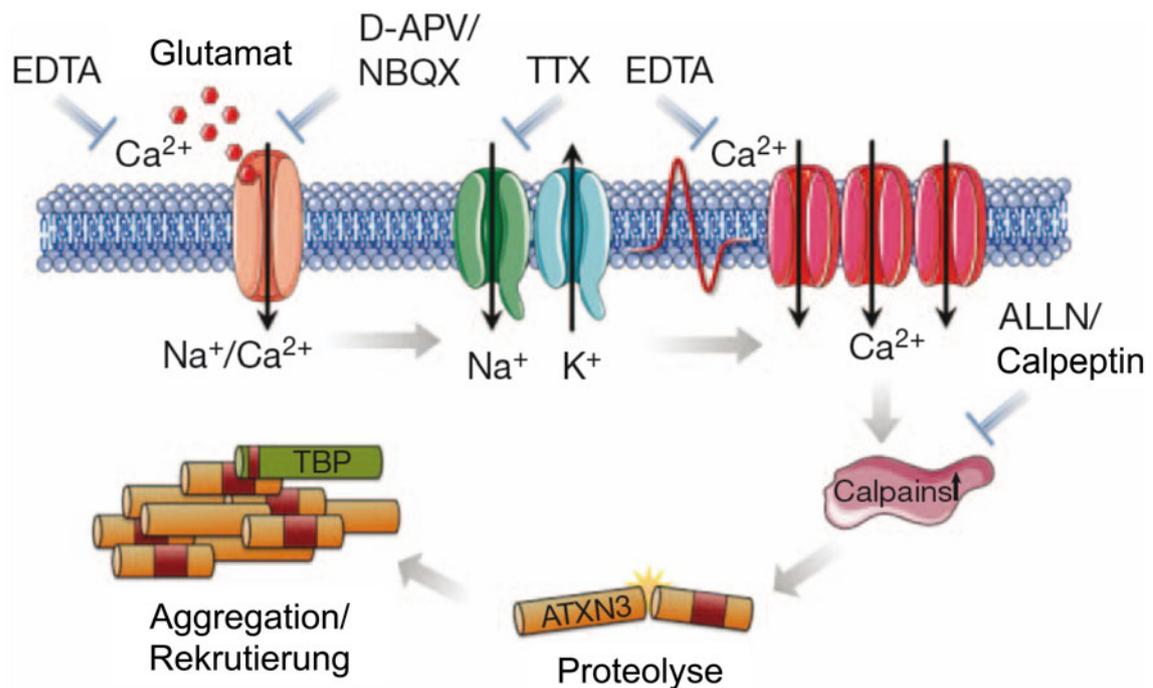


Abb. 4.1: Modell der Glutamat-induzierten Aggregation von Ataxin-3 in MJD-Neuronen durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vermittelte Calpainaktivität (verändert nach Koch *et al.*, 2011).

Ein Charakteristikum der polyglutamininduzierten Aggregation ist die Rekrutierung von weiteren Proteinen mit einem Polyglutaminbereich wie z.B. des Transkriptionsfaktors *TATA box binding protein* (TBP), dessen Co-Lokalisation in Ataxin-3-positiven Aggregaten in MJD-Patienten gezeigt werden konnte (Uchihara *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit diesem Befund konnten TBP in voller Länge sowie TBP-Fragmente in der SDS-unlöslichen Fraktion detektiert werden (Koch *et al.*, 2011). Neben Ataxin-3-Fragmenten wurden zusätzlich sowohl expandiertes als auch nicht-expandiertes Ataxin-3 der vollen Länge in die Mikroaggregate rekrutiert. Dies lässt auf einen *seeding*-Effekt der Ataxin-3-Fragmente schließen, der bereits in Überexpressionssystemen gezeigt werden konnte (Haacke *et al.*, 2006). Die Rekrutierung von nicht-expandiertem Ataxin-3 ist nicht unerwartet, da Ataxin-3 *in vitro* selbst ohne Polyglutaminbereich zur Aggregation neigt und in der Lage ist, Oligomere und amyloide Fibrillen zu bilden, was vermutlich auf die biochemischen Eigenschaften der N-terminalen Josephindomäne zurückzuführen ist (Ellisdon *et al.*, 2007; Gales *et al.*, 2005; Masino *et al.*, 2004). In Übereinstimmung hiermit zeigt ein Mausmodell, das ausschließlich den N-terminalen Teil von Ataxin-3 ohne den C-terminalen, polyglutaminkodierenden CAG-Bereich exprimiert, zytoplasmatische Ataxin-3-Aggregation, Neurodegeneration und motorische Symptome (Hübener *et al.*, 2011). Inwiefern N-terminale Fragmente bei endogener Expressionsstärke zur Pathologie beitragen, bedarf weiterer Untersuchungen. Trotz der schnellen Aggregationskinetik konnten in den MJD-Neuronen keine mikroskopisch sichtbaren Makroaggregate oder Inklusionen detektiert werden, ebenso gab es keine Anzeichen von akuter Zytotoxizität (Koch *et al.*, 2011). Weiterhin konnten 48 h nach

Glutamatstimulation keine SDS-unlöslichen Ataxin-3-positiven Aggregate mehr detektiert werden (Dr. Peter Breuer, Dr. Philipp Koch, persönliche Kommunikation). Diese Ergebnisse zeigen, dass Neurone zumindest vorübergehend die Fähigkeit besitzen, Mikroaggregate abzubauen. Zudem wird die Hypothese gestützt, dass neuronale Degeneration in den späten Phasen der Krankheit mit einer altersbedingten Beeinträchtigung der Proteinhomöostase assoziiert ist (Hartl *et al.*, 2011).

Die genaue mechanistische Verbindung von Mikroaggregaten zu Makroaggregaten und Inklusionen und schließlich zur Neurodegeneration ist unklar, jedoch weisen Befunde in anderen Modellen von Polyglutaminerkrankungen wie SCA1, SCA7 und SBMA darauf hin, dass Mikroaggregate und deren Akkumulation im Zuge der Krankheitsprogression dem Auftreten von Inklusionen und Neurodegeneration vorangehen (Li *et al.*, 2007b; Watase *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2003). Ähnliche Befunde konnten in einem Mausmodell für MJD beobachtet werden (Williams *et al.*, 2009), so dass die hier präsentierten Daten die Modellierung von frühen Aggregationsereignissen anhand von aus iPS-Zellen generierten MJD-spezifischen Neuronen und damit die erfolgreiche Modellierung einer neurodegenerativen Erkrankung mit später Symptomatik *in vitro* belegen.

### **4.3.2 Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER induziert Ataxin-3-positive Mikroaggregate sowie Inklusionen in jungen MJD-Neuronen**

Die Induktion von Mikroaggregaten kann nur in mindestens vier bis sechs Wochen alten MJD-Neuronen durchgeführt werden, da erst diese dann über die für den Glutamat-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nötigen Rezeptoren verfügen. Dies ist insofern relevant, als dass für ein Hochdurchsatzscreening von pharmakologischen Substanzen, die inhibierend auf die Aggregation wirken, eine möglichst kurze Differenzierungszeit zu bevorzugen ist. Die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit bei der Bildung von Mikroaggregaten warf die Frage auf, ob ein auf alternative Weise induzierter zytosolischer Ca<sup>2+</sup>-Anstieg auch in jüngeren bzw. unreiferen MJD-Neuronen die Bildung von Mikroaggregaten induzieren kann. Als Alternative zur Glutamat-induzierten Ataxin-3-Aggregation in MJD-Neuronen wurde ATP als potentielles Signalmolekül für die Induktion eines intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieges in jungen MJD-Neuronen untersucht. Eine semiquantitative Expressionsanalyse von im ZNS exprimierten, ATP-sensiblen, ionotropen P2RX-Rezeptoren in MJD-Ilt-NES-Zellen zeigte eine Expression von P2RX4, und eine Analyse der metabotropen, G<sub>q11</sub>-gekoppelten P2RY-Rezeptoren zeigte, dass P2RY1 und P2RY11 stark, sowie P2RY2 schwach exprimiert waren. Dieser Befund belegte zumindest die Expression von ATP-sensitiven Rezeptoren in diesem jungen Stadium der neuronalen Differenzierung. Eine ATP-Stimulation an Tag zwei der neuronalen Differenzierung von MJD-Ilt-NES-Zellen resultierte in einem Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-

Konzentration und zeigte damit die Existenz von funktionellen P2-Rezeptoren zu diesem frühen Differenzierungszeitpunkt. Eine Chelatierung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  war nicht in der Lage, den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zu inhibieren, wohingegen ein irreversibles Entleeren der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zu einem Ausbleiben des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieges führte. Dies lässt darauf schließen, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg auf ein Entleeren der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, vornehmlich des ERs, und nicht aus einem Einstrom aus dem extrazellulären Raum, und somit auf metabotrope P2RY-Rezeptoren zurückzuführen ist. Hierbei ist es möglich, dass aus den per Expressionsanalyse gefundenen Kandidaten P2RY1, P2RY2 und P2RY11 alle drei, nur zwei oder nur einzelne trotz ihrer Expression funktionell vorliegen. Ebenso kann bei mehreren relevanten Rezeptoren ihr Beitrag an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort variieren. Zur Identifikation der funktionellen P2RY-Rezeptoren und ihrer Beteiligung an der ATP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER sind weiterführende funktionelle Analysen mit spezifischen Inhibitorenkombinationen (Burnstock *et al.*, 2007; Communi *et al.*, 1999; Waldo *et al.*, 2004) notwendig.

Als nächstes wurde die Fähigkeit des ATP-Stimulus zur Induktion von Ataxin-3-positiven Mikroaggregaten in jungen Neuronen, analog zum Glutamat-Stimulus in MJD-Neuronen, analysiert. Hierbei zeigte die Analyse das selektive Auftreten eines prominenten positiven Ataxin-3-Signals in der SDS-unlöslichen Fraktion von jungen MJD-Neuronen, wohingegen unstimulierte MJD- als auch stimulierte Kontroll-Kulturen nur schwächere Signale zeigten, was auf eine Induktion von SDS-unlöslichen Aggregaten durch ATP-Stimulus hindeutet. Somit bietet die ATP-Induktion von SDS-unlöslichen Aggregaten in jungen MJD-Neuronen eine schnellere Alternative zur Mikroaggregation von Ataxin-3 in reiferen Neuronen durch Glutamat-Stimulus. Es ist jedoch anzumerken, dass an jungen Neuronen nur Substanzen effektiv getestet werden können, die nicht auf ausschließlich in elektrophysiologisch voll ausgereiften Neuronen vorhandene Rezeptoren und Signalwege abzielen. Für Substanzen hingegen, welche die Aggregation direkt modulieren wie z.B. molekulare Chaperone (Übersicht: Hartl *et al.*, 2011; Muchowski und Wacker, 2005) kann die ATP-induzierte Mikroaggregation von neuronalen MJD-Langzeitkulturen ein attraktives Modell darstellen.

Eine Analyse von mit ATP-stimulierten jungen MJD-Neuronen zeigte Ataxin-3 positive Makroaggregate in  $\beta$ III-Tubulin-positiven Neuronen. Unstimulierte MJD- und stimulierte Kontroll-Kulturen wiesen diese Makroaggregate hingegen nicht auf. Dieser für MJD spezifische Aggregationsphänotyp konnte auch in ATP-stimulierten jungen Neuronen der MJD-iPS-Zelllinien aus verschiedenen Patientenhintergründen nachgewiesen werden, wohingegen die stimulierten Kontrollneurone nicht betroffener Probanden negativ waren. Eine Ursache für das Auftreten von Ataxin-3-positiven Makroaggregaten in jungen MJD-Neuronen, die in reifen MJD-Neuronen nicht beobachtet werden konnten, könnte in einer

niedrigeren Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA)-Aktivität in eher undifferenzierten *versus* differenzierten neuronalen Zellen liegen (Cecchi *et al.*, 2008). Eine niedrigere PMCA-Aktivität könnte zu einer basal höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und einer verzögerten Rückkehr zur basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation führen, woraus sich eine höhere und länger anhaltende Calpainaktivität ableiten ließe. Dies ließe sich durch Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ruhekonzentration in reifen und jungen Neuronen und Analyse der Proteolyse von Calpainsubstraten bestimmen. Weiterhin könnte sich die Expression von Chaperonen, Komponenten des Proteasoms und  $\text{Ca}^{2+}$ -sequestrierenden Proteinen zwischen jungen und reifen Neuronen dahingehend unterscheiden, dass dies in einer verstärkten Aggregation in jungen Neuronen resultiert. Eine Microarray- und Proteom-Analyse von jungen und reifen Neuronen könnte hierüber Aufschluss geben.

Eine weitergehende Charakterisierung der ATP-induzierten Makroaggregate zeigte eine nukleäre Lokalisation; weniger als 1% der Ataxin-3-Aggregate waren zudem positiv für Ubiquitin. Diese qualitativen Charakteristika entsprechen denen von typischen *in vivo* detektierten NLLs, die eines der Schlüsselmerkmale der Pathologie von MJD sind (Paulson *et al.*, 1997b; Schmidt *et al.*, 1998). Die geringe Häufigkeit von Ubiquitin-positiven Ataxin-3-Aggregaten ist dabei in Übereinstimmung mit dem Befund, dass Aggregate *in vivo* erst nach ihrer Genese ubiquitiniert werden (Gong *et al.*, 2012), und dass die Anzahl an Ataxin-3-Ubiquitin-doppelt-positiven Zellen nur 27% der zu detektierenden Polyglutaminaggregate in *post mortem*-Hirngewebe ausmacht (Seidel *et al.*, 2012). Zwar wurde in vielen Studien bereits eine Co-Lokalisation von Proteinen mit Ataxin-3-positiven NLLs beschrieben (Auswahl: Chai *et al.*, 1999a; Chai *et al.*, 1999b; Chai *et al.*, 2001; Cong *et al.*, 2005; McCampbell *et al.*, 2000), die Co-Lokalisation von Ataxin-3-positiven NLLs mit Ubiquitin konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings erstmals in einem *in vitro*-System gezeigt werden.

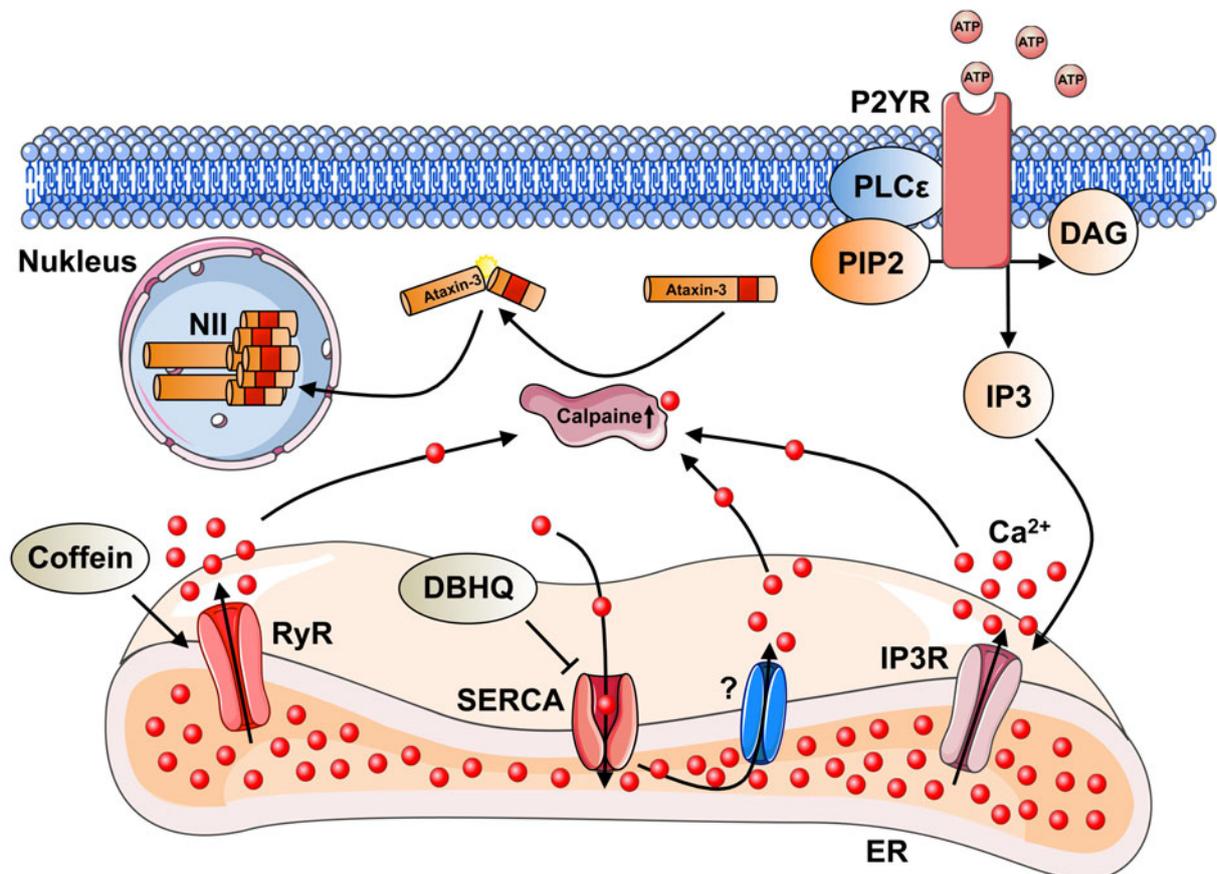
Die Lokalisation von P2-Rezeptoren in der Zellmembran und ihre Funktionalität unterliegen einer Regulation, die vom physiologischen Zustand der Zelle und verschiedenen Signalwegen abhängig ist (Burnstock *et al.*, 2007; Narcisse *et al.*, 2005). Um eine von der Aktivität der P2RY abhängige Variation in der ATP-stimulierten Makroaggregation von Ataxin-3 zu umgehen, wurden direkte Stimuli zur ER-assoziierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung auf ihr Potential zur Induktion von Ataxin-3-positiven NLLs hin untersucht. Coffein stimuliert die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER über Aktivierung der Ryanodinrezeptoren. Dies konnte an den in dieser Arbeit verwendeten jungen Neuronen verifiziert werden. Eine Stimulation mit Coffein anstelle von ATP führte selektiv in MJD-Neuronen zur Induktion Ataxin-3-positiver NLLs. Interessanterweise hat umgekehrt eine Inhibition der RyR durch Dantrolen eine protektive Wirkung in Mausmodellen von HD und MJD (Chen *et al.*, 2008a; Chen *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2012), was für eine Rolle der RyR in der Pathologie von MJD spricht. In einer der Studien konnte für HD zudem die Reduktion von HTT-Aggregaten gezeigt werden

(Chen *et al.*, 2011). Zusätzlich wird durch Stress und den Alterungsprozess die RyR-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER verstärkt (Liu *et al.*, 2012a; Thibault *et al.*, 2007). Dies könnte einen Grund für den späten Beginn von MJD darstellen.

Als weiterer, direkter Stimulus für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER wurde der reversible SERCA-Inhibitor DBHQ gewählt. Inhibition der SERCA mittels DBHQ resultierte in einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in jungen MJD-Neuronen. Wiederholte DBHQ-Stimulation induzierte die Bildung von Ataxin-3-positiven NIs spezifisch in jungen MJD-Neuronen. Basierend auf den oben genannten Ergebnissen führt offenbar eine aktive Interferenz mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER zur Initiierung Ataxin-3-positiver NIs in MJD-Neuronen (Abb. 4.2). Diese Hypothese wird durch Befunde von Chen *et al.* (2008a) gestützt. In dieser Studie wurde ein direkter Einfluss von expandiertem Ataxin-3 auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase durch Bindung an den IP3R und dadurch vermittelte, verstärkte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER gezeigt, wohingegen nicht-expandiertes Ataxin-3 nicht an den IP3R bindet.

Die Stimulation mittels ATP, Coffein und DBHQ ist unabhängig von neurospezifischen Rezeptoren. Dies warf die Frage auf, ob diese Stimuli in anderen, nicht-neuronalen Zelltypen NIs induzieren könnten. Stimulation von Fibroblasten, iPS-Zellen und Gliazellen mit ATP, Coffein und DBHQ zeigte keine Ataxin-3-positiven NIs. Die beobachtete Sensitivität von iPS-Zellen gegenüber DBHQ könnte auf die stärkere Entleerung des ERs im Vergleich mit ATP und Coffein und damit auftretendem ER-Stress zurückzuführen sein. Dies würde dagegen sprechen, dass die unterschiedlichen Medienbedingungen einen inhibitorischen Einfluss auf die Stimuli besitzen. Unter den verwendeten Kultur- und Stimulationsbedingungen ist die durch ATP-, Coffein- oder DBHQ-Stimulation induzierte Genese von Ataxin-3-positiven NIs demnach spezifisch für junge MJD-Neurone. Ein Grund für die Neurospezifität könnte das geringere Zellvolumen der Neurone im Vergleich zu den anderen Zelltypen sein. Hierdurch ist die intrazelluläre Konzentration von Ataxin-3 höher, was die Aggregation begünstigt. Zudem können Neurone als postmitotische Zellen Aggregate nicht durch Mitose auf ihre Tochterzellen aufteilen und so die individuelle Belastung mit Aggregaten reduzieren. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass ein Arrest des Zellzyklus das Auftreten von Ataxin-3-positiven Makroaggregaten *in vitro* in BHK-1- und PC12-Zellen forciert (Yoshizawa *et al.*, 2000). Auch sind einige Chaperone ausschließlich im Zytosol aktiv (Cao *et al.*, 2001) und können nur dort Aggregation modulieren, diese Funktion allerdings während der Mitose durch den Abbau der Kernhülle in der gesamten Zelle ausüben. Eine Aggregation von Ataxin-3 auch in anderen Zelltypen als Neuronen durch andauernde Stimulation und damit verstärkte Aggregation kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, worauf Befunde aus HD-Mausmodellen hindeuten. Diese zeigen, im Gegensatz zu den meisten HD-Patienten, ein weitreichendes Auftreten von Huntingtin-positiven Inklusionen in

nicht-neuronalem Gewebe wie Niere, Leber oder Pankreas (Moffitt *et al.*, 2009; Orth *et al.*, 2003; Sathasivam *et al.*, 1999), was vermutlich auf die Stärke der Transgenexpression in Kombination mit einem extrem expandierten CAG-Bereich von >150 und damit einem erhöhten Aggregationspotential zurückzuführen ist.



**Abb. 4.2: Modell der Induktion von Ataxin-3-positiven NII in jungen MJD-Neuronen durch Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum.**

Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) über eine Aktivierung der IP3R durch von ATP-Bindung an P2YR freigesetztes IP3, eine Öffnung der Ryanodinrezeptoren (RyR) durch Coffein oder eine Inhibition des Ca<sup>2+</sup>-Transportes in das ER durch die SERCA mittels DBHQ und einen dadurch initiierten Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom durch bisher unidentifizierte Kanäle (?) in das Zytosol aktiviert die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Calpaine. Diese proteolysieren Ataxin-3, dessen Fragmente ein erhöhtes Aggregationspotential besitzen und im Nucleus in Form von neuronalen, intranukleären Inklusionen (NII) aggregieren. PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PLCε = Phospholipase Cε; DAG = Diacylglycerin.

Eine Generierung von krankheitstypischen Aggregaten konnte bisher in keinem iPS-Zell-basierten Modell für die Aggregopathien ALS, HD, AD und PD gezeigt werden (Chen *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2013; HD Consortium, 2012; Israel *et al.*, 2012; Kiskinis *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2012). Bislang führte nur die Überexpression von Huntingtin in aus hES-Zellen abgeleiteten Neuronen zu detektierbaren Aggregaten (Lu und Palacino, 2013). Die hier präsentierten Daten demonstrieren somit das erste iPS-Zell-basierte, auf endogener Expression beruhende Modell zur Makroaggregation eines für die Pathologie ursächlichen Proteins in einem authentischen, neuronalen Kontext.

Inwiefern der Reifungsgrad der jungen Neurone die Modellierung von MJD beeinflusst, ist zur Zeit noch unklar. Allerdings konnten in iPS-Zell-basierten Modellsystemen

von HD, PD und Schizophrenie spezifische Phänotypen schon im NSC-Stadium detektiert werden (Brennand *et al.*, 2014; HD Consortium, 2012; Liu *et al.*, 2012b), wohingegen in iPS-Zellen kein Phänotyp beobachtet werden konnte, sodass frühe, neurale Zellerivate für eine *in vitro*-Modellierung zumindest Teilaspekte von Pathomechanismen abbilden können.

#### 4.4 Modulation der Autophagie induziert Ataxin-3-positive NlIs in jungen MJD-Neuronen

Eine quantitative Analyse zur Induktion von Ataxin-3-positiven NlIs in jungen MJD-Neuronen mit ATP, Coffein und DBHQ zeigte eine hohe Variabilität unabhängig vom verwendeten Stimulus. Die Extremwerte lagen bei zwischen 1% und über 80%. Die Unabhängigkeit von funktionellen Rezeptoren in der Zellmembran bei Stimulation mit Coffein oder DBHQ, legte als Ursache für dieses Phänomen Schwankungen im physiologisch-metabolischen Zustand der Zellen nahe, die Auswirkungen auf die Proteindegradationsmaschinerie und damit auf die Aggregation haben können. Die beiden Hauptsysteme der Proteindegradation in eukaryotischen Zellen sind das Proteasom und das Lysosom. Das UPS prozessiert die meisten löslichen, zytosolischen Proteine; allerdings ist das Lysosom in der Lage, mittels Autophagie ebenfalls zytosolische Proteine und Proteinaggregate zu prozessieren. Durch pharmakologische Inhibition der Autophagie mit den PIK3C3-Inhibitoren **3-Methyladenin** (3-MA) und Wortmannin sollte der Einfluss der Autophagie, die in jungen Neuronen als sehr effizient beschrieben worden ist (Boland *et al.*, 2008), auf die Induktion der Ataxin-3-positiven NlIs in jungen MJD-Neuronen untersucht werden. Eine Untersuchung der Kulturen nach vier Tagen Applikation von 3-MA oder Wortmannin zeigte die Präsenz von Ataxin-3-positiven NlIs in  $\beta$ III-Tubulin-positiven Neuronen ohne zusätzlichen Stimulus zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Daneben konnten deutliche Anzeichen von vermehrter Degeneration beobachtet werden, wie fragmentierte Zellkerne und eine Fragmentierung von  $\beta$ III-Tubulin in Neuriten. Dies könnte auf die gleichzeitige Inhibition des für Neurone essentiellen AKT-Signalweges (Datta *et al.*, 1997; Dudek *et al.*, 1997) durch 3-MA und Wortmannin zurückzuführen sein (Petiot *et al.*, 2000). Die Quantifizierung der Ataxin-3-positiven NlIs in mehreren, unabhängigen Experimenten ergab eine konstant hohe Effizienz der Aggregatinduktion durch 3-MA. Der Einsatz eines pharmakologischen Autophagieinhibitors übt demnach einen induzierenden Effekt auf die Genese von Ataxin-3-positiven NlIs in jungen MJD-Neuronen aus. Ein entgegengesetzter Effekt konnte in verschiedenen MJD-Modellsystemen bei Aktivierung der Autophagie beobachtet werden. Die Applikation der Autophagieaktivatoren Lithium, Rapamycin oder Temsirolimus/CCI-779 verringerte die Aggregation von Ataxin-3 in einem zellulären System

(Berger *et al.*, 2006) sowie, zusätzlich zur Aggregation, die neurologischen Symptome in *Drosophila*- und Mausmodellen (Jia *et al.*, 2013; Menzies *et al.*, 2010). Eine Überexpression des für die Autophagie essentiellen BECN1 in einem MJD-Rattenmodell (Nascimento-Ferreira *et al.*, 2011) oder Überexpression einer Reihe weiterer genetischer Modifikatoren der Autophagie in einem Screening in *Drosophila* zeigte ähnliche Effekte wie verringerte Neurodegeneration und Aggregatbildung (Bilen *et al.*, 2007;). Fibroblasten von MJD-Patienten wiesen gegenüber Kontrollen eine verringerte BECN1-Expression auf, und Komponenten der autophagosomalen Maschinerie co-lokalisierten mit aggregiertem Ataxin-3 (Nascimento-Ferreira *et al.*, 2011). Interessant in diesem Kontext ist, dass der für die Detektion der Ataxin-3-positiven NfLs verwendete Antikörper spezifisch die Ataxin-3-Isoform mit drei *ubiquitin interacting motifs* (UIM) erkennt (Schmidt *et al.*, 1998) und diese Isoform die vorwiegend exprimierte Isoform im ZNS darstellt (Harris *et al.*, 2010). Weiterhin wird die 3UIM-Isoform vorwiegend durch Autophagie, die 2UIM-Isoform hingegen über das Proteasom degradiert (Harris *et al.*, 2010). Als Schlussfolgerung aus diesen Befunden würde Autophagieinhibition demnach ein Ansteigen der Konzentration der 3UIM-Isoform von Ataxin-3 durch Inhibition des nativen Degradationsprozesses für diese Isoform induzieren und zusätzlich die Degradation von Ataxin-3-Aggregaten verhindern, die nicht durch das Proteasom prozessiert werden können, was final zur Bildung von Ataxin-3-positiven NfLs führen würde.

Ausgehend von der Erkenntnis, dass pharmakologische Autophagieinhibitoren Ataxin-3-positiv NfLs induzieren können und der Hypothese, dass die Variabilität in der Effizienz der verschiedenen Stimuli auf eine variierende Autophagieaktivität während der Experimente zurückzuführen sein könnte, wurden eine Reihe potentiell inhibierender Modifikationen an der Zusammensetzung des Zellkulturmediums SDM durchgeführt und der Effekt dieser Umstellung auf die Induktion von Ataxin-3-positiven NfLs in jungen MJD-Neuronen untersucht. Die Modifikationen bestanden hierbei aus verschiedenen Kombinationen einer Erhöhung der Konzentration der Wachstumsfaktoren IGF-1 und BDNF, der Depletion von Ascorbinsäure und einer Zugabe von IL-4, dbcAMP und Methylpyruvat zu einer potentiell Autophagie-inhibierenden Medienzusammensetzung. Tatsächlich entstanden Ataxin-3-positiv NfLs in drei der vier gewählten Bedingungen ohne Applikation eines Stimulus zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Depletion von Ascorbinsäure war bei einer niedrigen Konzentration der Wachstumsfaktoren IGF-1 und BDNF essentiell für die Genese von Ataxin-3-positiven NfLs. Dem gegenüber kompensierte eine hohe IGF-1- und BDNF-Konzentration die Supplementierung mit Ascorbinsäure, was in der Induktion von Ataxin-3-positiven NfLs resultierte. Eine Übertragung der effizientesten Kombination zur Induktion von Ataxin-3-positiven NfLs, Bedingung III., auf weitere genetische Hintergründe zeigte eine selektive Induktion von Ataxin-3-positiven NfLs in jungen MJD-Neuronen. Eine Reproduktion

und Quantifizierung offenbarte eine robuste Induktion mit hoher Effizienz in jungen Neuronen der Linie MJD1-9. Demnach kann durch Modulation von mit Autophagieinhibition-assoziierten Signalwegen die Bildung von Ataxin-3-positiven NIs selektiv in jungen MJD-Neuronen induziert werden. Die Klärung des entsprechenden Beitrags der einzelnen Medienkomponenten zu diesem Resultat bedarf weiterer Untersuchungen, wie auch der direkte Nachweis einer Autophagiemodulation. Neben der richtigen Wahl der Mediumzusammensetzung scheint die Detektion der Ataxin-3-positiven NIs an den Tag der Analyse gebunden zu sein, da die Induktion der NIs reversibel und einer Kinetik zu unterliegen scheint. Eine Untersuchung der getesteten Kombinationen an Tag 12 der Differenzierung zeigte die Abwesenheit von Ataxin-3-positiven NIs in den an Tag 8 zuvor positiven Bedingungen I., III. und IV., wohingegen einzelne NIs in der zuvor negativen Bedingung II. zu detektieren waren. Trotz beobachteter, vermehrter Zelldegeneration kann das Fehlen von Neuronen mit Ataxin-3-positiven NIs anhand der verbliebenen vitalen Zellen nicht auf einen selektiven Zelltod und Verlust der Ataxin-3-positiven NIs tragenden Neurone zurückgeführt werden. Durch die hohe Effizienz der Aggregatinduktion müsste der überwiegende Teil der Neurone degeneriert sein, was nicht zu beobachten war. Das Auftreten von Ataxin-3-positiven NIs an Tag 12 in der zuvor negativen Bedingung II. legt die Vermutung nahe, dass durch die initiale Präsenz der die Autophagie unterstützenden Ascorbinsäure die Genese der NIs verzögert wurde. Eine Analyse der Zeitkinetik könnte die Frage klären, ob und wann es ein Maximum von Neuronen mit Ataxin-3-positiven NIs gibt, deren Anzahl danach wieder abnimmt und wie die exakte Kinetik der NIs-Genese beschaffen ist. Als potentielle Ursache für die Reversibilität der Ataxin-3-positiven NIs käme eine Induktion der Autophagie in Betracht. Eine Depletion von Ascorbinsäure ohne alternative Antioxidantien über einen längeren Zeitraum induziert ER-Stress und die *unfolded protein response* (UPR) (Margittai *et al.*, 2005). Eine Initiierung der UPR stimuliert zusätzlich die Autophagie (Ogata *et al.*, 2006), ebenso wie die durch Oxidation induzierte Aktivierung der Proteinkinase *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) die Autophagie induziert (Alexander *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2010). Analyse der Autophagieaktivität sowie von UPR- und ER-Stressmarkern könnte hierüber Aufschluss geben. Eine Aktivierung der Autophagie würde als nativer Degradationsmechanismus der 3UIM-Isoform von Ataxin-3 (Harris *et al.*, 2010) zu einer Verringerung der zellulären Ataxin-3-Konzentration durch verstärkten Abbau und dadurch zu einer verringerten Aggregation führen. Ein Immunblot mit dem spezifischen Antikörper gegen die 3UIM-Isoform könnte zur Detektion einer eventuellen Reduktion der Ataxin-3-Konzentration verwendet werden. Daten aus einem konditionalen HD-Mausmodell legen weiterhin nahe, dass sowohl die neurologischen Symptome als auch das Auftreten von NIs reversibel sind, wenn die Transkription des mutierten Genes inhibiert wird (Martin-Aparicio *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2000), sodass ein steter Flux von neu synthetisiertem

Protein für den Erhalt der NlIs nötig zu sein scheint. Analog dazu könnte eine durch Autophagie vermittelte Abnahme der Ataxin-3-Konzentration zu einer stetigen Degradation und ultimativ zur Dekomposition der Ataxin-3-positiven NlIs führen. Interessanterweise ist die im konditionalen HD-Mausmodell *in vitro* gemessene Kinetik von jeweils drei bis vier Tagen für die Bildung und Degradation von NlIs vergleichbar mit der in dieser Arbeit beobachteten (Abb. 3.23, (B); Martin-Aparicio *et al.*, 2001).

Eine gänzlich andere Ursache für die Reversibilität der Ataxin-3-positiven NlIs könnten die neuronalen Subtypen sein. In MJD degenerieren nicht alle Neurone, und der Abbau der Ataxin-3-positiven NlIs könnte eine kompensatorische Antwort auf akkumulierende Proteine sein, die mit den verwendeten, neuronalen Subtypen assoziiert ist. Die degenerierenden, neuronalen Subtypen in MJD sind spezifisch für die Erkrankung und nicht-degenerierende, den pathologischen Effekten gegenüber resistente Neurone besitzen vermutlich Mechanismen, die diese Resistenz vermitteln bzw. ein Fehlen von für die Sensitivität notwendigen Komponenten. Für eine volle Rekapitulation der Pathologie *in vitro* könnten demnach die degenerierenden, sensitiven neuronalen Subtypen erforderlich sein. Für MJD ist ein spezifischer, für die *in vitro*-Modellierung besonders geeigneter neuronaler Subtyp aufgrund von fehlenden pathologischen Studien schwer zu ermitteln. Dass bestimmte Pathologien allerdings nur in spezifischen Subtypen auftreten ist für viele Erkrankungen bekannt. So konnte z.B. in einem iPS-Modell für ALS in spinalen Motoneuronen ein selektiver Phänotyp in ihrer Neurofilamentstruktur gezeigt werden, der in spinalen Interneuronen nicht auftrat (Chen *et al.*, 2014). Neben den bisher genannten potentiellen Ursachen für die noch unklare Reversibilität der Ataxin-3-positiven NlIs könnten altersabhängige Veränderungen eine Rolle spielen, die in iPS-abgeleiteten Neuronen noch nicht auftreten. Hierzu zählt z.B. eine verstärkte, durch RyR vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER (Thibault *et al.*, 2007). Weiterhin nimmt die PMCA-Aktivität im Alter ab, was zu einer höheren zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und längeren Refraktärzeiten nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt (Hanahisa und Yamaguchi, 2001). Für iPS-abgeleitete dopaminerge Neurone konnte gezeigt werden, dass eine transiente Expression von Progerin, einer trunkierten Form des Lamins A, die mit vorzeitigem Altern assoziiert ist, zur vorzeitigen Induktion altersassoziierter Phänotypen führt (Miller *et al.*, 2013). Es wäre interessant zu untersuchen, ob eine transiente Expression von Progerin und ein derart simulierter Alterungsprozess in jungen MJD-Neuronen modulierend auf die Induktion und Stabilität der Ataxin-3-positiven NlIs wirkt und ob dies im positiven Fall auf eine Reduktion der Autophagie zurückzuführen ist.

Unabhängig davon welcher Mechanismus ursächlich für die Reversibilität der Aggregation ist, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch eine Modulation von Autophagie-assoziierten Signalwegen Ataxin-3-positive NlIs in jungen MJD-Neuronen induziert werden können und die Regulation der Autophagie potentiell eine zentrale Rolle bei

der Aggregation von Ataxin-3 spielen könnte. Zur Klärung dieser Hypothese sind Experimente nötig, die die Autophagieaktivität direkt während der Aggregatinduktion messen, wozu Reportersysteme und Markeranalysen erforderlich sind (Übersicht: Klionsky *et al.*, 2012).

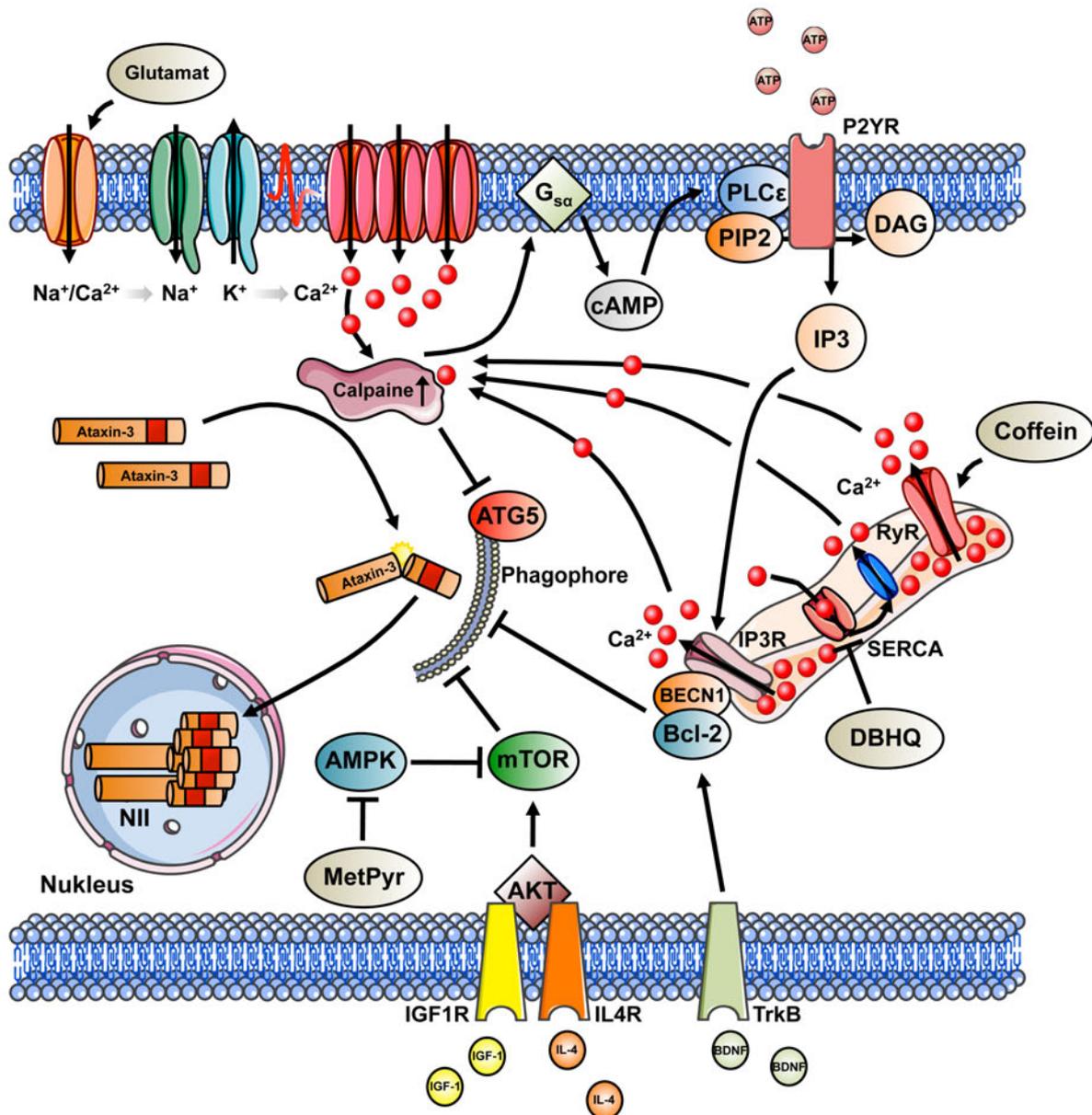
## 4.5 $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Calpainaktivität und Autophagie

Im folgenden Kapitel soll ein hypothetisches Modell entwickelt werden, das die Ergebnisse dieser Arbeit mit Literaturdaten verknüpft und durch eine Verbindung von Calpainaktivität und Autophagie einen Erklärungsansatz für die Pathologie von MJD bieten könnte. Die Genese von Ataxin-3-positiven NIs kann durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER induziert werden, allerdings scheint die Effizienz dieser Induktion von der Autophagieaktivität der Neurone abzuhängen. Eine Justierung der Kulturbedingungen in Richtung Autophagieinhibition induzierte auch ohne zusätzliche Stimulation eines zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs die Bildung von Ataxin-3-positiven NIs, was auf einen möglichen Crosstalk zwischen Autophagie und Calpainaktivität hindeuten könnte.

Der durch aktivierte, spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx ist essentiell für die Mikroaggregation von Ataxin-3 in MJD-Neuronen (Abb. 4.1; Koch *et al.*, 2011). In einem Screening für Autophagie-induzierende Substanzen wurden die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Inhibitoren Amiodaron, Niguldipin, Loperamid, Pimozid und Nicardipin identifiziert (Zhang *et al.*, 2007). In einer weiteren Studie wurden ebenfalls Amiodaron und Loperamid und zusätzlich Verapamil, Nimodipine und Nitrendipine, die auch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle inhibieren, als Autophagie-induzierend beschrieben (Williams *et al.*, 2008). Dies deutet darauf hin, dass umgekehrt ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch Depolarisation die Autophagie inhibiert und dies zur Bildung von Mikroaggregaten führen könnte. Calpeptin und ALLN inhibieren die Bildung von Ataxin-3-positiven-Mikroaggregaten nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, was durch eine Inhibition der Proteolyse von Ataxin-3 durch Calpaine begründet wurde (Abb. 4.2; Koch *et al.*, 2011). Calpeptin (Palomo *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2008) und ALLN (Williams *et al.*, 2008) wurden jedoch ebenfalls als Autophagie-induzierend beschrieben, ebenso wie eine Überexpression des zellulären Calpaininhibitors Calpastatin (Williams *et al.*, 2008). Die Prävention der Mikroaggregatbildung durch ALLN und Calpeptin könnte demnach auch auf eine Aktivierung der Autophagie zurückzuführen sein. Weiterhin bildet die durch Calpaine vermittelte Proteolyse des proautophagosomalen Proteins ATG5, das dadurch seine Funktion bei der Bildung der Phagophore einbüsst, eine direkte Verbindung von Calpainaktivität und Autophagieinhibition (Abb. 4.3; Xia *et al.*, 2010; Yousefi *et al.*, 2006). Die potentielle Relevanz dieses Befundes wird dadurch untermauert, dass ein *knockout* von ATG5 im ZNS zu Neurodegeneration und Ubiquitin-positiven

Inklusionen führt (Hara *et al.*, 2006).

Ein durch ATP-vermittelte P2YR-Aktivierung induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Austrom aus dem ER führte zur Bildung von Mikroaggregaten und Ataxin-3-positiven NIIs (Abb. 4.2). Eine



**Abb. 4.3: Modell zum hypothetischen Zusammenwirken von Calpainaktivität und Autophagieinhibition bei der Aggregation von Ataxin-3**

Erhöhung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch diverse Stimuli führt zu Calpainaktivierung und proteolytischer Spaltung von Ataxin-3, dessen Aggregationspotential dadurch steigt. Calpain proteolytisch spaltet zusätzlich ATG5 und inhibiert auf diesem Weg direkt die Autophagie. Zusätzlich wird durch eine Calpain-vermittelte Spaltung und Aktivierung von  $G_{s\alpha}$ -Protein die Synthese von cAMP induziert. cAMP aktiviert wiederum über Epac und Rap2B (nicht dargestellt) die Phospholipase  $C_{\epsilon}$  (PLC $\epsilon$ ), die IP3 synthetisiert. IP3 Bindung an den IP3R stabilisiert die Bindung von BECN1 an IP3R und inhibiert die Bildung der Phagophore. Weiterhin induziert IP3 eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER, welche wiederum Calpain aktiviert und damit einen Feedback-Loop bildet. Bindung von BDNF an die *neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2* (NTRK2; TrkB) stabilisiert den Komplex Bcl-2-BECN1-IP3R, verhindert eine Dissoziation des BECN1, das somit nicht zur Bildung der Phagophore zur Verfügung steht und die Autophagie unterdrückt. Aktivierung von mTOR durch IGF-1 und IL-4 vermitteltes AKT1-Signal und Prävention einer mTOR-Inhibition durch die AMPK1 mittels Methylpyruvat (MetPyr) inhibiert die Autophagie. Zusammen resultiert die proteolytische Spaltung von Ataxin-3 in Kombination mit Autophagieinhibition in der Ausbildung Ataxin-3-positiver neuronaler intranukleärer Inklusionen (NII). Graphik verändert nach Koch *et al.*, 2011 und Renna *et al.*, 2010. PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; DAG = Diacylglycerin.

Erhöhung der intrazellulären IP3-Konzentration durch  $G_{q11}$ -gekoppelte Rezeptoren wie P2YR induziert nicht nur eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER, sondern stabilisiert auch die Bindung des für die Bildung der Phagophore essentiellen Proteins BECN1 an den IP3R und inhibiert dadurch die Autophagie (Abb. 4.3; Vicencio *et al.*, 2009). Für die Pathologie ist in diesem Zusammenhang interessant, dass expandiertes Ataxin-3 durch Bindung an den IP3R eine erhöhte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem ER ins Zytosol induziert (Chen *et al.*, 2008a), was zu einer verstärkten Bindung von BECN1 an den IP3R und einer Inhibition der Autophagie führen würde. Diese erhöhte Freisetzung kann durch Dantrolen *in vitro* und *in vivo* kompensiert werden, obwohl Dantrolen die RyR und nicht die IP3R inhibiert, und resultiert in einer Reduktion neurologischer Symptome (Chen *et al.* 2008). In einer unlängst publizierten Studie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Dantrolen als RyR-Inhibitor neben seiner  $Ca^{2+}$ -stabilisierenden Funktion die Autophagie induziert (Ansari *et al.*, 2014). Dies wäre in Übereinstimmung mit der Coffein-vermittelten Bildung von Ataxin-3-positiven NILs, bei der Coffein die RyR stimuliert. Umgekehrt zur Autophagieinhibition durch eine Erhöhung der IP3-Konzentration induziert eine Inhibition der Inositolmonophosphatase (IMPase) durch Blockade der IP3-Produktion die Autophagie (Sarkar *et al.*, 2005), wie auch eine Inhibition des IP3R die Autophagie aktiviert (Criollo *et al.*, 2007). Die Bildung von Ataxin-3-positiven NILs nach IP3- oder Coffein- vermittelter  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER könnte demnach auf Inhibition der Autophagie und nicht ausschließlich auf eine erhöhte Calpainaktivität zurückzuführen sein. In Übereinstimmung mit einer Autophagie-inhibierenden Wirkung eines  $Ca^{2+}$ -Austroms aus dem ER ist für den in dieser Arbeit verwendeten, reversiblen SERCA-Inhibitor DBHQ, der eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER und Ataxin-3-positiv NILs induziert (Abb. 4.2), ebenfalls eine Autophagie-inhibierende Wirkung beschrieben (Gordon *et al.*, 1993). Williams und Kollegen konnten zudem eindrucksvoll darstellen, dass ein zyklischer, die Autophagie inhibierender Signalweg existiert, der  $Ca^{2+}$ , Calpaine und IP3-Konzentration miteinander in Beziehung setzt. Die Blockade einer der Komponenten des Signalweges führte zu einer Induktion der Autophagie, wobei die Inhibition weiterer Komponenten einen additiven Effekt hatte (Williams *et al.*, 2008; Übersicht: Renna *et al.*, 2010).

Somit lässt sich theoretisch eine Verbindung von Calpain-vermittelter Proteolyse von Ataxin-3 und daraus resultierender Aggregation und einer durch Autophagieinhibition induzierten Aggregation herstellen. Vermutlich trägt sowohl die Proteolyse von Ataxin-3 als auch eine niedrige Autophagieaktivität zur Genese von Ataxin-3-positiven NILs bei. Für eine potentielle Therapie wäre dies sogar von Vorteil, da mit einer Calpaininhibition direkt beide für die Aggregation essentiellen Mechanismen angegangen werden können. In Übereinstimmung zu dieser Überlegung reduzierte eine Calpastatin-Überexpression im Mausmodell nicht nur Calpain-prozessierte Ataxin-3-Fragmente, sondern ebenfalls Ataxin-3 der vollen Länge (Simoes *et al.*, 2014), was auf eine erhöhte Autophagie schließen lässt. Ein

direkter Bezug von Calpastatin-Überexpression zur Autophagie konnte kürzlich in einem *Drosophila*- und Mausmodell für HD gezeigt werden. Calpastatin-Überexpression induzierte die Autophagie, reduzierte deutlich die Aggregation von HTT in Nlls und milderte die Symptome im Vergleich zu nicht-Calpastatin-überexprimierenden HD-Kontrollen (Menzies *et al.*, 2014).

Für die Aggregation von Ataxin-3 in der Pathogenese von MJD ergibt sich somit ein mögliches Bild, in dem viele verschiedene Signalwege auf der Ebene der Calpain- und Autophagieaktivität zusammenwirken (Abb. 4.3) und bei dem eine altersassoziierte Missregulation der Calciumhomöostase (Hanahisa und Yamaguchi, 2001; Liu *et al.*, 2012a; Thibault *et al.*, 2007) schließlich in der Manifestation der Pathologie mündet. Da die für dieses Modell aufgezeigten potentiellen Interaktionen sich aus Befunden in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen zusammensetzen, müsste die tatsächliche Relevanz der skizzierten Zusammenhänge in humanen Neuronen mit Hilfe geeigneter Reportersysteme und Aktivitätstest validiert werden.

## 4.6 Ausblick

Zur Krankheitsmodellierung von monogenetischen Erkrankungen müssen zur Zeit parallel mehrere Kontroll- und Patienten-iPS-Linien verwendet werden, um sicherzustellen, dass ein beobachteter Phänotyp spezifisch durch die Mutation und nicht eventuell durch genetische Variabilität hervorgerufen wird. Die Verwendung eines isogenen Systems würde die Variabilität zwischen Kontroll- und Patientenlinie umgehen und die Anzahl der benötigten Linien minimieren. Mit Etablierung der TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*)- und der noch effektiveren CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated*)-Technologie zur homologen Rekombination im Feld der pluripotenten Stammzellen, stehen neuerdings Methoden zur Verfügung, die die Generierung isogener Paare, bei denen der Polyglutaminbereich in Patientenzellen verkürzt bzw. in Kontrollzellen verlängert ist, vereinfachen (Cong *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2013; Hockemeyer *et al.*, 2011; Mali *et al.*, 2013).

Bislang wurde die Bildung von Ataxin-3-positiven NlIs intensiv nur in jungen MJD-Neuronen untersucht und es stellt sich die Frage, ob NlIs auch in reiferen Kulturen induziert werden können. Hierzu könnten die nun entwickelten Medienbedingungen, die die Bildung von Ataxin-3-positiven NlIs begünstigen, an reiferen Neuronen untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte allerdings geklärt werden, inwieweit die Unterschiede in den Zelldichten zwischen unreifen und reifen Kulturen einen Einfluss auf die Bildung von NlIs haben. In unreifen Kulturen beträgt die Zellzahl pro 3,5 cm-Schale ca. 1 Million bei der Stimulation, während sie in reifen Kulturen ca. 3 – 4 Millionen beträgt. Für andere Zellsysteme konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung von Zellen in hoher Dichte unter normoxischen Bedingungen in einem Verhältnis der HIF1A/HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia induced factors*) resultiert, welches vergleichbar zu Zellen mit geringer Dichte unter hypoxischen Bedingungen ist und dadurch Autophagie aktiviert wird (Bellot *et al.*, 2009; Dayan *et al.*, 2009). Für die Induktion von Ataxin-3-positiven NlIs in reifen MJD-Neuronen könnte deswegen eventuell eine Vereinzellung und Replattierung von reifen, neuronalen Kulturen in einer geringeren Dichte notwendig sein. Zudem wäre die Verwendung alternativer Stimuli anstelle von Glutamat ein potentieller Ansatz, um NlIs in reifen Kulturen zu induzieren. Weiterhin könnte über die Verwendung einer niedrigen Konzentration Coffein in Kombination mit Glutamatstimulation gleichzeitig ein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom von außen und Ca<sup>2+</sup>-Austrom aus dem ER induziert werden, was potentiell in einer Verstärkung des Stimulus resultieren würde (Solovyova *et al.*, 2002; Verkhatsky, 2005) und die Bildung von Ataxin-3-positiven NlIs bewirken könnte. Vorausgesetzt, dass sich NlIs in reiferen Neuronen induzieren lassen, könnten sich Fragen zur Stabilität und zu einer in jungen Neuronen nicht beobachteten

Toxizität der NlIs untersuchen lassen. Alternativ könnte auch versucht werden, NlIs bereits in jungen Neuronen zu installieren und die Zellen dann ausreifen zu lassen, um auf diese Weise die Langzeitauswirkungen der Aggregate zu studieren.

Um die in der Arbeit vermutete Inhibition des autophagischen Flux durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  und die Mediumkomponenten tatsächlich nachzuweisen, ist eine Analyse der Konversion des LC3-I zu LC3-II per Immunoblot oder eine Fluoreszenzzeitmessung über das Reporterkonstrukt RFP-GFP-LC3 erforderlich (Kimura *et al.*, 2007; Klionsky *et al.*, 2012). Zusätzlich würde ein *knockdown* oder *knockout* der Autophagiegene ATG5 oder ATG7 eine spezifischere Autophagieinhibition als die pharmakologischen Inhibitoren bieten. Falls unter diesen Bedingungen eine Induktion Ataxin-3-positiver SDS-unlöslicher Aggregate bzw. NlIs erfolgt, würde dies für einen direkten Einfluss der Autophagie sprechen.

Unter Kapitel 4.5 wurde der Frage nachgegangen, wie sich die Befunde von Koch *et al.*, 2011 und dieser Arbeit in einen gemeinsamen Kontext stellen lassen, und ausgeführt, dass die Rollen von Calpainen und der Autophagie in MJD schwer voneinander zu trennen sind. Zur Untersuchung, ob die Glutamat-, ATP-, Coffein und DBHQ-Stimulation in MJD-Neuronen neben Calpainaktivierung auch die Autophagie inhibiert, könnte eine Blockade des zyklischen Calpain-Autophagie-Signalwegs durch Inhibition des *downstream* von Calpain liegenden  $\text{G}_{\text{sa}}$ -Proteins mit 2',5'-Dideoxyadenosine durchgeführt werden (Williams *et al.*, 2008). Bei einer Interaktion von Calpainaktivität und Autophagieinhibition würde so die Bildung von SDS-unlöslichen Aggregaten und NlIs inhibiert. Ebenso könnte die Applikation von Autophagie-stimulierenden Substanzen wie Rapamycin (Ravikumar *et al.*, 2004) und Trehalose (Sarkar *et al.*, 2007) die Fragestellung adressieren, ob Autophagiestimulation zu einem Ausbleiben der SDS-unlöslichen Aggregate und NlIs führen und damit eine potentielle Behandlung darstellen könnte. Weiterhin könnte untersucht werden, ob eine pharmakologische Autophagieinhibition mit 3-Methyladenin SDS-unlösliche Ataxin-3-positive Aggregate in reifen Neuronen induziert. Dies wäre ein denkbare Experiment, um eingehender das Zusammenspiel von Exzitations-induzierter Aggregation,  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und Autophagie in reifen Neuronen zu untersuchen.

Die Detektion von Ataxin-3-positiven NlIs ist auf fixierte Zellen angewiesen, so dass Fragen zur Dynamik der Aggregatbildung bzw. -abbau nur durch aufwändige Experimente beantwortet werden können. Eine mögliche Vereinfachung wäre hier der Einsatz eines Q16-GFP-Reporterkonstruktes, das über seinen Polyglutaminbereich mit NlIs von expandiertem Ataxin-1 co-aggregiert, aber von sich aus keine Aggregate bildet (Verhoef *et al.*, 2002). Mit einem derartigen Reportersystem versehene MJD Neurone könnten möglicherweise im Rahmen pharmakologischer Wirkstoffscreenings eingesetzt werden, um aggregationshemmende, therapeutisch wirksame Substanzen zu identifizieren.

## 5. Zusammenfassung

Die Machado-Joseph Erkrankung (MJD; Spinozerebelläre Ataxie Typ 3), ist die häufigste Form der hereditären, monogenetischen spinozerebellären Ataxien in Europa, Japan und den USA. Bei MJD ist der C-terminale Polyglutaminbereich des Ataxin-3 Proteins expandiert, was beim betroffenen Patienten zu Ataxin-3-positiven, SDS-unlöslichen Mikroaggregaten und neuronalen, intranukleären Inklusionen (NII) führt. Die Erforschung und Modellierung von MJD *in vitro* ist durch die geringe Verfügbarkeit von Patientengewebe limitiert und bislang meist auf die Verwendung von Tiermodellen bzw. nicht-neuronalen, artifiziellen Überexpressionssystemen beschränkt. Diese Limitierung könnte durch den Einsatz von induziert pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) und davon abgeleiteten neuroepithelialen Stammzellen (It-NES-Zellen) überwunden werden, da so eine nahezu unbegrenzte Quelle für Patienten-spezifische Neurone zur Verfügung steht. Im Rahmen dieser Dissertation wurden daher dermale Fibroblasten von vier MJD-Patienten sowie der gesunde Bruder bzw. Vater jeweils eines Patienten mittels retroviraler Transduktion der Faktoren OCT4, SOX2, c-MYC und KLF4 reprogrammiert und je zwei iPS-Zelllinien pro Individuum eingehend charakterisiert. Alle Linien exprimierten die Pluripotenzmarker TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA3, SSEA4 und alkalische Phosphatase, zeigten eine Inaktivierung der inserierten Transgene und waren in der Lage *in vitro* und *in vivo* spontan in Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Hochauflösende SNP Genotypisierungsanalysen zeigten, dass nahezu alle Linien frei von größeren genomischen Aberrationen waren. Die iPS-Zellen wurden dann in neurale Stammzellen differenziert. Alle abgeleiteten It-NES-Zelllinien zeigten ein charakteristisches Wachstumsmuster mit apikaler Lokalisation von ZO-1 sowie die Expression der neuralen Vorläufermarker SOX2, Nestin, DACH1 und PLZF. Nach Differenzierung bildeten die Zellen effizient Neurone und Gliazellen.

Eine Glutamat-stimulierte Exzitation von 4 – 6 Wochen alten Differenzierungskulturen induzierte selektiv in MJD-Neuronen Ataxin-3-positive SDS-unlösliche Aggregate, deren Bildung durch Calpaininhibitoren verhindert werden konnte. Des Weiteren führte eine Chelatierung extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, Inhibition der Membrandepolarisation oder eine Blockade spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu einer Inhibition der Aggregatbildung. Da die Reifung von funktionellen Glutamatrezeptoren viele Wochen in Anspruch nimmt, wurden alternative Stimuli untersucht, die innerhalb eines verkürzten Zeitrahmens mittels zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs Aggregate induzieren können. Die Applikation von ATP zu zwei bis vier Tage alten Differenzierungskulturen induzierte einen über P2Y-Rezeptoren vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), was ausschließlich in jungen MJD-Neuronen zur Bildung von SDS-unlöslichen Aggregaten führte. Zusätzlich konnten nach sechs bis acht Tagen Ataxin-3-positive NIIs detektiert werden, die zudem mit

Ubiquitin co-lokalisierten, ein histopathologisches Schlüsselmerkmal von MJD. Ein durch Coffein oder sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA)-Inhibition vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Austrom aus dem ER induzierte ebenfalls Ataxin-3-positive NIs in jungen MJD-Neuronen, bei letzterem Stimulus in über 80% der  $\beta$ III-Tubulin-positiven Zellen. Zwischen einzelnen Experimenten unterlag die Effizienz der NI-Bildung einer hohen Variabilität, die unabhängig von den verwendeten Stimuli auftrat. Daraus ergab sich die Hypothese, dass Schwankungen in den Kultur- und Medienbedingungen Einfluss auf die Proteinhomöostase nehmen und den Abbau von Aggregaten durch Stimulation des Proteasoms oder der Autophagie bedingen könnten. Tatsächlich induzierten pharmakologische Autophagieinhibitoren die Bildung von NIs in jungen MJD-Neuronen. Eine Analyse der Medienkomponenten auf potentiell Autophagie-begünstigende Substanzen ergab, dass einzelne Komponenten wie z.B. Ascorbinsäure, als Autophagie-induzierend beschrieben wurden. Die Eliminierung dieser Komponenten, sowie eine Konzentrationserhöhung potentiell Autophagie-inhibierender Substanzen (BDNF und IGF-1), und Zugabe weiterer potentiell negativer Modulatoren der Autophagie (dbcAMP, IL-4, Methylpyruvat) führte innerhalb von acht Tagen zu Ataxin-3-positiven NIs, ohne dass eine weitere Stimulation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Austroms aus dem ER dafür benötigt wurde.

Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass *in vitro* innerhalb weniger Tage in MJD-Neuronen mikroskopisch nachweisbare, Pathologie-assoziierte Proteinaggregate induziert werden können, die *in vivo* erst nach mehreren Dekaden auftreten. Die hier an Patienten-Neuronen gewonnen Einsichten zur Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ , Calpainen und potentiell Autophagie-regulierender Signalwege bei der Aggregatbildung bieten somit möglicherweise eine wichtige Grundlage für die Identifizierung aggregationsmodulierender, therapeutischer Wirkstoffe. Die Erkenntnisse zum Einfluss der Medienbedingungen auf die Autophagie besitzen zudem eine generelle Bedeutung für iPS-Zell-basierte *in vitro*-Modelle, bei denen die Proteinhomöostase oder Aggregationsprozesse untersucht werden sollen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., *et al.* (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284.
- Abbracchio, M.P., and Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64, 445-475.
- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., *et al.* (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58, 281-341.
- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32, 19-29.
- Abyzov, A., Mariani, J., Palejev, D., Zhang, Y., Haney, M.S., Tomasini, L., Ferrandino, A.F., Rosenberg Belmaker, L.A., Szekeley, A., Wilson, M., *et al.* (2012). Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature* 492, 438-442.
- Agarwal, S., Loh, Y.H., McLoughlin, E.M., Huang, J., Park, I.H., Miller, J.D., Huo, H., Okuka, M., Dos Reis, R.M., Loewer, S., *et al.* (2010). Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature* 464, 292-296.
- Ahlberg, J., Marzella, L., and Glaumann, H. (1982). Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis. *Lab Invest* 47, 523-532.
- Alba, M.M., and Guigo, R. (2004). Comparative analysis of amino acid repeats in rodents and humans. *Genome Res* 14, 549-554.
- Albrecht, M., Golatta, M., Wullner, U., and Lengauer, T. (2004). Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *Eur J Biochem* 271, 3155-3170.
- Alexander, A., Cai, S.L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K.H., Inoki, K., Guan, K.L., Shen, J., Person, M.D., *et al.* (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4153-4158.
- Allsopp, T.E., Kiselev, S., Wyatt, S., and Davies, A.M. (1995). Role of Bcl-2 in the brain-derived neurotrophic factor survival response. *Eur J Neurosci* 7, 1266-1272.
- Allsopp, T.E., Wyatt, S., Paterson, H.F., and Davies, A.M. (1993). The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73, 295-307.
- Alonso, E., Martinez-Ruano, L., De Biase, I., Mader, C., Ochoa, A., Yescas, P., Gutierrez, R., White, M., Ruano, L., Fragoso-Benitez, M., *et al.* (2007). Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov Disord* 22, 1050-1053.
- Alves, S., Regulier, E., Nascimento-Ferreira, I., Hassig, R., Dufour, N., Koeppen, A., Carvalho, A.L., Simoes, S., de Lima, M.C., Brouillet, E., *et al.* (2008). Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 17, 2071-2083.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227, 271-278.
- Amit, M., and Itskovitz-Eldor, J. (2002). Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 200, 225-232.
- Andrews, P.W., Banting, G., Damjanov, I., Arnaud, D., and Avner, P. (1984). Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma* 3, 347-361.
- Ansari, N., Hadi-Alijanvand, H., Sabbaghian, M., Kiaei, M., and Khodaghali, F. (2014). Interaction of 2-APB, dantrolene, and TDMT with IP3R and RyR modulates ER stress-induced programmed cell death I and II in neuron-like PC12 cells: an experimental and computational investigation. *J Biomol Struct Dyn* 32, 1211-1230.
- Antony, P.M., Mantele, S., Mollenkopf, P., Boy, J., Kehlenbach, R.H., Riess, O., and Schmidt, T. (2009). Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis* 36, 280-292.
- Anwyl, R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 29, 83-120.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., and Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431, 805-810.
- Arstila, A.U., and Trump, B.F. (1968). Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am J Pathol* 53, 687-733.

- Arthur, D.B., Akassoglou, K., and Insel, P.A. (2005). P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19138-19143.
- Artola, A., and Singer, W. (1987). Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* 330, 649-652.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17, 126-140.
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., and Adjaye, J. (2007). Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 500-510.
- Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K., and Surani, M.A. (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 461, 1292-1295.
- Bar-Nur, O., Russ, H.A., Efrat, S., and Benvenisty, N. (2011). Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* 9, 17-23.
- Bardoni, R., Goldstein, P.A., Lee, C.J., Gu, J.G., and MacDermott, A.B. (1997). ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* 17, 5297-5304.
- Barker, J.L., Dufy, B., Owen, D.G., and Segal, M. (1983). Excitable membrane properties of cultured central nervous system neurons and clonal pituitary cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 1, 259-268.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 29, 2570-2581.
- Ben-Yosef, D., Malcov, M., and Eiges, R. (2008). PGD-derived human embryonic stem cell lines as a powerful tool for the study of human genetic disorders. *Mol Cell Endocrinol* 282, 153-158.
- Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F.M., Oroz, L.G., Underwood, B.R., Pangalos, M.N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B.O., O'Kane, C.J., *et al.* (2006). Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet* 15, 433-442.
- Berke, S.J., Chai, Y., Marrs, G.L., Wen, H., and Paulson, H.L. (2005). Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. *J Biol Chem* 280, 32026-32034.
- Berke, S.J., and Paulson, H.L. (2003). Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPER hand on neurodegeneration. *Curr Opin Genet Dev* 13, 253-261.
- Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21, 13-26.
- Bettencourt, B.R., Hogan, C.C., and Nimali, M. (2007). Polyglutamine expansion in *Drosophila*: thermal stress and Hsp70 as selective agents. *J Biosci* 32, 537-547.
- Bettencourt, C., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J., and Lima, M. (2008). Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *J Hum Genet* 53, 920-923.
- Bhattacharyya, A., Thakur, A.K., Chellgren, V.M., Thiagarajan, G., Williams, A.D., Chellgren, B.W., Creamer, T.P., and Wetzel, R. (2006). Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. *J Mol Biol* 355, 524-535.
- Bichelmeier, U., Schmidt, T., Hubener, J., Boy, J., Ruttiger, L., Habig, K., Poths, S., Bonin, M., Knipper, M., Schmidt, W.J., *et al.* (2007). Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci* 27, 7418-7428.
- Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., and Uyeda, C.T. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43, 429-435.
- Bilen, J., and Bonini, N.M. (2007). Genome-wide screen for modifiers of ataxin-3 neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet* 3, 1950-1964.
- Blommaert, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelarova, H., and Meijer, A.J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 243, 240-246.
- Bockaert, J., Pin, J., and Fagni, L. (1993). Metabotropic glutamate receptors: an original family of G protein-coupled receptors. *Fundam Clin Pharmacol* 7, 473-485.
- Boeddrich, A., Gaumer, S., Haacke, A., Tzvetkov, N., Albrecht, M., Evert, B.O., Muller, E.C., Lurz, R., Breuer, P., Schugardt, N., *et al.* (2006). An arginine/lysine-rich motif is crucial for VCP/p97-mediated modulation of ataxin-3 fibrillogenesis. *EMBO J* 25, 1547-1558.
- Boiani, M., and Scholer, H.R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 872-884.
- Bongaerts, G.P., and Severijnen, R.S. (2007). Stem cells from residual IVF-embryos - Continuation of life justifies isolation. *Med Hypotheses* 69, 478-480.

- Borghese, L., Dolezalova, D., Opitz, T., Haupt, S., Leinhaas, A., Steinfarz, B., Koch, P., Edenhofer, F., Hampl, A., and Brustle, O. (2010). Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo. *Stem Cells* 28, 955-964.
- Bottenstein, J.E., and Harvey, A.L. (1985). *Cell Culture in the Neurosciences*. Plenum Press: New York and London, 3.
- Boulting, G.L., Kiskinis, E., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., Wainger, B.J., Williams, D.J., Kahler, D.J., Yamaki, M., Davidow, L., *et al.* (2011). A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 279-286.
- Bourguignon, L.Y., Peyrollier, K., Xia, W., and Gilad, E. (2008). Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J Biol Chem* 283, 17635-17651.
- Boy, J., Schmidt, T., Schumann, U., Grasshoff, U., Unser, S., Holzmann, C., Schmitt, I., Karl, T., Laccone, F., Wolburg, H., *et al.* (2009). A transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 resembling late disease onset and gender-specific instability of CAG repeats. *Neurobiol Dis* 37, 284-293.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Brake, A.J., Wagenbach, M.J., and Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371, 519-523.
- Brennand, K., Savas, J.N., Kim, Y., Tran, N., Simone, A., Hashimoto-Torii, K., Beaumont, K.G., Kim, H.J., Topol, A., Ladrán, I., *et al.* (2014). Phenotypic differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry*.
- Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., *et al.* (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191-195.
- Brusco, A., Gellera, C., Cagnoli, C., Saluto, A., Castucci, A., Michielotto, C., Fetoni, V., Mariotti, C., Migone, N., Di Donato, S., *et al.* (2004). Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol* 61, 727-733.
- Bryer, A., Krause, A., Bill, P., Davids, V., Bryant, D., Butler, J., Heckmann, J., Ramesar, R., and Greenberg, J. (2003). The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. *J Neurol Sci* 216, 47-54.
- Burk, K., Globas, C., Bosch, S., Klockgether, T., Zuhlke, C., Daum, I., and Dichgans, J. (2003). Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. *J Neurol* 250, 207-211.
- Burnett, B., Li, F., and Pittman, R.N. (2003). The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet* 12, 3195-3205.
- Burnett, B.G., and Pittman, R.N. (2005). The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4330-4335.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24, 509-581.
- Burnstock, G. (1976). Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1, 239-248.
- Burnstock, G. (2004). Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 4, 47-52.
- Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87, 659-797.
- Butland, S.L., Devon, R.S., Huang, Y., Mead, C.L., Meynert, A.M., Neal, S.J., Lee, S.S., Wilkinson, A., Yang, G.S., Yuen, M.M., *et al.* (2007). CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome. *BMC Genomics* 8, 126.
- Caccamo, D., Katsetos, C.D., Herman, M.M., Frankfurter, A., Collins, V.P., and Rubinstein, L.J. (1989). Immunohistochemistry of a spontaneous murine ovarian teratoma with neuroepithelial differentiation. Neuron-associated beta-tubulin as a marker for primitive neuroepithelium. *Lab Invest* 60, 390-398.
- Camden, J.M., Schrader, A.M., Camden, R.E., Gonzalez, F.A., Erb, L., Seye, C.I., and Weisman, G.A. (2005). P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* 280, 18696-18702.
- Camello, C., Lomax, R., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (2002). Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium* 32, 355-361.
- Cancel, G., Abbas, N., Stevanin, G., Durr, A., Chneiweiss, H., Neri, C., Duyckaerts, C., Penet, C., Cann, H.M., Agid, Y., *et al.* (1995). Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus. *Am J Hum Genet* 57, 809-816.
- Cao, F., Levine, J.J., Li, S.H., and Li, X.J. (2001). Nuclear aggregation of huntingtin is not prevented by deletion of chaperone Hsp104. *Biochim Biophys Acta* 1537, 158-166.
- Carvalho, D.R., La Rocque-Ferreira, A., Rizzo, I.M., Imamura, E.U., and Speck-Martins, C.E. (2008). Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol* 38, 296-299.

- Cecchi, C., Pensalfini, A., Liguri, G., Baglioni, S., Fiorillo, C., Guadagna, S., Zampagni, M., Formigli, L., Nosi, D., and Stefani, M. (2008). Differentiation increases the resistance of neuronal cells to amyloid toxicity. *Neurochem Res* 33, 2516-2531.
- Chai, Y., Berke, S.S., Cohen, R.E., and Paulson, H.L. (2004). Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem* 279, 3605-3611.
- Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Bonini, N.M., and Paulson, H.L. (1999a). Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci* 19, 10338-10347.
- Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Shoesmith, S.J., Perez, M.K., and Paulson, H.L. (1999b). Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. *Hum Mol Genet* 8, 673-682.
- Chai, Y., Shao, J., Miller, V.M., Williams, A., and Paulson, H.L. (2002). Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9310-9315.
- Chai, Y., Wu, L., Griffin, J.D., and Paulson, H.L. (2001). The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *J Biol Chem* 276, 44889-44897.
- Chakiath, C.S., and Esposito, D. (2007). Improved recombinational stability of lentiviral expression vectors using reduced-genome *Escherichia coli*. *Biotechniques* 43, 466, 468, 470.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230-1234.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275-280.
- Chambers, S.M., Qi, Y., Mica, Y., Lee, G., Zhang, X.J., Niu, L., Bilsland, J., Cao, L., Stevens, E., Whiting, P., *et al.* (2012). Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat Biotechnol* 30, 715-720.
- Chan, E.Y., Longatti, A., McKnight, N.C., and Tooze, S.A. (2009a). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 29, 157-171.
- Chan, E.M., Ratanasirintrao, S., Park, I.H., Manos, P.D., Loh, Y.H., Huo, H., Miller, J.D., Hartung, O., Rho, J., Ince, T.A., *et al.* (2009b). Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 27, 1033-1037.
- Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., Blackburn, L.W.t., Huang, C.L., Errigo, A., Yin, Y., *et al.* (2014). Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell* 14, 796-809.
- Chen, X., Tang, T.S., Tu, H., Nelson, O., Pook, M., Hammer, R., Nukina, N., and Bezprozvany, I. (2008a). Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci* 28, 12713-12724.
- Chen, X., Vega, V.B., and Ng, H.H. (2008b). Transcriptional regulatory networks in embryonic stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 203-209.
- Chen, X., Wu, J., Lvovskaya, S., Herndon, E., Supnet, C., and Bezprozvany, I. (2011). Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model. *Mol Neurodegener* 6, 81.
- Cheng, L., Hansen, N.F., Zhao, L., Du, Y., Zou, C., Donovan, F.X., Chou, B.K., Zhou, G., Li, S., Dowey, S.N., *et al.* (2012). Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell* 10, 337-344.
- Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C., and Thompson, C.B. (2011). Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11121-11126.
- Chessell, I.P., Michel, A.D., and Humphrey, P.P. (1997). Functional evidence for multiple purinoceptor subtypes in the rat medial vestibular nucleus. *Neuroscience* 77, 783-791.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., *et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111-123.
- Chou, A.H., Yeh, T.H., Kuo, Y.L., Kao, Y.C., Jou, M.J., Hsu, C.Y., Tsai, S.R., Kakizuka, A., and Wang, H.L. (2006). Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL. *Neurobiol Dis* 21, 333-345.
- Chou, A.H., Yeh, T.H., Ouyang, P., Chen, Y.L., Chen, S.Y., and Wang, H.L. (2008). Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol Dis* 31, 89-101.

- Chow, M.K., Mackay, J.P., Whisstock, J.C., Scanlon, M.J., and Bottomley, S.P. (2004). Structural and functional analysis of the Josephin domain of the polyglutamine protein ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 387-394.
- Christie, A., and Butler, M. (1994). Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *J Biotechnol* 37, 277-290.
- Chung, C.Y., Khurana, V., Auluck, P.K., Tardiff, D.F., Mazzulli, J.R., Soldner, F., Baru, V., Lou, Y., Freyzon, Y., Cho, S., *et al.* (2013). Identification and rescue of alpha-synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science* 342, 983-987.
- Ciechanover, A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 79-87.
- Ciechanover, A. (2006). The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology* 66, S7-19.
- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058.
- Colomer Gould, V.F., Goti, D., Pearce, D., Gonzalez, G.A., Gao, H., Bermudez de Leon, M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Ross, C.A., and Brown, D.R. (2007). A mutant ataxin-3 fragment results from processing at a site N-terminal to amino acid 190 in brain of Machado-Joseph disease-like transgenic mice. *Neurobiol Dis* 27, 362-369.
- Communi, D., Robaye, B., and Boeynaems, J.M. (1999). Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *Br J Pharmacol* 128, 1199-1206.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., *et al.* (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.
- Cong, S.Y., Pepers, B.A., Evert, B.O., Rubinsztein, D.C., Roos, R.A., van Ommen, G.J., and Dorsman, J.C. (2005). Mutant huntingtin represses CBP, but not p300, by binding and protein degradation. *Mol Cell Neurosci* 30, 560-571.
- Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., *et al.* (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3, e283.
- Costa, M.C., Gomes-da-Silva, J., Miranda, C.J., Sequeiros, J., Santos, M.M., and Maciel, P. (2004). Genomic structure, promoter activity, and developmental expression of the mouse homologue of the Machado-Joseph disease (MJD) gene. *Genomics* 84, 361-373.
- Cotman, C.W., Monaghan, D.T., and Ganong, A.H. (1988). Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11, 61-80.
- Coutinho, P., and Andrade, C. (1978). Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28, 703-709.
- Coutinho, P., and Sequeiros, J. (1981). [Clinical, genetic and pathological aspects of Machado-Joseph disease]. *J Genet Hum* 29, 203-209.
- Criollo, A., Vicencio, J.M., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Lavandero, S., and Kroemer, G. (2007). The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy* 3, 350-353.
- Cross, J.C., Werb, Z., and Fisher, S.J. (1994). Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266, 1508-1518.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11, 327-335.
- Cummings, C.J., and Zoghbi, H.Y. (2000). Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet* 9, 909-916.
- Curtis, D.R., and Watkins, J.C. (1963). Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *J Physiol* 166, 1-14.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Dayan, F., Bilton, R.L., Laferriere, J., Trottier, E., Roux, D., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2009). Activation of HIF-1alpha in exponentially growing cells via hypoxic stimulation is independent of the Akt/mTOR pathway. *J Cell Physiol* 218, 167-174.
- de Chiara, C., Menon, R.P., Dal Piaz, F., Calder, L., and Pastore, A. (2005). Polyglutamine is not all: the functional role of the AXH domain in the ataxin-1 protein. *J Mol Biol* 354, 883-893.
- Delarasse, C., Gonnord, P., Galante, M., Auger, R., Daniel, H., Motta, I., and Kanellopoulos, J.M. (2009). Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem* 109, 846-857.
- Demaurex, N., Lew, D.P., and Krause, K.H. (1992). Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J Biol Chem* 267, 2318-2324.
- Denker, H.W. (2008). Human embryonic stem cells: the real challenge for research as well as for bioethics is still ahead of us. *Cells Tissues Organs* 187, 250-256.

- Dice, J.F., Terlecky, S.R., Chiang, H.L., Olson, T.S., Isenman, L.D., Short-Russell, S.R., Freundlieb, S., and Terlecky, L.J. (1990). A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Semin Cell Biol* 1, 449-455.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221.
- Ding, Q., Regan, S.N., Xia, Y., Ostrom, L.A., Cowan, C.A., and Musunuru, K. (2013). Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* 12, 393-394.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7-61.
- Donaldson, K.M., Li, W., Ching, K.A., Batalov, S., Tsai, C.C., and Joazeiro, C.A. (2003). Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8892-8897.
- Doss-Pepe, E.W., Stenroos, E.S., Johnson, W.G., and Madura, K. (2003). Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol Cell Biol* 23, 6469-6483.
- Dubyak, G.R. (1991). Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4, 295-300.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., and Greenberg, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665.
- Durr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., Chneiweiss, H., Benomar, A., Lyon-Caen, O., Julien, J., *et al.* (1996). Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol* 39, 490-499.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277-280.
- Edwards, F.A., Gibb, A.J., and Colquhoun, D. (1992). ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359, 144-147.
- Egan, T.M., Samways, D.S., and Li, Z. (2006). Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch* 452, 501-512.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., *et al.* (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* 1, 568-577.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N.D., Tabar, V., and Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* 22, 152-165.
- Ellerby, L.M., Andrusiak, R.L., Wellington, C.L., Hackam, A.S., Propp, S.S., Wood, J.D., Sharp, A.H., Margolis, R.L., Ross, C.A., Salvesen, G.S., *et al.* (1999a). Cleavage of atrophin-1 at caspase site aspartic acid 109 modulates cytotoxicity. *J Biol Chem* 274, 8730-8736.
- Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Propp, S.S., Ellerby, H.M., Rabizadeh, S., Cashman, N.R., Trifiro, M.A., Pinsky, L., Wellington, C.L., Salvesen, G.S., *et al.* (1999b). Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J Neurochem* 72, 185-195.
- Ellisdon, A.M., Pearce, M.C., and Bottomley, S.P. (2007). Mechanisms of ataxin-3 misfolding and fibril formation: kinetic analysis of a disease-associated polyglutamine protein. *J Mol Biol* 368, 595-605.
- Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., and Finley, D. (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem* 279, 26817-26822.
- Eng, C.H., Yu, K., Lucas, J., White, E., and Abraham, R.T. (2011). Ammonia derived from glutaminolysis is a diffusible regulator of autophagy. *Sci Signal* 3, ra31.
- Erb, L., Liu, J., Ockerhausen, J., Kong, Q., Garrad, R.C., Griffin, K., Neal, C., Krugh, B., Santiago-Perez, L.I., Gonzalez, F.A., *et al.* (2001). An RGD sequence in the P2Y(2) receptor interacts with alpha(V)beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. *J Cell Biol* 153, 491-501.
- Etchebere, E.C., Cendes, F., Lopes-Cendes, I., Pereira, J.A., Lima, M.C., Sansana, C.R., Silva, C.A., Camargo, M.F., Santos, A.O., Ramos, C.D., *et al.* (2001). Brain single-photon emission computed tomography and magnetic resonance imaging in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 58, 1257-1263.

- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- Evert, B.O., Araujo, J., Vieira-Saecker, A.M., de Vos, R.A., Harendza, S., Klockgether, T., and Wullner, U. (2006a). Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *J Neurosci* **26**, 11474-11486.
- Evert, B.O., Schelhaas, J., Fleischer, H., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Stenzel, W., Klockgether, T., and Wullner, U. (2006b). Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin Neuropathol* **25**, 272-281.
- Evert, B.O., Vogt, I.R., Kindermann, C., Ozimek, L., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Schmitt, I., Klockgether, T., and Wullner, U. (2001). Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J Neurosci* **21**, 5389-5396.
- Evert, B.O., Vogt, I.R., Vieira-Saecker, A.M., Ozimek, L., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Klockgether, T., and Wullner, U. (2003). Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 1006-1018.
- Evert, B.O., Wullner, U., and Klockgether, T. (2000). Cell death in polyglutamine diseases. *Cell Tissue Res* **301**, 189-204.
- Falk, A., Koch, P., Kesavan, J., Takashima, Y., Ladewig, J., Alexander, M., Wiskow, O., Taylor, J., Trotter, M., Pollard, S., *et al.* (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.
- Fasano, C.A., Chambers, S.M., Lee, G., Tomishima, M.J., and Studer, L. (2010). Efficient derivation of functional floor plate tissue from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **6**, 336-347.
- Faux, N.G., Bottomley, S.P., Lesk, A.M., Irving, J.A., Morrison, J.R., de la Banda, M.G., and Whisstock, J.C. (2005). Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins. *Genome Res* **15**, 537-551.
- Feng, Y.H., Li, X., Wang, L., Zhou, L., and Gorodeski, G.I. (2006). A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem* **281**, 17228-17237.
- Ferrari, D., Los, M., Bauer, M.K., Vandenabeele, P., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1999). P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* **447**, 71-75.
- Ferri, A.L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P.P., Sala, M., DeBiasi, S., *et al.* (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* **131**, 3805-3819.
- Ferro, A., Carvalho, A.L., Teixeira-Castro, A., Almeida, C., Tome, R.J., Cortes, L., Rodrigues, A.J., Logarinho, E., Sequeiros, J., Macedo-Ribeiro, S., *et al.* (2007). NEDD8: a new ataxin-3 interactor. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1619-1627.
- Fields, R.D., and Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* **7**, 423-436.
- Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., and Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 527-552.
- Friedman, J.H. (2002). Presumed rapid eye movement behavior disorder in Machado-Joseph disease (spinocerebellar ataxia type 3). *Mov Disord* **17**, 1350-1353.
- Friedman, J.H., Fernandez, H.H., and Sudarsky, L.R. (2003). REM behavior disorder and excessive daytime somnolence in Machado-Joseph disease (SCA-3). *Mov Disord* **18**, 1520-1522.
- Friedman, M.J., Shah, A.G., Fang, Z.H., Ward, E.G., Warren, S.T., Li, S., and Li, X.J. (2007). Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIIB interaction: implications for its normal function and neurodegeneration. *Nat Neurosci* **10**, 1519-1528.
- Friedman, M.J., Wang, C.E., Li, X.J., and Li, S. (2008). Polyglutamine expansion reduces the association of TATA-binding protein with DNA and induces DNA binding-independent neurotoxicity. *J Biol Chem* **283**, 8283-8290.
- Fujii, S. (2004). ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: the role of extracellular ATP in hippocampal long-term potentiation. *J Pharmacol Sci* **94**, 103-106.
- Fukutake, T., Kamitsukasa, I., Arai, K., Hattori, T., and Nakajima, T. (2002). A patient homozygous for the SCA6 gene with retinitis pigmentosa. *Clin Genet* **61**, 375-379.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and 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**, 348-362.
- Gafni, J., Hermel, E., Young, J.E., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and Ellerby, L.M. (2004). Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem* **279**, 20211-20220.

- Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A.A., Manor, Y.S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., *et al.* (2013). Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504, 282-286.
- Gales, L., Cortes, L., Almeida, C., Melo, C.V., Costa, M.C., Maciel, P., Clarke, D.T., Damas, A.M., and Macedo-Ribeiro, S. (2005). Towards a structural understanding of the fibrillization pathway in Machado-Joseph's disease: trapping early oligomers of non-expanded ataxin-3. *J Mol Biol* 353, 642-654.
- Garcia-Mata, R., Gao, Y.S., and Sztul, E. (2002). Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic* 3, 388-396.
- Gaspar, C., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Goto, J., Arvidsson, K., Dias, A., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Lima, M., *et al.* (2001). Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet* 68, 523-528.
- Gatchel, J.R., and Zoghbi, H.Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 6, 743-755.
- Gispert, S., Twells, R., Orozco, G., Brice, A., Weber, J., Heredero, L., Scheufler, K., Riley, B., Allotey, R., Nothers, C., *et al.* (1993). Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. *Nat Genet* 4, 295-299.
- Giudice, A., and Trounson, A. (2008). Genetic modification of human embryonic stem cells for derivation of target cells. *Cell Stem Cell* 2, 422-433.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.
- Goffredo, D., Rigamonti, D., Tartari, M., De Micheli, A., Verderio, C., Matteoli, M., Zuccato, C., and Cattaneo, E. (2002). Calcium-dependent cleavage of endogenous wild-type huntingtin in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 277, 39594-39598.
- Gong, B., Kielar, C., and Morton, A.J. (2012). Temporal separation of aggregation and ubiquitination during early inclusion formation in transgenic mice carrying the Huntington's disease mutation. *PLoS One* 7, e41450.
- Gordon, P.B., Holen, I., Fosse, M., Rotnes, J.S., and Seglen, P.O. (1993). Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J Biol Chem* 268, 26107-26112.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H.L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., *et al.* (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63-67.
- Goti, D., Katzen, S.M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haiem, L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kakizuka, A., Sharp, A.H., *et al.* (2004). A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci* 24, 10266-10279.
- Goto, J., Watanabe, M., Ichikawa, Y., Yee, S.B., Ihara, N., Endo, K., Igarashi, S., Takiyama, Y., Gaspar, C., Maciel, P., *et al.* (1997). Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neurosci Res* 28, 373-377.
- Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777-788.
- Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., *et al.* (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125, 1179-1191.
- Gu, W., Ma, H., Wang, K., Jin, M., Zhou, Y., Liu, X., Wang, G., and Shen, Y. (2004). The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. *Eur Neurol* 52, 107-111.
- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D., and Paull, T.T. (2010). ATM activation by oxidative stress. *Science* 330, 517-521.
- Haacke, A., Broadley, S.A., Boteva, R., Tzvetkov, N., Hartl, F.U., and Breuer, P. (2006). Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet* 15, 555-568.
- Haacke, A., Hartl, F.U., and Breuer, P. (2007). Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *J Biol Chem* 282, 18851-18856.
- Haberhausen, G., Damian, M.S., Leweke, F., and Muller, U. (1995). Spinocerebellar ataxia, type 3 (SCA3) is genetically identical to Machado-Joseph disease (MJD). *J Neurol Sci* 132, 71-75.
- Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., *et al.* (2009). Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 5, 597-609.
- Han, D.W., Greber, B., Wu, G., Tapia, N., Arauzo-Bravo, M.J., Ko, K., Bernemann, C., Stehling, M., and Scholer, H.R. (2011). Direct reprogramming of fibroblasts into epiblast stem cells. *Nat Cell Biol* 13, 66-71.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahisa, Y., and Yamaguchi, M. (2001). Decrease in Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in the brain plasma membrane of rats with increasing age: involvement of brain calcium accumulation. *Int J Mol Med* 7, 407-411.

- Hancock, J.M., and Simon, M. (2005). Simple sequence repeats in proteins and their significance for network evolution. *Gene* 345, 113-118.
- Hao, J., Daleo, M.A., Murphy, C.K., Yu, P.B., Ho, J.N., Hu, J., Peterson, R.T., Hatzopoulos, A.K., and Hong, C.C. (2008). Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *PLoS One* 3, e2904.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889.
- Hargus, G., Ehrlich, M., Arauzo-Bravo, M.J., Hemmer, K., Hallmann, A.L., Reinhardt, P., Kim, K.P., Adachi, K., Santourlidis, S., Ghanjati, F., *et al.* (2014). Origin-Dependent Neural Cell Identities in Differentiated Human iPSCs In Vitro and after Transplantation into the Mouse Brain. *Cell Rep* 8, 1697-1703.
- Harris, G.M., Dodelzon, K., Gong, L., Gonzalez-Alegre, P., and Paulson, H.L. (2010). Splice isoforms of the polyglutamine disease protein ataxin-3 exhibit similar enzymatic yet different aggregation properties. *PLoS One* 5, e13695.
- Harris, J., De Haro, S.A., Master, S.S., Keane, J., Roberts, E.A., Delgado, M., and Deretic, V. (2007). T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* 27, 505-517.
- Harris, J., Master, S.S., De Haro, S.A., Delgado, M., Roberts, E.A., Hope, J.C., Keane, J., and Deretic, V. (2009). Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 37-43.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324-332.
- Hashida, H., Goto, J., Kurisaki, H., Mizusawa, H., and Kanazawa, I. (1997). Brain regional differences in the expansion of a CAG repeat in the spinocerebellar ataxias: dentatorubral-pallidoluysian atrophy, Machado-Joseph disease, and spinocerebellar ataxia type 1. *Ann Neurol* 41, 505-511.
- Hayashi, T. (1954). Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J Med* 3, 183-192.
- Hayashi, Y., Kakita, A., Yamada, M., Koide, R., Igarashi, S., Takano, H., Ikeuchi, T., Wakabayashi, K., Egawa, S., Tsuji, S., *et al.* (1998). Hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy: detection of widespread ubiquitinated neuronal and glial intranuclear inclusions in the brain. *Acta Neuropathol* 96, 547-552.
- HD Consortium (2012). Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell* 11, 264-278.
- Heir, R., Ablasou, C., Dumontier, E., Elliott, M., Fagotto-Kaufmann, C., and Bedford, F.K. (2006). The UBL domain of PLIC-1 regulates aggresome formation. *EMBO Rep* 7, 1252-1258.
- Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A.H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., *et al.* (2001). VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ* 8, 977-984.
- Hoche, F., Seidel, K., Brunt, E.R., Auburger, G., Schols, L., Burk, K., de Vos, R.A., den Dunnen, W., Bechmann, I., Egensperger, R., *et al.* (2008). Involvement of the auditory brainstem system in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2), type 3 (SCA3) and type 7 (SCA7). *Neuropathol Appl Neurobiol* 34, 479-491.
- Hochstrasser, M. (2000). Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol* 2, E153-157.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C.S., Gao, Q., Cassady, J.P., Cost, G.J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J.C., *et al.* (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* 29, 731-734.
- Hofmann, F., Lacinova, L., and Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139, 33-87.
- Holm, S. (2008). Time to reconsider stem cell ethics--the importance of induced pluripotent cells. *J Med Ethics* 34, 63-64.
- Holmberg, M., Duyckaerts, C., Durr, A., Cancel, G., Gourfinkel-An, I., Damier, P., Faucheux, B., Trottier, Y., Hirsch, E.C., Agid, Y., *et al.* (1998). Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Hum Mol Genet* 7, 913-918.
- Hotta, A., and Ellis, J. (2008). Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *J Cell Biochem* 105, 940-948.
- Hu, B.Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.X., Zhang, X.Q., Thomson, J.A., and Zhang, S.C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4335-4340.
- Huang, Q., Wu, Y.T., Tan, H.L., Ong, C.N., and Shen, H.M. (2009). A novel function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in modulation of autophagy and necrosis under oxidative stress. *Cell Death Differ* 16, 264-277.
- Hübener, J., Weber, J.J., Richter, C., Honold, L., Weiss, A., Murad, F., Breuer, P., Wullner, U., Bellstedt, P., Paquet-Durand, F., *et al.* (2013). Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum Mol Genet* 22, 508-518.

- Hucke, S., Flossdorf, J., Grutzke, B., Dunay, I.R., Frenzel, K., Jungverdorben, J., Linnartz, B., Mack, M., Peitz, M., Brustle, O., *et al.* (2012). Licensing of myeloid cells promotes central nervous system autoimmunity and is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Brain* 135, 1586-1605.
- Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Narva, E., Ng, S., Sourour, M., Hamalainen, R., Olsson, C., *et al.* (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471, 58-62.
- Ichikawa, Y., Goto, J., Hattori, M., Toyoda, A., Ishii, K., Jeong, S.Y., Hashida, H., Masuda, N., Ogata, K., Kasai, F., *et al.* (2001). The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet* 46, 413-422.
- Igarashi, S., Takiyama, Y., Cancel, G., Rogaeva, E.A., Sasaki, H., Wakisaka, A., Zhou, Y.X., Takano, H., Endo, K., Sanpei, K., *et al.* (1996). Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Hum Mol Genet* 5, 923-932.
- Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., and Kakizuka, A. (1996). Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13, 196-202.
- Ikeuchi, Y., Nishizaki, T., and Okada, Y. (1995). A P2 purinoceptor activated by ADP in rat medullar neurons. *Neurosci Lett* 198, 71-74.
- Ilgren, E.B. (1983). Review article: control of trophoblastic growth. *Placenta* 4, 307-328.
- Illes, P., Wirkner, Kerstin, Nörenberg, Wolfgang, Masino, Susan A. and Dunwiddie, Thomas V. (2001). Interaction between the transmitters ATP and glutamate in the central nervous system. *Drug Development Research* 52, 76-82.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Iranzo, A., Munoz, E., Santamaria, J., Vilaseca, I., Mila, M., and Tolosa, E. (2003). REM sleep behavior disorder and vocal cord paralysis in Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 18, 1179-1183.
- Irion, S., Luche, H., Gadue, P., Fehling, H.J., Kennedy, M., and Keller, G. (2007). Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25, 1477-1482.
- Isaac, J.T., Ashby, M.C., and McBain, C.J. (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54, 859-871.
- Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., *et al.* (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482, 216-220.
- Iwabuchi, K., Tsuchiya, K., Uchihara, T., and Yagishita, S. (1999). Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations. *Rev Neurol (Paris)* 155, 255-270.
- Izant, J.G., and McIntosh, J.R. (1980). Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4741-4745.
- Jahr, C.E., and Jessell, T.M. (1983). ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature* 304, 730-733.
- Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K., and Nukina, N. (2005). Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem* 280, 11635-11640.
- Jane, D.E., Lodge, D., and Collingridge, G.L. (2009). Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology* 56, 90-113.
- Jardim, L.B., Pereira, M.L., Silveira, I., Ferro, A., Sequeiros, J., and Giugliani, R. (2001). Machado-Joseph disease in South Brazil: clinical and molecular characterization of kindreds. *Acta Neurol Scand* 104, 224-231.
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H., and Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 4, 134-139.
- Jeub, M., Herbst, M., Spauschus, A., Fleischer, H., Klockgether, T., Wuellner, U., and Evert, B.O. (2006). Potassium channel dysfunction and depolarized resting membrane potential in a cell model of SCA3. *Exp Neurol* 207, 182-192.
- Ji, J., Ng, S.H., Sharma, V., Neculai, D., Hussein, S., Sam, M., Trinh, Q., Church, G.M., McPherson, J.D., Nagy, A., *et al.* (2012). Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30, 435-440.
- Jia, D.D., Zhang, L., Chen, Z., Wang, C.R., Huang, F.Z., Duan, R.H., Xia, K., Tang, B.S., and Jiang, H. (2013). Lithium chloride alleviates neurodegeneration partly by inhibiting activity of GSK3beta in a SCA3 *Drosophila* model. *Cerebellum* 12, 892-901.
- Jiang, H., Tang, B.S., Xu, B., Zhao, G.H., Shen, L., Tang, J.G., Li, Q.H., and Xia, K. (2005). Frequency analysis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias in mainland Chinese patients and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Chin Med J (Engl)* 118, 837-843.

- Jo, Y.H., and Role, L.W. (2002). Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci* 22, 4794-4804.
- Jo, Y.H., and Schlichter, R. (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 2, 241-245.
- Jung, J., Xu, K., Lessing, D., and Bonini, N.M. (2009). Preventing Ataxin-3 protein cleavage mitigates degeneration in a *Drosophila* model of SCA3. *Hum Mol Genet* 18, 4843-4852.
- Kanda, T., Isozaki, E., Kato, S., Tanabe, H., and Oda, M. (1989). Type III Machado-Joseph disease in a Japanese family: a clinicopathological study with special reference to the peripheral nervous system. *Clin Neuropathol* 8, 134-141.
- Kannagi, R., Cochran, N.A., Ishigami, F., Hakomori, S., Andrews, P.W., Knowles, B.B., and Solter, D. (1983). Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J* 2, 2355-2361.
- Kass, G.E., Duddy, S.K., Moore, G.A., and Orrenius, S. (1989). 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone rapidly elevates cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool. *J Biol Chem* 264, 15192-15198.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., *et al.* (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8, 221-228.
- Kawai, Y., Takeda, A., Abe, Y., Washimi, Y., Tanaka, F., and Sobue, G. (2004). Cognitive impairments in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 61, 1757-1760.
- Kawata, M., Sekiya, S., Kera, K., Kimura, H., and Takamizawa, H. (1991). Neural rosette formation within in vitro spheroids of a clonal human teratocarcinoma cell line, PA-1/NR: role of extracellular matrix components in the morphogenesis. *Cancer Res* 51, 2655-2669.
- Kee, K., Angeles, V.T., Flores, M., Nguyen, H.N., and Reijo Pera, R.A. (2009). Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 462, 222-225.
- Khaira, S.K., Pouton, C.W., and Haynes, J.M. (2009). P2X2, P2X4 and P2Y1 receptors elevate intracellular Ca<sup>2+</sup> in mouse embryonic stem cell-derived GABAergic neurons. *Br J Pharmacol* 158, 1922-1931.
- Khakh, B.S. (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* 2, 165-174.
- Kieling, C., Prestes, P.R., Saraiva-Pereira, M.L., and Jardim, L.B. (2007). Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 72, 543-545.
- Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., *et al.* (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472-476.
- Kim, D.S., Lee, J.S., Leem, J.W., Huh, Y.J., Kim, J.Y., Kim, H.S., Park, I.H., Daley, G.Q., Hwang, D.Y., and Kim, D.W. (2010). Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Rev* 6, 270-281.
- Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y.H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., *et al.* (2011a). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 1117-1119.
- Kim, H., Lee, G., Ganat, Y., Papapetrou, E.P., Lipchina, I., Socci, N.D., Sadelain, M., and Studer, L. (2011b). miR-371-3 expression predicts neural differentiation propensity in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 695-706.
- Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cui, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2001). Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12784-12789.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3, 452-460.
- Kirchhoff, M., Rose, H., and Lundsteen, C. (2001). High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 38, 740-744.
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L.A., Boulting, G.L., Moccia, R., Wainger, B.J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., *et al.* (2014). Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell* 14, 781-795.
- Klement, I.A., Skinner, P.J., Kaytor, M.D., Yi, H., Hersch, S.M., Clark, H.B., Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (1998). Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 95, 41-53.
- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., *et al.* (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544.
- Klockgether, T., Ludtke, R., Kramer, B., Abele, M., Burk, K., Schols, L., Riess, O., Laccone, F., Boesch, S., Lopes-Cendes, I., *et al.* (1998). The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain* 121 ( Pt 4), 589-600.

- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2006). Neurons and glial cells differentially express P2Y receptor mRNAs in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J Comp Neurol* 498, 443-454.
- Kobayashi, T., and Kakizuka, A. (2003). Molecular analyses of Machado-Joseph disease. *Cytogenet Genome Res* 100, 261-275.
- Koch, P., Breuer, P., Peitz, M., Jungverdorben, J., Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tuting, T., *et al.* (2011). Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* 480, 543-546.
- Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J.A., Ladewig, J., and Brustle, O. (2009). A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3225-3230.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., *et al.* (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.
- Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, K., *et al.* (2013). Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12, 487-496.
- Kriks, S., Shim, J.W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., *et al.* (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547-551.
- Krishna, N., Mohan, S., Yashavantha, B.S., Rammurthy, A., Kiran Kumar, H.B., Mittal, U., Tyagi, S., Mukerji, M., Jain, S., Pal, P.K., *et al.* (2007). SCA 1, SCA 2 & SCA 3/MJD mutations in ataxia syndromes in southern India. *Indian J Med Res* 126, 465-470.
- Krnjevic, K., and Phillis, J.W. (1963). Ionophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. *J Physiol* 165, 274-304.
- Krogsgaard-Larsen, P., Honore, T., Hansen, J.J., Curtis, D.R., and Lodge, D. (1980). New class of glutamate agonist structurally related to ibotenic acid. *Nature* 284, 64-66.
- Krügel, U., Kittner, H., Franke, H., and Illes, P. (2003). Purinergic modulation of neuronal activity in the mesolimbic dopaminergic system in vivo. *Synapse* 47, 134-142.
- Ku, S., Soragni, E., Campau, E., Thomas, E.A., Altun, G., Laurent, L.C., Loring, J.F., Napierala, M., and Gottesfeld, J.M. (2010). Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAATTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell* 7, 631-637.
- Kuba, K., and Nishi, S. (1976). Rhythmic hyperpolarizations and depolarization of sympathetic ganglion cells induced by caffeine. *J Neurophysiol* 39, 547-563.
- Kwak, S., and Weiss, J.H. (2006). Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol* 16, 281-287.
- Labrakakis, C., Tong, C.K., Weissman, T., Torsney, C., and MacDermott, A.B. (2003). Localization and function of ATP and GABAA receptors expressed by nociceptors and other postnatal sensory neurons in rat. *J Physiol* 549, 131-142.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lalo, U., Voitenko, N., and Kostyuk, P. (1998). Iono- and metabotropically induced purinergic calcium signalling in rat neocortical neurons. *Brain Res* 799, 285-291.
- Lam, Y.C., Bowman, A.B., Jafar-Nejad, P., Lim, J., Richman, R., Fryer, J.D., Hyun, E.D., Duvick, L.A., Orr, H.T., Botas, J., *et al.* (2006). ATAXIN-1 interacts with the repressor Capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology. *Cell* 127, 1335-1347.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- Lang, A.E., Rogaeva, E.A., Tsuda, T., Hutterer, J., and St George-Hyslop, P. (1994). Homozygous inheritance of the Machado-Joseph disease gene. *Ann Neurol* 36, 443-447.
- Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., *et al.* (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402-406.
- Lee, M., Jantarantotai, N., McGeer, E., McLarnon, J.G., and McGeer, P.L. (2010). Mg<sup>2+</sup> ions reduce microglial and THP-1 cell neurotoxicity by inhibiting Ca<sup>2+</sup> entry through purinergic channels. *Brain Res* 1369, 21-35.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
- Lerer, I., Merims, D., Abeliovich, D., Zlotogora, J., and Gadoth, N. (1996). Machado-Joseph disease: correlation between the clinical features, the CAG repeat length and homozygosity for the mutation. *Eur J Hum Genet* 4, 3-7.

- Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R.N., and Chakravarti, D. (2002). Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem* 277, 45004-45012.
- Li, X.J., Friedman, M., and Li, S. (2007a). Interacting proteins as genetic modifiers of Huntington disease. *Trends Genet* 23, 531-533.
- Li, M., Chevalier-Larsen, E.S., Merry, D.E., and Diamond, M.I. (2007b). Soluble androgen receptor oligomers underlie pathology in a mouse model of spinobulbar muscular atrophy. *J Biol Chem* 282, 3157-3164.
- Li, S.H., and Li, X.J. (1998). Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Hum Mol Genet* 7, 777-782.
- Li, X.J., Du, Z.W., Zarnowska, E.D., Pankratz, M., Hansen, L.O., Pearce, R.A., and Zhang, S.C. (2005). Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 215-221.
- Li, X.J., Hu, B.Y., Jones, S.A., Zhang, Y.S., Lavaute, T., Du, Z.W., and Zhang, S.C. (2008). Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules. *Stem Cells* 26, 886-893.
- Lim, J., Crespo-Barreto, J., Jafar-Nejad, P., Bowman, A.B., Richman, R., Hill, D.E., Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (2008). Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1. *Nature* 452, 713-718.
- Lima, M., Costa, M.C., Montiel, R., Ferro, A., Santos, C., Silva, C., Bettencourt, C., Sousa, A., Sequeiros, J., Coutinho, P., *et al.* (2005). Population genetics of wild-type CAG repeats in the Machado-Joseph disease gene in Portugal. *Hum Hered* 60, 156-163.
- Lin, K.P., and Soong, B.W. (2002). Peripheral neuropathy of Machado-Joseph disease in Taiwan: a morphometric and genetic study. *Eur Neurol* 48, 210-217.
- Linhartova, I., Repitz, M., Draber, P., Nemeč, M., Wiche, G., and Propst, F. (1999). Conserved domains and lack of evidence for polyglutamine length polymorphism in the chicken homolog of the Machado-Joseph disease gene product ataxin-3. *Biochim Biophys Acta* 1444, 299-305.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., *et al.* (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68-73.
- Liu, X., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Meli, A.C., Xie, W., Chen, B.X., Arancio, O., and Marks, A.R. (2012a). Role of leaky neuronal ryanodine receptors in stress-induced cognitive dysfunction. *Cell* 150, 1055-1067.
- Liu, G.H., Qu, J., Suzuki, K., Nivet, E., Li, M., Montserrat, N., Yi, F., Xu, X., Ruiz, S., Zhang, W., *et al.* (2012b). Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature* 491, 603-607.
- Lopes-Cendes, I., Teive, H.G., Calcagnotto, M.E., Da Costa, J.C., Cardoso, F., Viana, E., Maciel, J.A., Radvány, J., Arruda, W.O., Trevisol-Bittencourt, P.C., *et al.* (1997). Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr* 55, 519-529.
- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., and Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2883-2888.
- Ludwig, T.E., Bergendahl, V., Levenstein, M.E., Yu, J., Probasco, M.D., and Thomson, J.A. (2006). Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Methods* 3, 637-646.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., and McKay, R. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292, 1389-1394.
- Lustig, K.D., Shiau, A.K., Brake, A.J., and Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5113-5117.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 622-632.
- Lytton, J., and MacLennan, D.H. (1988). Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene. *J Biol Chem* 263, 15024-15031.
- Macedo-Ribeiro, S., Cortes, L., Maciel, P., and Carvalho, A.L. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3. *PLoS One* 4, e5834.
- Maciel, P., Costa, M.C., Ferro, A., Rousseau, M., Santos, C.S., Gaspar, C., Barros, J., Rouleau, G.A., Coutinho, P., and Sequeiros, J. (2001). Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 58, 1821-1827.
- Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvány, J., Dawson, D.M., Sudarsky, L., Guimaraes, J., Loureiro, J.E., *et al.* (1995). Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 57, 54-61.
- Maciel, P., Gaspar, C., Guimaraes, L., Goto, J., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Arvidsson, K., Dias, A., Sequeiros, J., Sousa, A., *et al.* (1999). Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)<sub>n</sub> tract. *Eur J Hum Genet* 7, 147-156.

- Maciel, P., Lopes-Cendes, I., Kish, S., Sequeiros, J., and Rouleau, G.A. (1997). Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients. *Am J Hum Genet* 60, 993-996.
- Maitra, A., Arking, D.E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., Sui, G., Cutler, D.J., Liu, Y., Brimble, S.N., *et al.* (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37, 1099-1103.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S.W., *et al.* (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506.
- Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P.P., Polo, S., Hodsdon, M.E., and De Camilli, P. (2005). Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12700-12705.
- Markossian, K.A., and Kurganov, B.I. (2004). Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggregates. *Biochemistry (Mosc)* 69, 971-984.
- Martin, A., Joseph, J.A., and Cuervo, A.M. (2002). Stimulatory effect of vitamin C on autophagy in glial cells. *J Neurochem* 82, 538-549.
- Martin, G.R. (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, 7634-7638.
- Martin, G.R., and Evans, M.J. (1974). The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* 2, 163-172.
- Martin-Aparicio, E., Yamamoto, A., Hernandez, F., Hen, R., Avila, J., and Lucas, J.J. (2001). Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 21, 8772-8781.
- Martins, S., Calafell, F., Gaspar, C., Wong, V.C., Silveira, I., Nicholson, G.A., Brunt, E.R., Tranebjaerg, L., Stevanin, G., Hsieh, M., *et al.* (2007). Asian origin for the worldwide-spread mutational event in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 64, 1502-1508.
- Martins, S., Calafell, F., Wong, V.C., Sequeiros, J., and Amorim, A. (2006). A multistep mutation mechanism drives the evolution of the CAG repeat at MJD/SCA3 locus. *Eur J Hum Genet* 14, 932-940.
- Martins, S., Coutinho, P., Silveira, I., Giunti, P., Jardim, L.B., Calafell, F., Sequeiros, J., and Amorim, A. (2008). Cis-acting factors promoting the CAG intergenerational instability in Machado-Joseph disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B, 439-446.
- Maruff, P., Tyler, P., Burt, T., Currie, B., Burns, C., and Currie, J. (1996). Cognitive deficits in Machado-Joseph disease. *Ann Neurol* 40, 421-427.
- Maruyama, H., Izumi, Y., Morino, H., Oda, M., Toji, H., Nakamura, S., and Kawakami, H. (2002). Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. *Am J Med Genet* 114, 578-583.
- Maruyama, H., Nakamura, S., Matsuyama, Z., Sakai, T., Doyu, M., Sobue, G., Seto, M., Tsujihata, M., Oh-i, T., Nishio, T., *et al.* (1995). Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 4, 807-812.
- Masino, L., Musi, V., Menon, R.P., Fusi, P., Kelly, G., Frenkiel, T.A., Trotter, Y., and Pastore, A. (2003). Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett* 549, 21-25.
- Masino, L., Nicastro, G., Menon, R.P., Dal Piaz, F., Calder, L., and Pastore, A. (2004). Characterization of the structure and the amyloidogenic properties of the Josephin domain of the polyglutamine-containing protein ataxin-3. *J Mol Biol* 344, 1021-1035.
- Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., *et al.* (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 21, 503-511.
- Matilla, T., McCall, A., Subramony, S.H., and Zoghbi, H.Y. (1995). Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 3 and Machado-Joseph disease. *Ann Neurol* 38, 68-72.
- Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., and Nakayama, K.I. (2004). Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J* 23, 659-669.
- Matsumura, R., Takayanagi, T., Fujimoto, Y., Murata, K., Mano, Y., Horikawa, H., and Chuma, T. (1996a). The relationship between trinucleotide repeat length and phenotypic variation in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 139, 52-57.
- Matsumura, R., Takayanagi, T., Murata, K., Futamura, N., Hirano, M., and Ueno, S. (1996b). Relationship of (CAG)<sub>n</sub>C configuration to repeat instability of the Machado-Joseph disease gene. *Hum Genet* 98, 643-645.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., and Guthrie, P.B. (1984). Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature* 309, 261-263.

- Mazzucchelli, S., De Palma, A., Riva, M., D'Urzo, A., Pozzi, C., Pastori, V., Comelli, F., Fusi, P., Vanoni, M., Tortora, P., *et al.* (2009). Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 2485-2492.
- McCampbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G., *et al.* (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* *9*, 2197-2202.
- McKee, S.C., Thompson, C.S., Sabourin, L.A., and Hakim, A.M. (2006). Regulation of expression of early growth response transcription factors in rat primary cortical neurons by extracellular ATP. *Brain Res* *1088*, 1-11.
- Menendez, P., Wang, L., and Bhatia, M. (2005). Genetic manipulation of human embryonic stem cells: a system to study early human development and potential therapeutic applications. *Curr Gene Ther* *5*, 375-385.
- Menzies, F.M., Garcia-Arencibia, M., Imarisio, S., O'Sullivan, N.C., Ricketts, T., Kent, B.A., Rao, M.V., Lam, W., Green-Thompson, Z.W., Nixon, R.A., *et al.* (2014). Calpain inhibition mediates autophagy-dependent protection against polyglutamine toxicity. *Cell Death Differ*.
- Menzies, F.M., Huebener, J., Renna, M., Bonin, M., Riess, O., and Rubinsztein, D.C. (2010). Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain* *133*, 93-104.
- Meregalli, M., Farini, A. and Torrente, Y. (2011). Stem Cell Therapy for Neuromuscular Diseases. *Stem Cells in Clinic and Research*.
- Michaelis, E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* *54*, 369-415.
- Miller, J.D., Ganat, Y.M., Kishinevsky, S., Bowman, R.L., Liu, B., Tu, E.Y., Mandal, P.K., Vera, E., Shim, J.W., Kriks, S., *et al.* (2013). Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* *13*, 691-705.
- Miller, V.M., Nelson, R.F., Gouvion, C.M., Williams, A., Rodriguez-Lebron, E., Harper, S.Q., Davidson, B.L., Rebagliati, M.R., and Paulson, H.L. (2005). CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J Neurosci* *25*, 9152-9161.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631-642.
- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* *22*, 132-139.
- Moffitt, H., McPhail, G.D., Woodman, B., Hobbs, C., and Bates, G.P. (2009). Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* *4*, e8025.
- Mori, F., Nishie, M., Piao, Y.S., Kito, K., Kamitani, T., Takahashi, H., and Wakabayashi, K. (2005). Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* *31*, 53-61.
- Mori, M., Heuss, C., Gahwiler, B.H., and Gerber, U. (2001). Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol* *535*, 115-123.
- Moseley, M.L., Benzow, K.A., Schut, L.J., Bird, T.D., Gomez, C.M., Barkhaus, P.E., Blindauer, K.A., Labuda, M., Pandolfo, M., Koob, M.D., *et al.* (1998). Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology* *51*, 1666-1671.
- Muchowski, P.J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E.E., Hayer-Hartl, M.K., and Hartl, F.U. (2000). Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 7841-7846.
- Muchowski, P.J., and Wacker, J.L. (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* *6*, 11-22.
- Müller, T., Breuer, P., Schmitt, I., Walter, J., Evert, B.O., and Wullner, U. (2009). CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3. *Hum Mol Genet* *18*, 3334-3343.
- Mukerji, M., Choudhry, S., Saleem, Q., Padma, M.V., Maheshwari, M.C., and Jain, S. (2000). Molecular analysis of Friedreich's ataxia locus in the Indian population. *Acta Neurol Scand* *102*, 227-229.
- Müller, F.J., Schuldt, B.M., Williams, R., Mason, D., Altun, G., Papapetrou, E.P., Danner, S., Goldmann, J.E., Herbst, A., Schmidt, N.O., *et al.* (2011). A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods* *8*, 315-317.
- Murata, Y., Yamaguchi, S., Kawakami, H., Imon, Y., Maruyama, H., Sakai, T., Kazuta, T., Ohtake, T., Nishimura, M., Saida, T., *et al.* (1998). Characteristic magnetic resonance imaging findings in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* *55*, 33-37.
- Nakano, K.K., Dawson, D.M., and Spence, A. (1972). Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* *22*, 49-55.
- Namura, S., Hirt, L., Wheeler, V.C., McGinnis, K.M., Hilditch-Maguire, P., Moskowitz, M.A., MacDonald, M.E., and Persichetti, F. (2002). The HD mutation does not alter neuronal death in the striatum of Hdh(Q92) knock-in mice after mild focal ischemia. *Neurobiol Dis* *11*, 147-154.

- Narcisse, L., Scemes, E., Zhao, Y., Lee, S.C., and Brosnan, C.F. (2005). The cytokine IL-1 $\beta$  transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 49, 245-258.
- Nascimento-Ferreira, I., Santos-Ferreira, T., Sousa-Ferreira, L., Auregan, G., Onofre, I., Alves, S., Dufour, N., Colomer Gould, V.F., Koeppen, A., Deglon, N., *et al.* (2011). Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain* 134, 1400-1415.
- Nguyen, H.N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., Kee, K., Schule, B., Dolmetsch, R.E., Langston, W., *et al.* (2011). LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 8, 267-280.
- Nicastro, G., Habeck, M., Masino, L., Svergun, D.I., and Pastore, A. (2006). Structure validation of the Josephin domain of ataxin-3: conclusive evidence for an open conformation. *J Biomol NMR* 36, 267-277.
- Nicastro, G., Masino, L., Esposito, V., Menon, R.P., De Simone, A., Fraternali, F., and Pastore, A. (2009). Josephin domain of ataxin-3 contains two distinct ubiquitin-binding sites. *Biopolymers* 91, 1203-1214.
- Nicastro, G., Menon, R.P., Masino, L., Knowles, P.P., McDonald, N.Q., and Pastore, A. (2005). The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10493-10498.
- Nicke, A., Baumert, H.G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17, 3016-3028.
- Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26, 137-148.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.
- North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013-1067.
- North, R.A., and Verkhratsky, A. (2006). Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflugers Arch* 452, 479-485.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., *et al.* (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26, 9220-9231.
- Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J.M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S.L., Manos, P.D., Rossi, D.J., *et al.* (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* 13, 541-549.
- Okamoto, Y., Nagai, Y., Fujikake, N., Akiko Popiel, H., Yoshioka, T., Toda, T., and Inui, T. (2009). Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregation inhibitors to the expanded polyglutamine stretch. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 634-639.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-953.
- Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S., Li, X.J., Stieg, P.E., *et al.* (1999). Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 399, 263-267.
- Ordway, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A., Bernstein, E.M., Cearley, J.A., Wiener, H.W., Dure, L.S.t., Lindsey, R., Hersch, S.M., Jope, R.S., *et al.* (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 91, 753-763.
- Orth, M., Cooper, J.M., Bates, G.P., and Schapira, A.H. (2003). Inclusion formation in Huntington's disease R6/2 mouse muscle cultures. *J Neurochem* 87, 1-6.
- Osakada, F., Jin, Z.B., Hirami, Y., Ikeda, H., Danjyo, T., Watanabe, K., Sasai, Y., and Takahashi, M. (2009). In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci* 122, 3169-3179.
- Padiath, Q.S., Srivastava, A.K., Roy, S., Jain, S., and Brahmachari, S.K. (2005). Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133B, 124-126.
- Palomo, G.M., Cerrato, T., Gargini, R., and Diaz-Nido, J. (2011). Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. *Hum Mol Genet* 20, 2807-2822.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Castro, E., Miras-Portugal, M.T., and Krishtal, O. (1999). ATP receptor-mediated component of the excitatory synaptic transmission in the hippocampus. *Prog Brain Res* 120, 237-249.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O., and Verkhratsky, A. (2002). Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. *J Physiol* 542, 529-536.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O., and Verkhratsky, A. (2003). P2X receptor-mediated excitatory synaptic currents in somatosensory cortex. *Mol Cell Neurosci* 24, 842-849.

- Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O.A., and Verkhratsky, A. (2009). P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158, 137-148.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., and North, R.A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch* 452, 589-597.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., and North, R.A. (2007). Quantal release of ATP in mouse cortex. *J Gen Physiol* 129, 257-265.
- Panula, S., Medrano, J.V., Kee, K., Bergstrom, R., Nguyen, H.N., Byers, B., Wilson, K.D., Wu, J.C., Simon, C., Hovatta, O., *et al.* (2011). Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 20, 752-762.
- Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008a). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-146.
- Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008b). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.
- Park, T.S., Galic, Z., Conway, A.E., Lindgren, A., van Handel, B.J., Magnusson, M., Richter, L., Teitell, M.A., Mikkola, H.K., Lowry, W.E., *et al.* (2009). Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells* 27, 783-795.
- Pastore, A., and Temussi, P.A. (2012). The two faces of Janus: functional interactions and protein aggregation. *Curr Opin Struct Biol* 22, 30-37.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927-939.
- Paulson, H.L. (2007). Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol* 27, 133-142.
- Paulson, H.L., Das, S.S., Crino, P.B., Perez, M.K., Patel, S.C., Gotsdiner, D., Fischbeck, K.H., and Pittman, R.N. (1997a). Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol* 41, 453-462.
- Paulson, H.L., Perez, M.K., Trotter, Y., Trojanowski, J.Q., Subramony, S.H., Das, S.S., Vig, P., Mandel, J.L., Fischbeck, K.H., and Pittman, R.N. (1997b). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19, 333-344.
- Peitz, M., Jungverdorben, J., and Brustle, O. (2013). Disease-specific iPSC cell models in neuroscience. *Curr Mol Med* 13, 832-841.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Gorter, J.A., Bennett, M.V., and Zukin, R.S. (1997). The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20, 464-470.
- Perez, M.K., Paulson, H.L., Pendse, S.J., Saionz, S.J., Bonini, N.M., and Pittman, R.N. (1998). Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* 143, 1457-1470.
- Perez, M.K., Paulson, H.L., and Pittman, R.N. (1999). Ataxin-3 with an altered conformation that exposes the polyglutamine domain is associated with the nuclear matrix. *Hum Mol Genet* 8, 2377-2385.
- Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-12548.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F., Meijer, A.J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 275, 992-998.
- Phillis, J.W., and Wu, P.H. (1981). The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 16, 187-239.
- Pillay, C.S., Elliott, E., and Dennison, C. (2002). Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363, 417-429.
- Pinheiro, P., and Mulle, C. (2006). Kainate receptors. *Cell Tissue Res* 326, 457-482.
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., *et al.* (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28, 848-855.
- Potter, P., and White, T.D. (1980). Release of adenosine 5'-triphosphate from synaptosomes from different regions of rat brain. *Neuroscience* 5, 1351-1356.
- Pozzi, C., Valtorta, M., Tedeschi, G., Galbusera, E., Pastori, V., Bigi, A., Nonnis, S., Grassi, E., and Fusi, P. (2008). Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3. *Neurobiol Dis* 30, 190-200.
- Price, P.J., Goldsborough, M. D., and Tilkins, M. L. (1998). Embryonic stem cell serum replacement. International Patent Application.

- Prothero, L.S., Mathie, A., and Richards, C.D. (2000). Purinergic and muscarinic receptor activation activates a common calcium entry pathway in rat neocortical neurons and glial cells. *Neuropharmacology* 39, 1768-1778.
- Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50, 413-492.
- Ranum, L.P., Lundgren, J.K., Schut, L.J., Ahrens, M.J., Perlman, S., Aita, J., Bird, T.D., Gomez, C., and Orr, H.T. (1995). Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive, or sporadic ataxia. *Am J Hum Genet* 57, 603-608.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., *et al.* (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36, 585-595.
- Raya, A., Rodriguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M.J., Consiglio, A., Castella, M., Rio, P., Sleep, E., *et al.* (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460, 53-59.
- Redman, R.S., and Silinsky, E.M. (1994). Decrease in calcium currents induced by aminoglycoside antibiotics in frog motor nerve endings. *Br J Pharmacol* 113, 375-378.
- Renna, M., Jimenez-Sanchez, M., Sarkar, S., and Rubinsztein, D.C. (2010). Chemical inducers of autophagy that enhance the clearance of mutant proteins in neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 285, 11061-11067.
- Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1134-1140.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.
- Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78, 363-397.
- Richards, M., Tan, S.P., Tan, J.H., Chan, W.K., and Bongso, A. (2004). The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* 22, 51-64.
- Richardson, P.J., and Brown, S.J. (1987). ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem* 48, 622-630.
- Riess, O., Rub, U., Pastore, A., Bauer, P., and Schols, L. (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum* 7, 125-137.
- Roberts, J.A., Vial, C., Digby, H.R., Agboh, K.C., Wen, H., Atterbury-Thomas, A., and Evans, R.J. (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch* 452, 486-500.
- Rodrigues, A.J., Coppola, G., Santos, C., Costa Mdo, C., Ailion, M., Sequeiros, J., Geschwind, D.H., and Maciel, P. (2007). Functional genomics and biochemical characterization of the *C. elegans* orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *FASEB J* 21, 1126-1136.
- Romanul, F.C., Fowler, H.L., Radvany, J., Feldman, R.G., and Feingold, M. (1977). Azorean disease of the nervous system. *N Engl J Med* 296, 1505-1508.
- Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3, 1009-1013.
- Rosenberg, R.N. (1992). Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord* 7, 193-203.
- Rosenberg, R.N., Nyhan, W.L., Bay, C., and Shore, P. (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology* 26, 703-714.
- Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10 Suppl, S10-17.
- Rüb, U., Brunt, E.R., de Vos, R.A., Del Turco, D., Del Tredici, K., Gierga, K., Schultz, C., Ghebremedhin, E., Burk, K., Auburger, G., *et al.* (2004). Degeneration of the central vestibular system in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patients and its possible clinical significance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30, 402-414.
- Rüb, U., Brunt, E.R., and Deller, T. (2008). New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol* 21, 111-116.
- Rüb, U., Brunt, E.R., Gierga, K., Schultz, C., Paulson, H., de Vos, R.A., and Braak, H. (2003). The nucleus raphe interpositus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *J Chem Neuroanat* 25, 115-127.
- Rüb, U., Burk, K., Schols, L., Brunt, E.R., de Vos, R.A., Diaz, G.O., Gierga, K., Ghebremedhin, E., Schultz, C., Del Turco, D., *et al.* (2004). Damage to the reticulotegmental nucleus of the pons in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. *Neurology* 63, 1258-1263.

- Rüb, U., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Schultz, C., Paulson, H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2002a). Degeneration of the external cuneate nucleus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Brain Res* 953, 126-134.
- Rüb, U., de Vos, R.A., Schultz, C., Brunt, E.R., Paulson, H., and Braak, H. (2002b). Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain* 125, 2115-2124.
- Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Coetzee, G.A., Irvine, R.A., Buckley, M., and Ferguson-Smith, M.A. (1995). Sequence variation and size ranges of CAG repeats in the Machado-Joseph disease, spinocerebellar ataxia type 1 and androgen receptor genes. *Hum Mol Genet* 4, 1585-1590.
- Ruiz, S., Gore, A., Li, Z., Panopoulos, A.D., Montserrat, N., Fung, H.L., Giorgetti, A., Bilic, J., Batchelder, E.M., Zaehres, H., *et al.* (2013). Analysis of protein-coding mutations in hiPSCs and their possible role during somatic cell reprogramming. *Nat Commun* 4, 1382.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Salter, M.W., and Hicks, J.L. (1994). ATP-evoked increases in intracellular calcium in neurons and glia from the dorsal spinal cord. *J Neurosci* 14, 1563-1575.
- Sambrook, J., and Gething, M.J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342, 224-225.
- Sanchez, I., Xu, C.J., Juo, P., Kakizaka, A., Blenis, J., and Yuan, J. (1999). Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22, 623-633.
- Sarkar, S., Davies, J.E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., and Rubinsztein, D.C. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 282, 5641-5652.
- Sarkar, S., Floto, R.A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L.J., and Rubinsztein, D.C. (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* 170, 1101-1111.
- Sasaki, H., Wakisaka, A., Fukazawa, T., Iwabuchi, K., Hamada, T., Takada, A., Mukai, E., Matsuura, T., Yoshiki, T., and Tashiro, K. (1995). CAG repeat expansion of Machado-Joseph disease in the Japanese: analysis of the repeat instability for parental transmission, and correlation with disease phenotype. *J Neurol Sci* 133, 128-133.
- Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Bertaux, F., Wanker, E.E., Doherty, P., Davies, S.W., and Bates, G.P. (1999). Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *Hum Mol Genet* 8, 813-822.
- Saunders, H.M., and Bottomley, S.P. (2009). Multi-domain misfolding: understanding the aggregation pathway of polyglutamine proteins. *Protein Eng Des Sel* 22, 447-451.
- Scaglione, K.M., Zavodszky, E., Todi, S.V., Patury, S., Xu, P., Rodriguez-Lebron, E., Fischer, S., Konen, J., Djarmati, A., Peng, J., *et al.* (2011). Ube2w and ataxin-3 coordinately regulate the ubiquitin ligase CHIP. *Mol Cell* 43, 599-612.
- Schatzmann, H.J. (1973). Dependence on calcium concentration and stoichiometry of the calcium pump in human red cells. *J Physiol* 235, 551-569.
- Scheel, H., Tomiuk, S., and Hofmann, K. (2003). Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum Mol Genet* 12, 2845-2852.
- Schmidt, T., Landwehrmeyer, G.B., Schmitt, I., Trottier, Y., Auburger, G., Laccone, F., Klockgether, T., Volpel, M., Epplen, J.T., Schöls, L., *et al.* (1998). An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol* 8, 669-679.
- Schmidt, T., Lindenberg, K.S., Krebs, A., Schöls, L., Laccone, F., Herms, J., Rechsteiner, M., Riess, O., and Landwehrmeyer, G.B. (2002). Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 51, 302-310.
- Schmitt, I., Brattig, T., Gossen, M., and Riess, O. (1997). Characterization of the rat spinocerebellar ataxia type 3 gene. *Neurogenetics* 1, 103-112.
- Schoepp, D.D., and Conn, P.J. (1993). Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 14, 13-20.
- Schöls, L., Amoiridis, G., Buttner, T., Przuntek, H., Epplen, J.T., and Riess, O. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol* 42, 924-932.
- Schöls, L., Amoiridis, G., Epplen, J.T., Langkafel, M., Przuntek, H., and Riess, O. (1996). Relations between genotype and phenotype in German patients with the Machado-Joseph disease mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61, 466-470.
- Schöls, L., Amoiridis, G., Langkafel, M., Buttner, T., Przuntek, H., Riess, O., Vieira-Saecker, A.M., and Epplen, J.T. (1995). Machado-Joseph disease mutations as the genetic basis of most spinocerebellar ataxias in Germany. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59, 449-450.
- Schwartz, P.H., Brick, D.J., Stover, A.E., Loring, J.F., and Muller, F.J. (2008). Differentiation of neural lineage cells from human pluripotent stem cells. *Methods* 45, 142-158.

- Seeburg, P.H., Single, F., Kuner, T., Higuchi, M., and Sprengel, R. (2001). Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channels in the mouse. *Brain Res* 907, 233-243.
- Seidel, K., Meister, M., Dugbartey, G.J., Zijlstra, M.P., Vinet, J., Brunt, E.R., van Leeuwen, F.W., Rub, U., Kampinga, H.H., and den Dunnen, W.F. (2012). Cellular protein quality control and the evolution of aggregates in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Neuropathol Appl Neurobiol* 38, 548-558.
- Sequeiros, J., and Coutinho, P. (1993). Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Adv Neurol* 61, 139-153.
- Serio, A., Bilican, B., Barmada, S.J., Ando, D.M., Zhao, C., Siller, R., Burr, K., Haghi, G., Story, D., Nishimura, A.L., *et al.* (2013). Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4697-4702.
- Shang, L., and Wang, X. (2011). AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation. *Autophagy* 7, 924-926.
- Shao, J., and Diamond, M.I. (2007). Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2, R115-123.
- Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., MacLean, G., Orkin, S.H., and Livesey, F.J. (2012). A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med* 4, 124ra129.
- Shibata-Hamaguchi, A., Ishida, C., Iwasa, K., and Yamada, M. (2009). Prevalence of spinocerebellar degenerations in the Hokuriku district in Japan. *Neuroepidemiology* 32, 176-183.
- Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M., Uchida, C., Onodera, O., Naruse, S., Kimura, T., Koide, R., Nozaki, K., Sano, Y., *et al.* (2000). Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nat Genet* 26, 29-36.
- Shin, S., Mitalipova, M., Noggle, S., Tibbitts, D., Venable, A., Rao, R., and Stice, S.L. (2006). Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions. *Stem Cells* 24, 125-138.
- Silveira, I., Coutinho, P., Maciel, P., Gaspar, C., Hayes, S., Dias, A., Guimaraes, J., Loureiro, L., Sequeiros, J., and Rouleau, G.A. (1998). Analysis of SCA1, DRPLA, MJD, SCA2, and SCA6 CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families. *Am J Med Genet* 81, 134-138.
- Simoes, A.T., Goncalves, N., Nobre, R.J., Duarte, C.B., and Pereira de Almeida, L. (2014). Calpain inhibition reduces ataxin-3 cleavage alleviating neuropathology and motor impairments in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 23, 4932-4944.
- Sinden, R.R. (1999). Biological implications of the DNA structures associated with disease-causing triplet repeats. *Am J Hum Genet* 64, 346-353.
- Siow, N.L., Xie, H.Q., Choi, R.C., and Tsim, K.W. (2005). ATP induces the post-synaptic gene expression in neuron-neuron synapses: Transcriptional regulation of AChE catalytic subunit. *Chem Biol Interact* 157-158, 423-426.
- Skinner, P.J., Koshy, B.T., Cummings, C.J., Klement, I.A., Helin, K., Servadio, A., Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (1997). Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature* 389, 971-974.
- Sladeczek, F., Pin, J.P., Recasens, M., Bockaert, J., and Weiss, S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317, 717-719.
- Slow, E.J., Graham, R.K., Osmand, A.P., Devon, R.S., Lu, G., Deng, Y., Pearson, J., Vaid, K., Bissada, N., Wetzel, R., *et al.* (2005). Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11402-11407.
- Smith, A.G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 435-462.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Sobue, G., Doyu, M., Nakao, N., Shimada, N., Mitsuma, T., Maruyama, H., Kawakami, S., and Nakamura, S. (1996). Homozygosity for Machado-Joseph disease gene enhances phenotypic severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60, 354-356.
- Solovyova, N., Veselovsky, N., Toescu, E.C., and Verkhratsky, A. (2002). Ca(2+) dynamics in the lumen of the endoplasmic reticulum in sensory neurons: direct visualization of Ca(2+)-induced Ca(2+) release triggered by physiological Ca(2+) entry. *EMBO J* 21, 622-630.
- Soong, B., Cheng, C., Liu, R., and Shan, D. (1997). Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindreds. *Ann Neurol* 41, 446-452.
- Sorrell, J.M., Baber, M.A., Brinon, L., Carrino, D.A., Seavolt, M., Asselineau, D., and Caplan, A.I. (2003). Production of a monoclonal antibody, DF-5, that identifies cells at the epithelial-mesenchymal interface in normal human skin. APN/CD13 is an epithelial-mesenchymal marker in skin. *Exp Dermatol* 12, 315-323.

- Sperlágh, B., Sershen, H., Lajtha, A., and Vizi, E.S. (1998). Co-release of endogenous ATP and [3H]noradrenaline from rat hypothalamic slices: origin and modulation by alpha2-adrenoceptors. *Neuroscience* 82, 511-520.
- Sperlágh, B., Zsilla, G., Baranyi, M., Illes, P., and Vizi, E.S. (2007). Purinergic modulation of glutamate release under ischemic-like conditions in the hippocampus. *Neuroscience* 149, 99-111.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.
- Stephenson, E.L., Mason, C., and Braude, P.R. (2009). Preimplantation genetic diagnosis as a source of human embryonic stem cells for disease research and drug discovery. *BJOG* 116, 158-165.
- Stone, T.W., and Taylor, D.A. (1978). An electrophysiological demonstration of a synergistic interaction between norepinephrine and adenosine in the cerebral cortex. *Brain Res* 147, 396-400.
- Storey, E., du Sart, D., Shaw, J.H., Lorentzos, P., Kelly, L., McKinley Gardner, R.J., Forrest, S.M., Biros, I., and Nicholson, G.A. (2000). Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia. *Am J Med Genet* 95, 351-357.
- Sudarsky, L., and Coutinho, P. (1995). Machado-Joseph disease. *Clin Neurosci* 3, 17-22.
- Sun, W.P., He, X.H., Yu, L.Q., Wang, D.P., Qin Zh, H., Fang, Q., and Wang, J. (2011). An improved polymerase chain reaction method for genetic testing of spinocerebellar ataxia type 3. *Genetika* 47, 1416-1419.
- Suzuki, M., Nagai, Y., Wada, K., and Koike, T. (2012). Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. *Biochem Biophys Res Commun* 429, 18-23.
- Tabar, V., Panagiotakos, G., Greenberg, E.D., Chan, B.K., Sadelain, M., Gutin, P.H., and Studer, L. (2005). Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nat Biotechnol* 23, 601-606.
- Tait, D., Riccio, M., Sittler, A., Scherzinger, E., Santi, S., Ognibene, A., Maraldi, N.M., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1998). Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix. *Hum Mol Genet* 7, 991-997.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takala, T., and Hayry, M. (2007). Benefiting from past wrongdoing, human embryonic stem cell lines, and the fragility of the German legal position. *Bioethics* 21, 150-159.
- Takano, H., Cancel, G., Ikeuchi, T., Lorenzetti, D., Mawad, R., Stevanin, G., Didierjean, O., Durr, A., Oyake, M., Shimohata, T., *et al.* (1998). Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am J Hum Genet* 63, 1060-1066.
- Takashima, Y., Guo, G., Loos, R., Nichols, J., Ficzb, G., Krueger, F., Oxley, D., Santos, F., Clarke, J., Mansfield, W., *et al.* (2014). Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* 158, 1254-1269.
- Takiyama, Y., Igarashi, S., Rogaeva, E.A., Endo, K., Rogaev, E.I., Tanaka, H., Sherrington, R., Sanpei, K., Liang, Y., Saito, M., *et al.* (1995). Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 4, 1137-1146.
- Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Kawashima, S., Sakamoto, H., Karube, Y., Shimazaki, H., Soutome, M., Endo, K., Ohta, S., *et al.* (1993). The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet* 4, 300-304.
- Takiyama, Y., Sakoe, K., Nakano, I., and Nishizawa, M. (1997). Machado-Joseph disease: cerebellar ataxia and autonomic dysfunction in a patient with the shortest known expanded allele (56 CAG repeat units) of the MJD1 gene. *Neurology* 49, 604-606.
- Tam, S., Spiess, C., Auyeung, W., Joachimiak, L., Chen, B., Poirier, M.A., and Frydman, J. (2009). The chaperonin TRiC blocks a huntingtin sequence element that promotes the conformational switch to aggregation. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1279-1285.
- Tang, B., Liu, C., Shen, L., Dai, H., Pan, Q., Jing, L., Ouyang, S., and Xia, J. (2000). Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. *Arch Neurol* 57, 540-544.
- Taniwaki, T., Sakai, T., Kobayashi, T., Kuwabara, Y., Otsuka, M., Ichiya, Y., Masuda, K., and Goto, I. (1997). Positron emission tomography (PET) in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 145, 63-67.
- Tarlac, V., and Storey, E. (2003). Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J Neurosci Res* 74, 406-416.
- Tasaki, I. (1963). Permeability of squid axon membrane to various ions. *J Gen Physiol* 46, 755-772.
- Teive, H.A., Munhoz, R.P., Raskin, S., and Werneck, L.C. (2008). Spinocerebellar ataxia type 6 in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 66, 691-694.

- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-117.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196-199.
- Testa, G., Borghese, L., Steinbeck, J.A., and Brustle, O. (2007). Breakdown of the potentiality principle and its impact on global stem cell research. *Cell Stem Cell* 1, 153-156.
- Thakur, A.K., Jayaraman, M., Mishra, R., Thakur, M., Chellgren, V.M., Byeon, I.J., Anjum, D.H., Kodali, R., Creamer, T.P., Conway, J.F., *et al.* (2009). Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 16, 380-389.
- Theunissen, T.W., Powell, B.E., Wang, H., Mitalipova, M., Faddah, D.A., Reddy, J., Fan, Z.P., Maetzel, D., Ganz, K., Shi, L., *et al.* (2014). Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell* 15, 471-487.
- Thibault, O., Gant, J.C., and Landfield, P.W. (2007). Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell* 6, 307-317.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Todi, S.V., Laco, M.N., Winborn, B.J., Travis, S.M., Wen, H.M., and Paulson, H.L. (2007). Cellular turnover of the polyglutamine disease protein ataxin-3 is regulated by its catalytic activity. *J Biol Chem* 282, 29348-29358.
- Todi, S.V., Winborn, B.J., Scaglione, K.M., Blount, J.R., Travis, S.M., and Paulson, H.L. (2009). Ubiquitination directly enhances activity of the deubiquitinating enzyme ataxin-3. *EMBO J* 28, 372-382.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Trottier, Y., Cancel, G., An-Gourfinkel, I., Lutz, Y., Weber, C., Brice, A., Hirsch, E., and Mandel, J.L. (1998). Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiol Dis* 5, 335-347.
- Tsai, H.F., Tsai, H.J., and Hsieh, M. (2004). Full-length expanded ataxin-3 enhances mitochondrial-mediated cell death and decreases Bcl-2 expression in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1274-1282.
- Tsai, Y.C., Fishman, P.S., Thakor, N.V., and Oyler, G.A. (2003). Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem* 278, 22044-22055.
- Tzvetkov, N., and Breuer, P. (2007). Josephin domain-containing proteins from a variety of species are active de-ubiquitination enzymes. *Biol Chem* 388, 973-978.
- Uchihara, T., Fujigasaki, H., Koyano, S., Nakamura, A., Yagishita, S., and Iwabuchi, K. (2001). Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias--triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol* 102, 149-152.
- Uchihara, T., Iwabuchi, K., Funata, N., and Yagishita, S. (2002). Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear aggregates--a morphometric study on pontine neurons of Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol* 178, 124-128.
- Urbach, A., Schuldiner, M., and Benvenisty, N. (2004). Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 635-641.
- van Alfen, N., Sinke, R.J., Zwarts, M.J., Gabreels-Festen, A., Praamstra, P., Kremer, B.P., and Horstink, M.W. (2001). Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. *Ann Neurol* 49, 805-807.
- van de Warrenburg, B.P., Sinke, R.J., Verschuuren-Bemelmans, C.C., Scheffer, H., Brunt, E.R., Ippel, P.F., Maat-Kievit, J.A., Dooijes, D., Notermans, N.C., Lindhout, D., *et al.* (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 58, 702-708.
- van Roon-Mom, W.M., Reid, S.J., Faull, R.L., and Snell, R.G. (2005). TATA-binding protein in neurodegenerative disease. *Neuroscience* 133, 863-872.
- van Schaik, I.N., Jobsis, G.J., Vermeulen, M., Keizers, H., Bolhuis, P.A., and de Visser, M. (1997). Machado-Joseph disease presenting as severe asymmetric proximal neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63, 534-536.
- Vazquez, P., Arroba, A.I., Cecconi, F., de la Rosa, E.J., Boya, P., and de Pablo, F. (2012). Atg5 and Ambra1 differentially modulate neurogenesis in neural stem cells. *Autophagy* 8, 187-199.
- Verhoef, L.G., Lindsten, K., Masucci, M.G., and Dantuma, N.P. (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet* 11, 2689-2700.
- Verkhatsky, A. (2005). Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev* 85, 201-279.
- Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukharenko, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., and Kuliev, A. (2005). Human embryonic

stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online* 10, 105-110.

Verma, R., Oania, R., Graumann, J., and Deshaies, R.J. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 118, 99-110.

Vicencio, J.M., Ortiz, C., Criollo, A., Jones, A.W., Kepp, O., Galluzzi, L., Joza, N., Vitale, I., Morselli, E., Tailler, M., *et al.* (2009). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ* 16, 1006-1017.

Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320, 97-100.

Wada, K., and Kamitani, T. (2006). UnpEL/Usp4 is ubiquitinated by Ro52 and deubiquitinated by itself. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 253-258.

Waldo, G.L., and Harden, T.K. (2004). Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* 65, 426-436.

Wang, G., Ide, K., Nukina, N., Goto, J., Ichikawa, Y., Uchida, K., Sakamoto, T., and Kanazawa, I. (1997). Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 476-479.

Wang, G., Sawai, N., Kotliarova, S., Kanazawa, I., and Nukina, N. (2000). Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum Mol Genet* 9, 1795-1803.

Wang, H., Ying, Z., and Wang, G. (2012). Ataxin-3 regulates aggresome formation of copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) by editing K63-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem* 287, 28576-28585.

Wang, Q., Li, L., and Ye, Y. (2006). Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. *J Cell Biol* 174, 963-971.

Wang, Q., and Walters, K.J. (2004). Chemical shift assignments of the (poly)ubiquitin-binding region of the proteasome subunit S5a. *J Biomol NMR* 30, 231-232.

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., *et al.* (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618-630.

Warrick, J.M., Chan, H.Y., Gray-Board, G.L., Chai, Y., Paulson, H.L., and Bonini, N.M. (1999). Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet* 23, 425-428.

Watanabe, M., Sugai, Y., Concannon, P., Koenig, M., Schmitt, M., Sato, M., Shizuka, M., Mizushima, K., Ikeda, Y., Tomidokoro, Y., *et al.* (1998). Familial spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy, peripheral neuropathy, and elevated level of serum creatine kinase, gamma-globulin, and alpha-fetoprotein. *Ann Neurol* 44, 265-269.

Watase, K., Weeber, E.J., Xu, B., Antalffy, B., Yuva-Paylor, L., Hashimoto, K., Kano, M., Atkinson, R., Sun, Y., Armstrong, D.L., *et al.* (2002). A long CAG repeat in the mouse Sca1 locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron* 34, 905-919.

Watkins, J.C. (1991). Some chemical highlights in the development of excitatory amino acid pharmacology. *Can J Physiol Pharmacol* 69, 1064-1075.

Watkins, J.C., and Jane, D.E. (2006). The glutamate story. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S100-108.

Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B.F., Burnstock, G., and Barnard, E.A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 324, 219-225.

Weber, A. (1968). The mechanism of the action of caffeine on sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* 52, 760-772.

Weeks, S.D., Grasty, K.C., Hernandez-Cuebas, L., and Loll, P.J. (2011). Crystal structure of a Josephin-ubiquitin complex: evolutionary restraints on ataxin-3 deubiquitinating activity. *J Biol Chem* 286, 4555-4565.

Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.

Weissmann, G. (2006). Stem cells, in vitro fertilization, and Jacques Loeb. *FASEB J* 20, 1031-1033.

Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Margolis, R.L., Trifiro, M.A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G.S., Propp, S.S., Bromm, M., *et al.* (1998). Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* 273, 9158-9167.

Wen, F.C., Li, Y.H., Tsai, H.F., Lin, C.H., Li, C., Liu, C.S., Lii, C.K., Nukina, N., and Hsieh, M. (2003). Down-regulation of heat shock protein 27 in neuronal cells and non-neuronal cells expressing mutant ataxin-3. *FEBS Lett* 546, 307-314.

Wentholt, R.J., Petralia, R.S., Blahos, J., II, and Niedzielski, A.S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16, 1982-1989.

Whitby, F.G., Xia, G., Pickart, C.M., and Hill, C.P. (1998). Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and

interactions with ubiquitin pathway enzymes. *J Biol Chem* 273, 34983-34991.

White, P.J., Webb, T.E., and Boarder, M.R. (2003). Characterization of a Ca<sup>2+</sup> response to both UTP and ATP at human P2Y<sub>11</sub> receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Mol Pharmacol* 63, 1356-1363.

Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., *et al.* (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol* 4, 295-305.

Williams, A.J., Knutson, T.M., Colomer Gould, V.F., and Paulson, H.L. (2009). In vivo suppression of polyglutamine neurotoxicity by C-terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) supports an aggregation model of pathogenesis. *Neurobiol Dis* 33, 342-353.

Williams, A.J., and Paulson, H.L. (2008). Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends Neurosci* 31, 521-528.

Winborn, B.J., Travis, S.M., Todi, S.V., Scaglione, K.M., Xu, P., Williams, A.J., Cohen, R.E., Peng, J., and Paulson, H.L. (2008). The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem* 283, 26436-26443.

Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., and Polo, S. (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div* 2, 11.

Woods, B.T., and Schaumburg, H.H. (1972). Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci* 17, 149-166.

Xia, H.G., Zhang, L., Chen, G., Zhang, T., Liu, J., Jin, M., Ma, X., Ma, D., and Yuan, J. (2010). Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy* 6, 61-66.

Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 971-974.

Yamada, M., Hayashi, S., Tsuji, S., and Takahashi, H. (2001). Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol* 101, 140-144.

Yamada, M., Tan, C.F., Inenaga, C., Tsuji, S., and Takahashi, H. (2004). Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30, 665-675.

Yamamoto, A., Lucas, J.J., and Hen, R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101, 57-66.

Yasuda, S., Inoue, K., Hirabayashi, M., Higashiyama, H., Yamamoto, Y., Fuyuhiko, H., Komure, O., Tanaka, F., Sobue, G., Tsuchiya, K., *et al.* (1999). Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes Cells* 4, 743-756.

Ye, Y., Meyer, H.H., and Rapoport, T.A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-656.

Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523.

Ying, Z., Wang, H., Fan, H., Zhu, X., Zhou, J., Fei, E., and Wang, G. (2009). Gp78, an ER associated E3, promotes SOD1 and ataxin-3 degradation. *Hum Mol Genet* 18, 4268-4281.

Yoo, S.Y., Pennesi, M.E., Weeber, E.J., Xu, B., Atkinson, R., Chen, S., Armstrong, D.L., Wu, S.M., Sweatt, J.D., and Zoghbi, H.Y. (2003). SCA7 knockin mice model human SCA7 and reveal gradual accumulation of mutant ataxin-7 in neurons and abnormalities in short-term plasticity. *Neuron* 37, 383-401.

Yoshizawa, T., Watanabe, M., Frusho, K., and Shoji, S. (2003). Magnetic resonance imaging demonstrates differential atrophy of pontine base and tegmentum in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 215, 45-50.

Yoshizawa, T., Yamagishi, Y., Koseki, N., Goto, J., Yoshida, H., Shibasaki, F., Shoji, S., and Kanazawa, I. (2000). Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Hum Mol Genet* 9, 69-78.

Young, M.A., Larson, D.E., Sun, C.W., George, D.R., Ding, L., Miller, C.A., Lin, L., Pawlik, K.M., Chen, K., Fan, X., *et al.* (2012). Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 10, 570-582.

Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H.U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 8, 1124-1132.

Yu, Y.C., Kuo, C.L., Cheng, W.L., Liu, C.S., and Hsieh, M. (2009a). Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease. *J Neurosci Res* 87, 1884-1891.

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

- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920.
- Zalk, R., and Shoshan-Barmatz, V. (2006). Characterization of DIDS-sensitive ATP accumulation in brain synaptic vesicles. *FEBS Lett* **580**, 5894-5898.
- Zawacki, T.M., Grace, J., Friedman, J.H., and Sudarsky, L. (2002). Executive and emotional dysfunction in Machado-Joseph disease. *Mov Disord* **17**, 1004-1010.
- Zhang, H., Li, Q., Graham, R.K., Slow, E., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2008). Full length mutant huntingtin is required for altered Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **31**, 80-88.
- Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., Zhu, H., Yu, A.D., Xie, X., Ma, D., *et al.* (2007). Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19023-19028.
- Zhang, S.C. (2006). Neural subtype specification from embryonic stem cells. *Brain Pathol* **16**, 132-142.
- Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O., and Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **19**, 1129-1133.
- Zhao, Y., Tan, E.K., Law, H.Y., Yoon, C.S., Wong, M.C., and Ng, I. (2002). Prevalence and ethnic differences of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Singapore. *Clin Genet* **62**, 478-481.
- Zhong, X., and Pittman, R.N. (2006). Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet* **15**, 2409-2420.
- Zhou, W., and Freed, C.R. (2009a). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **27**, 2667-2674.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., *et al.* (2009b). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 381-384.
- Zhou, Y.X., Takiyama, Y., Igarashi, S., Li, Y.F., Zhou, B.Y., Gui, D.C., Endo, K., Tanaka, H., Chen, Z.H., Zhou, L.S., *et al.* (1997). Machado-Joseph disease in four Chinese pedigrees: molecular analysis of 15 patients including two juvenile cases and clinical correlations. *Neurology* **48**, 482-485.
- Zimmermann, H. (1994). Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci* **17**, 420-426.
- Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* **23**, 217-247.
- Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2003). Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **21**, 319-321.
- Zweigerdt, R., Burg, M., Willbold, E., Abts, H., and Ruediger, M. (2003). Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies. *Cytotherapy* **5**, 399-413.

## 7. Eigene Publikationen

Roese-Koerner, B., Stappert, L., Berger, T., Braun, N.C., Veltel, M., **Jungverdorben, J.**, Evert, B.O., Peitz, M., Borghese, L., Brüstle, O. (2016). Reciprocal regulation between bifunctional miR-9/9(\*) and its transcriptional modulator Notch in human neural stem cell self-renewal and differentiation. *Stem Cell Rep* 7, 207-19.

Heesen, L., Peitz, M., Torres-Benito, L., Hölker, I., Hupperich, K., Dobrindt, K., **Jungverdorben, J.**, Ritzenhofen, S., Weykopf, B., Eckert, D., Hosseini-Barkooie, S.M., Storbeck, M., Fusaki, N., Lonigro, R., Heller, R., Kye, M.J., Brüstle, O., Wirth, B. (2016). Plastin 3 is upregulated in iPSC-derived motoneurons from asymptomatic SMN1-deleted individuals. *Cell Mol Life Sci* 73, 2089-104.

Peitz, M., **Jungverdorben, J.**, and Brüstle, O. (2013). Disease-specific iPS cell models in neuroscience. *Curr Mol Med* 13, 832-841.

Hucke, S., Flossdorf, J., Grutzke, B., Dunay, I.R., Frenzel, K., **Jungverdorben, J.**, Linnartz, B., Mack, M., Peitz, M., Brüstle, O., et al. (2012). Licensing of myeloid cells promotes central nervous system autoimmunity and is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Brain* 135, 1586-1605.

Koch, P.\*, Breuer, P.\*, Peitz, M.\*, **Jungverdorben, J.\***, Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tüting, T., et al. (2011). Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* 480, 543-546.

Patsch, C.\*, Peitz, M.\*, Otte, D.M., Kessler, D., **Jungverdorben, J.**, Wunderlich, F.T., Brüstle, O., Zimmer, A., and Edenhofer, F. (2010). Engineering cell-permeant FLP recombinase for tightly controlled inducible and reversible overexpression in embryonic stem cells. *Stem Cells* 28, 894-902.

\*geteilte Erstautorenschaft

---

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Oliver Brüstle danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Institut, die Begutachtung und Betreuung dieser Arbeit, die Teilnahme an der „Summerschool of Hydra“ und des Kurses „Molecular Neurology and Therapeutics“ sowie an zahlreichen internationalen Konferenzen.

Bei Herrn Dr. Michael Peitz bedanke ich mich herzlich für die unmittelbare Betreuung dieser Arbeit, die unzähligen Stunden wissenschaftlicher Diskussion, das entgegengebrachte Vertrauen bei der experimentellen Ausrichtung und die Geduld bei den Herausforderungen, die diese Arbeit bereit hielt.

Herrn Prof. Dr. Michael Hoch danke ich für seine freundliche Bereitschaft diese Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Pavel Kroupa und Herrn Prof. Dr. Hubert Schorle danke ich für ihre Mitwirkung als fachangrenzendes und fachnahes Mitglied der Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank gilt allen (auch ehemaligen) Mitarbeitern der „AG Peitz“ für Rat und Tat, moralische Unterstützung und ein Kaffeepad zur rechten Zeit. Die Arbeit war äußerst produktiv und hat schlicht und ergreifend Spaß gemacht.

Herrn PD Dr. Peter Breuer und Herrn PD Dr. Philipp Koch danke ich für die Kooperation bei der Realisierung der Veröffentlichung in *Nature*.

Herrn PD Dr. Bernd Evert danke ich für den wissenschaftlichen Austausch zu MJD.

Herrn Dr. Thorsten Schmidt für seine Kooperation und freigiebige Bereitstellung des 3UIM-spezifischen Ataxin-3-Antikörpers.

Frau Dr. Daniela Malan und Prof. Dr. Philipp Sasse danke ich für ihre Kooperation und technische Hilfe bei der spektrofluometrischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung und konfokalen Mikroskopie.

Frau Anke Leinhaas danke ich für die Durchführung der Transplantationen und Gewebeaufbereitung für den Teratom-Assay sowie den Mitarbeitern der Neuropathologie Bonn für deren histologische Verarbeitung.

Michaela Segschneider, Viola Poppe (geb. Dobberahn), Cornelia Thiele und Lisa Neumann danke ich für ihre technische Assistenz unserer Gruppe über die Jahre.

Meiner Biologielehrerin Frau Ute Wilhelms danke ich für die Weitergabe der Begeisterung an dieser Naturwissenschaft.

Dr. Ludwig Heesen, Kristina Dobrindt, Nicole Russ, Kathrin Vogt und Dr. Marc-Christian Thier danke ich für die unzähligen geteilten Stunden in der Zellkultur, deren Monotonie dadurch deutlich abnahm.

Meinen langjährigen Freunden Kathrin, Andreas, Robert, Peter, Sabrina, Lutz, Dom, Miriam, Jonas, Daniela und Thore danke ich für ihren unermüdlichen moralischen Beistand.

Allen meinen Freunden zu Hause im „Bergdorf“ danke ich dafür, dass Heimat Heimat ist und bleibt.

Mein ganz besonderer und liebevoller Dank gilt meinen Eltern Marita und Herbert, die mich immer unterstützten und deren großzügige finanzielle Förderung mir das Studium und die daran anschließende Promotion ermöglichten.