

*Johannes Jungverdorben, Andreas Till, Oliver Brüstle*

### 3.2 Modellierung neurodegenerativer Erkrankungen mittels induziert pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen): ein Fokus auf Autophagie<sup>6</sup>

Zusammengefasst und aus dem Englischen übersetzt von Lilian Marx-Stölting

Die ca. 200 verschiedenen Zelltypen des Körpers unterscheiden sich unter anderem darin, welche Gene ihres Genoms abgelesen werden und welche nicht, was auch als „genetisches Programm“ der Zelle bezeichnet wird. So unterscheidet sich das genetische Programm von Hautzellen deutlich von dem einer Blut- oder Nervenzelle. Neuere Methoden ermöglichen jedoch eine zelluläre Reprogrammierung, also die Überführung einer ausdifferenzierten Zelle mit einem bestimmten genetischen Programm in einen weniger differenzierten Zustand, aus dem dann durch Zugabe bestimmter Faktoren wiederum andere Zelltypen differenziert werden können. Derartige induziert pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) haben die Fähigkeit, sich in Derivative aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) zu entwickeln, wodurch es theoretisch möglich ist, jeden somatischen Zelltyp (also alle Körperzellen) in unbegrenzter Zahl in vitro zu züchten. Auf diese Weise können heute bereits aus Fibroblasten aus Hautbiopsien oder Blutzellen von Patienten und gesunden Spendern iPS-Zellen gewonnen und anschließend in gewebspezifische Zellen einschließlich Neurone und Gliazellen ausgereift werden. Dieser Ansatz eignet sich unter anderem dafür, krankheitsspezifische Phänotypen unter klassischen Zellkulturbedingungen darzustellen, zelluläre und molekulare Pathomechanismen zu untersuchen und Wirkstoffe direkt an von der jeweiligen Erkrankung betroffenen Zelltypen zu erproben. Anders als pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die aus Embryonen gewonnen werden müssen, können iPS-Zellen aus Körperzellen jedes Patienten oder gesunden Spenders generiert werden. Dadurch eröffnen sich auch neue Möglichkeiten für die Herstellung patienteneigener Spenderzellen für den Zellersatz und die regenerative Medizin.

<sup>6</sup> Dieser Beitrag ist eine deutsche Zusammenfassung des Review-Artikels „Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy“ von Johannes Jungverdorben, Andreas Till und Oliver Brüstle, der eine umfangreiche Darstellung des wissenschaftlichen Sachstands und der aktuellen Literatur zum Thema (Stand Frühjahr 2017) bietet. Der Artikel ist im Juli 2017 im *Journal of Molecular Medicine* (95/7: 705–718) erschienen und kostenfrei öffentlich zugänglich unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-017-1533-5> [19.10.2017]

### 3.2.1 Die Autophagie als zentraler Prozess der zellulären Homöostase

Als Autophagie bezeichnet man eine Gruppe zellulärer Prozesse, durch die Zellen eigene Bestandteile abbauen und verwerten können. Die überflüssigen, geschädigten und möglicherweise zytotoxischen zellulären Bestandteile werden dabei über verschiedene Wege in sogenannte Lysosomen transportiert und dort verdaut. Lysosomen sind Zellorganellen in tierischen Zellen, die von einer Biomembran umschlossen sind und Verdauungsenzyme enthalten. Der Begriff „Autophagie“ (von griech. „auto = selbst“ und „phagein = essen“) ist also ein Überbegriff für Prozesse, die den Transport von Zellmaterial in die Lysosomen zum Abbau beinhalten.

Das Phänomen der Autophagie kann in vier verschiedene Varianten unterteilt werden, von denen die Makroautophagie bei Säugern am besten erforscht ist und deshalb im Rahmen der hier zusammengefassten Studie vereinfachend mit dem Begriff „Autophagie“ beschrieben wird. Der Prozess der Makroautophagie ist gekennzeichnet durch die Ausbildung einer dreidimensional gebogenen Struktur (die Phagophore), die einen Teil des Zytoplasmas inklusive der darin enthaltenen Proteinaggregate, Organellen (oder Teile von Organellen) und sogar intrazellulären Pathogene umschließt. Der Inhalt eines derart gebildeten „Autophagosoms“ wird durch Fusion mit einem Lysosom dem Abbau zugeführt. Dabei steuern mit der Autophagie assoziierte Gene („autophagy related genes“, ATGs) den molekularen Mechanismus dieses Prozesses. Darunter ist etwa das Gen ATG12, das mit anderen Produkten von ATGs einen Komplex bildet, der für die Autophagie in Säugerzellen von zentraler Bedeutung ist. Ein weiterer Mechanismus führt zur Bildung des mit einer Fettsäure verknüpften Proteins LC3-II, das als zuverlässiger Marker für Säuger-Autophagosomen fungiert und dessen Vorkommen in der Zelle mit der Anzahl von Autophagosomen korreliert.

Autophagie ist für die neuronale Entwicklung und den neuronalen Stoffwechsel von großer Bedeutung. Werden bestimmte ATGs im Zentralnervensystem von Mäusen gezielt ausgeschaltet, kommt es zu neurodegenerativen Veränderungen und zur Ausbildung intraneuronaler Proteineinschlüsse (Aggregate). Aus diesem Grund werden Autophagiedefekte als *ein* wichtiges Schlüsselement für die Manifestation neurodegenerativer Erkrankungen angesehen.

Tatsächlich deutet vieles darauf hin, dass eine Beeinträchtigung der Autophagie für die Pathogenese (also die Entstehung und Entwicklung) neurodegenerativer Krankheiten von großer Bedeutung ist. So führen mit bestimmten neurodegenerativen Erkrankungen assoziierte genetische Varianten prädisponierender Faktoren häufig zur Störung der Regulation autophagisch-lysosomaler Abbauprozesse. Eine Dysregulation der Autophagie kann dabei zur Ansammlung von potenziell neurotoxischen Produkten,

wie etwa Proteinaggregaten und deren Vorläufern oder nicht mehr funktionsfähigen Mitochondrien<sup>7</sup> führen.

Sowohl für die Entdeckung der für die Autophagie verantwortlichen Proteinmaschinerie als auch für die Entwicklung von iPS-Zellen wurden Nobelpreise verliehen: 2012 erhielten Shinya Yamanaka und Sir John B. Gurdon gemeinsam den Nobelpreis für die Entdeckung von Reprogrammierungstechnologien, und im Jahre 2016 wurde der Japaner Yoshinori Ohsumi für die Beschreibung der Autophagiemaschinerie mit dem Nobelpreis geehrt.

Die hier zusammengefasste Übersichtsarbeit beschreibt den aktuellen Stand iPS-Zell-basierter Studien zu Störungen der Autophagie im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen. Diese umfassen unter anderem Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, die frontotemporale Demenz und die amyotrophe Lateralsklerose sowie die Niemann-Pick Erkrankung Typ C. In den aufgeführten aktuellen Studien wird eindrücklich belegt, wie mittels der iPS-Zell-Technologie auch subtile pathologische Veränderungen in subzellulären Prozessen dargestellt und mechanistisch aufgeklärt werden können.

### 3.2.2 Morbus Parkinson

Die Parkinson'sche Krankheit ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung und betrifft circa 2 % der Bevölkerung über 60 Jahren. Klinische Symptome umfassen Tremor (Zittern), eine Verlangsamung der Bewegungen und Steifheit der Gliedmaßen. Im Kontext der Erkrankung kommt es zu einem fortschreitenden Verlust von Dopamin-bildenden Nervenzellen in der sogenannten *Substantia nigra* im Mittelhirn. Auffällig ist dabei das Auftreten von intrazytoplasmatischen Einschlüssen (sogenannten Lewy-Körpern) in überlebenden Neuronen, die überwiegend aus dem neuronalen Protein Alpha-Synuklein bestehen. Circa 90 % der Parkinsonfälle treten sporadisch ohne direkt erkennbare genetische Ursachen auf. Die verbleibenden 10 % der Fälle finden sich gehäuft in Familien und beruhen auf spezifischen Mutationen in genau definierten Krankheitsgenen. Für die meisten dieser Mutationen wurden inzwischen aus iPS-Zellen abgeleitete Neurone hergestellt. Dazu gehören Mutationen in den Genen *LRRK2*, *GBA1*, *PINK1* und *Parkin/PARK2*, die alle im Zusammenhang mit unterschiedlichen Schritten des Autophagieprozesses beziehungsweise der selektiven Autophagie von Mitochondrien (ein komplexer Prozess, der als „Mitophagie“ bezeichnet wird) stehen. So wurde zum Beispiel mithilfe von iPS-Zellen gezeigt, dass eine bekannte Mutation des Mor-

<sup>7</sup> Mitochondrien sind Zellorganellen in eukaryontischen Zellen, die für den Energiehaushalt der Zellen von zentraler Bedeutung sind. Eukaryontische Zellen sind alle Zellen mit Zellkern, also keine Bakterien oder Archaeobakterien, die analog als „Prokaryonten“ bezeichnet werden.

bus-Parkinson-Risikogens *LRRK2* dazu führt, dass geschädigte Mitochondrien innerhalb der Zelle unkontrolliert transportiert werden, sodass die Zelle keine Gelegenheit hat, den Schaden durch Abbau über Mitophagie zu kompensieren.

### 3.2.3 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer'sche Krankheit ist die häufigste Form der Demenz und zugleich die häufigste neurodegenerative Erkrankung. Klinisch steht ein zunehmender Verlust des Erinnerungsvermögens und anderer kognitiver Prozesse im Vordergrund. Neuropathologisch kommt es zu Ablagerungen im Gehirngewebe, den sogenannten „amyloiden Plaques“. Zudem treten innerhalb von Nervenzellen Neurofibrillenbündel („neurofibrillary tangles“)<sup>8</sup> auf, die unter anderem Transportprozesse in Hirnzellen stören. In Gehirnen von Alzheimerpatienten wurden Veränderungen in Autophagosomen und Lysosomen gefunden, die diesen paradigmatischen pathologischen Veränderungen vorangehen. Der Übersichtsartikel stellt verschiedene iPS-Zell-basierte Studien zu Alzheimer-assoziierten Mutationen vor. So konnte an iPS-Modellen unter anderem gezeigt werden, dass der Alzheimer-Risikofaktor Presenilin-1, der an der Bildung einer molekularen Protein-„Schere“ beteiligt ist, essenziell für die richtige Funktionsweise von Lysosomen und Autophagosomen ist.

### 3.2.4 Frontotemporale Demenz und amyotrophe Lateralsklerose

Die frontotemporale Demenz (FTD) oder Pick-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung, die Stirn- und Schläfenlappen des Gehirns zerstört. Die FTD wurde mit einer Reihe verschiedener Risikogene assoziiert (u. a. *C9ORF72*, *GRN*, *MAPT*). Einige dieser Mutationen (z. B. pathologische Verlängerungen von sich wiederholenden Sequenzen im Gen *C9ORF72*) manifestieren sich als Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Die Verbindung zwischen der Fehlfunktion dieser Gene und der Regulation von Autophagie scheint hierbei durch verschiedene Mechanismen vermittelt zu werden. Erst kürzlich konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das von *C9ORF72* kodierte Protein an der korrekten Ausbildung von Autophagosomen und somit an der Regulation von sehr frühen Schritten der Autophagie beteiligt ist. Wie die einzelnen Mutationen genau die beteiligten Prozesse stören, ist allerdings größtenteils noch unbekannt.

<sup>8</sup> Amyloide Plaques bestehen aus Proteinfragmenten, die im gesunden Körper abgebaut werden, sich bei Alzheimer jedoch zu harten, unauflösbaren Plaques ablagern. Auch Neurofibrillenbündel sind (faserförmige) Ablagerungen und bestehen aus Bestandteilen des Zytoskeletts der Hirnzellen. Sie stören unter anderem Transportprozesse in Hirnzellen.

### 3.2.5 Lysosomale Speichererkrankungen

Niemann-Pick Typ C ist ein Vertreter der großen Gruppe von sogenannten „lysosomalen Speichererkrankungen“, bei denen der Stoffwechsel innerhalb der Lysosomen durch verschiedene Enzymdefekte gestört ist. Bei Niemann-Pick Typ C handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Störung der Lysosomen, die in mehr als 95 % der Fälle durch eine Funktionsstörung des Gens *NPC1* ausgelöst wird. Der Verlust der NPC1-Funktion beeinflusst den Cholesterinstoffwechsel, was zu Schäden in Leber und Gehirn führt. Autophagie ist in den Fettstoffwechsel eingebunden, und der zelluläre Lipidgehalt beeinträchtigt die Fluktuation autophagosomaler Membranen. Daher ist es wahrscheinlich, dass Änderungen der Lipidzusammensetzung den Autophagieprozess beeinträchtigen.

### 3.2.6 Herausforderungen und Perspektiven

Im Gegensatz zu Studien an Mäusen, die in der Regel auf einem uniformen genetischen Hintergrund aufbauen, werden Untersuchungen an iPS-Zellen durch die hohe genetische Variabilität in der menschlichen Population beeinflusst. Zudem können sich einzelne, von demselben Spender gewonnene iPS-Zell-Linien geringfügig unterscheiden. Diese Variabilität kann das Erkennen von subtilen krankheitsbedingten Phänotypen erschweren. Aus diesem Grund werden zunehmend sogenannte isogene iPS-Zell-Linien eingesetzt, bei denen entweder Mutationen in Patienten-abgeleiteten iPS-Zellen repariert oder krankheits-assoziierte Mutationen gezielt in iPS-Zellen gesunder Spender ‚eingebaut‘ werden. Mit den jüngst entwickelten Methoden zur Genomeditierung wie zum Beispiel der CRISPR/Cas9-Technologie<sup>9</sup> (siehe Kapitel 4: Fehse) bieten sich hier Perspektiven für hocheffiziente genetische Modifikationen.

Offen bleibt die Frage, warum bestimmte Mutationen nur in neuronalen Zellen (und nicht in anderen differenzierten Körperzellen) zu Schäden führen, oftmals sogar konzentriert in bestimmten neuronalen Subtypen. Aus diesem Grund werden vergleichende Untersuchungen an verschiedenen, aus iPS-Zellen gewonnenen neuronalen Subtypen zunehmend bedeutsam. Obwohl bereits heute eine Vielzahl von Differenzierungsprotokollen zur Verfügung steht, sind hierfür weitere Fortschritte in der In-vitro-Spezifizierung definierter neuraler Subpopulationen erforderlich.

Die immer zahlreicher erscheinenden iPS-Zell-Studien verdeutlichen, dass dieser Ansatz sich zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der Erforschung neurodegenera-

<sup>9</sup> Die CRISPR/Cas9-Technologie verwendet eine Proteinmaschinerie, die ursprünglich als Abwehrmechanismus in Bakterien identifiziert wurde, um zielgenau DNA im humanen Genom zu schneiden und diese Schnittstelle für das Einführen von gezielten Veränderungen zu nutzen.

tiver Erkrankungen entwickelt hat. Diese Übersichtsarbeit zeigt, dass iPS-Zell-basierte Krankheitsmodelle erfolgreich genutzt werden können, um Autophagie-relevante Phänotypen zu erforschen, die mit verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten einhergehen. So können einerseits Autophagie-relevante Krankheitsmechanismen direkt an menschlichen Zellen erforscht, andererseits aber auch an anderen Modellsystemen entwickelte Hypothesen im Hinblick auf ihre Relevanz im humanen System geprüft werden. Schlüsselfragen für zukünftige Forschungsarbeiten werden sich zum Beispiel darauf beziehen, ob und bis zu welchem Grad Autophagie in verschiedenen neuronalen Subtypen unterschiedlich reguliert wird und wieso eine generelle Modulation der Autophagie zu spezifischen Effekten in individuellen zellulären Subtypen führt. Aus iPS-Zellen abgeleitete Neurone könnten möglicherweise auch genutzt werden, um die Rolle der Autophagie während des altersassoziierten Fortschreitens des neurodegenerativen Phänotyps zu untersuchen und zu prüfen, ob sich Alterungsprozesse durch die präzise Modulation autophagischer Stoffwechselwege verlangsamen lassen.

Guangming Wu, Lei Lei, Hans R. Schöler

### 3.3 Totipotenz im Mausmodell<sup>10</sup>

Zusammengefasst und aus dem Englischen übersetzt von Lilian Marx-Stöltzing

„Totipotenz“ ist die Eigenschaft einer Zelle, einen kompletten multizellulären Organismus hervorbringen zu können, der etwa beim Menschen aus mehr als 200 verschiedenen Gewebetypen besteht.<sup>11</sup> Bei Säugetieren ist es die Zygote (befruchtete Eizelle), aus der im Rahmen der geordnet verlaufenden Embryonalentwicklung alle Typen somatischer (Körper-)Zellen entstehen, und zwar sowohl Zellen in Geweben, die zum Embryo gehören, als auch solche, die extraembryonale Gewebe (Plazenta) bilden. Damit ist die Zygote die ultimative totipotente Zelle. Aus naturwissenschaftlicher Perspektive gibt es allerdings unterschiedlich strenge Kriterien für Totipotenz: zum einen im weiteren

**10** Dieser Beitrag ist eine deutsche Zusammenfassung des Review-Artikels „Totipotency in the mouse“ von Guangming Wu, Lei Lei und Hans R. Schöler, der eine umfangreiche Darstellung des wissenschaftlichen Sachstands und der aktuellen Literatur zum Thema (Stand Frühjahr 2017) bietet. Der Artikel ist im Juli 2017 im *Journal of Molecular Medicine* (95/7: 687–694) erschienen und kostenfrei öffentlich zugänglich unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-017-1509-5> [19.10.2017].

**11** Bei Pflanzen behalten strukturell und funktionell spezialisierte Zellen etwa aus Blättern, Wurzeln, Stamm oder Blüten die Fähigkeit, zum undifferenzierten Stadium zurück zu konvertieren und ganze neue Pflanzen hervorzubringen. Die Regeneration von Totipotenz aus isolierten einzelnen Pflanzenzellen ist inzwischen gut erforscht.