

## Erster Zwischenbericht

### **„Etablierung einer Plattform zur Testung von Mikrotubuli stabilisierenden Wirkstoffen zur Behandlung von SPG4-HSP“**

*Prof. Dr. med Beate Winner,*

*Tania Rizo M.Sc.*

*Stammzellbiologische Abteilung, Universitätsklinikum Erlangen,*

*Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 91054 Erlangen*

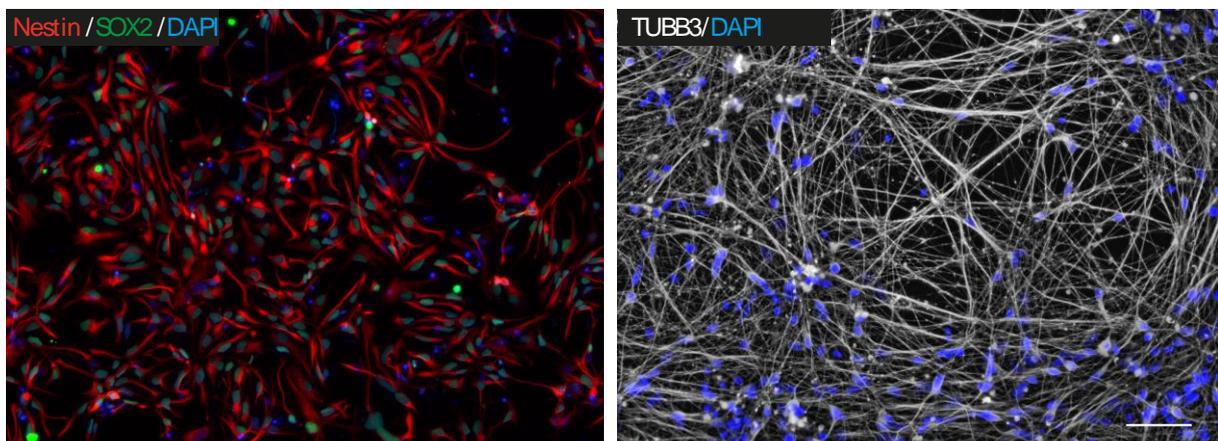
Wir haben uns riesig gefreut, dass unser Projekt das Interesse der Spender und der HSP-Gemeinschaft geweckt hat und möchten uns an dieser Stelle ganz herzlich für Ihre Unterstützung bedanken. Im Rahmen des Projekts werden wir Nervenzellen aus sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) generieren, welche aus Hautzellen „reprogrammiert“ worden sind. Auf diesen Nervenzellen werden wir dann unterschiedliche Wirkstoffe testen, welche die Mikrotubuli stabilisieren. Wir hoffen, mit dem Projekt eine robuste Messplattform zu etablieren, mit deren Hilfe wir in Zukunft den neuroprotektiven Effekt unterschiedlicher Substanzen besser bestimmen können.

#### **Auswahl der Zelllinien für die Analyse**

Für die Durchführung des Projekts haben wir uns für iPSZ entschieden, die aus Hautzellen von zwei HSP Patienten gewonnen wurden, die beide jeweils die identische Krankheit-verursachende Veränderung im SPAST Gen tragen. Als Kontrollen haben wir uns für iPSZ entschieden, die aus den Hautzellen von Gesunden Spendern gewonnen worden sind. Außerdem haben wir zusätzliche Kontrolllinien - sogenannte „isogene Linien“ - generiert, in denen wir mithilfe der CRISPR/Cas9-Technologie die Veränderung im SPAST-Gen in den Patientenzellen korrigiert haben.

#### **Vorarbeit: Generierung von neuronalen Vorläuferzellen**

Als ersten wichtigen Schritt haben wir in den letzten Monaten aus den SPAST-iPSZ, Kontroll-iPSZ und isogenen iPSZ-Linien sogenannte neuronale Vorläuferzellen (NPZ) generiert, die eine wichtige Vorstufe auf dem Weg zur Generierung reifer Nervenzellen darstellen. Die Qualität bzw. Reinheit dieser NPZ-Linien wurde anhand des Vorhandenseins der Markerproteine Nestin und SOX2 bestimmt (Abbildung 1 links). Hergestellte Linien mit einem geringen Anteil an Nestin und SOX2 positiven Zellen wurden daraufhin von der Studie ausgeschlossen.



**Abbildung 1.** Fluoreszenz-Immunfärbung von iPSZ abgeleiteten NPZ (links) und reifen Neuronen (rechts). NPZ wurden mit den neuronalen Stammzellmarker Nestin (rot) und SOX2 (grün) gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) sichtbar gemacht. Reife iPSZ abgeleitete Neurone wurden mit dem neuronalen Marker TUBB3 (weiß) gefärbt und die Zellkerne mit dem Zellkernmarker DAPI gefärbt. Maßstabsbalken: 50µm

Zwischen den so generierten NPZ-Linien kann es dennoch große Unterschiede hinsichtlich ihrem Potential zur Bildung reifer Nervenzellen geben. Daher haben wir in einem zweiten Schritt auch dieses „Differenzierungspotential“ bestimmt, indem wir jede der hergestellten NPZ Linien weiter zu Nervenzellen haben reifen lassen. Die Qualität dieser neuronalen Kulturen wurde anhand des neuronalen Markers TUBB3 bestimmt (Abbildung 1 rechts). Für das Projekt wurden dann die NPZ-Linien ausgewählt, die prozentuell den höchsten Anteil an TUBB3 positiven Zellen hervorgebracht haben.

### **Vorbereitung der Testparameter**

Für die Testung unterschiedlicher Substanzen auf Neuronen, die aus iPSZ Zellen generiert wurden, ist es wichtig die Parameter festzulegen, die wir in den finalen Schritten bei der Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen messen wollen. Als ersten Parameter haben wir uns für das Vorhandensein von sogenannten axonalen Schwellungen entschieden. Diese sind ein besonders interessanter Analyseparameter, da auch iPSZ Nervenzellen von SPAST Patienten diese Schwellungen aufweisen. Um unsere Messmethode zu kalibrieren und sicherzustellen, dass wir die axonalen Schwellungen messen können, haben wir Kontroll-Nervenzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Substanz behandelt, von der wir wissen, dass diese axonale Schwellungen induziert. In diesen Kulturen werden wir nun, in Abhängigkeit der Konzentration dieser Substanz, das Auftreten von axonale Schwellungen bestimmen. Auf diese Weise werden wir eine Verbesserung oder Verschlechterung messen zu können.

Um für die Auswertung eine Verblindung sicherzustellen wurde eine Studentische Hilfskraft eingearbeitet. Die Studentin wird gerade darin eingearbeitet die Anzahl an axonalen Schwellungen in den Nervenzellen auszuwerten.

### **Initiierung der Testung von Substanzen**

Die generierten NPZ-Linien wurden zur Lagerung eingefroren. Zwei Linien pro Gruppe werden nun aufgetaut und müssen über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen zu Nervenzellen reifen. Mit der Behandlung der SPAST und isogenen Kontroll-Neurone wird dann voraussichtlich im Februar begonnen.