

**„Generierung eines humanen Zellmodells auf der
Basis induzierter pluripotenter Stammzellen zur
Untersuchung Epilepsie-assoziiierter Mutationen“**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Stephan Müller
aus Filderstadt

Tübingen, 2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

24.02.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Holger Lerche

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Jan Benda

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Generierung eines humanen Zellmodells auf der Basis induzierter pluripotenter Stammzellen zur Untersuchung Epilepsie-assoziiierter Mutationen“

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

0.	Abkürzungsverzeichnis.....	4
1.	Einleitung	6
1.1.	Genetisch bedingte Epilepsien	6
1.2.	SCN1A und Epilepsie.....	8
1.3.	Zelluläre und Tiermodelle der Epilepsieforschung.....	9
1.4.	hiPS-Zellen	11
1.4.1.	hiPS-Zell-basierte Modellierung humaner neurologischer Erkrankungen.....	12
1.4.2.	hiPS-Zell basierte Modellierung von Dravetsyndrom.....	13
1.5.	Zielsetzung.....	15
2.	Material/ Methoden	16
2.1.	Materialien	16
2.1.1.	Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.2.	Oligonukleotide	18
2.1.3.	Zellkulturmedien.....	20
2.1.4.	Vektoren	21
2.1.5.	Lösungen.....	21
2.2.	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.2.1.1.	Quantitative PCR (qPCR).....	23
2.2.2.	Sequenzierung von DNA	24
2.2.3.	Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.2.4.	RNA Isolierung	24

2.2.5. Gerichtete Mutagenese.....	25
2.2.5.1. Gerichtete Mutagenese PCR.....	25
2.2.5.2. Transformation von Escherichia coli.....	26
2.2.5.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli	26
2.3. Zellbiologische Methoden	27
2.3.1. Kultivierung von hIPS Zellen	27
2.3.1.1. Kultivierung auf „Feeder“ Zellen	27
2.3.1.2. Kultivierung in „mTeSr“	27
2.3.2. Kultivierung primärer humaner Fibroblasten.....	28
2.3.2.1. Gewinnung primärer humaner Fibroblasten.....	28
2.3.3. Kultivierung von SNL Zellen	28
2.3.3.1. Herstellung von „Feeder“ Zellen aus SNL Zellen	28
2.3.4. Kultivierung von HEK 293FT Zellen	29
2.3.5. Produktion von Retroviren	29
2.3.6. Kultivierung von tSA Zellen.....	30
2.4. Immunocytochemische Färbungen	30
2.5. Elektrophysiologie	32
2.5.1. „Whole cell“-„Patch clamp“ Ableitungen in generierten neuronalen Zellen..	33
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Generierung eines humanen Zellsystems zur Analyse genetischer Epilepsien auf der Basis reprogrammierter somatischer Zellen.....	35
3.1.1. Rekrutierung von Patienten.....	36
3.1.2. Reprogrammierung von humanen Hautfibroblasten.....	37
3.1.3. Differenzierung von hIPS-Zellen in neuronale Zellkulturen	43
3.1.3.1. GABAerge Differenzierung von hIPS-Zellen.....	43

3.2. Charakterisierung der erhaltenen hIPS-Zelllinien	50
3.2.1. Charakterisierung der erstellten Patientenzelllinien.....	50
3.2.2. Charakterisierung der hIPS-Zelllinien abgeleitet von K1	54
3.2.3. Charakterisierung der hIPS-Zelllinien abgeleitet von K4	57
3.3. Elektrophysiologischer Aktivitätsnachweis der hIPS-Zelllinie L1-1 MUT von Benjamin Schmid.....	59
3.4. Generierung Epilepsie assoziierter Mutationen zur Analyse in heterologen Expressionssystemen	62
4. Diskussion	64
4.1. Generierung Epilepsie assoziierter Mutationen zur Analyse in heterologen Expressionssystemen	64
4.2. Generierung eines humanen Zellsystems zur Analyse genetischer Epilepsien auf der Basis reprogrammierter somatischer Zellen.....	66
4.2.1. Reprogrammierung von humanen Hautfibroblasten.....	66
4.2.2. GABAerge Differenzierung von hIPS-Zellen.....	67
4.2.3. Charakterisierung der erhaltenen hIPS-Zelllinien.....	69
4.3. Elektrophysiologischer Aktivitätsnachweis der hIPS-Zelllinie L1-1 MUT von Benjamin Schmid.....	71
4.4. Evaluierung des etablierten Zellsystems.....	73
4.4.1. Fazit.....	79
5. Zusammenfassung.....	82
6. Literaturverzeichnis.....	84
7. Danksagung.....	89
8. Lebenslauf.....	90

0. Abkürzungsverzeichnis

AIS	Axoninitialsegment
ALS	Amyotrophe laterale Sklerose
Asn	IUPAC Aminosäurebezeichnung Beispiel: Asparagin
BDNF	„Brain Derived Neurotrophic Factor“
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
CHO	chinesische Hamster Ovarialzellen
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DMEM	„Dulbecco`s modified eagle medium“
DMSO	Dimethyl Schwefeloxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DS	Dravet Syndrom
dsDNA	Doppelstrang DNA
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	„embryoic bodies“
EEG	Elektroenzephalogramm
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
ES	embryonische Stammzellen
FKS	fetales Kälberserum
FS	Fieberkrämpfe („febrile seizures“)
FS+	Fieberkrämpfe („febrile seizures“) +
GABA	γ -Aminobutyric acid
GDNF	„Glial cell-derived neurotrophic factor“
GEFS+	genetische Epilepsie mit Fieberkrämpfen +
GFP/RFP	grün/rot fluoreszierendes Protein
hFGF2	humaner „fibroblast growth factor“2
hIPS	humane induzierte pluripotente Stammzellen
IGE/GGE	idopathisch/genetische generalisierte Epilepsie
IGF	„insulin-like growth factor“
MAP2	„microtubule-associated protein 2“
MEA	„Multielektrode-Array“
MGE	mediale ganglionische Eminenz
min	Minute
MMC	Mitomycin C
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren

NGF	„ <i>nerve growth factor</i> “
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pur	Purmorphamin
Psg.	Passage
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho kinase
rpm	„ <i>revolutions per minute</i> “
RT	Raumtemperatur
ssDNA	Einzelstrang DNA
TEVC	„ <i>two-electrode voltage clamp</i> “
VPA	Valproat
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Epilepsie zählt zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen. Das Krankheitsbild weist dabei eine sehr hohe Heterogenität bezüglich der ausgeprägten Symptome auf. Ausgelöst durch spontane synchrone Entladungen von Neuronengruppen können Symptome beobachtet werden, welche von leichten Muskelzuckungen bis hin zu schweren Bewusstseinsstörungen reichen. Generell kann man zwischen symptomatischen und idiopathischen Epilepsien unterscheiden. Symptomatische Epilepsien sind dabei meist auf Läsionen im Hirn, Tumorbildung oder ähnliches zurückzuführen und weisen meist einen klaren epileptischen Fokus auf. Diese Art der Epilepsie lässt sich häufig durch Entfernung des epileptogenen Zentrums beheben. Dagegen idiopathische Epilepsien lassen sich nicht auf strukturelle Veränderungen des Gehirns zurückführen, sind meist generalisiert und haben meist genetische Ursachen (Lerche *et al.*, 2013; Lerche *et al.*, 2005; Escayg *et al.*, 2010).

1.1. Genetisch bedingte Epilepsien

Bisher identifizierte genetische Ursachen in seltenen Fällen idiopathischer Epilepsien sind häufig Mutationen in Ionenkanalgenen. Ionenkanäle sind Transmembranproteine, welche mehr oder weniger selektive Poren für Na⁺, K⁺, Cl⁻ oder Ca²⁺-Ionen bilden. Diese Kanäle können als Reaktion auf definierte Stimuli (z.B. Spannungsänderungen oder Ligandenbindung) einen Ionenfluss über die sonst undurchlässige Zellmembran einer Zelle ermöglichen (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999). In Nervenzellen sind Ionenkanäle dafür verantwortlich die neuronale Signalweiterleitung zu ermöglichen bzw. eingehende Signale zu integrieren und ausgehende Signale zu produzieren (Kandel *et al.*, 2000). Durch Mutationen ausgelöstes fehlerhaftes Schaltverhalten (z.B. veränderte Spannungsabhängigkeit oder verhinderte Inaktivierung) von Ionenkanälen kann daher zu veränderter Signalverarbeitung und damit schlussendlich zu einem epileptischen Anfall führen. Weitere molekulare Mechanismen, wie der zellinterne Proteintransport, fehlerhafte Proteinfaltung oder die strukturelle Integrität eines Ionenkanalproteins, können auf Mutationen zurückgeführt werden, und so deren Funktion beeinflussen (Lerche *et al.*, 2013; Maljevic *et al.*, 2008; Brunklaus *et al.*, 2015).

Die Identifikation von pathogenen Epilepsie-assoziierten Mutationen erfolgte z.B. durch klassische „Linkage“ Analysen in großen Stammbäumen betroffener Familien

(z.B. Kv7.2, Biervert *et al.*, 1998), oder durch die gezielte Sequenzierung von Kandidatengenen (z.B. *SCN1A*, Claes *et al.*, 2001). Die Weiterentwicklung der klassischen Sequenziermethodik (Sanger) zur „next generation sequencing“ Methode, sowie die damit einhergehende Verfeinerung bioinformatischer Methoden, erlaubt es heutzutage größere Mengen an Sequenzdaten zu erstellen und zu analysieren. So können heute relativ einfach ganze Exome oder Genome sequenziert werden, um neue Epilepsie-assoziierte Gene, oder neue Mutationen in bekannten Epilepsiegenen zu finden. Als Beispiele seien hier *PRRT2* (Chen *et al.*, 2011; Schubert *et al.*, 2012), *SCN8A* (Veeramah *et al.*, 2012), *STX1B* (Schubert *et al.*, 2014) und *KCNA2* (Syrbe *et al.*, 2015) genannt. Die bisher identifizierten Mutationen in diesen Genen sind monogene Ursachen seltener idiopathischer Epilepsien. Solche finden sich vor allem in grossen Stammbäumen mit autosomal dominanter Vererbung oder als *de novo* Mutationen bei schwer betroffenen Kindern (epileptische Enzephalopathien) und trifft bei den häufigen idiopathischen generalisierten Epilepsien nicht zu (Heinzen *et al.*, 2012). Weiterhin sind in einzelnen Genen gefundene Mutationen in definierten Familien für die Ausprägung einer Epilepsie verantwortlich, doch zeigen sich oft im gleichen Stammbaum unterschiedliche phänotypische Ausprägungen (Oliva *et al.*, 2012; Escayg *et al.*, 2010). Dies deutet auf weitere, möglicherweise genetische Ursachen hin, welche die Ausprägung einer Epilepsie beeinflussen können. Insbesondere idiopathisch/genetisch generalisierte Epilepsien (IGE/GGE) gelten als Prototyp einer komplexen genetischen Krankheit, in der seltene und generelle genetische Variationen Einfluss auf deren Pathogenese haben können (Lerche *et al.*, 2013).

1.2. SCN1A und Epilepsie

SCN1A kodiert für die α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.1.

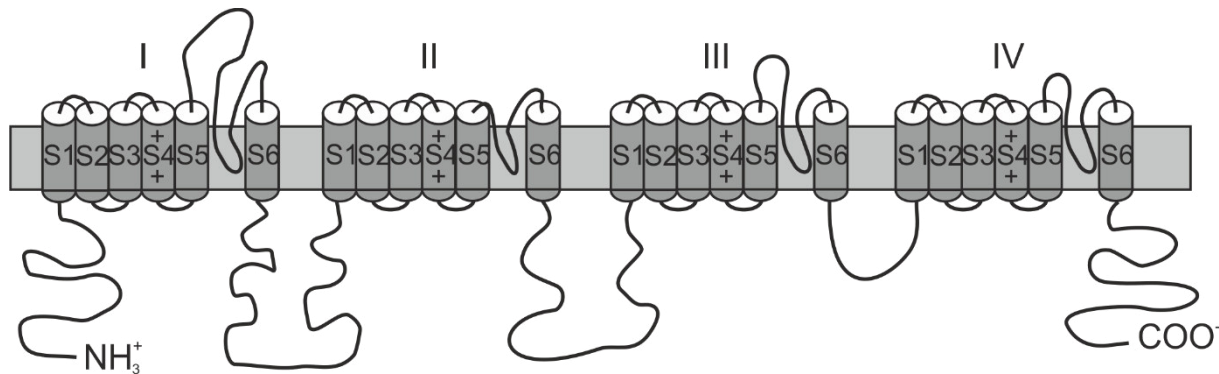


Abbildung 1: Schematisches Diagramm einer Nav1.1 α -Untereinheit, bestehend aus 4 homologen Domänen (I-IV) mit jeweils sechs Transmembrandomänen (S1-S6). Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Ulrike Hedrich

Diese besteht aus vier (I-IV) homologen Domänen mit insgesamt je sechs Transmembrandomänen (S1-S6), welche zusammen die Pore für den Natriumionenfluß bilden. Die S4 Segmente der Domänen I-IV bilden den Spannungssensor zur Aktivierung des Kanals und die intrazelluläre Schleife zwischen Segment III und IV ist für die Inaktivierung des Kanals verantwortlich (Catterall, 2000) (Abbildung 1). SCN1A wird im gesamten zentralen Nervensystem exprimiert, mit erhöhter Expression in Hippocampus, Kortex, Substantia Nigra und Hirnstamm (Gong *et al.*, 1999). Zellulär ist SCN1A nach momentanem Stand im Axoninitialsegment (AIS) γ -Aminobuttersäure (GABA) -erger Neurone (Ogiwara *et al.*, 2007; Duflocq *et al.*, 2008) lokalisiert. Am AIS eines Neurons werden Aktionspotentiale durch die Aktivierung von Natriumkanälen generiert und das Feuerungsverhalten durch weitere Ionenkanäle moduliert (Oliva *et al.*, 2012).

SCN1A ist bisher das klinisch relevanteste Epilepsie-assoziierte Gen (Mulley *et al.*, 2005). Bisher bekannte Mutationen gelten in ca. 80% aller Dravet Syndrom (DS) Fälle, sowie in ca. 10% aller „genetischen Epilepsien mit Fieberkrämpfen plus“ (GEFS+) Fälle als Auslöser der Krankheit (Mantegazza, 2011). DS zeichnet sich durch einen frühen Krankheitsbeginn (ca. ab dem sechsten Lebensmonat) mit fiebrigen und nicht fiebrigen Anfällen aus. Im weiteren Krankheitsverlauf treten myoklonische, fokale und weitere Anfallsarten sowie Ataxien auf. Ebenso weisen Patienten häufig kognitive Beeinträchtigung und Verhaltensstörungen auf (Dravet *et al.*, 2005). GEFS+ hingegen ist eine familiäre Epilepsie, welche ein breites Spektrum an Phänotypen innerhalb

eines Stammbaums aufweist. Sie reichen von fiebrigen Anfällen (FS) und fiebrigen Anfällen plus (FS+) über myoklonisch-atonische Anfälle bis hin zu mildereren Formen von DS (Oliva *et al.*, 2012). Die erste rekrutierte Patientin (P1) für diese Studie, sowie die Kontrollperson (K4) entstammen einer solchen GEFS+ Familie, mit unterschiedlichsten phänotypischen Ausprägungen (Abbildung 2).

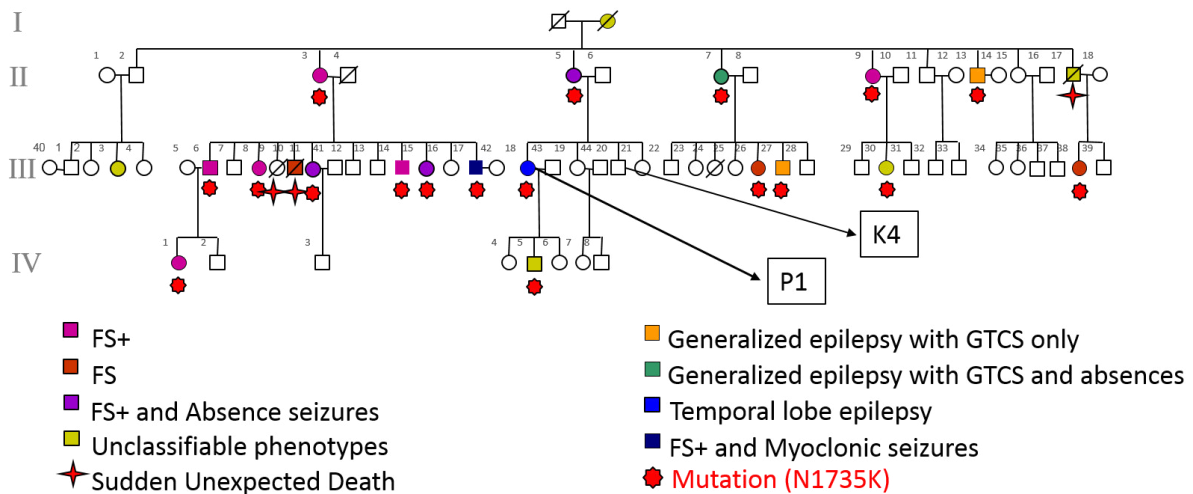


Abbildung 2: Stammbaum einer GEFS+ Familie mit indizierter phänotypischer Ausprägung. Weibliche Mitglieder der Familie werden als Kreis dargestellt, Männliche als Quadrat. Durchgestrichene Zeichen bezeichnen verstorbene Familienmitglieder. Der jeweilige Epilepsietyp ist farbig gekennzeichnet. Die Rekrutierte Patientin (P1) und Kontrolle (K4) entstammen Generation III und sind als Individuum 43 bzw. 21 gekennzeichnet (siehe Pfeile). (Abbildung modifiziert nach Liao *et al.*, unpublished)

Die Mutation (Asn1735Lys) ist trotz der breiten phänotypischen Ausprägungen in allen untersuchten betroffenen Individuen zu finden. Elektrophysiologische *in vitro* Analysen der Mutation in tSA201 Zellen zeigten eine reduzierte Stromdichte und eine langsamere Erholung nach schneller Inaktivierung gegenüber dem Wildtypgen. Hieraus lässt sie sich als „loss of function“ Mutation beschreiben (Liao *et al.*, unpublished).

1.3. Zelluläre und Tiermodelle der Epilepsieforschung

In genetischen Analysen gefundene Mutationen in Ionenkanälen oder Neurotransmitterrezeptoren werden mit Hilfe unterschiedlicher Modelle auf deren Auswirkungen untersucht. Die ersten funktionellen Untersuchungen werden dabei meist in heterologen eukaryotischen Zellsystemen durchgeführt. Hierbei werden mutierte Gene in eukaryotische Zellen eingebracht und dort von der Zelle exprimiert. Anhand von vergleichenden elektrophysiologischen Analysen von mutierten und

Wildtypkanälen können funktionelle Auswirkungen einer Mutation auf die Funktion eines Ionenkanals oder Rezeptors beschrieben werden. Für Natriumkanalmutationen sind tSA201 Zellen ein geeignetes heterologes System, da diese Zellen nur eine sehr geringe Zahl an eigenen Natriumkanälen ausbilden. Elektrophysiologischen Methoden, wie die „Patch clamp“ Technik, stellen eine schnelle Möglichkeit für funktionelle Analysen dar (Mantegazza *et al.*, 2011). Mehrere Epilepsie-assoziierte Mutationen konnten so funktionell mit der Pathogenese korreliert werden (z.B. SCN1A Asn1735Lys Liao *et al.*, unpublished; SCN2A Tyr1589Cys, Lauxmann *et al.*, 2013; SCN2A Met252Val, Liao *et al.*, 2010a/b; Lerche *et al.*, 2013). Für Kaliumkanalmutationen bzw. GABA Rezeptormutationen sind Oocyten von *Xenopus laevis* ein beliebtes Modellzellsystem. Die Oocyten können mit der „two-electrode voltage clamp“ (TEVC) Technik gut untersucht werden. Hierbei wird RNA mutierter Gene in die Oocyten injiziert und vergleichend gegen das Wildtypgen elektrophysiologisch untersucht. Die elektrophysiologischen Messungen können manuell durchgeführt werden (z.B. Asn258Ser Maljevic *et al.*, 2011), sind aber inzwischen hinreichend automatisiert worden (Robocyte, Multichannel Systems). Dies ermöglicht eine noch zeiteffektivere funktionelle Erstcharakterisierung von zu untersuchenden Mutationen (z.B. KCNA2 Ile298Thr/ Arg297Gln u.a. Syrbe *et al.*, 2014). Ein weiterer Anwendungsbereich ist die automatisierte Testung von pharmazeutisch aktiven Wirkstoffen auf einen gegebenen Ionenkanal.

Die genannten Modelle sind für eine erste Untersuchung hervorragend geeignet, allerdings lassen sich damit nur direkte Auswirkungen einer Mutation auf das Verhalten eines Proteins erkennen. Da die Modellzellsysteme keine neuronalen Zellen sind, lassen sich mögliche kompensatorische oder additive Effekte der natürlichen Umgebung des Proteins so nicht ermitteln. Sie bieten daher, wie bereits erwähnt, nur eine Möglichkeit für schnelle Erstanalysen. Dies macht sie äußerst hilfreich bei der Auswahl von Mutationen, welche lohnende Ziele für weitergehende Untersuchungen (z.B. Erstellung eines Mausmodells) darstellen (Lerche *et al.*, 2013).

Um die Auswirkungen von Mutationen neuronaler Umgebung zu untersuchen, sind bisher Mausmodelle unabdinglich. So bieten transgene Mausmodelle sowie Wildtypmäuse verschiedene Möglichkeiten die Auswirkungen einer Mutation zu untersuchen (Mantegazza und Catterall, 2012). So können z.B. primär isolierte Neuronenkulturen durch Elektroporation oder virale Infektion mit mutierten (bei Wildtypneuronen) oder auch Wildtyp (bei z.B. Neuronen heterozygoter „knockout“

Mäuse) Kanälen transfiziert werden. Mutationen können so in einer neuronalen Umgebung auf ihre Auswirkungen untersucht werden. Weiterhin bieten Mausmodelle die Möglichkeit die Auswirkungen von Mutationen direkt im Gehirn zu untersuchen. So wurde z.B. die *SCN1A* Mutation Arg1648His (Escayg *et al.*, 2000) anhand von Hirnschnitten einer *Knock-in* Maus untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die inhibitorischen Neurone in Kortex, Thalamus und Hippocampus eine deutliche Reduktion der Feuerfrequenz aufweisen. Eine verminderte Inhibition eines neuronalen Netzwerks führt dabei zu einer Hyperexzitabilität des Systems und kann so zu einem epileptischen Anfall führen (Hedrich *et al.*, 2014). Ein weiterer Vorteil von Mausmodellen ist die Möglichkeit Anfallsverhalten *in vivo* zu studieren. So erlaubt die Video EEG Technik die visuelle Aufnahme (Kamera) eines Anfalls bei gleichzeitiger Messung der resultierenden Hirnströme (implantierte EEG Elektroden) (Kondratiuk *et al.*, 2015). Mausmodelle bieten also eine gute Möglichkeit, um Einblicke in pathogene Mechanismen von Epilepsie-assoziierten Mutationen zu bekommen. Neben der generellen Frage, inwiefern Erkenntnisse muriner Modelle auf den Menschen übertragbar sind, zeigen Mutationen in unterschiedlichen genetischen Hintergründen verschiedener Mausmodelle unterschiedliche phänotypische Ausprägung und Anfallsschwellenwerte (Frankel *et al.*, 2001; Mistry *et al.*, 2014).

1.4. hIPS-Zellen

Genetisch bedingte Epilepsien sind wie beschrieben komplexe Krankheiten, deren Pathogenese von vielen Faktoren, z.B. genetischen Hintergründen (Frankel *et al.*, 2001) sowie individuell kompensatorischen oder additiven Effekten bei einzelnen Betroffenen (Klassen *et al.*, 2011), abhängt. Ein Zellmodell, welches es erlaubt, Epilepsie-assoziierte Mutationen in humanen neuronalen Zellen zu untersuchen, welche zusätzlich den gleichen genetischen Hintergrund aufweisen wie der Mutationsträger, ist daher eine sinnvolle Addition zu den bestehenden Modellsystemen.

Die Erstellung eines solchen Modells wird durch die von Takahashi und Yamanaka (2006) vorgestellte Methodik des Reprogrammierens somatischer Zellen in einen pluripotenten Zustand ermöglicht. Diese sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (IPS) können, ähnlich wie embryonale Stammzellen (ES) (Magnussen *et al.*, 1982), in Zellen aller drei Keimblätter eines Organismus entwickelt werden (Takahashi *et al.*, 2006). Initial wurde die Reprogrammierbarkeit an adulten

Fibroblasten von Mäusen gezeigt, konnte aber schon kurze Zeit später auch für humane Hautfibroblasten etabliert werden (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Die Reprogrammierung somatischer Zellen erfolgt durch die forcierte Überexpression von vier definierten Transkriptionsfaktoren: OCT3/4(Pou5f1), Sox2, Klf4 und c-Myc. Diese werden z.B. durch virale Transduktion in die somatischen Zellen eingebracht und bewirken eine Rückentwicklung der Zellen in einen naiven pluripotenten Grundzustand (Takahashi *et al.*, 2007).

Humane Fibroblasten aus Hautbiopsien sind bisher die verlässlichste Quelle für reprogrammierbare Zellen. Ihre Entnahme und spätere Kultivierung sind verlässlich und gut etabliert (Raab *et al.*, 2014). Eine weitere einfach zugängliche Ressource für reprogrammierbare Zellen sind Keratinocyten, welche von der Haarwurzel eines Patienten isoliert werden können. Deren Kultivierung ist allerdings schwierig und kostenintensiv (Raab *et al.*, 2014). Inzwischen wurde das Repertoire an reprogrammierbaren Zelltypen um ein Vielfaches erweitert. So konnten z.B. isolierte Zellen aus peripherem Blut (Loh *et al.*, 2009) oder Urin (Wang *et al.*, 2013) erfolgreich reprogrammiert werden. Allerdings ist es notwendig, dass der Organismus des Spenders vorher medikamentös stimuliert wird, um die gewünschten Zelltypen (CD34+) ernten zu können (Loh *et al.*, 2009).

Bis zum momentanen Zeitpunkt ist es noch unklar, ob aus induzierten Stammzellen generierte Zellen genauso benannt werden können wie ihr natürliches Pendant. Also z.B., ob neuronal differenzierte Zellen aus induzierten Stammzellen als generierte Neuronen oder als Neuronen-ähnliche Zellen zu bezeichnen sind. Diese Frage soll nicht innerhalb dieser Arbeit geklärt werden. Aus diesem Grund werden die neuronal differenzierten Zellen in dieser Arbeit, in Übereinstimmung mit einem Großteil bisher veröffentlichter Originalarbeiten, als generierte Neurone und nicht als Neuronen-ähnliche Zellen bezeichnet (z.B. Jiao *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013b; Seibler *et al.*, 2011; Reinhardt *et al.*, 2013; Higurashi *et al.*, 2013).

1.4.1. hIPS-Zell-basierte Modellierung humaner neurologischer Erkrankungen

Humane IPS Zellen (hIPS) bilden eine geeignete Grundlage um Zellmodelle für neurologische Erkrankungen zu erstellen. Zum einen können Zellen eines Patienten zur Reprogrammierung genutzt werden, wodurch die resultierende hIPS-Zelllinie den gleichen genetischen Hintergrund hat wie der Patient. Zum anderen stellen hIPS-

Zellen eine fast unbegrenzte Quelle für verschiedenste Zelltypen (je nach Differenzierungsprotokoll) dar (Mattis und Svendsen, 2011).

Bisherige krankheitsbezogene Studien mit hIPS abgeleiteten neuronalen Zellen umfassen unter anderem:

- Spinale muskuläre Atrophie: Es konnte gezeigt werden, dass aus patientenspezifischen hIPS Zellen Motoneurone generiert werden können, welche krankheitsspezifische Entwicklungsdefizite aufweisen und pharmazeutisch behandelbar sind (Ebert *et al.*, 2009).
- Familiäre Dysautonomie: In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Neurogenese aus patientenspezifischen hIPS-Zellen gegenüber der Neurogenese aus Kontrolllinien beeinträchtigt ist (Lee G *et al.*, 2009).
- Amyotrophe laterale Sklerose (ALS): In dieser Studie konnte die Beteiligung des Proteins VAPB an der Pathogenese von ALS gezeigt werden (Mitna-Neto *et al.*, 2011).
- Autismus: Durch vergleichende Genexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass ähnliche neuronale Prozesse an der Entwicklung von Angelmann- und Dup15q-Syndrom beteiligt sind (Germain *et al.*, 2014).
- Parkinson: Für Parkinson wurden bisher drei Studien veröffentlicht. So zeigten dopaminerge Neuronen generiert aus hIPS-Zellen eines Patienten mit einem Defekt in *PINK1* verminderte Rekrutierung von Parkin an die Mitochondrien (Seibler *et al.*, 2011). Eine weitere Studie mit hIPS-Zellen, generiert von einem Patienten mit einer *LRRK2* Mutation (Gly2019Ser), zeigte erhöhte Sensitivität generierter dopaminergener Neuronen gegen oxidativen Stress (Nguyen *et al.*, 2011). Als eine mögliche Ursache der erhöhten Sensitivität konnte eine veränderte Genexpression und eine damit einhergehende Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs identifiziert werden (Reinhardt *et al.*, 2013).

1.4.2. hIPS-Zell basierte Modellierung von Dravetsyndrom

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden insgesamt vier Studien veröffentlicht, in denen generierte Neuronen, abgeleitet von Patientenspezifischen hIPS-Zellen, als Modell zur Untersuchung von Dravetsyndrom benutzt wurden. Alle Patienten dieser Studien trugen Epilepsie-assoziierte Mutationen im *SCN1A* Gen:

- Higurashi *et al.*, 2013: In dieser Studie wurden hIPS-Zelllinien eines Dravetpatienten mit einer Stop-Mutation (Arg1645*) anhand eines vorrangig GABAergen (>50%) Differenzierungsprotokolls zu Neuronen differenziert. In vergleichenden elektrophysiologischen Messungen mit generierten Kontrollneuronen wurde eine Funktionsabnahme bezüglich der Ausbildung von Aktionspotentialen in GABAergen generierten Neuronen beobachtet.
- Jiao *et al.*, 2013: In dieser Studie wurden hIPS-Zellen von Fibroblasten eines Dravetpatienten (Phe1415Ile) und eines GEFS+ Patienten (Gln1923Arg) erstellt und anschließend glutamaterg differenziert. Zusätzlich wurden Fibroblasten von beiden Patienten für eine direkte Umwandlung in Neurone verwendet. Ein elektrophysiologischer Vergleich der Neurone beider Umwandlungsmethoden zeigte eine höhere Differenzierungseffektivität und Maturierung der aus hIPS-Zellen generierten Neurone, gegenüber direkt umgewandelten generierten Neuronen. Weiterhin ergab ein Vergleich der generierten Patientenneurone mit generierten Neuronen aus Kontroll hIPS-Zellen eine Hyperexzitabilität (führt zu erhöhter Aktionspotentialfeurrate) der generierten Patientenneurone. Die Hyperexzitabilität der generierten Neurone des Dravetpatienten war dabei stärker ausgeprägt als bei generierten Neuronen des GEFS+ Patienten.
- Liu *et al.*, 2013b: Grundlage dieser Studie waren, anhand eines GABAergen Differenzierungsprotokolls, generierte Neurone aus patientenspezifischen hIPS-Zelllinien zweier Dravetpatienten („splicing“ Mutation IVS14+3A>T und Stop-Mutation Tyr325*). „Phänotypisch pyramidale“ (morphologisch) und „phänotypisch bipolare“ (morphologisch) Neuronen der Patientenneurone wurden elektrophysiologisch, gegeneinander und mit den korrespondierenden generierten Kontrollneuronen verglichen. Die Patientenneurone zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Phänotypen. Allerdings wiesen beide Phänotypen gegenüber den generierten Kontrollneuronen eine Hyperexzitabilität und eine erhöhte Na⁺ Stromdichte auf.
- Chen *et al.*, 2014: In dieser Publikation wurde eine Kontroll hIPS-Zelllinie durch Genmanipulation mit TALEN-Technologie in eine artifizielle Dravetpatienten hIPS-Zelllinie (Ala5768Gly) umgewandelt. Beide hIPS-Zelllinien wurden charakterisiert und die elektrophysiologische Aktivität generierter Neurone gezeigt. Vergleichende elektrophysiologische Analysen wurden nicht durchgeführt.

1.5. Zielsetzung

Die Erforschung der pathologischen Auswirkungen von Epilepsie-assoziierten Mutationen erfolgte zum bisherigen Zeitpunkt fast ausschließlich in heterologen Modellsystemen. Die Methodik der Reprogrammierung somatischer Zellen (Takahashi *et al.*, 2007) in einen induzierten pluripotenten Zustand ermöglicht es, das bisherige Methodenspektrum um ein humanes Zellmodell zu erweitern. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Grundlagen zur Erstellung eines patientenspezifischen Zellmodells auf der Basis reprogrammierter somatischer Zellen im Labor zu verankern. Zu diesem Zweck sollten zunächst die notwendigen Zellkulturtechniken für die Erstellung und Kultivierung von hIPS-Zelllinien etabliert werden. Nach der Erstellung und Charakterisierung selbst erzeugter hIPS-Zelllinien sollten diese neuronal differenziert werden, um elektrophysiologische Untersuchungen anhand humaner generierter Neurone zu ermöglichen. Hierzu sollte ein GABAerges Differenzierungsprotokoll (Liu *et al.*, 2013a) etabliert werden, anhand dessen generierte neuronale Zellpopulationen mit elektrophysiologischer Aktivität erstellt werden können.

Zusätzlich sollten neugefundene Epilepsie-assoziierte Mutationen für die Analyse in heterologen Expressionssystemen zur Verfügung gestellt und analysiert werden.

2. Material/ Methoden

2.1. Materialien

Verwendete generelle Verbrauchsmaterialien wurden bestellt bei den Firmen Greiner BioOne (Frickenhausen), Nunc GmbH (Wiesbaden), Eppendorf (Hamburg) und Sarstedt (Nürnbrecht).

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Reagenz/Chemikalie	Firma	Anwendung
Accutase	Life Technologies (ThermoFisher Scientific)	unverdünnt
Ampicilin (50 ng/μl)	Sigma	1:100
B-27	Gibco (ThermoFisher Scientific)	1:50
BDNF (10 ng/μl)	Peprotech	1:1000
cAMP 1 μM	Peprotech	1:1000
DMEM	Biochrom, Berlin	CHO-Zellen
DMEM/Ham`s F-12	Biochrom, Berlin	Zelldifferenzierung
DMSO	AppliChem	5%
Fötale Kälberserum	PAN-Biotech, Aidenbach	1:10 in DMEM
GDNF (10 ng/μl)	Peprotech	1:1000
Glutamax	Gibco (ThermoFisher Scientific)	1:100
hFGF2 (10 ng/μl)	Peprotech	1:2000
IGF (10 ng/μl)	Peprotech	1:1000
Kanamycin (50 ng/μl)	Sigma	1:100
Knockout DMEM	Gibco (ThermoFisher Scientific)	hIPS- Zellen
Laminin (1 mg/mL)	Sigma-Aldrich	1:200 in PBS
L-Glutamin (200 mM)	PAA Laboratories, Cölbe	1:100
Matrigel	Stemcell	1:50 - 1-100 in HES
Mirus2020	Mirus	Transfektionsreagenz
Mitomycin C (1 mg/ml)	AppliChem	1:10
mTeSR	Stemcell Technologies	hIPS-Zellen
N2	Gibco (ThermoFisher Scientific)	1:100
Na-Pyruvat (100 mM)	PAA Laboratories, Cölbe	1:100
Neurobasal	Gibco (ThermoFisher Scientific)	Zelldifferenzierung
Non-essential Aminoacids (NEAA)	Biochrom, Berlin	1:100
OptiMEM	Gibco (ThermoFisher Scientific)	Transfektionen
Orange G	Sigma	Ladepuffer
Para-Formaldehyd	AppliChem	4% in PBS
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Gibco (ThermoFisher Scientific)	Waschschritte
Purmorphamin (10 mM)	Peprotech	1,3 μl in 10 ml

Penicilin/Streptomycin (10000 µg/ml)	Biochrom, Berlin	1:500 - 1:100
peqGold Range Mix DNA-Ladder	Peqlab Biotechnologie GmbH	unverdünnt
Poly-D-Lysin 50 mg/ml	Sigma-Aldrich	1:50 in HBSS
ProLong Gold Antifade	Life Technologies (ThermoFisher Scientific)	unverdünnt
RedSafe	iNtRON Biotechnology	7µL/100ml
ROCK Inhibitor Y 27632 10 mM	Ascent Scientific	1:1000
Trypsin Inhibitor	Gibco (ThermoFisher Scientific)	unverdünnt
Serum Replacement	Gibco (ThermoFisher Scientific)	hIPS- Zellen
β-mercaptoethanol (0,17%)	AppliChem	0,17% in PBS
TBE (10x)	AppliChem	1:10
Trans-it	Mirus	Transfektionsreagenz
TritonX	AppliChem	0,2% in PBS
Trypsin (10x)	Gibco (ThermoFisher Scientific)	1:50 in HBSS
Valproat (VPA) (50 mM)	Sigma	1:50

2.1.2. Oligonukleotide

qPCR

Oligonukleotid	Sequenz-F (5'-3')	Sequenz-R (5'-3')
OCT3/4vir	cccagggccccatttgggtacc	ttatcgtcgaccactgtgctgctg
Sox2vir	ggcaccctggcatggctctggctc	ttatcgtcgaccactgtgctgctg
Klf4vir	acgatcgtggccccggaaaaggacc	ttatcgtcgaccactgtgctgctg
c-Mycvir	caacaaccgaaaatgcaccagccccag	ttatcgtcgaccactgtgctgctg
OCT3/4endogen	ggctctcccattgcatcaaac	catggcctgcccggttatta
Nanog	cctgtatttggggcctg	gacagtctccgtgtgaggcat
GAPDH	ctggtaaagtggatattgttgcct	tggaatcatattggaacatgtaaac

Gerichtete Mutagenese

SCN1A

Oligonukleotid	Sequenz-F (5'-3')	Sequenz-R (5'-3')
E602K	ctttgaggataacaagaccgtagaga	tctctacggctcttgttatcctcaag
E289V	gcttccttgaggtacatagtatagaa	ttctatactatgtacctcaaggaagc

SCN2A

Oligonukleotid	Sequenz-F (5'-3')	Sequenz-R (5'-3')
F207S	atgtaacagaatctgtaaacctagg	cctaggtttacagattctgttacat
K908E	tgtaagagctacgaagaatgtgtgctg	cagacacacattcttctgtagctctacca
R28C	ctgctattgaacaatgcattgcagaagag	ctcttctgcaatgcattgttcaatagcag
T773I	gcattgtcttaataatactcttcatggctatg	catagccatgaagagtatatttaagacaatgc
G899S	ttgctggtcagcatgcagctctttg	caaagagctgcatgctgaccacagcaa
P1622S	aagtattttgtgctctaccctgttcgagtgatc	gatcactcggaacagggtagaggacacaaaactt
V423L	aatttgatcttggtctgggtggccatggcc	ggccatggccaccagagccaagatcaaatt
K1933M	cccttctctccatttctgatttgc	gacaaatcagaaatggaagacaaaagg
Y1589C	tcgttactactgtttcactattggat	atccaatagtgaacagtaacga

KCNA2

Oligonukleotid	Sequenz-F (3'-5')	Sequenz-R (3'-5')
P405L	tattgccttactgggtccctgtc	gacagggaccagtaaggcaata
R189Q	tgcccatctccaggatgagaatga	tcattctcatctggaagatgggca
R297Q	ccgtgcatccagttggaagagt	actttaccaactggatgacacgg

Sequenzierungen

Oligonukleotid	Nav1.1	Nav1.2
seq1-F/seq-1R	ggagacccaagcttggtaccgagc	aattcctgtaaaggtatactcc
seq2-F	gtgtttatgacaatgagtaaccctcc	cattatgtgcacgattcttac
seq3-F	gattcaagatatcattatttctgg	atggtactactttcaatagg
seq4-F	gtgctaaggaaagaagaaatcgg	caagagacttcagtggtgc
seq5-F	gttgacagcttctgccagagg	gaatgggaagatgcatagc
seq6-F	gcctggtagaacttgactcg	cttcacaggatcttcacagc
seq7-F	gtggataggatgcacaaaggag	ggtgattggaaatctagtgg
seq8-F	gtacaaagattcaagtgtgtc	caactagttcatctgaaggc
seq9-F	gacctctaagagccttatctcg	caaatccctaacactaag
seq10-F	gaagtttgagggtcaagacatc	ctttcattgggtcatcata
seq11-F	ctttgatgatgtcccttctg	gattggccgaatcctacgtc
seq12-F	gaaccgcctctcaatctgccac	gagatggttctatgaggtttgg

2.1.3. Zellkulturmedien

<u>hES-Medium (500ml):</u>	
Serum Replacement	83,5 ml
NEAA	5ml
L-Glutamin (200mmol)	5ml
β -Mercaptoethanol (0,17%)	0,9ml
DMEM Knockout	Ad 500ml

<u>NSC-Medium (500ml):</u>	
DMEM/F12	235ml
Neurobasal	235ml
N2	5ml
B27	10ml
Glutamax	5ml
NEAA	5ml

<u>SNL-Medium (500ml):</u>	
DMEM	445ml
FKS	50ml
NEAA	5ml

<u>TSA-Medium (500ml):</u>	
DMEM	445ml
FKS	50ml
L-Glutamin	5ml

<u>FT-Medium (500ml):</u>	
DMEM	445ml
FKS	50ml
L-Glutamin	5ml

<u>hIPS-Einfriermedium (25ml):</u>	
hES-Medium	21,25ml
Serum Replacement	2,5ml
DMSO	1,25ml

2.1.4. Vektoren

Liste verwendeter Vektoren:

Name	Anzuchtresistenz	Verwendung	Herkunft
pMXs-hc-Myc	Ampicillin	Virenproduktion	Dr. Benjamin Schmid
pMXs-hklf4	Ampicillin	Virenproduktion	Dr. Benjamin Schmid
pMXs-hSox2	Ampicillin	Virenproduktion	Dr. Benjamin Schmid
pMXs-hOct3/4	Ampicillin	Virenproduktion	Dr. Benjamin Schmid
pCMV-VSV-G	Ampicillin	Virenproduktion	Dr. Benjamin Schmid
pUMVC	Kanamycin	Virenproduktion	Dr. Benjamin Schmid
pcDNA3.1 (SCNA2/KCNA2)	Ampicillin	heterologe Expression	Dr. Snezana Maljevic
pCDM8 (SCNA1)	Kanamycin	heterologe Expression	Dr. Snezana Maljevic

2.1.5. Lösungen

Lösungen für elektrophysiologische Messungen neuronaler Zellen:

<u>Extrazelluläre Lösung</u>		<u>Intrazelluläre Lösung</u>	
KCL	8,09 mmol	KCL	153,33 mmol
MgCl ₂	6 mmol	MgCl ₂	1 mmol
HEPES	10 mmol	HEPES	10 mmol
CaCl ₂	1 mmol	EGTA	5 mmol
Glucose	10 mmol		
NaCl	142 mmol		
pH-Wert	7,3 (KOH)	pH-Wert	7,4 (NaOH)

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR ist die Abkürzung für Polymerase-Chain-Reaction, zu Deutsch Polymerase Kettenreaktion. Die PCR ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation von DNA. Grundsätzlich besteht eine PCR aus der Wiederholung von drei Schritten:

1. Denaturierung: Während dieses Schrittes wird Doppelstrang DNA (dsDNA) durch Erhitzen auf 95°C in Einzelstrang DNA (ssDNA) aufgetrennt.
2. Annealing: In diesem Schritt erfolgt die Anlagerung von Primern an die ssDNA. Dies geschieht bei einer Temperatur von ca. 50°- 60°C und variiert je nach Beschaffenheit des Primers.
3. Elongation: Dies ist der essentielle Schritt einer PCR. Nun wird die ssDNA durch DNA-Polymerasen zu dsDNA komplementiert, was bei einer Temperatur von 68°C - 72°C geschieht.

Durch Wiederholung dieser drei Schritte werden neusynthetisierte Stränge in der nächsten Wiederholung als neue Matrize verwendet. Aus diesem Grund wird diese Reaktion als Kettenreaktion bezeichnet. PCR-Reaktionen dieser Arbeit wurden nach folgendem Grundschemata ausgeführt:

<u>PCR-Ansatz:</u>		<u>PCR-Programm:</u>	
1 µl	Matrize (Template)	1. 95 °C	30 s
2,5 µl	10-fach Puffer	2. 95 °C	30 s
0,5 µl	dNTPs (10 mM)	3. 52°C	30 s
0,5 µl	<i>Vorwärts</i> -Primer (50 pM)	4. 72 °C	1000 bp/min
0,5 µl	<i>Rückwärts</i> -Primer (50 pM)	5. 72 °C	10 min
0,125 µl	DNA-Polymerase	6. 4 °C	∞
<u>19,875 µl</u>	MilliQ™ Wasser		
Σ 25 µl			Die Schritte 2.- 4. wurden 17- 32x wiederholt.

Die Dauer der Elongationsphase variierte je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz und eingesetzter Polymerase.

2.2.1.1. Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative PCR dient der Bestimmung der relativen Expression eines Gens in Bezug zu der Expression eines Haushaltsgens (z.B. GAPDH). Hierzu wird isolierte mRNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend wird die vorhandene cDNA mittels PCR zyklisch vermehrt. Nach jedem Zyklus wird die DNA-Menge mittels Fluoreszenz bestimmt. qPCR Analysen der vorliegenden Arbeit wurden auf einem ABI7000 Lightcycler der Firma Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) nach folgendem Schema durchgeführt:

qPCR-Programm

1. 50°C 30 min Reverse Transkription
2. 95°C 15 min Transkriptase Inaktivierung / Polymerase Aktivierung
3. 94°C 15 s PCR Schritte 3-5 35x wiederholen. Fluoreszenzmessung
4. 54°C 30 s jeweils am Ende von Schritt 5
5. 72°C 30 s

Es wurde das „QuantiTect SYBR Green Kit“ von Qiagen (Penzberg), bzw. das „SensiFast SYBR Lo-ROX One-Step-Kit“ von Bioline (Luckenwalde), nach Vorschrift des Herstellers verwendet.

2.2.2. Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Anschließende Sequenzanalysen wurden mit dem Programm CLC free Workbench 7 durchgeführt.

2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente der Länge nach aufgetrennt werden. Je nach Größe der DNA-Fragmente verwendet man Agarosegele mit Agarosekonzentrationen von 0,5%-2%. Da DNA ein gleichmäßig negativ geladenes Phosphatrückgrad besitzt, läuft sie im Agarosegel bei angelegter Spannung von der Kathode zur Anode. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen DNA und Gelmatrix laufen DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel, wodurch eine Auftrennung nach Größe erfolgt. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines mitlaufenden Standards (peqGold Range Mix DNA-Ladder 10000bp, Peqlab Biotechnologie GmbH).

Es wurden 0,8%-ige und 1,8%-ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Laufpuffer aufgekocht und mit RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) versetzt. Als Ladepuffer wurde Orange G verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von ~70 mA.

2.2.4. RNA Isolierung

RNA wurde mit Hilfe des „RNA-Isolation II Kit“ von Bioline (Luckenwalde) nach Vorschrift des Herstellers isoliert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung am „Nanodrop“™ Spektrophotometer (ThermoFisher Scientific).

2.2.5. Gerichtete Mutagenese

2.2.5.1. Gerichtete Mutagenese PCR

Mit Hilfe einer PCR können gerichtete Mutationen in einem Gen eingeführt werden, so dass ein gezielter Aminosäureaustausch oder das Einführen eines Stopp-Codons an gewünschter Stelle möglich ist. Man macht sich dabei zunutze, dass während einer PCR Primer trotz leichter Basenveränderung mit der Matrize hybridisieren können. Für die PCR wurden komplementäre Vorwärts- und Rückwärts-Primer erstellt, welche gegenüber der Originalsequenz um genau eine Base verändert wurden.

Die verwendeten Primer hatten ca. 30 Nukleotide Länge, wobei das veränderte Triplet mittig lag. Mit den erstellten Primern wurde eine PCR mit der zu verändernden Ursprungsmatrize durchgeführt. Dabei erfolgte bei jedem PCR-Schritt der Einbau des gewünschten Sequenzunterschiedes durch Verlängerung des Primers zu einem neuen DNA-Strang. Die Mutagenese wurde entweder mit dem „QuickChange“ PCR Mutagenese Kit (Agilent Technologies) oder dem LongRange PCR-Mix (Promega) nach folgendem Schema durchgeführt:

<u>Quikchange-PCR:</u>		<u>LongRange-PCR:</u>	
H ₂ O	13 µl	H ₂ O	6,2 µl
Puffer (10x)	2 µl	PCR-MIX (2x)	10 µl
Primer R/F (10 pm)	0,6 µl	Primer R/F (10 pm)	0,6 µl
DNTP´s	0,4 µl		
Quiksolution	1,2 µl	Quiksolution	0,6 µl
Template (50 ng/µl)	2 µl	Template (50 ng/µl)	2 µl
PfuULtra Polymerase	0,2 µl		
Gesamt	20 µl	Gesamt	20 µl

PCR-Programm:

1. 95 °C	5 min	Da die Ursprungsmatrize aus <i>Escherichia coli</i> isoliert wurde, lag diese methyliert vor und wurde durch Restriktion des PCR-Ansatzes mit dem methylierungsabhängig schneidenden Enzym DpnI entfernt. Anschließend wurde der PCR-Ansatz in <i>E.coli</i> -Zellen transformiert und auf einem entsprechenden Selektionsmedium
2. 95 °C	45 s	
3. 52-62°C	30 s	
4. 68 °C	1000 bp/min	
5. 68 °C	10 min	
6. 4 °C	∞	

angezogen. Die Plasmid DNA der gewachsenen Kolonien wurde anschließend isoliert und zur Überprüfung der Mutagenesereaktion sequenziert.

2.2.5.2. Transformation von *Escherichia coli*

Ein Aliquot kompetenter Bakterienzellen wurde auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA versetzt (1 µl Plasmid für Rücktransformation; 5 µl Plasmid einer Mutagenese) und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Hiernach erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden, anschließend wurde der Transformationsansatz mit 250 µl SOC-Medium versetzt und unter Schütteln (1 h / 37°C / 220 rpm) inkubiert, um die plasmidkodierte Antibiotikaresistenz auszubilden. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 30°C für Natrium- und 37°C für Kaliumkanäle angezogen.

Die Transformation von pcDM8 Plasmiden wurden mit dem Bakterienstamm Top10/P3 (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Die Transformation von pcDNA3.1 Plasmiden erfolgte in den Bakterienstamm Top10 (ThermoFisher Scientific). Plasmide mit Natriumkanalgenen wurden bei Raumtemperatur bzw. bei 30°C (1-2 Tage) angezogen. Alle anderen Konstrukte bei 37°C (24 Stunden) .

2.2.5.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (~ 150-900 ng/µl) wurde mit dem „High Pure Plasmid Isolation Kit“ von Roche (Basel) oder dem „Plasmid Prep Mini Spin Kit“ von GE Healthcare (München) durchgeführt. Im großen Maßstab (~ 600-3000 ng/µl) wurde das „Pure Link HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit“ (ThermoFisher Scientific) verwendet. Die Anzucht der Bakterienkultur variierte je nach Plasmidkonstrukt (siehe Abschnitt 2.2.5.2). Die Isolation erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

2.3. Zellbiologische Methoden

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem luftbefeuchtetem Inkubator bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Die adhärenenten Zellkulturen wurden mit Trypsin abgelöst (wenn nicht anderweitig beschrieben) und in Suspension genommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer Zählkammer.

2.3.1. Kultivierung von hIPS Zellen

Im Allgemeinen wurden hIPS in „six-well“ Platten kultiviert und einmal wöchentlich gesplittet. Hierzu wurden 10-15 hIPS Klone manuell, mit einer Pippettenspitze unter einem Zellkulturmikroskop, zerteilt und vorsichtig aufgesaugt. Anschließend wurden die aufgenommenen Klone vorsichtig trituriert und in ein neues „six-well“ ausgesät. Ein Medienwechsel erfolgte alle 20- 32 Stunden.

2.3.1.1. Kultivierung auf „Feeder“ Zellen

Die generellen Erhaltungskulturen wurden auf „Feeder“ Zellen kultiviert. Diese Zellen geben unter FGF2 Zugabe Stoffe in das Medium, welche die Pluripotenz der Stammzellen erhalten (Takahashi *et al.*, 2007). Die „Feeder“ Zellen wurden zu je 2×10^6 pro ganze „six-well“ Platte (ca. 300000/well) 24 Stunden vor dem Splitten der hIPS Zellen ausgesät. Die Kulturen wurden in hES-Medium (siehe Abschnitt 2.1.3) + hFGF2 gehalten.

2.3.1.2. Kultivierung in „mTeSr“

„mTeSr“ ist ein Stammzellvollmedium der Firma Stemcell Technologies. Es enthält alle Stoffe welche für den Erhalt der Pluripotenz benötigt werden. Es ermöglicht daher eine Kultivierung von Stammzellen ohne „Feeder“ Zellen und ermöglicht eine Bearbeitung der hIPS-Zellen ohne den Einfluß von Fremdzellen. Dies ist wichtig für z.B. die Differenzierung der Stammzellen bzw. bei der Isolation von RNA. Eine Woche vor Beginn eines anstehenden Versuches wurden die zu verwendenden hIPS-Linien in „mTeSr“ kultiviert. Hierzu wurden die hIPS-Zellen in, mit Matrigel (1:50 in hES) beschichtete, „six-well“ Platten gesplittet.

2.3.2. Kultivierung primärer humaner Fibroblasten

Humane Fibroblasten wurden auf T-25 Zellkulturflaschen in DMEM + 10% FKS konfluent angezogen. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zu je 250000 in neue T-25 Flaschen gesplittet. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

2.3.2.1. Gewinnung primärer humaner Fibroblasten

Die humanen Fibroblasten wurden aus Hautstücken mit einem Durchmesser von ca. 5 mm isoliert. Diese wurden von einem Arzt (Felicitas Becker) in der Klinik biopiert und zur Weiterverarbeitung ins Labor gegeben. Hier wurde sorgfältig das Fettgewebe sowie die Epidermis mit einer Schere entfernt. Das verbleibende Gewebe wurde dann in DMEM + 20% FKS + Penicillin/Streptomycin (1:10) gewaschen und anschließend in ca. 1- 2 mm² große Stücke zerteilt. Die so erhaltenen Gewebestücke wurden dann in einer 35 mm² Schale ausgelegt und für ca. 20 Minuten steril getrocknet, wodurch ein Abschwimmen des Hautstückes verhindert wurde. Anschließend wurden die Hautstücke mit DMEM + 20% FKS vorsichtig geflutet, ohne diese komplett zu bedecken. Nach ca. 3-8 Tagen begannen nun Fibroblasten aus den Hautstücken auszuwachsen. Wenn diese Konfluenz erreichten, wurden die Hautstücke in eine neue 35 mm² Schale umgesetzt. Die ausgewachsenen Fibroblasten wurden in eine T-25 Flasche ausgesät, in DMEM + 10% FKS bis zur Konfluenz angezogen und dann in Aliquots von 200000 - 300000 Zellen/ml in DMEM + 20% FCS + 5% DMSO eingefroren.

2.3.3. Kultivierung von SNL Zellen

SNL Zellen sind immortalisierte embryonische Mausfibroblasten. Diese wurden in T-75 Flaschen in SNL Medium (siehe Abschnitt 2.1.3) zu ca. 80 % Konfluenz angezogen und mindestens einmal pro Woche zu je 800000 Zellen passagiert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

2.3.3.1. Herstellung von „Feeder“ Zellen aus SNL Zellen

Die SNL Zellen wurden als „Feeder“ Zellen für hIPS Zellen eingesetzt. Hierzu wurden SNL Zellen für 2 Stunden mit Mitomycin C behandelt, welches den Spindelapparat der Zellen zerstört und diese somit teilungsunfähig macht. Die Teilungsunfähigkeit verhindert später ein Überwachsen der hIPS Kolonien durch „Feeder“ Zellen.

Zur Herstellung von „Feeder“ Zellen wurden ca. 6 - 8 T-75 Flaschen mit je ca. 800000 Zellen beschickt und zu ca. 80 - 90% Konfluenz angezogen. Anschließend wurden je 3 Millionen Zellen in 25 cm Schalen gesplittet. Nach 18 - 24 Stunden wurden die Zellen für 2 Stunden mit Mitomycin C behandelt und anschließend mit PBS gewaschen. Abschließend wurden Aliquots von je 2 - 6 Millionen Zellen/ 1.5 ml in SNL-Medium (20% FKS) zur späteren Verwendung, in Stickstoff eingefroren.

2.3.4. Kultivierung von HEK 293FT Zellen

HEK 293FT ist eine Zelllinie, welche zur Produktion von Retroviren und Lentiviren verwendet wird. Die Zelllinie wurde bei Bedarf in FT-Medium (siehe Abschnitt 2.1.3) auf T-75 Flaschen angezogen und mit Genitacin selektioniert. Nach der Selektionierung wurde die Zelllinie wöchentlich, ab einer Konfluenz von 70 - 80 %, zu je 500000 Zellen passagiert. Zur Virenproduktion wurden ca. 700000 Zellen je Transfektionsansatz 24 Stunden vor einer Transfektion in einer 10 cm Schale ausgesät.

2.3.5. Produktion von Retroviren

Retroviren dienen als Träger zur permanenten Insertion von DNA in einen Zielorganismus. Die verwendeten Viren wurden immer frisch vor einer Transduktion produziert. Hierzu wurden Zellen der Virenproduktionslinie HEK 293FT mit Plasmiden transfiziert, welche für die viralen Strukturkomponenten (Matrix und Hüllproteine/pCMV-VSV-G), einen Reverse Transkriptase Apparat (pUMVC), sowie das zu transferierende Gen (pMXs-h-OCT4/-Sox2/-Klf4/-c-MYC) kodierten. Für die Transfektion wurden je Transfektionsansatz 4,05 µg pUMVC, 450 ng pCMV-VSV-G, sowie 4,5 µg Transfergen mit 32 µl Mirus 2020 in 1,2 ml OptiMEM für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz zu den vorbereiteten Hek-293FT Zellen gegeben und 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel. Nach weiteren 24 Stunden konnten die Viren geerntet werden, welche von den produzierenden Zellen ins Medium abgegeben wurden. Hierzu wurde das Medium abgenommen, für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand durch einen 0,45 µm PVDF-Filter in ein VIVASPIN (100000MW/Stemcell Technologies) Röhrchen filtriert. Nun wurde der Überstand für weitere 40 Minuten bei 4000 rpm/ 4°C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde dann zur Infektion von Fibroblasten benutzt.

2.3.6. Kultivierung von tSA Zellen

Die Anzucht von tSA Zellen erfolgte auf T-75 Zellkulturflaschen in tSA-Medium. Die Zellen wurden einmal pro Woche zu je 700000 Zellen passagiert. Zusätzlich wurde einmal pro Woche das Medium gewechselt. tSA Zellen wurden für die elektrophysiologische Untersuchung von Natriumkanalmutationen verwendet. Hierzu wurden 700000 Zellen (je Transfektionansatz) in 35 mm Schalen gesplittet und nach folgendem Schema transfiziert:

- 250 µl OptiMEM + 7,5 µl Mirus TransIT 5 Minuten Inkubation
- + 2 µg α Untereinheit
- + 1 µg β_1 Untereinheit 20 Minuten Inkubation
- + 1 µg β_2 Untereinheit

Anschließend wurde der Transfektionsmix zu den Zellen gegeben und diese nach 24 Stunden für Versuche verwendet.

2.4. Immunocytochemische Färbungen

Immunocytochemische Färbungen dienen dem Nachweis bzw. der Lokalisation von Proteinen. Hierzu werden die Proben (Zellen/Proteinlysate) zunächst mit einem primären Antikörper inkubiert. Dieser bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein. Anschließend werden die Proben mit einem sekundären Antikörper inkubiert, welcher spezifisch an den primären Antikörper bindet. Der sekundäre Antikörper ist z.B. mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert, welche schließlich die indirekte Detektion des nachzuweisenden Proteins ermöglichen.

Für immunocytochemische Färbungen wurden die zu untersuchenden Zellen auf $\varnothing 22$ mm Deckgläschen in „24-well“ Platten angezogen. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst zweimal für je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 4% PFA-Lösung fixiert (15-20 Minuten). Nach weiteren vier Waschschritten mit PBS (je 5 Minuten) erfolgte eine Inkubation (1 Stunde/RT) mit Ziegenserum (3% in PBS + 0,2% Triton), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach weiteren vier Waschschritten wurde der Erstantikörper, in entsprechender Verdünnung, in PBS + 0,2% Triton + 1% Ziegenserum über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Zweitantikörper wurde am nächsten Tag eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach die Zellkerne mit DAPI angefärbt (2 Minuten/RT). Nach jeder Inkubation erfolgten jeweils vier Waschschrritte mit PBS. Die Deckgläschen wurden anschließend auf Objektträger übertragen und in „ProLong Gold Antifade“ eingebettet. Fluoreszenzmikroskopische

Aufnahmen wurden an einem Axioplan2 Mikroskop von Zeiss mit den Objektiven Plan-APOCHROMAT 20x/0.8 und Plan-NEOFLUAR 5x/0.15 durchgeführt.

Liste verwendeter primärer Antikörper:

Name	Wirt	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
β3-Tubulin	Maus	1:1000	Abcam	ab78078
β3-Tubulin	Hase	1:1000	Covance	MRB-435P
GABA	Hase	1:5000	Sigma-Aldrich	A2052
GAD67	Maus	1:500	Millipore	MAB5406
Map2	Huhn	1:500	Abcam	ab5392
Nkx2.1	Maus	1:500	Millipore	MAB5460
OCT3/4	Hase	1:500	Abcam	ab5740
Nanog	Hase	1:250	Abcam	ab21624
Sox2	Hase	1:200	Abcam	ab97959
SSEA4	Maus	1:500	Abcam	ab16287
Tra-1-81	Maus	1:500	Millipore	MAB4381

Liste verwendeter sekundärer Antikörper:

Farbstoff	Produktionswirt-Zielwirt	Verdünnung	Firma
AlexaFluor 488	Ziege anti-Hase/ -Maus/ -Huhn	1:250	Life Technologies (ThermoFisherScientific)
AlexaFluor 568	Ziege anti-Hase/ -Maus	1.250	Life Technologies (ThermoFisherScientific)

2.5. Elektrophysiologie

Die elektrophysiologische Ableitung von Ionenkanalströmen über eine biologische Membran ist ein Standardverfahren zur Beschreibung von Ionenkanaleigenschaften. Hierzu zählen z.B. die Bestimmung des Maximalstroms, der Öffnungszeit des Kanals bzw. die Beschreibung der Kinetik von Aktivierung und Deaktivierung oder der Strom-Spannungsabhängigkeit des Kanals. Daher eignet sich diese Methode hervorragend um die Eigenschaften mutierter Ionenkanäle zu beschreiben, und so Einsicht in molekulare Mechanismen von Ionenkanalerkrankungen zu erlangen.

Es gibt verschiedene elektrophysiologische Methoden, beispielhaft seien hier die „*Patch clamp*“ Methode und die „*two electrode voltage clamp*“ (TEVC) Methode genannt. TEVC wird zur Messung von Ionenkanal abhängigen Membranströmen eingesetzt. Als Modellzelle werden Oocyten verwendet. Für eine Messung werden zwei Glaspipetten in die Zelle eingestochen. Eine Elektrode dient der Bestimmung des Membranpotentials, die andere Elektrode dient der Strominjektion um ein beliebiges Membranpotential einzustellen. Aufgezeichnet werden die resultierenden Membranströme. Bei der „*Patch clamp*“ Methode wird eine, mit einer Messelektrode versehene, Glaspipette an eine Zelle geführt. Nun wird eine elektrisch dichte Verbindung zwischen Zellmembran und Glaspipette erzeugt. In dieser sogenannten „*cell-attached*“ Konfiguration kann die Membran unter der Pipette auf einem Potential gehalten und resultierende Ionenströme gemessen werden. Öffnet man die Zelle durch Unterdruck, erreicht man die „*whole cell*“ Konfiguration. In dieser Konfiguration werden Ströme von der gesamten Zellmembran, unter durch die Messlösungen definierten Bedingungen, abgeleitet. Innerhalb dieser Konfiguration gibt es zwei verschiedene Modi. Im „*voltage clamp*“ Modus kann die angelegte Spannung bestimmt und manipuliert werden. Durch Manipulation der angelegten Spannung kann die Öffnung von spannungsabhängigen Kanälen gesteuert und die resultierenden Ionenströme aufgezeichnet werden. Im „*current clamp*“ Modus kann die Zelle mit definierten Stromstärken injiziert werden, um resultierende Spannungsänderungen zu messen. Weiterhin kann die Zelle durch Strominjektion auf einem bestimmten Haltepotential gehalten werden, um spontane Spannungsänderungen der Zelle aufzuzeichnen.

2.5.1. „Whole cell“-„Patch clamp“ Ableitungen in generierten neuronalen Zellen

Zum Nachweis elektrophysiologischer Aktivität von generierten Neuronen wurde überprüft, ob die generierten Zellen Na^+ und K^+ Ströme aufweisen und in der Lage sind Aktionspotentiale auszubilden. Hierzu wurden die generierten Neurone bei Raumtemperatur abgeleitet. Dazu wurde ein Axopatch 200B Verstärker (Axon Instruments) verwendet, um die Daten mittels der pClamp 8.2 Software aufzuzeichnen. Die Signale wurden mit einer Abtastrate von 20 kHz (Na^+ und K^+ Ströme) bzw. 100 kHz (Aktionspotentiale) aufgezeichnet und mit 5 bzw. 10 kHz gefiltert. Die Glaspipetten wurden aus dünnwandigen Borosilikatglasröhrchen gezogen und hatten einen Widerstand von 2,2-3 M Ω . Die Messlösungen (siehe Abschnitt 2.1.5) hatten eine Osmolarität von 290-295 mOsm/kg. Zur Visualisierung der Zellen wurde ein AxioVert A1 Mikroskop von Zeiss mit A-Plan10x/0.25 und ACHROSTIGMA 32x/0.4 Objektiv verwendet.

Zum Nachweis von Na^+ und K^+ Strömen wurden die Zellen im „*voltage clamp*“ Modus, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV, in 24 Schritten zu je +5 mV (Startpunkt -60 mV) auf ein Potential von 60 mV gebracht und die resultierenden Ströme aufgezeichnet (Abbildung 3). Weiterhin wurden postsynaptische Potentiale in kontinuierlichen „*voltage clamp*“ Messungen bei einer angelegten Spannung von -70 mV durchgeführt.

Um die Fähigkeit der Aktionspotentialausbildung generierter Neurone zu überprüfen, wurden „*current clamp*“ Messungen durchgeführt. Hierzu wurde die Zellen auf -70 mV eingestellt und Ströme (Startpunkt -0,02 nA) mit steigender (0,01 nA) Stromstärke (Endpunkt 0,12 nA) über eine Dauer von 800ms appliziert und die resultierenden Spannungsänderungen aufgezeichnet (Abbildung 3). Bei der Messung dopaminergischer Neuronen (Abschnitt 3.1.4) lag der Startpunkt der Strominjektion bei -0,1 nA und der Endpunkt bei 0,2 nA, die Stromstärke wurde um jeweils 0,05 nA inkrementiert. Weiterhin wurde die spontane Ausbildung von Aktionspotentialen anhand kontinuierlicher „*current clamp*“ Ableitungen, bei einem Haltepotential entsprechend des Ruhepotentials der Zelle, festgestellt.

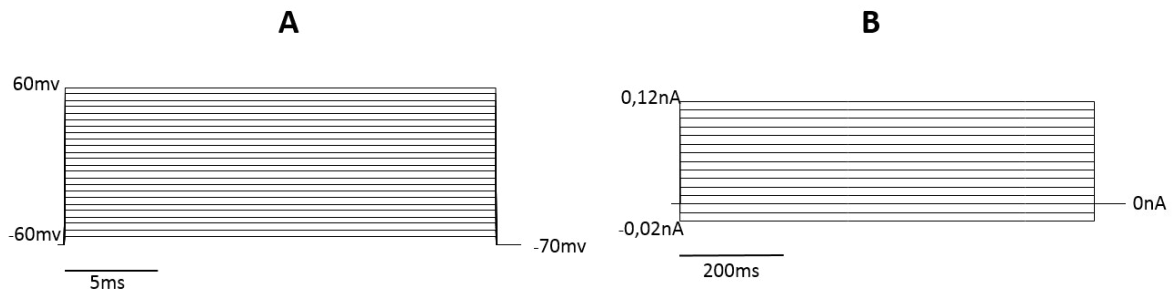


Abbildung 3: Verwendete Messprotokolle zum Nachweis elektrophysiologischer Aktivität generierter Neurone. A: „voltage clamp“ Messprotokoll zum Nachweis von Na⁺ und K⁺ Strömen. Inkrementierende (+5 mV) Spannungsänderungen von -60 mV bis 60 mV B: „current clamp“ Messprotokoll zum Nachweis evozierter Aktionspotentiale durch Strominjektion. Inkrementierende Strominjektion (+0,01 nA) von -0,02 nA bis 0,12 nA.

3. Ergebnisse

3.1. Generierung eines humanen Zellsystems zur Analyse genetischer Epilepsien auf der Basis reprogrammierter somatischer Zellen

Ursachen und Mechanismen genetisch bedingter Epilepsien werden momentan hauptsächlich in heterologen Systemen untersucht. Zur Validierung bestehender und zukünftiger Forschungserkenntnisse bezüglich ihrer humanen Anwendbarkeit sollte in dieser Arbeit ein humanbasiertes Zellsystem etabliert werden. Abbildung 4 zeigt ein im Rahmen dieser Arbeit entstandenes Schema zur Erstellung eines hIPS-Zell basierten Modells.

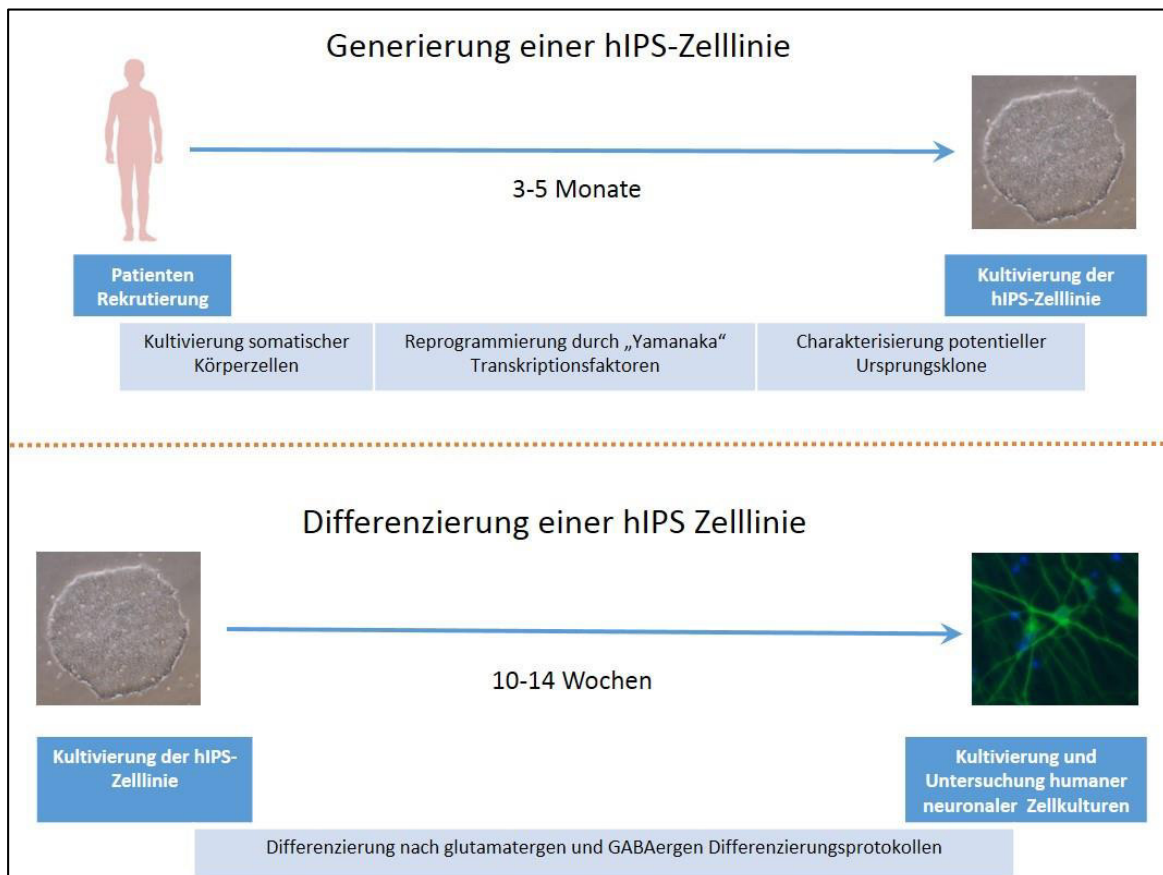


Abbildung 4: Schema zur Erstellung eines hIPS-Zell basierten humanen neuronalen Zellmodells zur Untersuchung Epilepsie-assoziiierter Mutationen. 1.Phase: Generierung von humanen Stammzelllinien durch Rekrutierung von Patienten und Kontrollspendern, der Entnahme sowie Kultivierung von Hautfibroblasten, deren Reprogrammierung sowie der Charakterisierung erhaltener hIPS-Klone. 2.Phase: Differenzierung erhaltener hIPS-Zelllinien nach neuronalen Differenzierungsprotokollen sowie deren anschließende elektrophysiologische Analyse.

Die Erstellung war im Wesentlichen in zwei Phasen unterteilt:

1. Die Erzeugung von hIPS-Zellen aus somatischen Körperzellen.
2. Die Differenzierung von hIPS-Zellen in generierte neuronale Zellen.

Weiterhin war jede Phase unterteilt in mehrere Zwischenschritte. Im Folgenden werden die einzelnen Zwischenschritte jeder Phase anhand der erzielten Ergebnisse erläutert und nachvollzogen.

3.1.1. Rekrutierung von Patienten

Die Rekrutierung von Patienten und Kontrollpersonen erfolgt im Rahmen der Epilepsie Ambulanz in Tübingen sowie über Kooperationspartner der AG Lerche. Nach intensiver ärztlicher Aufklärung und dem schriftlichen Einverständnis des Patienten erfolgt die Probenentnahme (Hautbiopsie/Haarwurzelbiopsie) durch einen Arzt. Rekrutierung, Probenentnahme sowie Verwendung des erhaltenen Materials innerhalb dieser Arbeit wurden genehmigt durch die Ethikkommission des UKT (Ethikantrag: „Etablierung eines humanen *ex-vivo* Zellkultur-Modells aus „reprogrammierten“ Fibroblasten (iPS-Zellen) von Patienten mit genetisch verursachten Epilepsiesyndromen“).

Tabelle 1: Rekrutierte Patienten sowie Kontrollen

	Bezeichnung	Gene	Mutation	Phenotyp
Patienten	P1	<i>SCN1A</i>	Asn1735Lys	GEFS+
	P2	<i>KCNQ2</i>	Arg325Gln	Epileptische Enzephalopathie
	P3	<i>SCN2A</i>	Ala263Val	Epilepsie + Ataxie
	Bezeichnung	Herkunft	Verwendung	
Kontrollen	K1	Rekrutiert	Übung/ gleiches Alter und Geschlecht wie P1	
	K2	Biobank	Protokoll Optimierung	
	K3	Biobank		
	K4	Rekrutiert	Bruder von P1 ohne Mutation	

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Reprogrammierung von P1 sowie K1 als allgemeine Kontrolle und K4 als familiäre Kontrolle zu P1. P2 und P3 werden momentan von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe anhand der etablierten Methodik (Abbildung 4) bearbeitet.

3.1.2. Reprogrammierung von humanen Hautfibroblasten

Eines der Hauptprobleme dieser Arbeit war die Etablierung einer reproduzierbaren Reprogrammierung von Fibroblasten. Diese wird daher an dieser Stelle detailliert dargelegt. Zunächst wurden die Fibroblasten des Spenders kultiviert (Abschnitt 2.3.2.1) wobei die Anzahl an Passagen (Psg.) möglichst gering gehalten wurde (ca. bis Psg. 15). Fibroblasten haben insgesamt sieben mikroskopisch unterscheidbare Entwicklungsstufen. Dabei wird unterschieden zwischen mitotischen (MF I/II/III) und postmitotischen (PMF IV-VII) Stadien (Bayreuther *et.al*, 1988; Abbildung 5). Die verschiedenen Entwicklungsstufen sind immer gleichzeitig in einer Kultur vorhanden, allerdings verändert sich deren Anteil mit steigender Passagenzahl. Kulturen niedriger Passagenzahl (Psg.10-15) weisen einen höheren Anteil von Fibroblasten in mitotischen Phasen auf als Kulturen höherer Passagenzahl. Dort erhöht sich der Anteil an postmitotischen Fibroblasten (Rodemann *et al.*, 1996).

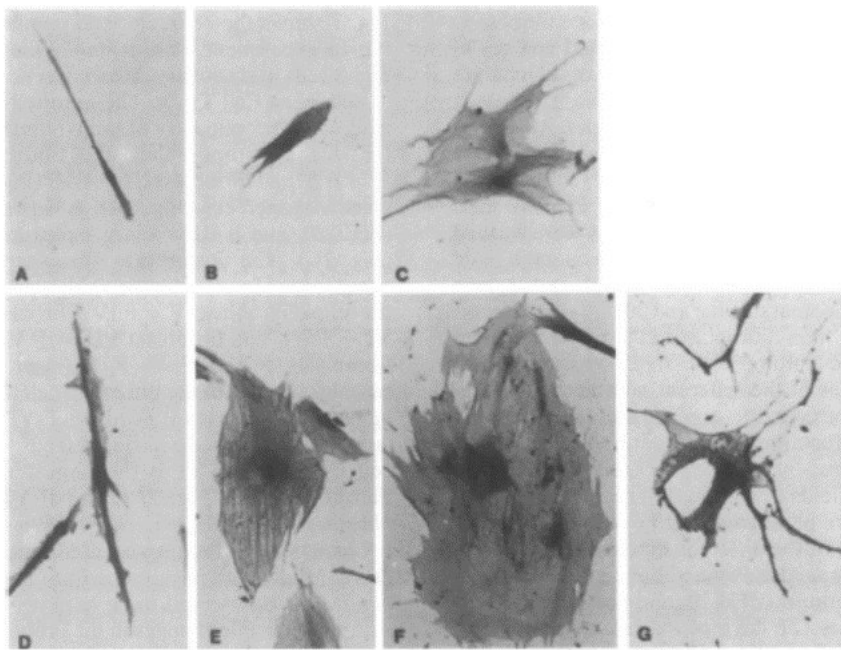


Abbildung 5: **Fibroblastenmorphotypen nach Bayreuther et.al 1988**; (A),(B),(C) Mitotisches Fibroblastenstadium I,II,III (D),(E),(F),(G). Postmitotisches Fibroblastenstadium IV,V,VI, VII

Die besten Ergebnisse für eine Reprogrammierung, gemessen an der Anzahl erhaltener potenzieller hIPS-Zell Klone, wurden mit Fibroblasten der Stufe MF I und MF II erzielt. Der Zustand der zu reprogrammierenden Kultur wurde daher stets vorher mikroskopisch festgestellt.

Für eine Reprogrammierung wurden 24 Stunden vor Infektion ca. 30000-50000 Fibroblasten je „well“ einer „six-well“ Platte ausgesät (DMEM/10% FKS).

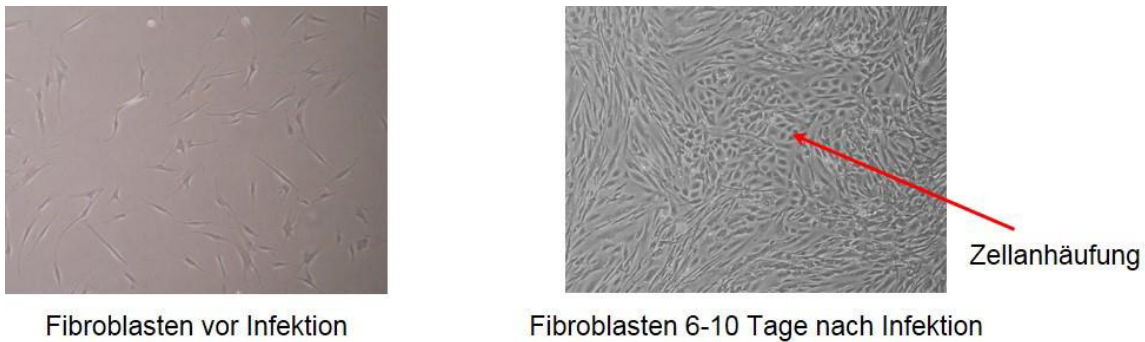


Abbildung 6: Fibroblasten (10x) vor und nach Infektion. Pfeil zeigt Anhäufung von Zellen mit veränderter Zellmorphologie

Der frisch präparierte Virus (Abschnitt 2.3.2) wurde zugegeben und für 18- 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt (DMEM + 10% Serumreplacement + 50 mM VPA) und dies alle 1- 2 Tage wiederholt. Nach ca. 6-10 Tagen konnte eine morphologische Veränderung der Fibroblasten beobachtet werden (Abbildung 6). Die veränderten Kulturen wurden nun trypsinisiert, trituriert und in 145cm² Schalen, auf „Feeder“ Zellen (3 Millionen) in hES-Medium + hFGF2 + Rockinhibitor ausgesät. Nach weiteren ca. 14- 21 Tagen, unter täglichem Medienwechsel (hES + hFGF2), konnte die Bildung von potentiellen hIPS-Zell Klonen beobachtet werden (Abbildung 7).

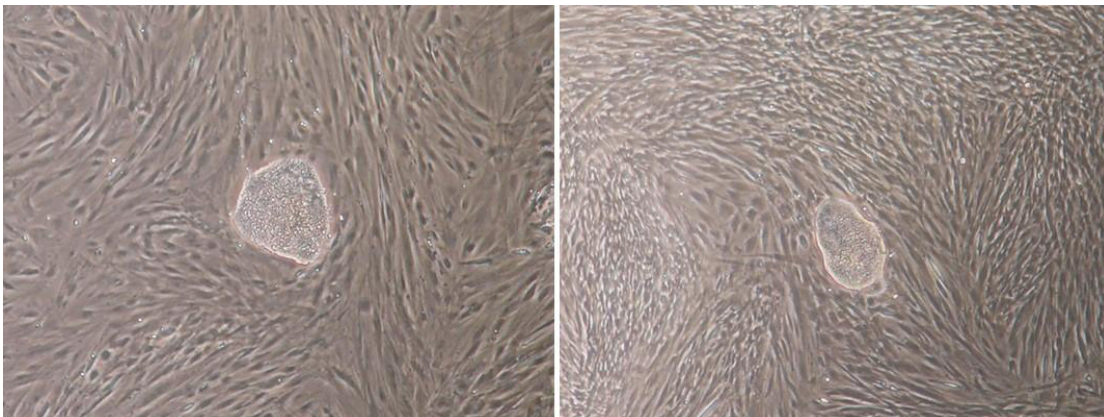


Abbildung 7: Potentielle hIPS-Zell Klonen auf SNL-„Feeder“ Zellen (10x) (Einzelkolonien)

Diese Klone wurden dann einzeln gepickt, leicht trituriert und in eine „12-well“ Platte ausgesät (ein Klon pro „well“). Die Klone wurden anschließend für weitere 1- 2 Wochen vermehrt. Dabei wurde stets das Verhalten der Klone beobachtet und dokumentiert. Viele Klone entwickelten abnormale Zellvermehrung (Abbildung 8) und wuchsen nicht mehr an oder starben einfach ab.

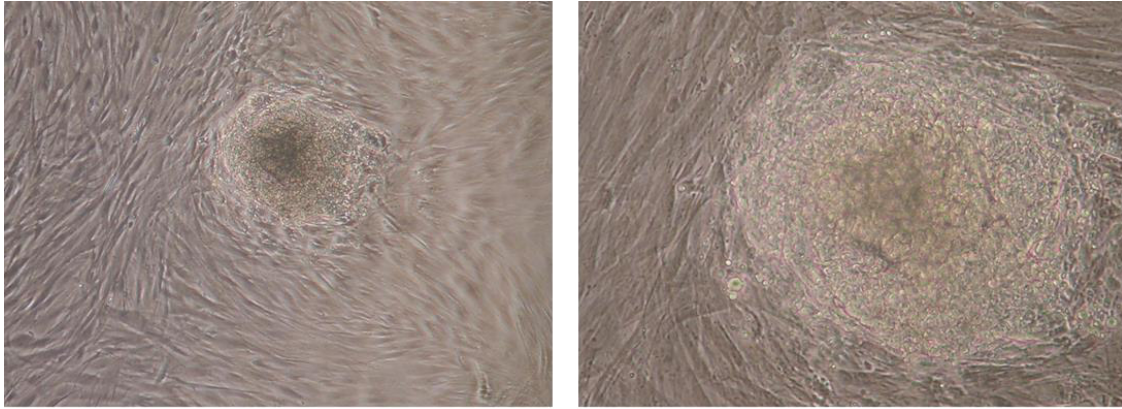


Abbildung 8: hIPS-Zell Klone mit abnormalem Wuchsverhalten (10x links / 20x rechts)

Die verbliebenen Klone wurden, nachdem sie ca. 4-6 Kolonien gebildet hatten, in „six-well“ Platten weiter vermehrt. Hierbei wurden immer alle Kolonien mit einer Pipette geteilt und umgesetzt. Das erste Umsetzen der Klone in eine „six-well“ Platte wurde als erste Passage definiert. Nach weiteren fünf Psg. (Psg. 6) wurden ca. 30-40 Kolonien eines Klons zur Absicherung eingefroren (hIPS-Einfriermedium; Abschnitt 2.1.3).

Ab Psg. zehn wurden die potentiellen hIPS-Zell Klone via qPCR analysiert (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Die Umwandlung der Fibroblasten in den Stammzellzustand wird zunächst durch die Überexpression der viralen Transkriptionsfaktoren angetrieben. Ist die Umwandlung abgeschlossen, wird die Expression endogener Stammzellmarker (*Nanog/OCT3/4*) hochreguliert, während die Expression der viral eingebrachten Faktoren von der Zelle durch retrovirale Reprimierung gehemmt wird (Yao *et al.*, 2004). Dieser Wechsel des Expressionsprofils war in früheren Psg. (bis Psg. sechs) noch nicht vollständig abgeschlossen, konnte aber ab Psg. zehn beobachtet werden (Abbildung 9). Klone, welche das gewünschte Expressionsprofil aufwiesen, wurden zur Karyogramm Analyse geschickt (Abbildung 10). Die Analysen wurden von der humangenetischen Abteilung des UKT durchgeführt (Frau Dr. Holzmann-Mau). Tabelle 2 zeigt eine Liste aller Klone, welche in den Charakterisierungsprozess aufgenommen wurden, sowie den Abschnitt der Darstellung der Charakterisierung. Nach erfolgter Charakterisierung wurden die Klone erneut zur Absicherung eingefroren.

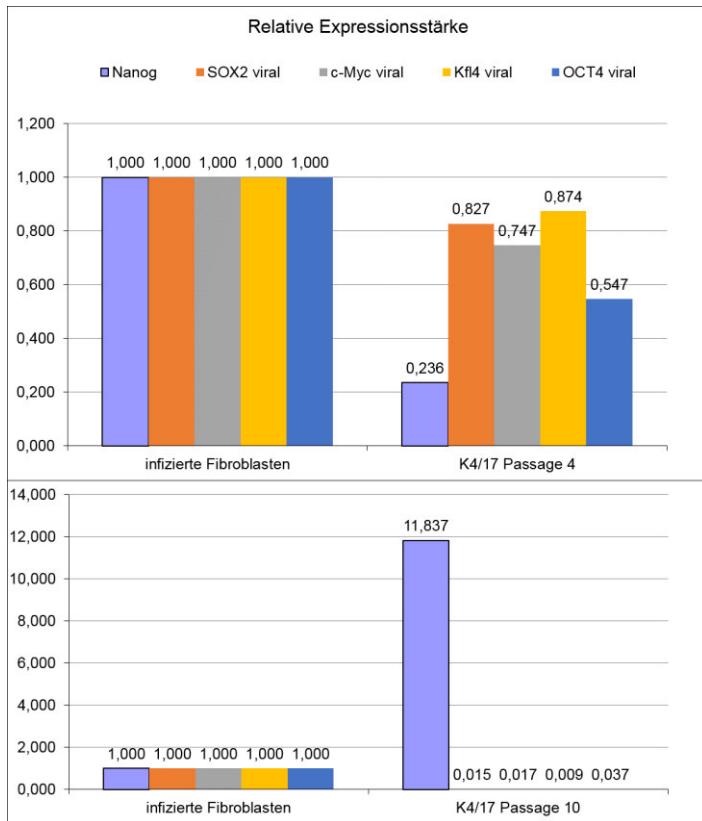


Abbildung 9: Expressionsstärke viral eingebrachter Transkriptionsfaktoren und des Stammzellmarkers Nanog nach Passage 4 und Passage 10 relativ zur Expression in acht Tage alten infizierten Fibroblasten

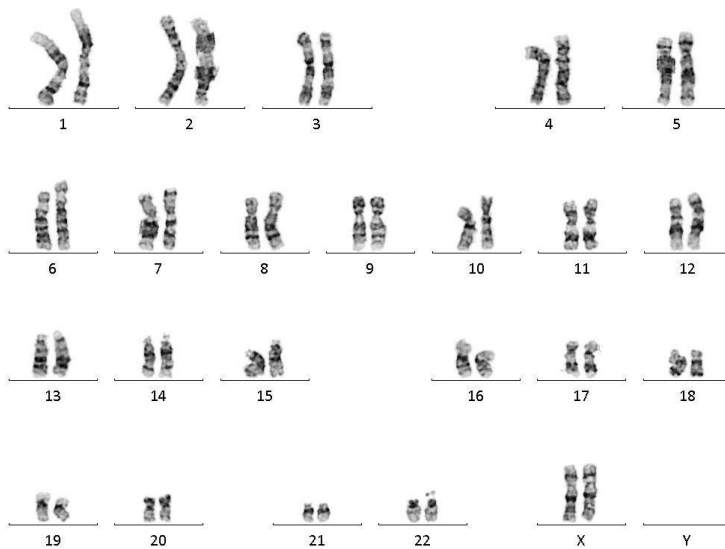


Abbildung 10: Beispielhaftes unauffälliges Karyogramm von K1/19

Tabelle 2: Liste aller untersuchten Klone, welche mindestens durch qPCR analysiert wurden

Spender/ Genotyp	Klonnr.	Expression viraler Faktoren	Karyogramm	Expression Stammzellfaktoren	Neuronale Differenzierung
K1/ Wildtyp	1	vorhanden	~		
	4	vorhanden	~		
	6	vorhanden	~		
	7	vorhanden	~		
	8	vorhanden	~		
	9	negativ	Trisomie Chr.12		
	11	vorhanden	~		
	12	vorhanden	~		
	13	vorhanden	~		
	14	vorhanden	~		
	16	vorhanden	~		
	17	vorhanden	~		
	18	vorhanden	~		
	19	negativ	normal	siehe 3.1.4.2	siehe 3.1.4.2
	23	vorhanden	~		
	25	vorhanden	~		
	30	vorhanden	~		
	32	vorhanden	~		
39	negativ	normal	siehe 3.1.4.2	siehe 3.1.4.2	
K3/Wildtyp	2	vorhanden	~		
	5	vorhanden	~		
	17	vorhanden	~		
	18	vorhanden	~		
	45	vorhanden	~		

Tabelle 2 Fortsetzung:

Spender/ Genotyp	Klonnr.	Expression viraler Faktoren	Karyogramm	Expression Stammzellfaktoren	Neuronale Differenzierung
K4/Wildtyp	3	vorhanden	~		
	9	vorhanden	~		
	13	vorhanden	~		
	14	vorhanden	~		
	15	vorhanden	~		
	16	vorhanden	~		
	17	negativ	~	siehe 3.1.4.3	~
	18	negativ	normal	siehe 3.1.4.3	~
	20	vorhanden	~		
P1/Asn1735Lys	1	negativ	Monosomie 17 und 9		
	6	negativ	Abberation Chr. 18		
	7	negativ	normal	siehe 3.1.4.1	siehe 3.1.4.1
	8	vorhanden	~		
	10	vorhanden	~		
	11	negativ	normal	siehe 3.1.4.1	siehe 3.1.4.1
	12	negativ	normal	siehe 3.1.4.1	siehe 3.1.4.1
	17	vorhanden	~		
	23	vorhanden	~		
	25	vorhanden	~		
	38	negativ	normal	Verlust durch Kontamination	
	42	vorhanden	~		

3.1.3. Differenzierung von hIPS-Zellen in neuronale Zellkulturen

Aufgrund der vorwiegenden Expression von Nav1.1 in inhibitorischen Neuronen (Ogiwara *et al.*, 2007) wurde zunächst ein GABAerges Differenzierungsprotokoll zur Erstellung GABAerger Neurone implementiert. Im Hinblick auf weitere zu untersuchende Mutationen wurde ebenso ein Differenzierungsprotokoll zur Erstellung glutamaterger Neurone etabliert. Dies eröffnet die Möglichkeit der Kokultivierung neuronaler Zellen unterschiedlicher Differenzierungsprotokolle, wodurch Netzwerkanalysen dieser Kulturen ermöglicht würden. In dieser Arbeit wird allerdings nur das GABAerge Differenzierungsprotokoll dargelegt, da das glutamaterge Differenzierungsprotokoll parallel von Dr. Gina Elsen etabliert wurde.

3.1.3.1. GABAerge Differenzierung von hIPS-Zellen

Die GABAerge Differenzierung wurde durchgeführt nach Liu *et al.*, (2013a). Hierbei wurden hIPS-Zellen durch Behandlung mit Purmorphamin zu neuronalen Vorläuferzellen der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) geprägt. Neuronale Vorläuferzellen des MGE können *in vivo* cholinerge Neuronen oder GABAerge Neuronen entwickeln. Die Ausprägung cholinergischer Zellen benötigt dabei allerdings den Wachstumsfaktor „nerve growth factor“ (NGF). Ohne Zusatz von NGF bilden sich fast ausschließlich GABAerge Neuronen.

Anhand dieses Protokolls wurden die hIPS-Zellen zunächst in frei schwimmende „embryonic Bodies“ (EB) differenziert. Diese wurden über ein absitzendes Rosettenstadium zu freischwimmenden Neurosphären (neuronale Stamm- bzw. Vorläuferzellen) entwickelt, welche dann als Ausgangsmaterial für eine terminale neuronale Differenzierung dienten.

Schema GABAerge Differenzierung

Tag	0	7	14	25	80
Zellstadium	hIPS	EB	Neuro epithel	Neurosphären	Neuronale Kultur/maturierende Neuronen
Medium	mTeSR	NSC-	NSC-	NSC+	
Zusätze			Pur	Pur	BDNF/GDNF/cAMP/IGF
Kulturplatte	„six-well“	10cm Platte	„six well“	10cm Platte	35mm Platte/ „coverslips“
Beschichtung	Matrigel		Laminin	Poly-Ornithin+Laminin	

Abbildung 11: Schema GABAerge Differenzierung. Gezeigt sind der Zeitpunkt der Bearbeitung der Zellen, der Name des Zellstadiums sowie deren jeweilige Kulturbedingungen.

Abbildung 11 zeigt einen Überblick des angewandten Differenzierungsprotokolls. Die neuronale Induktion (Tag 0-25) wurde stets am Stück durchgeführt und eine terminale Differenzierung frühestens nach Tag 25 begonnen. Die verbleibenden Neurosphären konnten für weitere 14- 21 Tage in Kultur gehalten werden, wobei jeweils nach sieben Tagen eine neue terminale Differenzierung durchgeführt werden konnte. Danach verschlechterte sich die Differenzierungseffizienz deutlich. 14- 21 Tage nach Beginn einer terminalen Differenzierung wurde die neuronale Kultur neu ausgesät. Hierzu wurde die Kultur mit Accutase sanft von der Zellkulturschale gelöst, kurz sedimentiert, leicht triuriert und erneut ausgesät. Dies diente der Vereinzelung verbleibender Progenitorzellhaufen und ermöglichte eine bessere Maturierung der generierten Neurone. In Abbildung 12 sind die einzelnen Zellstadien zur besseren Erkennung bildlich dargestellt.

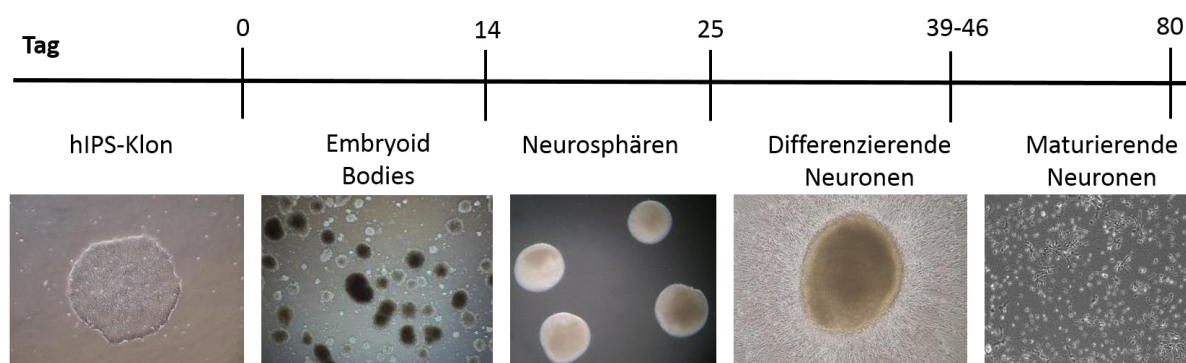


Abbildung 12: Bildliche Darstellung der einzelnen Zellstadien und deren ungefähre zeitliche Entwicklung

Der Maturationsprozess wurde anhand immunzytochemischer Färbungen kontrolliert. Hierbei diente Nkx2.1 als Indikator für dem MGE entsprechende abgeleitete Zellen. Abbildung 13 zeigt eine Immunfärbung von neuronalen Zellen einer GABAergen Differenzierung der Linie P1/12, zehn Tage nach Beginn einer terminalen Differenzierung (entspricht Tag 35 des Protokolls). Die Zellen zeigten dabei eine klare

Expression des MGE Markers Nkx2.1 und entsprachen damit neuronalen Vorläuferzellen des MGE. Ebenso zeigte sich eine klare Produktion von GABA in fast allen Zellen. Die beginnende Expression von β 3-Tubulin, welches als früher neuronaler Marker für Neuronen verwendet wurde, gab einen Hinweis auf die beginnende Bildung von generierten Neuronen.

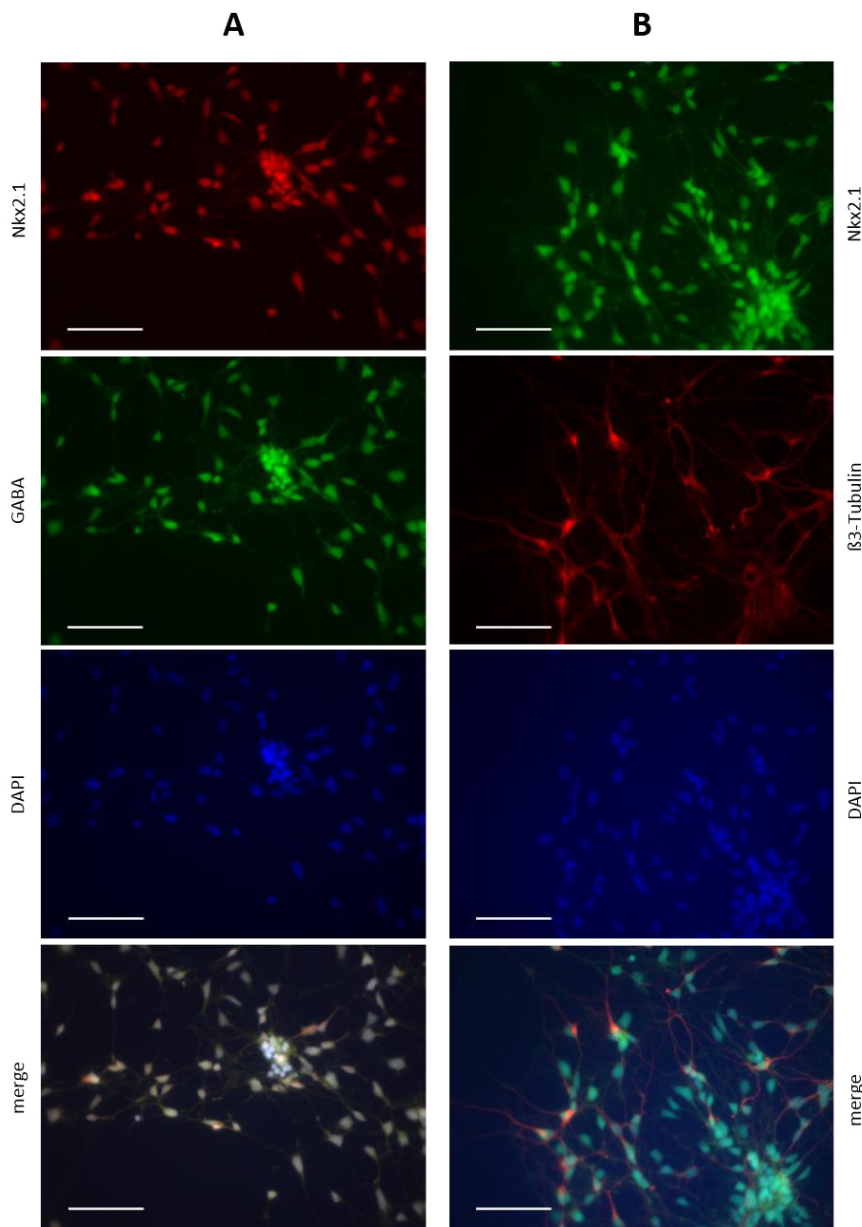


Abbildung 13: GABAerg differenzierte neuronale Zellen 10 Tage nach Beginn einer terminalen Differenzierung A: Immunzytochemische Färbung gegen den MGE-Marker Nkx2.1 (rot) und GABA (grün) zeigt die den induzierten Ursprung der Zellen sowie die Produktion von GABA B: Immunzytochemische Färbung gegen Nkx2.1 (grün) und frühen neuronalen Marker β 3-Tubulin (rot) zeigt die beginnende Bildung neuronaler Zellen mit MGE Hintergrund. DAPI diente der Färbung des Zellkerns. Maßstab 100 μ M

Abbildung 14 zeigt eine Antikörperfärbung von Zellen, 30 Tage nach Beginn der terminalen Differenzierung (Tag 55 des Protokolls), abgeleitet von P1/12. Es zeigte sich eine vielschichtige Verzweigung der Zellen sowie eine starke Expression von β 3-

Tubulin. Ebenso konnte die Expression der Glutamat Decarboxylasen 65/67 (GAD65/67), ein Marker für GABAerge Neuronen, beobachtet werden. Dies zeigte, dass sich die Zellpopulation in eine Population generierter GABAerger Neuronen entwickelte. Eine Färbung gegen den MGE Marker *Nkx2.1* wurde in diesem Stadium nicht mehr durchgeführt, da *Nkx2.1* nur in Vorläuferzellen exprimiert wird.

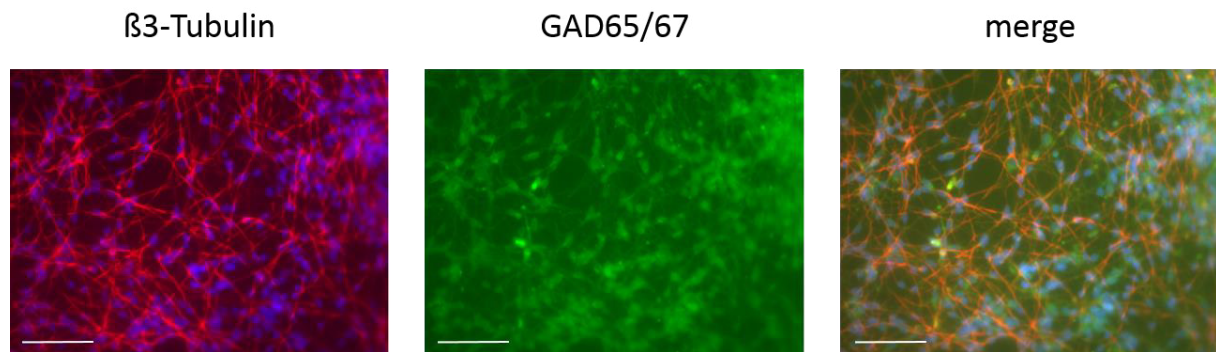


Abbildung 14: GABAerg differenzierte neuronale Zellen 30 Tage nach Beginn einer terminalen Differenzierung. In immunzytochemischen Färbungen zeigen die differenzierten Zellen die Expression von β 3-Tubulin und GAD65/67. Maßstab 100 μ M

Nach weiteren 30 Tagen (Tag 85 des Protokolls) ließ sich eine weitere Streckung der Zellen beobachten. Weiterhin wiesen die meisten Zellen eine Expression von GAD65/67 auf. Ebenso war weiterhin die Bildung von β 3-Tubulin zu beobachten (siehe Abbildung 15). Dies zeigte, dass es sich bei den entstandenen Zellen um GABAerge generierte Neuronen handelte.

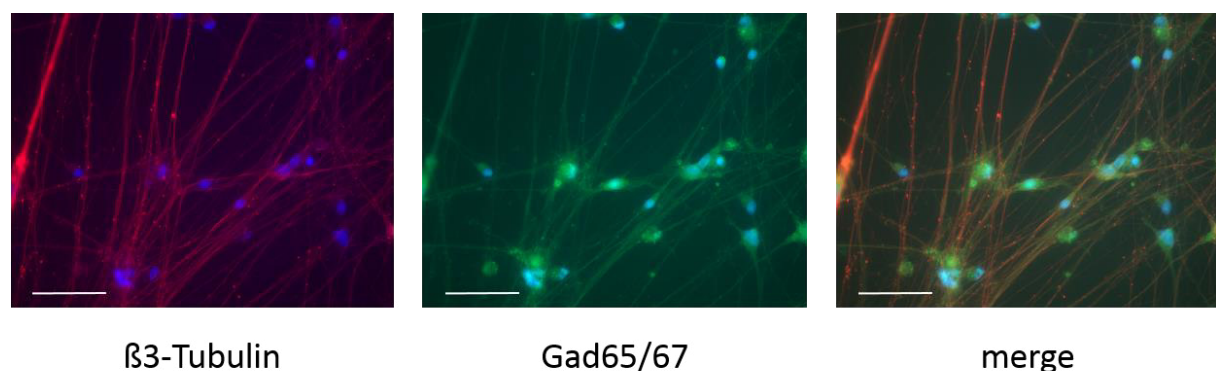


Abbildung 15: GABAerg differenzierte neuronale Zellen 60 Tage nach Beginn einer terminalen Differenzierung. In immunzytochemischen Färbungen zeigen die Expression von β 3-Tubulin und GAD65/67. Maßstab 100 μ M

Die erhaltenen generierten Neurone wurden nun bezüglich ihres elektrophysiologischen Verhaltens mit der „Patch clamp“ Technik untersucht.

In den ersten zwei Differenzierungsversuchen wurden die neuronalen Vorläuferzellen zu Beginn einer terminalen Differenzierung in Kulturplatten gezüchtet, welche ausschließlich mit Laminin beschichtet waren. Dies führte dazu, dass die Kulturen sich

spätestens nach 2-3 Wochen von der Platte abgelöst hatten. Anschließende Analysen waren so nicht mehr möglich. Die Veränderung der Beschichtung zu Poly-Ornithin und Laminin konnte dieses Problem um ca. 5- 8 zusätzliche Wochen verschieben. Wodurch erste elektrophysiologische Untersuchungen möglich waren. In drei weiteren Differenzierungsansätzen konnten erstmals elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Insgesamt wurden 60 Zellen dieser drei Differenzierungen gepatcht, wovon zwei Zellen verwertbare Messungen ergaben.

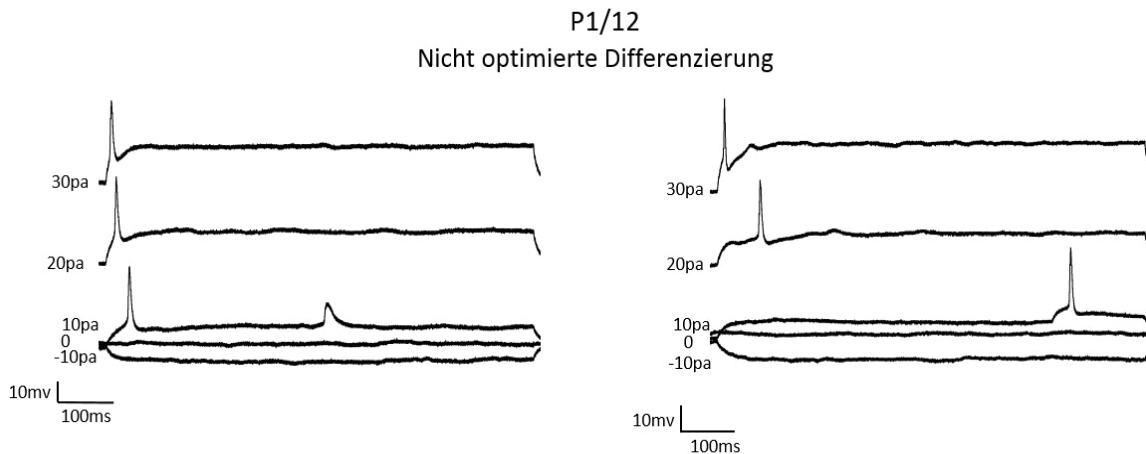


Abbildung 16: Evozierte Aktionspotentiale nach Strominduktion von GABAerg (nicht optimiert) differenzierten Zellpopulationen, abgeleitet von P1/12 n=2 aus 60 gepatchten Zellen.

Wie in Abbildung 16 zu sehen, zeigten beide Zellen nur vereinzelte Aktionspotentiale, ebenso konnte keine spontane Ausbildung von Aktionspotentialen festgestellt werden. Eine Bestimmung der Na^+ und K^+ Ströme wurde zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt.

Aufgrund der schlechten Ausbeute verwertbarer Messungen wurden in zwei weiteren Differenzierungsansätzen das erneute Aussähen der terminal differenzierenden Zellen eingeführt. Hierdurch sollte die Dichte verbleibender Progenitorzellhaufen verringert werden, um deren eventuell negative Einflüsse auf den Maturierungsprozeß zu beseitigen. Ebenso wurden die Zellen nun auch auf Na^+ und K^+ Ströme untersucht. Insgesamt wurden 37 Zellen aus zwei Differenzierungsansätzen gepatcht, wovon sieben Zellen verwertbare Messungen ergaben. Im „*voltage clamp*“ Modus zeigten alle sieben Zellen neurontypische Na^+ und K^+ Ströme (Abbildung 17 A). Ebenso wurden bei drei der sieben gemessenen Zellen einzelne spontane postsynaptische Potentiale, welche die Bildung von synaptischen Verbindungen anzeigen, während einer kontinuierlichen Messung (-40 mV Haltepotential) über eine Minute beobachtet (Abbildung 17 C).

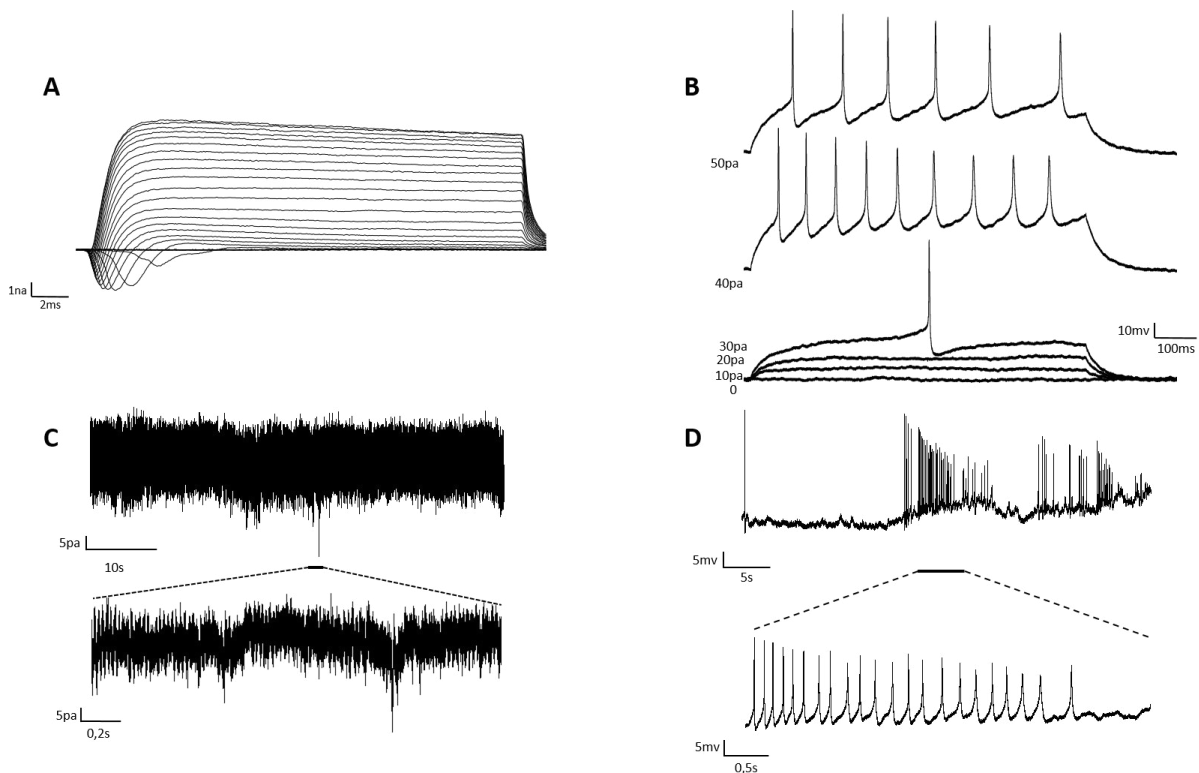


Abbildung 17: Elektrophysiologisches Verhalten GABAerg differenzierter Zellpopulationen generiert aus P1/12 **A:** repräsentative Na⁺/K⁺ Ströme n=7 **B:** Aktionspotentiale nach Strominjektion n=4 **C:** einwärts und auswärts gerichtete Ströme in kontinuierlicher „voltage clamp“ Messung n=3 **D:** spontane Aktionspotentialausbildung in kontinuierlicher „current clamp“ Messung (-40 mV Haltepotential) n=5

Wie in Abbildung 17 B zu erkennen, konnten durch Strominduktion ausgelöste Aktionspotentiale im „voltage clamp“ Modus bei vier der gemessenen Zellen nachgewiesen werden. Diese zeigen allerdings noch eine unregelmäßige teilweise unvollständige Ausprägung, sind allerdings, verglichen mit vorherigen Messungen (Abbildung 16), repetetiver und konstanter bzw. vorhanden. In kontinuierlichen „current clamp“ Messungen dagegen konnte bei fünf Zellen das spontane Auftreten von Aktionspotentialen beobachtet werden (Abbildung 17 D). Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden an GABAerg differenzierten Zellpopulationen, abgeleitet von P1/12, durchgeführt.

Im letzten optimierten Differenzierungsansatz wurde zu Vergleichszwecken die Kontrolllinie K1/19 gleichzeitig neben P1/12 differenziert. Insgesamt konnten von K1/19 acht differenzierte generierte Neuronen gepatcht werden, wovon zwei Zellen verwertbare Messungen lieferten. Die gemessenen Zellen zeigten Na⁺ und K⁺ Ströme sowie die Ausbildung evozierten Aktionspotentialen (Abbildung 18). Ebenso wie bei P1/12 waren die Aktionspotentiale teilweise unvollständig und unregelmäßig ausgeprägt.

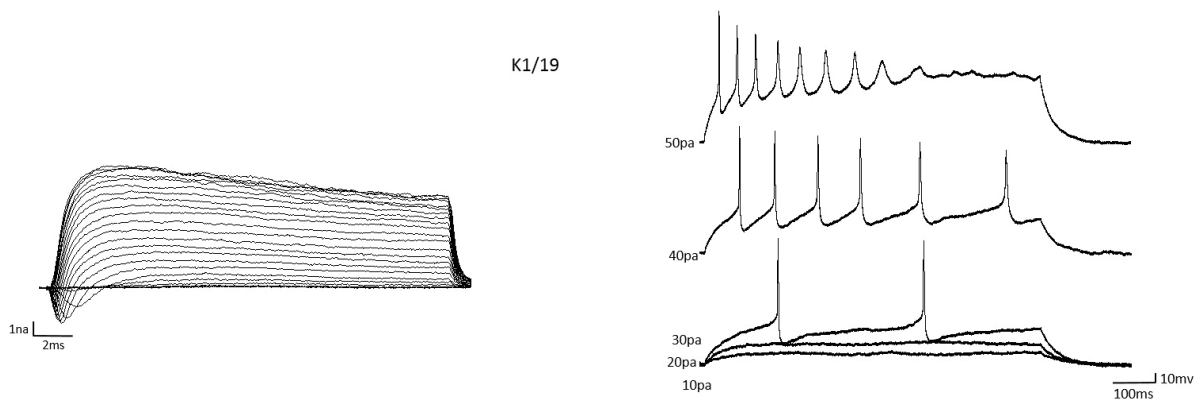


Abbildung 18: Elektrophysiologisches Verhalten GABAerg differenzierter Zellpopulationen abgeleitet von K1/19 Links: repräsentative Na⁺/K⁺ Ströme n=2 **B**: Aktionspotentiale nach Strominjektion n=2

Beide Zellen konnten nicht mehr auf postsynaptische Potentiale bzw. spontane Aktionspotentialausbildung untersucht werden. Ein Vergleich der elektrophysiologischen Aktivität wurde, aufgrund der geringen Anzahl verwertbarer Messungen sowie der weiterhin unregelmäßigen und unvollständigen Ausprägung der Aktionspotentiale, nicht durchgeführt.

3.2. Charakterisierung der erhaltenen hIPS-Zelllinien

Unter Anwendung des vorher beschriebenen Reprogrammierungsprotokolls konnten mehrere hIPS-Zelllinien hergestellt und charakterisiert werden (Tabelle 3). In diesem Abschnitt werden die Details dieser Charakterisierung für die folgenden Linien zusammengefasst.

Tabelle 3: Erstellte und charakterisierte hIPS-Zelllinien

hIPS-Zelllinie	Erzeugt aus	Geschlecht	Genotyp
P1/7	P1 Fibroblasten	weiblich	Asn1735Lys
P1/11	P1 Fibroblasten	weiblich	Asn1735Lys
P1/12	P1 Fibroblasten	weiblich	Asn1735Lys
K1/ 19	K1 Fibroblasten	weiblich	„Wildtyp“
K1/39	K1 Fibroblasten	weiblich	„Wildtyp“
K4/17	K4 Fibroblasten	männlich	„Wildtyp“
K4/18	K4 Fibroblasten	männlich	„Wildtyp“

3.2.1. Charakterisierung der erstellten Patientenzelllinien

Insgesamt wurden drei hIPS-Zelllinien aus Hautfibroblasten der Patientin P1 erstellt (P1/12; P1/11; P1/7). P1/12 zeigte eine klare Reprimierung der eingebrachten viralen Faktoren, sowie eine Hochregulierung der endogenen Stammzellmarker OCT4 und Nanog (Abbildung 19C). Ebenso zeigten P1/11 und P1/7 die erwarteten (3.1.2) Expressionsmuster (Abbildung 19B und 19A). Weiterhin wurde P1/12 einer Karyotypenanalyse unterzogen, um die chromosomale Integrität der Klone festzustellen. Diese zeigte in zwölf untersuchten Metaphasen mit einer Auflösung von 300-400 Banden keine Auffälligkeiten. P1/11 und P1/7 wiesen in acht und dreizehn untersuchten Metaphasen mit einer Auflösung von je 300-400 Banden keine Auffälligkeiten auf (Abbildung 23). Ebenso wurde eine immunzytochemische Färbung auf gängige Stammzellmarker durchgeführt (Abbildung 20 und 21). OCT-4 und Nanog wiesen dabei eine nukleäre Lokalisation auf, während SSEA-4 und TRA-1-81 cytosolisch lokalisiert waren. Wie deutlich zu erkennen ist, wurden alle Marker entsprechend exprimiert.

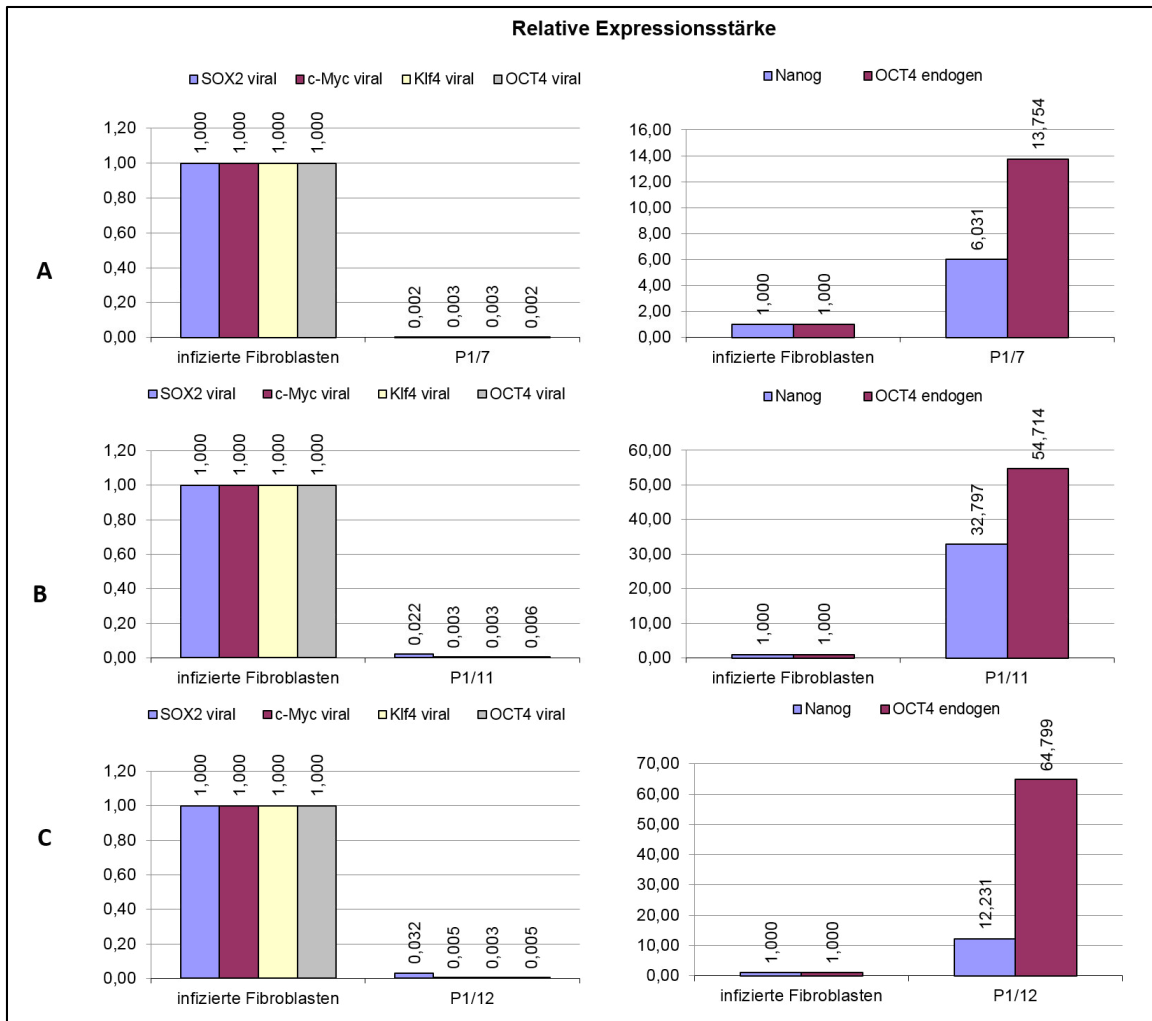


Abbildung 19: Relative Expression viral eingebrachter Transkriptionsfaktoren (links) und Stammzellmarkern (rechts) der hPSC-Zelllinien P1/7 (A); P1/11 (B); P1/12 (C) Die Expression ist relativ zu der Expression in 8 Tage alten infizierten Fibroblasten angegeben. Es ist eine effektive Reprimierung viral eingebrachter Transkriptionsfaktoren (links) sowie eine Hochregulierung endogener Stammzellfaktoren (rechts) zu sehen

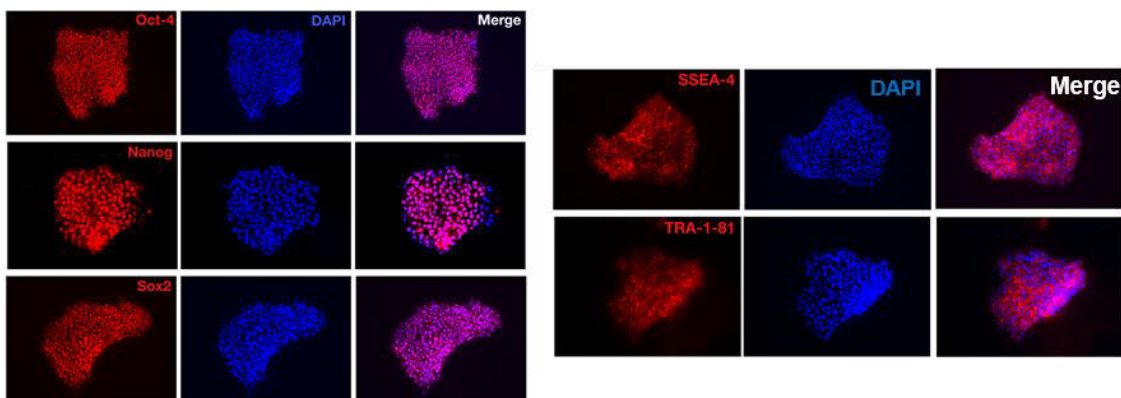


Abbildung 20: Immunzytochemische Färbung der hPSC-Zelllinie P1/12 auf die einzelnen Stammzellmarker OCT4, Nanog, Sox2, SSEA-4 und TRA-1-81. SSEA4 und Tra-1-81 sind cytosolisch lokalisiert; Nanog, Sox2 und OCT3/4 zeigen nukleäre Lokalisation. Zur Anfärbung von Zellkernen wurde DAPI verwendet. (Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Gina Elsen)

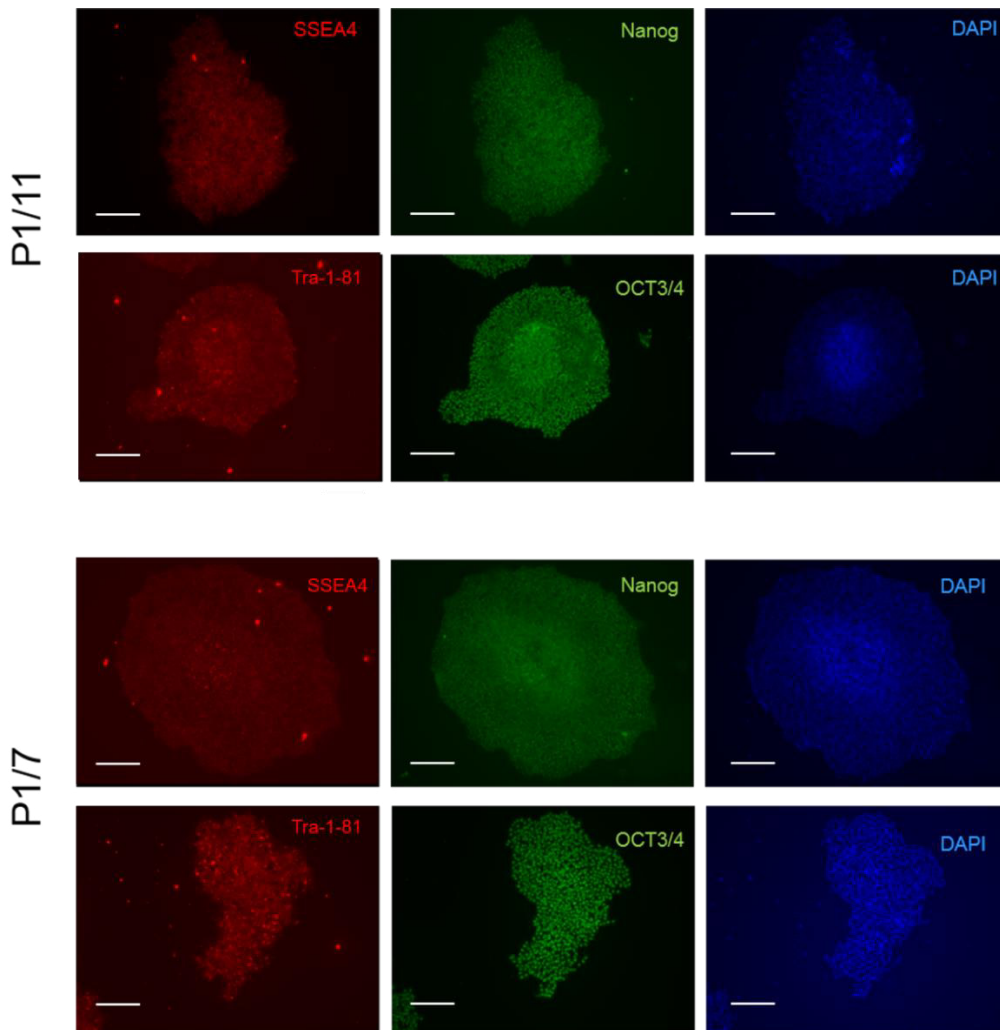


Abbildung 21: Immunzytochemische Doppelfärbung gegen die Stammzellmarker OCT4 und TRA-1-81, sowie SSEA4 und Nanog, der hIPSC-Zelllinien P1/11 (oben) und P1/7 (unten). SSEA4 und Tra-1-81 sind cytosolisch lokalisiert; Nanog und OCT3/4 sind nukleär lokalisiert. Zur Anfärbung von Zellkernen wurde DAPI verwendet. Maßstab: 500 μ m

Nach der Charakterisierung der Patientenzelllinien wurden diese neuronal differenziert (Abschnitt 3.1.3.1). Mit Hilfe einer immunzytochemischen Färbung gegen den neuronalen Marker MAP2 konnte die Bildung neuronaler Zellen bei allen drei Zelllinien beobachtet werden (Abbildung 22).

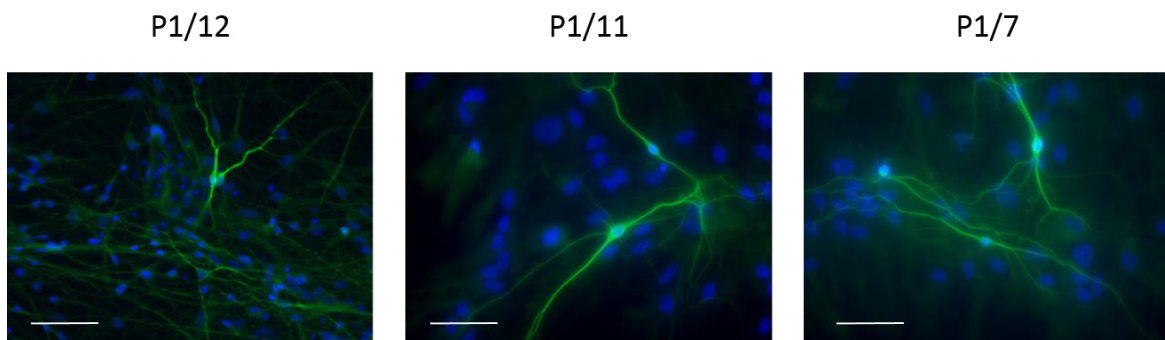


Abbildung 22: Anti-MAP2 immunzytochemische Färbung neuronal induzierter Zellkulturen der hIPSC-Zelllinien P1/12, P1/11, P1/7 3-4 Wochen nach terminaler Differenzierung. Zur Anfärbung von Zellkernen wurde DAPI verwendet. Maßstab: 100 μ m

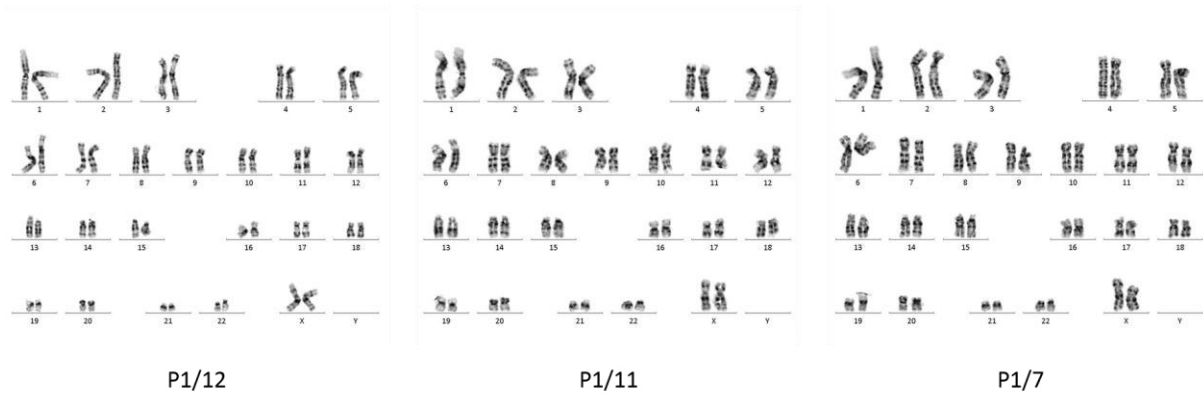


Abbildung 23: Beispielhafte unauffällige Karyogramme der hIPS-Zelllinien P1/12, P1/11, P1/7.

Die Färbungen wurden ca. 3-4 Wochen nach Beginn einer terminalen Differenzierung durchgeführt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass generierte Neurone aus der hIPS-Zelllinie P1/12 elektrophysiologische Aktivität aufweisen können. Hierzu wurden GABAerg differenzierte Neurone morphologisch identifiziert und per „Patch Clamp“ Verfahren untersucht. Die gemessenen Neurone zeigten im „voltage clamp“ Modus Na^+ und K^+ Ströme (Abbildung 17A), welche die Grundlage für die Ausbildung von Aktionspotentialen darstellen.

Weiterhin konnten evozierte Aktionspotentiale nach Strominjektion gemessen, sowie die spontane Ausbildung von Aktionspotentiale im „current-clamp“ Modus beobachtet werden (Abbildung 17B und 17D). Ebenso zeigte sich die Bildung von vereinzelt spontanen postsynaptischen Potentialen, welche die Ausbildung synaptischer Verbindungen anzeigt (Abbildung 17C). Elektrophysiologische Untersuchungen der Linien P1/11 und P1/7 wurde nicht durchgeführt, da zum Zeitpunkt der Analyse die Zellen bereits abgestorben waren (siehe 3.1.3.1). Beide Zelllinien werden momentan von Niklas Schwarz (PhD-Student AG Lerche) untersucht und zeigen elektrophysiologische Aktivität.

3.2.2. Charakterisierung der hPS-Zelllinien abgeleitet von K1

Ebenso wie die Patientenzelllinien wurden auch die Kontrollzelllinien auf deren Expressionsprofil hin untersucht. K1/39 wie auch K1/19 zeigten das gewünschte Expressionsprofil (Abbildung 24 A / 24 B).

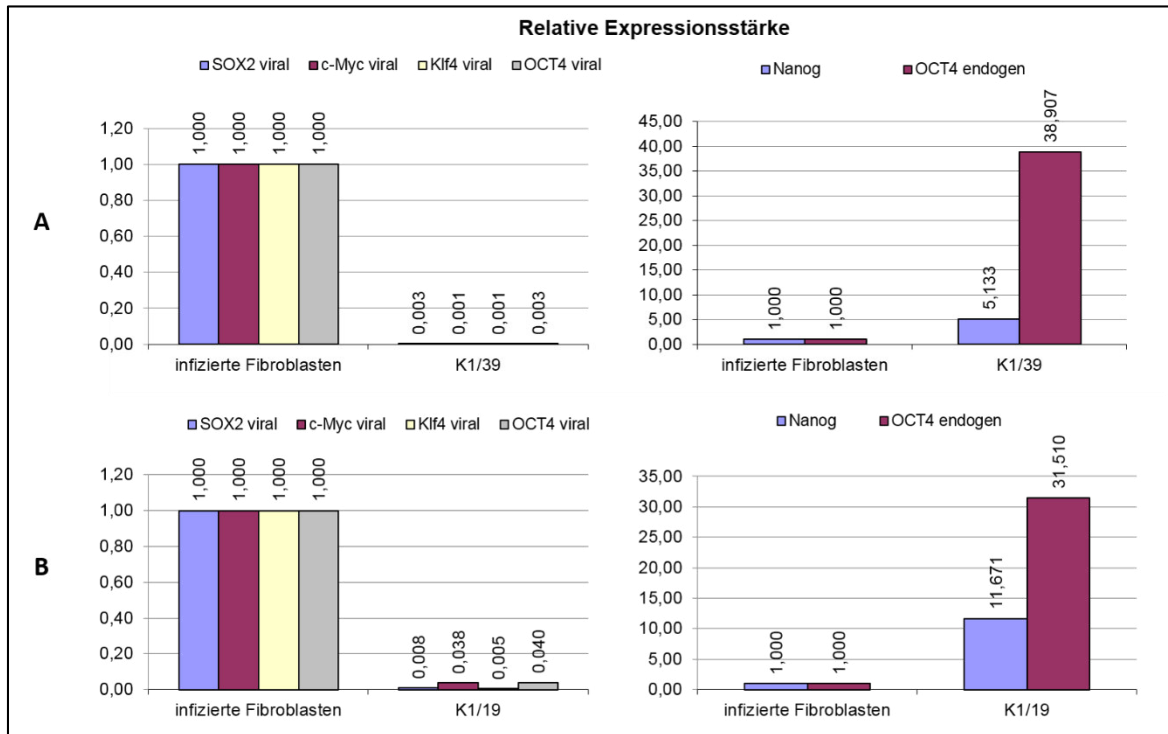


Abbildung 24: Relative Expression viral eingebrachter Transkriptionsfaktoren (links) und Stammzellmarkern (rechts) der hPS-Zelllinien K1/39 (A) und K1/19 (B). Die Expression ist relativ zu der Expression in 8 Tage alten infizierten Fibroblasten angegeben. Es ist eine effektive Reprimierung viral eingebrachter Transkriptionsfaktoren (links) sowie eine Hochregulierung endogener Stammzellfaktoren (rechts) zu sehen

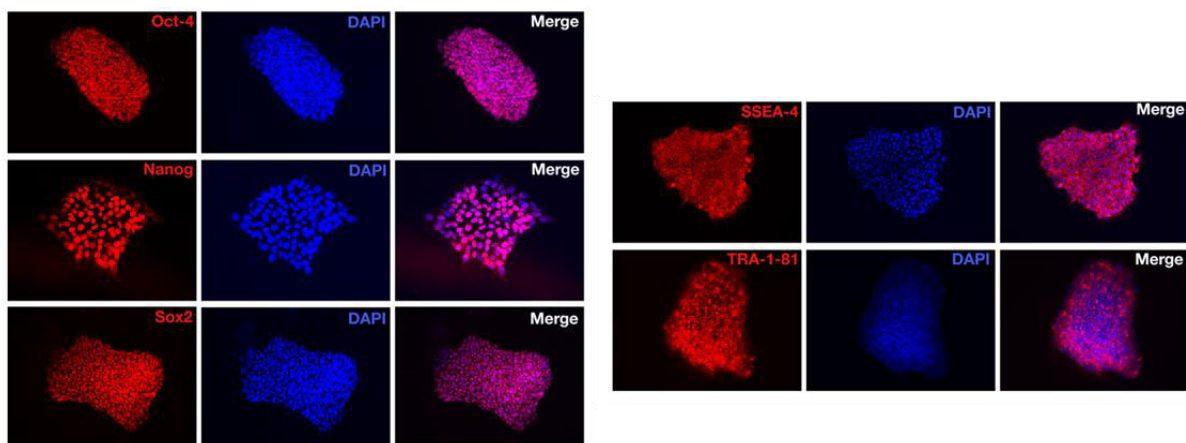


Abbildung 25: Immunzytochemische Färbung der hPS-Zelllinie K1/19 auf die einzelnen Stammzellmarker OCT4, Nanog, Sox2, SSEA-4 und TRA-1-81. SSEA4 und Tra-1-81 sind cytosolisch lokalisiert; Nanog, Sox2 und OCT3/4 zeigen nukleäre Lokalisation. Zur Anfärbung von Zellkernen wurde DAPI verwendet. (Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Gina Elsen)

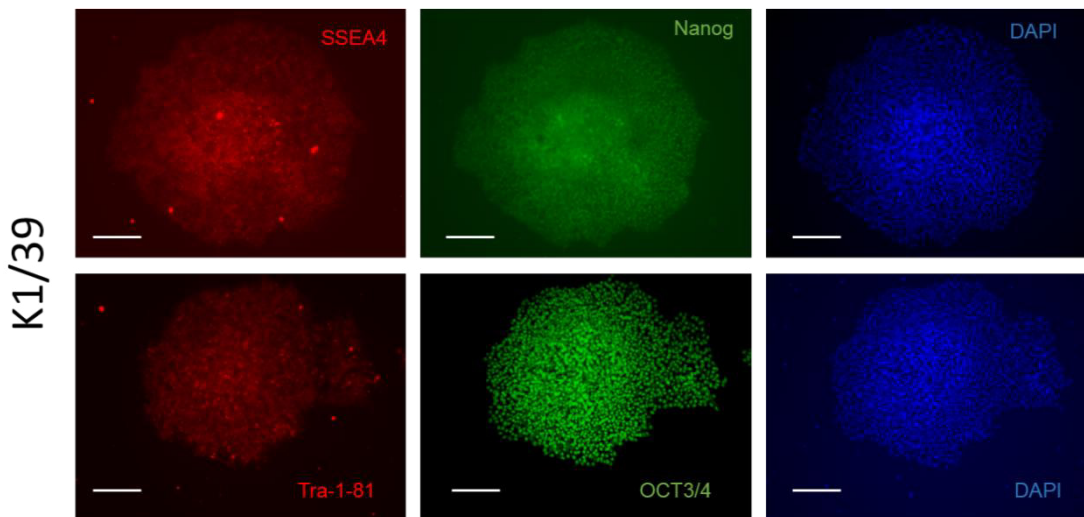


Abbildung 26: Immunzytochemische Doppelfärbung gegen die Stammzellmarker OCT4 und TRA-1-81, sowie SSEA4 und Nanog der hIPS-Zelllinie K1/39. SSEA4 und Tra-1-81 sind cytosolisch lokalisiert; Nanog und OCT3/4 sind nukleär lokalisiert. Zur Anfärbung von Zellkernen wurde DAPI verwendet. Maßstab: 500 μ m

K1/19 sowie K1/39 wurden durch immunzytochemische Färbungen auf die Expression typischer Stammzellmarker untersucht. K1/19 zeigte eine klare Expression der typischen Stammzellmarker (Abbildung 25). Ebenso wies K1/39 (Abbildung 26) die gewünschte Expression auf. Die chromosomale Integrität der hIPS-Zelllinien wurde durch Karyogrammanalyse bestätigt. K1/19 und K1/39 ließen in 15 bzw. 10 untersuchten Metaphasen bei einer Auflösung von 300-400 Banden keine Auffälligkeiten erkennen (Abbildung 10 und 28). Ebenso ließen sich beide Zelllinien neuronal differenzieren und durch eine Immunfärbung gegen MAP2 konnte die Bildung von neuronalen Zellen beobachtet werden (Abbildung 27).

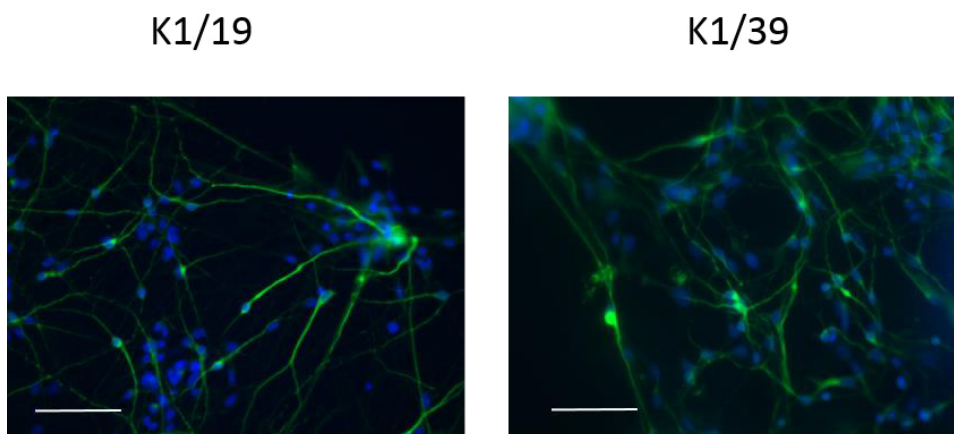


Abbildung 27: Anti-MAP2 Färbung neuronal induzierter hIPS-Zelllinien K1/19, K1/39 3-4 Wochen nach terminaler Differenzierung. Zur Anfärbung von Zellkernen wurde DAPI verwendet. Maßstab: 100 μ m

Weiterhin konnte die elektrophysiologische Aktivität von generierten Neuronen abgeleitet von K1/19 beobachtet werden (Abbildung 18).

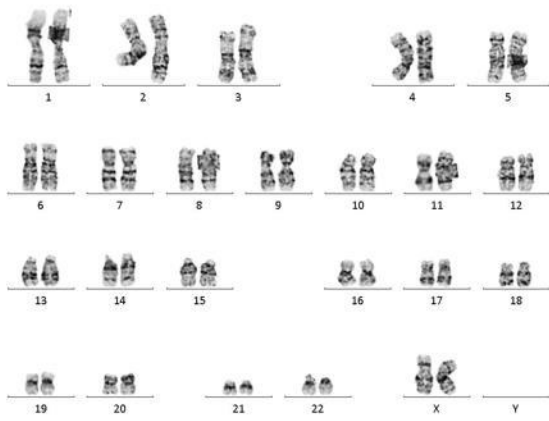


Abbildung 28: Beispielhaftes unauffälliges Karyogramm der hIPS-Zelllinie K1/39

3.2.3. Charakterisierung der hIPS-Zelllinien abgeleitet von K4

Auch die hIPS-Zelllinien K4/17 und K4/18 wurden bezüglich ihres Expressionsprofils der viral eingebrachten Faktoren sowie der Expression der Stammzellmarker Nanog und OCT4 durch qPCR Analyse untersucht.

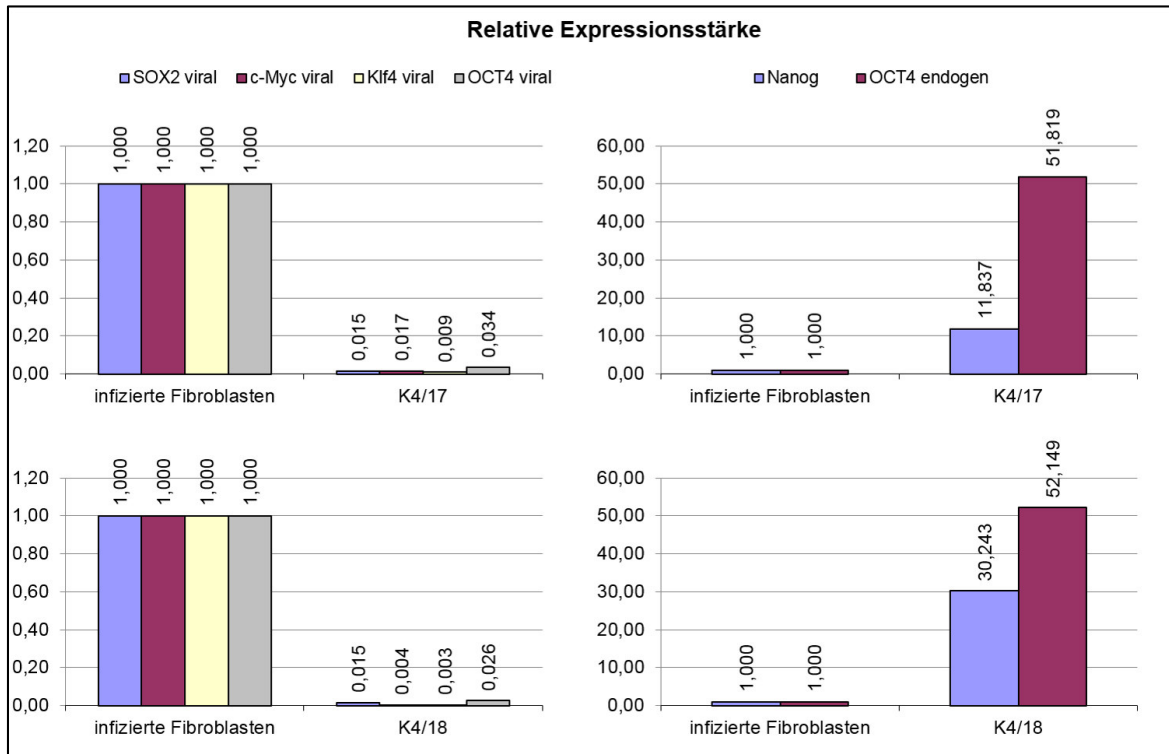


Abbildung 29: Relative Expression viral eingebrachter Transkriptionsfaktoren (links) und Stammzellmarkern (rechts) der hIPS-Zelllinien K4/17 (oben) und K4/18 (unten). Die Expression ist relativ zu der Expression in 8 Tage alten infizierten Fibroblasten angegeben. Es ist eine effektive Reprimierung viral eingebrachter Transkriptionsfaktoren (links) sowie eine Hochregulierung endogener Stammzellfaktoren (rechts) zu sehen

Beide Zelllinien wiesen das gewünschte Expressionsprofil auf (Abbildung 29). Dies wurde weiterhin durch immunzytochemische Färbungen gegen weitere gängige Stammzellmarker überprüft. Wie in Abbildung 30 zu sehen, zeigen beide Linien in der Immunfärbung die entsprechende Markerexpression. Die anschließende Karyotypenanalyse für K4/18 wies keine Auffälligkeiten in acht untersuchten Metaphasen bei einer Auflösung von 300-400 Banden auf (Abbildung 31). Die Karyogrammanalyse von K4/17 steht noch aus. Die hIPS-Zelllinien K4/17 und K4/18 sind die jüngsten der beschriebenen Zelllinien und werden derzeit differenziert, daher ist bis dato keine Immunfärbung abgeleiteter neuraler Zellen durchgeführt worden. Ebenso schließt der momentane Entwicklungsstand der Zellen elektrophysiologische Aktivitätsnachweise aus.

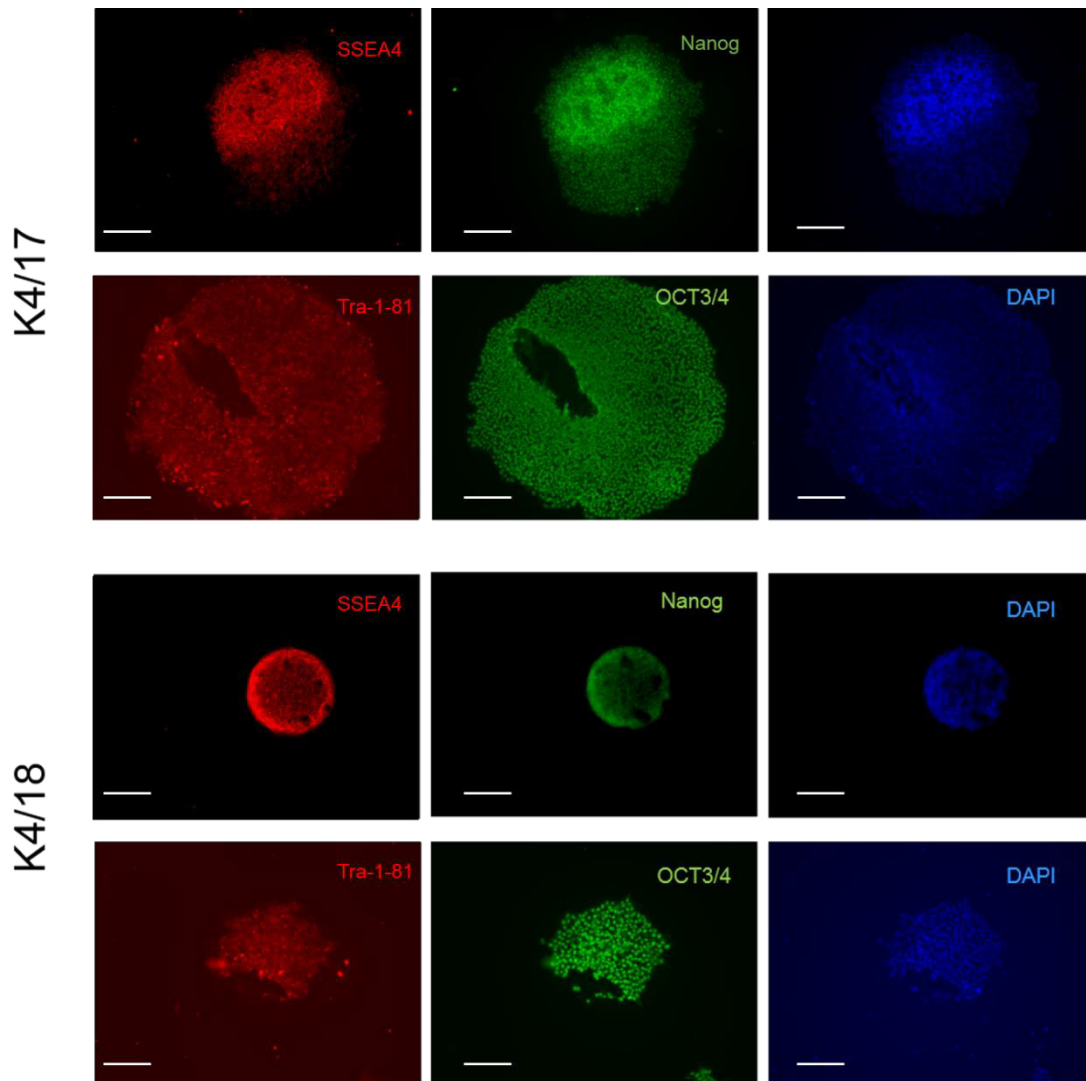


Abbildung 30: Immunzytochemische Doppelfärbung gegen die Stammzellmarker OCT4 und TRA-1-81, sowie SSEA4 und Nanog, der hIPS-Zelllinien K4/17 (oben) und K4/18 (unten). SSEA4 und Tra-1-81 sind cytosolisch lokalisiert; Nanog und OCT3/4 sind nukleär lokalisiert. Zur Anfärbung von Zellkernen wurde DAPI verwendet. Maßstab: 500 µm

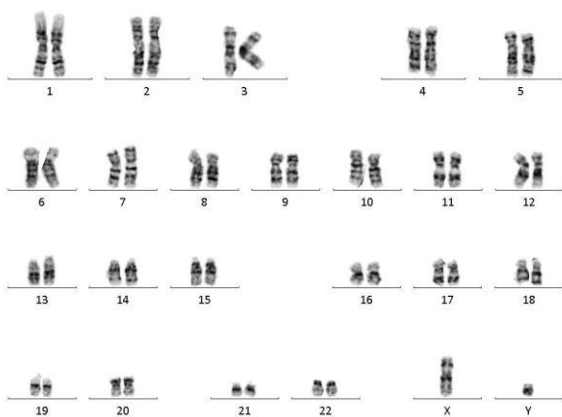


Abbildung 31: Beispielhaftes unauffälliges Karyogram der hIPS-Zelllinie K4/18

3.3. Elektrophysiologischer Aktivitätsnachweis der hIPS-Zelllinie L1-1 MUT von Benjamin Schmid

In einer 2013 von Reinhardt *et al.* veröffentlichten Studie (**“Genetic Correction of a LRRK2 Mutation in Human iPSCs Links Parkinsonian Neurodegeneration to ERK-Dependent Changes in Gene Expression”**) wurden hIPS-Linien (L1-1, L2-1) aus Hautfibroblasten zweier Parkinsonpatienten (L1, L2) mit einer Mutation in LRRK2 (Gly209Ser) erstellt und etabliert. Anhand von TALEN-Technologie wurden aus den generierten hIPS-Linien isogene genkorrigierte Kontrollen (L1-1 MUT und L2-1 MUT) erstellt. Diese Kontrollen unterscheiden sich von den Patientenlinien nur in der Korrektur der LRRK2 Mutation, welche zurück zum Wildtypgen korrigiert wurde. Weiterhin wurden vier geschlechts- und altersgepaarte Kontrolllinien erstellt. Aus den Patientenlinien, wie auch den genkorrigierten Linien, wurden dopaminerge generierte Neurone erstellt, anhand derer molekulare Parkinson-assoziierte Phänotypen untersucht wurden. So zeigten generierte Neuronen aus Patientenlinien verstärkte Neuritenverkürzung gegenüber generierten Neuronen aus genkorrigierten hIPS-Linien und den Kontrolllinien. Weiterhin waren die generierten Neurone der Patientenlinien sensitiver gegen oxidativen Stress und den Einfluss von Neurotoxinen. Die genkorrigierten Linien zeigten dabei jeweils keinen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber den gepaarten Kontrollen. Durch die Genkorrektur konnten also die pathogenen Effekte der Gly209Ser Mutation gerettet werden. Zusätzlich konnten, anhand eines Vergleichs der globalen Genexpressionsprofile zwischen genkorrigierten Linien und Patientenlinien durch „microarray“ Analyse, Unterschiede in der Genexpression festgestellt werden, welche im Vergleich zwischen Patienten und gepaarten Kontrollen nicht zu erkennen waren. Als dysregulierte Gene konnten „Copine VIII“ (CPNE8), „Annexin A1“ (ANXA1), „Microtubule-associated protein 7“ (MAP7), „Calcium-dependent activator protein for secretion 2“ (CADPS2) und „Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2“ (UHRF2) identifiziert werden. Die Dysregulierung wurde durch anschließende qPCR-Analysen bestätigt. Ein Knockdown der identifizierten Gene mit siRNA in 30 Tage alten generierten Neuronen aus genkorrigierten Linien führte zu erhöhter Neurodegeneration, welche vergleichbar mit der Neurodegeneration der generierten Neurone aus Patientenlinien war. Ebenso wurde festgestellt, dass in generierten Neuronen der Patientenlinien die „extrazellulär-Signal regulierte Kinase“ (ERK) Aktivität erhöht war und eine Inhibition der ERK-

Aktivität in diesen Zellen die pathogenen Auswirkungen der LRRK2-Gly209Ser Mutation negierte.

Ein Nebenaspekt dieser Arbeit war der Nachweis der elektrophysiologischen Aktivität generierter Neurone der hIPS-Zelllinien. Die generierten Neurone der Zelllinie L1-1 Mut wurden von mir auf deren elektrophysiologische Aktivität untersucht.

Die untersuchten generierten Neurone wiesen unregelmäßige spontane Aktionspotentialbildung bei einem Haltepotential von -70 mV (Abbildung 32 rechts) sowie vereinzelte Aktionspotentiale nach Strominjektion (Abbildung 32 links) auf.

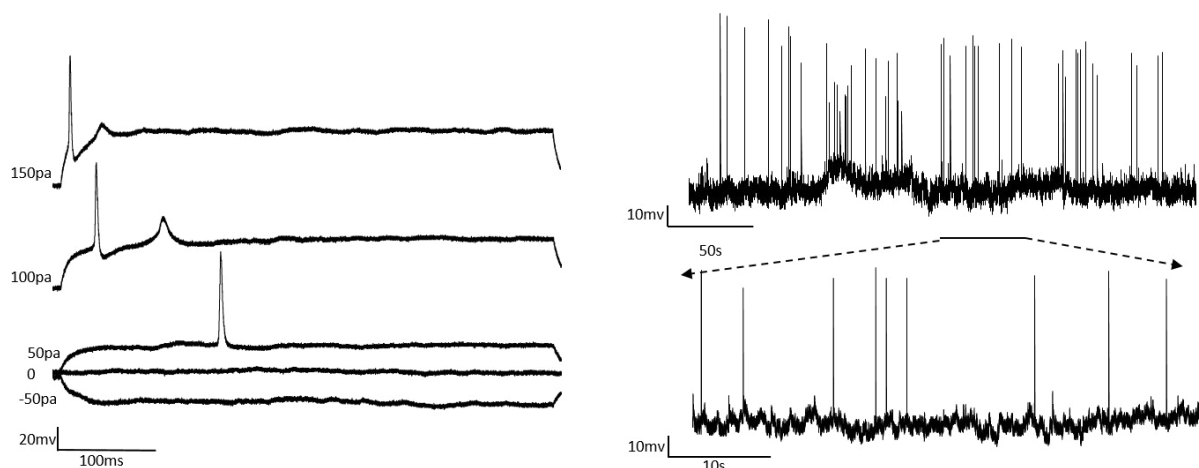


Abbildung 32: Repräsentative Messungen dopaminerg differenzierter Zellpoulationen abgeleitet von L1-1-Mut. Die gemessenen Zellen wiesen vereinzelte Aktionspotentiale nach Strominjektion auf (links), ebenso wurde die Ausbildung spontaner Aktionspotentiale (Haltepotential -70 mV) beobachtet n=6.

Es wurden insgesamt 47 Zellen aus vier Differenzierungsansätzen gepatcht und bei sechs Zellen konnte nachweisbare elektrophysiologische Aktivität detektiert werden. Ebenso wurden postsynaptische Potentiale in drei der gemessenen Zellen bei einem Haltepotential von -70 mV detektiert (Abbildung 33), diese wurden schließlich Teil der Veröffentlichung. Obwohl die elektrophysiologische Aktivität der generierten Neurone für die eigentlichen Erkenntnisse dieser Studie zweitrangig war, war es doch essentiell für die Veröffentlichung der Studie. Der Nachweis einer, wenn auch noch so geringen, elektrophysiologischen Aktivität der Zelllinien war essentiell für deren Etablierung.

Eine vergleichende Analyse der elektrophysiologischen Daten zwischen generierten Patientenneuronen und generierten Wildtypneuronen wurde nicht durchgeführt. Die Messungen dienen nur dem Nachweis der elektrophysiologischen Aktivität der generierten Neurone. Trotz der geringen Aktivität war diese ausreichend um die Zelllinien zu etablieren.

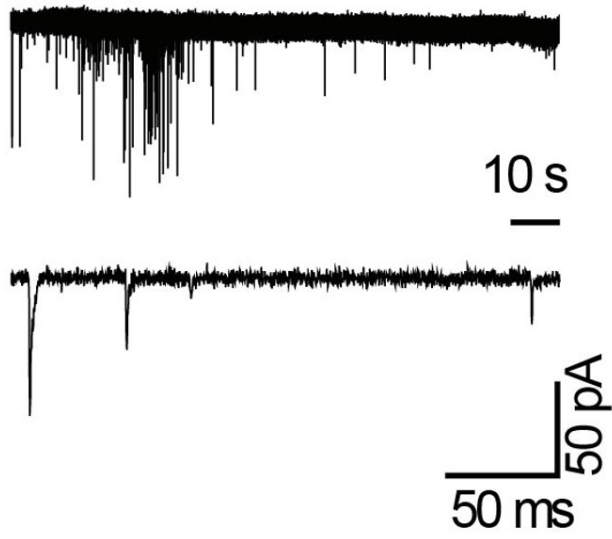


Abbildung 33: Spontane postsynaptische Potentiale generierter Neurone der Zelllinie L1-1-Mut (Haltepotential -70mv) n=3. (siehe auch Reinhardt *et al.* 2013: „supplementary Figure S7“)

3.4. Generierung Epilepsie assoziierter Mutationen zur Analyse in heterologen Expressionssystemen

Im Zuge dieser Arbeit wurden mehrere, neu gefundene, Ionenkanalmutationen (Tabelle 4) durch zielgerichtete Mutagenese (Abschnitt 2.2.5) erzeugt, um deren potentielle Pathomechanismen elektrophysiologisch zu charakterisieren.

Tabelle 4: Liste erzeugter Ionenkanalmutationen sortiert nach mutiertem Kanal

<i>KCNA2</i> Kv1.2	Nukleotidaustausch	Aminosäurenaustausch
	c.1214C>T	p.Pro405Leu
	c.788T>C	p.Ile298Tre
	c.890G<A	p.Arg297Gln
<i>SCN2A</i> Nav1.2	Nukleotidaustausch	Aminosäurenaustausch
	c.620T>C	p.Phe207Ser
	c.2722A>G	p.Lys908Glu
	c.82C>T	p.Arg28Cys
	c.2318C>T	p.Thr773Ile
	c.2695G>A	p.Gly899Ser
	c.4864C>T	p.Pro1622Ser
	c.1267G>C	p.Val423Leu
	c.A5798T:	p.Lys1933Met
c.4766A>G	p.Tyr1589Cys	
<i>SCN1A</i> Nav1.1	Nukleotidaustausch	Aminosäurenaustausch
	c.866A>T	Val289Glu
	c.1805G>C	Glu602Gln

Die *KCNA2* Mutationen wurden per automatisiertem TEVC Verfahren in Oocyten, in Kooperation mit Dr. Ulrike Hedrich (Postdoc, Ag Lerche) analysiert. Die Mutation Pro405Leu zeigte einen „*loss of function*“ Phänotyp, während die beiden Mutationen Ile298Tre und Arg297Gln einen „*gain of function*“ Effekt aufwiesen („**De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy**“, Syrbe, Hedrich *et al.*, 2015). Damit konnten Mutationen in *KCNA2* zum ersten Mal als eine mögliche Ursache für epileptische Enzephalopathien etabliert werden.

Ebenso konnte die *SCN2A* Mutation Tyr1589Cys als „*gain of function*“ Mutation charakterisiert werden. Die Analyse wurde per manuellem „*Patch clamp*“ Verfahren, in Kooperation mit Dr. Stephan Lauxmann durchgeführt. („**An *SCN2A* mutation in a family with infantile seizures from Madagascar reveals an increased subthreshold Na(+) current**“, Lauxmann *et al.*, 2013).

Die weiteren Mutationen befinden sich derzeit in Bearbeitung, durch Mitglieder der AG Lerche sowie Kooperationspartnern der AG Lerche.

4. Diskussion

4.1. Generierung Epilepsie assoziierter Mutationen zur Analyse in heterologen Expressionssystemen

Die erstellten Mutationen wurden teilweise durch Exomsequenzierung großer Kohorten bzw. in gezielten Genanalysen durch bioinformatische Methoden identifiziert. Solche Mutationen können die Ursache für Epilepsien sein, Allerdings können so identifizierte Mutationen auch keine funktionellen Auswirkungen haben. Aus diesem Grund werden solche Mutationen in heterologen Modellsystemen auf ihre Auswirkungen untersucht, um die funktionellen Auswirkungen einer Mutation zu untersuchen.

In Syrbe *et al.* (2015) konnten initial drei *de novo* KCNA2 Mutationen durch Exom Sequenzierung bei Patienten mit epileptischer Enzephalopathie identifiziert werden (Pro405Leu, Ile263Thr, Leu298Phe). KCNA2 codiert den Kaliumionenkanal K_v1.2. Die Mutationsträger Pro405Leu und Ile263Thr zeigten phänotypisch eine mildere Form epileptischer Enzephalopathie und wurden, ohne medikamentösen Einfluss, anfallsfrei im Alter zwischen 4 und 15 Jahren. Der Mutationsträger Leu298Phe, zeigte eine schwere epileptische Enzephalopathie mit starker mentaler Retardierung. Weiterhin wurde eine *de novo* Mutation in die Analyse mitaufgenommen, welche während des Reviewprozesses veröffentlicht wurde (Arg297Gln). Der Mutationsträger Arg297Gln zeigte ähnliche Symptome wie der Patient mit der Mutation Leu298Phe. In automatisierten TEVC-Analysen zeigten die Mutationen der milderen Form der epileptischen Enzephalopathie (Pro405Leu, Ile263Thr) einen klaren „loss-of function“ Effekt. Ebenso zeigte sich ein dominant negativer Effekt von mutierten Kanälen auf den Wildtypkanal, wenn Mutation und Wildtypkanal coexprimiert wurden. Die Mutationen der schweren Form epileptischer Enzephalopathie hingegen zeigten einen klaren „gain of Function“ Effekt, welcher zusätzlich starke Hyperpolarisation des Membranpotentials der Zellen zur Folge hatte. Ebenso konnte ein dominanter Effekt bei Coexpression mit dem Wildtypkanal beobachtet werden.

K_v1.2 gehört zu den verzögert gleichrichtenden Kaliumkanälen, welche die Repolarisation der neuronalen Zellmembran nach Bildung eines Aktionspotentials ermöglichen. Eine „loss of function“ Mutation würde in einem Neuron zu einer Hyperexzitabilität der neuronalen Membran, sowie erhöhter Feuerrate aufgrund

fehlender Repolarisierung führen. Die Effekte der „*gain of function*“ Mutationen in einem Neuron würden, bei physiologischen Membranpotentialen, zu dauerhaft offenen K_v1.2 Kanälen bzw. zu Stilllegung der elektrischen Aktivität des Neurons, aufgrund starker Hyperpolarisation der Zellmembran, führen. Die genauen pathophysiologischen Konsequenzen von „*gain-*“ oder „*loss of function*“ Mutationen, über die Effekte in einzelnen Zellen hinaus, sind schwer zu bestimmen, da KCNA2 global sowohl in inhibitorischen als auch excitorischen Neuronen exprimiert wird (Lorincz und Nusser, 2008). Obwohl der genaue Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp noch ungeklärt ist, konnte anhand der drastischen Effekte der Mutationen eine Verbindung der beiden gezeigt werden. Somit konnte KCNA2/K_v1.2 als eine neue mögliche Ursache für epileptische Enzephalopathien etabliert werden, wodurch sich neue Therapieansätze für bisher nicht behandelbare Fälle ergeben.

In Lauxmann *et al.* (2013) wurde zum ersten Mal eine nicht europäische Familie mit benignen familiären neonatalen/infantilen Anfällen (BFNIS) präsentiert. BFNIS ist eine selbst limitierende autosomal dominante Krankheit mit generalisierten Anfällen während des ersten Lebensjahres. Nach dem ersten Lebensjahr sind die meisten Betroffenen ohne medikamentöse Behandlung anfallsfrei (Berkovic *et al.*, 2004). Die neu identifizierte Tyr1589Cys Mutation im SCN2A Gen betrifft eine hochkonservierte Aminosäure in der D4/S2-S3 Schleife des kodierten Ionenkanals Nav 1.2. In elektrophysiologischen Analysen zeigte sich ein erhöhter Einstrom von Na⁺ im Schwellenbereich der Aktionspotentialbildung. Dieser leichte „*gain of Function*“ Effekt wird höchstwahrscheinlich über die veränderte Aminosäure selbst vermittelt und ist nicht phosphorylierungsabhängig, da das veränderte Tyrosin laut PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>) nicht Ziel von Phosphorylierungen ist. Bisher wurden insgesamt sechs BFNIS Mutationen funktional untersucht. Die meisten Mutationen zeigten dabei einen „*gain of function*“ Effekt. Bei manchen zeigte sich allerdings auch eine reduzierte Stromdichte, welche als „*loss of function*“ diskutiert wird (Scalmani *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Misra *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2010a/b). Die beobachteten „*gain of function*“ Effekte können das Auftreten epileptischer Anfälle innerhalb der vorgestellten Familie, in Übereinstimmung mit bisherigen Studien, am besten erklären. Das spontane Verschwinden der Anfälle könnte mit entwicklungsabhängigen Veränderungen der Natriumkanalexpression in exzitatorischen Neuronen zusammenhängen. So konnte bereits gezeigt werden, dass Nav 1.2 entwicklungsabhängig durch Nav 1.6 ersetzt wird (Liao *et al.*, 2010b).

4.2. Generierung eines humanen Zellsystems zur Analyse genetischer Epilepsien auf der Basis reprogrammierter somatischer Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Standardprotokoll zur Generierung von Stammzellen aus Fibroblasten etabliert werden. Ebenso konnte ein GABAerges Differenzierungsprotokoll etabliert werden, welches die Produktion GABAerger Neuronen mit elektrophysiologischer Aktivität ermöglicht.

Es wurden insgesamt drei hIPS-Zelllinien, aus isolierten Hautfibroblasten einer Patientin mit GEFS+ (P1/7; P1/11; P1/12), erstellt und charakterisiert (Abschnitt 3.2.1.). Weiterhin konnten zwei hIPS-Zelllinien aus den Hautfibroblasten einer Kontrollprobandin (K1/19; K1/39), sowie zwei weitere hIPS-Zelllinien aus Hautfibroblasten des Bruders von Patientin P1 (K4/17; K4/18) erstellt und charakterisiert werden (3.2.2 und 3.2.3.). Wichtige Zellkulturtechniken wie die Gewinnung von primären humanen Hautfibroblasten (Abschnitt 2.3.2.1) und die generelle Handhabung von induzierten Stammzellen (Abschnitte 3.1.2 und 2.3.1) wurden dadurch im Labor verankert.

4.2.1. Reprogrammierung von humanen Hautfibroblasten

Die Reprogrammierung erfolgte durch virale Transduktion mit den Transkriptionsfaktoren OCT3/4 /Sox2 /Klf4 /c-Myc nach der Methode von Takahashi *et al.*, 2007. Jeder Transkriptionsfaktor wurde dabei separat in Viren produziert und zusammen zur Transduktion von Hautfibroblasten verwendet. Nachteile dieser Methode sind zum einen: Die zu reprogrammierenden Zellen müssen um alle Transkriptionsfaktoren zu exprimieren von vier verschiedenen Viren infiziert werden. Dies senkt die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Reprogrammierung. Zum anderen werden die Transkriptionsfaktoren stabil in das Genom eingebaut. Daher sind die resultierenden Stammzellen nicht für eine eventuelle humane Therapie nutzbar. Zu Beginn dieser Arbeit war dies die verlässlichste Methode zur Reprogrammierung somatischer Zellen, weswegen diese Methode zur Etablierung gewählt wurde. Inzwischen gibt es mehrere Methoden zur Reprogrammierung somatischer Zellen, darunter nicht virale Systeme wie z.B. Transfektion der Zellen mit rekombinanten Proteinen der Transkriptionsfaktoren (Zhou *et al.* 2009) oder durch Transfektion definierter microRNA (Miyoshi *et al.* 2011). Beide Methoden sichern eine

integrationsfreie Reprogrammierung, sind aber methodisch gesehen komplizierter und zeitaufwendiger, da die Proteine wie auch die microRNA nicht nur produziert werden müssen, sondern auch in regelmäßigen zeitlichen Abständen (1-2 Tage) erneut transfiziert werden müssen. Weiterhin wurden inzwischen hIPS-Zellen integrationsfrei durch die Verwendung von Sendai Viren erzeugt (Macarthur *et al.*, 2012). Sendai Viren sind RNA-Viren, welche sich zytoplasmisch exprimieren und nicht in das Genom integrieren. Diese Methode ist inzwischen sehr beliebt und auch kommerziell in Kits erhältlich (CytoTune®-iPS Sendai Reprogramming Kit/ Life Technologies). Da die Produktion von, und der Umgang mit, Sendai Viren erst im Labor etabliert werden müsste bzw. der finanzielle Aufwand bei Kauf erheblich wäre, haben wir uns entschieden zukünftige Reprogrammierungen mit einem lentiviralen polycistronischen Vektor durchzuführen. Mit diesem Vektor können Viren produziert werden, welche alle vier Transkriptionsfaktoren beinhalten. Weiterhin verfügt die polycistronische Kasette über *LoxP* Schnittstellen, anhand derer die Transgenkasette mit Hilfe von *Cre*-Rekombinase aus dem Genom geschnitten werden kann. Dies hat den Vorteil, dass wir unsere bestehenden Protokolle weiterverwenden können, die Reprogrammierungseffizienz erhöhen und bei Bedarf transgenfreie hIPS-Zelllinien erzeugen können.

4.2.2. GABAerge Differenzierung von hIPS-Zellen

Ein GABAerges Differenzierungsprotokoll (Liu *et al.*, 2013a) wurde anhand der hIPS-Zelllinie P1/12 dokumentiert und etabliert (3.1.3.1). Hierzu wurden die hIPS-Zellen durch Zugabe von Purmorphamin zu neuronalen Vorläuferzellen der medialen ganglionischen Eminenz geprägt und wurde durch immunocytochemische Färbungen auf den Marker Nkx2.1 überprüft (Abbildung 13). Dabei zeigten über 90% der Zellen eine Expression des Markers. Ebenso zeigten fast alle Zellen die Produktion von GABA zehn Tage nach Beginn einer terminalen Differenzierung (Abbildung 13). Ab diesem Zeitpunkt konnte die beginnende Ausprägung von Neuronen anhand von Immunfärbungen gegen den frühen neuronalen Marker β 3-Tubulin beobachtet werden. Nach ca. 30 Tagen in terminaler Differenzierung konnten die GABA produzierenden Neurone durch immunzytochemische Färbung von GAD65/67 nachgewiesen werden (Abbildung 14). Dies konnte nach 60 Tagen in terminaler Differenzierung noch deutlicher beobachtet werden (Abbildung 15).

Ein großes Problem der ersten Differenzierungen ergab sich vorrangig durch die ca. drei monatige Haltung der Zellen in einer artifiziellen Umgebung. Dies äußerte sich vor allem durch Ablösung der differenzierenden Zellen von der Zellkulturschale. Infolgedessen konnten Versuchsansätze nicht mehr elektrophysiologisch analysiert werden. Behutsamer Umgang mit den Zellen sowie eine Optimierung der Beschichtung der Zellkulturschalen (Laminin/poly-Ornithin) konnte dies deutlich verbessern, aber nicht vollständig beheben. Durch eine zusätzliche Erhöhung der Anzahl von Differenzierungsansätzen kann dieses Problem weitestgehend gelöst werden, da sich die Anzahl überlebender Zellen statistisch gesehen erhöhen sollte. Ein weiteres großes Problem lag in der dürftigen elektrophysiologischen Aktivität der generierten Neurone. Die meisten Zellen zeigten keine bzw. sehr geringe elektrophysiologische Aktivität (Abbildung 16). Durch Verbesserung der Kulturbedingungen sowie der erneuten Passagierung maturierender Zellen (Entfernung störender Maturierungseinflüsse durch verbleibende Progenitor Zellhaufen), konnte die Ausbeute elektrophysiologisch aktiver Zellen drastisch erhöht werden. Die Anzahl der verwertbaren elektrophysiologischen Messungen stieg dadurch von ca. 3% der gemessenen Zellen auf ca. 20-25% der gemessenen Zellen. Ebenso verbesserte sich die Qualität der nachweisbaren Aktionspotentiale von vereinzelt auftretenden Ereignissen zu Aktionspotentialketten mit teilweise unvollständiger Ausprägung. Es zeigte sich, dass generierte Neurone abgeleitet von P1/12 Na^+ und K^+ -Ströme aufweisen, postsynaptische Potentiale zeigen und in der Lage sind, mehrere Aktionspotentiale (evoziert und spontan) hintereinander auszubilden (Abbildung 17). Ebenso konnte elektrophysiologische Aktivität von GABAerg differenzierten generierten Neuronen, abgeleitet von K1/19, beobachtet werden (Abbildung 18). Es konnte also gezeigt werden, dass anhand des etablierten Differenzierungsprotokolls elektrophysiologisch aktive Zellen generiert werden können, welche allerdings qualitativ noch keine vergleichenden Analysen zulassen. Eine Lösung dieses Problems scheint sich durch ein kürzlich veröffentlichtes Nährmedium („Brainphys“) zu ergeben, welches die elektrophysiologische Aktivität differenzierter Zellen erhöht (Bardy *et al.*, 2015). Dieses Kulturmedium vereint die elektrophysiologischen Eigenschaften von artifizieller cranialer Spinalflüssigkeit (aCSF) mit den nährenden Eigenschaften eines neuronalen Kulturmediums (Neurobasal, DMEM/F12). Bisherige neuronale Kulturmedien enthalten neuroaktive Komponenten, welche die biophysikalischen Eigenschaften von Neuronen

unterdrücken bzw. verändern (Bardy *et al.*, 2015). Den Autoren zufolge wird dies durch Einsatz von „Brainphys“ behoben. Zusätzlich erlaubt die Verwendung von „Brainphys“ die Ableitung generierter Neurone im Kulturmedium. Dies hat den Vorteil, dass einzelne Kulturen nach elektrophysiologischen Untersuchungen nicht verworfen werden müssen, sondern weiter kultiviert werden können. Erste von Niklas Schwarz (PhD-Student) und Filip Rosa (PhD-Student) an generierten Neuronen durchgeführte Tests bestätigen dies. So konnte die Ausbeute messbarer Zellen (ca. 50-60%) sowie die Qualität der gemessenen Aktionspotentiale verbessert werden.

4.2.3. Charakterisierung der erhaltenen hIPS-Zelllinien

Die Charakterisierung der produzierten hIPS-Zelllinien vor einer Differenzierung erfolgte durch Expressionsanalysen via qPCR und immunocytochemischen Färbungen. Dabei wurde überprüft, ob die viral eingebrachten Transkriptionsfaktoren effektiv reprimiert bzw. die endogenen Stammzellmarker Nanog und OCT4 erhöht exprimiert werden (qPCR-Daten Abschnitt 3.2). Die Expression der Stammzellmarker SSEA-4 und Tra-1-81 wurde durch immunzytochemische Färbungen nachgewiesen (immunzytochemische Färbungen Abschnitt 3.2). Weiterhin wurde die chromosomale Integrität der Zelllinien durch Karyotypisierung bestätigt. Alle aufgeführten Zelllinien entsprachen den Erwartungen. Zelllinien, welche die angewandten Kriterien nicht erfüllen konnten, wurden verworfen (Tabelle 2). Nach erfolgter GABAerger Differenzierung konnte für die hIPS-Zelllinien P1/7, P1/11, P1/12 (Abbildung 22) sowie K1/19, K1/39 (Abbildung 27) die Bildung neuronaler Zellen durch immunzytochemische Färbung gegen den neuronalen Marker MAP2 gezeigt werden. Ebenso konnte elektrophysiologische Aktivität für die Zelllinien P1/12 und K1/19 (Abschnitt 3.1.3.1. Abbildungen 17 und 18) nachgewiesen werden. Die Fähigkeit der hIPS-Zelllinien, K4/17 und K4/18 neuronale Zellen zu generieren konnte ebenso beobachtet werden. Da sich der Versuchsansatz noch in Bearbeitung befindet, konnte dies noch nicht dokumentiert werden. Die erstellten Zelllinien wurden damit hinreichend charakterisiert, um damit Versuche an generierten neuronalen Zellen durchzuführen. Für eine vollständige Charakterisierung, also dem definitiven Beweis der Pluripotenz der generierten hIPS-Zellen, muss noch der Beweis erbracht werden, dass sich die hIPS-Zelllinien in Zellen aller drei Keimblätter (endoderm, mesoderm und

ectoderm) entwickeln lassen. Generell wird dieser Beweis bisher durch die Ausbildung von Teratomas in Mäusen erbracht. Zusätzlich liefert dieser Test Informationen über die Tumorigenität (insbesondere Metastasenbildung) einer hIPS-Zelllinie, weswegen diese Methode auch als Sicherheitsstandard, für potentielle therapeutische Rücktransplantationen generierter hIPS-Zellen in den Patienten, angesehen wird (Buta *et al.*, 2013). Bei einem Teratomtest werden dissoziierte hIPS-Zellen in eine immungeschwächte (NOD-SCID) Maus injiziert. Diese bildet an der Injektionsstelle einen tumorartigen Auswuchs (Teratom), welcher Zellen aller drei Keimblätter (endoderm, mesoderm und ectoderm) enthält. Anschließend werden Paraffinschnitte des Tumors erstellt und immunocytochemisch gefärbt um die Identität der enthaltenen Zellen zu visualisieren (Zhang *et al.*, 2012). Die Notwendigkeit einer Teratomanalyse, von hIPS-Zelllinien für nicht therapeutische Zwecke, wird inzwischen in Frage gestellt, da EB basierte *in vitro* Differenzierungssays ausreichende Informationen über die Pluripotenz einer hIPS-Zelllinie liefern können (Buta *et al.*, 2013). Bei EB basierten Differenzierungssays werden hIPS-Zelllinien anhand von endo-, meso- und ectodermalen Differenzierungsprotokollen in die jeweiligen Keimblätter entwickelt, um so deren Bildung zu zeigen. Allerdings geben sie keine Information über die Tumorigenität einer hIPS-Zelllinie. Für die anwendungsbezogene *in vitro* Erforschung von Krankheitsmechanismen ist die Tumorigenität einer Zelllinie eher zweitrangig, da eine eventuelle Metastasenbildung nur bei Transplantation der hIPS-Zellen in einen Patienten relevant ist. Für die Erforschung von z.B. neuronalen Erkrankungen ist es wichtiger, die betroffenen Zellen der Krankheit erzeugen zu können, um dort Mechanismen der Erkrankungen zu untersuchen. Da bei allen Linien die Bildung neuronaler Zellen beobachtet werden konnte, welche die eigentlichen Zielzellen unserer Fragestellung sind, und weiterhin ein Teratomatest experimentell extrem aufwendig ist, wurde diese Analyse bisher nicht durchgeführt. Um die Pluripotenz unserer hIPS-Zelllinien vollständig zu belegen, wird momentan ein EB basierter *in vitro* Essay, von Filip Rosa (Phd. Student Ag Lerche) in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Hauser (Ag Schöls), im Labor etabliert, welcher den aufwendigen Teratomtest, bezüglich der Information über die Bildung aller drei Keimblätter aus generierten Zelllinien, ersetzen kann.

4.3. Elektrophysiologischer Aktivitätsnachweis der hIPS-Zelllinie L1-1 MUT von Benjamin Schmid

In dieser Studie konnte ein hIPS-Zell basiertes Modellsystem für parkinsonsche Neurodegeneration etabliert werden. Mehrere Parkinson-spezifische pathologische Phänotypen konnten mit generierten Neuronen rekapituliert werden. Durch die Einführung isogener Kontrollen konnten vier, vorher nicht mit Parkinson-assoziierte, Gene mit der Ausprägung von LRRK2-Gly209Ser abhängiger Neurodegeneration verknüpft werden (*CPNE8*, *CADPS2*, *MAP7*, *UHRF2*). Die Gene wurden bereits generell mit neurodegenerativen Krankheiten in Verbindung gebracht. So beeinflusst *CPNE8* den Ausbruch von Prionenkrankheiten in Mäusen (Lloyd *et al.*, 2010), wobei auch Parkinson als prionähnliche Krankheit bezüglich der Aggregation von alpha-Synuclein diskutiert wird (Polymenidou und Cleveland, 2012).

UHRF2 ist, wie *PARKIN*, eine E3-Ligase mit derselben katalytischen Aktivität. Da „*loss of function*“ Mutationen von *PARKIN* zum Ausbruch von Parkinson führen, ist der hergestellte Zusammenhang als signifikant anzusehen. Zusätzlich verstärkt *UHRF2* die Beseitigung von Polyglutamin Aggregaten, welche Neurodegeneration in mehreren Krankheiten auslösen (Iwata *et al.*, 2009). Dies lässt die Spekulation zu, dass *UHRF2* eventuell eine ähnliche Rolle für alpha-Synuclein Aggregate spielen könnte, welche ebenso für die Ausbildung von Parkinson verantwortlich gemacht wird.

CADPS2 ist in die Regulation der Neurotransmission von Monoaminen involviert. Dopamin ist ein solches Monoamin und wird mit der Erhöhung von oxidativen Stress in dopaminergen Neuronen in Verbindung gebracht (Napolitano *et al.*, 2010). Weiterhin wurde bei Mauslinien mit unterschiedlichen *LRRK2* Mutationen eine Dysregulation der Dopaminfreisetzung festgestellt (Li *et al.*, 2010). Eine Dysregulation von *CADPS2* durch *LRRK2*-Gly209Ser könnte zu erhöhter Formation toxischer Metabolite führen, die zu erhöhter Sensitivität gegenüber oxidativem Stress führen. Die erhöhte Sensitivität der generierten dopaminergen Neurone dieser Studie wäre konsistent mit dieser Theorie.

Da *LRRK2* kein Transkriptionsfaktor ist, sondern eine Proteinkinase, müssen weitere Proteine in die beobachtete Dysregulation der Genexpression involviert sein. Die erhöhte Aktivierung von ERK in generierten *LRRK2*-Gly209Ser Neuronen bietet einen

Ansatzpunkt die veränderte Genexpression zu erklären. ERK ist Teil des „Mitogen aktivierte Phosphat Kinase“ (MAPK)/ERK-Signalwegs, welcher Veränderung von Genexpression als Reaktion auf extrazelluläre Signale vermittelt (Cobb M.H., 1999). Die genauen Zusammenhänge müssten allerdings weitergehend untersucht werden, um diese Beziehung zu bestätigen. Generell ergaben sich durch diese Studie neue mögliche Ziele für die Erforschung der Pathologie von Parkinson sowie der Entwicklung von Therapeutika gegen Parkinson.

4.4. Evaluierung des etablierten Zellsystems

In bisherigen Studien mit hIPS-Zell basierten Modellen zu anderen Krankheiten (Abschnitt 1.4.1) lag der phänotypische Fokus der Untersuchungen auf veränderter Genexpression (ALS, Mitna-Neto *et al.*, 2011; Autismus, Germain *et al.*, 2014; Parkinson, Reinhardt *et al.*, 2013), entwicklungsabhängigen Phänotypen (Spinale muskuläre Atrophie, Ebert *et al.*, 2009; Familiäre Dysautonomie, Lee *et al.*, 2009) sowie krankheitsspezifischen molekularen Phänotypen (Parkinson: Seibler *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2011; Reinhardt *et al.*, 2013). Allen Studien ist die Etablierung der verwendeten hIPS-Zelllinien gemein, allerdings wird deren elektrophysiologische Aktivität nur beiläufig erwähnt, da diese für die untersuchten Krankheiten eher zweitrangig ist.

Genetische Epilepsien werden, wie in der Einleitung beschrieben, durch eine Hyperexzitabilität neuronaler Netzwerke im Gehirn hervorgerufen, deren Ursache z.B. auf genetisch veränderte Ionenkanäle zurückgeführt wird. Der wichtigste Phänotyp für eine Untersuchung von Epilepsie-assoziierten Ionenkanalmutationen ist demnach die Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften der veränderten Kanäle.

Bisher wurden drei DS bezogene Studien (siehe auch 1.4.2) veröffentlicht, in denen vergleichende elektrophysiologische Analysen zwischen generierten Neuronen aus Patienten spezifischen hIPS-Zelllinien und generierten Neuronen aus Kontroll hIPS-Zelllinien durchgeführt wurden (Higurashi *et al.*, 2013; Jiao *et al.*, 2013; Liu *et al.* 2013b). Weiterhin wurde eine artifizielle Patientenlinie, durch Einbringung einer DS assoziierten Mutation per TALEN-Technologie, aus Kontroll hIPS-Zellen erstellt und etabliert (Chen *et al.* 2014).

Higurashi *et al.*, (2013) verglichen hauptsächlich GABAerg (>50%) differenzierte generierte Neurone zweier hIPS-Zelllinien eines Patienten und einer Kontrolllinie bezüglich der Ausbildung von Aktionspotentialen nach Strominjektion. Zur Identifikation der SCN1A exprimierenden Neurone wurde ein *SCN1A*-Venus (YFP) Reporterkonstrukt in die hIPS-Zelllinien eingebracht. Gepatcht wurden Zellen mit klarer Venus-Fluoreszenz und neurontypischer Morphologie. Alle gemessenen Zellen hatten ein Ruhemembranpotential von -40 bis -45 mv und eine Kapazität bis zu 70 pF. Ein Großteil der gemessenen Zellen zeigte unregelmäßige und unvollständige („attenuierte“: Higurashi *et al.*, 2013) Aktionspotentialketten, ähnlich den in der vorliegenden Arbeit gezeigten. Nur Zellen, welche mindestens eine Anzahl von zehn Aktionspotentialen erreichten, wurden für vergleichenden Analysen herangezogen.

Die restlichen Zellen wurden als nicht ausreichend maturiert definiert. Die generierten Neurone beider Patientenzelllinien (12 Zellen / 15 Zellen) bildeten, ab einer Strominjektion von >50 pA, weniger Aktionspotentiale aus als die generierten Kontrollneurone (16 Zellen). Ebenso zeigte sich eine stärkere „Attenuierung“ der Aktionspotentiale bei den Patientenzelllinien als bei der Kontrollzelllinie. Anhand von immunocytochemischen Färbungen gegen GAD65/67 und Venus wurde gezeigt, dass die gemessenen Zellen GABAerg waren. Aus den Ergebnissen schlossen die Autoren auf eine funktionelle Beeinträchtigung der generierten GABAergen Neurone, womit sie mit Ergebnissen aus Mausmodellen übereinstimmen, welche eine Interneuron spezifische Abnahme der neuronalen Erregbarkeit postulieren, die zu einer Hyperexzitabilität des neuronalen Netzwerks führt (Yu *et al.*, 2006; Ogiwara *et al.*, 2007).

Fraglich bleibt, ob die erhaltenen Ergebnisse wirklich aussagekräftig genug sind, um Aussagen über die Auswirkungen der untersuchten Mutation (Arg1645*) zu machen. Leider wurde die Mutation bisher nicht funktionell in heterologen Expressionssystemen untersucht. Genaue Auswirkungen der Mutation auf die Funktion des Kanals sind daher unbekannt. Da es sich um eine Stop-Mutation im S4 (Voltagesensor) Segment der Domäne IV handelt, lässt sich vermuten, dass die Mutation drastische Auswirkungen auf die Funktion des Kanals haben kann. Die gezeigten Auswirkungen sind allerdings relativ gering. Weiterhin ist es fragwürdig, die „Attenuierung“ der Aktionspotentiale einerseits als Ausschlusskriterium für nicht ausreichend maturierte generierte Neurone und andererseits als Phänotyp zu definieren. Zwar sind der Effekt der „Attenuierung“ sowie die Unterschiede in der Aktionspotentialausbildung klar erkennbar, allerdings könnten diese auch auf unterschiedliche Maturierungsgrade der generierten Neurone zurückzuführen sein.

Liu *et al.* (2013b) hingegen verglichen die generierten Neurone, jeweils einer hIPS-Zelllinie zweier Patientenzelllinien („splicing“ Mutation IVS14+3A>T und Stop-Mutation Tyr325*) und zweier Kontrollzelllinien. Durch TEVC Messungen in Oocyten wurde gezeigt, dass der mutierte Kanal („splicing“ Mutation) keinerlei Natriumstrom verursacht. In Westernblotanalysen der injizierten Oocyten zeigte die mutierte mRNA keine Bildung von Nav1.1. Für die Tyr325* wurden keine Messungen in Oocyten durchgeführt. Allerdings ist davon auszugehen, dass auch kein funktioneller Kanal gebildet werden kann, da der Stop sehr früh zu einem Abbruch der Proteinsynthese (Domäne I) führt. Die generierten Neurone aller hIPS-Zelllinien wurden morphologisch in bipolare

(putativ inhibitorisch) und pyramidale (putativ exzitatorisch) Zellen unterteilt und jeweils getrennt analysiert. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den definierten Zelltypen innerhalb einer hIPS-Zelllinie. Die Zellen wurden nach 3-5 und 5-7 Wochen in neuronaler Differenzierung gepatcht. Die gepatchten Zellen hatten ein Ruhemembranpotential von ca. -60 mV bis ca. -70 mV. Dabei zeigte sich bei den Patientenlinien eine erhöhte Na⁺ Stromdichte, reduzierte Aktionspotentialschwelle und eine erhöhte Feuerrate von Aktionspotentialen gegenüber den Kontrolllinien. Hieraus schlossen die Autoren auf eine erhöhte Hyperexcitabilität in generierten DS-Neuronen. Hiermit widersprechen die Autoren bisherigen Ergebnissen aus Mausmodellen (siehe oben). Da kein signifikanter Unterschied zwischen den definierten Zelltypen zu erkennen war, schlugen die Autoren einen Zell-unabhängigen Mechanismus der Anfallsgenerierung bei DS vor, welcher aufgrund der generellen Übererregbarkeit verschiedener Zelltypen zu epileptischen Anfällen führen könnte. Diese Aussage ist kritisch zu betrachten, da unterschiedliche Neuronentypen auch unterschiedliches Feuerverhalten zeigen sollten. Weiterhin wurde die Identität der Zellen nie näher bestimmt. Ebenso stellt sich die Frage, ob die gezeigten elektrophysiologischen Daten die obigen Aussagen überhaupt zulassen. Es wurden in dieser Studie keinerlei Ausschlusskriterien für eventuelle nicht maturaerte generierte Neurone angelegt und die Messungen aller Zellen in die vergleichende Analyse einbezogen. Hierdurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten Effekte vom Entwicklungsstand der generierten Neurone abhängen und nicht mit den DS Mutationen in Verbindung stehen. Dies wird ebenfalls durch die beispielhaft gezeigten Messungen unterstützt. Diese zeigen eine starke „Attenuierung“ und die Bildung von weniger als zehn Aktionspotentialen. Diese Zellen wären also z.B. von Higurashi *et al.* (2013) aufgrund ungenügender Maturierung von einer Analyse ausgeschlossen worden.

Jiao *et al.* (2013) verglichen glutamaterg differenzierte generierte Neurone aus jeweils zwei hIPS-Zelllinien eines Dravetpatienten und eines GEFS+ Patienten mit denen aus zwei Kontrolllinien. Alle für die Analyse herangezogenen Zellen hatten ein Ruhemembranpotential von -45 mV bis -60 mV. Die generierten Patientenneurone zeigten dabei einen signifikant erhöhten Natriumstrom und eine verzögerte Inaktivierung der Natriumkanäle mit einem stärkeren Effekt bei der Dravetmutation. Weiterhin wurde eine erhöhte Aktionspotentialfrequenz beider Patientenlinien sowie eine erhöhte Aktionspotential Amplitude für die generierten Neurone des

Dravetpatienten festgestellt. Hieraus schlossen die Autoren, dass epileptische Anfallsgenerierung in DS und GEFS+, zumindest in manchen Fällen, durch eine Hyperexzitabilität glutamaterger Neurone entsteht. Leider wurde der Effekt der Mutationen nicht in generierten GABAergen Neuronen getestet, dadurch ist ein Einfluß der Mutationen auf GABAerge Zellen nicht beschrieben und kann daher nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich gibt es keine funktionelle Beschreibung der Mutationen in heterologen Expressionssystemen. Als Einschlußkriterium für maturierte Neurone wurde nur das Ruhemembranpotential herangezogen. Wie in Higurashi *et al.* (2013) gezeigt, ist dies nicht ausreichend um die Maturität der Zellen festzustellen. Die dargestellten Aktionspotentialketten der Studie dafür zeigten, wenigstens teilweise, eine regelmäßige nicht „attenuierte“ Ausprägung. Allerdings wurden scheinbar bei der Bestimmung der Aktionspotentialfrequenz bereits leichte Membrandepolarisierungen (unter 0 mV) als Aktionspotential definiert. Rechnet man diese wieder heraus, ergibt sich kein Unterschied mehr zwischen den einzelnen Linien. Weiterhin wird nicht angegeben, wie lange die gemessenen generierten Neurone differenziert wurden und zu welchem Zeitpunkt gemessen wurde. Da dies essentiell ist für die Vergleichbarkeit der Daten, ist auch in dieser Studie wieder fraglich, ob die gezeigten Ergebnisse wirklich relevant sind.

Allen bisher veröffentlichten Studien ist gemein, dass die elektrophysiologischen Erkenntnisse extrem angreifbar sind. Ein Einfluss nicht maturierter Neurone auf die gezeigten Ergebnisse kann in keiner der Publikationen ausgeschlossen werden. Hinzu kommt der Punkt, dass teilweise Daten verschiedener Klone eines Patienten nicht getrennt analysiert wurden (Jiao *et al.* 2013), oder nur ein einziger Klon eines Patienten untersucht wurde (Chen *et al.*, 2013). Aufgrund möglicher entwicklungsabhängiger Unterschiede einzelner Klone sollten immer zumindest zwei Klone getrennt voneinander analysiert werden (siehe auch Higurashi *et al.* 2013). Ein weiteres Problem ist, dass in keiner der Studien angegeben wird, aus wie vielen unterschiedlichen Differenzierungsansätzen die gemessenen generierten Neurone rekrutiert wurden.

Um die Angreifbarkeit der elektrophysiologischen Daten zu verhindern wird ein Zellsystem benötigt, welches nach Differenzierung vergleichbare homogene elektrophysiologische Daten, anhand einer ausreichenden Menge von messbaren Zellen, produzieren kann. Die zu messenden Zelltypen der generierten Neurone sollten klar bestimmbar sein. Weiterhin sollten die verwendeten Kontrolllinien klar

definiert sein und im besten Falle den Patientenlinien genetisch möglichst nahe sein. Hierfür bieten isogene Kontrollen eine ideale Möglichkeit, die putativen Einflüsse des genetischen Hintergrundes zu minimieren (Reinhardt *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). Die gemessenen Zellen sollten dabei ausreichend maturiert sein und bestimmte Kriterien wie z.B. ein Ruhemembranpotential von >-40 mV, eine Kapazität von ~ 70 pF, klare neurontypische Morphologie (Higurashi *et al.*, 2013) sowie nicht „attenuierte“ Aktionspotentialsketten generieren können. Diese Kriterien sind ein Vorschlag, welcher sich aus meinen und den Ergebnissen der diskutierten Studien ergibt. Genaue Kriterien sollten einheitlich von beteiligten Wissenschaftlern festgelegt werden, um die Validität individueller Ergebnisse zu gewährleisten und Ergebnisse verschiedener Studien vergleichbar zu machen.

Zum bisherigen Zeitpunkt konnte in der vorliegenden Arbeit die Reprogrammierung somatischer Zellen in hIPS-Zellen sowie deren anschließende Differenzierung in neuronale Zellkulturen mit elektrophysiologischer Aktivität gezeigt werden. Während die ausreichende Anzahl an Zellen inzwischen erreichbar ist (Abschnitt 4.2.2.), weisen die bisherigen elektrophysiologischen Daten allerdings noch nicht die benötigte Homogenität auf. Einerseits zeigten die differenzierten Neurone zu Beginn kaum Aktionspotentialausbildung (Abschnitt 3.1.3.1. Abbildung 16), was allerdings durch verbesserte Kulturbedingungen behoben werden konnte. Andererseits zeigten die Zellen unter verbesserten Kulturbedingungen zwar die Ausbildung mehrerer Aktionspotentiale, aber deren Ausbildung war teilweise „attenuiert“ und unregelmäßig (Abschnitt 3.1.3.1. Abbildung 16). Dieses Verhalten deutet daraufhin, dass die gemessenen Neurone bzw. Teile der Zellpopulation noch nicht vollständig maturiert sind. Die in Chen *et al.*, (2014) gezeigten elektrophysiologischen Daten deuten ähnliche Probleme bezüglich der Differenzierung an, weswegen höchstwahrscheinlich keine vergleichende Analyse zwischen Wildtyp- und Patientenneuronen durchgeführt wurde, sondern nur die hIPS-Zelllinien etabliert wurden. Higurashi *et al.* (2013) deuten ebenfalls das Vorhandensein nicht maturierter Neurone in ihren generierten Zellkulturen an, weswegen alle Zellen, welche nicht eine Mindestanzahl an Aktionspotentialen ausbildeten, nicht in deren Analyse aufgenommen wurden. Um eine ausreichende Zahl an untersuchten Zellen zu erhalten, wurden Messungen von Zellen mehrerer Differenzierungsansätze zusammengeführt (ebenso Jiao *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013b). Da wir bisher noch nicht zeigen konnten, dass es keine Unterschiede zwischen zeitlich versetzten Differenzierungsansätzen der gleichen hIPS-Zelllinie gibt,

haben wir bisher von dieser Vorgehensweise abgesehen. Dieser Nachweis wird zwar in keiner der bisherigen Studien erbracht, allerdings lassen sich solche Unterschiede, zumindest in unserem System, noch nicht ausschließen. Stattdessen soll dieses Problem gelöst werden, indem eine ausreichende Zahl gemessener Zellen innerhalb eines Differenzierungsansatzes erreicht wird. Ein Zusammenführen von Daten aus Messungen zeitlich versetzter Differenzierungsansätze soll nur dann erfolgen, wenn die Daten statistisch nicht unterscheidbar sind. Ein Ansatz um die Maturierung der generierten Neurone zu fördern, ist die Kokultur der zu differenzierenden Zellen mit Astrozyten (Muratore *et al.*, 2014). Dieses Vorgehen fördert ebenso die Ausbildung von synaptischen Verbindungen (Netzwerkbildung), wodurch es ermöglicht wird, Netzwerkuntersuchungen durch Messungen mit „multi electrode arrays“ (MEA) durchzuführen (Odawara *et al.*, 2014). Das bereits erwähnte Medium, welches Eigenschaften von Nährmedium und elektrophysiologischen Messlösungen vereint (Bardy *et al.*, 2015), kann dieses Vorhaben hervorragend ergänzen. Dies gilt ebenso für „Patch clamp“ Analysen, wie erste Versuche in unserer Arbeitsgruppe zeigen. Die Einführung eines glutamatergen Differenzierungsprotokolls in unserem Labor wurde beschlossen, um Effekte von Mutationen in möglichst physiologischen neuronalen Netzwerken zu untersuchen. Hierzu sollen zukünftig generierte GABAerge und glutamaterge Neuronen auf Astrozyten kultiviert werden und vorrangig durch MEA-Analysen untersucht werden. Die Kokultivierung von differenzierenden hIPS-Zellen mit Astrozyten wird gerade von Dr. Gina Elsen, anhand von primär isolierten Mausastrozyten, getestet und zeigt erste positive Effekte in MEA-Messungen. Die idealste und interessanteste Methode zur Gewinnung von humanen Astrozyten ist die Differenzierung der vorhandenen hIPS-Zelllinien in Astrozyten (Juopperi *et al.*, 2012). Dies würde ein Zellsystem generieren, welches ausschließlich aus von einer Person abgeleiteten Zellen besteht. Physiologische Experimente, wie auch die eventuelle Testung von Medikamenten, könnten so in einem Zellsystem mit einheitlichem genetischem Hintergrund durchgeführt werden. Ein Problem der Kokultivierung von unterschiedlichen Zelltypen ist die Erkennung einzelner Neuronentypen in einer Kultur. In der Studie von Liu *et al.*, (2013b) wurden Neurone morphologisch unterschieden und eingeteilt, während Higurashi *et al.* (2013) die zu untersuchenden Neurone durch ein *SCN1A*-Venus (YFP) Promotor-Reporterkonstrukt unterscheidbar machte. Zum Zwecke der Unterscheidbarkeit sollen ausschneidbare (Cre/Loxp) Promotor-XFP Marker in die von uns generierten hIPS-Zelllinien eingebracht werden (z.B.

GAD65/67::GFP, GABAerg ; VGLUT1::RFP, glutamaterg), um die Identität der zu messenden Zellen visuell bestimmen zu können. Der Einfluss unterschiedlicher Zelltypen (Einfluss nach Anteil im Netzwerk) auf die Netzwerkaktivität kann so besser bestimmt werden. Um den Einfluss des genetischen Hintergrundes weiter zu reduzieren, sollen isogene Kontrollen mit Crispr/Cas Technologie aus den bisher erstellten Patientenzelllinien erzeugt werden. Die pathogenen Einflüsse von mutierten Ionenkanälen könnten so innerhalb des gleichen genetischen Hintergrundes verglichen werden. Die Methodik wird momentan von Niklas Schwarz (PhD-Student, AG Lerche) im Labor etabliert.

4.4.1. Fazit

Das vorliegende Zellsystem aus generierten Neuronen, die aus reprogrammierten somatischen Zellen abgeleitet sind, ist nach meiner Überzeugung noch nicht geeignet, um die teilweise kleinen Effekte von Ionenkanalmutationen zu untersuchen. Die momentane Inkonsistenz der elektrophysiologischen Daten lassen genaue Aussagen über die Effekte von Epilepsie-assoziierten Mutationen, meiner Meinung nach, noch nicht zu.

Allerdings bildet das vorliegende Zellsystem eine solide Basis, um ein solches System zu erstellen. Die Verwendung von „Brainphys“ unterstützt die elektrophysiologische Aktivität von generierten Neuronen und ermöglicht elektrophysiologische Ableitungen im Kulturmedium. Dies ermöglicht mehr Messungen innerhalb eines Differenzierungsansatzes und scheint die Ausprägung elektrophysiologischer Aktivität von generierten neuronalen Kulturen zu unterstützen. Weiterhin kann die Reifung der generierten Neurone durch Kokultivierung mit Astrozyten beschleunigt bzw. verbessert werden. Anhand dieser Maßnahmen sollte es möglich sein, homogene vergleichbare elektrophysiologische Daten erzeugen zu können, welche es erlauben, die elektrophysiologischen Effekte von Epilepsie-assoziierten Ionenkanalmutationen in einem patientenspezifischen Zellsystem zu untersuchen. Die Kokultivierung von Zellen unterschiedlicher Differenzierungsprotokolle würde die Analyse potentieller Netzwerkeffekte von Ionenkanalmutationen durch MEA-Analysen ermöglichen, wodurch netzwerkabhängige Mechanismen eines epileptischen Anfalls beleuchtet werden könnten. Weiterhin könnte ein solches System zur patientenspezifischen Testung von Antiepileptika benutzt werden. Die Einbringung von Promotor-Reporterkonstrukten ermöglicht die visuelle Identitätsbestimmung generierter

Neuronentypen bei Einzel- und Kokultivierung von Zellen aus GABAergen und glutamatergen Differenzierungen. Einflüsse einzelner Neuronentypen auf die Netzwerkaktivität könnten so näher definiert und dokumentiert werden.

Generell könnten generierte Neuronen als Ausgangspunkt für molekularbiologische Untersuchungen dienen. Molekulare Phänotypen von Ionenkanalmutationen, unabhängig von den elektrophysiologischen Phänotypen, könnten so untersucht bzw. identifiziert werden. So könnten z.B. aus den generierten Neuronen Proteinlysate erstellt werden, anhand derer per Co-Immunopräzipitation nach Interaktionspartnern bestimmter Ionenkanäle gesucht werden kann. Dies könnte durch Yeast-2-Hybrid Versuche mit einer aus generierten Neuronen erstellten cDNA-Bibliothek ergänzt werden. Intrazelluläre Regulatoren von Ionenkanälen könnten so identifiziert und deren Funktion näher untersucht werden. Wobei auch Vergleiche der Interaktome zwischen verschiedenen Neuronentypen möglich wären, wodurch es eventuell ermöglicht würde, die Voraussetzungen für die Zusammensetzung der Ionenkanäle in unterschiedlichen Neuronentypen zu ergründen. Erstellte cDNA Banken könnten weiterhin dazu dienen, putative Transkriptionsfaktoren durch „Yeast-One-Hybrid“ Versuche zu identifizieren, welche an der Expression von Ionenkanälen beteiligt sind. Ebenso könnten vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen isogenen Kontrollen und den korrespondierenden Patientenlinien Hinweise auf eventuell modifizierende Gene geben (Reinhardt *et al.* 2013), welche in die Ausbildung der phänotypischen Diversität bei GEFS+ involviert sind.

Der momentane direkte therapeutische Nutzen von hPS-Zellen für Patienten ist noch gering. Allerdings ergeben sich aus der Forschung erste Anwendungsmöglichkeiten, welche die Therapie von genetischen Krankheiten verbessern könnte. Einerseits können neue Wirkstoffe generell in humanen Zellmodellen auf ihre Auswirkungen untersucht werden, wodurch sich die Entwicklung von Therapeutika beschleunigen ließe. Andererseits könnten Medikamente patientenspezifisch auf ihre Wirksamkeit getestet werden. So wäre es zum Beispiel möglich bei Patienten, welche eine Pharmakoresistenz aufweisen, Medikamente vorher an generierten Zellen zu testen und so dem Patient unnötige Nebenwirkungen nicht wirksamer Medikamente zu ersparen. Eine zukünftige Verwendung von patientenspezifischen hPS-Zelllinien für therapeutische Zwecke (z.B. Rücktransplantation von genkorrigierten hPS-Zellen) ist eine interessante Option für die Behandlung von genetisch bedingten Krankheiten. Genetisch bedingte fehlerhafte Zellen würden durch genkorrigierte Zellen, abgeleitet

von hIPS-Zellen des Patienten, bei geringem Abstoßungsrisiko komplementiert werden, um so die Symptome der Krankheit zu minimieren. Ebenso bieten sich Anwendungsmöglichkeiten bei Rückenmarksverletzungen. Aus hIPS-Zellen des Patienten generierte neuronale Stammzellen könnten an der verletzten Stelle injiziert werden und so eventuell einen Heilungsprozess auslösen. Naheliegender wäre, Neuronen zu generieren, welche als Ersatz für zerstörtes neuronales Gewebe dienen. Das zerstörte Gewebe würde neurochirurgisch entfernt und durch das generierte ersetzt. Dies gilt auch für andere Neuronen des peripheren Nervensystems. Ebenso liegt es nahe z.B. bei Verbrennungsoptionen Hautstücke durch gezüchtete Haut zu ersetzen. Da induzierte Stammzellen in fast jede beliebige Körperzelle entwickelbar sind, eröffnet dies die Möglichkeit Organe wie z.B. Herz, Leber oder Lunge aus patientenspezifischen induzierten Stammzellen zu entwickeln. So könnten Organtransplantationen in definierter Wartezeit bei sehr geringem Abstoßungsrisiko durchgeführt werden. Dies ist natürlich zum momentanen Zeitpunkt reine Spekulation und erfordert die weitergehende Erforschung von hIPS-Zellen, die Etablierung geeigneter Sicherheitsstandards sowie die Klärung ethischer und moralischer Fragen (Tanabe *et al.*, 2014). Allerdings verdeutlicht dies das enorme Potential von hIPS-Zellen für Forschung und Medizin.

5. Zusammenfassung

Idiopathische generalisierte Epilepsien zeichnen sich durch oft typische epileptische Anfälle ohne strukturelle Veränderungen des Gehirns aus. Die Ursache liegt in genetischen Veränderungen, häufig von Ionenkanalgenen. Zur Aufklärung der Pathogenese dieser Mutationen werden verschiedenste heterologe *in vitro* und *in vivo* Modelle genutzt. Trotz enormer Erkenntnisgewinne durch diese Modelle sind die genauen Zusammenhänge zwischen Epilepsie-assoziierten Mutationen und der eigentlichen Anfallsentstehung noch teilweise unklar. Mit Hilfe der von Takahashi et al., (2007) vorgestellten Methode, der Reprogrammierung von Fibroblasten in pluripotente Stammzellen, kann ein patientenspezifisches, humanes *in vitro* Zellmodell zur Untersuchung von Epilepsie-assoziierten Mutationen generiert werden.

In dieser Arbeit wurde der Ablauf zur Erstellung eines patientenspezifischen *in vitro* Zellmodells im Labor etabliert. Dieses umfasst:

1. Die Reprogrammierung von Hautfibroblasten zu induzierten pluripotenten Stammzellen.
2. Die Differenzierung der generierten Stammzellen in neuronale Zellkulturen mit elektro-physiologischer Aktivität.

Eine Methode zur Reprogrammierung von Hautfibroblasten durch virale Transduktion der Transkriptionsfaktoren (OCT3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) wurde etabliert und angewendet. Ebenso wurden die notwendigen Zellkulturtechniken zur Kultivierung und Charakterisierung von hIPS-Zellen verankert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt sieben hIPS-Zelllinien generiert und bezüglich ihrer Pluripotenz hinreichend charakterisiert. Darunter vier Kontrolllinien von zwei unterschiedlichen Individuen (K1/19, K1/39 und K4/17, K4/18), sowie drei Zelllinien generiert aus einer Patientin mit GEFS+, mit einer Mutation (Asn1735Lys) in SCN1A (P1/7, P1/11, P1/12). Zur Charakterisierung der erstellten Zelllinien wurde die Expression von gängigen Stammzellmarkern (Nanog, OCT3/4, SSEA4, Tra-1-81) durch immunzytochemische Färbungen sowie relative Expressionsbestimmungen durch qPCR gezeigt. Ebenso wurde die effektive Reprimierung eingebrachter viraler Faktoren gezeigt. Anhand der Linie P1/12 wurde ein Differenzierungsprotokoll zur Erzeugung GABAerger Neurone im Labor etabliert. Die zeitliche Entwicklung der Zellkulturen wurde anhand immunzytochemischer Färbungen dokumentiert. Elektrophysiologische Ableitungen der generierten Neurone zeigten neurontypische Na⁺ und K⁺ Ströme sowie spontane und induzierte Aktionspotentialausbildung, deren Ausprägung noch Zeichen von

unreifen Neuronen aufwiesen. Die Fähigkeit neuronale Zellen zu generieren, wurde für die Patientenlinien sowie die Kontrolllinien K1 dokumentiert und für K4 beobachtet. Weiterhin wurden 14 Epilepsie-assoziierte Ionenkanalmutationen (SCN1A [2], SCN2A [9], KCNA2 [3]) per gerichteter Mutagenese generiert und für elektrophysiologische Analysen in heterologen Modellsystemen zur Verfügung gestellt.

6. Literaturverzeichnis

- Bardy C, van den Hurk M, Eames T, et al. Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E2725-2734.
- Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, et al. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5112-5116.
- Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, et al. Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann Neurol* 2004;55:550-557.
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, et al. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 1998;279:403-406.
- Brunklaus A, Ellis R, Stewart H, et al. Homozygous mutations in the SCN1A gene associated with genetic epilepsy with febrile seizures plus and Dravet syndrome in 2 families. *Eur J Paediatr Neurol* 2015;19:484-488.
- Buta C, David R, Dressel R, et al. Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays? *Stem Cell Res* 2013;11:552-562.
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;26:13-25.
- Chen W, Liu J, Zhang L, et al. Generation of the SCN1A epilepsy mutation in hiPS cells using the TALEN technique. *Sci Rep* 2014;4:5404.
- Chen WJ, Lin Y, Xiong ZQ, et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nat Genet* 2011;43:1252-1255.
- Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, et al. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* 2001;68:1327-1332.
- Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:479-500.
- Dravet C, Bureau M, Oguni H, et al. Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. *Adv Neurol* 2005;95:71-102.
- Duflocq A, Le Bras B, Bullier E, et al. Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. *Mol Cell Neurosci* 2008;39:180-192.
- Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr., et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009;457:277-280.
- Escayg A, Goldin AL. Sodium channel SCN1A and epilepsy: mutations and mechanisms. *Epilepsia* 2010;51:1650-1658.

- Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, et al. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 2000;24:343-345.
- Frankel WN, Taylor L, Beyer B, et al. Electroconvulsive thresholds of inbred mouse strains. *Genomics* 2001;74:306-312.
- Germain ND, Chen PF, Plocik AM, et al. Gene expression analysis of human induced pluripotent stem cell-derived neurons carrying copy number variants of chromosome 15q11-q13.1. *Mol Autism* 2014;5:44.
- Hedrich UB, Liautard C, Kirschenbaum D, et al. Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Na(V)1.1 mutation. *J Neurosci* 2014;34:14874-14889.
- Heinzen EL, Depondt C, Cavalleri GL, et al. Exome sequencing followed by large-scale genotyping fails to identify single rare variants of large effect in idiopathic generalized epilepsy. *Am J Hum Genet* 2012;91:293-302.
- Higurashi N, Uchida T, Lossin C, et al. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain* 2013;6:19.
- Iwata A, Nagashima Y, Matsumoto L, et al. Intranuclear degradation of polyglutamine aggregates by the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* 2009;284:9796-9803.
- Jiao J, Yang Y, Shi Y, et al. Modeling Dravet syndrome using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and directly converted neurons. *Hum Mol Genet* 2013;22:4241-4252.
- Juopperi TA, Kim WR, Chiang CH, et al. Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. *Mol Brain* 2012;5:17.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of neural science*. McGraw-Hill New York; 2000.
- Klassen T, Davis C, Goldman A, et al. Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell* 2011;145:1036-1048.
- Kondratiuk I, Plucinska G, Mischczuk D, et al. Epileptogenesis following Kainic Acid-Induced Status Epilepticus in Cyclin D2 Knock-Out Mice with Diminished Adult Neurogenesis. *PLoS One* 2015;10:e0128285.
- Lauxmann S, Boutry-Kryza N, Rivier C, et al. An SCN2A mutation in a family with infantile seizures from Madagascar reveals an increased subthreshold Na(+) current. *Epilepsia* 2013;54:e117-121.
- Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009;461:402-406.

- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* 1999;79:1317-1372.
- Lerche H, Shah M, Beck H, et al. Ion channels in genetic and acquired forms of epilepsy. *J Physiol* 2013;591:753-764.
- Lerche H, Weber YG, Jurkat-Rott K, et al. Ion channel defects in idiopathic epilepsies. *Curr Pharm Des* 2005;11:2737-2752.
- Li X, Patel JC, Wang J, et al. Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S. *J Neurosci* 2010;30:1788-1797.
- Liao Y, Anttonen AK, Liukkonen E, et al. SCN2A mutation associated with neonatal epilepsy, late-onset episodic ataxia, myoclonus, and pain. *Neurology* 2010;75:1454-1458.
- Liao Y, Deprez L, Maljevic S, et al. Molecular correlates of age-dependent seizures in an inherited neonatal-infantile epilepsy. *Brain* 2010;133:1403-1414.
- Liu Y, Liu H, Sauvey C, et al. Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2013;8:1670-1679.
- Liu Y, Lopez-Santiago LF, Yuan Y, et al. Dravet syndrome patient-derived neurons suggest a novel epilepsy mechanism. *Ann Neurol* 2013;74:128-139.
- Lloyd SE, Maytham EG, Grizenkova J, et al. A Copine family member, Cpne8, is a candidate quantitative trait gene for prion disease incubation time in mouse. *Neurogenetics* 2010;11:185-191.
- Loh YH, Agarwal S, Park IH, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 2009;113:5476-5479.
- Lorincz A, Nusser Z. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci* 2008;28:14329-14340.
- Macarthur CC, Fontes A, Ravinder N, et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA Sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions. *Stem Cells Int* 2012;2012:564612.
- Magnuson T, Epstein CJ, Silver LM, et al. Pluripotent embryonic stem cell lines can be derived from tw5/tw5 blastocysts. *Nature* 1982;298:750-753.
- Maljevic S, Naros G, Yalcin O, et al. Temperature and pharmacological rescue of a folding-defective, dominant-negative KV 7.2 mutation associated with neonatal seizures. *Hum Mutat* 2011;32:E2283-2293.
- Maljevic S, Wuttke TV, Lerche H. Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *J Physiol* 2008;586:1791-1801.

- Mantegazza M. Dravet syndrome: insights from in vitro experimental models. *Epilepsia* 2011;52 Suppl 2:62-69.
- Mantegazza M, Catterall WA. Voltage-Gated Na⁺ Channels: Structure, Function, and Pathophysiology. In Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al. (Eds) *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*: Bethesda (MD); 2012.
- Mattis VB, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells: a new revolution for clinical neurology? *Lancet Neurol* 2011;10:383-394.
- Misra SN, Kahlig KM, George AL, Jr. Impaired NaV1.2 function and reduced cell surface expression in benign familial neonatal-infantile seizures. *Epilepsia* 2008;49:1535-1545.
- Mistry AM, Thompson CH, Miller AR, et al. Strain- and age-dependent hippocampal neuron sodium currents correlate with epilepsy severity in Dravet syndrome mice. *Neurobiol Dis* 2014;65:1-11.
- Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC, et al. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum Mol Genet* 2011;20:3642-3652.
- Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 2011;8:633-638.
- Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, et al. SCN1A mutations and epilepsy. *Hum Mutat* 2005;25:535-542.
- Muratore CR, Srikanth P, Callahan DG, et al. Comparison and optimization of hiPSC forebrain cortical differentiation protocols. *PLoS One* 2014;9:e105807.
- Napolitano A, Manini P, d'Ischia M. Oxidation chemistry of catecholamines and neuronal degeneration: an update. *Curr Med Chem* 2011;18:1832-1845.
- Nguyen HN, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 2011;8:267-280.
- Odawara M, Kadowaki T, Naito Y. Incidence and predictors of hypoglycemia in Japanese patients with type 2 diabetes treated by insulin glargine and oral antidiabetic drugs in real-life: ALOHA post-marketing surveillance study sub-analysis. *Diabetol Metab Syndr* 2014;6:20.
- Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci* 2007;27:5903-5914.
- Oliva M, Berkovic SF, Petrou S. Sodium channels and the neurobiology of epilepsy. *Epilepsia* 2012;53:1849-1859.

- Polymenidou M, Cleveland DW. Prion-like spread of protein aggregates in neurodegeneration. *J Exp Med* 2012;209:889-893.
- Raab S, Klingenstein M, Liebau S, et al. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int* 2014;2014:768391.
- Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF, et al. Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell* 2013;12:354-367.
- Rodemann HP, Binder A, Burger A, et al. The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int Suppl* 1996;54:S32-36.
- Scalmani P, Rusconi R, Armatura E, et al. Effects in neocortical neurons of mutations of the Na(v)1.2 Na⁺ channel causing benign familial neonatal-infantile seizures. *J Neurosci* 2006;26:10100-10109.
- Schubert J, Paravidino R, Becker F, et al. PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures. *Hum Mutat* 2012;33:1439-1443.
- Schubert J, Siekierska A, Langlois M, et al. Mutations in STX1B, encoding a presynaptic protein, cause fever-associated epilepsy syndromes. *Nat Genet* 2014;46:1327-1332.
- Seibler P, Graziotto J, Jeong H, et al. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci* 2011;31:5970-5976.
- Syrbe S, Hedrich UB, Riesch E, et al. De novo loss-or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 2015;47:393-399.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-872.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
- Tanabe K, Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotency by defined factors. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 2014;90:83.
- Veeramah KR, O'Brien JE, Meisler MH, et al. De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. *The American Journal of Human Genetics* 2012;90:502-510.
- Wang L, Wang L, Huang W, et al. Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nat Methods* 2013;10:84-89.
- Xu R, Thomas EA, Jenkins M, et al. A childhood epilepsy mutation reveals a role for developmentally regulated splicing of a sodium channel. *Mol Cell Neurosci* 2007;35:292-301.

7. Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Dr. Lerche für die Möglichkeit dieses Thema zu bearbeiten und die Unterstützung während meiner Dissertation.

Prof. Dr. Jan Benda danke ich für seine unbürokratische Hilfe.

Meiner „Beraterin“ Dr. Snezana Maljevic danke ich für ihre Unterstützung und ihren steten Glauben an das Projekt.

Der Elektrophysiologie-Magierin Dr. Ulrike B. S. Hedrich danke ich für die Einführung in die schwarzen Künste und ihren Aquisitionskräften bezüglich gebackener Köstlichkeiten.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe Lerche danken, die mich sehr freundschaftlich aufgenommen hat und die vielen Fehlschläge erträglicher gemacht haben.

Im Besonderen möchte ich Heidi Löffler danken, die es stets geschafft mich durch freundliche Worte (oder auch einem verdienten Rüffel :)) zu motivieren und mich in die geheimen Künste der Zellkultur eingeführt hat.

Ebenso danke ich meinen beiden Doktorgeschwistern Julian Schubert und Yvonne Fuell, für das Beste Denzellenteam der Welt (möge Danny Crane ewig sein).

8. Lebenslauf

Ausbildung:

- Februar 2010 - August 2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Hertie Institut für Klinische Hirnforschung Tübingen
Forschungsgebiet: induzierbare Stammzellen, Genetik und Pathophysiologie von Ionenkanalerkrankungen
- Mai 2008 - Mai 2009 Diplom in Biologie am Zentrum für molekulare Biologie der Pflanzen (ZMBP) Tübingen
Forschungsgebiet: Protein-Protein Interaktionen und molekulare Signalkaskaden (Gesamtnote:1,3)
- Oktober 2003 - Juni 2008 Student der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
- Oktober 2001 . Oktober 2003 Student der Bioinformatik an der Eberhard Karls Universität Tübingen
- September 2000 - Juli 2001 Zivildienst als Altenpfleger im Krankenhaus Bethanien Hamburg
- Juni 2000 Abitur am Alexander von Humboldt-Gymnasium Neuss (Abschlussnote: 2,7)

Publikationen:

- März 2015 **De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy.**
Nature Genetics 03/2015; DOI:10.1038/ng.3239
- Juni 2013 **An SCN2A mutation in a family with infantile seizures from Madagascar reveals an increased subthreshold Na(+) current.**
Epilepsia 06/2013; DOI:10.1111/epi.12241
- März 2013 **Genetic Correction of a LRRK2 Mutation in Human iPSCs Links Parkinsonian Neurodegeneration to ERK-Dependent Changes in Gene Expression.**
Cell stem cell 03/2013; 12(3):354-67. DOI:10.1016/j.stem. 2013.01.008
- Januar 2013 **PRRT2-related disorders: further PKD and ICCA cases and review of the literature**
Journal of Neurology 01/2013; 260(5). DOI:10.1007/s00415-012-6777
- Mai 2012 **PRRT2 Mutations are the major cause of benign familial infantile seizures.**
Human Mutation 05/2012; 33(10):1439-43. DOI:10.1002/humu.22126

