



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Funktionelle Charakterisierung von aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteten Neuronen

Autor: Jan Rosner
Institut / Klinik: Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim (ZI)
Doktorvater: Prof. Dr. P. Schloss

Die Generierung von Neuronen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) stellte einen Meilenstein der modernen Neurowissenschaften dar. Ein wichtiger Schritt in der Validierung eines möglichen zellulären Krankheitsmodells ist die Charakterisierung des funktionellen Phänotyps der in den in-vitro Kulturen vorhandenen Neurone. Für den Einsatz von Retinsäure wurde ein positiver Effekt auf die neuronale Differenzierung beschrieben.

Gegenstand dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von hiPSC-abgeleiteten glutamatergen Neuronen sowie der Vergleich zweier Differenzierungsprotokolle hinsichtlich des Effekts auf die terminal differenzierten Neurone. Mittels standardisiertem Differenzierungsprotokoll konnte aus einer hiPSC-Linie via EB (*embryoid body*) Formation und Rosettenbildung durch «dual smad»- Inhibition eine neuronale Vorläuferzelllinie (NPC) generiert werden. Eine Zelllinie wurde während der EB-Formation (dem in vitro Korrelat der Gastrulation) mit Retinsäure präkonditioniert (NPC^{+RA}), die andere Linie wurde nicht behandelt

(NPC^{-RA}). Die NPC-Linien konnten für die weiteren funktionellen Experimente als Ausgangspunkt der terminalen Differenzierung verwendet werden.

Methodisch führend für die funktionelle Charakterisierung der neuronalen Zellen war der Einsatz der Fura-2 Kalzium-Imaging Methode. Durch dieses Verfahren konnten die NPC^{+RA} und NPC^{-RA}-Linie anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven für Glutamat charakterisiert werden. Die Untersuchung der Glutamatrezeptor-Subtypen erfolgte nur für die NPC^{+RA}-Linie durch Applikation der spezifischen Agonisten NMDA und AMPA. Die mit Retinsäure präkonditionierten sowie die unbehandelte Zelllinie unterschieden sich nicht hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften, gemessen anhand der EC50-Werte für Glutamat ($\log_{10} \text{EC}_{50} = -4.78 \pm 0.26$ und -4.72 ± 0.17).

Die pharmakokinetischen Eigenschaften sind vergleichbar mit *bona fide* kortikalen Neuronen, insbesondere mit der Expression der GluA4-Untereinheit des AMPA- Rezeptors. Die terminal differenzierten Netzwerke zeigten keine Spontanaktivität.

Die Anzahl der Glutamat-sensitiven Zellen variierte deutlich zwischen den einzelnen Differenzierungsansätzen, was auf eine relevante Heterogenität hinweist. Innerhalb der Netzwerke zeigten an Tag 50 der terminalen Differenzierung ca. 40% der Zellen eine Glutamat-Sensitivität. Weiterhin fanden sich funktionelle NMDA und AMPA Rezeptoren. Die NMDA- und AMPA-evozierten Kalziumströme konnten reversibel durch die kompetitiven Antagonisten AP-5 und CNQX gehemmt werden. Die NMDA-evozierten Ströme wurden in Anwesenheit von Glyzin und in Magnesium-freier Lösung signifikant grösser. Unter Superfusion mit TTX-, AP-5- und CdCl₂-substituierter Tyrode Lösung, ließ sich nach AMPA-Applikation in ca. 40% der Glutamat-sensitiven Zellen eine Kalziumantwort nachweisen. Diese Kalziumantworten sind am ehesten durch Kalzium-permeable AMPA-Rezeptoren vermittelt.

Die funktionellen Experimente wurden methodisch durch den immunzytochemischen Nachweis typischer neuronaler und glialer Markerproteine sowie die Charakterisierung von AMPA- und NMDA-Rezeptoren auf Protein- und RNA-Ebene ergänzt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine sich selbst-erneuernden neuronale Vorläuferzelllinie aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen generiert werden. Diese Vorläuferzellen konnten in eine neuronale Zelllinie mit einem glutamatergen Phänotyp differenziert werden. Eine Präkonditionierung mit Retinsäure während der EB-Formation erhöhte den Anteil neuronaler Phänotypen im terminal differenzierten Netzwerk, wobei die pharmakokinetischen Eigenschaften der Glutamatrezeptoren nicht beeinflusst wurden. Die Fura-2 Kalzium-Imaging Methode stellt eine vielversprechende, relativ simple und robuste Methode dar, um hiPSC-Neurone funktionell zu

charakterisieren. Die Expression typischer neuronaler Marker reflektiert einen bereits weit fortgeschrittenen morphologischen Reifegrad. Der Nachweis funktioneller NMDA- und AMPA-Rezeptoren deutet ebenfalls auf eine fortgeschrittene Entwicklung hin. Die fehlende Spontanaktivität, die EC50-Werte entsprechend der AMPA-GluA4-Untereinheit sowie der Nachweis Kalzium-permeabler AMPA-Rezeptoren sind hingegen Indizien für noch funktionell unreife neuronale Netzwerke.