

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
(Direktorin: Prof. Dr. Kamila Jauch-Chara)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian–Albrechts-Universität zu Kiel

Pluripotente Stammzellen als Modell
zur Erforschung des Aicardi-Goutières Syndroms
Inauguraldissertation

Zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt

von

Natalya Baryshnikova

aus Taschkent

Kiel 2019

1. Berichterstatter: PD. Dr. med. F-J. Müller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P-M Holterhus

Tag der mündlichen Prüfung: 9.12.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.: Prof. Dr. K. Jauch-Chara

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS AICARDI-GOUTIÈRES-SYNDROM	1
1.1.1 KLINISCHE MERKMALE DES AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROM	1
1.1.2 MOLEKULARE GENETIK DES AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROM	2
1.1.3 PATHOGENESE DES AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROM	3
1.1.4 AGS ALS MODELLERKRANKUNG FÜR HÄUFIGERE, KOMPLEXE AUTOIMMUNERKRANKUNGEN	7
1.1.5 MAUSMODELLE DES AGS	7
1.2 HUMANE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN ZU <i>IN VITRO</i> KRANKHEITSMODELLIERUNG	8
1.2.1 ERZEUGUNG HUMANER PLURIPOTENTER STAMMZELLINIEN VON PATIENTEN	8
1.2.2 ERKRANKUNGSMODELLIERUNG MITTELS INDUZIERTER PLURIPOTENTER STAMMZELLEN	9
1.2.3 FRAGESTELLUNG	10
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 ZELLKULTUROBERFLÄCHEN	10
2.1.1 MATRIGELBESCHICHTUNG FÜR DIE STAMMZELLKULTUR	10
2.1.2 BESCHICHTUNG DER GLASPLÄTTCHEN MIT POLY-L-LYSIN	10
2.2 VERWENDETE ZELLINIEN	11
2.2.1 HUMANE DERMAL FIBROBLASTEN	11
2.2.2 HUMANE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN	11
2.2.3 HUMANE INDUZIERTE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN	12
2.2.3.1 REPROGRAMMIERUNG HUMANER FIBROBLASTEN ZU INDUZIERTEN PLURIPOTENTEN STAMMZELLEN	12
2.2.3.2 ISOLATION VON KLONALEN HIPSC LINIEN	14
2.3 ZELLKULTUR	14
2.4.3 MEDIUMWECHSEL	14
2.5 PASSAGIEREN VON ZELLEN	14
2.6 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	15
2.7 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON KULTIVierten ZELLEN	16
2.7.1 FIXIERUNG MIT FORMALDEHYDLÖSUNG	16
2.7.2 PERMEABILISIERUNG UND BLOCKIERUNG VON ZELLEN FÜR DIE ANTIKÖRPERINKUBATION	17
2.7.3 BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT PRIMÄREN ANTIKÖRPERN	17
	17
2.7.5 BEHANDLUNG VON ZELLEN MIT SEKUNDÄREN ANTIKÖRPERN	17
	18
2.8 MIKROSKOPISCHE HOCHDURCHSATZANALYSE VON GEFÄRBTEN ZELLEN	18
2.8.1 IMMUNZYTOCHEMISCH GEFÄRBTE ZELLEN	18
2.8.2 MIKROKERNTEST	18
3 ERGEBNISSE	20
3.1 REPROGRAMMIERUNG VON FIBROBLASTEN EINES AGS PATEINTEN ZU HIPSC LINIEN	20
	22
3.2 CHARAKTERISIERUNG DER AGS-HIPSC LINIEN FÜR PLURIPOTENZ	22
3.2.1 MORPHOLOGIE, IMMUNZYTOCHEMIE UND KARYOTYPSIERUNG	23

3.2.2	PLURITEST	24
3.3.1	VERMEHRTE MIKROKERNE IN AGS hiPSC	26
4	DISKUSSION	28
4.1	ERKRANKUNGSMODELLIERUNG MITTELS hiPSC	30
4.2	HETEROGENITÄT DER AGS-hiPSC LINIEN	31
4.3	AUSBLICK UND WEITERE UNTERSUCHUNGEN AN AGS-hiPSC	33
5	ZUSAMMENFASSUNG	35
6	LITERATURVERZEICHNIS	36
7	DANKSAGUNG	41
8	ANHANG	42
	ERGÄNZENDE TABELLE 1: VERWANDTE MEDIEN UND REAGENZIEN	42
	ERGÄNZENDE TABELLE 2: VERWANDTE MEDIEN UND REAGENZIEN	43
	ERGÄNZENDE TABELLE 3: REAKTIONSGEFÄßE UND MATERIALIEN	44
	ERGÄNZENDE TABELLE 4: VERWANDTE GERÄTE UND INSTRUMENTE	45

Abkürzungsverzeichnis

ADAR	<i>Adenosine deaminases acting on RNA</i>
AGS	Aicardi-Goutières-Syndrom
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCL5	<i>CC-chemokine ligand 5</i>
cGAMP	<i>cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate</i>
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
CMV	Cytomegalievirus
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
DAPI	4`6-Diamin-2-Phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	Embryonale Stammzellen
FCS	<i>fetal calf serum</i>
HDF	humane dermale Fibroblasten
hESC	humane embryonale Stammzellen
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
hPSC	humane pluripotente Stammzellen
IFI27	<i>interferon alpha inducible protein 27</i>
IFI44	<i>interferon-induced protein 44</i>
IFI44L	<i>interferon-induced protein 44 like</i>
IFIH1	<i>interferon-induced helicase C domain-containing protein 1</i>
IFIT2	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2</i>
IL6	Interleukin 6
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
KLF4	<i>Krueppel-like factor 4</i>
LC3	<i>Light chain 3</i>

L-MYC	Myelocytomatose Onkogen L1
LINE-1	<i>long interspersed nuclear element 1</i>
LIN28	<i>cell lineage abnormal 28</i>
LRRK2	<i>leucine-rich repeat kinase2</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
NF-kB	Nekrosefaktor kB
Oct	Octamer-bindender Transkriptionsfaktor
POU5F1	<i>POU domain class 5 homeobox 1</i>
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
p53	Protein 53
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (ohne MgCl₂/CaCl₂)</i>
PFA	Paraformaldehyd
PSC	<i>pluripotent stemcell</i> (pluripotente Stammzellen)
RNase H2	Ribonuclease H2
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLE	Sytemischer Lupus erythematodes
SMAD1	<i>mothers against decapentaplegic protein 1</i>
SOX2	<i>Sex-determining-region Y (box 2)</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
TANK	<i>TRAF family member associated NFKB activator</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase1</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TREX1	<i>three prime repair exonuclease 1</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Aicardi-Goutières-Syndrom

Das Aicardi-Goutières Syndrom (AGS) ist eine äußerst seltene, frühkindliche, chronisch verlaufende, genetisch determinierte entzündliche Erkrankung des Gehirns, die für die Patienten mit schweren intellektuellen sowie körperlichen Beeinträchtigungen einhergeht.

1.1.1 Klinische Merkmale des Aicardi-Goutières Syndrom

Das klassische AGS war ursprünglich durch die französischen Neuropädiater Jean Aicardi und Françoise Goutières bei Säuglingen und Kleinkindern als eine früh einsetzende, fortschreitende Erkrankung des zentralen Nervensystems mit beidseitiger Spastizität und Dystonie infolge einer Verkalkung der Basalganglien, einer erworbenen Mikrozephalie, einer ausgeprägten Lymphozytose im Liquor sowie einer rapiden Verschlechterung mit infauster Prognose beschrieben worden (Aicardi and Goutières 1984). Eine große Gruppe der Patienten präsentiert sich bereits gleich nach der Geburt mit Vergrößerung von Leber und Milz, erhöhten Leberenzymwerten, Thrombozytopenie sowie Entwicklungsverzögerung und spastischer Paraparese. Obwohl die Symptome sehr stark an eine kongenitale Virusinfektion (wie z.B. durch CMV, Röteln, Herpes simplex oder HIV) erinnern, konnte bislang kein pathogenes Virus aus Patientenmaterialien isoliert werden (Rice et al. 2007). Die neurologischen Auffälligkeiten sind durch Blutgefäßveränderung (Stenosen oder Aneurysmen der Hirnarterien), intrakranielle Verkalkungen und Nekrosen innerhalb der Basalganglien, eine Schädigung der weißen Substanz (Leukodystrophie) sowie eine globale Hirnatrophie bedingt. Einige dieser Befunde konnten in einzelnen Fällen bereits *in utero* gesichert werden (Crow et al. 2015). Circa 40 % der AGS-Patienten zeigen zudem charakteristische Hautveränderungen und Symptome, wie Vaskulitiden und Nekrosen der Finger (auch Chilblainläsionen genannt), Marmorhaut (Livedo reticularis), entzündliche sowie nekrotisierende Erkrankungen des Fettgewebes und Verlust des subkutanen Fettgewebes (Lipodystrophie). Auch weitere, z.T. sehr unterschiedliche pathologische Veränderungen und Prozesse sind mit dem AGS vergesellschaftet, welche nicht mit der neurologischen bzw. dermatologischen Präsentation in direktem Zusammenhang stehen. Bei einigen AGS Patienten wurden Rückfallfieber, Glaukome, Knochenmarksupression mit Thrombozytopenie, chronische lymphatische

Leukämien, Enchondrome (gutartige Knochen- bzw. Knorpeltumore, Myositiden (Skelettmuskelentzündung), eine hypertrophe Kardiomyopathie (Herzmuskelentzündung), Verkalkung der Aorta, vorzeitiger Zahnverlust und Gelenkkontrakturen als mit dem Syndrom einhergehend beschrieben (Crow and Manel 2015; Crow et al. 2015).

1.1.2 Molekulare Genetik des Aicardi-Goutières Syndrom

Das AGS ist eine sehr seltene, monogene Erbkrankheit, für die mittlerweile Mutationen in sieben Genen (RNase H2A, RNase H2B, RNase H2C, TREX1, SAMHD1, ADAR1, IFIH1) als Ursache beschrieben wurden (Crow and Manel 2015). Die Prävalenz des Syndroms kann nicht verlässlich angegeben werden, die diesbezüglich bisher größte internationale Studie untersuchte die klinische Präsentation von insgesamt 374 AGS Patienten aus 299 Familien, welche multizentrisch weltweit rekrutiert worden waren (Crow et al. 2015). Diese Erkrankung geht immer mit einer pathologisch abnorm hohen Produktion von Typ-I-Interferonen einher. Typ-I-Interferone sind Zytokine, welche an den Interferon- α Rezeptor binden. Die vermutlich krankheitsauslösenden Mutationen in den genannten Genen wurden zunächst durch genetische Untersuchungen von familiären AGS Fällen entdeckt (Crow et al. 2006a; 2006b; Rice et al. 2007). Durch die genetische Definition des Syndroms anhand verschiedener AGS auslösender Gene konnten im Weiteren Patienten identifiziert werden, welche nicht dem „klassischen“ AGS Phänotyp entsprechen. Bei diesen Patienten mit Mutationen in den AGS Genen fehlen gelegentlich eines, mehrere oder sogar alle Symptome des klassischen AGS, sodass mittlerweile bei den unterschiedlichen Formen des typischen und atypischen AGS bzw. AGS-Genassoziierten Erkrankungen von „Typ-I-Interferonopathien“ gesprochen wird. (Crow and Manel 2015). Normalerweise werden Typ-I-Interferone (vornehmlich Interferon alpha (α) und beta (β)) von zahlreichen Zelltypen als Immunantwort auf als „fremd“ erkannte DNA oder RNA im Rahmen einer Infektion mit Viren oder Bakterien freigesetzt. Die Typ-I-Interferone beeinflussen als biologisch aktive Signalproteine sowohl umliegende infizierte als auch nicht infizierte Zellen und koordinieren somit sowohl die lokale als auch systemische Immunantwort.

Alle bis jetzt bekannte Gene, bei denen Mutation in AGS-Patienten nachgewiesen werden konnten (TREX1, RNase H2A, B und C, SMAD1, ADAR, IFIH1), sind funktionell mit dem Nukleinsäurestoffwechsel verknüpft.

Sowohl die *Three Prime Repair Exonuklease 1* (TREX1) als auch die A-, B- und C-Untereinheiten der Ribonuklease H2 (RNase H2) stellen Nukleinsäuren ab- bzw. umbauende Enzyme dar

(sogenannte Nukleasen), welche auf Einzel- und Doppelstrang-DNA bzw. RNA-DNA-Hybride gerichtet sind (Crow Manel 2015). Das SAM Domain und HD *Domain 1-containing* Protein 1 (SAMHD1) verfügt auch über Ribonukleasenaktivität und besitzt eine Phosphohydrolasenaktivität, mit der SAMHD1 die Menge an Deoxynucleosidtriphosphaten im Zytoplasma reguliert und damit retrovirale Replikation in infizierten Zellen supprimiert. *Adenosin-Deaminase acting on RNA* (ADAR) stellt ein Enzym dar, welches RNA-Moleküle bindet und durch posttranslationale Modifikation von Adenosin zu Inosin doppelsträngige RNA Moleküle destabilisiert. Das Gen IFIH1 codiert für das Protein *Melanoma Differentiation Associated Protein 5* (MDA5). Das Gen MDA5 ist ein zytosolischer Rezeptor, der doppelsträngige RNA mit mehr als 2000 Nukleotiden Länge bindet und damit deren viralen Ursprungs erkennt (Crow and Manel 2015).

Eine übergreifende Hypothese bezüglich der funktionellen Rolle der mit AGS verknüpften Gene besagt, dass Veränderungen in der Nukleinsäuren abbauenden Funktion der Enzyme zu einer pathologischen, zytoplasmatischen Anhäufung von Nukleinsäureintermediaten führt, damit intrazelluläre antivirale Schutzmechanismen aktiviert und somit eine entzündliche zelluläre Antwort angestoßen wird (Crow and Manel 2015).

Es gibt jedoch auch weiterführende, komplexere Vermutungen bezüglich der genetischen Mechanismen, welche an der Pathogenese des AGS beteiligt sein könnten. Für die DNase TREX1 und die dNTPase SAMHD1 wurde gezeigt, dass beide Enzyme bei der Vermehrung von sowohl endogenen (LINE-1 und Alu-Elemente) als auch exogenen (HIV) Retroelementen eine wichtige Rolle spielen. Es ist beobachtet worden, dass in TREX1-defizienten Zellen endogene Retroelemente (z.B. LINE-1, engl.: *long interspersed nuclear element-1*) vermehrt aktiv sind. Infolgedessen wird in diesen Zellen dauerhaft die Produktion der Interferone vom Typ I ($\alpha+\beta$) hochreguliert. Auf der anderen Seite weisen Zellen, denen entweder TREX1, SAMHD1 oder RNase H2 fehlt, vermehrt DNA Schäden auf (Yang et al. 2007; Reijns et al. 2012; Günther et al. 2015; Kretschmer et al. 2015). Als alternative Hypothese wurde formuliert, dass diese chronischen DNA-Schäden für die AGS-assoziierte Interferonantwort verantwortlich sein könnten, und nicht die vermehrte Aktivität von Retrotransposons (Crow and Manel 2015).

1.1.3 Pathogenese des Aicardi-Goutières Syndrom

Wie im vorangegangenen Abschnitt kurz skizziert, wird unter anderem vermutet, dass eine abnorme Anhäufung von zelleigenen Nukleinsäuren und anschließende Aktivierung von

intrazellulären Rezeptoren des angeborenen Immunsystem (engl.: „*innate immunity*“) zu einer unverhältnismäßigen Typ-I-Interferonantwort führt.

Hierfür exemplarisch sind die Veränderungen, welche durch RNase H2-Mutationen ausgelöst werden: RNase H2 ist eine Endoribonuklease, welche zwei distinkte Enzymaktivitäten besitzt. Auf der einen Seite spaltet RNase H2 den RNA-Anteil von RNA/DNA-Hybriden, d.h. doppelsträngigen Nukleinsäuren, welche aus einem Strang RNA (mehr als 4 aufeinanderfolgende Ribonukleotiden) und einem gegenüberliegenden Strang DNA bestehen. Die Fähigkeit zur Hydrolyse von RNA/DNA-Hybriden teilt RNase H2 mit der nahe verwandten Nuklease RNase H1. RNase H2 unterscheidet sich von anderen Enzymen der RNase H Familie dadurch, dass sie in der Lage ist, einzelne Ribonukleotide aus doppelsträngiger DNA herauszuschneiden. RNase H2 besteht aus drei Untereinheiten (A, B und C), die alle drei für ein Funktionieren des Enzyms erforderlich sind (Cerritelli and Crouch 2009). Die Katalyse der Prozesse wird durch die A Untereinheit vermittelt, die RNase H2B und C Proteine bilden mit der A Untereinheit ein Enzymkomplex und werden vor allem als regulatorische Einheiten des multimeren Proteins angesehen. Mutationen in allen drei RNase H2 Genen stellen die häufigste (> 50 % der Fälle) genetische Ursache für AGS dar (Crow et al. 2015). RNA/DNA-Hybride entstehen als Zwischenprodukte in vielen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel bei der Transkription, DNA Replikation sowie der Telomerenelongation (Cerritelli and Crouch 2009; Balk et. al. 2013). Die molekulare Charakterisierung von RNaseH2-defizienten Mäusen hat jedoch ergeben, dass die Hauptfunktion von RNase H2 sehr wahrscheinlich in der Entfernung von falsch eingebauten, einzelnen Ribonukleotiden aus replizierender DNA besteht: RNaseH2-knockout-Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung (Rabe 2013). Dabei weist die genomische DNA der Embryos eine starke Akkumulation von einzelnen Ribonukleotiden auf, was zu massiven DNA-Schädigungen und in der Konsequenz zu einem Wachstumsstop der Embryonen führt.

Abbildung 1 stellt ein aktuelles Modell für die Pathogenese des RNase H2-assoziierten AGS dar, welche im Folgenden näher beschrieben wird (Die römischen Ziffern beziehen sich auf jene Bildelemente in Abb. 1, welche mit denselben Ziffern gekennzeichnet sind).

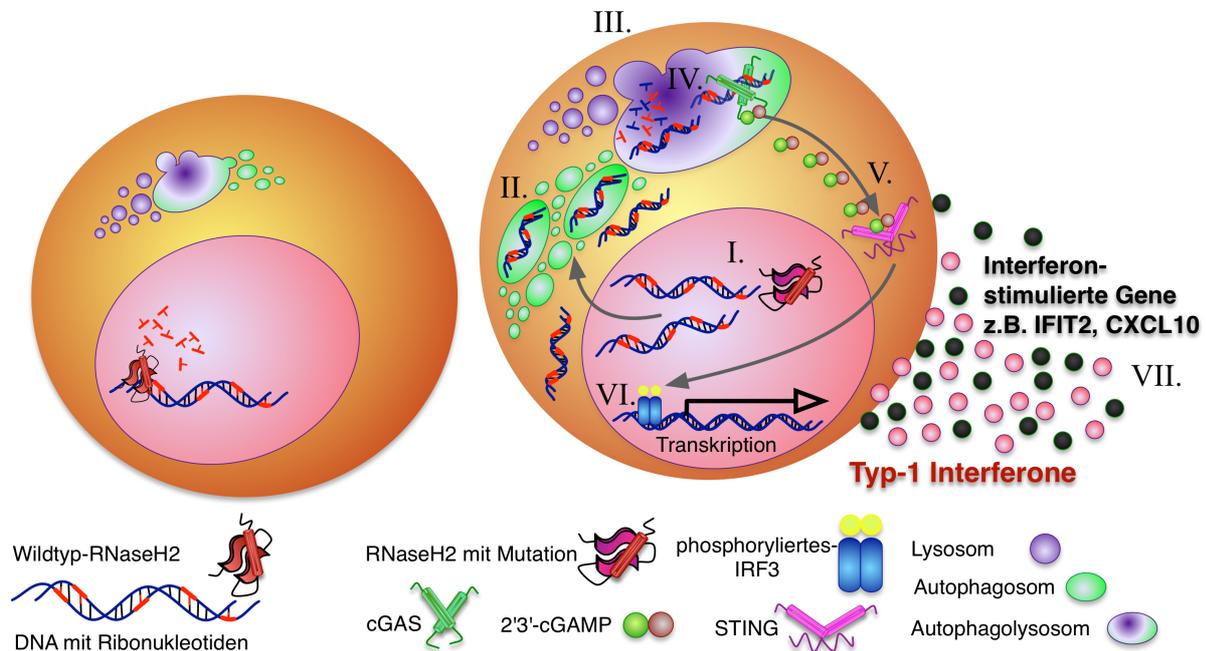


Abbildung 1: Molekulares Modell der Pathogenese des RNase H2-assoziierten AGS

I.) Es wird angenommen, dass es infolge von hypofunktionellen Varianten des RNase H2-Enzyms zu einem starken Anstieg von einzelnen, DNA-assozierten Ribonukleotiden im Zellkern kommt (Günther et al. 2015). Die genomischen Ribonukleotide wiederum resultieren in zahlreiche DNA-Schäden, welche noch im Nucleus lokalisiert sind.

II.) Die geschädigten DNA-Moleküle treten vermehrt in das Zytoplasma über und sammeln sich in Form von sogenannten Micronuclei (Bartsch et al. 2017). Der Begriff Mikrokern bezieht sich dabei auf eine Ansammlung von DNA, welche mittels DNA-anfärbenden Chemikalien (z.B. Hoechst 33342 [Bisbenzimid]) anfärbbar ist. Da im Normalfall nur der Zellkern wegen seines großen DNA-Gehalts mit z.B. Hoechst 33342 stark angefärbt wird, erscheinen die mit DNA angefüllten Mikrokerne wie kleine Zellkerne (engl.: „micronuclei“). Die *Micronuclei* (Mikrokerne) fusionieren nun mit Autophagosomen, welche die geschädigten DNA-Moleküle dem zellulären Autophagie-System zum unspezifischen Abbau zuführen.

III.) Die Autophagosomen verschmelzen daraufhin mit Lysosomen, welche im Normalfall den vollständigen Abbau der dysfunktionalen Zellbestandteile in den dadurch gebildeten Autophagolysosomen sicherstellen würden. Jedoch übersteigt vermutlich die große Menge an

Nukleotidpolymeren die Kapazität des Autophagolysosomsystems, sodass die DNA in den dadurch vermehrt vorhandenen Micronuclei vom angeborenen Immunsystem fälschlicherweise als „fremd“ erkannt werden und eine pathologische Entzündungsreaktion ausgelöst wird.(Bartsch et al. 2017; Mackenzie et al. 2017)

IV.) Die Nukleotidsequenzen werden durch das zytoplasmatische Sensorprotein zyklische GMP-AMP Synthase (engl.: *cyclic GMP-AMP Synthase*, cGAS) fälschlicherweise als viralen Ursprungs erkannt. cGAS setzt über das angeborene Immunsystem mittels Dimerisierung und anschließender Produktion von 2,3 zyklischem Guanosin Monophosphate–Adenosin Monophosphat (*cyclic GMP-AMP*, cGAMP) eine Signaltransduktionskaskade in Gang.

V.) cGAMP aktiviert das STING Protein (engl.: *Stimulator of Interferon Genes*, STING).

VI.) STING wiederum rekrutiert die Serin/Threonin Kinase (engl.: *TANK-binding kinase 1*, TBK1), welche über Phosphorylierung des Interferon-regulatorischen Faktors 3 (engl.: *Interferon regulatory factor 3*, IRF3) und anschließender nukleärer Translokation desselben zu einer Aktivierung der Transkription der Interferon I-Gene führt.

VII.) Durch auto- und parakrine Stimulation werden intrazelluläre Prozesse der Immunantwort aktiviert (z.B. Hochregulation von NF- κ B, IFIT2, IFI44L, IFI44, IFI27). Nachfolgend werden zahlreiche entzündliche Zytokine und andere entzündungsassoziierte Mediatoren (z.B. CXCL10, CCL5, IL-6, TNF-alpha) aus den Zellen freigesetzt.

Die chronische Aktivierung des Mechanismus der angeborenen Immunität führt in unserem Modell, über die Ausschüttung von Typ-I-Interferonen, zu einer stark erhöhten Konzentration dieser antiviralen Zytokine im Liquor und dadurch wiederum zu einer das gesamte ZNS betreffenden, massiven Entzündungsreaktion.

Durch die verstärkte Zytokinsekretion kommt es zu einem vermehrten Einstrom von weißen Blutkörperchen in das Hirnwasser. In Hirnschnitten von AGS-Patienten konnte aber gezeigt werden, dass das vermehrte Interferon α von Astrozyten - und nicht von einwandernden Leukozyten – stammt (van Heteren et al. 2008). Dass erhöhte Mengen von Interferon α im ZNS für die Ausbildung von AGS-typischen Symptomen (wie z.B. Kalkablagerungen, Atrophie, Leukodystrophie) verantwortlich sein können, konnte in transgenen Mäusen, deren Astrozyten durch transgene Manipulation permanent Interferon α produzieren, gezeigt werden.

1.1.4 AGS als Modellerkrankung für häufigere, komplexe Autoimmunerkrankungen

Neben der auffälligen Ähnlichkeit zu einer viralen Infektion besteht eine hohe symptomatische Überlappung mit der systemischen Autoimmunerkrankung Lupus erythematoses (insbesondere eine Interferon- α -Signatur, Verkalkungen des Gehirns und „chilblain lesions“). Das Aicardi-Goutières Syndrom wurde als prototypische, nukleinsäurebasierte Autoimmunerkrankung bezeichnet (Lee-Kirsch et al. 2014). Da AGS als monogene Erbkrankheit eine definierte molekulare Ursache besitzt, könnte es als ein Modell für komplexere, polygene Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus erythematoses dienen, welche ebenfalls durch Defekte im Nukleinsäurestoffwechsel ausgelöst werden. In der Tat wurden in 2,6 % der Patienten mit systemischem Lupus Mutationen im TREX1 Gen nachgewiesen, womit TREX1-Mutationen aktuell die häufigste monoallele Ursache für Lupus erythematoses darstellen (Lee-Kirsch et al. 2007; Namjou et al. 2011). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass seltene Sequenzvarianten in den RNase H2-Genen mit der Entstehung von Lupus erythematoses assoziiert sind (Günther et al. 2015).

1.1.5 Mausmodelle des AGS

Durch die Entdeckung der AGS-assoziierten Gene sind in den folgenden Jahren verschiedene gentechnisch erzeugte Mausmodelle entwickelt worden. Überraschenderweise zeigt keines der transgenen bzw. Tiere mit konditioneller Ablation der RNase H2-Funktion, in Bezug auf das zentrale Nervensystem, ein dem menschlichen Erkrankungsbild ähnelnden Phänotyp (Bartsch et al. 2018).

Ein vollständiger Verlust der RNase H2-Funktion („*Knock Out*“) führt in Mäusen zu embryonaler Letalität (Hiller et al. 2012; Reijns et al. 2012). Dieser Befund wird durch die Tatsache untermauert, dass alle bisher im Menschen identifizierten RNase H2 Mutationen die enzymatische Aktivität der Endoribonuklease verringern, jedoch nicht vollständig aufheben. In der Arbeitsgruppe von Professor Björn Rabe wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche konditionell Knockout Mausmodell für die RNase H2 entwickelt. Keines der Tiere zeigte jedoch bisher Anzeichen oder Befunde der menschlichen Erkrankung im zentralen Nervensystem *in vivo*, obwohl aus den transgenen Tieren gewonnene Astrozyten *in vitro* einzelne Merkmale des AGS zeigten (Bartsch et al. 2018). Ähnlich liegen Befunde mit anderen Knock-Out Modellen für das AGS, in denen sich bisher kein dem menschlichen AGS ähnelnder ZNS Phänotyp sichern lies (Morita et al. 2004; Hartner et al. 2009; Gall et al. 2012; Hiller et al. 2012; Reijns et al. 2012; Behrendt et al. 2013; Rehwinkel et al. 2013; Funabiki et al. 2014).

1.2 Humane pluripotente Stammzellen zu *in vitro* Krankheitsmodellierung

In den vergangenen Jahren haben sich induzierte pluripotente Stammzellen zu einem wichtigen Werkzeug entwickelt, das *in vitro* Krankheitsmodellierung erlaubt.

Stammzellen sind Zellen, die in der Lage sind, sich zum einen in bestimmte zelluläre Elemente eines Gewebes zu differenzieren und zum anderen sich selbst zu erneuern, d.h. sich ohne Verlust Ihrer besonderen Eigenschaften zu vermehren (Schöler 2004). Es gibt verschiedene Typen von Stammzellen, welche nach deren Differenzierungspotential unterschieden werden können. Von den verschiedenen Stammzellenklassen sind seit mehreren Jahren insbesondere pluripotente Stammzellen (PSC) im Fokus der Grundlagenforschung. Diese Zellen haben das Potential sich in alle Zelltypen der drei Keimblätter des Gastrulationsembryos zu differenzieren (Thomson 1998; Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi et al. 2007). Sie sind somit in der Lage sich *in vitro* beispielsweise in Nervenzellen (neuroektodermale Differenzierungsrichtung), hämatopoetische Stammzellen (mesodermale Differenzierungsrichtung) und pankreatische Betazellen (endodermale Differenzierungsrichtung) zu entwickeln. Das größte Potential von humanen PSC wird neben Anwendungen in der regenerativen Medizin auch im Kontext der *in vitro* Krankheitsmodellierung und Medikamentenforschung gesehen (Grskovic et al. 2011). Hierzu werden Zelltypen, welche durch eine bestimmte Erkrankung betroffen sind, durch *in vitro* Differenzierung aus hPSC erzeugt und die vermuteten molekularen bzw. zellulären Pathomechanismen an diesen in großer Menge zur Verfügung stehenden Zielzellen versucht nachzustellen.

1.2.1 Erzeugung humaner pluripotenter Stammzelllinien von Patienten

Die weit verbreitete Nutzung von hPSC zur *in vitro* Krankheitsmodellierung wurde vor allem durch die Entwicklung der Reprogrammierung von somatischen Zellen zu einem pluripotenten Zustand ermöglicht. Shinya Yamanaka kombinierte die Überexpression von zentralen Transkriptionsfaktoren welche Pluripotenz regulieren (Oct4, Klf4, cMyc und Sox2) in somatischen Zellen mit einer Selektionsstrategie für PSC und generierte damit Stammzellkulturen, welche sich praktisch nicht von ESC unterscheiden lassen und funktionell äquivalent sind, d.h. beispielsweise nach Injektion in murine Präimplantationsembryonen zu Chimärismus führen (Takahashi and Yamanaka 2006; Okita et al. 2007). Diese Zellen wurden von Yamanka als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) bezeichnet. John Gurdon und

Shinya Yamanaka erhielten im Jahre 2012 den Nobelpreis für Medizin für ihre Arbeiten und grundlegende Entdeckungen (Lensch and Mummery 2013).

Mit dieser Technologie ist es nun möglich geworden, somatische Zellen, die von einem Patienten, der an einer genetischen Krankheit leidet, und die z.B. durch eine Hautbiopsie gewonnen wurden, in einen pluripotenten Zustand durch biotechnologische Verfahren zu überführen. Damit entsteht eine nahezu unerschöpfliche *in vitro* Quelle für patientenspezifische, differenzierte Zielzellen mit definierten genetischen Defekten, welche in einem nächsten Schritt experimentell untersucht werden können.

1.2.2 Erkrankungsmodellierung mittels induzierter pluripotenter Stammzellen

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Stammzellbanken mit z.T. tausenden hiPSC Linien von Patienten mit unterschiedlichsten Erkrankungen entstanden (Soares et al. 2014). Die Herausforderung bei dieser Form von Erkrankungsmodellierung besteht darin, phänotypische Korrelate der zu untersuchenden Erkrankung *in vitro* zu definieren, welche dann in einem zweiten Schritt für die Aufklärung der zugrundeliegenden Pathomechanismen herangezogen werden können. Verschiedenste neuropsychiatrische Erkrankungen sind in den vergangenen Jahren in patienten-spezifischen hiPSC-basierten *in vitro* Modelle übersetzt worden. In einer der ersten Arbeiten zu einer monogenen Form der Parkinson'schen Erkrankung (LRRK2-G2019C) konnte über die pathophysiologische Rolle des alpha-Synukleins weiter aufgeklärt werden und dies über Veränderung der oxidativen Stressantwort sowie über eine erhöhte Vulnerabilität der dopaminergen Neurone für Neurotoxine gezeigt werden (Nguyen et al. 2011). Analog dazu wurde z.B. für hiPSC abgeleitete Neurone, welche von einer Patientin mit einer sehr früh einsetzenden, schwerstgradigen Psychose stammten, gezeigt, dass diese *in vitro* eine verminderte synaptische Konnektivität zeigen und diese sich durch die Behandlung mit einem Neuroleptikum verbessert (Brennand et al. 2011).

Für die hier vorgelegte Arbeit besonders relevant sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Allison Muotri, die hiPSC Linien von AGS Patienten mit Mutationen im TREX1 Gen erzeugten und neurale Zellen aus den pluripotenten Zellen differenzierten und untersuchten (Thomas et al. 2017). Konsistent mit den histopathologischen Untersuchungen an AGS Patienten, zeigten vor allem Astrozyten eine starke Aktivierung der Interferon-I Immunantwort und führten sekundär zur Schädigung von Nervenzellen *in vitro* (Thomas et al. 2017).

1.2.3 Fragestellung

In der hier vorgelegten Dissertation soll mit zellbiologischen Verfahren der Frage nachgegangen werden, ob pathophysiologische *in vitro* Korrelate des Aicardi-Goutières Syndroms in induzierten pluripotenten Stammzellen, die von einem AGS Patienten mit einer RNase H2 Mutation stammen, gefunden werden können.

2 Material und Methoden

In der Vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* kultivierte humane pluripotente sowie somatische Zelllinien kultiviert. Hierzu wurden unterschiedliche Zellkulturoberflächen und Medien eingesetzt.

2.1 Zellkulturoberflächen

2.1.1 Matrigelbeschichtung für die Stammzellkultur

Für die „feeder-free“ Kultivierung von hPSC wurde Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, Heidelberg Cat.Nr.: 356234) verwendet. Um Zellkulturschalen mit Matrigel zu beschichten, wurde das Matrigel stets auf Eis aufgetaut und zu einer Konzentration von 1:100 mit gekühltem (4 °C) DMEM (1x) verdünnt. Danach wurden für 1 Vertiefung einer 6 Wellplatte 1 ml Matrigellösung (1 ml/9,6 cm²) verwendet. Nachfolgend wurden die Zellkulturschalen in einem Kühlschrank bei 4 °C für 24 Stunden inkubiert. Zur direkten Verwendung mit hPSC wurde die Matrigellösung verworfen und die beschichtete Plastikoberfläche mit den entsprechenden Stammzellmedien zeitnah befüllt, ohne dass die Beschichtung antrocknen konnte.

2.1.2 Beschichtung der Glasplättchen mit Poly-L-Lysin

Mikroskopdeckgläschen (*Microscope Cover Glasses* Fa. VWR, Darmstadt) wurden als Träger für Zellen und deren fluoreszenzmikroskopische Analyse verwendet. Damit die jeweiligen Zellen auf dem Glas anhaften konnten, wurden die Deckgläschen zunächst mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierzu wurden die Deckgläschen in eine 1 Molare HCl-Lösung eingelegt und auf 50-60 °C für 2 Stunden erhitzt. Nach Abkühlung des Gefäßes auf Raumtemperatur wurde die Salzsäure mit destilliertem Wasser abgespült und die Deckgläschen mit einer Ethanollösung (70 % Ethanol und 30 % zweifach destilliertes Wasser) für 30 min behandelt. Die 70 %ige Ethanollösung wurde dann durch eine 95 % Ethanollösung ersetzt. Dieser Vorgang wurde nach 30 min nochmals wiederholt. Anschließend wurden die Deckgläschen in einem

Trockenschrank bei 60 °C für mindestens eine Stunde getrocknet. Die Poly-L-Lysin-Lösung wurde nach Empfehlung des Herstellers in der Verdünnung 1:10 mit einer PBS-Lösung (*Phosphat Buffered Saline*) eingesetzt. In einer Arbeitswerkbank wurden die Deckgläschen unter sterilen Bedingungen mit der vorbereiteten Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet, indem sie in einen Gestellrahmen platziert und dieser wiederum in ein Gefäß mit der Beschichtungslösung für 5 min eingetaucht wurden. Anschließend wurden die beschichteten Deckgläschen für 2 Stunden in einem Trockenschrank getrocknet. Um die entsprechenden Zelltypen auf die Deckgläschen ausbringen zu können, wurde die mit Poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen jeweils einzeln auf die Vertiefungen einer 24 Wellplatte verteilt und dort mit der entsprechenden Matrixpräparation (Gelatine, Matrigel) beschichtet und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2 Verwendete Zelllinien

Es wurden *in vitro* kultivierte humane embryonale (WA01, WA09), induzierte pluripotente (ZIP23K1, K11, K13, ZIP13K2) und somatische Zelllinien humane dermale Fibroblasten (HDF) verwandt.

2.2.1 Humane dermale Fibroblasten

Für die Arbeit wurden humane dermale Fibroblasten in Fibroblastenmedium mit nachfolgender Zusammensetzung kultiviert: DMEM (1x), 20 % fetales Kälberserum, 5 mM Glutamin (Life Technologies, Darmstadt) und Penizillin/Streptomycin (50 U/ml, Life Technologies, Darmstadt). Die Zellen wurden zur Subkultivierung durch eine dreiminütige Inkubation mit Trypsin (0,05 %, Life Technologies, Darmstadt) von der Zellkulturoberfläche abgelöst, das Trypsin durch serumhaltiges Medium neutralisiert, die Gesamtzellzahl mittels eines bildbasierten Zellzählcomputers (Countess, Life Technologies, Darmstadt) bestimmt. Danach wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur für 3 min und 150 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Fibroblastenmedium resuspendiert und mit einer Zellzahl von 1000 Zellen/cm² wieder in neue Kulturgefäße ausgesät.

2.2.2 Humane pluripotente Stammzellen

Als pluripotente Stammzellen wurden sowohl hESC (Thomson 1998) als auch hiPSC (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007) parallel verwendet. Hierbei wurden für beide pluripotenten Zelltypen (hPSC) dieselben Zellkulturbedingungen angewandt. Die hPSC wurden auf

extrazellulären Matrixpräparationen in einem industriell hergestellten Zellkulturmediensystem (mTeSR) ohne die Verwendung einer „feeder cell“-Schicht kultiviert. Für die vorliegende Arbeit wurde die hESC Linie WA09 sowie WA01 (im folgenden H9 bzw. H1 genannt) sowie die hiPSC Linie ZIP13K2 als Kontrollzelllinien verwendet (Thomson 1998; Tandon et al. 2018). Die Einfuhr und Verwendung für die in dieser Doktorarbeit beschriebenen Arbeiten mit besagter hESC Linie war von dem Robert Koch Institut am 02.04.2009 für Versuche, die hESC mit hiPSC vergleichen genehmigt worden (AZ 3.04.02/0042-E01).

2.2.3 Humane induzierte pluripotente Stammzellen

Für die Arbeiten wurden hiPSC von dermalen Fibroblasten eines AGS Patienten mit einer A177T-Mutation der B-Untereinheit (siehe 2.3.1) abgeleitet und charakterisiert. Die Fibroblasten wurden freundlicherweise von Professor Yanick Crow (*Centre for Genomic Medicine, Institute of Human Development Faculty of Medical and Human Sciences, University of Manchester*) zur Verfügung gestellt. Die im folgenden beschriebenen Arbeiten wurden von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der CAU begutachtet und genehmigt (Aktenzeichen A 145/11).

2.2.3.1 Reprogrammierung humaner Fibroblasten zu induzierten pluripotenten Stammzellen

Für die Reprogrammierung humaner dermaler Fibroblasten (HDF) zu hiPSC wurden die Plasmide pCXLE-hOCT3/4-shp53, pCXLE-hSK und pCXLE-hUL verwendet (Okita et al. 2011). Durch die Kombination dieser drei Plasmide wurden die humanen Transkriptionsfaktoren POU5F1(OCT3/4), SOX2, KLF4, L-MYC und LIN28 in den mit den Plasmiden transfizierten Zielzellen für > 3 Wochen stabil überexprimiert (Okita et al. 2011). Zusätzlich wurde die Expression des p53 Proteins durch eine „short hairpin“ RNA supprimiert (Hong et al. 2009). Für die hier beschriebenen Arbeiten wurden ausschließlich die Plasmide und das Protokoll zur Reprogrammierung mit episomalen, nicht-integrierenden Plasmiden nach Okita, Yamanaka und Kollegen verwandt (Okita et al. 2011).

Tabelle 1: Parameter für die Elektroporation von humanen dermalen Fibroblasten mittels Neon Mikroporator.

<i>Pulsprogramm</i>	<i>Spannung</i>	<i>Pulslänge</i>	<i>Pulsanzahl</i>	<i>Zellzahl</i>	<i>Plasmidmenge</i>
<i>HDF</i>	1,650 V	10 ms	3	6×10^5	4 μ g
<i>Transfektion</i>					

Je Transfektionsansatz wurden drei T75-Flaschen mit 70-80 %iger Konfluenz verwendet. Zunächst wurde das alte Zellkulturmedium verworfen und die Zellen mit 5 mL PBS (1x) gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Trypsinierung (3 mL Trypsin/T75-Flasche) für 3 min bei 37 °C. Anschließend wurde die Trypsinlösung mittels Fibroblastenmedium (ohne Antibiotika) inaktiviert und die Zellzahl mittels automatisiertem Zellzähler bestimmt. Für die Transfektion mit dem Neon Mikroporator wurden 6×10^5 der Zellsuspension bei 150 x g für 3 min bei RT zentrifugiert und das Zellpellet mittels PBS (1x) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 150 x g für 3 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 μ l Resuspensionspuffer R resuspendiert. Parallel wurden die in Nuclease-freien ddH₂O gelösten Plasmide in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt und 4 μ g der resultierenden DNA mit einem maximalen Volumen von 10 μ l für eine Transfektion verwendet. Die in dem Resuspensionspuffer gelösten Zellen wurden nachfolgend mit der Plasmid-DNA Lösung vermengt und mit dem Pulsprogramm in Tab. 1 elektroporiert.

Nach der Transfektion wurden die Zellen eines Ansatzes in je 1 Vertiefung einer 6 Wellplatte mit 2 mL vorgelegtem Fibroblastenmedium ohne Antibiotika überführt. In den folgenden Tagen erfolgte alle 2 Tage ein Mediumwechsel mit Fibroblastenmedium. An Tag 7 nach der Transfektion wurden die Zellen erneut passagiert. Hierzu wurden das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen mit PBS (1x) gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen mit 1 ml Trypsin pro Vertiefung einer 6 Wellplatte für maximal 3 min bei 37 °C. Die Trypsinierungsreaktion wurde mit 2 ml Fibroblastenmedium pro Vertiefung gestoppt und die Zellzahl bestimmt. Nach Zentrifugation bei 150 x g für 3 min wurde das Zellpellet in TeSR-E7 (STEMCELL Technologies, Stolberg, Katalog-Nr. 05910) resuspendiert und zu je 1×10^5 Zellen auf eine Matrigel beschichtete 100 mm Petrischale in 10 ml TeSR-E7 ausgesät. Anschließend erfolgte ein täglicher Mediumwechsel mit 10 ml TeSR-E7 Medium/100 mm Petrischale supplementiert mit Natriumbutyrat 0,5 μ M (Sigma- Aldrich, Hamburg).

2.2.3.2 Isolation von klonalen hiPSC Linien

Die in der Kokultur (nicht reprogrammierte Fibroblasten) entstehenden hiPSC-Klone wurden ab Tag 21 manuell analog zur manuellen Subkultivierung von hPSC (siehe 2.4.2) unter einem Stereomikroskop identifiziert, aus der Zellkulturschale herausgelöst und in eine Matrigel beschichtete Zellkulturschale mit TeSR-E8 Medium (STEMCELL Technologies, Stolberg, Katalog-Nr. 05990) überführt.

2.3 Zellkultur

2.4.3 Mediumwechsel

Die Häufigkeit von Mediumwechseln wurde durch den spezifischen Zelltyp bestimmt. Bei embryonalen oder induzierten Stammzellen wurde das Medium täglich gewechselt. Die Fibroblasten wurden alle 2 Tagen mit frischem Medium versorgt. Für die Stammzellen wurde TeSR-E8 Medium benutzt, für die Fibroblasten wurde ein serumbasiertes Fibroblastenmedium verwandt (siehe 2.2.1).

2.5 Passagieren von Zellen

Für das Passagieren von HDF in T-75 Zellkulturflaschen wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % in Fibroblastenmedium kultiviert. Verbrauchtes Medium wurde verworfen und die Zellen mit 5 ml PBS (1x) gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 3 ml 0,25 % Trypsinlösung bei 37 °C im Brutschrank. Die Trypsinreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 6 ml Fibroblastenmedium inhibiert und die Zellzahl mittels automatisiertem Zellzähler bestimmt. Nachfolgend wurde die Einzelzellsuspension in einem 15 ml Röhrchen bei 150 x g für 3 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von frischem Fibroblastenmedium erfolgte die Resuspension des Zellpellets und nachfolgend das Aussäen der HDF mit einer Zellzahl von 1000 HDF/cm² in neue T-75 Zellkulturflaschen.

Für die Passagierung von hiPSC/hESC wurde die Zellen als Zellaggregate anstelle einer Einzelzellsuspension mittels 0,5 mM EDTA-Lösung (Thermo Fisher, AM9260C) abgelöst. Die Herstellung der EDTA-Lösung erfolgte dabei durch 1:1000 Verdünnung einer 0,5 M EDTA Lösung mittels einer speziellen DPBS welches weder MgCl₂ noch CaCl₂ enthält. Hierzu wurde zunächst das verbrauchte Stammzellmedium verworfen und die Zellen mit einer 4 ml EDTA-Lösung pro Vertiefung einer 6 Wellplatte gewaschen, um überschüssige bivalente Kationen zu chelatieren. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml EDTA-Lösung pro Vertiefung und Inkubation

für 4-5 min bei RT. Die EDTA-Lösung wurde im Anschluss abgenommen und die Zellen mittels 10 ml Stabpipette vorsichtig mit 4 ml TeSR-E8 abgespült. Während der EDTA Inkubation wurden die mit Matrigel beschichteten 6 Wellplatten für den Zelltransfer vorbereitet. Hierzu wurde die Matrigellösung verworfen und 1 ml Stammzellmedium (TeSR-E8) in die Vertiefungen pipettiert. Für die Expansion der Zellaggregate wurde jeweils 1 ml der abgelösten Zellen in eine neue Vertiefung pipettiert und die Zellkulturplatte in einen Brutschrank bei 37 °C transferiert.

Für immunzytochemische- sowie Mikrokernanalysen wurden die verwendeten hiPSC/hESC als Einzelzellen ausplattiert. Dies erfolgte durch den Einsatz von Accutase (Millipore, SCR005, Darmstadt). Zunächst wurde das verbrauchte Stammzellmedium abgenommen und die Zellen mit 2 ml PBS (1x) pro Vertiefung einer 6 Wellplatte gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml vorgewärmter Accutase (RT) pro Vertiefung für 4 min bei 37 °C im Brutschrank. Die enzymatische Reaktion wurde mit 2 mL TeSR-E8 pro Vertiefung gestoppt, die Zellzahl mittels automatisiertes Zellzählcomputers bestimmt und die Zellen mittels Zentrifugation bei 120 x g für 3 min und RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem TeSR-E8 mit 0,5 µM Thiazovivin (Tocris, Kat. Nr. 3845) mit einer Zellzahl von 6×10^4 Zellen/cm² einer 24 Wellplatte (immunzytochemische Analysen) bzw. 2×10^4 Zellen/cm² einer 96 Wellplatte (Mikrokernanalysen) ausplattiert.

2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren von HDF für die Langzeitkonservierung beinhaltet ähnliche experimentelle Schritte wie beim Passagieren dieses Zelltyps (siehe 2.5). Zunächst wurden die Zellen mit PBS (1x) gewaschen, trypsinisiert, die enzymatische Reaktion gestoppt und die Zellzahl bestimmt. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml HDF-Einfriermedium/ 5×10^5 Zellen, bestehend aus 80 % Fibroblastenmedium und 20 % DMSO (Sigma-Aldrich, Kat. Nr. D2650-5x5 ml) aufgenommen und zu jeweils 1 ml in Kryoröhrchen transferiert. Letztlich sorgte der Transfer in einen *Corning CoolCell* Einfriercontainer (Corning, Kat. Nr. 432000) für eine kontrollierte (Kühlrate von -1 °C/min) Kryokonservierung der Zellen bei -80 °C. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen für die Langzeitaufbewahrung in einem Flüssigstickstoffcontainer gelagert.

Die Präparation von hiPSC/hESC für das Einfrieren als Zellaggregate in serumhaltigen Stammzell-Einfriermedium erfolgte in den ersten Schritten analog zum Passagieren mittels EDTA-Lösung (siehe 2.5). Nach dem Ablösen der Zellen mittels TeSR-E8 folgte jedoch ein

Zentrifugationsschritt bei 90 x g für 1 min und RT. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellaggregate mittels 10 ml Stabpipette in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 90 % Knockout Serum Replacement (Thermo Fisher, Kat. Nr. 10828028) und 10 % DMSO, aufgenommen. Aus einer 70-80 % konfluenten Vertiefung einer 6 Wellplatte konnten so zwei Kryoröhrchen mit je 500 µl Einfriermedium und Zellen generiert werden. Die Kryokonservierung erfolgte anschließend wie bereits für HDF beschrieben in einem Einfriercontainer.

Das Auftauen von Zelllinien erfolgte in einem temperierten (37 °C) Wasserbad (GFL Typ 1000). Hierzu wurden die Kryoröhrchen bei 37 °C gerade solange aufgetaut bis ca. 90 % des Eisvolumens geschmolzen war. Anschließend wurden die Kryoröhrchen mit Ethanol (Hersteller, Kat. Nr.), zwecks Desinfektion, besprüht und in die Sterilwerkbank verbracht. Je nach aufgetauter Zelllinie wurden nun 2 ml des entsprechenden Kultivierungsmedium langsam hinzugegeben, um einen osmotischen Schock der Zellen zu minimieren. Nachfolgend erfolgte eine Zentrifugation der Zellen wie bereits zuvor beschrieben (siehe 2.5). Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen, die HDF in 10 ml Fibroblastenmedium resuspendiert und in einer T-75 Zellkulturflasche ausgesät. Um ein Auftauen der pluripotenten Zellen zu ermöglichen wurde das Stammzellmedium (TeSR-E8) mit 0,5 µM Thiazovivin supplementiert.

2.7 Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten Zellen

2.7.1 Fixierung mit Formaldehydlösung

Durch Zugabe von Formaldehydlösungen zu Zellen können diese durch reversible Vernetzung zellulärer Proteinen konserviert („fixiert“) werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine 4 %ige Formaldehydlösung für die Fixierung von Zellen auf beschichteten Deckgläschen (*cover slips*) für spätere immunzytochemische Färbungen verwendet. Hierbei wurde 1 g eines 95 %igen Paraformaldehydpulver (PFA, Sigma Aldrich, Darmstadt) auf einer Feinwaage GFL Typ 1000 (GFL, Burgwedel) eingewogen und in 25 mL PBS (1x) bei 65 °C im Wasserbad für 2-3 h gelöst. Vor der Zugabe von PFA-Lösung zu den Zellen, wurden diese dreimalig mit 1 ml PBS pro Vertiefung einer 24er Flachboden-Zellkulturplatte (Greiner Bio-One, Hamburg) gewaschen, um Mediumreste vollständig zu entfernen. Die Fixierung erfolgte dann durch die Zugabe von 500 µl 4 %iger Formaldehydlösung je Vertiefung einer 24er Flachboden-Zellkulturplatte für 10 min bei RT. Anschließend wurde die PFA-Lösung abgenommen und die

Zellen dreimalig mit 1 mL PBS (1x) pro Vertiefung einer 24er Flachboden-Zellkulturplatte gewaschen. Die Lagerung von fixierten Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml PBS (1x) und dem Verschluss der Zellkulturplatten mittels Parafilm® (Brand, Wertheim) oder die Zellen wurden sofort nach dem Fixieren für die Färbung vorbereitet.

2.7.2 Permeabilisierung und Blockierung von Zellen für die Antikörperinkubation

Frisch fixierte oder im Kühlschrank gelagerte Zellen wurden nach der Behandlung mit Formaldehydlösung durch Zugabe einer 0,3 %igen Triton-X-Lösung (Octoxinol 9, SigmaAldrich, Darmstadt) für 5 min bei RT permeabilisiert, um die Zellmembranen für Antikörper durchlässig zu machen. Danach wurden die Proben dreimalig mit 1 ml PBS (1x) pro Vertiefung gewaschen und nachfolgend mit 5 % BSA-Lösung für 1 h bei RT inkubiert (Bovine Serum Albumin, ThermoFisher, Braunschweig), um unspezifische Bindung des primären Antikörpers zu reduzieren bzw. zu blockieren.

2.7.3 Behandlung der Zellen mit primären Antikörpern

Für die immunzytochemische Färbung von mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden 25-35 µl primärer Antikörperlösung (Tab.2) zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Kühlschrank in einer selbstgebauten Feuchteammer, um das Austrocknen der Proben zu verhindern. Hierzu wurden Kimwipes-Tücher mit PBS befeuchtet und in eine ca. 20 cm x 10 cm x 10 cm große Kammer gelegt. Nachfolgend wurden die Proben hinzugefügt, die Kammer mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde eine 1%ige BSA in PBS-Lösung verwendet

Tabelle 2: Primäre Antikörper für die Pluripotenzcharakterisierung

<i>Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Firma, Katalognummer</i>
Mouse anti-SOX2	1:200	ThermoFisher, MA1-014
Rabbit anti- NANOG	1:50	Abcam, ab21624
Rabbit anti-OCT-4	1:200	Cell Signalling Technology, 2750
Mouse anti-TRA 1-60	1:100	Merck Millipore, MAB4360

2.7.5 Behandlung von Zellen mit sekundären Antikörpern

Die mit Primärantikörpern behandelten Zellen werden nach der Inkubation dreimalig für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Die indirekte Detektion der durch den primären Antikörper gebundenen Epitope erfolgte durch Zugabe von 25-35 µl Sekundärantikörperlösung (Tab.3) mittels spezifischer Bindung an den Primärantikörper. Die Inkubation mit Sekundärantikörpern erfolgte für 2 h bei RT im Dunkeln. Danach wurden die Zellen dreimalig

für jeweils 5 min in PBS (1x) gewaschen. Für mikroskopische Analysen wurde jedes Deckgläschen auf einen Objektträger in 5-10 µl *mounting* medium (Fluoroshield, Sigma-Aldrich, Hamburg) mit DAPI (4'6-Diamidin-2-Phenylindol) transferiert. Der Farbstoff DAPI interkaliert dabei in die kleine Furche (engl.: „*minor groove*“) der DNA und emittiert unter ultraviolettem Licht blaue Fluoreszenz. Um die Proben vor dem Austrocknen zu schützen wurden die Ränder der Deckgläschen mit transparentem Nagellack versiegelt.

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper für die Pluripotenzcharakterisierung

<i>Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Firma, Katalognummer</i>
Goat anti-rabbit IgG	1:1000	ThermoFisher, Cat # A-11008
Goat anti-mouse IgG	1:1000	ThermoFisher, Cat # A-11001
Goat anti-mouse IgM	1:1000	ThermoFisher, Cat # A-21042

2.8 Mikroskopische Hochdurchsatzanalyse von gefärbten Zellen

2.8.1 Immunzytochemisch gefärbte Zellen

Für die Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Zellen wurde mit einem *PerkinElmer Opera High Content Imaging System* mikroskopische Aufnahmen mit 20 x Vergrößerung in den entsprechenden Fluoreszenzspektren aufgenommen und in der *Columbus High Content Imaging Software* (PerkinElmer Hamburg) nach Vorgaben des Herstellers dokumentiert.

2.8.2 Mikrokerntest

Für den Mikrokerntest (engl.: „*micronucleus assay*“) wurden für das Aussäen der Zellen Greiner BioOne 96-well Glasbodenplatten wie unter 2.1.2 beschrieben beschichtet. Pro Vertiefung wurden 2×10^4 hiPSC ausgesät und für einen Tag bei 37 °C in 5 % CO₂ in TeSR-E8 kultiviert.

Am nächsten Tag wurden das Medium abgenommen und die Zellen mit 100 µl eines Fixationspuffers (100 mM K-Pipes pH 6.8, 10 mM EGTA, 1 mM Magnesium Chlorid, 0.1 % Tween 20 und 3.7 % Formaldehyd) fixiert und bei RT für 20 min inkubiert. Der Fixationspuffer wurde abpipettiert und durch TBS-T Puffer (10 mM Tris-HCL pH 7.4, 150 mM NaCl und 0.1 % Tween 20) pro Vertiefung ersetzt und für 7 min bei RT inkubiert. Dieser Waschschrift wurde weitere zwei Mal wiederholt und zuletzt durch eine Färbelösung mit 1 µg/ml Hoechst 33342 zur Kernfärbung und mit 5 µg/mL „CellMask Deep Red“ (Life Technologies) zur Anfärbung des Zytoplasmas in PBS Lösung ersetzt. Danach wurde die Färbelösung wieder durch TBS-T ersetzt

und von den die Platten auf einem *Opera High Content Imaging System* (PerkinElmer Hamburg) mikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Hierzu wurden pro Vertiefung 173 Bilder mit 60x Vergrößerung aufgenommen. Diese Bilder wurden mit einem Mikrokerntestmodul in der *Columbus High Content Imaging Software* (PerkinElmer Hamburg) nach Vorgaben des Herstellers ausgewertet.

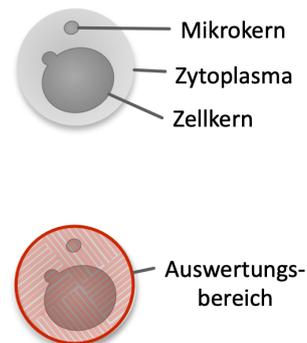
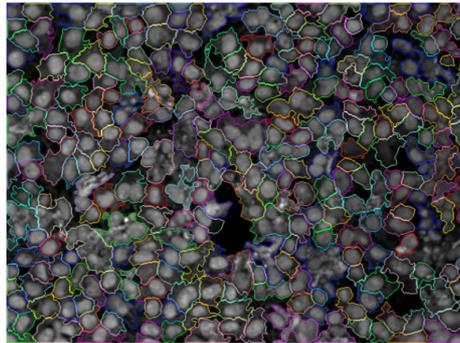
Hierzu werden zunächst basierend auf dem nukleären Hoechst 33342 Signal die Zellkerne identifiziert. In einem nächsten Schritt wurde die Zytoplasmaregion für jede Zelle einzeln basierend auf der *CellMask Deep Red*

Zytoplasmafärbung identifiziert (Abb. 2A). Als weiteren Schritt wurden Mikrokerne als die Hoechst 33342-positiven Punkte identifiziert (engl.: „*spot detection*“), welche im

Zytoplasma liegen (Abb. 2B). Zur Mikrokernelquantifikation wiederum, bietet das Softwaremodul zwei

unterschiedliche Algorithmen an. Algorithmus A verwendet vor allem die Fluoreszenzintensität im Hoechst 33342-Bereich. Algorithmus B verwendet vom Nutzer veränderbare Parameter (wie mittlere Größe der Zellkerne, der Mikrokerne, mittlere Distanz der Objekte voneinander). Es wurden beide Methoden in parallel nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Es wurde die Werte von jeweils 10 Vertiefungen für eine Zelllinie verwendet und gemittelt.

A. Cytoplasmabereich



B. Ringregion

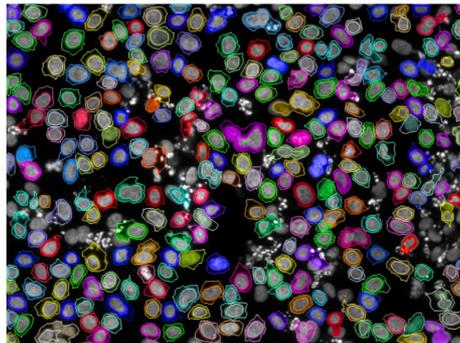


Abbildung 2: Prinzip der Hochdurchsatzmikrokernelauswertung

A: Auswertung der gesamten Zelle auf Mikrokerne (Schematische Darstellung des Auswertebereichs rechts neben tatsächlichem mikroskopischem Bild); B: Auswertung eines Ringbereichs um den Zellkern (Schematische Darstellung des Auswertebereichs rechts neben dem tatsächlichem mikroskopischen Bild)

3 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Grundlagen für ein stammzellbasiertes *in vitro* Modell für das Aicardi-Goutières Syndrom zu schaffen und nach einem möglicherweise mit der Entzündung korrelierenden Phänotyp zu suchen.

Hierzu wurden Fibroblasten eines Patienten mit AGS zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert, die daraus resultierenden hiPSC Zelllinien wurden auf deren Pluripotenz überprüft und basierend auf Befunde anderer Gruppen erforscht, ob der AGS Mutationsstatus mit der Bildung von Mikrokernen korreliert.

Die somatischen Zellen stammten von einem Patienten mit der häufigsten zu AGS führenden Sequenzvariante (A1777T) des RNase H2B Gens. Die Fibroblasten waren unfreundlicherweise von Y. Crow (University of Manchester) für die hier beschriebenen Arbeiten zur Verfügung gestellt worden. Diese Zellen wurden nach kurzzeitiger Kultivierung folgend publizierter Protokolle mit episomalen Konstrukten transfiziert und nach weiterer Kultur in entsprechenden Stammzellmedien klonale Zelllinien daraus selektiert. Die vollständige Charakterisierung von pluripotenten Stammzellen ist ein langwieriger und komplexer Prozess, der grundlegenden, wissenschaftlichen Standards genügen muss (International Stem Cell Initiative 2018). Die in dieser Arbeit erzeugten Zelllinien wurden durch immunzytochemische Färbungen sowie bioinformatische Analysen als genomisch intakte, pluripotente Stammzellen charakterisiert.

In einem nächsten Schritt wurden basierend auf Voruntersuchung in murinen Modellsystemen überprüft, ob undifferenzierte hiPSC Zelllinien von AGS-Patienten eine erhöhte Produktion von zytoplasmatischen DNA-Einschlüssen zeigen.

Im Folgenden werden zunächst die Befunde zur Charakterisierung der iPS Zelllinien dargestellt werden. Danach werden die Ergebnisse einer ersten im Hochdurchsatzverfahren durchgeführte Mikrokernanalyse beschrieben werden.

3.1 Reprogrammierung von Fibroblasten eines AGS Patienten zu hiPSC Linien

Somatische Zellen können durch Überexpression mehrerer Transkriptionsfaktoren im Rahmen eines biotechnologischen Prozesses zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden. Dieser experimentelle Prozess dauert mehrere Wochen, in denen in den somatischen Zellen mit geeigneten Transfektionssystemen Transgene überexprimiert werden. Bei einer geringen Anzahl derartig behandelte Zellen kommt es zu einem Phasenübergang in einen

komplett veränderten, pluripotenten Zustand. Aus einzelnen dieser Zellen entwickeln sich im Folgenden in geeigneten Zellkulturmedien pluripotente Stammzellenkolonien, welche unter mikroskopischer Sichtkontrolle einzelnen aus der Zellkultur herausgelöst und weiter kultiviert werden können. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass diese Kolonien häufig klonalen Ursprung sind. Deswegen spricht man von so genannten klonalen hiPSC Zelllinien.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden durch ein episomale Überexpressionssystem (pCXLE) bestehend aus drei unterschiedlichen Plasmide die Transkriptionsfaktoren POU5F1/OCT4, KLF4, SOX2, L-MYC, LIN28 sowie ein gegen das Tumorsuppressorgen p53 gerichtete siRNA exprimiert. Zunächst werden die somatischen Zellen in einem geeigneten Zellkulturmedium weiter zur Proliferation gebracht (in diesem Fall Fibroblastenmedium) und dann in einem nächsten Schritt auf ein geeignetes, das Wachstum von humanen pluripotenten Stammzellen ermöglichendes Zellkultursystem umgestellt (in diesem Fall TeSR-E7). Wie erwartet bildeten sich innerhalb von drei Wochen nach Transfektion der Fibroblasten kleine Kolonien die in ihrer Morphologie an humane pluripotente Stammzellen erinnerten. Von diesen Kolonien wurden insgesamt zwölf unter einem invertierten Stereomikroskop ausgewählt und in jeweils eine Vertiefung einer Zellkulturplatte vereinzelt. Von diesen Kolonien ließen sich insgesamt acht weiter in TeSR-E8 subkultivieren (Klon 1, 4, 6, 8, 11, 13 und 15).

Die standardisierte hPSC Nomenklatur (Luong et al. 2011; Kurtz et al. 2018) besteht aus dem Akronym der Institution an der eine Zelllinien erzeugt wurde, die Definition, ob eine Zelllinie embryonalen oder induziert pluripotenten Ursprung ist, eine Nummer welche ein Individuum eindeutig identifiziert, dessen Zellen zu Pluripotenz reprogrammiert wurden sowie einen alphabetischen Code für den für die Erstellung einer Zelllinie herangezogenen Klon.

Tabelle 4. gibt ein Überblick über die Anzahl der erzeugten Klone, deren systematischen Namen. Alle klonalen Zelllinien wurden für eine weitergehende Pluripotenzcharakterisierung mit PluriTest ausgewählt.

<i>PSC Klon (Interne Nomenklatur)</i>	<i>Standardisierter Name hPSCReg</i>
ZIP23K1	ZIPi023-A
ZIP23K4	ZIPi023-D
ZIP23K6	ZIPi023-F
ZIP23K8	ZIPi023-H
ZIP23K11	ZIPi023-K
ZIP23K12	ZIPi023-L
ZIP23K13	ZIPi023-M
ZIP23K15	ZIPi023-O
ZIP13K2	ZIPi013-B
WA01/H1	WAe001-A
WA09/H9	WAe009-A

Tabelle 4: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte pluripotente Stammzelllinien mit hPSCReg Nomenklatur (<https://hpscereg.eu>, Kurtz et al. 2018).

3.2 Charakterisierung der AGS-hiPSC Linien für Pluripotenz

Für die Charakterisierung und Qualitätskontrolle von hiPSC können eine Vielzahl von Kriterien herangezogen werden (De Los Angeles et al. 2015). Abhängig von der Anwendung gelten unterschiedliche Charakterisierungsalgorithmen (d.h. experimentelle Schritte zum stringenten Nachweis von Pluripotenz) als ausreichend (Müller et al. 2012; De Los Angeles et al. 2015; Brändl et al. 2016). Für den hier beschrittenen Weg werden die Zellen zunächst basierend auf deren Erscheinungsbild in der Zellkultur als pluripotenter Phänotyp identifiziert und selektiv kultiviert. Dann werden verschiedene Proteine, welche mit Pluripotenz assoziiert sind mittels immunzytochemischer Färbungen nachgewiesen. Da hiPSC karyotypisch intakt sein müssen, um als valides Modell für humane Erkrankungen gelten zu können, wird danach mit ausgewählten klonalen hiPSC Linien eine Bestimmung des Karyotyps vorgenommen. Schließlich (Müller et al. 2011) wird mittels einer gesamt-genomischen, bioinformatischen Methode (Müller et al. 2011) das Genexpressionsprofil der einzelnen hiPSC Zelllinie mit denen einer großen Datenbank von als pluripotent phänotypisierten Stammzelllinien abgeglichen.

3.2.1 Morphologie, Immunzytochemie und Karyotypisierung

Alle AGS-hiPSC Zelllinien zeigten das *in vitro* Wachstumsmuster von Kolonien dicht an einander wachsender, kleiner Zellen mit wenig Zytoplasma und großen Kernen. Die Zellen exprimierten konsistent vergleichbar mit einer pluripotenten Kontrollzelllinie (ZIP13K2) in überwiegender Zahl die Pluripotenzmarker POU5F1, NANOG, SOX2 und Tra-1-60. (Abb. 3).

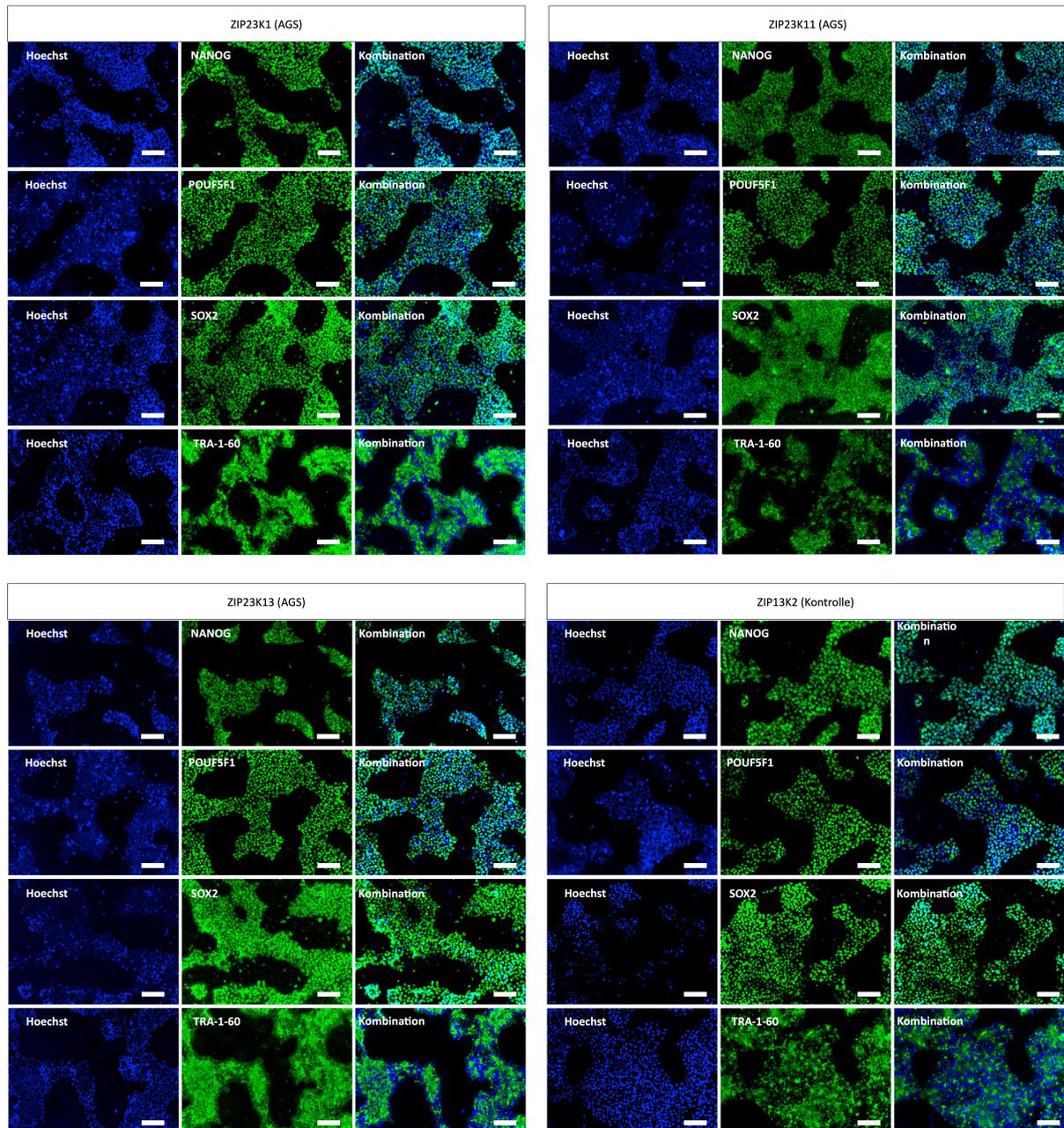


Abbildung 3: Immunzytochemische Färbung von Pluripotenzmarkern in AGS-hiPSC und einer Kontrollzelllinie. Hoechst = Zellkernfärbung (blau) mit Hoechst 33342, Kombination = Kombination der immunzytochemischen Färbung und der Zellkernfärbung, NANOG = Färbung (grün) mit Antikörper gegen NANOG, POU5F1 = Färbung (grün) mit Antikörper gegen POU5F1, SOX2 = Färbung (grün) mit Antikörper gegen SOX2, TRA-1-60 = Färbung (grün) mit Antikörper (TRA-1-60) gegen TRA-1-60 Stammzellantigen, Weißer Balken = 100 µm

Die Zelllinien ZIP23K1, ZIP23K11, ZIP23K13 wurde zur weiteren Charakterisierung ausgewählt und Proben zur Karyotypisierung an das humangenetische Labor Tumorgenetik Nord (Kiel) versandt. Alle drei Zelllinien zeigten in allen ausgewerteten Mitosen einen karyotypisch normalen weiblichen Chromosomensatz (Abb. 4 und Tab.5).

Tabelle 5: Ergebnisse der Karyotypisierung

<i>iPSC Linie</i>	<i>Passage</i>	<i>Ausgewertete Mitosen</i>	<i>Einzelzell- aberrationen</i>	<i>Karyotyp</i>
ZIP23K1	18	5	0	46,XX
ZIP23K4	18	5	0	46,XX
ZIP23K6	18	5	0	46,XX

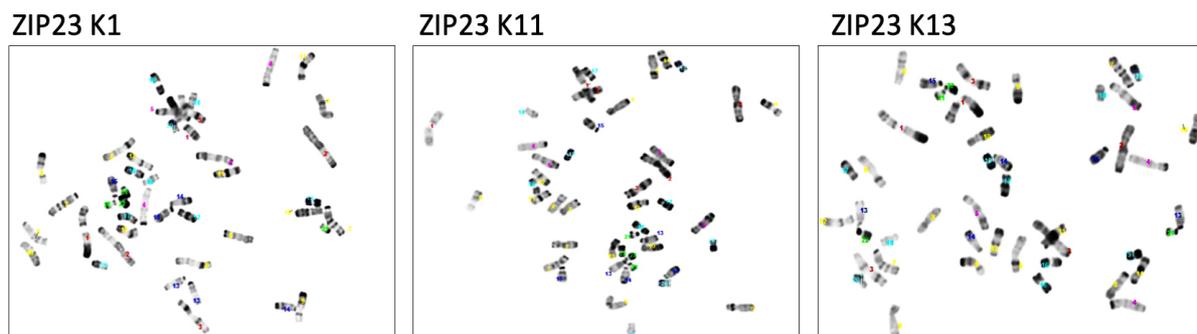


Abbildung 4: Exemplarische Ergebnisse der karyotypischen Untersuchung von ZIP23K1, ZIP23K11 und ZIP23K13. Alle Zelllinien zeigten einen normalen 23 XX Chromosomensatz.

3.2.2 PluriTest

Von allen klonalen ZIP23 Linien wurden ca. 2×10^6 Zellen pelletiert und am Institut für klinische Molekularbiologie (Kiel) RNA extrahiert und diese auf Illumina HT12v4 hybridisiert. Die Daten wurden auf www.pluritest.org hochgeladen und anhand der gesamtgenomischen Daten die pluripotenten Eigenschaften der Zelllinien bestimmt (Müller et al. 2011; International Stem Cell Initiative 2018). Abb. 5 und Tab. 6 zeigen die detaillierten Ergebnisse der Analysen. Basierend auf den Resultaten konnte nach aktuell geltenden Standards (International Stem Cell Initiative 2018) der Nachweis geführt werden, dass die getesteten humanen Zelllinien tatsächlich pluripotente Eigenschaften besitzen.

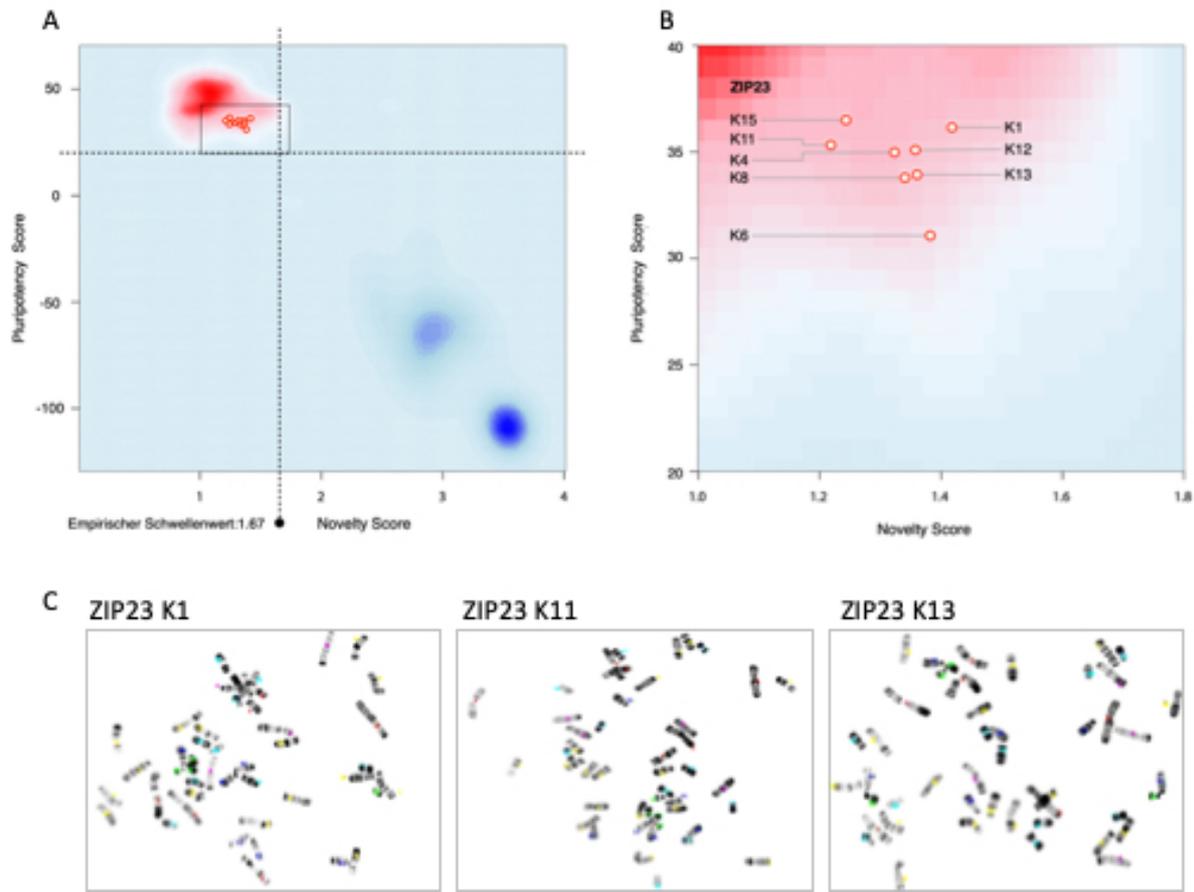


Abbildung 5 : Ergebnisse der PluriTest Analyse und Karyotypisierung

A: Die PluriTest (Müller et al. 2011) Auswertung zeigt, dass alle Zelllinien innerhalb der empirisch festgelegten Schwellenwerte für Pluripotency und Novelty Score liegen. Das Rechteck in A um die PluriTest Ergebnisse der einzelnen Zelllinien deutet den vergrößerten Bereich in B an, in welchem dieselben Daten mit den einzelnen klonalen Zelllinien verknüpft sind. Die rote und blaue Farbe im Hintergrund zeigt die empirische PluriTest Ergebnisverteilung der Trainings- und Testdaten aus Müller et al. 2011 an. Rote Pixel zeigen die Dichteverteilung pluripotenter Zellen, blaue Pixel die Dichteverteilung nicht-pluripotenter Zellen an. Man beachte, dass die Skalierung der x- zur y-Achsen zwischen den Abbildungen A und B nicht identisch ist. C: Repräsentative Aufnahmen von Metaphasechromosomen der Zelllinien ZIP23K1, ZIP23K11 und ZIP23K13.

Tabelle 6: Ergebnisse der PluriTest Analyse

<i>hiPSC Klon (Interne Nomenklatur)</i>	<i>Pluripotency Score (PluriTest)</i>	<i>Novelty Score (PluriTest)</i>	<i>Karyotypisch Überprüfung</i>
ZIP23K1	36	1,42	46 XY
ZIP23K4	35	1,32	
ZIP23K6	31	1,38	
ZIP23K8	34	1,34	
ZIP23K11	35	1,22	46 XY
ZIP23K12	35	1,35	
ZIP23K13	34	1,36	46 XY
ZIP23K15	37	1,24	
Zielwerte	> 20	< 1,67	

3.3 Phänotypisierung der AGS-hiPSC Linien

3.3.1 Vermehrte Mikrokerne in AGS hiPSC

Durch die Messung und Analyse von Micronuclei in hochdurchsatzmikroskopisch gewonnenen Daten, zeigte sich das die Zelllinien ZIP23K1, ZIP23K11, ZIP23K13 bereits im undifferenzierten, pluripotenten Differenzierungszustand deutlich mehr Mikrokerne als pluripotente Vergleichszellen zeigen (Student t-Test, $p < 0,001$ zwischen ZIP23K1, K11 und K13 und Kontrollzellen; Abb. 6A). Bemerkenswerterweise war die Anzahl der gemessenen Mikrokerne auch zwischen den verschiedenen Subklonen z.T. hochsignifikant unterschiedlich (z.B. Student t-Test $p < 0,001$ zwischen ZIP23K13 und K15, Abb. 6A). Gleichzeitig konnten für die unterschiedlichen Messergebnisse keine anderen zugrundeliegenden experimentellen Faktoren (z.B. Zellzahl pro Vertiefung oder Größe der Mikrokerne) identifiziert (Abb. 7) werden. Die Zellzahl (gemessen an den Zellkernen in einer Vertiefung) bewegte sich zwischen ca. 22000 und 16000 Zellen pro Vertiefung und untersuchter Zelllinie (Abb. 7A). Es konnten darüber hinaus keine Unterschiede zwischen den gemessenen Mikrokerngrößen der verschiedenen Zelllinien festgestellt werden. Allerdings zeigte sich, dass die Algorithmen A und B der Columbus Software unterschiedlich große Mikrokerne betrachteten und quantifizieren (Abb. 7B).

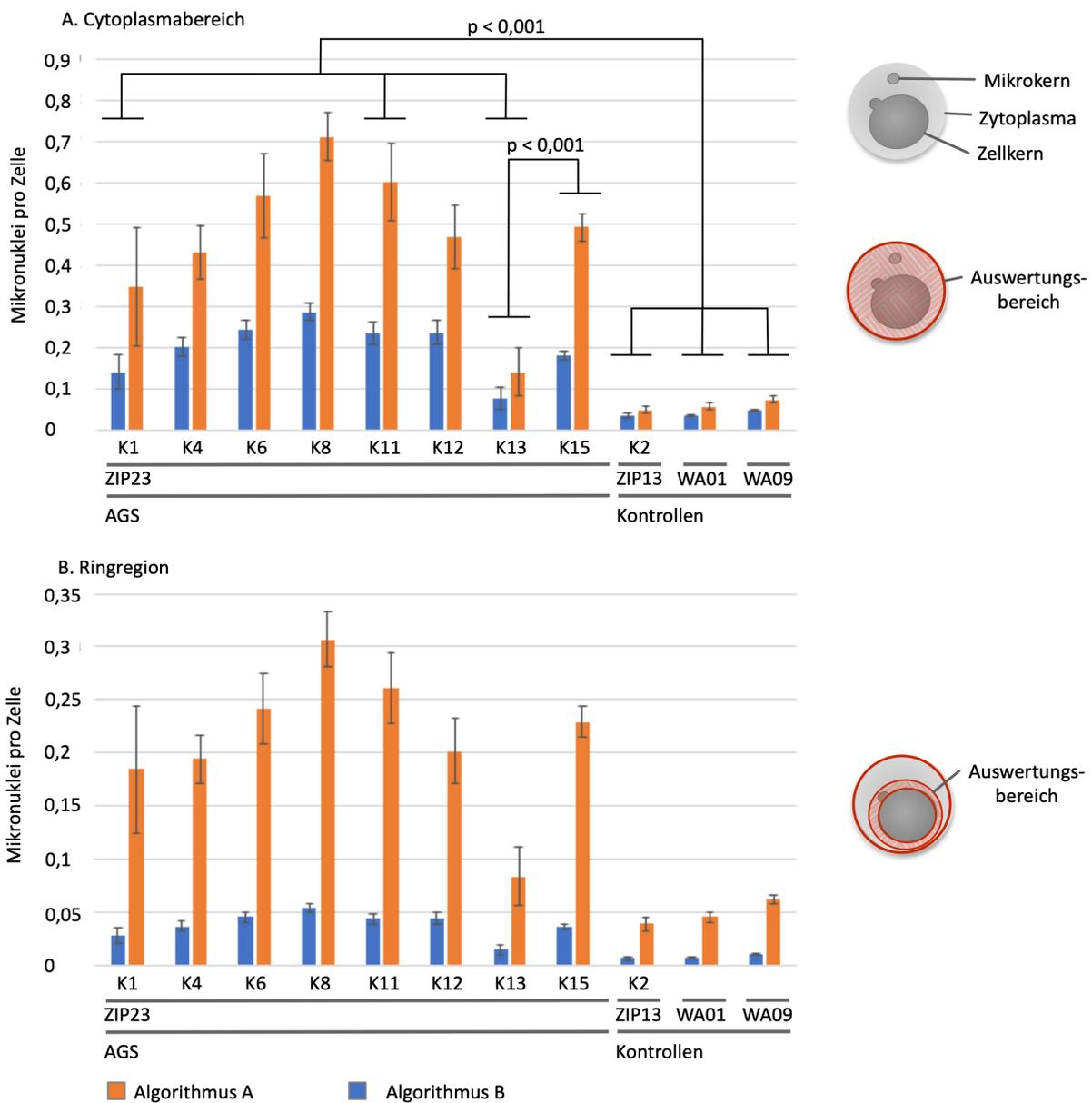


Abbildung 6: Ergebnisse der Mikrokernmessung mittels unterschiedlicher Auswertungsmethoden

Auswertung der hochdurchsatzmikroskopischen Messungen im Hinblick auf die gesamte Zellfläche bzw. die Zellkernringregion. Es wurden zwei Auswertelgorithmen zur Bestimmung der Mikrokernzahl der Columbus High Content Imaging Software (Algorithmus A und B, PerkinElmer Hamburg) nach Vorgaben des Herstellers verwandt. Auf der y-Achse sind die durchschnittlich gemessenen Mikrokern pro Zelle und der Auswertungsbereich aufgetragen. Ein Wert z.B. von 1 bedeutet, dass im Mittel ein Mikrokern pro Zelle und Auswertungsbereich vorhanden ist, ein Wert z.B. von 0,1 bedeutet, dass im Mittel 0,1 Mikrokern pro Zelle und Auswertungsbereich gemessen wurden.

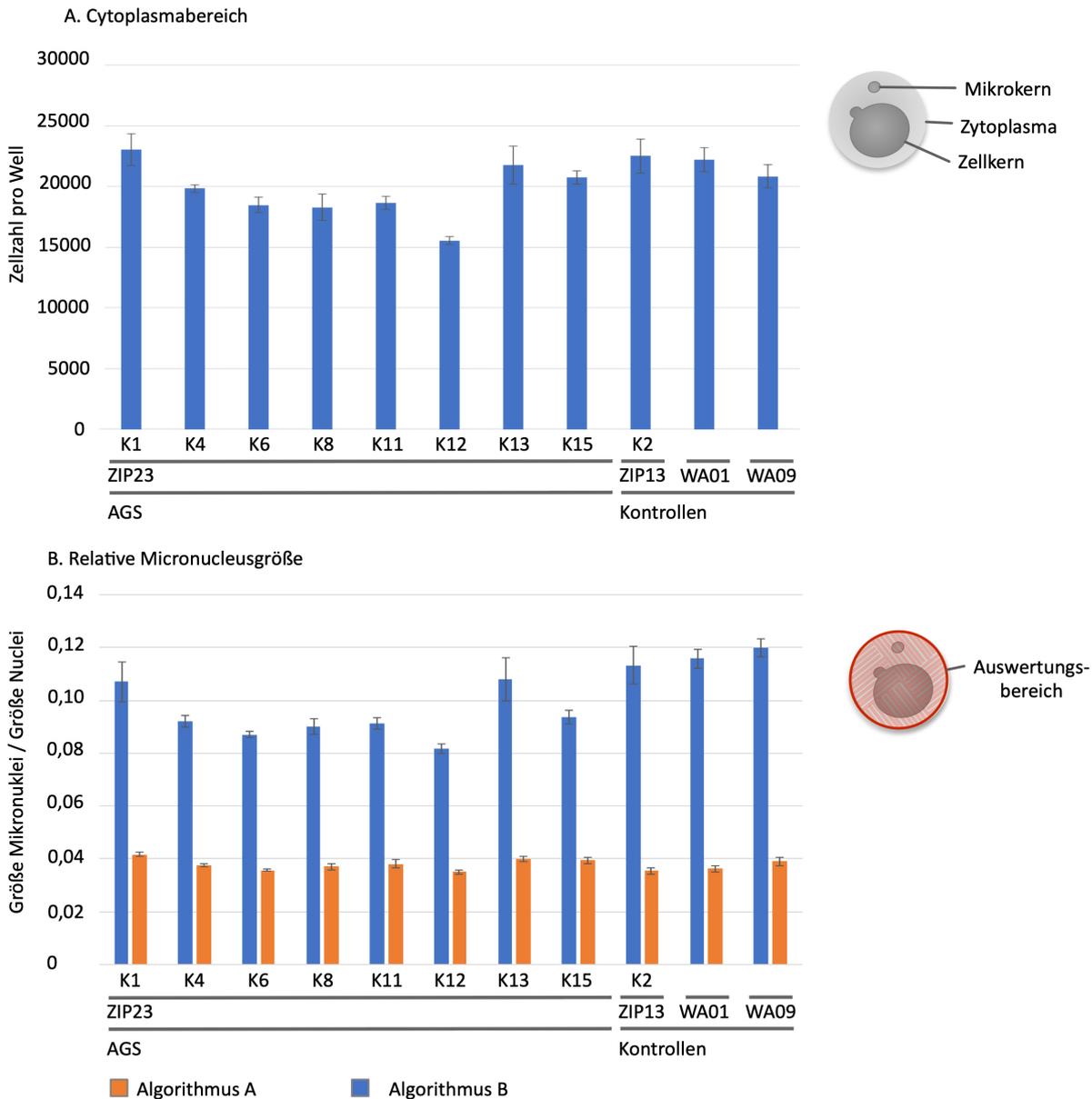


Abbildung 7: Kontrolle der Mikrokernmessungen auf mögliche andere experimentale Kovariaten

Auswertung der hochdurchsatzmikroskopischen Messungen im Hinblick auf Anzahl der Zellen pro Well und die Größe der quantifizierten Mikrokerne. A: Anzahl der Zellen pro Well, geschätzt anhand der von der Columbussoftware erkannten Zellkerne. B: Größe der quantifizierten Mikrokerne, getrennt nach Auswerte Algorithmen. Es wurden zwei Auswertealgorithmen zur Bestimmung der Mikrokernzahl der Columbus High Content Imaging Software (Algorithmus A und B, PerkinElmer Hamburg) nach Vorgaben des Herstellers verwandt. Auf der y-Achse ist die Fläche der einzelnen Mikrokerne in Relation zur Größe des Zellkerns derselben Zelle aufgetragen. Ein Wert z.B. von 0,1 bedeutet, dass im Mittel die Fläche ein Mikrokern ein Zehntel der Fläche des Zellkerns darstellte. Ein Wert z.B. von 0,02 bedeutet, dass im Mittel die Fläche ein Mikrokern ein Fünftel der Fläche des Zellkerns darstellte.

4 Diskussion

Diese Arbeit beschreibt die Etablierung eines *in vitro* Modells des genetischen determinierten Aicardi-Goutières-Syndroms.

Ein Ziel der Modellierung von Erbkrankheiten mittels induzierten pluripotenten Stammzellen bzw. daraus differenzierter Derivate ist zunächst die komplexen Mechanismen der Entstehung der Erkrankung zellulärer und molekulare Ebenen untersuchbar zu machen. Zentraler Bestandteil dieses Konzepts ist die Definition eines *in vitro* Korrelats der Erkrankung *in vivo*. Diese sogenannten *in vitro* Phänotypen können molekularbiologisch messbar sein, z.B. die Länge von Mikrosatellitenmarkern im Falle der Friedreich'schen Ataxie (Ku et al. 2010). Alternativ können biochemische Veränderungen der Zellen im Vergleich zu Kontrollzelllinien als *in vitro* Phänotyp gemessen werden, wie z.B. bei Patienten mit einer Mutation im PMP22-Gen, welche zu einem Mangel an Proteinprozessierung u.a. des Frataxin-Proteins führt (Vögtle et al. 2018). Am häufigsten werden jedoch zellbiologische Phänomene bei Krankheitsmerkmalsträgern beobachtet, wie z.B. vermehrter neuraler Zelltod in Zellkulturen von differenzierten hiPSC-Zelllinien von AGS-Patienten mit TREX1 Mutation (Thomas et al. 2017). Im nächsten Schritt werden basierend auf dem *in vitro* Phänotyp die Mechanismen, welche vermutlich an einer bestimmten Erkrankung beteiligt sind, untersucht. Hierzu werden zumeist kompensatorische oder, idealerweise, als kausal vermutete Mechanismen experimentell in der Zellkultur moduliert, wie z.B. im Falle von TREX1-defizienten Nervenzellen, welche durch den Einsatz von Reverse-Transkriptase-Inhibitoren verringerte Retrotransposonaktivität zeigen und in geringerem Maße Zelltod erleiden (Thomas et al. 2017). Alternativ können anhand eines derartigen, *in vitro* Phänotyps hypothesenfrei im Hochdurchsatzverfahren gesamtgenomische, transkriptionelle und/oder proteomische Profile erstellt und mit Wildtypzellen verglichen, systematisch die Expressionsniveaus von einzelnen Genen moduliert oder niedermolekulare Substanzen auf deren Wirksamkeit getestet werden.

Schließlich besteht die Hoffnung, über dieses reduktionistische experimentelle System den Verlauf dieser und ähnlichen genetischen bzw. monogenetischen Erkrankungen positiv zu beeinflussen und möglicherweise sogar heilen zu können.

In der vorliegenden Arbeit haben wir somatische Zellen eines Patienten mit Aicardi-Goutières Syndrom infolge einer RNase H2-Mutation und Kontrollpersonen zu pluripotenten Stammzelllinien reprogrammiert.

Die Generierung von pluripotenten Stammzellen aus somatischen Zellen durch Reprogrammierung erfordert eine sorgfältige Charakterisierung und Qualitätskontrolle der einzelnen Zelllinien (Müller et al. 2012; Brändl et al. 2016). Drei karyotypische normale

Zelllinien (ZIP23K1, ZIP23K11, ZIP23K13) zeigten ein für hiPSC typisches, immunzytochemisches Markerprofil. Die Analyse der gesamtgenomischen Expressionsprofile der Zelllinien mittels PluriTest demonstrierte, dass die untersuchten Zellen alle ein mit vollständig reprogrammierten hPSC konsistentes Genexpressionsprofil aufweisen und somit nach den aktuell akzeptierten Standards als pluripotent gelten können (International Stem Cell Initiative 2018). Schließlich wurde in einem nächsten Schritt erste Untersuchungen zur Definition eines *in vitro* Phänotyps durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass alle ZIP23 hiPSC Zelllinien in variablen Maße vermehrt Mikrokernbildung im Zytoplasma zeigen und somit bereits im undifferenzierten Zustand ein vorbeschriebenes *in vitro* Korrelat zum AGS Phänotyp vorliegt. Allerdings zeigte sich bei der Analyse in weiterführenden Untersuchungen von Interferon-stimulierten Genen nach Abschluß dieser Dissertation, dass die Zellen keine transkriptionelle Immunantwort auf die vermehrte RNase H2B Defizienz ausgelöste Mikrokernbildung zeigen (Prof. Björn Rabe, persönliche Kommunikation).

4.1 Erkrankungsmodellierung mittels hiPSC

Infolge der bahnbrechenden Arbeiten von Takahashi und Yamanaka hat sich die Nutzung von patienten-abgeleiteten hiPSC in den vergangenen Jahren zu einer häufig genutzten Technologie entwickelt, um *in vitro* an menschlichen Zellen grundlegenden Krankheitsmechanismen zu untersuchen.

Allerdings sind auch zahlreiche Limitationen der Technologie zu beachten. So stellt die *in vitro* Kultur eine höchst artifizielle Umgebung dar, welche kaum die Komplexität der natürlichen menschlichen Entwicklung *in utero*, nachgeburtliche Wachstums- oder gar Alterungsprozesse nachbilden kann. Deswegen wird die Technologie am häufigsten dazu verwendet, Erbkrankheiten mit Beginn in der frühen Kindheit zu untersuchen. So auch in dem Fall von AGS, einer schwergradigen Erbkrankheit mit häufigen Beginn direkt nach der Geburt, welche in dieser Arbeit als auch von Muotri und Kollegen (Thomas et al. 2017) mittels hiPSC untersucht wurde. Insbesondere bei Erkrankungen, die das zentrale Nervensystem betreffen sind hiPSC der einzige realistisch gangbare und ethisch vertretbare Weg, um lebende Zellen mit neuraler Identität über länger Zeit zu untersuchen. Darüber hinaus ist es in den vergangenen Jahren sogar gelungen, genetisch determinierte neurodegenerative Erkrankungen mit Krankheitsbeginn im mittleren oder fortgeschrittenen Lebensalter erfolgreich zu untersuchen (Almeida et al. 2013; Sareen et al. 2013). Allerdings stellen die Zellkulturbedingungen eine Extremsituation dar, welche durch beispielsweise deutlich höhere

Sauerstoffpartialdrücke zu deutlich vermehrtem oxidativen Stress führen und somit Zellen *in vitro* einer ganz anderen Umgebung aussetzen, als dies unter natürlichen Bedingungen *in vivo* der Fall ist.

In der vorliegenden Arbeit ist bemerkenswert, dass es bereits in einem *in vitro* Korrelat der frühen menschlichen Entwicklung zu einem beeindruckenden Anstieg der Mikrokernbildung kommt. hiPSC in den in dieser Arbeit verwendeten Kulturbedingungen entsprechen am ehesten Zellen im späten Epiblastenstadium des menschlichen Embryos (Brons et al. 2007; Tesar et al. 2007) und weisen noch keine gewebespezifische Differenzierung auf. Ein derart ausgeprägtes Auftreten des Mikrokernphänotyps in hiPSC ist demnach überraschend und weist zunächst am ehesten auf den ausgeprägten Einfluss der unphysiologischen Zellkulturbedingungen hin. Diese Ergebnisse stehen im starken Kontrast zu *in vivo* Daten aus transgenen Mauslinien. Während eine vollständige Abwesenheit funktioneller RNase H2 Komplexe zu embryonaler Letalität zum Zeitpunkt der Gastrulation führt (Reijns et al. 2012), zeigen transgene Mäuse mit derselben hypofunktionellen RNase H2 Mutation wie in den von uns untersuchten Patientenzellen keinerlei offensichtlichen Phänotyp (Mackenzie et al. 2016). Spezifisch zeigten diese Tiere keinerlei Einschränkung der Lebensdauer trotz einer nachweisbaren, starken Einschränkung der RNase H2 Aktivität. Darüber hinaus fanden sich keine Hinweise auf Entzündungen, Infektionen oder onkologische Prozesse im Alter von einem Jahr in Gehirn, Haut, Herz, Leber, Lunge, Gastrointestinaltrakt oder Nieren (Mackenzie et al. 2016). Allerdings konnte eine Aufregulierung der interferonstimulierten Gene in Herz und Nieren der Mäuse (Mackenzie et al. 2016) sowie in einer weiteren Arbeit vermehrt Mikrokerne in Erythrozytenvorläuferzellen aus derselben Mauslinie nachgewiesen werden (Mackenzie et al. 2017).

4.2 Heterogenität der AGS-hiPSC Linien

Kritisch bewertet werden muss auch die offensichtliche Heterogenität der AGS-iPSC Linien in Bezug auf der Mikrokernbildung. Es ist seit langem bekannt, dass hiPSC in ihrer Differenzierungskapazität, d.h. die Fähigkeit sich in bestimmte differenzierte Zelltypen sich zu entwickeln, stark unterscheiden können (Chan et al. 2009; Bock et al. 2011; Boulting et al. 2011). Darüber hinaus konnten Mekhoubad, Eggan und Kollegen im Falle des X-Chromosom assoziierten Lesch-Nyhan Syndroms zeigen, dass epigenetische Variabilität, in diesem Falle die Erosion der X-Inaktivierung durch *in vitro* Kulturbedingungen signifikant die Modellierung der Erbkrankheit mit weiblichen hiPSC beeinträchtigt (Mekhoubad et al. 2012).

Spezifisch handelt es sich bei dem Lesch-Nyhan Syndrom um eine Erkrankung, welche durch Mutationen im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Gen auf dem X-Chromosom ausgelöst wird und bei den Patienten zu schwerstgradigen Verhaltensauffälligkeiten und neurologischen Symptome führt. Da das Gen sich auf dem X-Chromosom befinden, sind vor allem männliche Individuen von der Erkrankung betroffen, weil eine Mutation des Gens zur Inaktivierung des einzig vorhandenen Allels führt. Frauen sind in aller Regel nicht betroffen, weil die verbleibende Kopie des Gens infolge der zufällig erfolgenden X-Inaktivierung beider vorhandener X-Chromosomen noch genügend Produktion des HPRT-Enzyms ermöglicht. Auch in diesem Falle konnte bisher kein Mausmodell der Erkrankung erzeugt werden, welches infolge des Verlusts der HPRT-Funktion dieselben neurologischen Auffälligkeiten wie menschliche Mutationsträger zeigt (Finger et al. 1988; Engle et al. 1996). In Bezug auf die Krankheitsmodellierung mit hiPSC konnten die Gruppe um Kevin Eggan zeigen, dass im Falle, dass Fibroblasten weiblicher HPRT-Mutationsträgerinnen als Grundlage zur Erzeugung von hiPSC dienten, die X-Inaktivierung in den jeweiligen Fibroblastenzellen zu klonalen hiPSC-Linien führte, in den entweder das gesunde oder das mutierte Allel inaktiviert war. Die Linien, in denen das gesunde HPRT-Allel inaktiviert war, zeigte denselben Phänotyp *in vitro* wie solche hiPSC Linien von männlichen Lesch-Nyhan Syndrom Patienten. Allerdings veränderte sich der *in vitro* Phänotyp in den weiblichen hiPSC Linien mit Zeichen der Lesch-Nyhan Erkrankung über mehrere Zellkulturpassagen infolge einer zunehmenden Erosion der X-chromosomalen Inaktivierung. Dadurch kam es zu einer zunehmenden Aktivierung des HPRT-Gens und dadurch zu einer Normalsierung der *in vitro* beobachteten Merkmale der Erkrankung, spezifisch ein zelluläre Wachstumsverzögerung bei neuraler Differenzierung (Mekhoubad et al. 2012).

Auch wenn das RNase H2B Gen sich nicht auf dem X-Chromosom befindet und somit nicht der Inaktivierung des X-Chromosoms unterliegt, können mehrere Parallelen zu den hier dargestellten experimentellen Befunden gezogen werden. In beiden Fällen konnten zu eindrücklichen, schwerstgradigen neuropsychiatrischen Erkrankungen im Menschen keine überzeugenden Mausmodelle durch transgene bzw. knock-out Veränderungen der betroffenen Gene erstellt werden. In beiden Fällen zeigten hiPSC Linien von Patienten eindrückliche *in vitro* Merkmale der jeweiligen Erkrankungen bereits in den undifferenzierten hiPSC auf. Allerdings trat eine z.T. unerwartete große Variabilität der Merkmalsausprägung auf. Im Falle des HPRT-Gens konnte die zunehmende Erosion der X-chromosomalen

Inaktivierung als epigenetische Ursache identifiziert werden, während bei den hier vorliegenden Ergebnissen zur Erkrankungsmodellierung des Aicardi-Goutières Syndrom noch unklar sind. Bemerkenswert sind z.T. signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen klonalen Linien in Bezug auf deren Mikrokernbildung. Es kann nur vermutet werden, ob auch hier epigenetische Faktoren, beispielsweise unterschiedliche DNA-Methylierung von Sequenzen, welche auf das RNase H2B Gen regulatorischen Einfluss ausüben, den beobachteten Differenzen zugrunde liegen. Auch in AGS-Patienten mit RNase H2 Mutationen sind Erkrankungsbeginn und Erkrankungsschwere variabel und könnten durch weitere genetische wie auch epigenetische Faktoren beeinflusst werden (Rice et al. 2007). Hervorzuheben ist jedoch die Tatsache, dass es sich in dem Falle der im Rahmen dieser Arbeit erstellten hiPSC Kulturen um sogenannten isogene Zelllinien, d.h. die verschiedenen Klone unterscheiden sich nur in der Merkmalsausprägung bei weitestgehend identischer Genomsequenz (Brändl et al. 2015).

Alle bisher im Menschen beschriebenen Mutationen des RNase H2 Gens stellen hypofunktionelle Varianten dar, bei denen eine Restaktivität des Enzyms erhalten bleibt. Dies ist konsistent mit dem tierexperimentellen Befund, dass der vollständige Verlust der Aktivität des Enzyms zum Absterben im Embryonalstadium führt. Nicht publizierte Untersuchungen aus dem Labor von Professor Andrew Jackson (University of Edinburgh, Großbritannien) an drei der erzeugten AGS-hiPSC Linien zeigten zwischen den Zellklonen unterschiedliche Aktivitätsniveaus der enzymatischen Aktivität des RNase H2 Enzyms, welche gegenüber Zellen ohne Mutationen im RNase H2 Gen relativ reduziert war. Somit liegen auch hier nicht vernachlässigbare Hinweise auf eine relevante Variabilität von AGS-hiPSC Linien in deren erkrankungsassoziierte Merkmalsausprägung.

4.3 Ausblick und weitere Untersuchungen an AGS-hiPSC

Obwohl die ersten in dieser Arbeit erhobenen Untersuchung an neu etablierten hiPSC Linien von einem AGS-Patienten vielversprechende, ja sogar überraschende Ergebnisse erbrachten, bleiben noch zahlreiche Fragen offen, die weiterer experimenteller Klärung bedürfen, um aus einer rein phänomenologischen Beschreibung eines möglichen Phänotyps in RNase H2-defizienten Zellen mechanistische Erkenntnisse abzuleiten.

Zum einen stellen undifferenzierte PSC kein adäquates Modell des zentralen Nervensystems dar, in welchem sich bei AGS-Patienten die Erkrankung am stärksten manifestiert. Hierzu sind weitere Untersuchungen an neuronal differenzierten Stammzellen erforderlich. Insbesondere

der Befund, dass die hier erstellten undifferenzierten hiPSC keine Interferon stimulierte Gen - Signatur aufweisen, zeigt, dass es vermutlich bereits in der menschlichen Embryonalentwicklung zwar zur Mikrokernakkumulation kommt, allerdings die für das AGS pathobiologisch fundamentale Aktivierung der angeborenen Immunität durch das cGAS/Sting-System (siehe 1.1.3) noch nicht stattfindet. Hierzu müssen in weiteren Arbeiten die hiPSC Zellen in neurale Vorläuferzellen sowie Astrozyten und Neurone differenziert werden. In diesen Zellen sollte dann sowohl die Mikrokernzahl als auch die Aktivierung der Interferon-I-Antwort quantifiziert werden.

Die hier reprogrammierten Zellen stammen von einer Trägerin der häufigsten zum AGS führenden Mutationen (A177T) in dem am häufigsten bei AGS betroffenen Gen (RNase H2B) (Rice et al. 2007; Crow et al. 2015). Allerdings zeigen Patienten mit Mutationen im RNase H2B Gen im Allgemeinen durch einen relativ weniger schweren Krankheitsverlauf als z.B. jene Patienten mit Mutationen in den weiteren Untereinheiten des RNase H2 Komplex (H2A, H2C) aus. Um die Befunde mit den in dieser Arbeit erstellten hiPSC Linien weiter zu untermauern, sollten auch somatische Zellen von AGS Patienten mit Mutationen in den weiteren RNase H2 Untereinheiten reprogrammiert werden und denselben Untersuchungen unterzogen werden. Schließlich bleibt noch zu hoffen, dass ein derart entwickeltes *in vitro* Krankheitsmodell zum Patientennutzen eingesetzt werden kann. Hierzu wäre es z.B. erforderlich, Medikamente oder medikamentenähnliche Substanzen (engl.: „*compounds*“) im Horchdurchsatzverfahren darauf zu testen, ob beispielsweise der hier beobachtete Mikrokernphänotyp durch bestimmte niedermolekulare Substanzen unterdrückt werden kann oder die Aktivierung des cGAS/Sting-Systems durch die Mikrokerne (siehe 1.1.3) verhindert werden kann. Wie in 1.1.3 weiter ausgeführt und von Mackenzie und Kollegen gezeigt (Mackenzie et al. 2017), spielt das Autophagolysosom vermutlich eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des RNase H2 assoziierten AGS. Hier könnten mit fluoreszierenden Transgenen ausgestattete, hiPSC-basierte Modelle informativere experimentelle Messpunkte liefern. Beispielsweise können mit dem LC3-Protein verknüpfte grün und rot fluoreszierende Reporterkonstrukte die Reifung von Autophagosomen sichtbar machen und mit den bereits beobachteten Mikrokernen beobachtbar machen (Kimura et al. 2007; Bartsch et al. 2017). Obwohl diese Untersuchungen aktuell noch in weiter Ferne liegen, konnte in dieser Arbeit ein Grundstein zur weiteren Entwicklung eines *in vitro* Erkrankungsmodells des Aicardi-Goutières Syndroms gelegt werden.

5 Zusammenfassung

Das Aicardi-Goutières Syndrom stellt eine schwerstgradige, zum Tode führende Entzündungserkrankung dar, welche mit Veränderungen in fünf Enzymkomplexen in Verbindung gebracht wurde, die essentielle Funktionen im Nukleinsäurestoffwechsel übernehmen. Zumeist erkranken Kinder in ihrer frühesten Jugend, gelegentlich sogar schon im Mutterleib an einer Panenzephalitis, die einer viralen Infektion des zentralen Nervensystems im Mutterleib ähnelt. Obwohl es zahlreiche Versuche gab, die Erkrankung im Mausmodell durch transgene Techniken nachzubilden, zeigt keines der Tiermodelle den für die menschliche Erkrankung charakteristischen Phänotyp einer Panenzephalitis.

In den vergangenen Jahren wurde die Erkrankungsmodellierung durch stammzellbasierte *in vitro* Systeme zunehmend zur Methode der Wahl, um komplexe menschliche Erkrankung zu erforschen. Hierzu werden von Patienten gewonnene, somatische Zellen durch biotechnologische Methoden zu induzierten pluripotenten Stammzellen reprogrammiert.

Diese Zellen können in einem weiteren Schritt in neurale Zelltypen in der Petrischale differenziert werden und ermöglichen somit beispielsweise die Erforschung neuropsychiatrische Erkrankungen an lebenden menschlichen neuronalen Zellen.

In der hier vorgelegten Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob induzierte pluripotente Stammzellen, die dafür von einem Patienten mit einer mit dem Aicardi-Goutières assoziierten Mutation im RNase H2 Gen erzeugt wurden, *in vitro* Korrelate mit der Erkrankung zeigen.

Hierzu beschreibe ich die Reprogrammierung von Fibroblasten eines AGS-Patienten, bei welchem Mutationen im RNase H2B Gen gefunden wurden. Diese humanen pluripotenten Stammzellen wurden im weiteren phänotypisch und in Bezug auf deren Genexpression charakterisiert. Überraschenderweise zeigten bereits die pluripotenten Stammzellen einen in der Hochdurchsatzmikroskopie quantifizierbaren Phänotyp, welcher vor kurzem als pathogonomisch für die RNase H2 Defizienz beschrieben wurde. Alle der erstellten Zelllinien zeigten eine deutlich erhöhte Rate an sogenannten Mikrokerne, d. h. Einschlüsse von DNA im Zytoplasma. Pluripotente Zellen im undifferenzierten Stadium zeigten jedoch keine messbare Entzündungsreaktion.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass humane induzierte pluripotente Stammzellen ein mögliches relevantes Modell zur weiteren Erforschung des Aicardi-Goutières Syndrom darstellen.

6 Literaturverzeichnis

- Aicardi J, Goutieres F. A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann Neurol.* 1984 Jan;15(1):49–54.
- Almeida S, Gascon E, Tran H, Chou HJ, Gendron TF, Degroot S, et al. Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol.*; 2013 Sep;126(3):385–99.
- Balk B, Maicher A, Dees M, Klermund J, Luke-Glaser S, Bender K, et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Oct;20(10):1199–205.
- Bartsch K, Damme M, Regen T, Becker L, Garrett L, Hölter SM, et al. RNase H2 Loss in Murine Astrocytes Results in Cellular Defects Reminiscent of Nucleic Acid-Mediated Autoinflammation. *Front Immunol.* 2018 Mar 29;9:713.
- Bartsch K, Knittler K, Borowski C, Rudnik S, Damme M, Aden K, et al. Absence of RNase H2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy. *Hum Mol Genet.* 2017 Oct 15;26(20):3960–72.
- Behrendt R, Schumann T, Gerbaulet A, Nguyen LA, Schubert N, Alexopoulou D, et al. Mouse SAMHD1 has antiretroviral activity and suppresses a spontaneous cell-intrinsic antiviral response. *Cell Reports.* 2013 Aug 29;4(4):689–96.
- Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, et al. Reference Maps of human ES and iPSC cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell.* 2011 Feb 4;144(3):439–52.
- Boulting GL, Kiskinis E, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Wainger BJ, et al. A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. 2011 Mar;29(3):279–86.
- Brändl B, Schneider SA, Loring JF, Hardy J, Gribbon P, Müller F-J. Stem cell reprogramming: basic implications and future perspective for movement disorders. *Mov Disord.* 2015 Mar;30(3):301–12.
- Brändl B, Schuldt BM, Böhnke L, Keminer O, Vaas LAI, Fischer R, et al. Utilizing Regulatory Networks for Pluripotency Assessment in Stem Cells. *Curr Stem Cell Rep.* Springer International Publishing; 2016 Jul 5;:1–8.
- Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011 Apr 13.
- Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature.* 2007 Jul 12;448(7150):191–5.

- Cerritelli SM, Crouch RJ. Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J.*; 2009 Mar;276(6):1494–505.
- Chan E, Ratanasirintrao S, Park I, Manos P, Loh Y, Huo H, et al. Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotech.* 2009 Oct 11.
- Crow YJ, Chase DS, Lowenstein Schmidt J, Szykiewicz M, Forte GMA, Gornall HL, et al. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am J Med Genet A.* 2015 Feb 1;167(2):296–312.
- Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, Robins P, Leitch A, Ali M, et al. Mutations in the gene encoding the 3′-5′ DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat Genet.* 2006a Aug;38(8):917–20.
- Crow YJ, Leitch A, Hayward BE, Garner A, Parmar R, Griffith E, et al. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat Genet.* 2006b Aug;38(8):910–6.
- Crow YJ, Manel N. Aicardi- Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jul 1;15(7):429–40.
- De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, Fujiwara Y, Benvenisty N, Deng H, et al. Hallmarks of pluripotency. *Nature.* 2015 Sep 24;525(7570):469–78.
- Engle SJ, Womer DE, Davies PM, Boivin G, Sahota A, Simmonds HA, et al. HPRT-APRT-deficient mice are not a model for lesch-nyhan syndrome. *Hum Mol Genet.* 1996 Oct;5(10):1607–10.
- Finger S, Heavens RP, Sirinathsinghji DJ, Kuehn MR, Dunnett SB. Behavioral and neurochemical evaluation of a transgenic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *Journal of the Neurological Sciences.* 1988 Sep;86(2-3):203–13.
- Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, et al. Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5. *Immunity.* 2014 Feb 20;40(2):199–212.
- Gall A, Treuting P, Elkon KB, Loo Y-M, Gale M, Barber GN, et al. Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses via lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease. *Immunity.* 2012 Jan 27;36(1):120–31.
- Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nature reviews Drug discovery.* 2011 Dec;10(12):915–29.
- Günther C, Kind B, Reijns MAM, Berndt N, Martinez-Bueno M, Wolf C, et al. Defective removal of ribonucleotides from DNA promotes systemic autoimmunity. *J Clin Invest.* 2015 Jan;125(1):413–24.

- Hartner JC, Walkley CR, Lu J, Orkin SH. ADAR1 is essential for the maintenance of hematopoiesis and suppression of interferon signaling. *Nat Immunol.* 2009 Jan;10(1):109–15.
- Hiller B, Achleitner M, Glage S, Naumann R, Behrendt R, Roers A. Mammalian RNase H2 removes ribonucleotides from DNA to maintain genome integrity. *J Exp Med.* 2012 Jul 30;209(8):1419–26.
- Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature.* 2009 Aug 27;460(7259):1132–5.
- International Stem Cell Initiative. Assessment of established techniques to determine developmental and malignant potential of human pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2018 May 15;9(1):1925.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy.* 2007 Sep;3(5):452–60.
- Kretschmer S, Wolf C, König N, Staroske W, Guck J, Häusler M, et al. SAMHD1 prevents autoimmunity by maintaining genome stability. *Ann Rheum Dis.* 2015 Mar;74(3):e17–7.
- Ku S, Soragni E, Campau E, Thomas EA, Altun G, Laurent LC, et al. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA-TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell.* 2010 Nov 5;7(5):631–7.
- Kurtz A, Seltmann S, Bairoch A, Bittner M-S, Bruce K, Capes-Davis A, et al. A Standard Nomenclature for Referencing and Authentication of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2018 Jan 9;10(1):1–6.
- Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee Y-A, et al. Mutations in the gene encoding the 3'–5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2007 Sep;39(9):1065–7.
- Lee-Kirsch MA, Wolf C, Günther C. Aicardi-Goutières syndrome: a model disease for systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol.* 2014 Jan;175(1):17–24.
- Lensch MW, Mummery CL. From Stealing Fire to Cellular Reprogramming: A Scientific History Leading to the 2012 Nobel Prize. *Stem Cell Reports.* 2013 Jun 4;1(1):5–17.
- Mackenzie KJ, Carroll P, Lettice L, Tarnauskaitė Ž, Reddy K, Dix F, et al. Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS/STING-dependent innate immune response. *EMBO J.* 2016 Apr 15;35(8):831–44.
- Mackenzie KJ, Carroll P, Martin C-A, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ, et al. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature.* 2017 Aug 24;548(7668):461–5.

- Mekhoubad S, Bock C, de Boer AS, Kiskinis E, Meissner A, Eggan K. Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. *Cell Stem Cell*. 2012 May 4;10(5):595–609.
- Morita M, Stamp G, Robins P, Dulic A, Rosewell I, Hrivnak G, et al. Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3'→5' DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis. *RNA*. 2004 Aug;24(15):6719–27.
- Müller F-J, Brändl B, Loring JF. Assessment of human pluripotent stem cells with PluriTest. *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2012.
- Müller F-J, Schuldt BM, Williams R, Mason D, Altun G, Papapetrou EP, et al. A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods*. 2011 Mar 6;8:315–7.
- Namjou B, Kothari PH, Kelly JA, Glenn SB, Ojwang JO, Adler A, et al. Evaluation of the TREX1 gene in a large multi-ancestral lupus cohort. *Genes Immun*. 2011 Jun;12(4):270–9.
- Nguyen HN, Byers B, Cord B, Shcheglovitov A, Byrne J, Gujar P, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*. 2011 Mar 4;8(3):267–80.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007 Jul 19;448(7151):313–7.
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPSCs. *Nat Methods*. 2011 May;8(5):409–12.
- Rabe B. Aicardi-Goutières syndrome: clues from the RNase H2 knock-out mouse. *J Mol Med*. 2013 Nov;91(11):1235–40.
- Rehwinkel J, Maelfait J, Bridgeman A, Rigby R, Hayward B, Liberatore RA, et al. SAMHD1-dependent retroviral control and escape in mice. *EMBO J*. 2013 Sep 11;32(18):2454–62.
- Reijns MAM, Rabe B, Rigby RE, Mill P, Astell KR, Lettice LA, et al. Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell*. 2012 May 25;149(5):1008–22.
- Rice G, Patrick T, Parmar R, Taylor CF, Aeby A, Aicardi J, et al. Clinical and molecular phenotype of Aicardi-Goutières syndrome. *Am J Hum Genet*. 2007 Oct;81(4):713–25.
- Sareen D, O'Rourke JG, Meera P, Muhammad AKMG, Grant S, Simpkinson M, et al. Targeting RNA Foci in iPSC-Derived Motor Neurons from ALS Patients with a C9ORF72 Repeat Expansion. *Sci Transl Med*. 2013 Oct 23;5(208):208ra149.
- Schöler HR. Das Potenzial von Stammzellen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. Springer; 2004 Jun;47(6):565–77.

- Soares FAC, Sheldon M, Rao M, Mummery C, Vallier L. International Coordination of Large-Scale Human Induced Pluripotent Stem Cell Initiatives: Wellcome Trust and ISSCR Workshops White Paper. *Stem Cell Reports*. 2014 Dec;3(6):931–9.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861–72.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663–76.
- Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 2007 Jul 12;448(7150):196–9.
- Thomas CA, Tejwani L, Trujillo CA, Negraes PD, Herai RH, Mesci P, et al. Modeling of TREX1-Dependent Autoimmune Disease using Human Stem Cells Highlights L1 Accumulation as a Source of Neuroinflammation. *Cell Stem Cell*. 2017 Sep 7;21(3):319–331.e8.
- Thomson JA. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145–7.
- van Heteren JT, Rozenberg F, Aronica E, Troost D, Lebon P, Kuijpers TW. Astrocytes produce interferon-alpha and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Aicardi-Goutières syndrome. *Glia*. 2008 Apr;56(5):568–78.
- Vögtle F-N, Brändl B, Larson A, Pendziwiat M, Friederich MW, White SM, et al. Mutations in PMPCB Encoding the Catalytic Subunit of the Mitochondrial Presequence Protease Cause Neurodegeneration in Early Childhood. *The American Journal of Human Genetics*. 2018 Mar;0(0).
- Yang Y-G, Lindahl T, Barnes DE. Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):873–86.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917–20.

7 Danksagung

Ich möchte meinen herzlichen Dank folgenden Personen erweisen, ohne deren Arbeit und Mithilfe meine Promotion niemals möglich gewesen wäre hätte:

Mein Dank gilt zunächst Herrn PD Dr. med. Franz-Josef Müller, meinem Doktorvater, für die freundliche Betreuung, und unentbehrliche Hilfe bei der Begleitung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Björn Brändl, der mir immer entgegenkommend, die Besonderheiten der Zellkultivierung und der Stammzellcharakterisierung erklärte; sowie für seine große Hilfsbereitschaft, menschliche Unterstützung und Motivation.

Außerdem möchte ich Frau Imke Petersen danken für ihren unermüdlichen Eifer, Unterstützung und Anleitung in der Laborarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Björn Rabe für hilfreiche Diskussion und Literaturhinweise zur Pathogenese des AGS. Ich danke Bernhard Schult für Seine Unterstützung bei der PluriTest Auswertung.

Des Weiteren bin ich Herrn Dr. rer. nat. Bernhard Ellinger zu Dank verpflichtet, der mir den Zugang zum Mikrokerne counting eröffnet hat und mich bei der Auswertung mit der PerkinElmer Columbus Software unterstützt hat.

Daneben möchte ich Professor Dr. Yannik Crow (University of Endinburgh) für die freundliche zur Verfügungsstellung der Fibroblastenlinien danken, ohne denen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ferner bedanke ich mich bei Shinya Yamanaka für die bereitgestellten pCXLE-Plasmide über Addgene.

8 Anhang

Ergänzende Tabelle 1: Verwandte Medien und Reagenzien

Reagenzien/Lösungen	Name/Hersteller	Cat.Nr.
PBS (Phosphat Buffered Sline) pH 7,2 (1x) CaCl ₂ , MgCl ₂	Gibco® bei Life technologies	20012-019
Poly-L-Lysin 0,01% mol wt 70,000-150,000	Sigma	P4707
Primäre Antikörper	s. sep. Tabelle	
Sekundäre Antikörper:		
A-Ms	Alexa Fluor® 594 (Ziege), Invitrogen, molecular probes®	A21135
A-Rt	Alexa Fluor® 488 (Ziege), Invitrogen, molecular probes®	A11006
A-Rb	Alexa Fluor® 594 (Esel), Invitrogen, molecular probes®	A21207
BSA (Bovine Serum Albumin) 25%	Live technologies	10008-01
PFA (Paraformaldehyd, Pulver) 95%	Sigma Aldrich	158127
t-octylphenoxypolyethoxyethanol	Triton X, Sigma Aldrich (Darmstadt)	T9284
Mounting Medium	Fluoroshild mit Dapi Sigma Aldrich	110M1906
L-Glutamine 200 mM	Gibco	25030-024
Accutase	Chemicon International	SCR005
Thiazovivin	StemRD (Burlingame USA)	1226056-71-8
Trypsin	Sigma	T4549
4'6 diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochlorid	Dapi/Invitrogen, Molecular probes	D1306
Gelatine	Sigma-Aldrich	G-1890
Ethanol		
Nagellack	Rival de Loop	

Ergänzende Tabelle 2: Verwandte Medien und Reagenzien

Medien/Agennzien	Zusammensetzung	Hersteller/Cat.Nr.
WICELL hESC Medium	DMEM/F12(1:1)+L-Glut+HEPES 80% Knockout Serum 20% Glutamax ~1ml MEM Non-Essential AA.0,1mM β-ME 0,1mM bFGF 4ng/ml	Gibco®by Life technologies 11330 Invitrogen 108280-028 Invitrogen 35050 Invitrogen 11140-050 Invitrogen 21985-023 Sigma F0291
Stem pro Medium	DMEM/F12w/Glutamax 90,8% Stem pro hESC Supplement 1x 25%BSA 1,80% β-ME 0,1 mM bFGF 12 ng/ml	Gibco®by Life technologies 10565 A10006-01 A10006-01 Invitrogen 21985-023 Sigma F0291
Fibroblast Medium	MEM(1x) FBS 10% Pen/Strep 1%	Gibco®by Life technologies 11095-080 Gibco®by Life technologies 10270 Gibco®by Life technologies 15070
MEF Medium	D-MEM Hi Glucose(1x)+ Glutama-l 90% FBS10% MEM-Non-Essential Aminosäuren 0,1mM	Gibco 10566 Gibco®by Life technologies 10270 Invitrogen 11140-050
Fibr-Gefrier-Medium	50% MEM(1x) 40%BSA DMSO10%	Gibco®by Life technologies 11095-080 Gibco®by Life technologies A10008-01 Merck Millipore 1096780100
iPSC/ESC-Gefrier Medium	90% Knockout Serum 10% DMSO Thiazovivin 0,5 μM	Gibco®by Life technologies 10828-028 Merck Millipore 1096780100 StemRD Thia-01;-05;-25
Matrigel	99% DMEM (1x) 1%Matrigel	Gibco®by Life technologies 11960-044/-085 BD Biosciens (354234)

Ergänzende Tabelle 3: Reaktionsgefäße und Materialien

Gefäße/Hilfsmittel	Name/Produktbeschreibung/Fa	Cat. -Nr.
Wellplatte	12 Zellkulturplatte, Cellstar SigmaAldrich,Darmstadt	665180
Wellplatte	24 Zellkulturplatte, Cellstar SigmaAldrich,Darmstadt	662 160
Deckgläschen	Mikroskop Deckglas 12 mm Ø Fa. VWR	6331-1577
Deckgläschen BioCoat	Mikroskop Deckglas 12 mm Ø Fa.BD	354085
Objektträger	Menzel-Gläser SuperFrost, ca 76x26 mm iso 8037/1	631-0650
Pipetten	1000 µl Brand/Abimed 100 µl Brand/ Abimed 10 µl Brand/Abimed	
Akku-Pipette	Pipetus® Hirschmann Laborgeräte	9907200
Pipettenspitzen	FilterTip 1000µl Sarstedt AG&Co 200 µl Sarstedt AG&Co 10 µl Sarstedt AG&Co	70762411 70760002 701115
Serologische Pipetten	25 ml Sarstedt AG&Co	861685001
Mikroreaktionsgefäße	SafeSeal 1,5 ml Sarstedt AG&Co	3002/136201
Reaktionsgefäße	Röhre 15 ml Sarstedt AG&Co	62554512
Reaktionsgefäße	Röhre 50 ml Sarstedt AG&Co	62547254
Falcon	BD-Falkon 50 ml Becton, Dickinson&Co	2254925
Cryo-Einfriergerät	Nalgene Mr.Frosty Sigma HxØ 86 mm x 117 mm	C1562

Ergänzende Tabelle 4: Verwandte Geräte und Instrumente

Technische Geräte	Name	Hersteller/Fa
Sicherheitswerkbank	Hera safe	Kendro Laboratory Products GmbH
CO2 Incubator	HeraCell150	Thermo electron Corporation/Kendro LP
Vortex	Vortex Genie 2	Sender&Hobein AG Zurich, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG Werk Göttingen
Stereomikroskop+ Lampe	Stemi 2000 CL6000LED	Carl Zeiss AG Werk Göttingen Carl Zeiss AG Werk Göttingen
Durchlichtmikroskop	EVOS	Advanced Microscopy Group Products
Kühlschrankx2	Comfort	Liebherr Werk Lienz GmbH
Kühlschrank	Kühlmaschine Kirsch	BOSCH
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus
Tiefkühltruhe	INNOVA c585 VIP	New Brunswick Scientific GmbH
Gefrierschrank	Öko Super	Liebherr Werk Lienz GmbH
Wasserbad	WB 1002	P-D Industriegesellschaft mbH Dresden
Zellzähler	Countess	Invitrogen
Reine Werkbank mit horizontaler Luftführung	HERAguard	Thermo Electron LED GmbH
Großer Stickstoffbehälter	Probenlageungsbehälter 38 L	VWR International