

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. Carla Nau

---

**Funktionelle Analyse dopaminergener Neurone von  
Parkinsonpatienten mit kombiniert-heterozygoten  
Mutationen im Parkin-Gen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Jana Marx

aus Siegen

Lübeck 2023

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Enrico Leipold

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. med Yorck Hellenbroich

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2023

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 25.10.2023

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

# I. Inhalt

<b>II. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>IV. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>9</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Morbus Parkinson und Parkinson-Syndrome .....</b>	<b>11</b>
1.1.1. Parkinson-Syndrome durch Mutationen im Parkin-Gen .....	13
<b>1.2. Induzierte pluripotente Stammzellen .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. Ziel der Arbeit.....</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIAL.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Patientenmaterial .....</b>	<b>20</b>
<b>3. METHODEN.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Induzierte pluripotente Stammzellen .....</b>	<b>21</b>
3.1.1. Herstellung iPSC-abgeleiteter Neurone .....	21
3.1.2. Kultivierung der iPS-Neurone.....	22
<b>3.2. Patch-Clamp-Verfahren .....</b>	<b>23</b>
3.2.1. Elektrophysiologische Grundlagen .....	23
3.2.2. Herstellung der Mikropipetten .....	28
3.2.3. Durchführung der Messung.....	30
<b>3.3. Protokolle .....</b>	<b>33</b>
3.3.1. Messung spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle .....	33
3.3.2. Messung postsynaptischer Ströme .....	34
3.3.3. Messung des Membranpotentials und der Spontanaktivität: Spontane Aktionspotentiale .....	34
3.3.4. Evozierte Aktionspotentiale .....	35
<b>3.4. Auswertung .....</b>	<b>36</b>
3.4.1. Einschlusskriterien .....	36
3.4.2. Bestimmung der Stromdichten der spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle.....	36
3.4.3. Auswertung postsynaptischer Ströme .....	36
3.4.4. Auswertung der spontanen Aktivität.....	37

3.4.5. Auswertung der Aktivität unter Strominjektion .....	37
<b>3.5. Statistische Auswertung .....</b>	<b>38</b>
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Qualitative Beschreibung der Zellmorphologie .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2. Elektrophysiologische Eigenschaften der drei Zelllinien.....</b>	<b>43</b>
4.2.1. Funktionelle Analyse spannungsabhängiger Ionenkanäle .....	43
4.2.2. Postsynaptische Ströme als Indikator neuronaler Vernetzung .....	47
4.2.3. Spontane Aktionspotentiale.....	49
4.2.4. Aktionspotentiale durch Injektion von Strompulsen: Evozierte Aktionspotentiale .....	51
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1. Zellmaterial .....</b>	<b>56</b>
5.1.1. Eigenschaften der untersuchten Zellen .....	56
5.1.2. Zellalter .....	58
5.1.3. iPSC .....	60
<b>5.2. Limitationen des experimentellen Setups .....</b>	<b>62</b>
<b>5.3. Elektrophysiologische Messungen .....</b>	<b>63</b>
5.3.1. Spannungsabhängige Natrium- und Kaliumströme .....	63
5.3.2. Spontane postsynaptische Ströme.....	64
5.3.3. Spontane Aktionspotentiale.....	64
5.3.4. Aktionspotentiale bei Strominjektion und <i>voltage sag</i> .....	65
<b>5.4. Mutationen.....</b>	<b>66</b>
<b>5.5. Ausblick.....</b>	<b>68</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>71</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>72</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>91</b>
8.1. Weiterführende Abbildungen .....	91
8.2. Chemikalien .....	93
8.3. Wachstumsfaktoren .....	94
8.4. Lösungen und Medien .....	94

<b>8.5. Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>95</b>
<b>8.6. Geräte.....</b>	<b>95</b>
<b>8.7. Software.....</b>	<b>96</b>
<b>9. DANKSAGUNG.....</b>	<b>97</b>
<b>10. LEBENSLAUF.....</b>	<b>98</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Struktur des Parkin-Gens .....	13
Abbildung 2. Zeitlicher Verlauf der Zelldifferenzierung und Experimentierphase .	22
Abbildung 3. Beispielhaftes neuronales Aktionspotential einer Zelle der Wildtyplinie zum Zeitpunkt 2.....	24
Abbildung 4. Konfigurationen bei Durchführung von Experimenten mit der <i>Patch-Clamp</i> -Technik .....	25
Abbildung 5. Aufbau des <i>Patch-Clamp</i> -Setups .....	27
Abbildung 6. Aufbau von Messkammer und Elektrode.....	28
Abbildung 7. Pulsprotokolle zur Messung spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle.....	33
Abbildung 8. Messprotokoll zur Messung postsynaptischer Ströme.....	34
Abbildung 9. Messung spontaner Aktionspotentiale .....	35
Abbildung 10. Messprotokoll zur Messung evozierter Aktionspotentiale .....	35
Abbildung 11. Repräsentative Darstellung der <i>mCherry</i> -Fluoreszenz von TH <sup>+</sup> -iPS-Zellen bei Anregung mit grünem Licht.....	40
Abbildung 12. Lichtmikroskopische Aufnahmen: Neuronale Morphologie der verwendeten Zelllinien.....	42
Abbildung 13. Charakteristisches Schaltverhalten der Nav- und Kv-Kanäle.....	43
Abbildung 14. Aktivität spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle .....	46
Abbildung 15. Postsynaptische Ströme der verschiedenen Zelllinien .....	48
Abbildung 16. Spontanaktivität in iPSC-abgeleiteten dopaminergen Kulturen .....	50
Abbildung 17. Exemplarisches Verhalten einer Zelle auf zweisekündige Strompulse .....	51
Abbildung 18. Evoziertes Feuerverhalten der iPSC-abgeleiteten dopaminergen Kulturen.....	53
Abbildung 19. Exemplarische Darstellung des Spannungs- <i>Sags</i> einer Zelle der Wildtyplinie, gemessen bei einer Strominjektion von $-40$ pA .....	53
Abbildung 20. Ausbildung eines hyperpolarisierenden Spannungs- <i>Sag</i> in iPSC-abgeleiteten dopaminergen Kulturen.....	54
Abbildung 21. Neuronales Gedächtnis in Patienten-abgeleiteten neuronalen Modellen (nach Traxler <i>et al.</i> , 2019).....	69

Abbildung 22. Schaltverhalten der  $N_{av}$ - und  $K_v$ -Kanäle und  
Spannungsabhängigkeit der Stromdichten..... 91

Abbildung 23. Weiterführende Analysen der postsynaptischen Ströme ..... 92

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Wichtige Parkinson-relevante Gene .....	12
Tabelle 2. Verwendete Spenderzelllinien .....	20
Tabelle 3. Schema zur Zugabe von Wachstumsfaktoren und Medium bis einschließlich Tag 40 nach Start der Differenzierung .....	22
Tabelle 4. Einstellungen zur Herstellung der Glasmikropipetten bei einem Ramp- Wert von 571 .....	29
Tabelle 5. Herstellung der Silikongummiverbindung zur Beschichtung der Spitzen der Glasmikropipetten .....	29

## IV. Abkürzungsverzeichnis

AA	Ascorbinsäure
AgCl	Silberchlorid
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
C <sub>m</sub>	Membrankapazität
c-Myc	Transkriptionsfaktor
CRISPR/Cas	<i>Clustered regulary interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated</i> (CRISPR-assoziiertes Protein)
DaN	Dopaminerge Neurone
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EOPD	<i>Early onset Parkinson's disease</i>
GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
Glc	D-Glucose
Gln	L-Glutamin
GPS	Genetische / hereditäre Parkinson-Syndrome
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IBR	<i>In-between-RING</i>
iPS(C)	Induzierte pluripotente Stammzellen
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
KCl	Kaliumchlorid
Klf4	<i>Krüppel-like</i> Faktor 4 (Transkriptionsfaktor)
KOH	Kaliumhydroxid
KOS	Transkriptionsfaktoren Klf4, Oct4, Sox2
K <sub>v</sub> (-Kanäle)	Spannungsabhängige Kaiumkanäle
LJP	<i>Liquid Junction Potential</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

Nav (-Kanäle)	Spannungsabhängige Natriumkanäle
Oct4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
PARK2	Parkin-Gen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	<i>Parkinson's disease</i> / Morbus Parkinson
PLO	Poly-L-Ornithin
PSC	Postsynaptische Ströme
REP	Repressorelement
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RMP	Ruhemembranpotential
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SHH	Sonic hedgehog (Protein)
SnPc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
Sox2	<i>sex determining region Y (SRY)- box 2</i> (Transkriptionsfaktor)
TGF $\beta$ 3	<i>Transforming growth factor Beta 3</i>
TH	Tyrosinhydroxylase
Ubl	<i>Ubiquitin-like</i>

# 1. Einleitung

## 1.1. Morbus Parkinson und Parkinson-Syndrome

Der Morbus Parkinson (*Parkinson's disease*, PD) ist eine progredient verlaufende neurodegenerative Erkrankung, deren Prävalenz mit steigendem Lebensalter deutlich zunimmt und nach der Alzheimer-Demenz die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit darstellt (7, 88, 118, 139, 209).

1817 beschrieb der britische Chirurg James Parkinson in seinem Essay „*On the Shaking Palsy*“ („Eine Abhandlung über die Schüttellähmung“) (157) erstmals die in der heutigen Zeit als Morbus Parkinson bekannte Erkrankung und stellte den Tremor sowie die posturale Instabilität als charakteristische Symptome dar. Heutzutage werden Parkinson-Syndrome charakterisiert durch das Vorliegen einer Akinese sowie mindestens eines der weiteren Symptome Rigor, Ruhetremor und/oder posturale Instabilität (48, 56). Dabei ist die Ausprägung der Symptome nicht diagnostisch relevant. Neben diesen Kardinalsymptomen können weitere, fakultative Begleitsymptome auftreten, welche sensorischer, vegetativer, psychischer sowie kognitiver Art sein können (52, 54). PD ist eine klinische Diagnose, welche durch bildgebende Verfahren sowie medikamentöse Tests mit L-DOPA oder Apomorphin gesichert werden kann.

Die Pathogenese der Erkrankung ist noch nicht vollständig geklärt. Es kommt zu einem Verlust dopaminerger Neurone (DaN) vorrangig in der *Pars compacta* der *Substantia nigra* (SnPc). Dieser Verlust an Neuronen scheint zu einem gewissen Teil in Verbindung zu stehen zu den Stoffwechselwegen der Autophagie (33, 78, 159), der Endozytose (3, 44, 67), der Lysosomen (50, 104, 145, 148, 156, 167), der Mitochondrien (22, 47, 76, 146, 192, 204, 227) sowie der Immunantwort (33, 108, 148, 194, 225). Durch den Mangel an Dopamin kommt es zu einer Störung der Basalganglienschleife, was zu der klassischen Symptomtrias aus Rigor, Tremor und Akinese führt (48, 56).

Ferner sind auch serotonerge Neurone in den Raphekernen sowie cholinerge Neurone im *Nucleus basalis Meynert* von der Degeneration betroffen, was zu einem Mangel der Neurotransmitter Noradrenalin, Serotonin und Acetylcholin und damit zu einer Entwicklung einer depressiven sowie dementiellen Symptomatik führt (9). Die genaue Ursache für den Verlust der Neurone ist nicht bekannt. Es

wird vermutet, dass die Erkrankung zu einem großen Teil auf eine komplexe Interaktion zwischen genetischen Faktoren, Umweltfaktoren und dem individuellen Lebensstil zurückzuführen ist (122, 152). Neben idiopathischen Formen der Erkrankung, welche als idiopathische Parkinson-Syndrome (IPS oder Morbus Parkinson) bezeichnet werden, gibt es auch Formen, die auf genetischen Mutationen beruhen (hereditäre Parkinson-Syndrome, GPS).

Polymeropoulos *et al.* zeigten 1996, dass Mutationen im *SNCA*-Gen zu den PD-typischen Krankheitsmechanismen und -symptomen führen können und belegten, dass die Veranlagung für diese Erkrankung vererbt werden kann (160). In den darauffolgenden Jahren wurden erste Familienanalysen durchgeführt, welche zeigen konnten, dass Parkinson eine genetisch heterogene und komplexe Erkrankung ist, welche wie in Tabelle 1 dargestellt nicht nur auf *SNCA* beschränkt ist (61, 147, 175, 176). Einige rezessiv vererbte Formen mit frühem Beginn wurden durch Mutationen in den Genen *PRKN*, *PINK1* und *DJ-1* beschrieben und 2004 konnte schließlich gezeigt werden, dass eine Mutation in *LRRK2* die nach aktuellem Stand häufigste autosomal-dominant vererbte PD-assoziierte Mutation darstellt (154, 226).

Gen	Mutation	Entdeckung	Vererbung
<i>SNCA</i>	<i>Missense</i> oder Multiplikation	1997	Dominant
<i>PRKN</i>	<i>Missense</i> oder <i>loss of function</i>	1998	Rezessiv
<i>DJ-1</i>	<i>Missense</i>	2003	Rezessiv
<i>LRRK2</i>	<i>Missense</i>	2004	Dominant
<i>PINK1</i>	<i>Missense</i> oder <i>loss of function</i>	2004	Rezessiv

**Tabelle 1. Wichtige Parkinson-relevante Gene.** Neben den dargestellten fünf Genen gibt es noch mindestens 15 weitere Gene, die mit der Parkinson-Erkrankung assoziiert sind. Darstellung nach Blauwendraat *et al.*, 2020.

Etwa 5-10 % der PD-Fälle sind monogen bedingt, was bedeutet, dass Mutationen in einem einzelnen Gen die Ursache für die Entstehung der Erkrankung sind (54, 112, 120, 121). In den vergangenen 25 Jahren wurden Parkinson-assoziierte Mutationen in mehr als 20 Genen identifiziert, welche jedoch noch immer nicht alle monogenetischen oder komplex-genetischen Fälle erklären können.

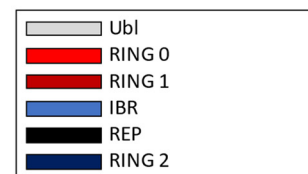
Die monogenetischen Parkinson-Syndrome weisen ein klinisches Bild auf, das dem der IPS sehr ähnlich ist, jedoch kommt es tendenziell häufiger zu weiteren, atypischen Symptomen wie beispielsweise zu Dystonien (15, 29, 120, 133).

Neben den idiopathischen und hereditären Parkinson-Syndromen gibt es zusätzlich noch die atypischen Parkinson-Syndrome, welche durch eine neurodegenerative Grunderkrankung hervorgerufen werden, sowie die sekundären Parkinson-Syndrome, welche meist Folge einer antidopaminergen Medikation sind, jedoch auch durch Tumoren bedingt sein können.

Therapeutisch versucht man, das gestörte Gleichgewicht der Neurotransmitter zu beeinflussen, was insbesondere über das Beheben des Dopaminmangels durch medikamentöse Gabe von L-DOPA geschieht.

### 1.1.1. Parkinson-Syndrome durch Mutationen im Parkin-Gen

Das menschliche Parkin-Gen (*PRKN*, *PARK2*) liegt auf dem langen Arm von Chromosom 6 (6q25.2-q27) und besitzt 12 Exone (160, 161). Es kodiert für eine multifunktionelle E2-abhängige E3-Ubiquitin-Ligase im Zytosol, welche unter anderem an der Degradierung intrazellulärer Proteine beteiligt ist (29, 123, 178, 180).



**Abbildung 1. Struktur des Parkin-Gens.** Parkin besteht aus 465 Aminosäuren und ist bei Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 6 zu finden. Ubl: *Ubiquitin-like*, RING: *really interesting new gene*, IBR: *in-between RING*

Das Parkin-Protein besteht aus einer N-terminalen *Ubiquitin-like*-Domäne (Ubl-Domäne), zwei *really interesting new gene*-Domänen (RING-Domänen) 0 und 1, welche zusammen die carboxyterminale RING-Box bilden, einer *In-Between* RING-Domäne (IBR-Domäne), einem Repressorelement (REP) sowie der RING 2-Domäne.

Die drei RING-Domänen sowie die IBR-Domäne können jeweils zwei Zink-Ionen binden und somit zur korrekten Faltung des Proteins sowie zur Proteinfunktion beitragen (11, 24, 92, 178, 207). Die Ubl-Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Enzymsubstrate, dem Einleiten des Ubiquitinierungsvorganges und der Regulation der zellulären Parkin-Level und der Parkin-Aktivität (8, 34, 60, 63,

170, 206). Das REP bindet die E2-bindende RING 1-Domäne und blockiert diese dadurch.

Als E3-Ubiquitin-Ligase ist Parkin direkt an der Ubiquitinierung beteiligt. Bei diesem posttranslationalen Prozess werden abzubauen Proteine durch das Anhängen von Ubiquitin markiert (87). Die so markierten Proteine können dann mittels des Proteasoms oder durch Lysosomen abgebaut werden, wobei man letzteres als Autophagie bezeichnet (165). Für die Ubiquitinierung werden drei Enzyme benötigt: E1, E2 und E3. E1 aktiviert das Ubiquitin mittels Adenosintriphosphat (ATP) und überträgt es dann auf E2. Das E2-Enzym interagiert schließlich mit dem E3-Enzym und transferiert das Ubiquitin auf das abzubauen Protein (87, 178).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Ligaseaktivität durch Autoinhibition unterdrückt, bestimmte Mutationen oder auch Einwirkung von Hitze unter experimentellen Bedingungen können die Aktivität jedoch verstärken. Die Autoinhibition weist dabei drei Mechanismen auf (34, 166, 208, 216):

1. Der Zugang zur katalytischen RING 2-Domäne wird durch die RING 0-Domäne geblockt.
2. Die Bindestelle für das E2-Enzym befindet sich auf der RING 1-Domäne, welche durch die Ubl-Domäne sowie das REP geblockt wird.
3. Im inaktiven Zustand ist die Entfernung zwischen der E2-Bindestelle und der katalytischen RING 2-Domäne so groß, dass der Ubiquitin-Transfer verhindert wird.

Bei Aktivierung ubiquitiniert Parkin eine Vielzahl an Proteinen im Zytosol und an der äußeren Mitochondrienmembran und zeigt dabei eine geringe Substratspezifität (32, 173). Zu den Substraten des Enzyms zählen Stoffe, die wichtige Funktionen in diversen Stoffwechselwegen aufweisen, wie beispielweise  $\alpha$ -Synuclein, Synaptotagmin XI sowie Synphillin-1 (94, 181). Bei Patienten mit Mutationen im Parkin-Gen kommt es zur Akkumulation dieser Stoffe, was einen möglichen Erklärungsansatz für den selektiven Untergang von DaN in der SnPc sowie im *Locus coeruleus* darstellen könnte (42, 202).

Zusammen mit *PINK1* ist Parkin in der Lage, geschädigte Mitochondrien mit reduziertem mitochondrialem Membranpotential zu erkennen und die Elimination

mittels Ubiquitin-Proteasom- sowie Autophagie-Stoffwechselwegen anzuregen (103, 124, 149, 150, 220).

Auch im Dopaminmetabolismus und bei der Clearance von Proteinen, die als Folge von Dopaminoxidation geschädigt wurden, spielt Parkin eine wichtige Rolle. Studien konnten zeigen, dass Neurone mit Parkin-Mutation eine verringerte Dopaminaufnahme bei gesteigerter spontaner Dopaminfreisetzung aufwiesen (40, 101, 105).

Bei Zell-Stress wie beispielsweise der Akkumulation ungefalteter Proteine wird die Expression von Parkin hochreguliert, sodass diese Proteine abgebaut werden und der Zelluntergang unterdrückt wird (95, 96). Ein Modell mit Parkin-Knockout-Zellen konnte höhere Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nachweisen (17, 23).

Das Parkin-assoziierte Parkinson-Syndrom wird autosomal-rezessiv vererbt und stellt die häufigste genetische Ursache der Parkinson-Erkrankung mit frühem Beginn (*Early Onset Parkinson's Disease*, EOPD) dar (18, 85, 138). EOPD beschreibt eine Parkinson-Erkrankung, welche vor dem 40. Lebensjahr erstmals symptomatisch wird; in einigen Fällen treten auch juvenile Formen mit einem Beginn vor dem 20. Lebensjahr auf. Das mediane Erkrankungsalter bei EOPD liegt bei 31 Jahren (2, 18, 21, 85, 117, 127, 138). Über 50 % der Fälle von autosomal-rezessiv vererbtem EOPD liegen Mutationen im Parkin-Gen zugrunde (18, 216).

Die ersten Mutationen im Parkin-Gen wurden 1998 von Kitada *et al.* in japanischen Patienten mit EOPD beschrieben (109). Es handelte sich dabei sowohl um homozygote als auch um gemischt heterozygote Mutationen. Gemischt heterozygote Mutationen beschreiben eine Allelkonstellation, bei welcher zwei unterschiedlich mutierte Allele des gleichen Gens vorliegen (174). Aktuell sind weit über 250 verschiedene Mutationen oder genetische Varianten im Parkin-Gen bekannt, welche zum Ausbruch der Erkrankung führen (29). Ein möglicher Grund für diese ungewöhnlich hohe Rate an Mutationen könnte die Position dieses Gens innerhalb einer sog. *fragile site* sein, in diesem Fall FRA6E (140). Die Bandbreite der möglichen Mutationen erstreckt sich von Punktmutationen über Deletionen und Insertionen bis hin zu Deletionen oder Multiplikationen eines oder mehrerer Exons. In den meisten Fällen kommt es durch einen *Frameshift* zu einem

vorzeitigen Proteinabbruch oder einer Funktionseinschränkung bzw. -veränderung des Proteins (174).

Neben dem frühen Erkrankungsbeginn und den klassischen Symptomen der Erkrankung weist das Parkin-assoziierte GPS auch Befunde auf, welche eine klinische Abgrenzung zum IPS möglich machen. Zu diesen Befunden zählen eine ausgeprägte tageszeitliche Schwankung der Symptomausprägung, Dystonie und Hyperreflexie. Häufig kommt es durch Schlaf zu einer Besserung der Symptomatik. Der Krankheitsverlauf ist im Vergleich zum IPS eher langsam progredient, das Ansprechen auf Levodopa ist sehr gut (51, 85, 86, 107, 126, 127). Histopathologisch ist das Besondere an der Parkin-assoziierten Parkinsonerkrankung das Fehlen von Lewy-Körperchen, was eine Rolle von Parkin bei der Bildung ebenjener Strukturen indiziert. Als Lewy-Körperchen werden rundliche Einschlüsse aus abnorm phosphorylierten Proteinen bezeichnet, welche im Zytoplasma von Neuronen auftreten und neben der Parkinson-Erkrankung auch bei der Lewy-Körper-Demenz auftreten (21, 39, 82, 117).

## 1.2. Induzierte pluripotente Stammzellen

Stammzellen bieten aufgrund ihres Differenzierungspotentials beste Bedingungen, um die Auswirkungen von Mutationen und genetischen Varianten detailliert zu erforschen. Die Gewinnung solcher Stammzellen aus menschlichen Embryos wirft viele ethische Fragen auf, weswegen schon vor mehr als 60 Jahren erste Experimente bezüglich einer Reprogrammierung von somatischen Zellen durchgeführt wurden. So konnten Gurdon *et al.* 1958 erfolgreich intestinale Epithelzellen in enukleierte Eizellen von Fröschen implantieren (77).

2006 konnten Takahashi und Yamanaka erstmals erfolgreich pluripotente Stammzellen aus Hautzellen adulter Mäuse herstellen (197, 198). Nach Retrovirus-vermittelter Transduktion der Zellen fanden sie heraus, dass lediglich vier Gene benötigt wurden, um Fibroblasten zu solchen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) zu reprogrammieren: *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* und *c-Myc*. Die so im Labor hergestellten Stammzellen wiesen alle molekularen und funktionellen Eigenschaften humaner Stammzellen auf, ohne die komplexen ethischen Fragestellungen, welche durch die Verwendung humaner Embryos entstehen, aufzuwerfen. Diese wegweisende Arbeit wurde 2012 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet und hat seitdem immer mehr an Bedeutung gewonnen (90).

Nach Entwicklung der iPSC-Technik wurde diese Methode rasch als große Chance für die personalisierte Medizin gesehen, um beispielsweise Organtransplantate künstlich zu züchten. 2013 generierte eine japanische Forschungsgruppe zwei Retinaimplantate aus Fibroblasten von an altersbedingter Makuladegeneration erkrankten Patienten (131). Ein Jahr später wurde einer ersten Patientin ein Implantat aus iPSC-abgeleitetem Retinaepithel eingesetzt. Kurz vor der Operation eines zweiten Patienten wurde diese klinische Studie jedoch abgebrochen, da Mutationsanalysen mehrere genetische Veränderungen des Implantats zeigten (66). Seitdem wird die sichere Anwendung von iPSC-abgeleiteten Implantaten in Patienten stark diskutiert.

Doi *et al.* starteten 2018 eine neue Studie, in der iPSC-abgeleitete dopaminerge Progenitorzellen zur Behandlung von Parkinsonpatienten eingesetzt werden (53, 196). Endgültige Ergebnisse dieser Studie stehen noch aus.

Heute dient die iPSC-Technologie zum größten Teil dem Modellieren von Krankheiten oder spezifischen Krankheitsaspekten und dem genauen Verständnis von Medikamentenwirkungen auf einzelne Patienten (28, 128, 185). Mithilfe der CRISPR/Cas9-Technologie ist es möglich, zwischen den Effekten von spezifischen Mutationen und weiteren Mutationen im genetischen Hintergrund der Individuen zu unterscheiden, indem patientenspezifische isogene iPSCs mit korrigierten Mutationen hergestellt werden (10, 16, 20, 41, 79, 130, 172). Zusätzlich dazu können spezifische Marker in Zellen eingebracht werden, welche beispielsweise die Identifikation von Subtypen ermöglicht (26, 224).

Um die genetischen Aspekte der Parkinsonerkrankung zu untersuchen, ist es wichtig, die dopaminergen Zellen zu untersuchen, da in diesen die pathologischen Prozesse ablaufen. Dies gelingt beispielsweise durch Markierung der Tyrosinhydroxylase (TH) in den Zellen. Die TH ist das Schlüsselenzym der Katecholaminbiosynthese, welches die Oxidation der Aminosäure Tyrosin in 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) katalysiert (142). Aus DOPA werden anschließend die Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin gebildet. Durch Markierung dieses Enzyms kann eine möglicherweise veränderte Aktivität beobachtet werden (46).

### 1.3. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden drei iPS-Zelllinien elektrophysiologisch untersucht. Die Zellen wurden aus den Fibroblasten zweier Parkinsonpatienten und einer gesunden Kontrollpatientin gewonnen. Die an einem GPS erkrankten Patienten wiesen unterschiedliche, komplex-heterozygote Mutationen im Parkin-Gen auf, wobei eine der Mutationen identisch war.

Nach Reprogrammierung und Differenzierung der Fibroblasten zu dopaminergen Neuronen sollten mögliche elektrophysiologische Unterschiede in den Mutationszelllinien im Vergleich zur Kontrollzelllinie aufgedeckt und eingeordnet werden. In allen drei Zelllinien wurde zwischen dopaminergen, Tyrosinhydroxylase-exprimierenden Zellen (TH<sup>+</sup>) und nicht-dopaminergen, nicht-Tyrosinhydroxylase-exprimierenden Zellen (TH<sup>-</sup>) unterschieden. Da die Parkinson-Erkrankung mit einem Verlust dopaminergener Neurone einhergeht, ist zu vermuten, dass die (Schrittmacher-) Aktivität dieser Zellen im Vergleich zu den Zellen gesunder Probanden gestört ist, was in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Dabei wurden neben der Spontanaktivität der Neurone auch weitere elektrophysiologische Parameter der Zellen analysiert.

## 2. Material

Die benötigten Materialien für die Herstellung und Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten iPSC-abgeleiteten Zellen wurden vom Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck bereitgestellt.

Eine detaillierte Auflistung dieser und aller weiteren verwendeten Materialien befindet sich im Anhang (Abschnitt 8.2. bis 8.7.).

### 2.1. Patientenmaterial

Die für die Experimente verwendeten iPS-Zellen wurden vom Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck durch Reprogrammierung humaner dermaler Fibroblasten generiert. Das Patientenmaterial stammte von einer gesunden Probandin und zwei Patienten mit klinisch diagnostiziertem Parkinson-Syndrom. Beide Erkrankte wiesen kombinierte heterozygote Mutationen im Parkin-Gen auf.

Genauere Informationen zu den Spender\*innen der Fibroblasten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Name	Labor-Code	Alter bei Biopsie	Geschlecht	PD-assoziierte Mutation (Gen)	PD-assoziierte Mutation (Protein)
818	SFC 818	57 Jahre	Männlich	delEx4, c.823 C>T	Verkürzt, p.R275W
821	SFC 821	35 Jahre	Weiblich	c.823 C>T, c.1054 T>C	p.R275W, p.C352R
Wildtyp	084	63 Jahre	Weiblich	Keine	Keine

*Tabelle 2. Verwendete Spenderzelllinien.* Bei den beiden Mutationslinien trägt je ein Allel die gleiche Parkinson-assoziierte Mutation; in der zweiten, ebenfalls Parkinson-assoziierten Mutation, unterschieden sich die Zelllinien.

Eine schriftliche Einverständniserklärung der Spender\*innen sowie die Bewilligung der Studie durch die Ethikkommission lagen dem Institut für Neurogenetik vor.

## 3. Methoden

### 3.1. Induzierte pluripotente Stammzellen

#### 3.1.1. Herstellung iPSC-abgeleiteter Neurone

Die Arbeitsgruppen *Molecular Mechanisms of Parkinson Disease* (Leitung: Dr. A. Rakovic) und *Applied Stem Cell Biology* (Leitung: Prof. Dr. P. Seibler) des Instituts für Neurogenetik der Universität zu Lübeck führten die Reprogrammierung der Fibroblasten und Differenzierung der iPS-Zellen durch und stellten sie zur Verfügung.

##### 3.1.1.1. *Reprogrammierung und Fluoreszenzmarkierung*

Zur Reprogrammierung der humanen dermalen Fibroblasten wurde ein nicht-integrierendes Sendaivirus mit drei Vektoren (codierend für die Transkriptionsfaktoren *KOS*, *Klf4* und *c-Myc*) genutzt, mit welchem die Zellen transduziert wurden.

Um eine visuelle Identifikation Dopamin-produzierender Neurone (TH<sup>+</sup>) zu ermöglichen, wurde mittels der CRISPR/Cas9-Methode ein T2A-*mCherry*-Konstrukt an das 5'-Ende des TH-Gens angefügt. Bei Bestrahlung mit grünem Licht (Wellenlänge 550 nm) emittieren die dopaminergen Neurone, d.h. die TH<sup>+</sup>-Neurone, rotes Licht.

##### 3.1.1.2. *Zelldifferenzierung*

Das Institut für Neurogenetik ging bei der Differenzierung der iPS-Zellen zu dopaminergen Neuronen nach dem Protokoll von Kricks *et al.* (114) vor. Dabei wurde den Zellen ein stetig ansteigender Anteil von neuronalen Wachstumsfaktoren zugesetzt, bis sie an Tag 20 auf mit Salpetersäure gereinigten sowie mit PLO und Laminin beschichteten Deckgläschen ausplattiert werden konnten. Im Anschluss daran erfolgten die elektrophysiologischen Messungen wie in Abbildung 2 dargestellt.

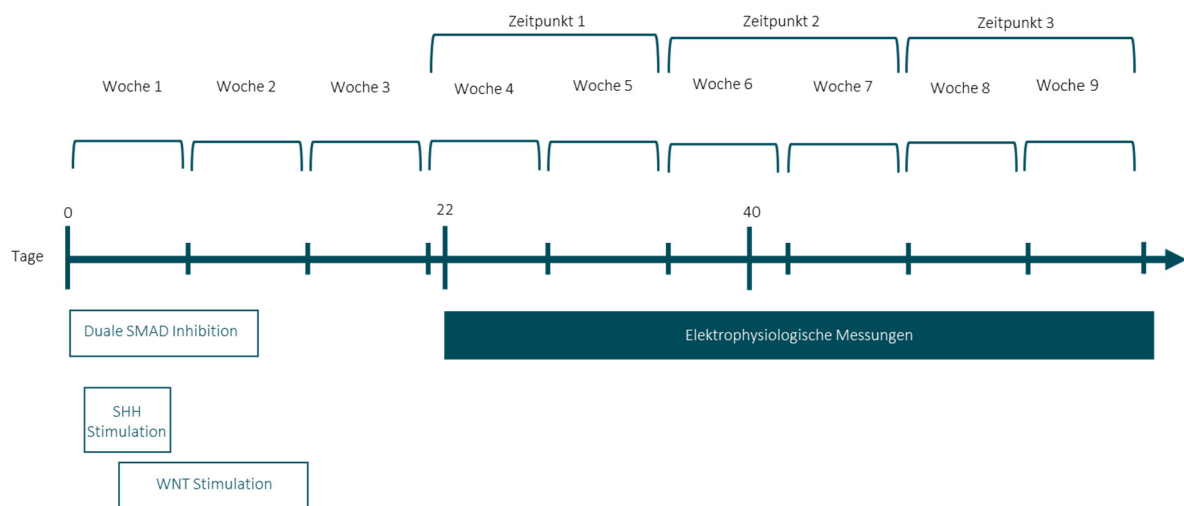


Abbildung 2. Zeitlicher Verlauf der Zelldifferenzierung und Experimentierphase.

### 3.1.2. Kultivierung der iPS-Neurone

Am 21. Tag nach Beginn der Differenzierung wurden die auf Deckgläschen in 24-Well-Platten liegenden Zellen aus dem Institut für Neurogenetik in das *Center for Brain, Behaviour and Metabolism* für die weiteren Messungen überführt.

Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte alle zwei Tage. Bis einschließlich Tag 40 nach Beginn der Differenzierung wurden dem Nährmedium zusätzliche Faktoren nach dem in Tabelle 3 dargestellten Schema hinzugegeben.

Dazu wurde zunächst das alte Medium vorsichtig mit einer Pasteurpipette am oberen Rand des Wells abgesaugt, bis das Deckgläschen lediglich mit einem kleinen Rest Flüssigkeit benetzt war. Anschließend wurden 0,5 ml neues Medium (ggf. plus Faktoren) langsam hinzugegeben.

Substanz	Verhältnis	Menge pro Well
AA	1:500	1 µl
BDNF	1:2000	0,25 µl
cAMP	1:200	2,5 µl
DAPT	1:1000	0,5 µl
GDNF	1:500	1 µl
TGF β3	1:2000	0,25 µl
NB/B27-Medium		0,495 ml

Tabelle 3. Schema zur Zugabe von Wachstumsfaktoren und Medium bis einschließlich Tag 40 nach Start der Differenzierung.

## 3.2. Patch-Clamp-Verfahren

### 3.2.1. Elektrophysiologische Grundlagen

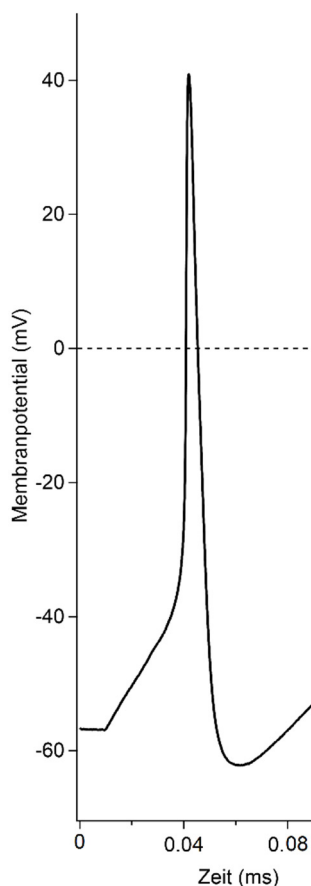
Die Elektrophysiologie beschäftigt sich mit der Messung lokaler Potentialänderungen über erregbare Zellmembranen. Neben Spannungsänderungen (Aktionspotentiale, AP) kann auch der Stromfluss durch einzelne Ionenkanäle aufgezeichnet werden. Eine spezielle Methode stellt die *Patch-Clamp*-Technik dar, bei der sowohl ganze Zellen als auch einzelne Membranabschnitte einer Zelle untersucht werden können.

#### 3.2.1.1. *Erregbare Membranen und Aktionspotentiale*

Die Zellmembran dient als Barriere zwischen dem Zytoplasma und dem die Zelle umgebenden extrazellulären Raum. Sie besteht zum Großteil aus Phospholipiden mit einem lipophilen und einem hydrophilen Molekülanteil. Diese ordnen sich in wässrigen Lösungen so an, dass sich eine Lipiddoppelschicht ergibt, bei der die hydrophilen Anteile nach außen gerichtet sind (217). Diese Doppelschicht grenzt die Zelle zu ihrer Umgebung ab, ermöglicht den Ablauf zellulärer Prozesse und bietet Schutz vor chemischen und mechanischen Einflüssen (183). Das Zytoplasma, der intrazelluläre Raum, und der extrazelluläre Raum unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Ionenzusammensetzung, wodurch Konzentrationsgradienten entstehen. Diese werden durch aktive und passive Transportprozesse von geladenen Teilchen durch Ionenkanäle oder Pumpen aufrechterhalten (49). Durch die unterschiedlich verteilten Ladungen auf den beiden Seiten der Membran ergibt sich das Ruhemembranpotential, welches in neuronalen Zellen bei etwa  $-70$  mV liegt (37, 71, 115, 219).

Aktionspotentiale dienen der Übermittlung von Informationen. Um ein AP auslösen zu können, bedarf es spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle. Erreicht ein Reiz ein Neuron, zum Beispiel in Form von Neurotransmittern, welche durch ein benachbartes Neuron ausgeschüttet wurden, kommt es durch Bindung dieser Neurotransmitter an Rezeptoren in der Zellmembran zu einer initialen Depolarisation. Sobald ein definiertes Schwellenpotential erreicht wird, kommt es zum Öffnen spannungsabhängiger Natriumkanäle in der Membran und einem schnellen Einstrom positiv geladener Natriumionen in das Zellinnere, was zu einer schlagartig ansteigenden Depolarisation führt - ein AP wird ausgelöst (Abbildung 3). Da die spannungsabhängigen Natriumkanäle zeitlich nicht unbegrenzt aktiv

sind, sondern schnell inaktivieren, kommt es zur Repolarisation. Der Scheitelpunkt der Kurve stellt den Beginn dieser dar. Es öffnen sich spannungsabhängige Kaliumkanäle, sodass es zu einem Ausstrom von Kaliumionen kommt. Anschließend folgt eine Phase der Hyperpolarisation, welche durch einen fortgesetzten Kaliumausstrom verursacht und auch als relative Refraktärzeit bezeichnet wird. Anschließend nähert sich die Zelle durch Wiederherstellung der ursprünglichen Ladungsverhältnisse mittels Natrium-Kalium-Pumpe ihrem Ruhemembranpotential an (89, 151). Die so ablaufenden Prozesse für die Entstehung eines AP dauern in Neuronen wenige Millisekunden. Direkt nach einem Aktionspotential sind die spannungsabhängigen Natriumkanäle noch inaktiv, die Membran ist somit nicht sofort wieder erregbar. Diese Zeitspanne, welche knapp 1 ms beträgt, entspricht der absoluten Refraktärzeit und ist wichtig für die Erregungsleitung, da sie eine unidirektionale Reizweiterleitung gewährleistet.



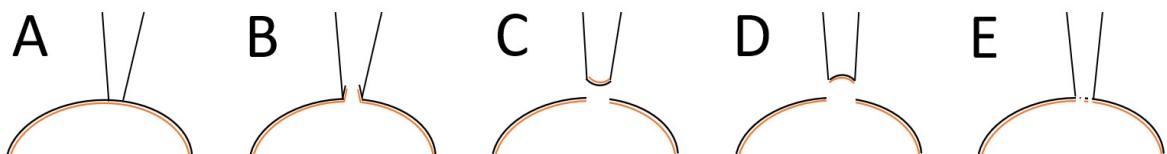
**Abbildung 3. Beispielhaftes neuronales Aktionspotential einer Zelle der Wildtyplinie zum Zeitpunkt 2.** Es kommt zu einem Natriumioneneinstrom, der das Membranpotential bei Erreichen des Schwellenwertes stark ansteigen lässt. Etwas verzögert öffnen Kaliumkanäle. Durch den Kaliumionenausstrom kommt es zu einer Repolarisation und abschließenden Hyperpolarisation.

### 3.2.1.2. Intrazelluläre Membranpotentialableitungen: Patch-Clamp-Technik

Mithilfe der *Patch-Clamp*-Technik können Stromfluss und Spannungsänderungen über einzelne Membranabschnitte einer Zelle untersucht werden.

Dabei können die Experimente in zwei Modi betrieben werden, die man als *Voltage-Clamp*- oder *Current-Clamp*-Modus bezeichnet. Im *Voltage-Clamp*-Modus ist die Kontrolle des Membranpotentials möglich. Dabei fungiert das Haltepotential, welches an die Membran angelegt wird, als künstliches Ruhemembranpotential. In diesem Modus wird der Stromfluss aufgezeichnet. Im *Current-Clamp*-Modus ist die Aufzeichnung des natürlichen Membranpotentials einer Zelle möglich. Zusätzlich können Ströme in die Zelle injiziert werden. Diese Methode findet Anwendung bei der Aufnahme von Aktionspotentialen.

Um ein *Patch-Clamp*-Experiment durchzuführen, wird eine Mikropipette mit einer Elektrode nah an die Zellmembran der zu untersuchenden Zelle geführt und anschließend ein Kontakt hergestellt. Je nach Ziel der Messungen und abhängig von der Art der Zellen lässt sich die genaue Art dieses Kontaktes anpassen. Man unterscheidet fünf verschiedene Formen dieser sog. Messkonfigurationen, welche in Abbildung 4 dargestellt sind.



**Abbildung 4. Konfigurationen bei Durchführung von Experimenten mit der Patch-Clamp-Technik.** (A) *Attached cell*-Konfiguration: Die Pipette geht eine dichte Verbindung ("seal") mit der Membranoberfläche ein. (B) *Whole-cell*-Konfiguration: Durch Anlegen eines wiederholt kurzen Unterdrucks wird eine Verbindung ins Zellinnere geschaffen. (C) *Outside-out*-Konfiguration: Die äußere Seite der Zellmembran wölbt sich in die Badlösung, sodass das zytosolische Milieu erhalten bleibt. (D) *Inside-out*-Konfiguration: Die innere Seite der Zellmembran steht in Kontakt mit der Badlösung, das extrazelluläre Milieu bleibt erhalten. (E) *Perforated-patch*-Konfiguration: Nach Erreichen der *attached-cell*-Konfiguration perforiert ein Poren-formendes Antibiotikum in der Pipette die Zellmembran.

Bei allen Konfigurationen wird ein Stromkreis zwischen zwei Elektroden geschlossen. Die erste Elektrode befindet sich in der Badlösung, die zweite im Inneren der Mikropipette; die Potentialdifferenz zwischen diesen beiden Elektroden spiegelt das Membranpotential wider. Die Badlösung ist dabei der

Extrazellulärflüssigkeit nachempfunden, während die Lösung im Inneren der Pipette der Zusammensetzung des Zytosols ähnelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen in der *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt, im Folgenden sollen jedoch auch die anderen möglichen Konfigurationen kurz erläutert werden.

Die *attached-cell*-Konfiguration ist die erste Konfiguration, welche beim Durchführen eines *Patch-Clamp*-Experiments erzielt wird. Dabei wird durch Anlegen eines Unterdrucks eine dichte Verbindung zwischen Pipettenspitze und Membran erzeugt. In dieser Messkonfiguration kann nur der Stromfluss durch den mit der Pipette abgedeckten Membranbereich gemessen werden, nicht aber das Membranpotential (62).

Zum Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration wird durch wiederholtes Anlegen von Unterdruckpulsen eine Verbindung ins Zellinnere geschaffen (45, 177). Da das Volumen der Zelle verglichen zu dem der Pipette gering ist, ist davon auszugehen, dass die Intrazellulärlösung komplett gegen die Pipettenlösung ausgetauscht wird (6). Mit dieser Konfiguration können nun elektrophysiologische Messungen wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden.

Aus der *whole-cell*-Konfiguration kann der sog. *outside-out-Patch* entstehen. Dabei bilden die Enden der abgelösten Membranen ein Vesikel an der Pipettenspitze, wenn die Pipette vorsichtig von der Zelle zurückgezogen wird (210). Der *inside-out-Patch* entsteht aus der *attached-cell*-Konfiguration. Die Elektrode wird vorsichtig von der intakten Zellmembran entfernt, bis ein Teil dieser aus der Zelle gerissen wird. Dabei zeigt die innere Seite der Zellmembran nach außen. *Inside-out*- und *outside-out*-Konfigurationen werden bevorzugt zur Messung der Aktivität einzelner Ionenkanäle genutzt (80, 143). Der in Abbildung 4 unter E dargestellte *Patch* wird als *perforated patch bezeichnet*. Bei diesem befindet sich in der Pipette ein Porenbildner, sodass nach der *attached cell*-Konfiguration vereinzelte Öffnungen in der Zellmembran geschaffen werden, welche für Ionen durchlässig sind, größere Moleküle jedoch nicht passieren lassen (6, 91). Diese Konfiguration ähnelt der *whole-cell*-Konfiguration, da es jedoch nur zu kleinen Membranperforationen kommt, bleibt das Zytosol hier nahezu intakt.

Je nach Fragestellung gibt es verschiedene Aufbauten, um *Patch-Clamp*-Experimente durchzuführen. Diese können von simplen Konstruktionen bis hin zu

komplexen, hoch differenzierten und automatisierten Setups reichen. Ein schematischer Aufbau des verwendeten *Patch-Clamp*-Setups ist in Abbildung 5 dargestellt und soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Grundsätzlich wird bei der *Patch-Clamp*-Technik eine Mikropipette in Kontakt mit einer Zellmembran gebracht. Um dies zu ermöglichen, benötigt man ein Mikroskop, mit welchem man die Position der Mikropipette und die Zellen beobachten kann. Meist kommt ein inverses Mikroskop zum Einsatz, bei welchem das Objektiv im Gegensatz zu regulären Mikroskopen unter dem Objekt liegt. Dies ermöglicht präzise Bewegungen der Pipetten mithilfe der dreidimensional bewegbaren Mikromanipulatoren. Um die Zelle stimulieren und die Reaktionen aufzeichnen zu können, werden zusätzlich diverse elektrische Komponenten benötigt.

Da bereits kleine Vibrationen die Qualität der Messungen beeinträchtigen und zum Abreißen der Pipette von der Zelle führen können, sind Mikroskop und Manipulatoren auf einem schwingungsgedämpften Tisch installiert. Um Einflüsse durch elektrische Störquellen in der Umgebung zu reduzieren, wird der gesamte Versuchsaufbau in einem Faraday'schen Käfig installiert.

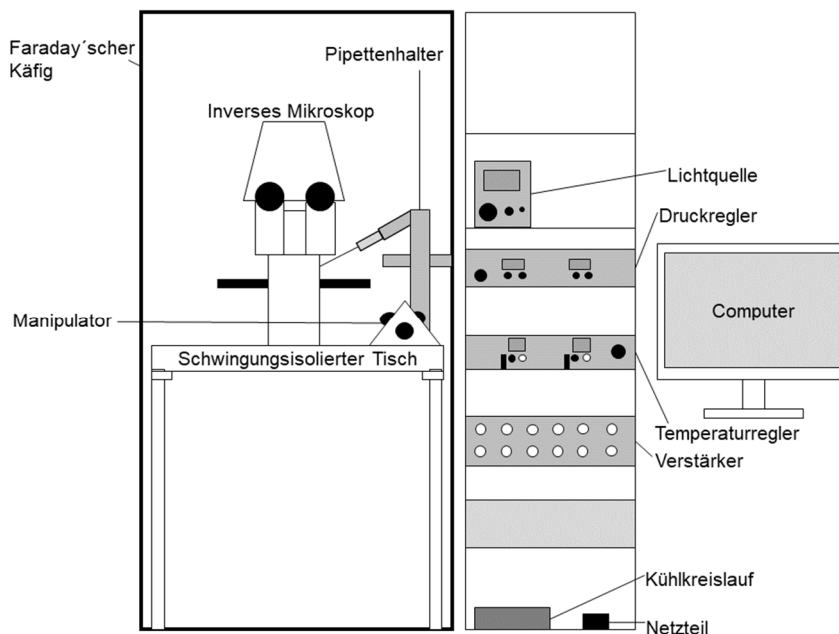


Abbildung 5. Aufbau des *Patch-Clamp*-Setups.

Der Verstärker ist die zentrale Komponente des Aufbaus. Er ist mit beiden Elektroden verbunden. Die gemessenen Signale werden in ein Spannungssignal umgewandelt und digitalisiert.

Die mit in Abschnitt 8.4. beschriebener Lösung befüllte Mikropipette wird über einen chlorierten Silberdraht gestülpt und am Pipettenhalter befestigt, welcher sich im ca. 45°-Winkel zum Objektisch befindet. Über- und Unterdruck können dann über einen Schlauch, welcher seitlich in den Pipettenhalter mündet, appliziert werden.

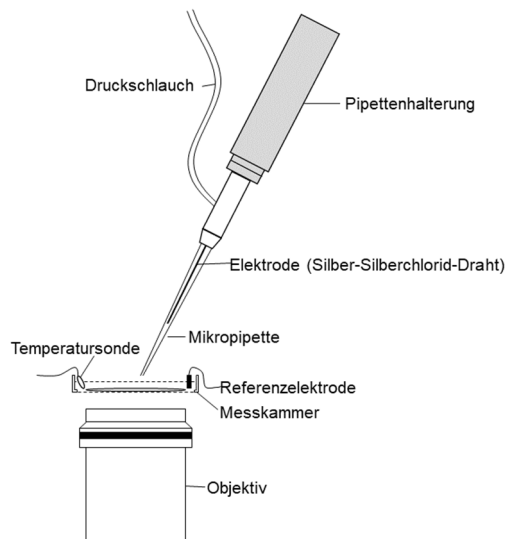


Abbildung 6. Aufbau von Messkammer und Elektrode.

Die Messkammer (Abbildung 6) liegt über dem Objektiv des Mikroskops. Sie ist mit Extrazellulärlösung gefüllt, in welcher sich zwei Messsonden befinden. Die Elektrode in der Badlösung stellt die erste dieser Sonden dar, die zweite Sonde ist ein Temperatursensor, mit welcher die Temperatur der Lösung gemessen werden kann. Über die temperierbare Messkammer können definierte Badtemperaturen eingestellt werden.

### 3.2.2. Herstellung der Mikropipetten

Die zur Messung verwendeten Mikropipetten wurden aus 1.5 x 1.8 x 100 mm Borosilikatglas hergestellt. Dazu wurde eine Glaskapillare in das Pipettenziehgerät eingespannt und durch ein eingestelltes dreistufiges Programm mit definierter Hitze und Zugspannung zu zwei identischen Mikropipetten ausgezogen (Details sind in Tabelle 4 aufgelistet). Die hergestellten Mikropipetten wiesen einen durchschnittlichen Öffnungsdurchmesser von 0.5  $\mu\text{m}$  auf, welcher mit Hilfe eines Lichtmikroskops überprüft wurde.

<b>Line</b>	<b>Heat</b>	<b>Pull</b>	<b>Velocity</b>	<b>Delay</b>	<b>Pressure</b>	<b>Ramp</b>
1 (x2)	573	0	27	1	500	571
2 (x1)	565	0	24	1		
3 (x1)	565	10	24	1		

**Tabelle 4. Einstellungen zur Herstellung der Glasmikropipetten bei einem Ramp-Wert von 571.**

Im Anschluss wurden die Spitzen der Mikropipetten mit RTV-Silikonkautschuk (vgl. Tabelle 5) überzogen. Dies dient der Verringerung der elektrischen Kapazität der Glaselektrode, welche zu Störungen in Form von erhöhtem Rauschen und schlechter Spannungskontrolle der untersuchten Zelle während der Messung führen kann.

Dafür wurden die Mikropipetten einzeln in eine Mikroschmiede eingespannt und die flüssige Silikongummiverbindung mithilfe eines Applikationshakens unter lichtmikroskopischer Kontrolle angebracht, ohne dabei die Öffnung der Spitze zu verschließen. Um das Silikongummi auszuhärten, wurde anschließend für einige Sekunden ein heißer Luftstrom auf die Spitze ausgerichtet.

<b>Benötigte Materialien:</b>	RTV 615 1 Lb-Kit Behälter Waage <i>Hot Plate Stirrer</i>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Substanz A und B im Verhältnis 10:1 abwiegen.</li> <li>2. Langsam auf 50 °C erhitzen und mischen, bis die entstandene Substanz beginnt, Blasen zu bilden.</li> <li>3. Entstandene Silikongummiverbindung zu je ca. 0.5 ml in 2 ml Gefäße abfüllen und bei -20 °C bis zur Verwendung lagern.</li> </ol>	

**Tabelle 5. Herstellung der Silikongummiverbindung zur Beschichtung der Spitzen der Glasmikropipetten.**

Vor jeder Messung wurden die Glasmikropipetten zusätzlich hitzepoliert, um das Erzielen einer dichten Zell-Pipetten-Verbindung im Gigaohm-Bereich (*Gigaseal*) zu ermöglichen. Dazu wurden die Mikropipetten erneut in die Mikroschmiede eingespannt und so ausgerichtet, dass sich die Spitze nur wenige Mikrometer entfernt von einem Heizdraht befand. Dieser Draht wurde dann für einige Sekunden erhitzt, wodurch die Ränder der Mikropipettenspitze glattpoliert wurden.

Unmittelbar vor der Verwendung als Messelektrode wurde die Mikropipette mit der Pipettenlösung befüllt. Dazu wurde zunächst die Spitze der Pipette in die Lösung eingebracht und dann Unterdruck appliziert, sodass Flüssigkeit in die Spitze gelangen konnte. Im Anschluss wurde unter Verwendung einer Kunststoffkanüle weitere Lösung in die Glasmikropipette gegeben, bis diese etwa zur Hälfte befüllt war. Um eventuell verbliebene Luftbläschen zu entfernen, wurde die Mikropipette vorsichtig geschwenkt und beklopft.

Die auf diese Weise hergestellten Messelektroden wiesen einen elektrischen Widerstand von etwa 3-4 M $\Omega$  auf.

### 3.2.3. Durchführung der Messung

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen mittels der *Patch-Clamp*-Technik erfassen zu können, wurde die 24-Well-Platte der gewählten Zelllinie zunächst lichtmikroskopisch auf ihre Eignung untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen in ihrem Zellverband vital aussahen und noch am Deckgläschen hafteten.

Anschließend wurde je ein Deckgläschen unter der Sterilwerkbank aus einer der Vertiefungen der Platte geholt und in die Messkammer, welche vorher mit 1 ml Badlösung gefüllt wurde, überführt.

Um eine geeignete Zelle für die Messung auszuwählen, wurde das gesamte Deckgläschen unter einem inversen Mikroskop betrachtet. Die zu analysierenden Zellen mussten definierte Kriterien aufweisen: Zum einen sollten sie möglichst isoliert liegen und dabei eine längliche bis rundlich-ovale Form aufweisen, zum anderen sollten mindestens zwei Fortsätze vorhanden sein, mit denen die Neurone in Kontakt mit benachbarten Zellen stehen konnten.

Durch Bestrahlung mit grünem Licht und Herunterregulieren der Durchlichtbeleuchtung wurde visuell überprüft, ob ein rotes Fluoreszieren der gewählten Zelle vorhanden war und dies dokumentiert.

Die verwendeten Pipetten- und Badlösungen wurden in ihrer Zusammensetzung den physiologischen Eigenschaften der Intra- und Extrazellulärflüssigkeit nachempfunden. Dazu wurden sie nach dem in Abschnitt 8.4. aufgeführten Schema hergestellt. Ein Aliquot der Pipettenlösung wurde während der kompletten Versuchszeit auf Eis gelagert.

Eine Mikropipette wurde mit Pipettenlösung bis zur Hälfte befüllt, über die AgCl-Elektrode gestülpt und im Pipettenhalter befestigt. Um einer Kontamination der Spitze der Glasmikropipette vorzubeugen, wurde ein leichter Überdruck angelegt, bevor die Mikropipette in die sich in der Messkammer befindende Badlösung eingetaucht wurde.

Nun wurde ein Testpuls im *Voltage-Clamp*-Modus appliziert, um die Etablierung eines *Gigaseals* zu überprüfen. Nach Eintauchen der Mikropipettenspitze in die Badlösung wurde die Signalantwort erkennbar.

Der vorher ausgewählten Zelle wurde sich vorsichtig genähert. Sobald die Spitze direkt neben der Zelle zu liegen kam, wurde der Spannungs-*Offset* zwischen Bad- und Pipettenlösung ermittelt und korrigiert.

Anschließend wurde der Zellkontakt durch direktes Ansteuern der Zelle etabliert. Der Kontakt wurde durch einen Abfall der Testpulsantwort deutlich, woraufhin der Überdruck in der Mikropipette durch einen leichten Unterdruck ersetzt wurde. Nach Etablieren eines *Seals* im G $\Omega$ -Bereich wurde eine weitgehend flache Stromantwort mit kapazitiven Artefakten am Anfang und Ende des Testpulses sichtbar. Diese Artefakte wurden durch die Kapazität der Elektrode hervorgerufen und durch Betätigen der Schalttaste Auto im Bereich *C-fast* durch den Verstärker kompensiert.

Um von der *attached-cell*-Konfiguration in die *whole-cell*-Konfiguration zu wechseln, wurde das Membranpotential zunächst auf  $-30$  mV gesetzt, um den *Patch* zu stabilisieren und eine plötzliche Depolarisation der Zelle nach dem Durchbrechen zu vermeiden. Anschließend wurden kurze, in der Intensität langsam kräftiger werdende Unterdruckpulse genutzt, um durch die Zellmembran zu brechen. Erneut traten kapazitive Stromspitzen zu Beginn und Ende des Testpulses auf, welche durch das Umladen der Membrankapazität hervorgerufen wurden. Die Geschwindigkeit, mit welcher sich die Membran auf- bzw. entladen kann, wird durch die Kapazität der Membran und den Serienwiderstand bestimmt. Um diese Parameter zu kompensieren, wurde die Schalttaste Auto im Bereich *C-slow* betätigt.

Das Membranpotential wurde langsam auf  $-70$  mV herabgesetzt. Besaßen die Zellen noch immer einen *Seal* im G $\Omega$ -Bereich und lag der unkompensierte Serienwiderstand unter  $20$  M $\Omega$ , wurde die Messung nach Kompensation des

Serienwiderstandes initiiert und die Messprotokolle ausgeführt. Alle Messungen erfolgten bei einer definierten Temperatur von  $20\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ .

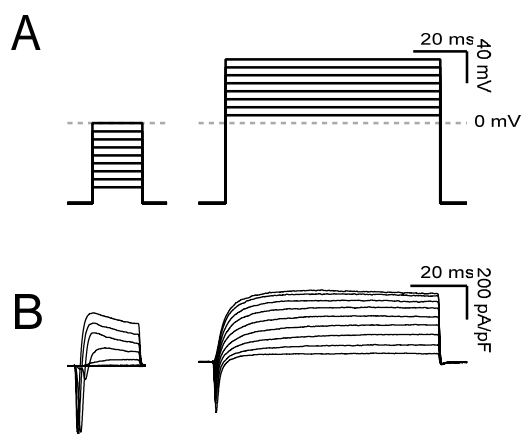
### 3.3. Protokolle

Im Folgenden werden die verschiedenen Messprotokolle im *Voltage-* und *Current-Clamp*-Modus beschrieben, welche von jeder Zelle aufgenommen wurden, die den zuvor genannten Kriterien entsprach. Die ersten beiden Protokolle wurden dabei im *Voltage-Clamp*-Modus durchgeführt, während für die letzten beiden Protokolle in den *Current-Clamp*-Modus gewechselt wurde. Dabei wurde die Software PATCHMASTER von HEKA Elektronik verwendet.

Durch das Zusammentreffen der Pipetten- und Badlösungen entsteht das sogenannte *Liquid Junction Potential* (LJP). Es tritt auf, wenn zwei Elektrolytlösungen unterschiedlicher Ionen-Zusammensetzung miteinander in Kontakt stehen. Die Ionen diffundieren von der Lösung mit hoher Konzentration in die Lösung mit niedrigerer Konzentration. Durch diesen Ionentransfer entsteht eine Potentialdifferenz, welche mit den hier verwendeten Lösungen  $-7$  mV beträgt. Dieses LJP wurde in den Protokollen berücksichtigt und alle Spannungsangaben um diesen Betrag nachträglich korrigiert.

#### 3.3.1. Messung spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle

Um die Stromantworten spannungsabhängiger Natrium- ( $N_{av}$ ) und Kaliumkanäle ( $K_v$ ) im *whole-cell*-Modus zu messen, wurde ein Doppelpulsprotokoll verwendet.



**Abbildung 7. Pulsprotokolle zur Messung spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle.** (A) Schematische Darstellung des verwendeten Messprotokolls. (B) Repräsentative Stromantwort eines TH<sup>+</sup>-Neurons der Wildtyplinie auf die in A dargestellten Testpulse.

Die Zellen wurden zunächst für 50 ms auf ein Membranpotential von  $-107$  mV gebracht und anschließend mit einer Serie von 20 ms-Pulsen in 10 mV-Schritten

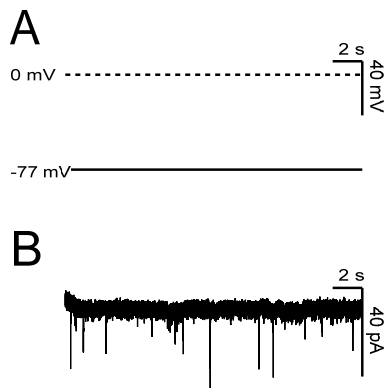
auf  $-80$  mV bis  $0$  mV depolarisiert, um  $\text{Nav}$ -spezifische Stromantworten zu messen.

Dem folgte eine  $40$  ms andauernde Erholungsphase bei  $-107$  mV, bevor eine zweite Serie von  $80$  ms-Testpulsen von  $0$  mV bis  $80$  mV in Schritten von  $10$  mV appliziert wurde, um  $\text{K}_V$ -abhängige Ströme zu messen.

In Abbildung 7 sind das verwendete Protokoll sowie die Stromantworten eines repräsentativen  $\text{TH}^+$ -Neurons der Wildtyplinie gezeigt.

### 3.3.2. Messung postsynaptischer Ströme

Um mögliche postsynaptische Ströme (PSCs) darstellen und messen zu können, wurden die Zellen auf ein Haltemembranpotential von  $-77$  mV geklemmt. Anschließend wurden die spontanen PSCs für mindestens  $20$  s aufgezeichnet.



**Abbildung 8. Messprotokoll zur Messung postsynaptischer Ströme.** (A) Schematische Darstellung des verwendeten Messprotokolls. (B) Repräsentative Stromantwort eines  $\text{TH}^+$ -Neurons der Wildtyplinie auf das in A dargestellte Protokoll.

### 3.3.3. Messung des Membranpotentials und der Spontanaktivität: Spontane Aktionspotentiale

Um das Ruhemembranpotential der Zellen zu ermitteln und mögliche spontane Oszillationen und Aktionspotentiale zu identifizieren, wurde die Zellaktivität für mindestens  $40$  s bis maximal  $200$  s aufgezeichnet, ohne dass Strom injiziert wurde.

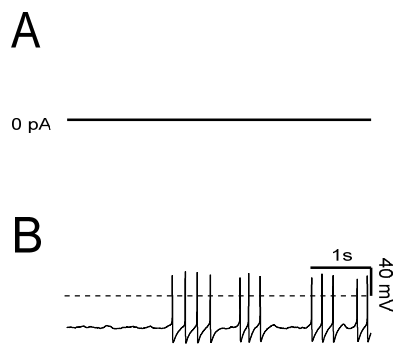


Abbildung 9. **Messung spontaner Aktionspotentiale.** (A) *Current-Clamp*-Protokoll ohne Strominjektion zur Messung spontan generierter Aktionspotentiale. (B) Repräsentative Antwort eines TH<sup>+</sup>-Neurons der Wildtyplinie auf das in A dargestellte Protokoll.

### 3.3.4. Evozierte Aktionspotentiale

Um Aktionspotentiale zu evozieren, wurden die Zellen zunächst auf ein Potential von  $-77$  mV geklemmt und anschließend Strompulse mit schrittweise ansteigender Stromstärke injiziert. Diese Pulse dauerten jeweils zwei Sekunden, die Stromstärke stieg von  $-40$  pA bis  $140$  pA in Schritten von  $20$  pA. Zwischen den Strompulsen wurde das Membranpotential auf das Haltepotential von  $-77$  mV geklemmt.

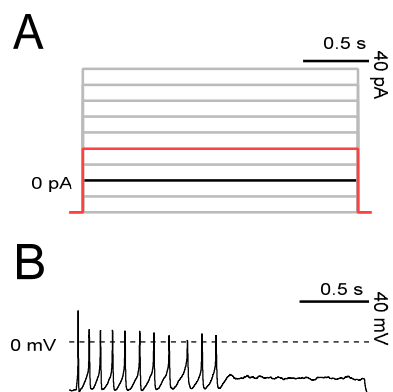


Abbildung 10. **Messprotokoll zur Messung evozierter Aktionspotentiale.** (A) Schematische Darstellung des verwendeten Messprotokolls zur Messung evozierter Aktionspotentiale. Rot dargestellt ist die Strominjektion von  $40$  pA, schwarz kennzeichnet  $0$  pA. (B) Repräsentative Antwort einer Zelle der Wildtyplinie auf eine Strominjektion von  $40$  pA.

### 3.4. Auswertung

Die Auswertung der Messungen erfolgte unter Verwendung der Programme HEKA Fitmaster, Microsoft Excel und WaveMetrics IGOR Pro 8. Dabei wurden die Daten stets in gleicher Weise analysiert und ausgewertet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics 21 bzw. 27 verwendet.

Die Zellen der verschiedenen Linien wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander verglichen. Diese Zeitpunkte umfassten jeweils zwei aufeinanderfolgende Wochen und reichten von Woche 4 nach Start der Differenzierung bis einschließlich Woche 9 (vgl. Abbildung 2).

#### 3.4.1. Einschlusskriterien

Es wurden nur Messungen berücksichtigt, die über den gesamten Messzeitraum eine stabile Abdichtung zwischen Zellmembran und Pipette aufwiesen (Seal im GΩ-Bereich). Zudem wurden Messungen mit einem unkompensierten Serienwiderstand von mehr als 20 MΩ nicht berücksichtigt.

#### 3.4.2. Bestimmung der Stromdichten der spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle

Die Membrankapazität ist ein Maß für die Membranfläche, also für die Größe einer Zelle mit ihren Verzweigungen. Um Zellen unterschiedlicher Größe und Morphologie in Bezug auf ihre Zusammensetzung von spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanälen in der Zellmembran miteinander vergleichen zu können, wurden die Stromamplituden auf die Kapazität der Membran normiert.

Durch Auftragen der Maximalstromdichten gegen die dazugehörigen Spannungen wurden Stromdichte-Spannungs-Kurven erstellt. Sie geben Aufschluss über die spannungsabhängige Aktivierung der zugrundeliegenden Nav- und Kv-Kanäle.

#### 3.4.3. Auswertung postsynaptischer Ströme

Die postsynaptischen Ströme wurden mittels eines in Igor Pro 8 erstellten Makros identifiziert und analysiert. Die Daten wurden mit 1 kHz gefiltert und die erste Ableitung berechnet. Als objektives Detektionskriterium diente ein Schwellenwert von  $-5$  Standardabweichungen. Automatisch detektierte Ereignisse wurden anschließend visuell verifiziert, um Fehldetektionen auszuschließen.

Die Analyse detektierter PSCs umfasste Anzahl und Amplitude der Ereignisse.

#### 3.4.4. Auswertung der spontanen Aktivität

Zu Beginn dieses Protokolls wurde der Messmodus von *Voltage-* auf *Current-Clamp*-Modus umgeschaltet. Dadurch wird kein Ruhemembranpotential mehr vorgegeben und die Zelle kann ihr natives Ruhemembranpotential ausbilden. Analysiert wurden Aktionspotentiale im Zeitraum von 5 s - 35 s nach Umschalten in den *Current-Clamp*-Modus; die Detektionsschwelle für Aktionspotentiale betrug  $-20$  mV.

Die Aktionspotentiale wurden hinsichtlich der Schwellenspannung, bei der erstmals ein AP spontan auftrat, sowie der Peak-Spannung analysiert. Die Datenanalyse erfolgte mithilfe eines Makros in Igor Pro 8.

#### 3.4.5. Auswertung der Aktivität unter Strominjektion

Evozierte Aktionspotentiale wurden in gleicher Weise analysiert wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben. Für das erste evozierte Aktionspotential wurden zusätzlich die Amplitude und die zugehörige Stimulationsstromstärke ermittelt.

Die Reaktion der Zelle auf die erste Strominjektion von  $-40$  pA wurde zusätzlich auf einen Membranspannungsabfall innerhalb der ersten Millisekunden nach Start der Strominjektion (sog. *sag*) analysiert. Dazu wurde das Minimum der ersten 500 ms mit dem Mittelwert des Membranpotentials der letzten 200 ms der aufgezeichneten Stromspur verglichen.

### 3.5. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler berechnet und dargestellt.

Mittels der statistischen Analysesoftware IBM SPSS Statistics wurde für unabhängige Stichproben der Mann-Whitney-U-Test angewandt, für relative Anteile wurde der exakte Test nach Fisher verwendet.

Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Signifikante Unterschiede zwischen TH<sup>+</sup>- und TH<sup>-</sup>-Zellen innerhalb einer Zelllinie wurden mit [\*] markiert. Um die zeitliche Entwicklung einzelner Parameter zu beurteilen, wurden die Daten des ersten und dritten Messzeitraums miteinander verglichen und entsprechende signifikante Unterschiede mit [x] markiert. Unterschiede zwischen verschiedenen Linien wurden mit [#] gekennzeichnet. Der Alpha-Fehler wurde nicht korrigiert. Aufgrund der in dieser Arbeit vorgenommenen Mehrfachvergleiche sind die inferenzstatistischen Auswertungen lediglich deskriptiv zu werten (4).

## 4. Ergebnisse

Um die Auswirkungen kombiniert-heterozygoter Mutationen im Parkinson-assoziierten Parkin-Gen auf die elektrische Aktivität von SnPc-Neuronen zu analysieren, wurden iPSC-abgeleitete dopaminerge Mischkulturen verwendet, die aus Spendermaterial von an Parkinson erkrankten Mutationsträgern und von gesunden Probanden hergestellt wurden. Diese Kulturen basieren auf Zelllinien, welche wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben modifiziert wurden.

Die Messungen mit der *Patch-Clamp*-Technik wurden für jede Zelllinie über einen Zeitraum von sechs Wochen nach Start der neuronalen Differenzierung durchgeführt. Um der hohen Variabilität innerhalb der Kulturen Rechnung zu tragen und um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden Messungen aus je zwei aufeinanderfolgenden Wochen zu einem Analysezeitpunkt zusammengefasst (siehe Abbildung 2).

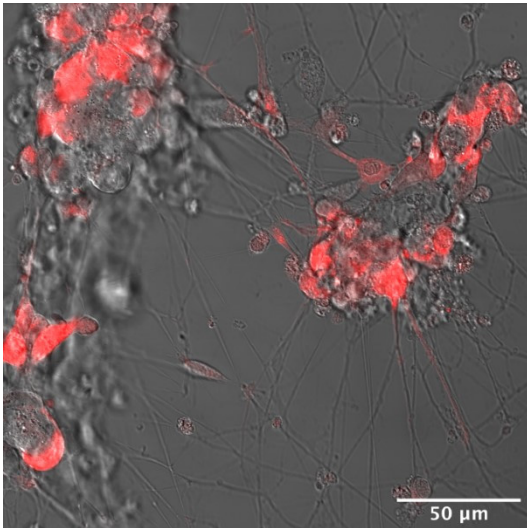
Der Fokus lag auf dem Vergleich der funktionellen Eigenschaften gesunder Neurone („Wildtyp“) mit denen von erkrankten Mutationsträgern. Hierfür wurde die Entwicklung der elektrophysiologischen Eigenschaften über die Differenzierungs- und Untersuchungsdauer betrachtet. In jeder Linie wurde zwischen TH<sup>+</sup>- und TH<sup>-</sup>-Zellen unterschieden, um potenzielle Unterschiede zwischen den beiden Subpopulationen und möglicherweise vorhandene Subtyp-spezifische Effekte der Mutationen zu identifizieren.

Neben der funktionellen Kanalexpression von Nav- und Kv-Kanälen, welche vonnöten ist, damit Neurone Aktionspotentiale bilden und Informationen weiterleiten können, wurde auch die Ausbildung von Netzwerken untersucht. *In vivo* werden diese benötigt, um Informationen zwischen Neuronen zu übertragen.

Zu Beginn jeder Messung wurde die zu analysierende Zelle lichtmikroskopisch begutachtet. Deshalb soll zunächst auf die morphologischen Eigenschaften der verschiedenen Zelllinien eingegangen werden.

#### 4.1. Qualitative Beschreibung der Zellmorphologie

Die Zellkulturen stammen von Fibroblasten gesunder Probanden bzw. an Parkinson-erkrankter Patienten ab. In Zellkulturen stellen sich Fibroblasten als längliche Zellen mit nur wenigen, kurzen Zellausläufern und in meist gleichmäßiger Verteilung dar. Vor der Differenzierung zu neuronalen Zellen erfolgte die Reprogrammierung der Fibroblasten zu Stammzellen, welche sich in der Zellkultur als rundliche Zellen mit einer homogenen Zellverteilung zeigen.



**Abbildung 11. Repräsentative Darstellung der *mCherry*-Fluoreszenz von TH<sup>+</sup>-iPS-Zellen bei Anregung mit grünem Licht.** Aufgrund der wenigen verfügbaren Zellen wurden keine eigenen Aufnahmen gemacht, weshalb dieses Bild eine vergleichbare iPSC-abgeleitete Reporterkultur zeigt. Das Bild wurde freundlicherweise vom Institut für Neurogenetik zur Verfügung gestellt.

Die Verteilung von TH<sup>+</sup>- und TH<sup>-</sup>-Zellen wird in Abbildung 11 beispielhaft an Zellen eines gesunden Kontrollprobanden dargestellt. Die abgebildete Zelllinie stellt ausdifferenzierte Neurone dar, welche wie die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit einem Reportersystem zur Erkennung von TH ausgestattet wurden.

Die Zellen wiesen eine neuronale Morphologie auf. Sie stellten sich rundlich-oval dar, wiesen lange, weitverzweigte Ausläufer auf und formten Zellcluster. Der Anteil der nicht-dopaminergen TH<sup>-</sup>-Zellen war visuell deutlich höher als der Anteil der dopaminergen TH<sup>+</sup>-Zellen.

Besonders stark fluoreszierenden Zellen waren vornehmlich in Clustern zu finden und besaßen viele Ausläufer. Nicht immer waren die einzelnen Zellen in den Clustern deutlich voneinander abzugrenzen, weshalb hauptsächlich die zuäußerst liegenden Zellen für Messungen verwendet wurden. Es konnten auch außerhalb

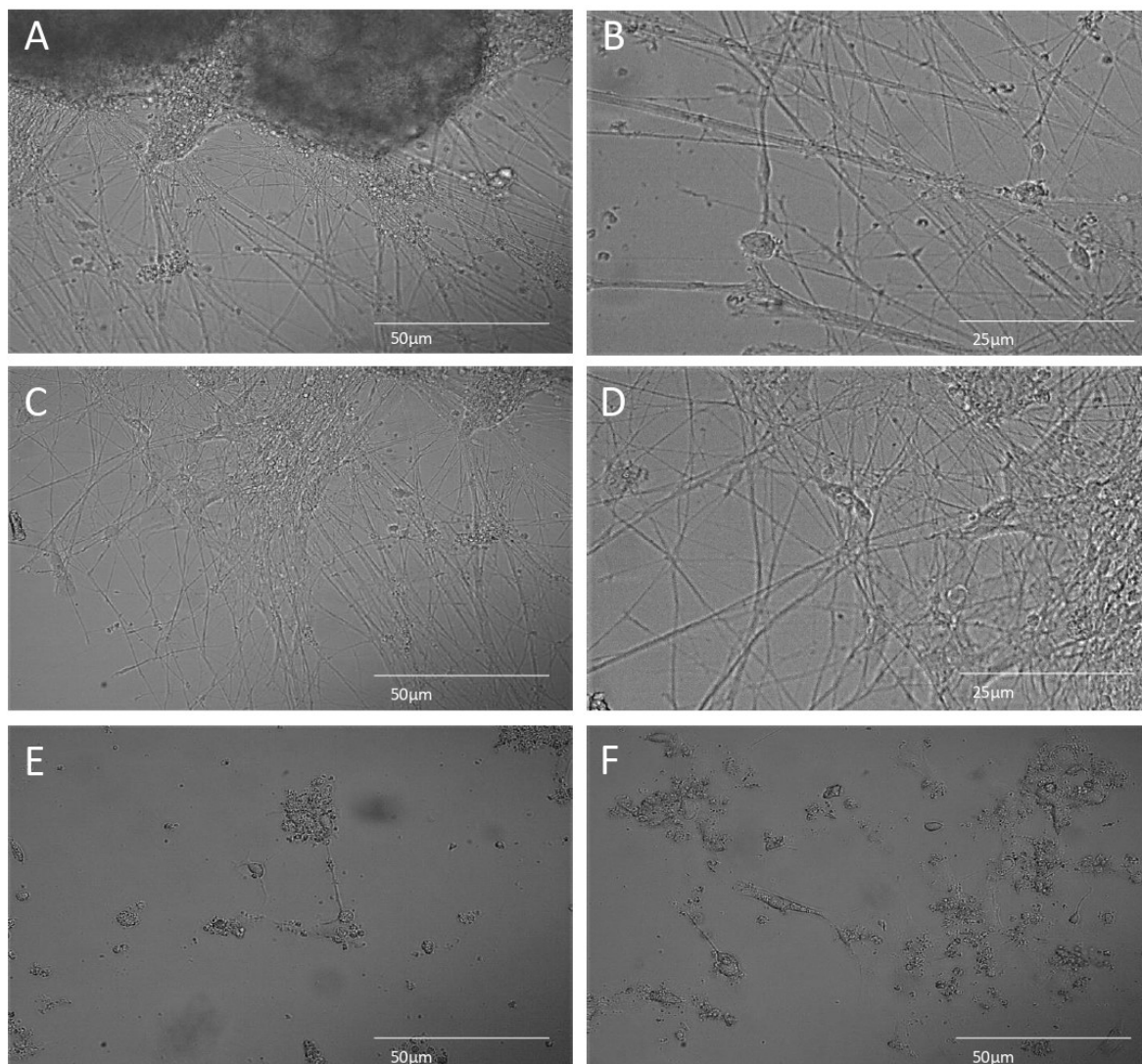
der Cluster vereinzelt fluoreszierende Zellen identifiziert werden, deren Fluoreszenzsignal jedoch deutlich schwächer war.

Die Zellen der Wildtyplinie 084 und die der Linie 818 ähnelten bereits zu Beginn des Messzeitraumes sehr den in Abbildung 11 dargestellten Zellen. In beiden Linien wiesen die Zellen eine neuronale Morphologie auf. Die Cluster, welche in ihrer Ausprägung bei den Zellen der Wildtyplinie initial stärker ausgeprägt waren als bei der Linie 818, nahmen im Verlaufe der Differenzierung an Größe und Anzahl zu. Auch kam es bei beiden Linien zu einem starken Zuwachs an Zellfortsätzen, was den neuronalen Charakter der Kulturen unterstreicht und auf die Ausbildung von Netzwerken hinweist.

Während fluoreszierende Zellen in der Wildtypkultur bereits zu Beginn der Messungen sichtbar waren, konnte man diese bei der Linie 818 erst sieben Tage nach Start der Messungen, d.h. ab dem 29. Tag nach Start der Differenzierung beobachten. Eine quantitative Auszählung war mit den verfügbaren Mitteln am *Patch-Clamp*-Setup nicht möglich.

Die Zellen der Linie 821 wiesen vor allem zu Beginn der Differenzierungsphase ein nur wenig neuronal differenziertes Aussehen auf. Die einzelnen Zellen stellten sich rundlich und nur vereinzelt mit Ausläufern dar, zumeist waren sie avital verändert (siehe auch Abbildung 12). Ab dem zweiten Analysezeitpunkt (Tag 39 der Differenzierung, siehe Abbildung 2) ähnelten viele der Zellen in ihrem Äußeren sehr denen des ersten Zeitpunktes. Nur wenige Zellen entwickelten ein neuronales Aussehen, die Mehrheit behielt die rundliche, nicht-neuronale Morphologie bei. Ab der achten Woche nach Beginn der Differenzierung veränderte sich die Morphologie der Zellen dieser Mutationslinie deutlich: Die Zellen nahmen eine mehr und mehr neuronale Morphologie an, charakterisiert durch ein längliches Aussehen der Zellkörper, einige sehr lange Fortsätze und kleine Cluster.

Der Anteil der TH<sup>+</sup>-Zellen in dieser Linie war sehr gering. Fluoreszierende Zellen waren nur vereinzelt sichtbar, mehrere Deckgläschen enthielten keinerlei TH<sup>+</sup>-Zellen.



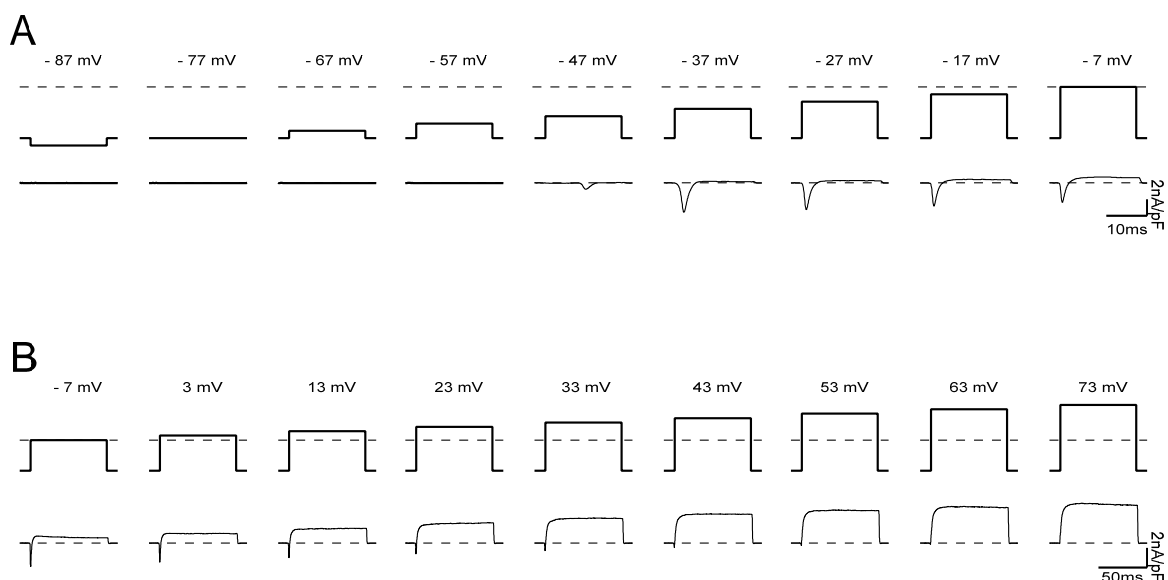
**Abbildung 12. Lichtmikroskopische Aufnahmen: Neuronale Morphologie der verwendeten Zelllinien.** (A) Übersichtsbild (20-fache Vergrößerung) der Wildtypzelllinie mit dreidimensionalen Zellclustern. (B) Eine höhere Vergrößerung (40-fach) zeigt einzelne Somata in der Peripherie. Zum Zeitpunkt 2, d.h. 6-7 Wochen nach Start der Differenzierung wiesen die Zellen eine neuronale Morphologie auf. Die Somata waren länglich-oval und entwickelten Neuriten, die Netzwerke bildeten. (C, D) Aufnahmen der Zelllinie 818 wie in A und B. (E, F) Aufnahmen der Mutationslinie 821. In (E) zeigen sich vereinzelt Somata ohne Zellcluster. Die Differenzierung dieser Zelllinie wurde von einem ausgeprägten Zellsterben begleitet. Es sind keine neuronal differenzierten Zellen zu erkennen. (F) Zum Zeitpunkt 3, d.h. 8-9 Wochen nach dem Start der Differenzierung, ist bei einzelnen Zellen eine neuronale Morphologie zu erahnen.

## 4.2. Elektrophysiologische Eigenschaften der drei Zelllinien

### 4.2.1. Funktionelle Analyse spannungsabhängiger Ionenkanäle

Spannungsabhängige Natrium- und Kalium-Kanäle sind wichtig für Neurone, da sie eine elementare Rolle in der Entstehung und Fortleitung von Aktionspotentialen spielen (siehe Abschnitt 3.2.1.).

Nav- und Kv-vermittelte Ionenströme wurden im *Voltage-Clamp*-Modus mithilfe eines Doppelpulsprotokolls aus zwei aufeinanderfolgenden Testpulsserien analysiert. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-107$  mV wurde eine erste Serie von 20 ms Pulsen mit Spannungen von  $-87$  mV bis  $-7$  mV in 10 mV Schritten appliziert, gefolgt von einer 40 ms dauernden Erholungsphase bei  $-107$  mV. Daran anschließend folgte eine zweite Pulsserie von 80 ms-dauernden Pulsen mit Spannungen von  $-7$  mV bis  $+73$  mV (vgl. Abbildung 7).



**Abbildung 13. Charakteristisches Schaltverhalten der Nav- und Kv-Kanäle.** (A) Kurze Spannungspulse (oben) zwischen  $-47$  mV und  $-17$  mV triggerten vorwiegend transiente Einwärtsströme (unten), wie sie für Nav-Kanäle typisch sind. (B) Ab einer Spannung von etwa  $-7$  mV (oben) aktivierten zusätzlich Kv-Kanäle (unten), welche einen nicht-inaktivierenden Auswärtsstrom generierten.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, bewirkte der erste Teil des Doppelpulses ab einer Spannung von durchschnittlich  $-47$  mV einen schnell aktivierenden Einwärtsstrom. Der maximale Einwärtsstrom wurde bei  $-37$  mV erreicht und fiel mit weiter zunehmender Testpulsspannung wieder ab. Diese Spannungsabhängigkeit der Stromamplituden ist typisch für Nav-Kanäle und ist im Anhang in Abschnitt 8.1. für

alle untersuchten Linien dargestellt. Aufgrund der in Abschnitt 3.2.1. beschriebenen physiologischen Verhältnisse ist dieser Ionenstrom als Einstrom von Natriumionen in die Zelle zu werten. Die spannungsabhängigen Natriumkanäle werden durch eine Änderung des Membranpotentials geöffnet und kurz darauf bei anhaltender Depolarisation inaktiviert. Erst eine Repolarisation der Zelle führt zur erneuten Aktivierbarkeit der Kanäle.

Der zweite Testpuls diente zur Aktivierung von  $K_V$ -Kanälen. Während bei niedrigen Spannungen lediglich  $Na_V$ -vermittelte Ströme zu sehen waren, wurden ab etwa  $-7$  mV zusätzlich  $K_V$ -assoziierte Ströme gemessen. Diese zeigten sich als ein langsamer auswärtsgerichteter Strom, welcher mit positiver werdender Testpulsspannung größer wurde und keine nennenswerte Inaktivierung aufwies. Wie in Abschnitt 3.2.1. beschrieben ist dieses Verhalten kompatibel mit dem spannungsabhängiger Kaliumkanäle.

Mittels der aufgezeichneten Stromamplituden und der ermittelten Membrankapazität war es möglich, indirekt auf die Level der in der Zellmembran vorhandenen Ionenkanäle rückzuschließen. Dazu wurden die Stromantworten der Spannungspulse analysiert, welche die Zelle auf  $-27$  mV bzw. auf  $73$  mV depolarisierten. Der Spannungswert von  $-27$  mV wurden gewählt, da bei dieser Spannung zwar  $Na_V$ -Kanäle, jedoch nahezu keine  $K_V$ -Kanäle aktiv sind. Das Umkehrpotential für Natrium liegt bei den gegebenen Bedingungen rechnerisch bei  $68,4$  mV, weswegen der Puls bei  $73$  mV gewählt wurde, um  $K_V$ -vermittelte Stromantworten ohne  $Na_V$ -Einflüsse zu analysieren.

Um den Vergleich unterschiedlich großer Zellen möglich zu machen, wurden die Stromamplituden auf die Membrankapazität der Zelle normiert, woraus Stromdichten resultierten.

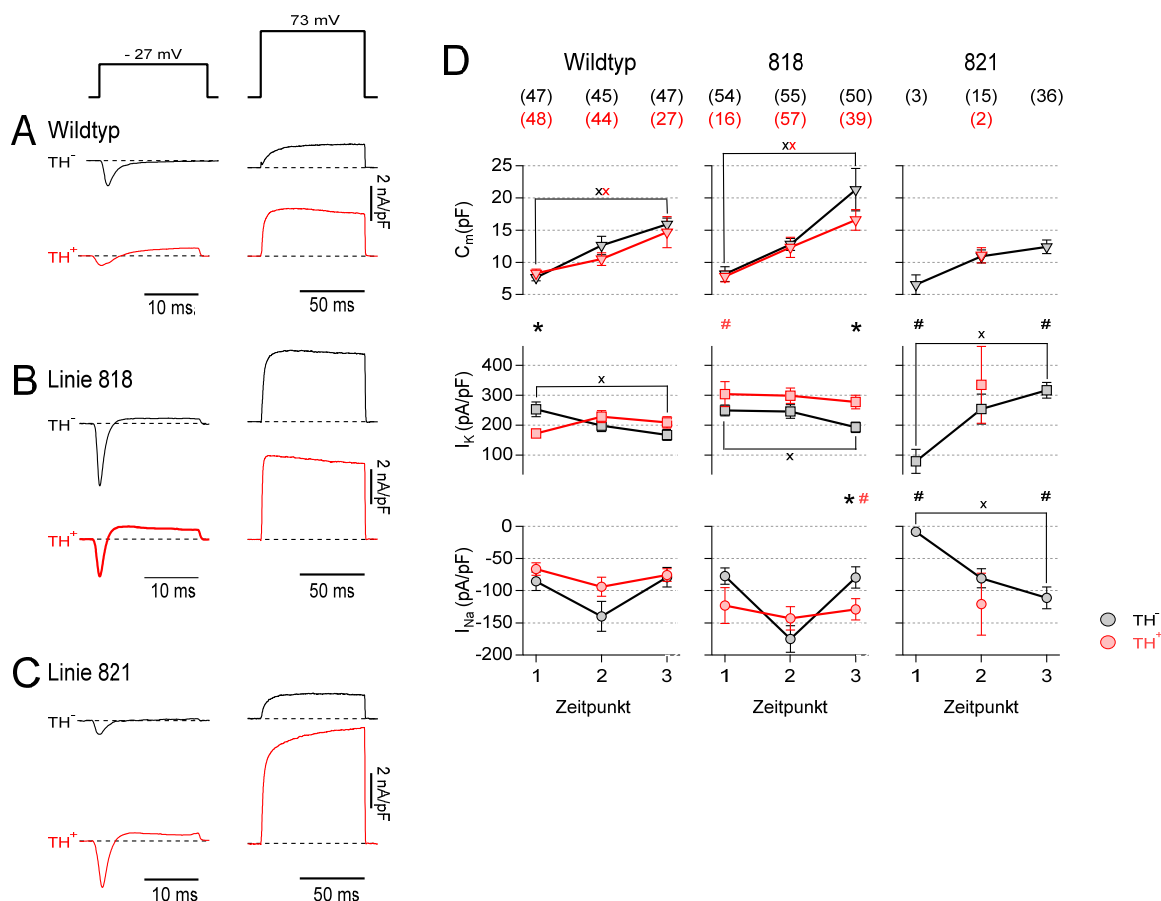
Die beschriebenen Parameter werden im Folgenden als Funktion der Differenzierungsdauer und TH-Expression dargestellt. Alle drei Zelllinien generierten sowohl  $K_V$ - als auch  $Na_V$ -vermittelte Ströme. Im Verlauf der Differenzierung entwickelten sich bei den einzelnen Linien jedoch abhängig von der TH-Expression unterschiedliche Trends, was in Abbildung 14 dargestellt ist.

Die Wildtyplinie und die Mutationslinie 818 nahmen eine ähnliche Entwicklung: Die Natriumstromdichte war zum Zeitpunkt 2 sowohl bei den  $TH^+$ - als auch bei den  $TH^-$ -Zellen am höchsten und näherte sich am dritten Zeitpunkt dem Ausgangswert

an; es fand somit eine transiente Änderung statt. Während die TH<sup>+</sup>-Zellen der Linie 818 schon von Beginn an etwas mehr Natriumströme aufwiesen als jene des Wildtyps, wurde dieser Unterschied erst zum dritten Zeitpunkt signifikant, an welchem auch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zellreihen dieser Mutationslinie vorlag.

Die Kaliumstromdichte zeigte sich bei den TH<sup>-</sup>-Zellen des Wildtyps sowie bei beiden Zellreihen der Mutationslinie 818 rückläufig, wobei die TH<sup>+</sup>-Zellen der Linie 818 zu jedem Zeitpunkt eine höhere Kaliumstromdichte aufweisen als die Zellen des Wildtyps. Dieser Unterschied ist zum Zeitpunkt 3 statistisch signifikant. Bei den Wildtypzellen zeigten die TH<sup>+</sup>-Zellen zu Beginn der Messungen eine signifikant geringere Stromdichte als die TH<sup>-</sup>-Zellen ( $172 \pm 1,3$  pA/pF im Vergleich zu  $253 \pm 2,5$  pA/pF). Im zeitlichen Verlauf hob sich dieser Unterschied wieder auf und die TH<sup>+</sup>-Zellen wiesen etwas größere Stromdichten auf, welche sich jedoch nicht signifikant von den TH<sup>-</sup>-Zellen unterschieden.

Die Zellen der Mutationslinie 821 sind aufgrund der verzögerten morphologischen Entwicklung und deutlich geringeren Messungen nicht direkt mit den anderen Zelllinien vergleichbar. Zu Beginn waren kaum messbare Level von Na<sub>v</sub>- bzw. K<sub>v</sub>-Kanälen vorhanden, welche im Verlauf der Differenzierung anstiegen. Am dritten Zeitpunkt konnten im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere Natrium- und Kaliumströme bei den TH<sup>-</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Die gemessenen Stromdichten der TH<sup>+</sup>-Zellen dieser Mutationslinie sind aufgrund einer geringen Zellzahl nicht aussagekräftig, gleichen jedoch qualitativ denen der TH<sup>+</sup>-Zellen der Mutationslinie 818.



**Abbildung 14. Aktivität spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle.** (A-C) Repräsentative Stromantworten der iPSC-abgeleiteten TH<sup>-</sup>- und TH<sup>+</sup>-Neurone der untersuchten Zelllinien auf Testspannungen von -27 mV und 73 mV zum Zeitpunkt 2. (D) Durchschnittliche Membrankapazität (oben) sowie K<sub>V</sub>- (Mitte) und Na<sub>V</sub>-assoziierte (unten) Stromdichten der TH<sup>-</sup>- und TH<sup>+</sup>-iPSC-abgeleiteten Neurone zu verschiedenen Zeitpunkten nach Start der neuronalen Differenzierung. Die Daten wurden aus Experimenten wie in A-C gezeigt erhoben. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte, verbunden mit durchgezogenen Linien. Die Anzahlen experimenteller Replikate sind in Klammern angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen TH<sup>-</sup>- und TH<sup>+</sup>-Zellen innerhalb einer Linie wurden mit \*, zwischen Zeitpunkt 1 und 3 mit x und zwischen der Wildtyplinie und den Linien 818 sowie 821 mit # markiert. Für die Signifikanzniveaus gilt: \*/#/x P < 0,05.

Um die Größe der Zellen abschätzen zu können, wurde der Parameter der Membrankapazität C<sub>m</sub> herangezogen, über welchen indirekt auf die Größe der Membranfläche geschlossen werden kann. Es ist jedoch die Tatsache zu berücksichtigen, dass die Größe einer Zelle auch durch die Anzahl und Länge ihrer Fortsätze bestimmt wird und deren Membrananteile nur zum Teil in diesen Parameter einfließen. Aus diesem Grund sind mit der Membrankapazität C<sub>m</sub> nur grobe Trends in Bezug auf die Zellgröße zu erfassen.

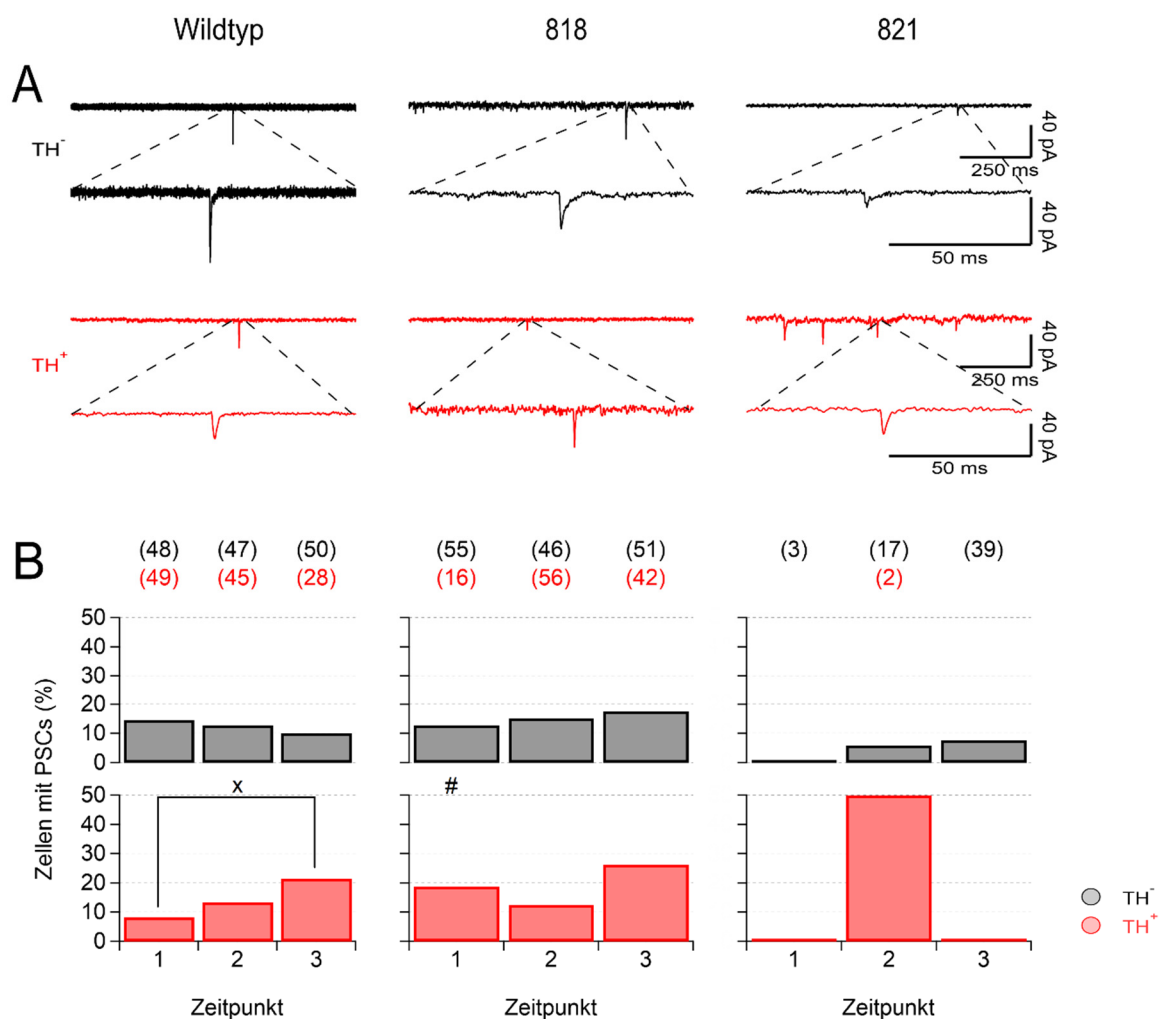
Über den Beobachtungszeitraum war die Membrankapazität der Zellen aller drei Linien stetig ansteigend; die Zellen der Linie 821 waren jedoch zu jedem Zeitpunkt etwas kleiner als die der anderen Zelllinien. Die ansteigende Membrankapazität ist als Hinweis auf eine zunehmende Zellgröße und die Ausbildung von Zellausläufern zu verstehen und typisch für eine sich entwickelnde Kultur. Die Wildtyplinie und die Linie 818 zeigten beide eine signifikante Entwicklung von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 3. Eine beobachtete Entwicklung bei den Zellen der Linie 821 beschränkte sich auf die TH-Zellen, war jedoch nicht statistisch signifikant und kann aus den bereits genannten Gründen lediglich einen groben Trend angeben.

Bezüglich der Aktivität spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle ähnelten sich die Wildtyplinie und die Mutationsträgerlinie 818 stark und wiesen nur wenige Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Parameter auf. Die Mutationslinie 821 verhielt sich hingegen anders: Wie bereits in Abschnitt 4.1. beschrieben lagen nur vereinzelt TH<sup>+</sup>-Neurone vor und die neuronale Entwicklung schien im Vergleich zu den anderen beiden Linien deutlich verlangsamt oder unvollständig zu sein.

#### 4.2.2. Postsynaptische Ströme als Indikator neuronaler Vernetzung

Die synaptischen Verschaltungen zwischen einzelnen Neuronen dienen der Kommunikation der Zellen untereinander. Als Hinweis darauf können spontane, relativ kleine, an der Membran der postsynaptischen Zelle auftretende Ströme gewertet werden (sogenannte postsynaptische Ströme). Diese wurden ebenfalls im *Voltage-Clamp*-Modus aufgezeichnet und geben einen Hinweis auf die Netzwerkaktivität der iPS-Neurone.

Um spontane postsynaptische Ströme zu messen, wurden die Zellen auf ein Membranpotential von  $-77$  mV geklemmt (vgl. Abbildung 8). Stimulationspulse wurden nicht appliziert.



**Abbildung 15. Postsynaptische Ströme der verschiedenen Zelllinien.** (A) Repräsentative PSCs der verschiedenen Zelllinien bei einem Haltepotential von  $-77$  mV zum Zeitpunkt 2. Im oberen Teil sind die spontanen Ströme der Zellen über eine Messdauer von 1 s dargestellt, im unteren Teil sind repräsentative PSCs in höherer zeitlicher Auflösung abgebildet. (B) Zeitliche Entwicklung des prozentualen Anteils der PSC-ausbildenden Zellen, bezogen auf die Gesamtanzahl analysierter Zellen. Die Daten wurden aus Messungen wie in A gezeigt erhoben. Die Anzahlen experimenteller Replikate sind in Klammern angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen TH<sup>-</sup>- und TH<sup>+</sup>-Zellen innerhalb einer Linie wurden mit \*, zwischen Zeitpunkt 1 und 3 mit x und zwischen Wildtyplinie und den Linien 818 sowie 821 mit # markiert. Für die Signifikanzniveaus gilt: \*/#/x  $P < 0,05$ .

Die Gesamtanzahl der PSC-ausbildenden Zellen stieg bei den TH<sup>+</sup>- Zellen der Wildtyplinie und der Linie 818 über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg an, verlief jedoch nur bei den Zellen des Wildtyps signifikant. Bei den Zellen der Linie 818 traten etwas häufiger PSCs auf, was jedoch nur am ersten Untersuchungszeitpunkt statistisch signifikant war (vgl. Abbildung 15).

Nur wenige Zellen der Linie 821 wiesen PSCs auf. Die TH<sup>-</sup>-Zellen zeigten tendenziell seltener PSCs als die Zellen der Wildtyplinie, jedoch war dieser Trend

nicht statistisch signifikant. Aufgrund von nur zwei erfolgreichen Messungen war eine valide Aussage zur Häufigkeit von PSCs in der TH<sup>+</sup>-Subpopulation dieser Linie nicht möglich.

Aus weiterführenden Analysen der PSCs lassen sich keine verlässlichen Aussagen ableiten, da jeweils nur wenige Messungen durchgeführt werden konnten, welche zudem eine hohe Variabilität aufwiesen. Eine Analyse des Spannungspeaks, Anzahl der spontan auftretenden postsynaptischen Ströme pro Zelle pro Linie sowie *onset* und *decay* der PSCs (Zeit, die ein postsynaptischer Strom benötigte, um von der Ausgangsspannung ausgehend zu fallen bzw. zu steigen) ist graphisch dargestellt im Anhang in Abschnitt 8.1. zu finden.

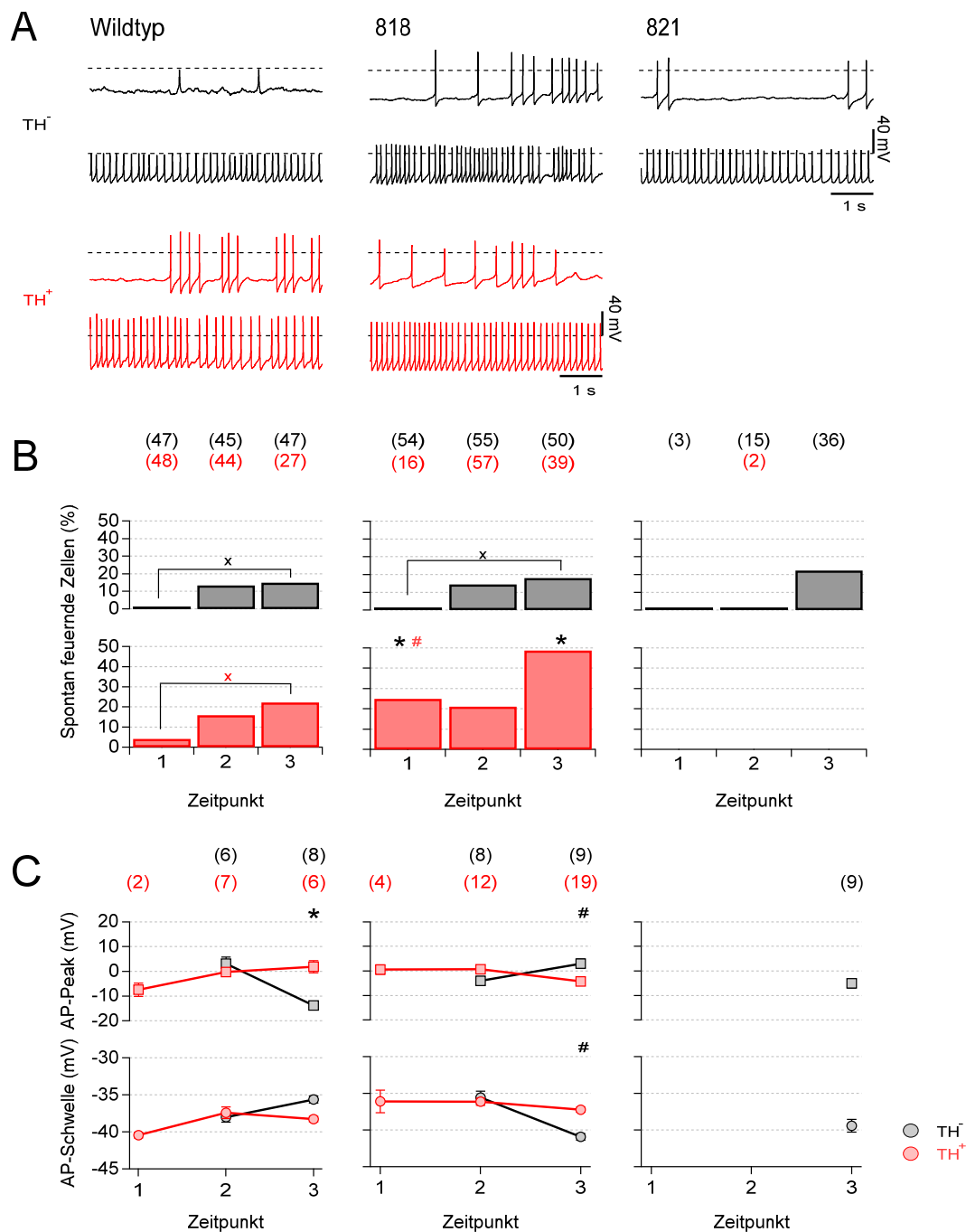
#### 4.2.3. Spontane Aktionspotentiale

Eine charakteristische Eigenschaft dopaminergener Neurone *in vivo* ist das Ausbilden spontaner Aktionspotentiale. Diese Fähigkeit wurde im *Current-Clamp*-Modus untersucht.

Alle Aktionspotentiale, welche die in Abschnitt 3.4.4. erläuterten Kriterien erfüllten, gingen in die Analyse ein. Dabei feuerten manche Zellen nur ein Aktionspotential, während andere mehrere aufeinanderfolgende APs oder kontinuierlich feuerten. Zwischen den einzelnen Linien und Subpopulationen gab es hinsichtlich der Feuercharakteristik keine klaren Trends.

Der Anteil der Zellen, welche spontan Aktionspotentiale feuerten, wurde im Verlauf der Differenzierung (wie in Abbildung 16 dargestellt) sowohl bei den Zellen der Wildtyplinie als auch bei den Zellen der Mutationslinie 818 größer. Die TH<sup>+</sup>-Zellen beider Linien waren zu allen Zeitpunkten aktiver als die TH<sup>-</sup>-Zellen.

Die TH<sup>+</sup>-Zellen der Linie 818 unterschieden sich bezüglich ihres spontanen Feuerverhaltens am ersten Zeitpunkt signifikant von den TH<sup>+</sup>-Zellen der Wildtyplinie, welche seltener Aktionspotentiale ausbildeten. Bei den TH<sup>-</sup>-Zellen der Linie 818 fiel auf, dass diese zu diesem Zeitpunkt noch keine spontanen Aktionspotentiale ausbildeten. Diese Tatsache war auch bei den Zellen der Wildtyplinie zu beobachten.



**Abbildung 16. Spontanaktivität in iPSC-abgeleiteten dopaminergen Kulturen.** (A) Repräsentative Aufzeichnung von Aktionspotentialmessungen der drei Linien zum Zeitpunkt 2. Die gestrichelte Linie markiert 0 mV. Pro Zelllinie sind exemplarisch je zwei Messungen von TH<sup>-</sup>- und TH<sup>+</sup>- Zellen dargestellt. (B) Zeitliche Entwicklung des prozentualen Anteils spontan feuernder Zellen an der Gesamtanzahl gemessener Zellen. (C) Die Aktionspotentiale wurden hinsichtlich der Schwellenwertspannung untersucht. Zusätzlich wurde der durchschnittliche Peak der Aktionspotentiale ermittelt. Die Daten wurden aus Messungen wie in A gezeigt erhoben. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte, verbunden mit durchgezogenen Linien. Die Anzahlen unabhängiger Messungen sind für B und C in Klammern angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen TH<sup>-</sup>- und TH<sup>+</sup>-Zellen innerhalb einer Linie wurden mit \*, zwischen Zeitpunkt 1 und 3 mit x und zwischen Wildtyplinie und den Linien 818 sowie 821 mit # markiert. Für die Signifikanzniveaus gilt: \*/#/x  $P < 0,05$ .

Bezüglich des Peaks und der Schwellenspannung der Aktionspotentiale unterschieden sich die beiden Zellarten der Wildtyplinie und der Linie 818 nicht signifikant. Auffallend war jedoch, dass je höher der Anteil der feuernden Zellen war, desto weniger negativ, also höher waren auch die Spannungsschwelle und der Aktionspotentialpeak.

Bei den Zellen der Mutationslinie 821 ließen sich nur wenige Zellen beobachten, welche spontan APs feuerten. Diese konnten lediglich am dritten Zeitpunkt gemessen werden und ähnelten bezüglich des Peak und der Schwellenspannung der APs den anderen beiden Zelllinien.

#### 4.2.4. Aktionspotentiale durch Injektion von Strompulsen: Evozierte Aktionspotentiale

Nicht alle Zellen waren in der Lage, spontan Aktionspotentiale zu feuern. Um auch die Aktionspotentiale nicht spontan feuender Zellen beurteilen zu können, wurden zweisekündige Strompulse zwischen  $-40$  pA und  $140$  pA in Zellen injiziert, die zuvor auf ein Haltepotential von  $-77$  mV geklemmt wurden (*Low-Frequency-Voltage-Clamp*; vgl. Abbildung 17). Dadurch konnten in den meisten Fällen Aktionspotentiale evoziert werden.

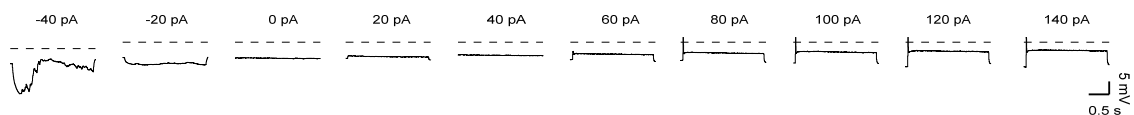


Abbildung 17. Exemplarisches Verhalten einer Zelle auf zweisekündige Strompulse.

Die Zellen der Wildtyplinie unterschieden sich zu den verschiedenen Zeitpunkten in ihrer Fähigkeit, bei Strominjektion APs auszubilden, nicht signifikant voneinander. Die TH<sup>+</sup>-Zellen konnten tendenziell häufiger durch Strominjektion zum Feuern von Aktionspotentialen stimuliert werden (vgl. Abbildung 18).

Der Anteil der TH<sup>-</sup>-Zellen, die evozierte Aktionspotentiale ausbildeten, nahm bei der Linie 818 über die Zeit ab. Die TH<sup>+</sup>-Zellen waren zu Beginn und zu Ende der Differenzierungsphase aktiver als die TH<sup>-</sup>-Zellen, jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht-signifikant.

Bei den Zellen der Mutationslinie 821 nahm der Anteil der AP-ausbildenden TH<sup>-</sup>-Zellen im Laufe der Zeit zu. Die Ergebnisse der Messungen der TH<sup>+</sup>-Zellen dieser Zelllinie sind nicht mit den anderen Zelllinien vergleichbar und erlauben keine Analyse, da die Anzahl an Daten zu gering ist. Es konnten lediglich zwei

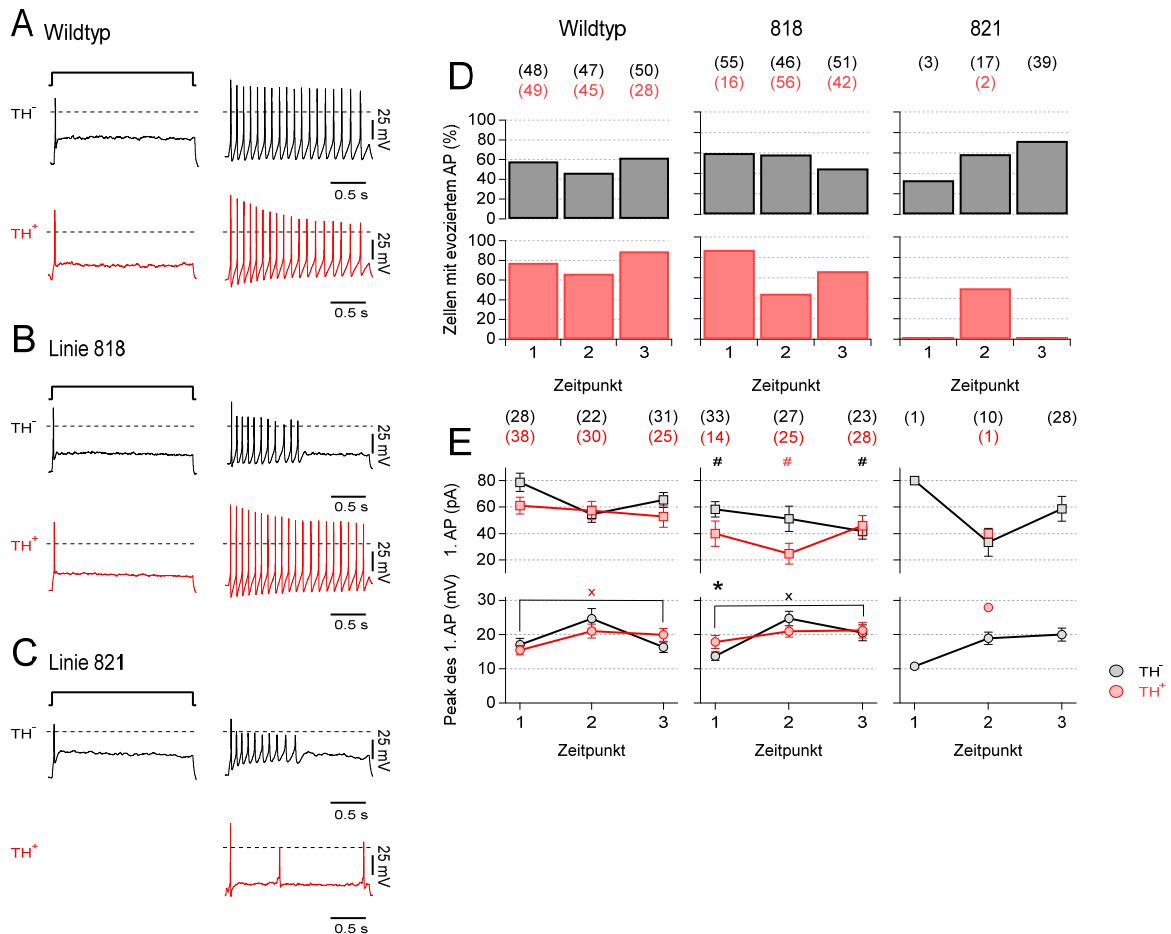
Messungen durchgeführt und dabei nur bei einer davon Aktionspotentiale hervorgerufen werden.

Der AP-Peak der Zellen des Wildtyps zeigte zu den verschiedenen Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede. Es stellte sich bei den TH<sup>+</sup>-Zellen ein statistisch signifikanter Anstieg des Peaks dar. Der Strom, bei welchem das erste AP gefeuert wurde, bewegte sich für den Wildtyp über die gesamte beobachtete Zeitdauer hinweg zwischen 50 und 80 pA für beide Subpopulationen.

Die beiden Subpopulationen der Mutationslinie 818 ähneln im zeitlichen Verlauf denen der Wildtyplinie. Die Stimulationsstromstärke, bei welcher das erste AP ausgelöst wurde, nahm bei den TH<sup>-</sup>-Zellen über die Zeit ab; bei den TH<sup>+</sup>-Zellen variierte dieser Wert. Im Allgemeinen lag sie bei dieser Zelllinie unter der des Wildtyps, was konsistent ist mit der höheren Spontanaktivität dieser Linie.

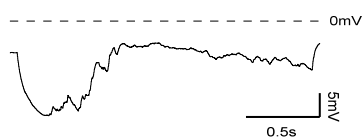
Die Messungen der TH<sup>-</sup>-Zellen zum Zeitpunkt 1 sowie die der TH<sup>+</sup>-Zellen zum Zeitpunkt 2 der Linie 821 wurden wie bereits angeführt nicht statistisch mit den anderen Linien verglichen. Der Peak der TH<sup>-</sup>-Zellen stellte sich konstant und nicht signifikant unterschiedlich zum Wildtyp dar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Wildtyplinie und die Mutationslinie 818 eine vergleichbare Erregbarkeit sowie ein sehr ähnliches Feuerverhalten aufwiesen und eine ausführlichere Analyse der Daten der Linie 821 nicht möglich war.



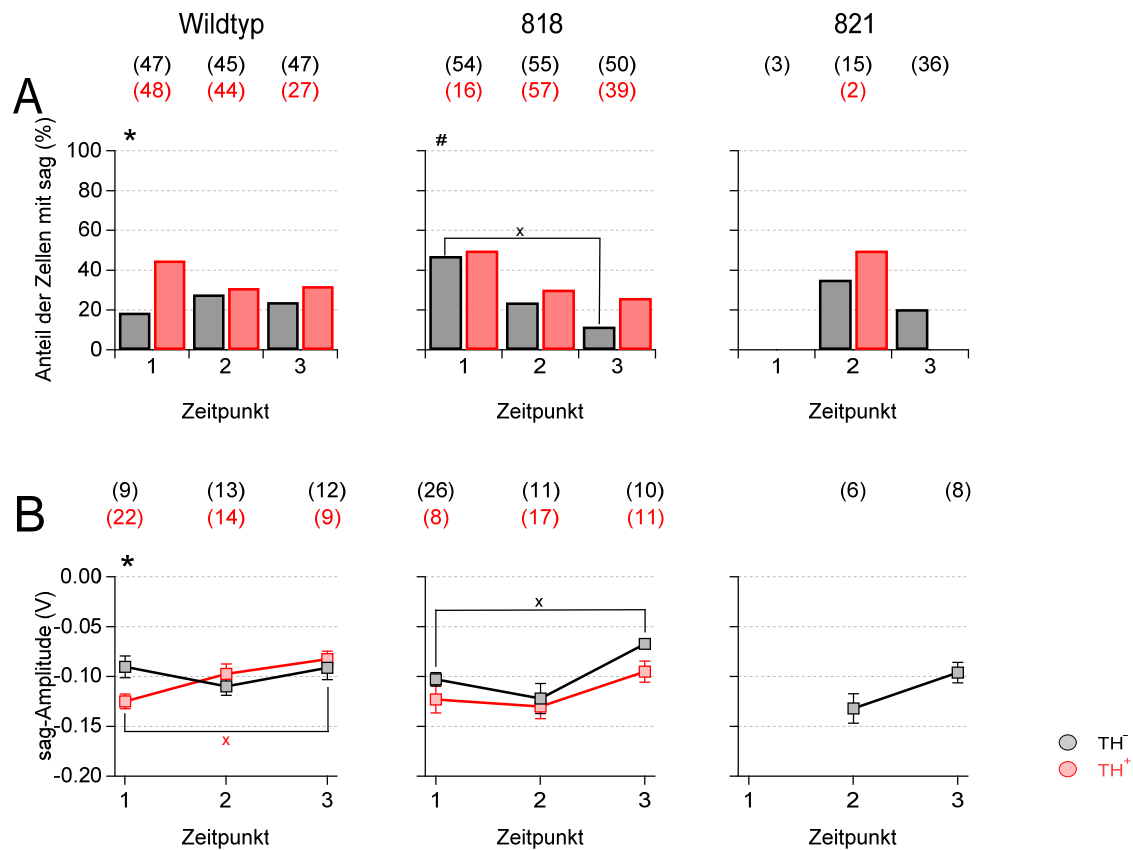
**Abbildung 18. Evoziertes Feuerverhalten der iPSC-abgeleiteten dopaminergen Kulturen.** (A-C) Repräsentative Reaktion der Zellen auf eine Strominjektion von 40 pA zum Zeitpunkt 2. Für jede Subpopulation (TH<sup>-</sup>/TH<sup>+</sup>) einer Zelllinie sind zwei unabhängige Messungen dargestellt, da manche Zellen nur ein Aktionspotential zeigten, andere jedoch mehrere APs feuerten. (D) Zeitliche Entwicklung des prozentualen Anteils feuender Zellen. (E) Das erste aufgezeichnete Aktionspotential wurde hinsichtlich der maximal erreichten Spannung (Peak) sowie der dazugehörigen Stimulationsstromstärke analysiert. Die Daten wurden aus Experimenten wie in A-C gezeigt, erhoben. In (E) sind Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte, verbunden mit durchgezogenen Linien gezeigt. Die Anzahlen experimenteller Replikate sind in Klammern angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen TH<sup>-</sup>- und TH<sup>+</sup>-Zellen innerhalb einer Linie wurden mit \*, zwischen Zeitpunkt 1 und 3 mit x und zwischen Wildtyplinie und den Linien 818 sowie 821 mit # markiert. Für die Signifikanzniveaus gilt: \*/#/x P < 0,05.

#### 4.2.4.1. Sag bei Injektion eines Strompulses von -40 pA



**Abbildung 19. Exemplarische Darstellung des Spannungs-Sags einer Zelle der Wildtyplinie, gemessen bei einer Strominjektion von -40 pA.**

Dopaminerge Neurone generieren einen sog.  $I_h$ -Strom, welcher durch die Aktivität des hyperpolarisationsaktivierten HCN-Kanals verursacht wird. Dieser bewirkt bei Aktivierung eine transiente Hyperpolarisation (sog. *voltage sag*) der Zellen wie in Abbildung 19 exemplarisch dargestellt. Dieser *sag* wurde bei einem Strompuls von  $-40$  pA aufgezeichnet und quantifiziert.



**Abbildung 20. Ausbildung eines hyperpolarisierenden Spannungs-Sags in iPSC-abgeleiteten dopaminergen Kulturen.** (A) Zeitliche Entwicklung des prozentualen Anteils der Sag-ausbildenden Zellen. Der Sag wurde mit einer Strominjektion von  $-40$  pA ausgelöst. (B) Zeitliche Entwicklung der durchschnittlichen Amplitude des Sags der drei Zelllinien. Dargestellt sind in A prozentuale Anteile, in B Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte, verbunden mit durchgezogenen Linien. Die Anzahlen experimenteller Replikate sind in Klammern angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen TH<sup>-</sup>- und TH<sup>+</sup>-Zellen innerhalb einer Linie wurden mit \*, zwischen Zeitpunkt 1 und 3 mit x und zwischen Wildtyplinie und den Linien 818 sowie 821 mit # markiert. Für die Signifikanzniveaus gilt: \*/#/x P < 0,05.

In allen drei Zelllinien stellte sich der Anteil der Zellen mit sag bei den TH<sup>+</sup>-Zellen höher als bei den TH<sup>-</sup>-Zellen dar, jedoch zeigte sich nur bei den Wildtypzellen am ersten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied (vgl. Abbildung 20). Über den Untersuchungszeitraum glichen sich die prozentualen Anteile der Zellen mit sag bei der Wildtyplinie aneinander an, während die prozentualen Anteile bei den

Zellen der Mutationslinie 818 bei beiden Subpopulationen sank. Bei den TH<sup>-</sup>-Zellen der Linie 821 schien dieser Trend ebenfalls zu existieren, auch wenn sich erst ab Zeitpunkt 2 *sags* zeigten.

Die Höhe der Amplitude des *sags* stellte sich bei allen Linien ähnlich dar. Bei den TH<sup>+</sup>-Zellen der Wildtyplinie fiel die Amplitude über die Zeit signifikant ab. Alle drei Zelllinien zeigten über den Untersuchungszeitraum einen Abfall der *sag*-Amplitude.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen kombiniert-heterozygoter Mutationen im Parkinson-assoziierten Parkin-Gen auf die elektrische Aktivität iPSC-abgeleiteter dopaminergener Neurone untersucht. Eine *mCherry*-Reporter-Kassette wurde an das 5'-Ende des TH-Gens angefügt, um zwischen Dopamin-produzierenden (TH<sup>+</sup>) und nicht-dopaminergen (TH<sup>-</sup>) Zellen differenzieren zu können.

Da Morbus Parkinson mit einem Verlust dopaminergener Neurone einhergeht, wurde das Augenmerk auf mögliche Unterschiede in der elektrophysiologischen Aktivität der TH<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu den TH<sup>-</sup>-Zellen gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die (Spontan-)Aktivität dopaminergener Neurone einer der beiden Mutationslinien höher war als die der gesunden Kontrolllinie. Bei einer weiteren Mutationslinie war die Generierung elektrophysiologischer Daten deutlich eingeschränkt.

### 5.1. Zellmaterial

#### 5.1.1. Eigenschaften der untersuchten Zellen

Neurone sind auf die Leitung und Übertragung von Erregungen spezialisiert und sowohl durch die charakteristische Form mit Zellfortsätzen als auch durch die Ausbildung von Aktionspotentialen gekennzeichnet (205, 221). Da sich die Herstellung neuronaler Zellen *in vitro* von der natürlichen Entwicklung *in vivo* unterscheidet, wird seit Längerem darüber debattiert, ob *in vitro* gezüchtete neuronale Zellen als Neurone bezeichnet werden können und wie genau man diese klassifizieren kann.

Ein wichtiges Klassifikationskriterium ist dabei die Morphologie der Zellen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien ähnelten die Zellen der Linie 818 denen der Wildtyplinie lichtmikroskopisch stark: Die Zellen besaßen rundlich-ovale Somata und Neuriten, die weit verzweigte Netzwerke bildeten. Abweichend davon präsentierte sich die Mutationslinie 821; trotz identischer Differenzierung und Behandlung wurde dort ein erhöhtes Zellsterben beobachtet. Nur wenige der vitalen Zellen bildeten Neuriten, welche im Gegensatz zu den Zellen der anderen beiden Linien jedoch deutlich weniger verzweigte bis kaum ausgebildete Netzwerke aufwiesen.

Da dopaminerge und nicht-dopaminerge Neurone unter dem Lichtmikroskop anhand von morphologischen Kriterien wie Größe, Form oder Länge der Neuriten kaum voneinander zu unterscheiden sind (5, 106, 132), wurde wie beschrieben ein TH-Reportersystem in die Zellen eingebracht (14). Dabei entstehen Mischkulturen, die üblicherweise nur geringe Anteile an TH<sup>+</sup>-Zellen beinhalten (13, 26, 97, 117, 164, 195). Auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen konnte festgestellt werden, dass der Anteil der TH<sup>+</sup>-Zellen größer war als jener der TH<sup>-</sup>-Zellen. Dabei wurde festgestellt, dass vor allem bei Zelllinien mit Mutation im Parkin-Gen quantitativ weniger TH<sup>+</sup>-Zellen vorhanden waren (164, 179). In den für diese Arbeit durchgeführten Messungen ließ sich dieser Umstand lediglich für die Mutationslinie 821 beobachten. In dieser Kultur war ein ungewöhnlich starkes Zellsterben und nur vereinzelt TH<sup>+</sup>-Zellen zu beobachten. Es ist anzumerken, dass sich die Kultivierung dieser Zellen deutlich schwieriger gestaltete als die der anderen beiden Zelllinien. Dieser Umstand könnte einerseits zurückzuführen sein auf mögliche Probleme oder Uneinheitlichkeiten bei der Gewinnung der Zellen, sodass die Differenzierung im Vergleich zu den anderen Zelllinien nur verlangsamt ablaufen konnte. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die erschwerte Kultivierung dieser Zellen zurückzuführen ist auf die Mutation. Es ist denkbar, dass die Mutationen im Parkin-Gen sich stärker auf diese Zelllinie auswirkten und die TH<sup>+</sup>-Zellen somit selektiv dezimiert wurden. Ebenfalls ist es möglich, dass die Effektivität der Differenzierung als Folge der Mutation reduziert war, wie man es bei Parkinson primär erwarten würde (5, 179, 214).

Die Zellen der Linie 818 und des Wildtyps ähnelten sich auch morphologisch stark (siehe Abschnitt 4.1.), jedoch ist zu beachten, dass die Zellen der Linie 818 in der ersten Messwoche noch keine TH<sup>+</sup>-Zellen ausbildeten. Dieser Umstand könnte einer leicht verzögerten Entwicklung der Zellen dieser Mutationslinie oder einer generellen Reduktion der Effektivität der dopaminergen Differenzierung wie bereits für die Zellen der Linie 821 beschrieben geschuldet sein.

Die Mutationen im Parkin-Gen, die in dieser Arbeit komplex-heterozygot vorliegend untersucht wurden, sind bislang lediglich homozygot oder heterozygot im Sinne eines betroffenen Allels untersucht worden (1, 135). Es ist somit möglich, dass sich die Mutationen in der vorliegenden Konstellation anders auswirken als die bislang untersuchten Einzelmutationen. Auch könnte dies ein Grund sein für

die verzögerte dopaminerge Differenzierung der Zellen der Linie 818 sowie die erschwerte Kultivierung der Zellen der Linie 821 (5, 179, 214).

Bezüglich der Morphologie wurde zudem in mehreren Studien beschrieben, dass bei vielen Mutationen im Parkin-Gen prominente mitochondriale Abnormalitäten sowie zytoplasmatische Einschlüsse, Lewy-Körperchen genannt, zu sehen sind (17, 23, 25, 29, 70, 76, 117, 214). Diese morphologischen Charakteristika wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, markante Auffälligkeiten wurden lichtmikroskopisch jedoch nicht festgestellt. Einige Autoren gehen davon aus, dass bei EOPD keine solche Lewy-Körperchen nachweisbar sind (189).

Ein zweites wesentliches Klassifikationskriterium für neuronale Zellen ist die Fähigkeit, Aktionspotentiale zu generieren und synaptisch weiterzugeben (188, 211, 218, 221). Zudem weisen Neurone typische Membrancharakteristiken auf, zu denen das Vorhandensein zahlreicher Ionenkanäle zählt (205, 221). Diese Parameter wurden mit der *Patch-Clamp*-Technik elektrophysiologisch untersucht und werden in Abschnitt 5.3.1. weiterführend diskutiert.

Ein weiterer Punkt der Diskussion, ob iPS-Neurone als Neurone klassifiziert werden dürfen, stellt die physiologische Umgebung der Zellen dar. Diese kann *in vitro* nicht in aller Komplexität dargestellt werden, da sich keine physiologischen Netzwerke vergleichbar mit der *in-vivo*-Situation ausbilden und die Zellen sich daher anders entwickeln. Diese These wird von einigen Studien unterstützt, in welchen nachgewiesen wurde, dass iPS-Neurone sich in ihren Eigenschaften von denen ausgereifter Hirnzellen unterscheiden (36, 59, 81, 141, 169, 184, 205, 222).

### 5.1.2. Zellalter

Da Parkinson-Erkrankungen zu den progredient neurodegenerativen Erkrankungen zählen, welche erst im Laufe des Lebens auftreten, stellt das Alter der Zellen einen wichtigen Punkt dar, welcher bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen ist.

Die Entwicklung des Gehirns und des Nervensystems beginnt im menschlichen Embryo ab der dritten Woche *post conceptionem* (144, 168). Ab der sechsten bis siebten Woche nach der Konzeption entwickeln sich die dopaminergen Neurone (158). In der Literatur finden sich verschiedene Angaben, wann die Entwicklung der Neurone abgeschlossen ist (190). Setzt man den Beginn der Differenzierung der induzierten Stammzellen gleich mit dem Beginn der neuronalen Entwicklung,

so erfolgten viele der Messungen zu einem Zeitpunkt, an dem die Entwicklung der dopaminergen Neurone eventuell noch nicht abgeschlossen war. Unter der Voraussetzung, dass sich die Zellen *in vitro* so entwickeln wie *in vivo*, kann man daraus schlussfolgern, dass die beobachteten Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen mit Vorsicht zu betrachten sind, da es sich nicht um vollständig ausgereifte Neurone handelte. Ein dopaminerges Charakter der untersuchten Zellen scheint zu existieren, da eine Expression von TH nachgewiesen wurde, jedoch ist die Reifung der Zellen vermutlich noch nicht abgeschlossen gewesen, sodass sich die erzielten Ergebnisse über einen längeren Untersuchungszeitraum gegebenenfalls verändert hätten. Ebenfalls möglich ist, dass die Reifung der Zellen zu einem frühen Zeitpunkt zum Erliegen gekommen ist und die untersuchten Zellen somit nicht ausgereift waren.

Goldberg *et al.* untersuchten das Vorhandensein dopaminerges Neurone in Parkinson-Knockout-Mausmodellen und legten dar, dass die Anzahl der TH<sup>+</sup>-Neurone in der SnPc bis einschließlich zur 24. Woche bei Wildtyp und Knockout gleich groß war (68). In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass reprogrammierte Fibroblasten ähnlich wie primäre Neurone einem Reifungsprozess unterliegen, sodass gerade die Zellen von Parkinsonpatienten die Charakteristika reifer Neurone und ebenso pathologische Auffälligkeiten erst nach längerer (Differenzierungs-) Dauer erwerben (36, 141, 187, 191, 200, 212, 221). Aufgrund dieser Berichte scheint es möglich, dass ausgeprägte elektrophysiologische Unterschiede zwischen Mutations- und Kontrolllinien erst nach längerer Zeit aufgetreten wären, was die Ähnlichkeit der Wildtyplinie mit der Mutationslinie 818 zu den beobachteten Zeitpunkten erklären könnte.

Neben dem biologischen Alter der Zellen hat auch das Alter der zellspendenden Personen zum Zeitpunkt der Fibroblastengewinnung einen entscheidenden Einfluss auf die Erfolgsrate der Zellkultur. In einer Studie von Falk und Karow konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Alter der Spender\*innen die Zellkulturen weniger erfolgreich etabliert werden können (59). In dieser Arbeit konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Während die Etablierung einer Zellkultur des Wildtyps (Spenderalter bei Biopsie 63 Jahre) und der Mutationslinie 818 (Spenderalter bei Biopsie 57 Jahre) gelang, konnte bei der Linie 821 keine viable Kultur erzeugt werden, obwohl der Spender mit 35 Jahren zum Zeitpunkt der Biopsie deutlich jünger war. Eine Erklärung dafür könnte ein unterschiedlicher

Erkrankungsbeginn sein. Es ist noch unklar, inwieweit die individuelle Progredienz der Erkrankung die Etablierung von iPSC-abgeleiteten Neuronen beeinflusst. So ist es denkbar, dass eine stark fortgeschrittene Erkrankung der Spender\*innen oder bestimmte physiologische Marker wie beispielsweise Alter und Krankheitsbeginn sich in Zellkulturen in schnellen Effekten der Mutationen äußert, also eine Differenzierung beziehungsweise Entwicklung der iPSC-abgeleiteten Neurone erschwert. Da jedoch keine Daten über den Beginn der Erkrankung oder die klinische Ausprägung der Symptome der Spender\*innen der hier verwendeten Zelllinien vorliegen, lässt sich diese Hypothese nicht überprüfen.

### 5.1.3. iPSC

Seit der Entwicklung der iPSC-Technologie vor über zehn Jahren sind die induzierten pluripotenten Stammzellen aus der Forschung kaum noch wegzudenken. Es gibt jedoch einige Schwierigkeiten mit dieser Technik, welche vor allem in den letzten Jahren bekannt geworden sind.

Eines der größten Probleme ist die Tatsache, dass iPSC-Zellen eine erhebliche genetische Variabilität aufweisen können (12, 116, 119, 141, 153, 169, 182, 186, 213, 223). Dazu zählen nicht nur Unterschiede zwischen verschiedenen Passagen einer Linie, sondern auch Unterschiede zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb einer Linie zwischen unterschiedlichen Subpopulationen (163, 182). Volpato und Webber beschrieben drei Arten von Mutationen, die auftreten können (213):

1. Vorbestehende Mutationen in somatischen Zellen, aus denen die iPSC gewonnen werden
2. Mutationen, die durch den Prozess der Reprogrammierung hervorgerufen werden („prozessbedingte Mutationen“)
3. Mutationen, welche im Laufe der Differenzierungszeit auftreten

Die Mutationen während des Reprogrammierungsprozesses entstehen insbesondere zu Beginn des Prozesses und stellen mit knapp 75 % den größten Anteil der Mutationen (100, 193). Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass es Unterschiede durch prozessbedingte Mutationen zwischen den insgesamt je drei Mal hergestellten iPSC-abgeleiteten Neuronen pro Zelllinie gab.

Wie in weiteren Studien gezeigt wurde, kann auch das Geschlecht der Fibroblastenspendenden Auswirkungen auf die Qualität der iPSC-Zellen haben (136, 171). Da Parkinson jedoch autosomal und nicht gonosomal vererbt wird,

sollten solche geschlechtsspezifischen Effekte eher geringfügige Auswirkungen haben. Es ist anzumerken, dass in dieser Arbeit die Fibroblasten der Wildtyplinie und der Mutationslinie 821 von einer weiblichen Spenderin stammen, jene der Linie 818 hingegen von einem männlichen Spender. Der große Unterschied zwischen den Zellen der Linie 821 und den anderen beiden Linien ist ausschließlich mit dem Geschlecht der Spender\*innen somit nicht zu erklären.

## 5.2. Limitationen des experimentellen Setups

Induzierte pluripotente Stammzellen und die aus ihnen abgeleiteten Zellen sind sehr empfindlich (35, 58, 116, 129, 153). Bereits kleinste Erschütterungen auf Transportwegen oder in der Zellkultur sowie Temperaturschwankungen können dazu führen, dass sich die Zellen von den Kulturgefäßen, in denen sie kultiviert werden, ablösen. Beim Transport der Zellen sowie beim Wechsel des Kulturmediums lässt sich auch mit größter Vorsicht eine mechanische Agitation der Zellen nicht komplett vermeiden, was den Verlust einiger Zellen zur Folge haben kann.

Im Laufe des experimentellen Arbeitens konnte beobachtet werden, dass elektrophysiologische Messungen direkt nach Wechsel des Kulturmediums nur selten erfolgreich waren. Mit einem zeitlichen Abstand von einigen Stunden zwischen Wechsel des Mediums und den Messungen konnten Letztere problemlos erfolgen. Da diese Erkenntnis während laufender Experimente gewonnen wurde, ist es möglich, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften einzelner Zellen unterschätzt wurden.

Die Unterscheidung der Zellen in TH<sup>+</sup>- bzw. TH<sup>-</sup>-Zellen erfolgte ausschließlich anhand visueller Kriterien (siehe Abschnitt 4.1.). Aus diesem Grund könnte es sein, dass einzelne TH<sup>+</sup>-Zellen nicht als solche erkannt wurden, da sie im Vergleich zu anderen Zellen in geringerem Maße rotes Licht emittierten. Ebenfalls ist es möglich, dass einige TH<sup>-</sup>-Zellen fälschlicherweise für TH<sup>+</sup>-Zellen gehalten wurden, wenn die Zellen in direkter Nachbarschaft besonders stark rot fluoreszierten.

## 5.3. Elektrophysiologische Messungen

### 5.3.1. Spannungsabhängige Natrium- und Kaliumströme

Die Höhe der spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumströme wies über den betrachteten Zeitraum hinweg Schwankungen auf. Vor allem die TH<sup>+</sup>-Zellen der Linie 818 lieferten konstant höhere Stromantworten als die TH<sup>+</sup>-Zellen der Wildtypelinie.

Die Aktivierung von Natriumkanalströmen bei iPSC-abgeleiteten Neuronen erfolgt in der Literatur bei  $-37 \pm 8$  mV, wohingegen Kaliumkanalströme erst bei  $-27 \pm 14$  mV aktiviert werden (64). In der vorliegenden Arbeit konnte ein physiologisches Schaltverhalten der Natrium- und Kaliumkanäle wie in Abschnitt 3.2.1. und in der Literatur beschrieben dargestellt werden.

Über die Membrankapazität  $C_m$  konnte indirekt auf die Größe der Zellen geschlossen werden, wobei Faktoren wie die Anzahl und Größe der Zellfortsätze zum Teil mit einfließen (69). Im Mausmodell mit MitoPark-Mäusen (57) sowie gesunden Mäusen stellte sich die Membrankapazität dopaminergischer Zellen der MitoPark-Mäuse über die Zeit hinweg als absinkend dar, während die Membrankapazität der dopaminergen Neurone der Kontrollgruppe keine signifikanten Änderungen aufwies (19). Im Vergleich mit humanen iPSC-abgeleiteten neuronalen Kulturen, wie sie auch in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, konnten Studien zeigen, dass es zu einer Zunahme der Membrankapazität über die Zeit kam (164). Auch bei den drei in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien kam es zu einer Zunahme der Membrankapazität über die Zeit, was in Zusammenschau mit der Morphologie, dem Ionenkanalverhalten sowie der elektrischen Aktivität auf eine Größenzunahme der Zellen entsprechend einem fortschreitenden Zellwachstum bzw. einer sich entwickelnden Kultur hindeutet. Damit wird auch die Hypothese aus Abschnitt 5.1.2. weiter gestärkt: Die Zellen scheinen sich im Verlauf der experimentellen Phase stets weiter in Richtung neuronaler Kulturen entwickelt zu haben. Ob die Entwicklung abgeschlossen wurde, ist jedoch nicht zu beurteilen.

### 5.3.2. Spontane postsynaptische Ströme

Spontane postsynaptische Ströme können als Marker für Zellverbindungen gewertet werden. Bereits die Morphologie der Zellen kann einen ersten Anhalt dafür geben, ob PSCs zu erwarten sind (106, 221).

Kang *et al.* beobachteten dopaminerge iPSC-abgeleitete Neurone über einen Zeitraum von fünfeinhalb Wochen und konnten feststellen, dass Amplitude und Frequenz der spontanen postsynaptischen Ströme mit der Zeit zunahm (106). Auch bei den hier untersuchten Zellen stellte sich die Amplitude der PSCs mit der Zeit als tendenziell zunehmend dar, die Frequenz wies leichte Schwankungen auf. Insgesamt gab es jedoch kaum signifikante Veränderungen über den Untersuchungszeitraum.

Der Anteil der Zellen, welche PSCs ausbilden, wird in der Literatur als über die Zeit ansteigend beschrieben (162, 164). Die hier durchgeführten Messungen ermöglichen keine direkte Aussage über die Netzwerkaktivität, da in der Aufzeichnung der Ströme keine Differenzierung zwischen Spontan- und Netzwerkaktivität erfolgt ist. Somit sind die dargestellten Ergebnisse lediglich als Hinweise auf eine mögliche Netzwerkaktivität zu sehen. Mit Ausnahme der TH-Zellen der Wildtyplinie stieg auch in der vorliegenden Arbeit der Anteil der PSC-ausbildenden Zellen mit der Zeit an, dabei wiesen die Zellen der Linie 818 im Vergleich zu den Wildtypzellen stets einen höheren Anteil auf. Ähnlich zu den Daten von Prè *et al.* wiesen zwischen 9 und 19 % der Zellen der Wildtyplinie sowie der Linie 818 zu Beginn der Messungen spontane postsynaptische Ströme auf (162). Die Zellen der Linie 821 fielen durch das Fehlen von PSCs auf, was jedoch gut erklärbar ist durch das eingeschränkte Wachstum dieser Zelllinie.

### 5.3.3. Spontane Aktionspotentiale

Eine der charakteristischen Fähigkeiten dopaminergener Neurone *in vivo* ist die Schrittmacheraktivität, welche das Feuere von Aktionspotentialen in regelmäßigen Abständen bezeichnet (55, 75, 114). Da die Parkinson-Erkrankung mit einem Verlust dopaminergener Neurone einhergeht, ist zu vermuten, dass die Schrittmacheraktivität dieser Zellen im Vergleich zu den Zellen gesunder Probanden gestört ist, was in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht wurde.

Einige Autoren beschreiben eine Charakterisierung des spontanen Feuerverhaltens der Neurone, die je nach Kontext oder auch spontan variieren

kann (72–74, 110, 203). Margolis *et al.* hingegen konnten weder einzelne Zelllinien noch Subpopulationen der Zellen am spontanen Feuerverhalten unterscheiden (132). In der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Unterteilung nicht vollzogen.

Der Anteil an Zellen, welche spontan APs ausbilden können, beträgt in einigen Studien ca. 20 % nach fünf bis sechs Wochen nach dem Start der Differenzierung, im Laufe der Zeit steigt dieser Anteil an (19, 162). Die Membranspannung, bei welcher die Aktionspotentiale ausgelöst wurden (Schwellenwert), sinkt mit der Zeit, diese Zusammenhang konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden.

#### 5.3.4. Aktionspotentiale bei Strominjektion und *voltage sag*

Eine Untersuchung evozierter Aktionspotentiale ist in der Literatur bis auf wenige Ausnahmen vorwiegend qualitativ vorgenommen worden. Einige Autoren konnten zeigen, dass die große Mehrheit der Zellen bei einer depolarisierenden Strominjektion Aktionspotentiale ausbilden konnten (158, 164). In der vorliegenden Arbeit liegt dieser Anteil mit jeweils mehr als 50% bei sowohl TH<sup>-</sup>- als auch TH<sup>+</sup>-Zellen in einem ähnlichen Rahmen.

Der durch Aktivierung der HCN-Kanäle hervorgerufene *voltage sag* konnte vorwiegend bei dopaminergen Neuronen beobachtet werden. Diese Kanäle wurden durch He *et al.* ausführlich physiologisch charakterisiert (84). In der Literatur ist beschrieben, dass dem *sag* häufig ein breites Aktionspotential folgt (27, 38, 55, 65, 132). Dies konnte hier nicht gezeigt werden, da die Messdauer nach Stimulation zu kurz war. Auch eine geringere Ausprägung des I<sub>h</sub>-Stromes bei den Zellen der Mutationslinie wie durch Chan *et al.* beschrieben, konnte nicht beobachtet werden (31).

Einigen Forschern zufolge spricht die Anwesenheit eines I<sub>h</sub>-Stromes für eine *pacemaking*-Aktivität der Zellen (31, 38, 84). Dabei definiert die Abwesenheit eines solchen Stromes nicht-dopaminerge Neurone sicher, jedoch kann das Vorhandensein eines I<sub>h</sub>-Stromes das Vorliegen dopaminergener Neurone nicht sicher bestätigen. Diese Aussage lässt sich mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten stützen.

## 5.4. Mutationen

Die in den beiden Mutationszelllinien komplex-heterozygot vorliegenden Mutationen sind als Einzelmutationen häufig vorkommende Varianten.

Die in beiden hier betrachteten Mutationslinien vorliegende Punktmutation R275W beschreibt einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan in Exon 7, welches in der RING 1-Domäne liegt (43, 111). Beschrieben werden bei dieser Variante prominente mitochondriale Abnormalitäten sowie große Aggresome im Cytoplasma, wie sie beispielsweise auch bei der Huntington-Erkrankung durch Huntingtin-Aggregate oder der spinocerebellären Ataxie Typ 1 durch Ataxin-1-Aggregate hervorgerufen werden (43, 102, 113, 214). Diese Punktmutation R275W führte in homozygoten Probanden zu einem unvollständigen Funktionsverlust des Parkins. Die Funktion war jedoch so hochgradig eingeschränkt, dass sie an die von Parkin-Knockout-Zellen erinnerte (17, 214). Sriram *et al.* postulierten, dass diese Mutation das Ubiquitin-Proteasom-System durch Einlagerung des Parkins in Aggresom-ähnliche intrazelluläre Strukturen beeinflusst (189).

Die Deletion des Exons 4, hier vorliegend auf einem Allel der Zellen der Linie 818, wurde 1998 erstmals von Kitada *et al.* beschrieben und tritt häufig bei Patienten mit autosomal-rezessiv vererbten juvenilen Parkinsonerkrankungen auf (99, 109). Hayashi *et al.* konnten in einer postmortalen Untersuchung eines Gehirns eines an EOPD-erkrankten Patienten nachweisen, dass keine Lewy-Körperchen gebildet wurden (83). In dieser Arbeit wurden Lewy-Körperchen nicht explizit untersucht. Wie bereits in Abschnitt 5.1.1. beschrieben, imponierten jedoch lichtmikroskopisch keine prominenten Auffälligkeiten in den Zellen. Die Deletion dieses Exons führt zu einem verkürzten Protein mit fehlenden RING-Domänen und damit zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität (199). Liegt diese Mutation homozygot vor, ist also keine funktionstüchtige Kopie des Exons 4 vorhanden, kommt es fast immer zum Entstehen einer Parkinson-Erkrankung, es scheinen jedoch zusätzlich auch Umweltfaktoren und/oder spezifische Suszeptibilitätsfaktoren eine Rolle zu spielen, da auch gesunde Probanden Varianten des Exons 4 aufweisen können, zu denen auch heterozygote Deletionen zählen (199). Der genaue Krankheitswert beziehungsweise der Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Mutation ist also noch nicht abschließend geklärt. Da die Linie 818 in ihrer Morphologie und den Eigenschaften starke Ähnlichkeit mit dem Wildtyp aufwies,

stellt sich die Frage, inwiefern die Kombination beider Mutationen einen sich gegenseitig abmildernden Effekt hat oder ob ein nicht-homozygotes Vorliegen weniger ausgeprägte Effekte hat.

Die in den Zellen der Linie 821 vorliegende Punktmutation p.C352R in Exon 9 bezieht sich auf die IBR-Region des Parkins. Diese Mutation wurde 2020 von Tariq *et al.* isoliert als homozygot vorliegende Variante in iPSC-abgeleiteten Neuronen generiert und die genauen Auswirkungen auf die Zellphysiologie sind Gegenstand aktueller Forschungen (201). Genauere Ergebnisse bezüglich der Schwere dieser Mutation sind noch ausstehend, die hier untersuchte Mutationskonstellation zeigte sich jedoch zum einen kompliziert in Differenzierung und Zellkultur, zum anderen stellte sich das elektrophysiologische Verhalten der gemessenen Zellen im Vergleich zum Wildtyp und der weiteren Mutationslinie 818 deutlich anders dar. Es konnten kaum TH<sup>+</sup>-Zellen untersucht werden, was Folge einer erschwerten Differenzierung sein könnte. Ebenfalls denkbar ist, dass dieser Umstand eine Folge der Mutation ist, welche die TH<sup>+</sup>-Zellen selektiv zerstört (vgl. auch Abschnitt 5.1.1.). Da keine klinischen Daten bezüglich der Ausprägung der Symptomatik vorliegen, können keine definitiven Schlüsse über die Effekte dieser Mutation getroffen werden, eine starke Beeinträchtigung der Parkin-Funktion ist jedoch anzunehmen.

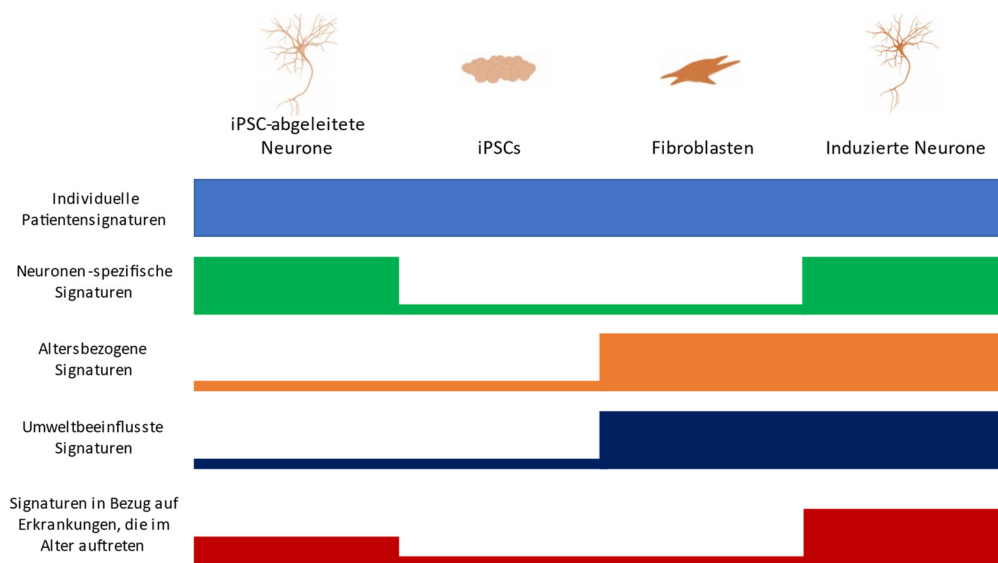
## 5.5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass komplex-heterozygote Mutationen, die sich in nur einer Mutation unterscheiden, verschiedene Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von neuronalen Mischkulturen haben können. Um die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse validieren und weiterführend untersuchen zu können, sollte man die einzelnen Mutationen isoliert voneinander untersuchen. So könnte man feststellen, ob die singuläre Punktmutation p.C352R der Linie 821 ebenfalls zu erschwerten Zellkultur- und Untersuchungsbedingungen führt. Zusätzlich sollte die klinische Symptomatik bei von den untersuchten Mutationen betroffenen Patienten mit den elektrophysiologischen Eigenschaften korreliert werden, um genauere Aussagen über den Schweregrad treffen zu können.

Patientenspezifische iPSC-Neurone eignen sich gut zur Untersuchung patientenspezifischer Fragestellungen und der Entwicklung personalisierter Therapien, da der genetische Hintergrund mit dem des Patienten identisch ist. Um die Bedeutung und Auswirkungen verschiedener Mutationen im Detail zu verstehen und Mutationen von unterschiedlichen Patienten mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen vergleichend zu untersuchen, eignen sich Patienten-abgeleitete iPSC weniger. Spender\*Innen können auch weitere, nicht-pathologische somatische Mutationen aufweisen, welche durch die iPSC-Technologie übernommen werden und im weiteren Verlauf dann möglicherweise die Funktion und das Überleben der iPSC-abgeleiteten Zellen beeinflussen. Aus diesem Grund erfordern mutationsspezifische Fragestellungen einen standardisierten genetischen Hintergrund. Nur mit sog. isogenen Linien, welche sich ausschließlich in der zu untersuchenden Mutation unterscheiden, lässt sich ein quantitativer Vergleich anstellen, weswegen sie in zukünftigen Projekten präferiert zur Anwendung kommen sollten.

Zusätzlich sollte die Auswahl der Spender\*innen, sofern keine isogenen Kontrolllinien verwendet werden, genau aufeinander abgestimmt werden. Neben der Berücksichtigung und Angleichung des biologischen Geschlechts sollte eine Anpassung auch in Bezug auf das Alter sowie die individuelle Krankheitsgeschichte erfolgen, um möglichst vergleichbare Daten zu produzieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Validität der Daten stellt die Untersuchung der Zellen über einen längeren Zeitraum dar. Dieser sollte optimalerweise mehrere Jahre umfassen oder aber adäquat simuliert werden, beispielsweise mit Progerin, einem Protein, welches die Stammzell-Differenzierung über den Notch-Signalweg reguliert und darüber den Alterungsprozess beschleunigt (191). Der Untersuchungszeitraum könnte auch nach hinten verschoben werden, um das Verhalten der Zellen zu späteren Zeitpunkten zu untersuchen.



**Abbildung 21. Neuronales Gedächtnis in Patienten-abgeleiteten neuronalen Modellen (nach Traxler et al., 2019).** Um die Gegebenheiten *in vivo* auch *in vitro* möglichst gut darzustellen, sollten patientenspezifische Modelle die individuellen (epi-)genetischen Signaturen beinhalten. Diese können zwischen verschiedenen Zelltypen variieren, sind aber in allen dargestellten Zelltypen vorhanden. Neuronen-spezifische Signaturen finden sich lediglich in neuronalen Zellen. Im Gegensatz zur Reprogrammierung zur Etablierung von iPSC kann die direkte Umwandlung von Fibroblasten zu induzierten Neuronen auch alters- und umweltbezogene Signaturen aufrechterhalten, welche ggf. für Krankheitsmodelle wichtig sind. Da die meisten altersbedingten Erkrankungen eine Interaktionskomponente zwischen Genen und Umwelt aufweisen, erscheint es plausibel, dass spezifische Signaturen eher in induzierten Neuronen als in iPSC-abgeleiteten Neuronen zu finden sind.

Um der Problematik hinsichtlich des Zellalters zu entgehen, gibt es die Möglichkeit einer Verwendung induzierter Neurone. Induzierte Neurone werden direkt aus Fibroblasten gewonnen, ohne dass ein Zwischenschritt über pluripotente Stammzellen erfolgt (30, 93, 98, 125, 134, 137, 155, 212, 215). So können altersbezogene Veränderungen erhalten bleiben und untersucht werden. Ein

Vergleich von Fibroblasten, iPSC, iPSC-abgeleiteten Neuronen und induzierten Neuronen ist in Abbildung 21 dargestellt.

Die Dopaminausschüttung der Zellen sollte quantifiziert werden. Einige Studien konnten nachweisen, dass Mutationen im Parkin-Gen mit einer gesteigerten spontanen Dopaminfreisetzung einhergehen (39, 100, 105), welche zu vermehrtem Dopamin-induzierten oxidativen Stress führte, der am Untergang der dopaminergen Zellen beteiligt war. Die Depolarisations-vermittelte Calcium-abhängige Dopaminausschüttung blieb dabei gleich, sodass ein Vergleich der spontanen, Calcium-unabhängigen Dopaminfreisetzung zwischen mutationsbetroffenen und gesunden Zellen neue Aufschlüsse geben könnte.

Da Parkinson nicht ausschließlich Dopamin, sondern auch weitere Neurotransmitter betrifft, wäre eine größer angelegte Untersuchung mit Quantifizierung sämtlicher Neurotransmitter ebenfalls aufschlussreich (9).

## 6. Zusammenfassung

Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit und durch eine Reihe charakteristischer Symptome gekennzeichnet, welche an Intensität zunehmen und die Lebensqualität der Patienten einschränken. Auf zellulärer Ebene ist die Erkrankung mit einem Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* assoziiert. Diese Arbeit untersuchte die Auswirkungen kombiniert-heterozygoter Mutationen im Parkinson-assoziierten Parkin-Gen auf die elektrische Aktivität von aus Patientenmaterial abgeleiteten Neuronen.

Aus Fibroblasten eines Gesunden und zweier Parkinsonpatienten mit unterschiedlichen kombiniert-heterozygoten Mutationen im Parkin-Gen wurden Probanden-spezifische induzierte pluripotente Stammzelllinien generiert und ein Reportersystem für Tyrosin-Hydroxylase eingebracht. Diese Zelllinien wurden zu Neuronen ausdifferenziert und über einen Zeitraum von sechs Wochen mittels *Patch-Clamp*-Technik funktionell untersucht.

Während die Zellen einer Mutationskultur eine geringe Zellviabilität aufwiesen und die Zellen vermehrt abstarben, konnten Neurone eines zweiten Patienten und eines Kontrollprobanden etabliert werden. Die charakteristischen Eigenschaften neuronaler Zellen wurden im zeitlichen Verlauf zunehmend deutlicher, sodass aufgrund dessen sowie aufgrund morphologischer Merkmale von sich entwickelnden Kulturen ausgegangen werden kann. Die Neurone der Probanden zeigten während der Differenzierungsphase eine vergleichbare funktionelle Expression spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle. Spontane Aktionspotentiale konnten detektiert werden, waren jedoch häufiger in den dopaminergen Zellen zu beobachten. Die Spontanaktivität war insbesondere in den dopaminergen Neuronen einer Parkin-Mutationslinie erhöht.

Die untersuchten Mutationen wirken sich unterschiedlich auf die abgeleiteten Neurone und deren elektrischen Eigenschaften aus. Um die Mechanismen dieser kombiniert-heterozygoten Mutationen umfassend zu verstehen, ist es nötig, die Auswirkungen der Einzelmutationen zu untersuchen. Zusätzlich sollte die Zelllinie mit der geringen Zellviabilität erneut untersucht werden, um weitere die Kultivierungs- und Differenzierungsphase beeinflussende Faktoren auszuschließen. Eine Verwendung isogener Linien sollte überlegt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. ClinVar Database: 602544[MIM] - ClinVar - NCBI. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (Datum des Zugriffs: 14.02.2023)
2. Abbas N, Lücking CB, Ricard S, Dürr A, Bonifati V, et al. 1999. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum. Mol. Genet.* 8(4):567–74
3. Abeliovich A, Gitler AD. 2016. Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. *Nature.* 539(7628):207–16
4. Abt K. 1987. Descriptive Data Analysis: A Concept between Confirmatory and Exploratory Data Analysis. *Methods Inf. Med.* 26(02):77–88
5. Ahfeldt T, Ordureau A, Bell C, Sarrafha L, Sun C, et al. 2020. Pathogenic Pathways in Early-Onset Autosomal Recessive Parkinson's Disease Discovered Using Isogenic Human Dopaminergic Neurons. *Stem Cell Rep.* 14(1):75–90
6. Akaike N, Harata N. 1994. Nystatin perforated patch recording and its applications to analyses of intracellular mechanisms. *Jpn. J. Physiol.* 44(5):433–73
7. Ascherio A, Schwarzschild MA. 2016. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* 15(12):1257–72
8. Bai JJ, Safadi SS, Mercier P, Barber KR, Shaw GS. 2013. Ataxin-3 is a multivalent ligand for the parkin Ubl domain. *Biochemistry.* 52(42):7369–76
9. Barone P. 2010. Neurotransmission in Parkinson's disease: beyond dopamine. *Eur. J. Neurol.* 17(3):364–76
10. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, et al. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 315(5819):1709–12
11. Beasley SA, Hristova VA, Shaw GS. 2007. Structure of the Parkin in-between-ring domain provides insights for E3-ligase dysfunction in autosomal recessive Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(9):3095–3100

12. Beevers JE, Caffrey TM, Wade-Martins R. 2013. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived dopaminergic models of Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 41(6):1503–8
13. Beevers JE, Lai MC, Collins E, Booth HDE, Zambon F, et al. 2017. MAPT Genetic Variation and Neuronal Maturity Alter Isoform Expression Affecting Axonal Transport in iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Rep.* 9(2):587–99
14. Ben Jehuda R, Shemer Y, Binah O. 2018. Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Rev. Rep.* 14(3):323–36
15. Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. 2020. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 19(2):170–78
16. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, et al. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 326(5959):1509–12
17. Bogetofte H, Jensen P, Ryding M, Schmidt SI, Okarmus J, et al. 2019. PARK2 Mutation Causes Metabolic Disturbances and Impaired Survival of Human iPSC-Derived Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 13:
18. Borsche M, Klein C. 2018. Morbus Parkinson. *Med. Genet.* 30(2):267–73
19. Branch SY, Chen C, Sharma R, Lechleiter JD, Li S, Beckstead MJ. 2016. Dopaminergic Neurons Exhibit an Age-Dependent Decline in Electrophysiological Parameters in the MitoPark Mouse Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 36(14):4026–37
20. Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, et al. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 321(5891):960–64
21. Brüggemann N, Klein C. 1993. Parkin Type of Early-Onset Parkinson Disease. In *GeneReviews®*, ed MP Adam, HH Ardinger, RA Pagon, SE Wallace, LJ Bean, et al. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
22. Burchell VS, Nelson DE, Sanchez-Martinez A, Delgado-Camprubi M, Ivatt RM, et al. 2013. The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat. Neurosci.* 16(9):1257–65
23. Burman JL, Yu S, Poole AC, Decal RB, Pallanck L. 2012. Analysis of neural subtypes reveals selective mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons from parkin mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(26):10438–43

24. Byrd RA, Weissman AM. 2013. Compact Parkin only: insights into the structure of an autoinhibited ubiquitin ligase. *EMBO J.* 32(15):2087–89
25. Caiazza MC, Lang C, Wade-Martins R. 2020. What we can learn from iPSC-derived cellular models of Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 252:3–25
26. Calatayud C, Carola G, Fernández-Carasa I, Valtorta M, Jiménez-Delgado S, et al. 2019. CRISPR/Cas9-mediated generation of a tyrosine hydroxylase reporter iPSC line for live imaging and isolation of dopaminergic neurons. *Sci. Rep.* 9(1):1–9
27. Carbone C, Costa A, Provensi G, Mannaioni G, Masi A. 2017. The Hyperpolarization-Activated Current Determines Synaptic Excitability, Calcium Activity and Specific Viability of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 11:
28. Carlson C, Koonce C, Aoyama N, Einhorn S, Fiene S, et al. 2013. Phenotypic screening with human iPS cell-derived cardiomyocytes: HTS-compatible assays for interrogating cardiac hypertrophy. *J. Biomol. Screen.* 18(10):1203–11
29. Chai C, Lim K-L. 2013. Genetic Insights into Sporadic Parkinson's Disease Pathogenesis. *Curr. Genomics.* 14(8):486–501
30. Chambers SM, Studer L. 2011. Cell fate plug and play: direct reprogramming and induced pluripotency. *Cell.* 145(6):827–30
31. Chan CS, Glajch KE, Gertler TS, Guzman JN, Mercer JN, et al. 2011. HCN Channelopathy in External Globus Pallidus Neurons in Models of Parkinson's Disease. *Nat. Neurosci.* 14(1):85–92
32. Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ, Kolawa NJ, et al. 2011. Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* 20(9):1726–37
33. Chang D, Nalls MA, Hallgrímsdóttir IB, Hunkapiller J, van der Brug M, et al. 2017. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nat. Genet.* 49(10):1511–16
34. Chaugule VK, Burchell L, Barber KR, Sidhu A, Leslie SJ, et al. 2011. Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J.* 30(14):2853–67
35. Chen W, Huang Q, Ma S, Li M. 2019. *Progress in Dopaminergic Cell Replacement and Regenerative Strategies for Parkinson's Disease* | *ACS Chemical Neuroscience*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021>

36. Chia SJ, Tan E-K, Chao Y-X. 2020. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21(7):
37. Chrysaftides SM, Bordes S, Sharma S. 2021. Physiology, Resting Potential. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
38. Chu H, Zhen X. 2010. Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the regulation of midbrain dopamine systems. *Acta Pharmacol. Sin.* 31(9):1036–43
39. Chung KKK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, et al. 2001. Parkin ubiquitinates the  $\alpha$ -synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat. Med.* 7(10):1144–50
40. Cobb MM, Ravisankar A, Skibinski G, Finkbeiner S. 2018. iPSC cells in the study of PD molecular pathogenesis. *Cell Tissue Res.* 373(1):61–77
41. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, et al. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339(6121):819–23
42. Cookson MR. 2005. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74:29–52
43. Cookson MR, Lockhart PJ, McLendon C, O'Farrell C, Schlossmacher M, Farrer MJ. 2003. RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein. *Hum. Mol. Genet.* 12(22):2957–65
44. Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, et al. 2006.  $\alpha$ -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Science.* 313(5785):324–28
45. Covey E, Carter M, eds. 2015. *Basic Electrophysiological Methods*. Oxford, New York: Oxford University Press. 240 pp.
46. Daubner SC, Le T, Wang S. 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508(1):1–12
47. Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron.* 39(6):889–909
48. De Virgilio A, Greco A, Fabbrini G, Inghilleri M, Rizzo MI, et al. 2016. Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmun. Rev.* 15(10):1005–11
49. Dean R. 1941. Theories of electrolyte equilibrium in muscle. *Biol. Symp.*
50. Dehay B, Martinez-Vicente M, Caldwell GA, Caldwell KA, Yue Z, et al. 2013. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28(6):725–32

51. Deng H, Le W-D, Hunter CB, Ondo WG, Guo Y, et al. 2006. Heterogeneous phenotype in a family with compound heterozygous parkin gene mutations. *Arch. Neurol.* 63(2):273–77
52. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. 2016. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Idiopathisches Parkinson-Syndrom
53. Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, et al. 2020. Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nat. Commun.* 11(1):3369
54. Draoui A, El Hiba O, Aimrane A, El Khiaat A, Gamrani H. 2020. Parkinson's disease: From bench to bedside. *Rev. Neurol. (Paris)*
55. Dufour MA, Woodhouse A, Amendola J, Goillard J-M. 2014. Non-linear developmental trajectory of electrical phenotype in rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons. *eLife.* 3:e04059
56. Duty S, Jenner P. 2011. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br. J. Pharmacol.* 164(4):1357–91
57. Ekstrand MI, Galter D. 2009. The MitoPark Mouse - an animal model of Parkinson's disease with impaired respiratory chain function in dopamine neurons. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15 Suppl 3:S185-188
58. Engle SJ, Blaha L, Kleiman RJ. 2018. Best Practices for Translational Disease Modeling Using Human iPSC-Derived Neurons. *Neuron.* 100(4):783–97
59. Falk S, Karow M. 2018. Natural and forced neurogenesis: similar and yet different? *Cell Tissue Res.* 371(1):181–87
60. Fallon L, Bélanger CML, Corera AT, Kontogiannea M, Regan-Klapisz E, et al. 2006. A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat. Cell Biol.* 8(8):834–42
61. Farrer M, Wavrant-De Vrieze F, Crook R, Boles L, Perez-Tur J, et al. 1998. Low frequency of alpha-synuclein mutations in familial Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 43(3):394–97
62. Fenwick EM, Marty A, Neher E. 1982. A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol.* 331:577–97

63. Finney N, Walther F, Mantel P-Y, Stauffer D, Rovelli G, Dev KK. 2003. The cellular protein level of parkin is regulated by its ubiquitin-like domain. *J. Biol. Chem.* 278(18):16054–58
64. Franz D, Olsen HL, Klink O, Gimsa J. 2017. Automated and manual patch clamp data of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons. *Sci. Data.* 4(1):170056
65. Gambardella C, Pignatelli A, Belluzzi O. 2012. The h-Current in the Substantia Nigra pars Compacta Neurons: A Re-examination. *PLOS ONE.* 7(12):e52329
66. Garber K. 2015. RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 33(9):890–91
67. García-Sanz P, Orgaz L, Bueno-Gil G, Espadas I, Rodríguez-Traver E, et al. 2017. N370S-GBA1 mutation causes lysosomal cholesterol accumulation in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 32(10):1409–22
68. Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, et al. 2003. Parkin-deficient Mice Exhibit Nigrostriatal Deficits but Not Loss of Dopaminergic Neurons \*. *J. Biol. Chem.* 278(44):43628–35
69. Golowasch J, Thomas G, Taylor AL, Patel A, Pineda A, et al. 2009. Membrane Capacitance Measurements Revisited: Dependence of Capacitance Value on Measurement Method in Nonisopotential Neurons. *J. Neurophysiol.* 102(4):2161–75
70. Gonzalez-Rodriguez P, Zampese E, Surmeier DJ. 2020. Selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 252:61–89
71. Gorman AL, Marmor MF. 1974. Steady-state contribution of the sodium pump to the resting potential of a molluscan neurone. *J. Physiol.* 242(1):35–48
72. Grace AA, Bunney BS. 1984. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 4(11):2877–90
73. Grace AA, Bunney BS. 1984. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 4(11):2866–76
74. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ. 2007. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci.* 30(5):220–27

75. Grace AA, Onn S-P. 1989. Morphology and Electrophysiological Properties of Immunocytochemically Identified Rat Dopamine Neurons Recorded in vitro. , p. 19
76. Grünewald A, Voges L, Rakovic A, Kasten M, Vandebona H, et al. 2010. Mutant Parkin Impairs Mitochondrial Function and Morphology in Human Fibroblasts. *PLoS ONE*. 5(9):
77. Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. 1958. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*. 182(4627):64–65
78. Hale CM, Cheng Q, Ortuno D, Huang M, Nojima D, et al. 2016. Identification of modulators of autophagic flux in an image-based high content siRNA screen. *Autophagy*. 12(4):713–26
79. Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, et al. 2012. Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Mol. Cell*. 45(3):292–302
80. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*. 391(2):85–100
81. Handel AE, Chintawar S, Lalic T, Whiteley E, Vowles J, et al. 2016. Assessing similarity to primary tissue and cortical layer identity in induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons through single-cell transcriptomics. *Hum. Mol. Genet*. 25(5):989–1000
82. Hattori N, Mizuno Y. 2017. Twenty years since the discovery of the parkin gene. *J. Neural Transm*. 124(9):1037–54
83. Hayashi S, Wakabayashi K, Ishikawa A, Nagai H, Saito M, et al. 2000. An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene. *Mov. Disord*. 15(5):884–88
84. He C, Chen F, Li B, Hu Z. 2014. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog. Neurobiol*. 112:1–23
85. Hedrich K, Kann M, Lanthaler AJ, Dalski A, Eskelson C, et al. 2001. The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in early-onset parkinsonism. *Hum. Mol. Genet*. 10(16):1649–56
86. Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, et al. 2002. Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. *Neurology*. 58(8):1239–46

87. Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:425–79
88. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. 2007. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology.* 68(5):326–37
89. Hodgkin AL, Huxley AF. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117(4):500–544
90. Holmes D. 2012. Stem cell scientists share 2012 Nobel Prize for medicine. *The Lancet.* 380(9850):1295
91. Horn R, Marty A. 1988. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.* 92(2):145–59
92. Hristova VA, Beasley SA, Rylett RJ, Shaw GS. 2009. Identification of a novel Zn<sup>2+</sup>-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *J. Biol. Chem.* 284(22):14978–86
93. Hu B-Y, Weick JP, Yu J, Ma L-X, Zhang X-Q, et al. 2010. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(9):4335–40
94. Huynh DP, Scoles DR, Nguyen D, Pulst SM. 2003. The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum. Mol. Genet.* 12(20):2587–97
95. Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. 2001. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell.* 105(7):891–902
96. Imai Y, Soda M, Takahashi R. 2000. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* 275(46):35661–64
97. Ishikawa T, Imamura K, Kondo T, Koshiba Y, Hara S, et al. 2016. Genetic and pharmacological correction of aberrant dopamine synthesis using patient iPSCs with BH4 metabolism disorders. *Hum. Mol. Genet.* 25(23):5188–97
98. Iwafuchi-Doi M, Zaret KS. 2014. Pioneer transcription factors in cell reprogramming. *Genes Dev.* 28(24):2679–92

99. Jeon BS, Kim J-M, Lee D-S, Hattori N, Mizuno Y. 2001. An Apparently Sporadic Case With Parkin Gene Mutation in a Korean Woman. *Arch. Neurol.* 58(6):988–89
100. Ji J, Ng SH, Sharma V, Neculai D, Hussein S, et al. 2012. Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 30(3):435–40
101. Jiang H, Ren Y, Yuen EY, Zhong P, Ghaedi M, et al. 2012. Parkin controls dopamine utilization in human midbrain dopaminergic neurons derived from induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 3:668
102. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143(7):1883–98
103. Joselin AP, Hewitt SJ, Callaghan SM, Kim RH, Chung Y-H, et al. 2012. ROS-dependent regulation of Parkin and DJ-1 localization during oxidative stress in neurons. *Hum. Mol. Genet.* 21(22):4888–4903
104. Kalia LV, Lang AE. 2015. Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* 386(9996):896–912
105. Kang J-F, Tang B-S, Guo J-F. 2016. The Progress of Induced Pluripotent Stem Cells as Models of Parkinson's Disease. *Stem Cells Int.* 2016:4126214
106. Kang S, Chen X, Gong S, Yu P, Yau S, et al. 2017. Characteristic analyses of a neural differentiation model from iPSC-derived neuron according to morphology, physiology, and global gene expression pattern. *Sci. Rep.* 7(1):1–11
107. Kann M, Jacobs H, Mohrmann K, Schumacher K, Hedrich K, et al. 2002. Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism. *Ann. Neurol.* 51(5):621–25
108. Kannarkat GT, Cook DA, Lee J-K, Chang J, Chung J, et al. 2015. Common Genetic Variant Association with Altered HLA Expression, Synergy with Pyrethroid Exposure, and Risk for Parkinson's Disease: An Observational and Case-Control Study. *NPJ Park. Dis.* 1:
109. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, et al. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392(6676):605–8
110. Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC, Scroggs R. 1999. Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9(6):690–97

111. Klein C, Djarmati A, Hedrich K, Schäfer N, Scaglione C, et al. 2005. PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur. J. Hum. Genet.* 13(9):1086–93
112. Klein C, Westenberger A. 2012. Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2(1):
113. Kopito RR. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10(12):524–30
114. Kriks S, Shim J-W, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, et al. 2011. Floor plate-derived dopamine neurons from hESCs efficiently engraft in animal models of PD. *Nature.* 480(7378):547–51
115. Kuffler SW, Nicholls JG. 1977. From Neuron to Brain: A Cellular Approach to the Function of the Nervous System. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* 62(3):287–287
116. Kumar S, Blangero J, Curran JE. 2018. Induced Pluripotent Stem Cells in Disease Modeling and Gene Identification. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 1706:17–38
117. Laperle AH, Sances S, Yucer N, Dardov VJ, Garcia VJ, et al. 2020. iPSC modeling of young-onset Parkinson's disease reveals a molecular signature of disease and novel therapeutic candidates. *Nat. Med.* 26(2):289–99
118. Lau LM de, Breteler MM. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5(6):525–35
119. Liang G, Zhang Y. 2013. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell.* 13(2):149–59
120. Lill CM. 2016. Genetics of Parkinson's disease. *Mol. Cell. Probes.* 30(6):386–96
121. Lill CM, Klein C. 2017. Epidemiologie und Ursachen der Parkinson-Erkrankung | SpringerLink. *Nervenarzt.* 88:345–55
122. Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, Kavvoura FK, Bagade S, et al. 2012. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet.* 8(3):e1002548
123. Lim K-L, Dawson VL, Dawson TM. 2006. Parkin-mediated lysine 63-linked polyubiquitination: a link to protein inclusions formation in Parkinson's and other conformational diseases? *Neurobiol. Aging.* 27(4):524–29

124. Lim K-L, Ng X-H, Grace LG-Y, Yao T-P. 2011. Mitochondrial Dynamics and Parkinson's Disease: Focus on Parkin. *Antioxid. Redox Signal.* 16(9):935–49
125. Liu M-L, Zang T, Zou Y, Chang JC, Gibson JR, et al. 2013. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat. Commun.* 4:2183
126. Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, Wood NW, Michele GD, et al. 2003. How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann. Neurol.* 54(2):176–85
127. Lücking C, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, et al. 2000. Association between Early-Onset Parkinson's Disease and Mutations in the Parkin Gene. *N. Engl. J. Med.* 342:1560–67
128. Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, et al. 2009. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(37):15768–73
129. Mahajani S, Raina A, Fokken C, Kügler S, Bähr M. 2019. Homogenous generation of dopaminergic neurons from multiple hiPSC lines by transient expression of transcription factors. *Cell Death Dis.* 10(12):898
130. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, et al. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(6):467–77
131. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramami Y, Morinaga C, et al. 2017. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 376(11):1038–46
132. Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO, Fields HL. 2006. The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J. Physiol.* 577(3):907–24
133. Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, et al. 2016. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 31(4):436–57
134. Matsuda T, Irie T, Katsurabayashi S, Hayashi Y, Nagai T, et al. 2019. Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion. *Neuron.* 101(3):472-485.e7
135. *MDSGene*. [www.mdsgene.org](http://www.mdsgene.org) (Datum des Zugriffs; 14.02.2023)

136. Mekhoubad S, Bock C, de Boer AS, Kiskinis E, Meissner A, Eggan K. 2012. Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. *Cell Stem Cell*. 10(5):595–609
137. Mertens J, Reid D, Lau S, Kim Y, Gage FH. 2018. Aging in a Dish: iPSC-Derived and Directly Induced Neurons for Studying Brain Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Genet.* 52:271–93
138. Mielke C, Krüger R. 2014. Aktuelles zu den genetischen Ursachen der Parkinson-Krankheit: Implikationen für die molekulare Pathogenese und Diagnostik. *J. Für Neurol. Neurochir. Psychiatr.* 15 (1):16–19
139. Mishima T, Fujioka S, Fukae J, Yuasa-Kawada J, Tsuboi Y. 2018. Modeling Parkinson's Disease and Atypical Parkinsonian Syndromes Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19(12):
140. Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, et al. 2010. Mechanisms of Genomic Instabilities Underlying Two Common Fragile-Site-Associated Loci, PARK2 and DMD, in Germ Cell and Cancer Cell Lines. *Am. J. Hum. Genet.* 87(1):75–89
141. Mohamed N-V, Larroquette F, Beitel LK, Fon EA, Durcan TM. 2019. One Step Into the Future: New iPSC Tools to Advance Research in Parkinson's Disease and Neurological Disorders. *J. Park. Dis.* 9(2):265–81
142. Molinoff PB, Axelrod J. 1971. Biochemistry of catecholamines. *Annu. Rev. Biochem.* 40:465–500
143. Molleman A. 2003. The Practice of Patch Clamping. In *Patch Clamping*, pp. 95–114. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd
144. Moore K, Persaud TVN, Torchia MG, Viebahn C. 2013. *Embryologie*. München: Urban & Fischer in Elsevier. 618 pp. 6. Auflage ed.
145. Moors T, Paciotti S, Chiasserini D, Calabresi P, Parnetti L, et al. 2016. Lysosomal Dysfunction and  $\alpha$ -Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease: Diagnostic Links. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 31(6):791–801
146. Mullin S, Schapira AHV. 2015. Pathogenic mechanisms of neurodegeneration in Parkinson disease. *Neurol. Clin.* 33(1):1–17
147. Muñoz E, Oliva R, Obach V, Martí MJ, Pastor P, et al. 1997. Identification of Spanish familial Parkinson's disease and screening for the Ala53Thr mutation of the alpha-synuclein gene in early onset patients. *Neurosci. Lett.* 235(1–2):57–60

148. Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, et al. 2014. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 46(9):989–93
149. Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183(5):795–803
150. Narendra D, Walker JE, Youle R. 2012. Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(11):
151. Nikitin ES, Malyshev AY, Balaban PM, Volgushev MA. 2016. [Physiological Aspects of the Application of Hodgkin-Huxley Model of Action Potential Initiation for Invertebrate and Vertebrate Neurons]. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I. P. Pavlova.* 66(3):279–88
152. Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, et al. 2012. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 72(6):893–901
153. Ohnuki M, Takahashi K. 2015. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370(1680):20140367
154. Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, et al. 2004. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron.* 44(4):595–600
155. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, et al. 2011. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature.* 476(7359):220–23
156. Park J-S, Blair NF, Sue CM. 2015. The role of ATP13A2 in Parkinson's disease: Clinical phenotypes and molecular mechanisms. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 30(6):770–79
157. Parkinson J. 2002. An Essay on the Shaking Palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 14(2):223–36
158. Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, et al. 2004. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(34):12543–48
159. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, et al. 2017. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primer.* 3:17013

160. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, et al. 1996. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*. 274(5290):1197–99
161. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, et al. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276(5321):2045–47
162. Prè D, Nestor MW, Sproul AA, Jacob S, Koppensteiner P, et al. 2014. A time course analysis of the electrophysiological properties of neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *PloS One*. 9(7):e103418
163. Rakovic A, Seibler P, Klein C. 2015. iPSC models of Parkin and PINK1. *Biochem. Soc. Trans.* 43:302–7
164. Rakovic A, Voß D, Vulinovic F, Meier B, Hellberg A-K, et al. 2022. Electrophysiological Properties of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Midbrain Dopaminergic Neurons Correlate With Expression of Tyrosine Hydroxylase. *Front. Cell. Neurosci.* 16:817198
165. Randow F, Youle RJ. 2014. Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria. *Cell Host Microbe*. 15(4):403–11
166. Riley BE, Loughheed JC, Callaway K, Velasquez M, Brecht E, et al. 2013. Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nat. Commun.* 4:1982
167. Robak LA, Jansen IE, van Rooij J, Uitterlinden AG, Kraaij R, et al. 2017. Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* 140(12):3191–3203
168. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. 2016. *Funktionelle Embryologie*. Stuttgart: Schattauer GmbH. 192 pp. 5., überarbeitete Auflage ed.
169. Rouhani F, Kumasaka N, Brito MC de, Bradley A, Vallier L, Gaffney D. 2014. Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLOS Genet.* 10(6):e1004432
170. Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, Kikuchi J, Yokoyama S, et al. 2003. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep.* 4(3):301–6
171. Salomonis N, Dexheimer PJ, Omberg L, Schroll R, Bush S, et al. 2016. Integrated Genomic Analysis of Diverse Induced Pluripotent Stem Cells from the Progenitor Cell Biology Consortium. *Stem Cell Rep.* 7(1):110–25

172. Sander JD, Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 32(4):347–55
173. Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, et al. 2013. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature.* 496(7445):372–76
174. Schaaf CP, Zschocke J. 2013. Mutationen und genetische Variabilität. In *Basiswissen Humangenetik*, ed CP Schaaf, J Zschocke, pp. 31–50. Berlin, Heidelberg: Springer
175. Scott WK. 1997. Genetic Complexity and Parkinson's Disease. *Science.* 277(5324):387–90
176. Scott WK, Yamaoka LH, Stajich JM, Scott BL, Vance JM, et al. 1999. The alpha-synuclein gene is not a major risk factor in familial Parkinson disease. *Neurogenetics.* 2(3):191–92
177. Segev A, Garcia-Oscos F, Kourrich S. 2016. Whole-cell Patch-clamp Recordings in Brain Slices. *J. Vis. Exp. JoVE*
178. Seirafi M, Kozlov G, Gehring K. 2015. Parkin structure and function. *FEBS J.* 282(11):2076–88
179. Shaltouki A, Sivapatham R, Pei Y, Gerencser AA. 2015. Mitochondrial Alterations by PARKIN in Dopaminergic Neurons Using PARK2 Patient-Specific and PARK2 Knockout Isogenic iPSC Lines | Elsevier Enhanced Reader. *Stem Cell Rep.* 4(5):847–59
180. Shimura H, Hattori N, Kubo S i, Mizuno Y, Asakawa S, et al. 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25(3):302–5
181. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, et al. 2001. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science.* 293(5528):263–69
182. Simmnacher K, Lanfer J, Rizo T, Kaendl J, Winner B. 2020. Modeling Cell-Cell Interactions in Parkinson's Disease Using Human Stem Cell-Based Models. *Front. Cell. Neurosci.* 13:
183. Singer SJ, Nicolson GL. 1971. The structure and chemistry of mammalian cell membranes. *Am. J. Pathol.* 65(2):427–37

184. Sloan SA, Darmanis S, Huber N, Khan T, Birey F, et al. 2017. Human Astrocyte Maturation Captured in 3D Cerebral Cortical Spheroids Derived from Pluripotent Stem Cells. *Neuron*. 95(4):779-790.e6
185. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, et al. 2009. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 136(5):964–77
186. Soldner F, Jaenisch R. 2012. *iPSC Disease Modeling* | *Science*. <https://science.sciencemag.org> (Datum des Zugriffs: 14.02.2023)
187. Soldner F, Laganière J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, et al. 2011. Generation of Isogenic Pluripotent Stem Cells Differing Exclusively at Two Early Onset Parkinson Point Mutations. *Cell*. 146(2):318–31
188. Song H, Stevens CF, Gage FH. 2002. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat. Neurosci*. 5(5):438–45
189. Sriram S, Li X, Ko H, Chung K, Wong E, et al. 2005. Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin. *Hum. Mol. Genet*. 14:2571–86
190. Stiles J, Jernigan TL. 2010. The Basics of Brain Development. *Neuropsychol. Rev*. 20(4):327–48
191. Studer L, Vera E, Cornacchia D. 2015. Programming and Reprogrammung Cellular Age in the Era of Induced Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 16(6):591–600
192. Subramaniam SR, Chesselet M-F. 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol*. 0:17–32
193. Sugiura M, Kasama Y, Araki R, Hoki Y, Sunayama M, et al. 2014. Induced Pluripotent Stem Cell Generation-Associated Point Mutations Arise during the Initial Stages of the Conversion of These Cells. *Stem Cell Rep*. 2(1):52–63
194. Sulzer D, Alcalay RN, Garretti F, Cote L, Kanter E, et al. 2017. T cells from patients with Parkinson's disease recognize  $\alpha$ -synuclein peptides. *Nature*. 546(7660):656–61
195. Sundberg M, Bogetofte H, Lawson T, Smith G, Astradsson A, et al. 2013. Improved cell therapy protocol for Parkinson's disease based on differentiation efficiency and safety of hESC-, hiPSC and non-human primate iPSC-derived DA neurons. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 31(8):1548–62

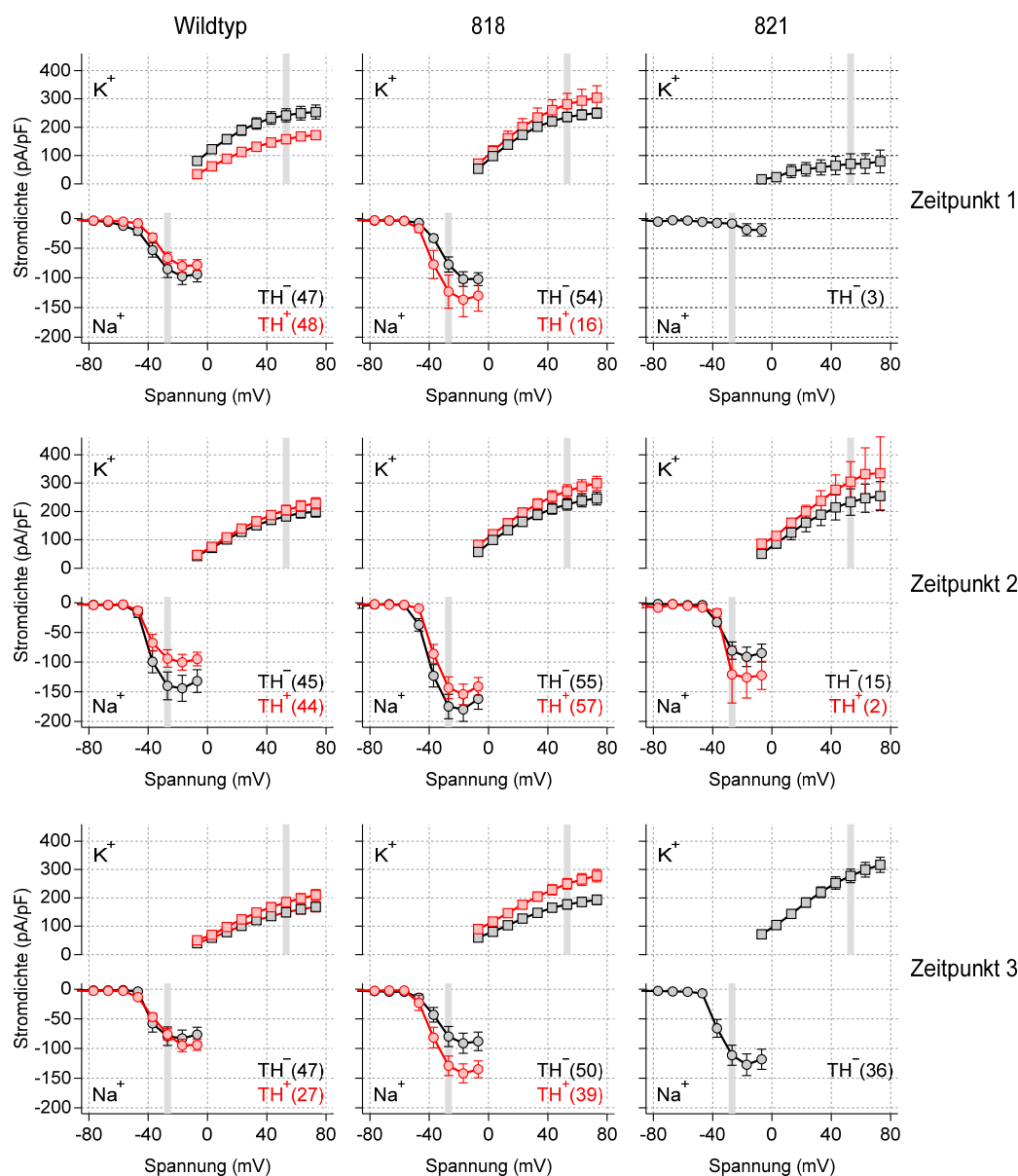
196. Takahashi J. 2019. Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's disease: an interview with Jun Takahashi. *Regen. Med.* 14(2):93–95
197. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131(5):861–72
198. Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126(4):663–76
199. Tan EK, Shen H, Tan JMM, Lim KL, Fook-Chong S, et al. 2005. Differential expression of splice variant and wild-type parkin in sporadic Parkinson's disease. *Neurogenetics.* 6(4):179–84
200. Tao Y, Zhang S-C. 2016. Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 19(5):573–86
201. Tariq M, Liu H, Ibañez DP, Li Y, Chen S, et al. 2020. Generation of three induced pluripotent stem cell lines from a Parkinson's disease patient with mutant PARKIN (p. C253Y). *Stem Cell Res.* 45:101822
202. Tay S-P, Lim GGY, Yeo CWS, Lim K-L. 2011. *Parkin and Parkinson's Disease*. London: IntechOpen
203. Tepper JM, Trent F, Nakamura S. 1990. Postnatal development of the electrical activity of rat nigrostriatal dopaminergic neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 54(1):21–33
204. Thomas B, Beal MF. 2007. Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 16(R2):R183–94
205. Traxler L, Edenhofer F, Mertens J. 2019. Next-generation disease modeling with direct conversion: a new path to old neurons. *FEBS Lett.* 593(23):3316–37
206. Trempe J-F, Chen CX-Q, Grenier K, Camacho EM, Kozlov G, et al. 2009. SH3 domains from a subset of BAR proteins define a Ubl-binding domain and implicate parkin in synaptic ubiquitination. *Mol. Cell.* 36(6):1034–47
207. Trempe J-F, Fon EA. 2013. Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection. *Front. Neurol.* 4:
208. Trempe J-F, Sauvé V, Grenier K, Seirafi M, Tang MY, et al. 2013. Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science.* 340(6139):1451–55

209. Tysnes O-B, Storstein A. 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996*. 124(8):901–5
210. Vertes RP, Stackman RW, Jr, eds. 2011. *Electrophysiological Recording Techniques*. Totowa, NJ: Humana Press
211. Vicario-Abejón C, Collin C, Tsoulfas P, McKay RD. 2000. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur. J. Neurosci*. 12(2):677–88
212. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. 463(7284):1035–41
213. Volpato V, Webber C. 2020. Addressing variability in iPSC-derived models of human disease: guidelines to promote reproducibility. *Dis. Model. Mech*. 13(1):
214. Wang C, Lu R, Ouyang X, Ho MWL, Chia W, et al. 2007. Drosophila overexpressing parkin R275W mutant exhibits dopaminergic neuron degeneration and mitochondrial abnormalities. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. 27(32):8563–70
215. Wapinski OL, Vierbuchen T, Qu K, Lee QY, Chanda S, et al. 2013. Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell*. 155(3):621–35
216. Wauer T, Komander D. 2013. Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state. *EMBO J*. 32(15):2099–2112
217. Weinstein RS. 1969. Current concepts. The structure of cell membranes. *N. Engl. J. Med*. 281(2):86–89
218. Wernig M, Benninger F, Schmandt T, Rade M, Tucker KL, et al. 2004. Functional Integration of Embryonic Stem Cell-Derived Neurons In Vivo. *J. Neurosci*. 24(22):5258–68
219. Wright SH. 2004. Generation of resting membrane potential. *Adv. Physiol. Educ*. 28(4):139–42
220. Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, et al. 2009. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J. Clin. Invest*. 119(3):650–60
221. Yang N, Ng YH, Pang ZP, Südhof TC, Wernig M. 2011. Induced Neuronal (iN) Cells: How to Make and Define a Neuron. *Cell Stem Cell*. 9(6):517–25

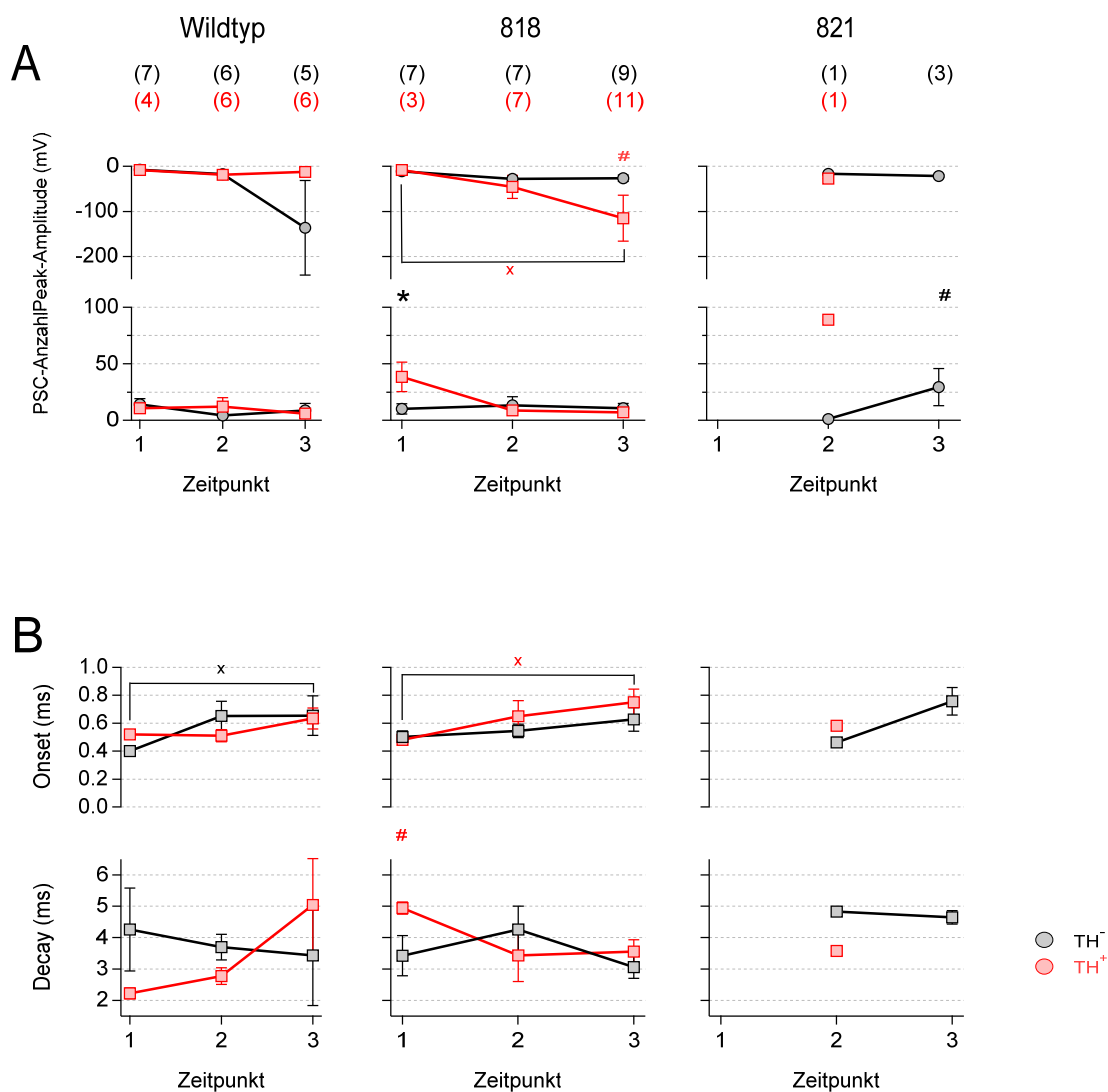
222. Yao Z, Mich JK, Ku S, Menon V, Krostag A-R, et al. 2017. A Single-Cell Roadmap of Lineage Bifurcation in Human ESC Models of Embryonic Brain Development. *Cell Stem Cell*. 20(1):120–34
223. Yoshihara M, Oguchi A, Murakawa Y. 2019. Genomic Instability of iPSCs and Challenges in Their Clinical Applications. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1201:23–47
224. Zanon A, Kalvakuri S, Rakovic A, Foco L, Guida M, et al. 2017. SLP-2 interacts with Parkin in mitochondria and prevents mitochondrial dysfunction in Parkin-deficient human iPSC-derived neurons and Drosophila. *Hum. Mol. Genet.* 26(13):2412–25
225. Zhang D, Stumpo DJ, Graves JP, DeGraff LM, Grissom SF, et al. 2006. Identification of potential target genes for RFX4\_v3, a transcription factor critical for brain development. *J. Neurochem.* 98(3):860–75
226. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, et al. 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 44(4):601–7
227. Zuo L, Motherwell MS. 2013. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene*. 532(1):18–23

## 8. Anhang

### 8.1. Weiterführende Abbildungen



**Abbildung 22. Schaltverhalten der  $\text{Na}_v$ - und  $\text{K}_v$ -Kanäle und Spannungsabhängigkeit der Stromdichten** Kurze Spannungspulse zwischen  $-47 \text{ mV}$  und  $-17 \text{ mV}$  triggern vorwiegend transiente Einwärtsströme, wie sie für  $\text{Na}_v$ -Kanäle typisch sind. Ab einer Spannung von etwa  $-7 \text{ mV}$  aktivieren zusätzlich  $\text{K}_v$ -Kanäle, welche einen nicht-inaktivierenden Auswärtsstrom generieren. Grau hinterlegt sind die Stromantworten der Spannungspulse, welche die Zelle auf  $-27 \text{ mV}$  beziehungsweise auf  $73 \text{ mV}$  depolarisierten. Um den Vergleich unterschiedlich großer Zellen möglich zu machen, wurden die Stromamplituden auf die Membrankapazität der Zelle normiert, woraus Stromdichten resultierten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte, verbunden mit durchgezogenen Linien. Die Anzahlen experimenteller Replikate sind in Klammern angegeben.



**Abbildung 23. Weiterführende Analysen der postsynaptischen Ströme.** (A) Vergleich der Anzahl der PSCs pro Linie sowie maximaler Amplitude. (B) Darstellung von *onset* und *decay* der PSCs (Zeit, die ein postsynaptischer Strom benötigte, um von der Ausgangsspannung ausgehend zu fallen bzw. zu steigen). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte, verbunden mit durchgezogenen Linien. Die Anzahlen experimenteller Replikate sind in Klammern angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen TH<sup>-</sup>- und TH<sup>+</sup>-Zellen innerhalb einer Linie wurden mit \*, zwischen Zeitpunkt 1 und 3 mit x und zwischen Wildtyplinie und den Linien 818 sowie 821 mit # markiert. Für die Signifikanzniveaus gilt: \*/#/x P < 0,05.

## 8.2. Chemikalien

Ascorbinsäure (AA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chlorwasserstoff (HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA
DAPT (γ-Sekretase-Inhibitor IX)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
D-Glucose (Glc)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin (Gln)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Mg-ATP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N <sub>2</sub> -Supplement (N <sub>2</sub> )	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Na <sub>2</sub> -GTP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Neurobasal Medium	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NeuroCult SM1 Neuronal Supplement (B27)	Stemcell Technologie, Vancouver, Kanada
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RTV615 1 Lb Kit	Momentive Performance Materials Inc., Waterford, NY, USA
Silikongummiverbindung RTV 615-A und -B	Momentive Performance Materials Inc., Waterford, NY, USA
Transforming Growth Factor Beta 3 (TGF β3)	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA

### 8.3. Wachstumsfaktoren

AA	0.2 mM, gelöst in Aqua Dest.
BDNF	20 ng/ml, gelöst in steriler PBS mit 0.1 % BSA
cAMP	0.5 mM, gelöst in Aqua Dest.
DAPT	10 $\mu$ M, gelöst in DMSO
GDNF	20 ng/ml, gelöst in sterilem PBS mit 0.1 % BSA
TGF $\beta$ 3	1 ng/ml, gelöst in 4 mM HCl + 1 mg/ml BSA

### 8.4. Lösungen und Medien

#### Badlösung

120 mM	NaCl
3 mM	KCl
2,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
30 mM	HEPES
15 mM	Glucose

Die Lösung wurde steril filtriert. Nach Einstellung des pH auf 7,4 mit NaOH wurde sie bei 4 °C kühl gelagert.

#### Pipettenlösung

125 mM	KCl
8 mM	NaCl
1 mM	CaCl <sub>2</sub>
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	EGTA
10 mM	HEPES

Die Lösung wurde steril filtriert und der pH mit KOH auf 7,3 eingestellt. Bis zur Fertigstellung wurde dieser Lösungsansatz bei 4 °C gelagert. Zur Vervollständigung des Herstellungsprozesses wurden zusätzlich 0,4 mM Na<sub>2</sub>-GTP sowie 4 mM Mg-ATP hinzugegeben.

Die fertiggestellte Lösung wurde in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

**NB/B27-Medium**

Neurobasal Medium

2 % NeuroCult SM1 Neuronal Supplement (B27)

2 mM L-Glutamin

1 % Penicillin-Streptomycin

**8.5. Verbrauchsmaterialien**

Einmalhandschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim Meditrade, Kiefersfelden
Einmalspritzen	BD Discardit II, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Kapillaren	Borosilikatglas (1.5 - 1.8 x 100 mm), Kimble Chase, Vineland, NJ, USA
Multiwellplatten	24 Well-Multiwellplatten, Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Pipetten	Pasteurpipetten aus Kalk-Soda-Glas, Labsolute, Renningen
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht Labsolute, Th. Geyer, Renningen Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Wischtücher	Wypall, Kimberly-Clark, Irving, TX, USA

**8.6. Geräte**

Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Fluoreszenzlampe	pE-300ultra, CoolLED Limited, Andover, UK
Gefriertruhe (-20 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Heißluftsterilisator	Heißluftsterilisator ST 6120, Heraeus, Hanau
Heizplatte	Hotplate Stirrer Benchmark Scientific, Edison, NJ, USA
Inkubator	CO <sub>2</sub> -Inkubator Eppendorf Galaxy 170 S, Eppendorf, Hamburg
Kamera	DocuLUX camera system, HEKA Elektronik, Lambrecht
Kühlaggregat	Exos Liquid Cooling System, Koolance, Auburn, WA, USA
Labornetzgerät	RND 320-KA3005P, Distrelec Group, Nänikon, Schweiz
Lötlampe	Soudogaz X 2000 PZ, Newell Brands, Atlanta, GA, USA
Magnetrührer	Combimag RCH, IKA, Staufen
Messtisch	TMC Vibration Control mit Gimbal Piston ® -Technologie,

	Ametek, Berwyn, PA, USA
Mikromanipulator	Multi-Micromanipulator Systems MPC-200, Sutter Instrument, Novato, CA, USA
Mikropipettenziehgerät	P-1000 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument, Novato, CA, USA
Mikroschmiede	L/M-CPZ 101, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen
Mikroskope	Inverses Mikroskop Axio Vert.A1, Carl Zeiss, Jena Leica DMI1, Leica Camera, Wetzlar Zeiss ID 03, Carl Zeiss, Jena
Perfusionsregelung	MPCU, Lorenz Messgerätebau, Kaltenburg-Lindau
pH-Meter	SevenCompact, pH S220-Basic, Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA
Pipetten	Research Plus Einkanalpipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer	Pipetus akku (230 V), Hirschmann, Eberstadt
Sterilwerkbank	Thermo Scientific Safe 2020, Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
Temperaturregelung	Single Channel Temperature Controller PTC-10, npi electronic GmbH, Tamm
Verstärker	EPC 10 USB <i>Single Patch Clamp Amplifier</i> , HEKA Elektronik, Lambrecht
Vortexmischer	Mini Vortex Mixer, Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
Waage	ABT 100-5M, Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad	VWB2, VWR International, Radnor, PA, USA

## 8.7. Software

DocuLUX Software	HEKA Elektronik, Lambrecht
FitMaster	HEKA Elektronik, Lambrecht
Igor Pro 8	WaveMetrics, Portland, OR, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
PatchMaster	HEKA Elektronik, Lambrecht
SPSS Statistics 21/27	IBM, Armonk, NY, USA

## 9. Danksagung

An dieser Stelle gilt mein großer Dank all denen, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit in verschiedenster Weise unterstützt und motiviert haben.

Zunächst danke ich Prof. Dr. Carla Nau und Prof. Dr. Christine Klein herzlich für die Möglichkeit zur Forschung und für die bereitgestellten Arbeitsmöglichkeiten.

Mein großer Dank gilt Prof. Enrico Leipold für die Möglichkeit, dieses spannende Thema zu bearbeiten und in ganz besonderer Hinsicht für die hervorragende zeitintensive und persönliche Betreuung und Beantwortung all meiner Fragen.

Ich bedanke mich bei Dr. Aleksander Rakovic und dem Institut für Neurogenetik für die Unterstützung und Kooperation, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Insbesondere möchte ich Britta Meier für die Herstellung der iPS-Zellen und die herausragende Unterstützung bei der weiteren Versorgung dieser danken.

Von Herzen möchte ich gegenüber allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der *AG Neuroscience in Anesthesiology* meinen Dank ausdrücken. Danke für euren fachlichen Rat, die tatkräftige Unterstützung und für zahlreiche Motivationsschübe durch die Freitagsplanungen - ohne Euch wäre meine Zeit im Labor nur halb so schön gewesen. Ganz besonders danke ich Ann-Katrin Hellberg für ihre geduldige Einarbeitung, Anleitung und Unterstützung in labor- und zelltechnischen Belangen, sowie für ihre emotionale Unterstützung.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, und meinen Freunden, die mich stets ermutigt haben und durch sämtliche Höhen und Tiefen bei der Erstellung dieser Arbeit mit mir gegangen sind.

## 10. Lebenslauf