

Aus der Neurologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Platten

**Analyse der MYORG-Expression in Zellkulturmodellen
unter Verwendung von humanen embryonalen
Stammzellen und immortalisierten Astrozyten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von

Parmpreet Singh

aus

Witzenhausen

2025

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referent: Prof. Dr. med. Jochen Weishaupt

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Primäre familiäre Gehirnkalkifikation (PFBC)	1
1.2 Myogenesis regulating glycosidase (MYORG)	14
1.3 Die neurovaskuläre Einheit	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material	25
2.1 Zellkultur	25
2.2 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	29
2.3 Kits	31
2.4 Molekularbiologie	31
2.5 Puffer und Lösungen	32
2.6 Chemikalien und Reagenzien	34
2.7 Verbrauchsmaterial	35
2.8 Laborgeräte und technisches Equipment	37
2.9 Datenbearbeitung und Software	38
3 Methoden	39
3.1 Zellkultur	39
3.2 Orangu-Zellproliferationstest	43
3.3 Molekularbiologie	44
3.4 Biochemie	46
3.5 Mikroskopie und quantitative Bildanalyse	48
3.6 Statistische Analyse	51

4 Ergebnisse	53
4.1 Genotypisierung der hESCs und Generierung von iAs	53
4.2 Co-Kulturen von IM-HAs und endothelialen Zellen	59
5 Diskussion	81
5.1 Evaluation von iAs aus hESCs mit einer p.W75*-Mutation in <i>MYORG</i> ..	81
5.2 In-vitro BHS-Modell: Etablierung und Limitationen	84
5.3 In-vitro BHS-Modell: Einordnung der Analysen	87
6 Zusammenfassung	93
7 Literaturverzeichnis	95
Appendix	XI
Lebenslauf	XIII
Danksagung	XV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktion PFBC-assoziiierter Proteine	7
Abbildung 2: Kraniale CT-Aufnahmen von Patient*innen mit PFBC	11
Abbildung 3: Differentialdiagnosen der PFBC	12
Abbildung 4: Genlokus, Struktur und Expression von MYORG	16
Abbildung 5: Neurovaskuläre Einheit und Blut-Hirn-Schranke	19
Abbildung 6: Membraneinsatz und Co-Kulturen	22
Abbildung 7: Protokoll Astrozytendifferenzierung Canals et al.	43
Abbildung 8: Grundlegende Reaktion Orangu-Zellproliferationstest	44
Abbildung 9: Analyse der nukleären Oberfläche mit ImageJ	49
Abbildung 10: Analyse der Markerintensität und -fläche mit ImageJ	50
Abbildung 11: Genotypisierung des MYORG-Gens von hESCs	54
Abbildung 12: Differenzierung von hESCs unterschiedlicher Zelllinien zu iAs	56
Abbildung 13: Immunzytochemische Färbungen der iAs	57
Abbildung 14: Immunzytochemische Färbungen der iAs mit Markierungen	58
Abbildung 15: Proliferation von IM-HAs in unterschiedlichen Medien	60
Abbildung 16: Proliferation von IM-HAs in konditionierten Medien	61
Abbildung 17: Proliferation von IM-HAs unterschiedlicher Ausplattierungsdichte	63
Abbildung 18: Zusammensetzung der Konditionen	66
Abbildung 19: Analyse der nukleären Oberfläche	69
Abbildung 20: Analyse der zellulären Oberfläche (GFAP-Fläche)	70
Abbildung 21: Analyse der GFAP-Fluoreszenzintensität	71
Abbildung 22: Analyse der MYORG-Fluoreszenzintensität	72
Abbildung 23: Quantitative Proteinanalyse von ALDH1L1	74
Abbildung 24: Quantitative Proteinanalyse von GFAP	75
Abbildung 25: Quantitative Proteinanalyse von SOX9	76
Abbildung 26: Quantitative Proteinanalyse von MYORG	78
Abbildung 27: Quantitative Proteinanalyse von CD31	79
Abbildung 28: p.W75*-Mutation und Epitop des MYORG-Antikörpers CD31	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genetische Ätiologie der PFBC.....	4
Tabelle 2: Humane embryonale Stammzellen	25
Tabelle 3: Immortalisierte Zelllinien.....	25
Tabelle 4: Lösungen und niedermolekulare Verbindungen für die Zellkultur	26
Tabelle 5: Kommerzielle Zellkulturmedien	27
Tabelle 6: Selbstgemachte Zellkulturmedien und Lösungen	27
Tabelle 7: Medienzusammensetzung für die Generierung induzierter Astrozyten.....	28
Tabelle 8: Beschichtungslösungen für die Zellkultur.....	29
Tabelle 9: Primäre Antikörper für Immunofluoreszenz.....	29
Tabelle 10: Primäre Antikörper für Western Blot.....	29
Tabelle 11: Sekundäre Antikörper.....	30
Tabelle 12: Fluoreszenzfarbstoffe	30
Tabelle 13: Kits	31
Tabelle 14: Reagenzien für die Molekularbiologie	31
Tabelle 15: Plasmide für die Lentivirusproduktion	31
Tabelle 16: Selbstgemachte Lösungen für die Lentivirusproduktion.....	32
Tabelle 17: Primer	32
Tabelle 18: Reaktionsmischung für PCR	32
Tabelle 19: Kommerzielle Puffer und Lösungen	32
Tabelle 20: Selbstgemachte Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	33
Tabelle 21: Selbstgemachte Puffer und Lösungen für Western Blot	33
Tabelle 22: Selbstgemachte Puffer und Lösungen für Immunzytochemie.....	34
Tabelle 23: Chemikalien und Reagenzien	34
Tabelle 24: Verbrauchsmaterial	35
Tabelle 25: Laborgeräte und technisches Equipment.....	37
Tabelle 26: Computerprogramme	38
Tabelle 27: Verwendete PCR-Zyklen.....	45
Tabelle 28: Übersicht von in-vitro Blut-Hirn-Schranken-Modellen	65

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Langform
(m/v)	Massenprozent
(v/v)	Volumenprozent
%	Prozent
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
1x	Einfache Konzentration
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ALDH1L1	aldehyde dehydrogenase 1 family member L1
AM	Astrocyte Medium
ANOVA	analysis of variance
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid
BCEC	brain capillary endothelial cells
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMP4	bone morphogenetic protein 4
BSA	bovine serum albumin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CALCIFADE	calcifications in Fahr's Disease
Cas9	CRISPR associated protein 9
CD31	Cluster of Differentiation 31
Chr	Chromosom
CNTF	ciliary neurotrophic factor

Abkürzung	Langform
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	Computertomographie
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo- (2.2.2)octan
DAPI	4',6-Diamidin-2- phenylindol
DaT	Dopamintransporter
DBcAMP	zyklisches N ⁶ ,O ^{2'} - Dibutyryladenosin- 3',5'-monophosphat
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DPBS	dulbecco's phosphate-buffered saline
ebd.	ebenda
EDTA	Ethylendiamin- tetraacetat
EG	EndoGRO-MV
EM	Endothelial Cell Medium
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	fetal bovine serum
FGF-2	fibroblast growth factor 2
FGF-23	fibroblast growth factor-23
FIBGC	familial idiopathic basal ganglia calcification

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Langform
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GH31	Glycosyl-Hydrolase-Familie 31
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HBEC-5i	human brain endothelial cell line 5i
HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
hBMEC	human brain microvascular endothelial cell
HCl	Chlorwasserstoff
hCMEC/D3	human cerebral microvascular endothelial cell line D3
HEK	human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hESC	human embryonic stem cell
hom	homozygot
iA	induzierte Astrozyten
Ig	Immunglobulin
IM-HA	immortalized human astrocytes
iPSC	induced pluripotent stem cells
JAM2	Junctional- adhesion-molecule-2
JAM3	junctional- adhesion-molecule-3
k	Kilo-
KCl	Kaliumchlorid
KD	Knockdown
KEG	konditioniertes EndoGRO-MV

Abkürzung	Langform
kEM	konditioniertes Endothelial Cell Medium
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kir4.1	inward rectifier K ⁺ channel
KO	Knockout
L-Dopa	Levodopa
LDS	Lithiumdodecylsulfat
M	molar (mol/L)
m	Milli-
MO	Morpholino-Oligomere
MOPS	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
MYORG	myogenesis regulating glycosidase
n	Nano-
N/A	not available
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NAA60	N-alpha-acetyltransferase 60
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NEAA	non-essential amino acid
NET37	nuclear envelope transmembrane protein 37
Nfib	nuclear factor 1 B-type
NVU	neurovascular unit
OCLN	occludin
OGD	oxygen–glucose deprivation
p	Signifikanzwert

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Langform
PAS	periodic acid–Schiff
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGFB	platelet-derived growth factor subunit B
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor-β
PDL	Poly-D-Lysin
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PFBC	primary familial brain calcification
pH	potential of hydrogen
PHO81	phosphate system positive regulatory protein
Pi	anorganisches Phosphat
PiT2	type III sodium-dependent inorganic phosphate transporter 2
PLL	Poly-L-Lysin
PO ₄ ³⁻	Phosphat
PP-IP	Inositolpyrophosphat
RCF	relative centrifugal force
ret	Retentionssequenz
RIPA	radioimmuno-precipitation assay puffer
ROCK-Inhibitor	Rho-assoziiierter Proteinkinaseinhibitor

Abkürzung	Langform
RPM	revolutions per minute
rtTA	reverse tetracycline-controlled transactivator
S100B	S100 calcium binding protein B
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLC20A2	solute carrier family 20 member 2
SOX9	SRY-box transcription factor 9
SRY	sex determining region of Y
SV40	Simian-Virus 40
SYG1	synaptogenesis protein
TBS	TRIS-buffered saline
TBST	TRIS-buffered saline with Tween20
TEER	transendothelial electrical resistance
TRIS	Tris(hydroxymethyl) trisaminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	vascular smooth muscle cells
w. E.	willkürliche Einheit
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
XPR1	xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula Occludens-1
μ	Micro-

1 Einleitung

1.1 Primäre familiäre Gehirnkalkifizierung (PFBC)

1.1.1 Abstract

Die primäre familiäre Gehirnkalkifizierung (primary familial brain calcification [PFBC]) ist eine genetische, neurodegenerative Erkrankung, die sich in der neuroradiologischen Bildgebung mit bilateralen, intrazerebralen Kalkifikationen präsentiert (Ramos et al. 2017). Die meisten Patient*innen sind während ihrer Kindheit und im jungen Erwachsenenalter gesund und entwickeln zwischen ihrer dritten bis sechsten Lebensdekade erste Krankheitszeichen (ebd.). Die geschätzte Prävalenz liegt zwischen 2,1 und 6,6 pro 1000 (Chen et al. 2023; Nicolas et al. 2018). Am häufigsten leiden Patient*innen an Symptomen wie Parkinsonismus, Sprechstörungen, kognitiven Defiziten, Kopfschmerzen und Depressionen (Balck et al. 2021). Derzeit sind neun PFBC-assoziierte Gene bekannt, die vermutlich über Veränderungen der Phosphathomöostase bzw. durch eine eingeschränkte Integrität der neurovaskulären Einheit (neurovascular unit [NVU]) zur Entwicklung der gefäßassoziierten Kalziumablagerungen beitragen (Chelban et al. 2024; Mochida et al. 2010; O'Driscoll et al. 2010; Xu et al. 2023). Eine kausale Therapie sowie prognostische Marker stehen zurzeit nicht zur Verfügung, sodass sich die Behandlung der Patient*innen vor allem auf symptomatische Verfahren stützt (Xu et al. 2023).

1.1.2 Nomenklatur

Seit der erstmaligen, bekannten Beschreibung eines Patienten mit bilateralen Kalkifikationen in den Basalganglien im Jahre 1850 wurde die PFBC mit über 35 unterschiedlichen Namen betitelt (Delacour 1850; Manyam 2005).

Morbus Fahr (Fahr's disease) – eine auch heute noch häufig verwendete Bezeichnung – geht auf den deutschen Pathologen Karl Theodor Fahr zurück (Fahr 1930). Dieser beschrieb 1930 einen 81-jährigen Patienten mit Kalkifikationen im Centrum semiovale und Striatum (ebd.). Im weiteren Verlauf wurden unabhängig von Ätiologie und Pathogenese wiederholt Erkrankungen mit symmetrischen Verkalkungen im Gehirn benannt (Manyam 2005). Aufgrund der unzureichenden Präzision des Begriffs rücken Expert*innen heute immer mehr von dieser Begrifflichkeit ab (Ramos et al. 2017).

Im Rahmen einer systematischen Nomenklatur der Erkrankung wurde der, bis vor einigen Jahren genutzte, Begriff familiäre idiopathische Basalganglienverkalkung (familial idiopathic basal ganglia calcification [FIBGC]) eingeführt. Durch die Gewinnung neuer Erkenntnisse zu krankheitsassoziierten Genen sowie betroffenen Hirnarealen entwickelte sich über einige Modifikationen die, heute etablierte, Bezeichnung primäre familiäre Gehirnkalkifizierung. (Ramos et al. 2017)

1.1.3 Epidemiologie

Das mediane Erkrankungsalter der PFBC liegt bei 43 Jahren, während die Altersspanne für den Symptombeginn von 1 bis 87 Jahren reicht. Die meisten Patient*innen zeigen dabei zwischen ihrer dritten bis sechsten Lebensdekade erstmals Krankheitszeichen. Bei der Geschlechterverteilung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (Männer-Frauen-Verhältnis von 0,9). Teilweise ergeben sich bezüglich der epidemiologischen Eckdaten mutationsspezifische Unterschiede. Beispielsweise liegt das mediane Erkrankungsalter bei Mutationsträger*innen in *PDFGB* signifikant geringer im Vergleich zu solchen in *SLC20A2*, *XPR1* oder *MYORG*. (Balck et al. 2021; Orgun et al. 2021; Ramos et al. 2017)

Trotz einer nahezu hundertprozentigen Penetranz bezüglich neuroradiologischer Diagnostik zeigt die PFBC eine klinische Penetranz von 57,9 % bis 81,5 % (Chen et al. 2019; Tadic et al. 2015). Neben einem großen Anteil asymptomatischer Patient*innen wird die Diagnose weiterhin durch heterogene klinische Erscheinungsbilder mit einer Vielzahl an möglichen Symptomen erschwert (Chen et al. 2019). Zur Schätzung der minimalen Prävalenz wurde daher auf populationsgenetische Daten aus Gendatenbanken (z. B. gnomAD) zurückgegriffen, um die Allelfrequenz bekannter Mutationen auf die Gesamtpopulation zu extrapolieren (Chen et al. 2019; Nicolas et al. 2018). Aus diesen Berechnungen ergab sich eine geschätzte minimale Prävalenz der PFBC von zwischen 2,1 und 6,6 pro 1000 (ebd.). Demnach gehört die PFBC vermutlich nicht zu den seltenen Erkrankungen, die in der Europäischen Union mit einer maximalen Prävalenz von 5 pro 10 000 definiert sind (Regulation 2000).

Zur Inzidenz, Mortalität, Morbidität sowie zu Unterschieden bei der geographischen Verteilung oder Verbreitung in ethnischen Gruppen gibt es derzeit keine Publikationen.

1.1.4 Ätiologie

Die PFBC ist zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt, sodass in den letzten 14 Jahren neun krankheitsassoziierte Gene beschrieben wurden. Mutationen in diesen neun Genen sind ursächlich für etwa 50 % der PFBC-Fälle (Westenberger et al. 2019). Bei den übrigen Betroffenen gelingt es hingegen nicht, die genetische Ätiologie der Erkrankung aufzuklären (ebd.).

Die vier Gene *solute carrier family 20 member 2* (*SLC20A2*), *platelet-derived growth factor receptor-β* (*PDGFRB*), *platelet-derived growth factor subunit B* (*PDGFB*) und *xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1* (*XPR1*) wurden aufgrund ihrer autosomal dominanten Vererbung als Erstes mit der PFBC in Verbindung gebracht (Legati et al. 2015; Nicolas et al. 2013b; Wang et al. 2012). Die übrigen fünf Gene *occludin* (*OCN*), *junctional adhesion molecule 3* (*JAM3*), *myogenesis regulating glycosidase* (*MYORG*), *junctional adhesion molecule 2* (*JAM2*) und *N-alpha-acetyltransferase 60* (*NAA60*) unterliegen einer autosomal rezessiven Vererbung und

weisen daher eine geringere familiäre Häufung auf (Cen et al. 2020; Chelban et al. 2024; Mochida et al. 2010; O'Driscoll et al. 2010; Yao et al. 2018).

Molekulargenetische Analysen zeigen, dass der Erkrankung meist ein durch Missense-Mutationen verursachter Funktionsverlust (Loss-of-Function-Mutation) in den PFBC-assoziierten Genen zugrunde liegt. Weiterhin können auch Nonsense-, Frameshift- oder Spleiß-Mutationen sowie Deletionen einzelner oder mehrerer Exons bzw. ganzer Gene vorkommen. (Chen et al. 2023; Westenberger et al. 2019)

Ein Überblick über die derzeit bekannten, PFBC verursachenden Gene, deren Genlokus, Anteil an den genetisch bedingten Fällen, medianes Erkrankungsalter sowie die kodierten Proteine, deren Expressionsort und Funktion ist auf den folgenden Seiten in *Tabelle 1* zu finden.

1.1.5 Pathogenese

In etwa der Hälfte der Fälle bleibt die Ätiologie der PFBC ungeklärt und bei den übrigen Patient*innen gelingt der Nachweis einer PFBC-assoziierten Mutation (Westenberger et al. 2019). Diese Mutationen betreffen, wie in *Abbildung 1* dargestellt, Gene, die sehr diverse Proteine codieren. Angefangen von Adhäsionsmolekülen und Zellkontakten über Transportproteine bis hin zu Wachstumsfaktoren zeigt sich ein breites Spektrum an Proteinen, deren Fehlfunktion in der Ausbildung der PFBC mündet. Eine Gemeinsamkeit bei allen Betroffenen und damit auch ein zentrales Element der Erkrankung sind bilaterale, gefäßassoziierte Kalzifikationen im Gehirn. Diese treten in der Häufigkeit abnehmend in den Basalganglien, dem Cerebellum, dem Thalamus und der weißen Substanz auf, bestehen überwiegend aus Hydroxylapatit und können als röntgendichtes Material besonders gut in der Computertomographie (CT) dargestellt werden (Balck et al. 2021; Smeyers-Verbeke et al. 1975).

Im Zuge einer näheren Charakterisierung der Kalzifikationen konnte zunächst kein klarer Zusammenhang zwischen deren Lokalisation und Volumen, der Art und Ausprägung der Symptome sowie der vorliegenden Mutation eruiert werden (Westenberger et al. 2019). Mit der Aufarbeitung zusätzlicher Patient*innendaten konnten aktuellere Publikationen hingegen aufzeigen, dass die Kalzifikationen mit dem Alter zunehmen und dass bei symptomatischen, im Vergleich zu asymptomatischen Mutationsträger*innen schwerwiegendere Kalzifikationen festgestellt werden (Golüke et al. 2023; Nicolas et al. 2013a).

Weiterhin wurde bei den vier Mutationen mit autosomal dominantem Erbgang (*SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB* und *XPR1*) ein signifikanter positiver Effekt zwischen der Mutationsschwere und der Anzahl der kalzifizierten Hirnareale beschrieben. Die Mutationsschwere wurde dabei je nach erwartbarem Funktionsverlust des Proteins in zwei Klassen eingeteilt. Zudem erhöht sich mit jedem weiteren, kalzifizierten Hirnareal das Risiko, symptomatisch zu werden, um den Faktor 2,39. (Balck et al. 2021)

Tabelle 1: Genetische Ätiologie der PFBC

Gen	Erstmalige Beschreibung	Lokus	Vererbung	Anteil	Medianes Erkrankungsalter	Protein	Expression im ZNS	Funktion	Referenzen
OCLN	2010	Chr 5	Autosomal rezessiv	NA	NA	Occludin (OCLN)	Endothelzellen	Bildung von Tight junctions unter anderem zusammen mit Proteinen der Claudin-Familie; regulieren Zellpolarität und bilden eine Diffusionsbarriere zum Verschluss des Intrazellularraums	(Fagerberg et al. 2014; Feldman et al. 2005; Furuse et al. 1993; O'Driscoll et al. 2010; Schottlaender et al. 2020)
JAM3	2010	Chr 11	Autosomal rezessiv	NA	NA	Junctional-adhesion-molecule-3 (JAM3)	Endothelzellen	Junktionales Adhäsionsmolekül; wichtige Rolle bei der Regulation von Zellpolarität, Endothelpermeabilität, Leukozytenmigration und Funktion der Blut-Hirn-Schranken (BHS)	(Fagerberg et al. 2014; Mochida et al. 2010; Schottlaender et al. 2020)
SLC20A2	2012	Chr 8	Autosomal dominant	59,78%	47 Jahre (21,5 – 61,5; n = 109)	Type III sodium-dependent inorganic phosphate transporter 2 (PiT2)	Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen	Aufrechterhaltung der Phosphathomöostase durch Resorption von anorganischem Phosphat in Zellen	(Balck et al. 2021; Chen et al. 2023; Wang et al. 2012; Xu et al. 2023)
PDGFRB	2013	Chr 5	Autosomal dominant	5,98%	48 Jahre (11 – 54; n = 7)	Platelet-derived growth factor receptor-β (PDGFRB)	Neurone, glatte Gefäß-muskelzellen und Perizyten	Rezeptortyrosinkinase für die PDGF-Familie, insbesondere für Homodimere aus PDGF-B und PDGF-D; Essentiell für die Angiogenese und Formation der BHS	(Balck et al. 2021; Chen et al. 2023; Nicolas et al. 2013b; Xu et al. 2023)

EINLEITUNG

Gen	Erstmalige Beschreibung	Lokus	Vererbung	Anteil	Medianes Erkrankungsalter	Protein	Expression im ZNS	Funktion	Referenzen
PDGFB	2013	Chr 22	Autosomal dominant	12,68%	30 Jahre (12,5 – 45; n = 41)	Platelet-derived growth factor subunit B (PDGFB)	Neurone und Endothelzellen	Wachstumsfaktor für mesenchymale Zellen; kritische Rolle in der Proliferation und Rekrutierung von Perizyten und glatter Gefäßmuskulatur	(Balck et al. 2021; Chen et al. 2023; Keller et al. 2013; Xu et al. 2023)
XPR1	2015	Chr 1	Autosomal dominant	5,98%	44 Jahre (38 – 66; n = 13)	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 (XPR1)	Neuronen und Astrozyten	Ausfluss von anorganischem Phosphat aus Zellen	(Balck et al. 2021; Chen et al. 2023; Legati et al. 2015; Xu et al. 2023)
MYORG	2018	Chr 9	Autosomal rezessiv	13,59%	46 Jahre (38 – 53; n = 39)	Myogenesis regulating glycosidase (MYORG)	Endoplasmatisches Retikulum von Astrozyten	Teil der Glycosyl-Hydrolase-Familie 31 (GH31); reguliert vermutlich die Glykosylierung von Proteinen	(Balck et al. 2021; Chen et al. 2023; Xu et al. 2023; Yao et al. 2018)
JAM2	2020	Chr 21	Autosomal rezessiv	1,99%	38 Jahre (21,75 – 43; n = 10)	Junctional-adhesion-molecule-2 (JAM2)	Endothelzellen und Astrozyten	Junktionales Adhäsionsmolekül; wichtige Rolle bei der Regulation von Zellpolarität, Endothelpermeabilität, Leukozytenmigration und Funktion der BHS	(Balck et al. 2021; Cen et al. 2020; Chen et al. 2023; Xu et al. 2023)
NAA60	2024	Chr 16	Autosomal rezessiv	NA	NA	N-alpha-acetyl-transferase 60	Golgi-Apparat mit Ausrichtung des Enzyms zur zytosolischen Seite	N-terminale Acetylierung vieler transmembraner Proteine, darunter auch SLC20A2	(Aksnes et al. 2015; Chelban et al. 2024)

Abkürzungen: ZNS = zentrales Nervensystem, Chr = Chromosom; Tabelle ergänzt und angepasst nach Chen et al. 2023

Um die Pathomechanismen hinter den Kalzifikationen als pathologisches Korrelat der PFBC näher verstehen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die Funktion der in *Tabelle 1* und *Abbildung 1* aufgeführten Proteine zu betrachten. Laut dem neusten Stand der Forschung scheinen vor allem die Phosphathomöostase und die Integrität der neurovaskulären Einheit eine wesentliche Rolle zu spielen. (Xu et al. 2023)

1.1.5.1 Phosphathomöostase

Anorganisches Phosphat (Pi , PO_4^{3-}) ist ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Körpers und nimmt in Form von energiereichen Bindungen wie beispielsweise Adenosintriphosphat (ATP) eine fundamentale Rolle im zellulären Stoffwechsel ein (Takeda et al. 2004). Der Großteil des Phosphats (etwa 85 %) ist allerdings in Form von Hydroxylapatit oder amorphem Calciumphosphat in Knochen oder Zähnen gebunden (Azevedo und Saiardi 2017). Auch die bei der PFBC vorliegenden bilateralen intrazerebralen Kalzifikationen bestehen hauptsächlich aus dem Calciumphosphatsalz Hydroxylapatit (Summenformel $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$) (Smeyers-Verbeke et al. 1975).

Der Calcium- und Phosphathaushalt des Körpers verfolgt das Ziel, die Konzentration der Elektrolyte im Serum in einem engen Zielbereich zu halten, sodass eine ausreichende Mineralisierung und Zellfunktion sichergestellt werden kann (Azevedo und Saiardi 2017; Takeda et al. 2004). Dies erfolgt durch Botenstoffe wie Vitamin D, Parathormon und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (fibroblast growth factor-23 [FGF-23]), die die intestinale und renale Absorption sowie die Mineralisierung der Knochen regulieren (ebd.). Störungen dieses Regelkreises können in unterschiedlichen Krankheitsbildern und auch in der Ausbildung intrazerebraler Kalzifikationen resultieren (Dahlmann und Prill 1974). Während diesen Kalzifikationen eine sekundäre Genese zugrunde liegt, sind bei der PFBC Gene betroffen, die im direkten Zusammenhang mit der Ausbildung von intrazerebralen Kalzifikationen stehen.

SLC20A2, *XPR1* und *NAA60* sind drei PFBC-assoziierte Gene, die eine wesentliche Rolle im Erhalt der zellulären Phosphathomöostase des Gehirns spielen (*Tabelle 1*, *Abbildung 1*). Das erstgenannte Gen codiert für PiT2, einen Natrium-Phosphat-Cotransporter, der Natrium und Pi in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 in die Zelle befördert (Ravera et al. 2007; Wang et al. 2012). Eine geringere Expression des Cotransporters resultiert neben einer verringerten Aufnahme von Pi in die Zelle auch in einer Beeinträchtigung des Phosphatausstroms aus der Zelle (López-Sánchez et al. 2020). Denn PiT2 bewirkt nicht nur den Einstrom von Pi in die Zelle, sondern kann in einem engen Zusammenspiel mit dem Transportprotein XPR1 auch dessen Funktion – den Ausfluss von Pi aus dem Cytosol in den Extrazellularraum – beeinflussen (Legati et al. 2015; López-Sánchez et al. 2020).

Neben PiT2 kann auch die intrazelluläre Phosphatkonzentration über unterschiedliche Prozesse Einfluss auf die Aktivität von XPR1 nehmen (Azevedo und Saiardi 2017; Wild et al. 2016). Denn wie viele andere, an der Phosphathomöostase beteiligte Proteine besitzt auch XPR1 eine SPX-Domäne (benannt nach synaptogenesis protein (SYG1), phosphate system positive regulatory protein (PHO81) und XPR1) (ebd.). Inositolpyrophosphat (PP-IP), das seinerseits durch Interaktionen mit ATP und anorganischen Polyphosphaten modifiziert wird, kann an die SPX-Domäne binden (ebd.). Dadurch können regulatorische Mechanismen angestoßen werden, die noch nicht bis in das letzte Detail verstanden sind. Der durch eine Mutation bedingte Funktionsverlust der SPX-Domäne in XPR1 geht allerdings mit verringertem Ausfluss von Pi in den Extrazellularraum einher und könnte so die intrazerebralen Kalzifikationen induzieren (Legati et al. 2015).

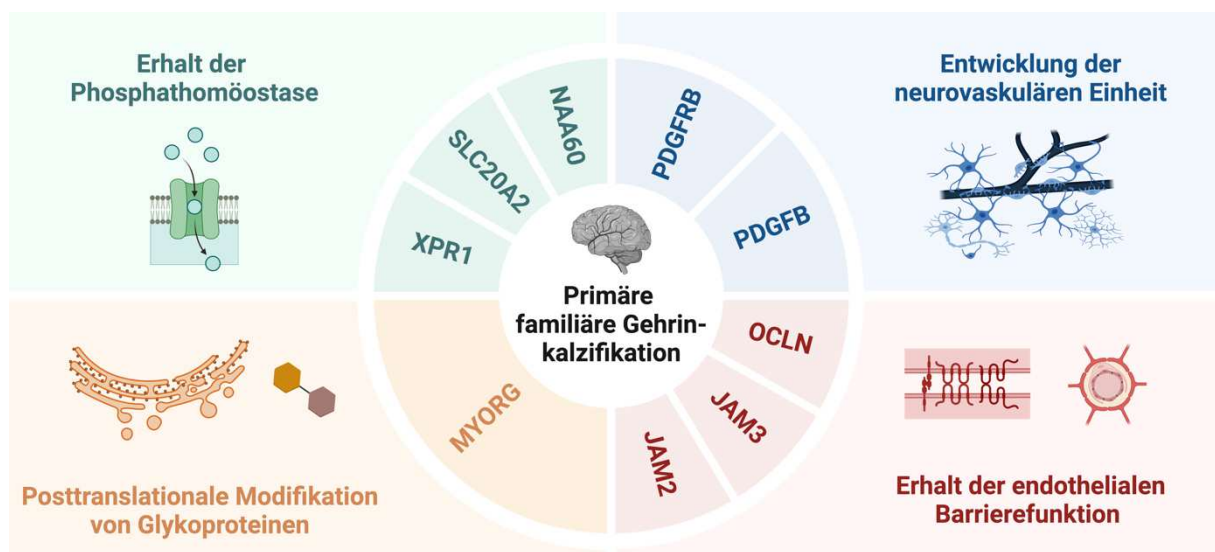


Abbildung 1: Funktion PFBC-assoziierter Proteine

Die krankheitsassoziierten Proteine lassen sich bezüglich ihrer Funktion in vier Gruppen einteilen. XPR1 und SLC20A2 sind Transportproteine, die unter anderem in Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen den Ein- und Ausstrom von Pi regulieren. NAA60 ist eine N-Acetyltransferase, die über ihr Substrat SLC20A2 ebenfalls einen Einfluss auf die Phosphathomöostase nimmt. PDGFRB ist ein Wachstumsfaktorrezeptor, der durch die Bindung von dem Wachstumsfaktor PDGFB aktiviert werden kann. Dadurch setzt sich eine Kaskade in Gang, die die Entwicklung der NVU beeinflusst. OCLN, JAM2 und JAM3 sind Adhäsionsmoleküle und Zellkontakte, die eine zentrale Rolle im Erhalt der endothelialen Barrierefunktion spielen. MYORG ist eine α -Galaktosidase und ist an der posttranslationalen Modifikation von Glykoproteinen wie SLC20A2, PDGFRB, PDGFB und XPR1 beteiligt. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Ein 2024 erstmals mit PFBC assoziiertes Enzym ist die Acetyltransferase NAA60. Diese wird in der Membran des Golgi-Apparats exprimiert und ist an der N-terminalen Acetylierung vieler transmembraner Proteine beteiligt. Unter den Substraten von NAA60 sind bereits zwei Proteine identifiziert worden, die mit der PFBC in Verbindung stehen: SLC20A2 und MYORG. Für SLC20A2 konnte mittels Biotinylierung in primären Fibroblasten von PFBC-Patient*innen mit einem Funktionsverlust von NAA60 eine verringerte Oberflächendichte nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen,

dass eine funktionelle Beeinträchtigung von NAA60 über eine verringerte N-terminale Acetylierung von SLC20A2 ebenfalls zu einer eingeschränkten Phosphathomöostase und daraus resultierenden Kalzifikationen beiträgt. (Chelban et al. 2024)

1.1.5.2 Integrität der neurovaskulären Einheit

Das menschliche Gehirn ist ein hochkomplexes Organ, dessen Homöostase einer engmaschigen und präzisen Steuerung auf molekularer und zellulärer Ebene unterliegt (Zlokovic 2010). Grundlegend dafür ist eine kontinuierliche Perfusion, die den Stoffaustausch von Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Nährstoffen und metabolischen Abfallprodukten ermöglicht und eine Interaktion mit dem peripheren Immunsystem sowie mit Hormonen und Zytokinen aus anderen Körpergeweben sicherstellt (Daneman und Prat 2015). Die Regulation des Stoffaustauschs erfolgt durch die Blut-Hirn-Schranke – eine Substruktur der neurovaskulären Einheit (neurovascular unit [NVU]) (ebd.). Letztere wird über das strukturelle Zusammenspiel des zentralen Nervensystems (ZNS) und des Gefäßsystems definiert und wird durch viele unterschiedliche Zelltypen, wie Neurone, Astrozyten, endotheliale Zellen, Perizyten, Oligodendrozyten und Mikroglia gebildet (Del Zoppo 2010; Iadecola 2017; Rajput et al. 2024). Die Funktionen und Interaktionen dieser zellulären Komponenten werden in *Kapitel 1.3* umfassend erläutert.

Alle derzeit bekannten, PFBC-assoziierten Proteine haben einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Integrität der NVU (*Tabelle 1*). SLC20A2, XPR1 und NAA60 beeinträchtigen, wie bereits im letzten Unterkapitel beschrieben, die Phosphathomöostase und somit das Milieu, in dem sich die Zellen der NVU befinden (ebd.). Die übrigen sechs Gene und deren pathophysiologische Rolle bei der Ausbildung der PFBC werden im Folgenden näher erläutert.

Ein wesentliches Element der NVU sind Tight Junctions, die zwischen benachbarten Endothelzellen zu finden sind und damit eine parazelluläre Barriere schaffen (Daneman und Prat 2015; Hawkins und Davis 2005). Diese bestehen aus spezialisierten Transmembranproteinen wie Occludinen, Claudinen und junctionalen Adhäsionsmolekülen (junctional adhesion molecules [JAMs]) (ebd.). Occludin und JAM3 werden vor allem in Endothelzellen, JAM2 zusätzlich auch in Astrozyten exprimiert (*Tabelle 1*). Mutationen in den entsprechenden Genen gehen in der Regel mit einem Funktionsverlust der Transmembranproteine einher, wodurch die Barrierefunktion des Endothels eingeschränkt wird (Cen et al. 2020; Mochida et al. 2010; O'Driscoll et al. 2010; Schottlaender et al. 2020). Dadurch kommt es zu einer Leckage unterschiedlicher Ionen, Moleküle, Proteine sowie Zellen über die Blut-Hirn-Schranke, sodass physiologische Gradienten abgebaut und eine transendotheliale Zellmigration ermöglicht wird (Xu et al. 2023). Infolgedessen steigt unter anderem die Pi-Konzentration im Liquor, die zur Ausbildung von Kalzifikationen beitragen könnte (ebd.).

PDGFRB ist eine Rezeptortyrosinkinase, die vor allem an der Zelloberfläche von Neuronen, glatten Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells [VSMCs]) und Perizyten exprimiert wird (Fredriksson et al. 2004; Tallquist et al. 2000). Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren der PDGF-Familie wird PDGFRB autophosphoryliert und setzt eine Kaskade in Gang, die unter anderem Zellüberleben und -differenzierung beeinflusst (Andrae et al. 2008). Ein bevorzugter Ligand der Rezeptortyrosinkinase ist das Homodimer PDGF-B, das durch Endothelzellen zerebraler Gefäße ausgeschüttet wird (Hellström et al. 1999). PDGF-B initiiert die Rekrutierung PDGFRB-positiver VSMCs und Perizyten, die sich dadurch wie ein Geflecht um die Gefäße anordnen und damit die strukturelle Grundlage für die Ausbildung einer BHS bilden (ebd.). Funktionelle Einschränkungen von PDGFRB oder PDGF-B können zu endothelialer Hyperplasie, erhöhtem Gefäßdurchmesser, abnormaler Zellform der Endothelzellen, veränderter Verteilung von Adhäsionsmolekülen und morphologischen Zeichen einer erhöhten Endothelpermeabilität führen (Hellström et al. 2001). Am Ende der pathophysiologischen Prozesse stehen erneut intrazerebrale Kalzifikationen, die das Produkt eines erhöhten Pi-Einstroms in das Hirngewebe und leicht erhöhter Pi-Konzentrationen im Liquor sind (Hozumi et al. 2018; Xu et al. 2023).

MYORG gehört zur Glycosyl-Hydrolase-Familie 31 (GH31) und ist eine α -Galaktosidase mit einer erhöhten Substratspezifität für das Disaccharid Gal- α 1,4-Glc (Datta et al. 2009; Meek et al. 2022). Grundsätzlich unterliegt das Protein einer ubiquitären Expression im endoplasmatischen Retikulum und der Kernhülle vieler unterschiedlicher Zelltypen, wobei es im zentralen Nervensystem (ZNS) überwiegend in Astrozyten zu finden ist (Fagerberg et al. 2014; Yao et al. 2018). Das enzymatisch aktive, carboxyterminale (C-terminale) Fragment von MYORG ragt in das Lumen des ERs, wo es vermutlich an der posttranslationalen Modifikation von Glykoproteinen beteiligt ist (Meek et al. 2022). Die PFBC-assoziierten Proteine SLC20A2, PDGFRB, PDGFB und XPR1 sind ebenfalls Glykoproteine und damit potenzielle Substrate von MYORG (Keller et al. 2013; Legati et al. 2015; Nicolas et al. 2013b; Wang et al. 2012). Demzufolge könnte eine Mutation in *MYORG* in einer astrozytären Dysfunktion resultieren, welche ihrerseits über eine Beeinträchtigung der NVU zu den PFBC-typischen, intrazerebralen Kalzifikationen führen könnte (Carecchio et al. 2023). Eine dezidierte Betrachtung des aktuellen Kenntnisstandes bezüglich klinischer, genetischer sowie pathophysiologischer Aspekte zu MYORG ist in *Kapitel 1.2* zu finden.

1.1.6 Symptome

Die PFBC präsentiert sich mit einer sehr heterogenen Symptomatik, die von milden Kopfschmerzen über Sprechstörungen bis hin zu schweren motorischen, kognitiven und psychiatrischen Defiziten reichen kann. Während Träger*innen pathogener Mutationen in den PFBC-assoziierten Genen eine vollständige radiologische Penetranz aufweisen und demnach immer Kalzifikationen entwickeln, bleiben diese in fast einem Drittel der Fälle asymptomatisch. Mit etwa 46 % zeigen Träger*innen einer

pathogenen *PDGFRB*-Mutation eine besonders geringe klinische Penetranz. Pathologische Varianten in *PDGFB*, *MYORG* und *JAM2* hingegen resultieren in über 85 % in einer klinischen Symptomatik. (Balck et al. 2021)

In 42 % der Fälle manifestiert sich die PFBC mit einer Kombination aus motorischen und nicht-motorischen Symptomen. 31 % der Betroffenen weisen ausschließlich motorische Defizite, wie beispielsweise Parkinsonismus, Sprechstörungen, Tremor oder Ataxie auf. Die übrigen 27 % zeigen mit Symptomen wie kognitiven Einschränkungen, Kopfschmerzen, Depressionen oder Psychosen lediglich nicht-motorische Defizite. (Balck et al. 2021)

1.1.7 Diagnostik

Die erste Schwierigkeit in der Diagnose ist es, die PFBC in die differenzialdiagnostischen Überlegungen miteinzubeziehen. Wie bereits in den letzten Unterkapiteln erläutert wurde, ist die PFBC eine unterdiagnostizierte Erkrankung mit klinisch heterogenen Erscheinungsbildern, sodass sich die Diagnosestellung häufig als Herausforderung darstellt (Ramos et al. 2017). Die vorliegenden Diagnosekriterien gehen auf Moskowitz et al., Ellie et al. und Manyam et al. zurück und setzen sich aus den folgenden vier Punkten zusammen.

Progressive neurologische Beeinträchtigungen motorischer oder nicht-motorischer Art: Das Auftreten der Symptome erfolgt zumeist in der vierten oder fünften Lebensdekade, kann aber auch früher oder später erfolgen.

Bilaterale Kalzifikationen in den Basalganglien: Auch andere Hirnareale wie das Cerebellum, der Thalamus und die weiße Substanz können betroffen sein. Kalzifikationen bei asymptomatischen Patient*innen werden ebenfalls berücksichtigt.

Ausschluss einer sekundären Genese: Darunter fallen metabolische, mitochondriale, infektiöse, toxische, traumatische oder andere systemische Erkrankungen.

Positive Familienanamnese bezüglich der PFBC

(Ellie et al. 1989; Manyam 2005; Moskowitz et al. 1971)

Die Diagnosekriterien sind mittlerweile etwas veraltet und bedürfen einer Überarbeitung. Beispielsweise ist in Anbetracht eines rezessiven Vererbungsmodus nicht zwangsläufig eine positive Familienanamnese nötig, um die Diagnose einer PFBC zu stellen. Zudem fehlten zum Zeitpunkt der Festlegung der oben genannten Kriterien die Möglichkeiten und das Wissen, um Genmutationen in die Diagnosestellung einzubinden. Diese beiden Aspekte sollten bei der Erarbeitung neuer Diagnosekriterien berücksichtigt werden. (Chen et al. 2023)

Der Nachweis der bilateralen, intrazerebralen Kalzifikationen in der neuroradiologischen Bildgebung erfolgt (wie in Abb. 2 gezeigt) meist mittels CT.

Dieses ermöglicht einen sehr sensitiven Nachweis von Kalzifikationen, die sich in der Bildgebung in Form von hyperdensen Läsionen mit einer Dichte von über 130 Hounsfield-Einheiten (HE) darstellen (Snijders et al. 2024). Allerdings können diese auch Produkt eines normalen Alterungsprozesses sein, sodass sie bei 0,3 – 30 % der Patient*innen als Nebenbefund beschrieben werden (de Brouwer et al. 2020; Eskandary et al. 2005; Förstl et al. 1992; Yamada et al. 2013). Zur Differenzierung zwischen alters- und PFBC-bedingten Kalzifikationen kann beispielsweise der Nicolas-Score verwendet werden (Golüke et al. 2023; Nicolas et al. 2013a). Dieser ermöglicht über die Dimensionierung des kalzifizierten Volumens die Feststellung, dass Kalzifikationen in Zusammenhang mit der PFBC stärker ausgeprägt und diffuser verteilt sind als ebensolche, die als Teil des physiologischen Alterungsprozesses beobachtet werden (ebd.).

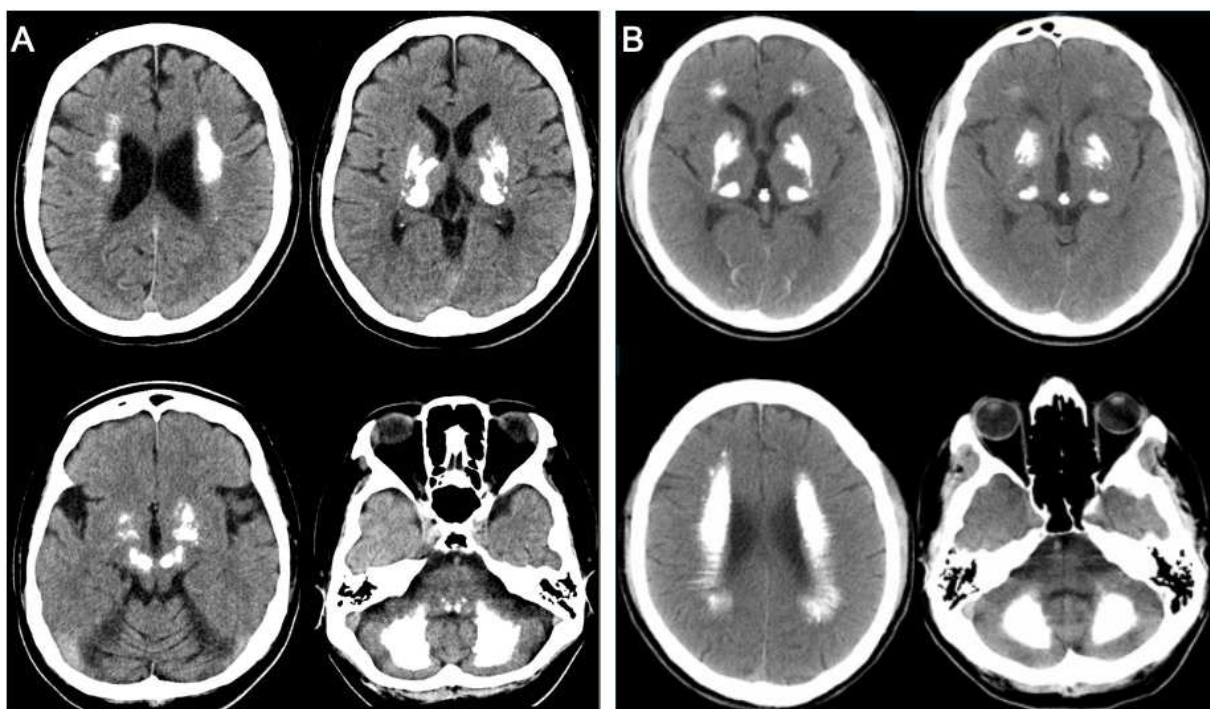


Abbildung 2: Kraniale CT-Aufnahmen von Patient*innen mit PFBC

(A) Vier axiale CT-Aufnahmen einer 43-jährigen Frau mit einer Mutation in *MYORG*: Zu sehen sind bilaterale Kalzifikationen in der weißen Substanz, den Basalganglien, dem Mittelhirn, dem Cerebellum sowie der Pons. (Kume et al. 2020) **(B)** Vier axiale CT-Aufnahmen eines Patienten mit einer Mutation in *SLC20A2*: Zu sehen sind bilaterale Kalzifikationen im Putamen, dem Globus pallidus, dem Thalamus, dem Nucleus dentatus cerebellaris, der subkortikalen weißen Substanz und des okzipitalen Kortex. (Carecchio et al. 2023) (CT-Aufnahmen übernommen von Kume et al. (A) und Carecchio et al. (B))

Bevor beim Vorliegen einer PFBC-kompatiblen Symptomatik und bilateralen Kalzifikationen in den Basalganglien eine endgültige Diagnose gestellt werden kann, muss der Ausschluss einer sekundären Genese erfolgen. Dazu werden eine ausführliche Anamnese und eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, die bei PFBC-Patient*innen für gewöhnlich unauffällige Befunde hervorbringen. Diese beinhalten ein großes Blutbild, die Bestimmung der Serumkonzentrationen für Calcium, Phosphat, Magnesium, alkalisches Phosphat, Calcitonin und Parathormon, die Abklärung von Stoffwechsel-, Entzündungs- und Infektionskrankheiten, die

Testung der Schwermetallbelastung im Blut und Urin, Liquoruntersuchungen für Bakterien, Viren und Parasiten sowie weitere, im Einzelfall notwendige Analysen. Für die finale Etablierung einer Diagnose wird zudem der Nachweis einer Mutation in den PFBC-assoziierten Genen mittels serieller Einzelgentestung, eines Multigenpanels sowie weiterer Methoden der Gensequenzierung angestrebt. (Ramos et al. 2017)

1.1.8 Differentialdiagnosen

Es gibt eine Fülle von möglichen Differentialdiagnosen für die PFBC und je nach Publikation werden über 50 sekundäre Ursachen für Verkalkungen im Gehirn beschrieben (Balck et al. 2021). Neben Erkrankungen der Nebenschilddrüse können auch infektiöse, mitochondriale, syndromale und neurodegenerative Erkrankungen mit intrazerebralen Kalzifikationen sowie neuropsychiatrischen Symptomen einhergehen (Ramos et al. 2017). Auch der normale Alterungsprozess und traumatisch oder durch eine Ischämie bedingte, nekrotische Veränderungen in neuronalem Gewebe können als Differenzialdiagnose in Betracht kommen (ebd.). Weiterhin gibt es Erkrankungen, die in ihrer Symptomatik der PFBC ähneln, dabei aber keine intrazerebralen Kalzifikationen aufweisen. Dazu gehört die progressive supranukleäre Blickparaese (progressive supranuclear palsy [PSP]), die sich mit einer vertikalen Blickparese, kognitiven Störungen, Rigor und Akinese präsentiert (Carecchio et al. 2023). Damit ähnelt sie phänotypisch vor allem der durch Mutationen in *MYORG* bedingten PFBC (Chelban et al. 2020). Ein Überblick über die differentialdiagnostischen Gruppen mit einigen beispielhaften Erkrankungen ist in *Abbildung 3* zu finden.

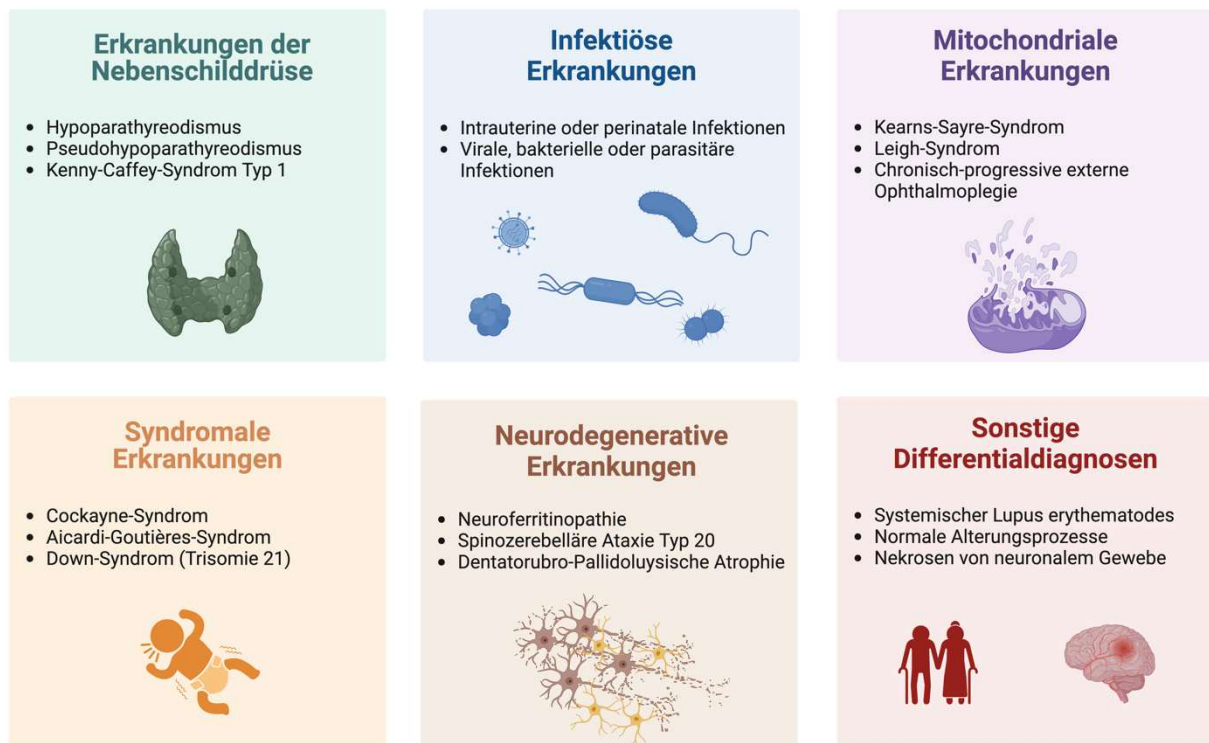


Abbildung 3: Differentialdiagnosen der PFBC

Auflistung einiger Erkrankungen, die als sekundäre Ursachen für intrazerebrale Kalzifikationen in Frage kommen und vor der Diagnosestellung einer PFBC in Erwägung gezogen werden sollten (Ramos et al. 2017). Abbildung erstellt mit BioRender.com.

1.1.9 Therapie

Das klinische Management der PFBC birgt einige Schwierigkeiten und hat sich trotz des sukzessiven Erkenntnisgewinns im Bereich der krankheitsassoziierten Gene sowie der Pathogenese in den letzten Jahren kaum weiterentwickelt (Carecchio et al. 2023; Oliveira und Oliveira 2016). Derzeit gibt es keine spezifischen Therapien und bis jetzt wurden nur wenige klinische Studien mit Medikamenten wie Nimodipin (Kalziumkanalblocker), Etidronat (Bisphosphonat) oder Alendronat (Bisphosphonat) durchgeführt. Ersteres – ein ZNS-spezifischer Kalziumkanalblocker – konnte bei Betroffenen keine Reduktion PFBC-assoziiierter Symptome bewirken (Manyam 2005). Die Behandlung mit Bisphosphonaten, welche üblicherweise in der Behandlung der Osteoporose verwendet werden, zeigte in zwei kleinen klinischen Studien von Loeb et al. (2 Patient*innen) und Oliveira et al. (7 Patient*innen) eine verbesserte und stabilere Symptomatik bei ausbleibendem Effekt auf das Volumen der vorliegenden Kalzifikationen (Loeb 1998; Oliveira und Oliveira 2016). In den Niederlanden läuft seit 2023 die CALCIFADE-Studie – eine randomisierte, Placebo-kontrollierte, doppelt verblindete, klinische Phase-2-Interventionsstudie –, bei der der Effekt einer Etidronat-Gabe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht wird (Snijders et al. 2024). Hierzu werden die Studienteilnehmer*innen regelmäßigen Untersuchungen bezüglich der kognitiven Funktion, motorischer und neuropsychiatrischer Symptome, Lebensqualität sowie des Volumens der Gehirnkalkifikationen unterzogen (ebd.). Ergebnisse dazu werden im Laufe des Jahres 2026 erwartet (ebd.).

Die vorliegenden Optionen, Betroffenen Linderung zu verschaffen, beschränken sich derzeit auf die Anwendung symptomatischer Therapien. Das häufigste Symptom der PFBC – der Parkinsonismus – kann beim Vorliegen von Beeinträchtigungen im Dopamintransporter-Scan (DaT-Scan) erfolgreich mit Levodopa (L-Dopa) behandelt werden (Chen et al. 2020a; Ichikawa et al. 2019; Kumar und Jog 2017). Beim Vorliegen von neuropsychiatrischen Symptomen können Antidepressiva oder Antipsychotika verabreicht werden (Carecchio et al. 2023).

Analog zu den spezifischen Therapien gibt es derzeit keine präventiven Therapien sowie prognostischen Marker für die PFBC (Carecchio et al. 2023). Dem entgegenstehend finden sich eine moderne Bildgebung sowie Genanalysetechniken, die schon vor Symptombeginn die Detektion intrakranieller Kalzifikationen und Mutationen in PFBC-assoziierten Genen ermöglichen (ebd.). Dementsprechend besteht zusätzlich zur gewöhnlichen Therapie das außerordentliche Potential, durch präventive Interventionen Einfluss auf die Krankheitsprogression zu nehmen. In der Zukunft bedarf es daher weiterer Forschungsanstrengungen, sodass durch Erkenntnisgewinne im Bereich der Therapie und Prognose eine Optimierung der Patient*innenversorgung gewährleistet werden kann.

1.2 Myogenesis regulating glycosidase (MYORG)

1.2.1 Klinisches Erscheinungsbild und Genetik

MYORG ist das erste beschriebene, PFBC-assoziierte Gen, das einem autosomal rezessiven Vererbungsmodus unterliegt (Yao et al. 2018). Bis zu seiner erstmaligen Beschreibung im Jahre 2018 durch Yao et al. waren mit *SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB* und *XPR1* nur Gene bekannt, die autosomal dominant vererbt werden (ebd.). Mutationen in *MYORG* sind für 13,59 % der PFBC-Fälle mit aufgeklärter genetischer Ätiologie verantwortlich (Xu et al. 2023). Damit ist es nach *SLC20A2* (59,78 %) die zweithäufigste Ursache für die PFBC (ebd.). Bezüglich des Erkrankungsalters, der Altersspanne und der radiologischen Penetranz fügen sich Betroffene mit *MYORG*-Mutation in das Bild der übrigen PFBC-Patient*innen ein (ebd.). Dennoch zeigen sich bei der klinischen sowie genetischen Betrachtung der entsprechenden Patient*innen einige Auffälligkeiten, die im Folgenden näher aufgearbeitet werden sollen.

Ein PFBC-assoziiierter Genotyp führt in 57,9 % bis 81,5 % der Fälle zur Entwicklung einer Symptomatik (Chen et al. 2019). Die damit bezifferte klinische Penetranz unterscheidet sich wesentlich je nach zugrundeliegender Mutation. Betroffene mit Mutationen in *PDGFRB* bleiben in über der Hälfte der Fälle (54 %) gesund, während homozygote Mutationen in *MYORG* in 91 % der Fälle Symptome hervorrufen (Balck et al. 2021). Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der neuroradiologischen Bildgebung wider. So zeigen Patient*innen mit pathogener Mutation in *MYORG* besonders umfangreiche Kalzifikationen, die bei 94 % der Patient*innen in mindestens drei Gehirnregionen vorzufinden sind (ebd.). Am häufigsten ist, wie auch bei der Gesamtheit der Patient*innen mit PFBC, neben den Basalganglien das Cerebellum betroffen (ebd.). Auffällig sind im Vergleich zu den übrigen PFBC-Patient*innen die häufigen Kalzifikationen des Hirnstamms, insbesondere der zentralen Pons (33 %) und kortikale Hirnatrophien, die bei über einem Drittel (37 %) der *MYORG*-assoziierten PFBC vorliegen (Chelban et al. 2020).

Bemerkenswert ist weiterhin, dass trotz eines rezessiven Vererbungsmodus auch bei einer heterozygoten Mutation von *MYORG* Kalzifikationen auftreten können (Arkadir et al. 2019; Grangeon et al. 2019; Ramos et al. 2019). Dabei fallen zwischen homozygoten, komplex heterozygoten und gewöhnlich heterozygoten Mutationsträger*innen Unterschiede im klinischen und radiologischen Phänotyp auf (Chen et al. 2020b). Bei heterozygoten Mutationsträger*innen sind intrazerebrale Kalzifikationen nicht obligatorisch und reichen beim Vorhandensein von einer leichten, bis hin zu einer stark diffusen Ausprägung (Carecchio et al. 2023; Chen et al. 2020b). Die radiologische Penetranz liegt bei diesen Patient*innen insgesamt bei nur 73,7 % und auch die klinische Penetranz ist deutlich geringer als bei homozygoten Mutationsträger*innen (ebd.). Daher wird vermutet, dass der Phänotyp bei *MYORG*-Patient*innen einer rezessiven Vererbung mit inkompletter Dominanz bzw. Semidominanz unterliegt (ebd.).

Derzeit sind über 60 krankheitsassoziierte Mutationen von MYORG bekannt (Balck et al. 2021). Am häufigsten sind Missense-Mutationen (55 %), gefolgt von in-frame-Indels (19 %) sowie trunkierenden Frameshift- oder Nonsense-Mutationen (26 %) (ebd.). Der Großteil der Mutationen ist weit verteilt im C-terminalen, luminalen Fragment zu finden, sodass kein Hotspot definiert werden kann (Chen et al. 2023).

In der klinischen Evaluation präsentieren sich Patient*innen mit MYORG-assoziiierter PFBC häufig mit Sprechstörungen (78 %). Diese entwickeln sich meist auf Grundlage einer Dystonie oder Spastik und resultieren in unterschiedlichen Dysphonien (Balck et al. 2021; Chen et al. 2023; Grangeon et al. 2019). Weitere häufige Symptome sind Bradykinesien (45 %), kognitive Defizite (43 %), supranukleäre Blickparesen (37,8 %), Ataxien (37 %) und Depressionen (11 %) (Balck et al. 2021; Chelban et al. 2020).

1.2.2 Aufbau und Funktion

MYORG, auch bekannt als *KIAA1161* oder *nuclear envelope transmembrane protein 37 (NET37)*, befindet sich auf der Bande 13.3 des kurzen Arms von Chromosom 9 und kodiert für das gleichnamige Typ-II-Transmembranprotein MYORG (Yao et al. 2018). Dieses besteht aus 714 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 81087 Dalton (Da) (Stelzer et al. 2016). Es setzt sich, wie in *Abbildung 4* zu sehen ist, aus drei Domänen zusammen – einer aminoterminalen (N-terminalen), cytoplasmatischen (AS 1–57), einer transmembranen (AS 58–79) sowie einer langen, luminalen, C-terminalen Domäne mit enzymatischer Aktivität (AS 80–714) (Yao et al. 2018). Das Protein zeigt eine ubiquitäre Gewebeexpression im ER und der Kernhülle menschlicher Zellen, wobei es im ZNS vor allem im ER von Astrozyten zu finden ist (Datta et al. 2009; Fagerberg et al. 2014).

Im Jahre 2006 ordnete Chen et al. MYORG erstmals mittels Sequenzhomologien der GH31 zu (Chen et al. 2006). Drei Jahre später legte Datta et al. dessen Rolle bei der Myogenese von C2C12-Zellen dar, indem er zeigte, dass eine MYORG-Depletion mit einer reduzierten Aktivierung des AKT-Signalwegs sowie einer mangelhaften Sekretion des insulinähnlichen Wachstumsfaktors II (Insulin-like growth factor 2 [IGF-II]) einhergeht (Datta et al. 2009). Ein in vitro-Nachweis der Glycosidasefunktion gelang ihm damals nicht und konnte erstmals im Jahre 2022 durch Meek et al. erfolgen. Mittels einer Reihe von strukturellen und biochemischen Analysen wies er die Rolle von MYORG als α -Galaktosidase nach (Meek et al. 2022). Interessanterweise weist MYORG eine erhöhte Substratspezifität für Gal- α 1,4-Glc – ein Disaccharid, das im menschlichen Körper in keinem bekannten Glykan vorkommt – auf (ebd.). Es wird angenommen, dass dieses Disaccharid noch entdeckt werden wird und dass MYORG über die Spaltung glykosidischer Bindungen die Faltung und Entwicklung von Glykoproteinen im ER reguliert (Meek et al. 2022).

Zu den potenziellen Substraten von MYORG gehören auch die PFBC-assoziierten Glykoproteine SLC20A2, PDGFRB, PDGFB und XPR1 (Keller et al. 2013; Legati et al.

2015; Nicolas et al. 2013b; Wang et al. 2012). Fehlfaltungen dieser Proteine könnten über die, in den vorausgehenden Kapiteln beschriebenen, Mechanismen zur Beeinträchtigung der Phosphathomöostase sowie der Integrität der neurovaskulären Einheit führen und dadurch zur Krankheitsentwicklung beitragen. Darüber hinaus könnte ein Verlust der enzymatischen Aktivität von MYORG in einer astrozytären Dysfunktion resultieren und dadurch bzw. über die gestörte Wechselwirkung mit umliegenden Komponenten der NVU wie Perizyten oder glatten Muskelzellen die Ausbildung der PFBC bedingen (Xu et al. 2023).

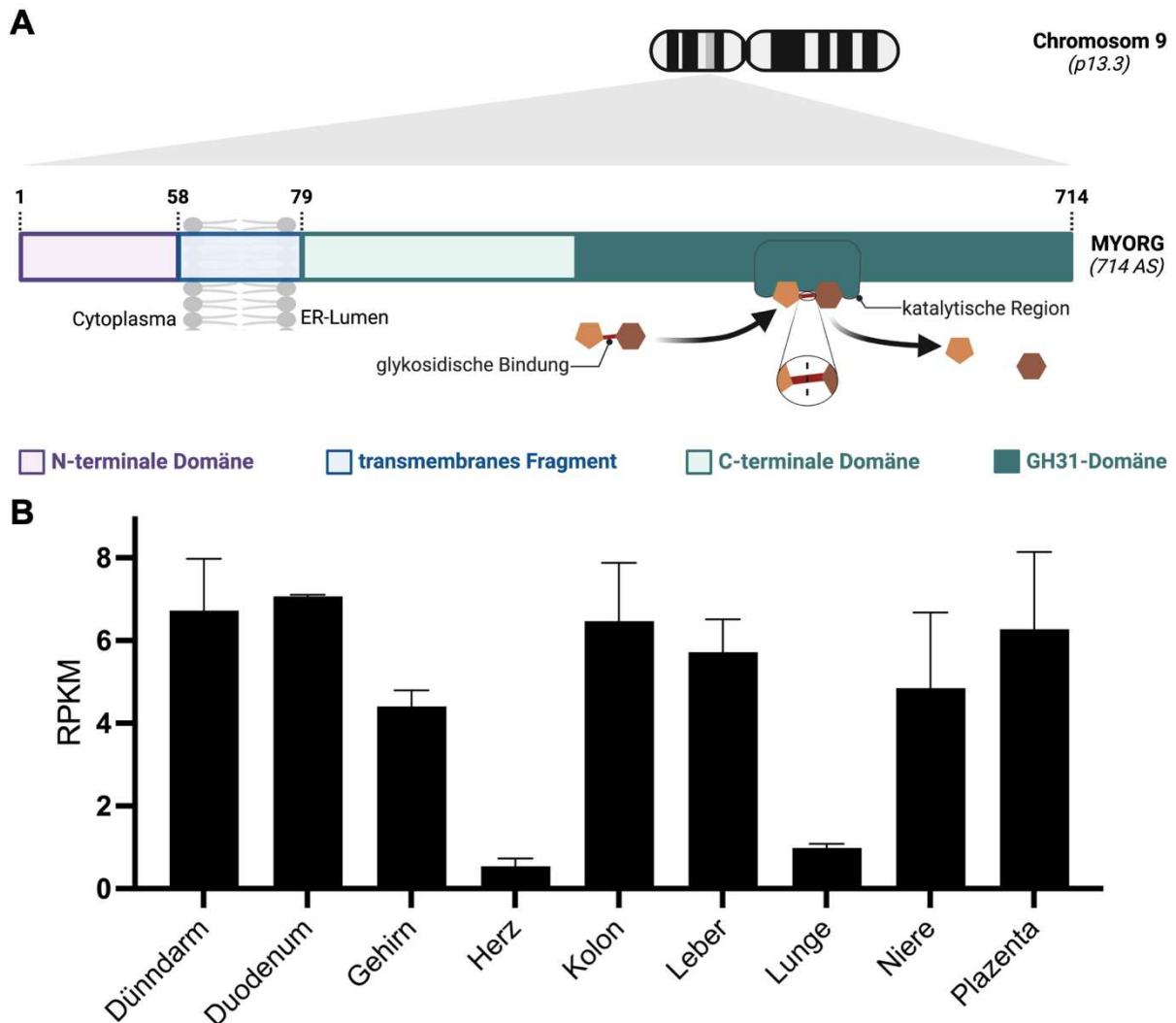


Abbildung 4: Genlokus, Struktur und Expression von MYORG

(A) Schematische Darstellung von Chromosom 9 mit der Hervorhebung der Bande 13.3 des p-Arms, auf dem sich *MYORG* befindet. Weiterhin wird der Aufbau von *MYORG* aus der N-terminalen und C-terminalen Domäne sowie dem transmembranen Fragment dargestellt. Die C-terminale Domäne enthält eine Glycosyl-Hydrolase-Familie 31 (GH31)-Domäne mit enzymatischer Aktivität. Diese hat eine erhöhte Substrataffinität für Gal- α 1,4-Glc und spaltet glykosidische Bindungen. Abbildung erstellt mit BioRender.com. **(B)** Balkendiagramm mit Durchschnittswerten und Standardabweichungen von humanen Genexpressionsdaten einer RNA-Sequenzierung unterschiedlicher Gewebe in reads per kilobase of transcript per million mapped reads (RPKM). Die Daten stammen von insgesamt 95 Individuen. *MYORG* wird bei schwankender Expressionsstärke ubiquitär exprimiert (Daten übernommen von Fagerberg et al.).

1.2.3 MYORG im Tiermodell

Die erstmalige Beschreibung einer Kolo-kalisation von MYORG mit den astrozytären Markern S100 β und GFAP in Hirnschnitten von Mäusen erfolgte durch Yao et al. im Jahre 2018. Weiterhin untersuchte er MYORG-Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid [mRNA]) in unterschiedlichen Geweben sowie insbesondere Hirnregionen von C57BL/6J-Mäusen und zeigte eine ubiquitäre Expression in allen Gewebearten sowie eine besonders hohe Expressionsstärke im Cerebellum der Mäusehirne (Yao et al. 2018). Er entwickelte zudem ein Mausmodell mit einem *MYORG*-Knockout (KO). Dafür brachte er mittels Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated protein 9 (CRISPR-Cas9) einen *MYORG*-KO in eine C57BL/6J Zygote ein. Die so generierten Mäuse wurden im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen des gleichen Mäusestamms in regelmäßigen Abständen auf das Vorhandensein von Kalzifikationen untersucht. Dabei zeigten sich bis zum achten Monat keine Veränderungen. Ab dem neunten Monat konnten in mehreren Färbungen mit Alizarinrot, von Kossa, Hämatoxylin-Eosin (H&E), Alcianblau und periodic acid–Schiff (PAS)-Reaktion Kalzifikationen im Thalamus von *MYORG*-KO-Mäusen beobachtet werden. Damit ordnen sich die *MYORG*-KO-Mäuse bezüglich der Zeit bis zur Ausbildung von Kalzifikationen inmitten der übrigen PFBC-Mausmodelle ein, denn *SLC20A2*- und homozygote *PDGFB*-Retentionssequenz (*PDGFB*^{ret/ret})-KO-Mäuse weisen mit acht Wochen bzw. zwei Monaten deutlich früher intrazerebrale Kalzifikationen auf (Jensen et al. 2018; Keller et al. 2013). Hingegen konnten in *PDGFRB*- und *JAM2*-KO-Mäusen im Beobachtungszeitraum von 14 bzw. 18 Monaten keinerlei Kalzifikationen nachgewiesen werden (Schottlaender et al. 2020; Vanlandewijck et al. 2015).

Ein Nachteil des Mausmodells ist die lange Zeitspanne bis zur Entwicklung der Kalzifikationen, sodass auch Untersuchungen bezüglich der Lokalisation und Ausbreitung von Ablagerungen, Verhaltensänderungen der Tiere sowie des Einflusses potentieller Therapeutika viel Zeit in Anspruch nehmen. Mit dieser Rationale entwickelten Zhao et al. 2022 ein Tiermodell an Zebrafischen. Zunächst führte er an der mRNA aus unterschiedlichen Hirnregionen des Zebrafisch-WTs des Stammes AB Expressionsanalysen durch. Es bestätigte sich, dass MYORG eine besonders hohe Expression im Cerebellum aufweist. Daraufhin generierte er einen *MYORG*-Knockdown (KD) mithilfe von Morpholino-Oligomeren (MO). In diesem Fall hatte das MO die komplementäre Sequenz zur *MYORG*-mRNA von Exon 2 und Intron 2, sodass es sich an die mRNA anlagern und deren Spleißstellen blockieren konnte. Die Injektion erfolgte in einem frühen Entwicklungsstadium des Embryos und bereits zwei bis vier Tage nach der Befruchtung konnten in den *MYORG*-KD-Zebrafischen Kalzifikationen mittels Calceinfärbung nachgewiesen werden. Trotz dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass Zebrafische eine etwa nur 67-prozentige Überlappung mit der humanen Proteinsequenz von MYORG aufweisen. Zudem haben die generierten *MYORG*-KD-Zebrafische nur eine Überlebenszeit von etwa 7 Tagen, sodass auch dieses Modell einige Limitationen mit sich bringt. (Zhao et al. 2022a)

1.3 Die neurovaskuläre Einheit

Das Konzept der NVU geht zurück auf das Jahr 2001 (Iadecola 2017). Es bezeichnet die Interaktion des ZNS mit dem Gefäßsystem, wodurch unter anderem eine kontinuierliche zerebrale Perfusion und die davon abhängigen neuronalen Funktionen sichergestellt werden (ebd.). In den folgenden Abschnitten sollen die, an diesem strukturellen Geflecht und physiologischen Prozessen beteiligten, Zelltypen näher erläutert werden. Weiterhin soll auf die BHS, die den Austausch diverser Ionen, Moleküle sowie Zellen zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS reguliert und damit ein wesentlicher Bestandteil der NVU ist, eingegangen werden (Daneman und Prat 2015).

1.3.1 Aufbau und Funktion

Obwohl das menschliche Gehirn durchschnittlich nur etwa 2 % des Körpergewichts ausmacht, ist es für über 20 % des Energie- sowie Sauerstoffverbrauchs des gesamten Körpers verantwortlich (Jain et al. 2010; Magistretti und Allaman 2015). Eine weitere Besonderheit sind die extrem geringen Sauerstoff- und Energiereserven des Gehirns und die damit einhergehende Notwendigkeit einer konstanten Perfusion zur Deckung des Sauerstoff- und Glucosebedarfs (McConnell und Mishra 2022). Um dieser Versorgung gerecht zu werden, verfügt der Mensch über ein sehr feines, neurovaskuläres Netzwerk, in dem keine kortikale Hirnzelle mehr als 25 µm von einer Kapillare entfernt ist (Lovick et al. 1999). Im Folgenden werden der Aufbau und die Funktion der einzelnen Komponenten der NVU erläutert. Diese werden entsprechend der *Abbildung 5* von innen nach außen abgearbeitet.

Die Blutgefäße des ZNS werden von einer kontinuierlichen Schicht von Endothelzellen gebildet (McConnell und Mishra 2022). Diese sind über Tight Junctions miteinander verbunden, um so eine unkontrollierte Passage von Ionen, Molekülen oder Zellen über das Endothel zu verhindern und eine adäquate Barrierefunktion sicherzustellen (Andreone et al. 2017; Chow und Gu 2017). Zur Gewährleistung eines gerichteten Transports zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS verfügen die Endothelzellen über eine Vielzahl an luminal und basolateral gelegenen Rezeptoren sowie Transportern (Cornford und Hyman 2005). Die strukturelle Zusammensetzung bzw. Permeabilität der Endothelzellen kann von Faktoren wie ihrer Lokalisation im ZNS, immunologischen und inflammatorischen Stimuli sowie der zirkadianen Rhythmik beeinflusst werden (Cuddapah et al. 2019; Jambusaria et al. 2020).

An der basolateralen Seite schließt sich den zerebralen Blutgefäßen eine Basalmembran an (McConnell und Mishra 2022). Diese Schicht enthält keine Zellen und kann in einen vaskulären und einen parenchymalen Anteil untergliedert werden (ebd.). Ersterer liegt den Endothelzellen auf und wird auch von diesen sekretiert, während der parenchymale Anteil die Gefäße in der Umgebung verankert und von den astrozytären Endfüßen gebildet wird (Castro Dias et al. 2019). Auch diese Schicht unterliegt diversen strukturellen Anpassungsprozessen, sodass die Dicke und

Zusammensetzung der Basalmembran abhängig von der Lokalisation im ZNS, zellulären Interaktionen sowie Alterungsprozessen beeinflusst werden kann (Ceafalan et al. 2019; Xu et al. 2019). Eine funktionelle Basalmembran trägt zum Erhalt der endothelialen Barrierefunktion und BHS bei, bewahrt den transendothelialen elektrischen Widerstand (transendothelial electrical resistance [TEER]) und ermöglicht die Verankerung der astrozytären Endfüße an den Endothelzellen über das Transmembranprotein Aquaporin 4 (Menezes et al. 2014; Xu et al. 2019). Eine astrozytäre Dysfunktion kann hingegen in einer strukturellen Beeinträchtigung der Basalmembran resultieren und so die Integrität der NVU einschränken (Robel et al. 2009).

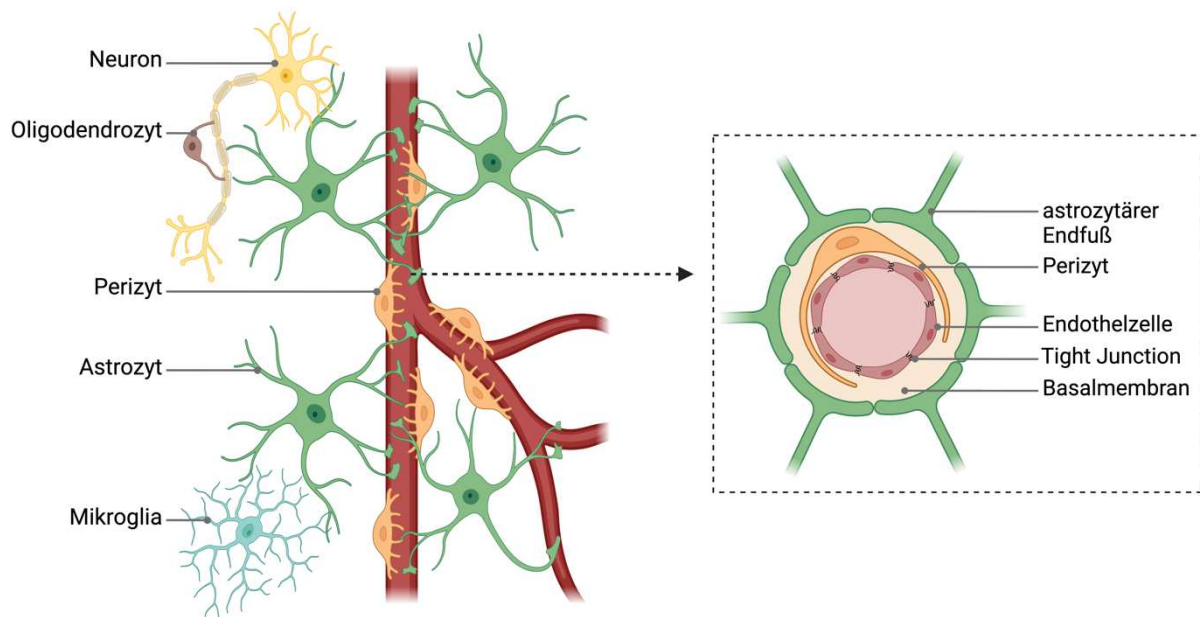


Abbildung 5: Neurovaskuläre Einheit und Blut-Hirn-Schranke

Links ist eine schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit mit deren zellulären Bestandteilen zu sehen. Zentral befindet sich eine Kapillare, die von Perizyten, Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten umgeben ist. Rechts ist der schematische Querschnitt einer Kapillare mit den Komponenten einer Blut-Hirn-Schranke dargestellt. Zusätzlich zu den bereits genannten zellulären Bestandteilen, sind hier zusätzlich die Basalmembran sowie Tight Junctions abgebildet. VSMCs sind kein Bestandteil dieser Abbildung, da diese in der Regel in größeren Gefäßen zu finden sind. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Um die Endothelzellen und die Basalmembran herum findet sich eine Schicht von muralen Zellen, die von wesentlicher Bedeutung für die Stabilität, die Entwicklung und den Vasotonus des zerebralen Gefäßnetzwerks ist (Warren und Gerecht 2023). Dazu gehören unter anderem Perizyten, die im ZNS in einer besonders hohen Dichte vorkommen (Armulik et al. 2011). Diese nehmen durch ihre vielseitigen Interaktionen mit den weiteren Komponenten der NVU Einfluss auf die Entwicklung des Gefäßnetzwerks, die Integrität der BHS und den kapillären Blutfluss (Daneman et al. 2010; Gaengel et al. 2009; Hall et al. 2014). Perizyten exprimieren Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie PDGFB und vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (vascular endothelial growth factor [VEGF]) und spielen daher eine wichtige Rolle in der Vaskulogenese und Angiogenese (Ribatti et al. 2011). Weiterhin besitzt ein Teil

der Perizyten im adulten ZNS kontraktile Elemente und kann dadurch Einfluss auf den zerebralen Blutfluss in Kapillaren nehmen (Gonzales et al. 2020). Zur Regulation des zerebralen Blutflusses in größeren Gefäßen wird allerdings der zweite Subtyp der muralen Zellen – die VSMCs – benötigt (McConnell und Mishra 2022). Diese ordnen sich in vielen konzentrischen Schichten um die größeren Blutgefäße an, exprimieren eine Vielzahl von Ionenkanälen und stehen über Gap Junctions miteinander in Verbindung, sodass sich Änderungen im Vasotonus entlang des Gefäßverlaufs ausbreiten können (Christ et al. 1996; McConnell und Mishra 2022).

Die nächste Zellschicht der NVU wird von Astrozyten – der häufigsten Gliazelle im ZNS – gebildet (McConnell und Mishra 2022). Astrozyten spielen eine zentrale Rolle im ZNS und der NVU und haben eine Vielzahl von Funktionen. Morphologisch betrachtet umhüllen sie mit ihren Ausläufern die Struktur aus Endothelzellen, der Basalmembran und den muralen Zellen (Mathiisen et al. 2010). Zudem stehen die Astrozyten durch weitere Ausläufer mit Synapsen, Ranvierschen Schnürringen, anderen neuronalen Substrukturen sowie mit umliegenden Astrozyten in Kontakt (Sofroniew und Vinters 2010). Die einzelnen Astrozyten sind über Gap Junctions miteinander verbunden und bilden dadurch ein funktionales Synzytium (Scemes und Spray 2003). Dieses Synzytium exprimiert transmembrane Transportproteine wie Aquaporin 4 und den einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal 4.1 (inward rectifier K⁺ channel 4.1 [K_{ir}4.1]), wodurch in Zusammenhang mit Perioden starker neuronaler Erregung Kaliumspitzen abgepuffert und zur Homöostase des extrazellulären Milieus beigetragen werden kann (Amiry-Moghaddam et al. 2003; Ishii et al. 1997; Scemes und Spray 2003). Auch können Signale mithilfe von Kalziumschwankungen innerhalb der Astrozyten über weite Strecken hinweg vermittelt werden (Araque et al. 2014). Durch Wechselwirkungen mit Endothelzellen und Perizyten sowie der Bildung des parenchymalen Anteils der Basalmembran regulieren Astrozyten die Instandhaltung der BHS-Integrität, endotheliale Transportprozesse, die natürliche Immunantwort sowie die cerebrovaskuläre Perfusion (Boulay et al. 2017; Li et al. 2021). Letztere wird beispielsweise durch den Einfluss von Mediatoren wie Prostaglandin E₂ oder ATP auf den Vasotonus vermittelt (Kim et al. 2015; Rosenegger et al. 2015). In Zusammenhang damit passen Astrozyten den Blutfluss an das Aktivitätslevel von Hirnregionen an – ein Prozess der auch neurovaskuläre Kopplung (neurovascular coupling [NVC]) genannt wird (Howarth et al. 2021). Der NVC liegt ein interzellulärer Signalweg zugrunde, der von Neuronen ausgehend über Astrozyten an den VSMCs wirkt und dadurch eine Regulation des Vasotonus ermöglicht (ebd.). Des Weiteren bilden Astrozyten ein komplexes metabolisches Netzwerk und können über die Glucosebereitstellung in metabolisch aktiven Hirnarealen die neuronale Plastizität sowie das Verhalten modulieren (Clasadonte et al. 2017; Murphy-Royal et al. 2020; Rouach et al. 2008).

Mikroglia entspringen embryologisch betrachtet dem Dottersack und wandern im Embryo als erste Gliazellen in das sich entwickelnde Gehirn ein (Thion et al. 2018). Dabei nutzen sie das Gefäßnetzwerk als Leitstruktur und fördern zugleich die

Angiogenese sowie die Fusion endothelialer Spitzenzellen in Kapillarbetten (Coelho-Santos und Shih 2020; McConnell und Mishra 2022). Im adulten Gehirn sind sie gleichmäßig über das gesamte Gewebe verteilt und machen etwa 10 bis 15 % aller Zellen im ZNS aus (McConnell und Mishra 2022; Xavier et al. 2014). Sie wirken als Gewebsmakrophagen und koordinieren in dieser Funktion die Immunantwort durch die Ausschüttung von Gliotransmittern und Zytokinen sowie die Stimulierung peripherer Immunzellen (Fenn et al. 2014; Osipova et al. 2018). Weiterhin nehmen auch die Mikroglia durch die wechselseitige Interaktion mit Astrozyten und Endothelzellen Einfluss auf die BHS und die NVU im Allgemeinen (Ronaldson und Davis 2020; Xing et al. 2018).

In unmittelbarer Nähe zu den Neuronen befindet sich der nächste Subtyp der Gliazellen – die Oligodendrozyten (Hamanaka et al. 2018). Diese kreieren durch spiralförmige Umwicklung kurzer axonaler Abschnitte die Myelinscheide und ermöglichen so eine Optimierung der elektrischen Impulsübertragung (Bradl und Lassmann 2010). Weiterhin bilden sie einen Schutz der neuronalen Axone und können diese mit wichtigen Metaboliten wie Glucose versorgen (Meyer et al. 2018). Oligodendrozyten stehen ebenfalls in einer wechselseitigen Beziehung zu der BHS sowie den daran beteiligten Zellen, wie Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten (Miyamoto et al. 2015; Miyamoto et al. 2014; Seo et al. 2014). So können sie beispielsweise über Gap Junctions mit Astrozyten in Verbindung stehen und über parakrine Sekretion vom Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und FGF durch Endothelzellen in ihrem Überleben und ihrer Differenzierung beeinflusst werden (Arai und Lo 2009; Rouach et al. 2002).

All diese Zelltypen und deren komplexe Interaktionen dienen im Wesentlichen der Schaffung eines adäquaten Milieus, in dem die neuronale Signalübertragung zur Regulation diverser Körperfunktionen stattfinden kann. Doch eine fein modulierbare und konstante Perfusion, die strukturell von den Komponenten der NVU sichergestellt wird und regulativen Mechanismen wie der NVC unterliegt, beschreibt nur ein Prinzip, das für ein funktionierendes ZNS nötig ist. Eine weitere zentrale Struktur, die den Austausch von Ionen, Molekülen sowie Zellen zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS reguliert und eine Substruktur der NVU darstellt, ist die BHS. Weitere Grundlagen zur BHS sowie deren Relevanz im Kontext neurologischer Erkrankungen sollen Gegenstand des nächsten Kapitels sein.

1.3.2 Blut-Hirn-Schranke

Die BHS stellt die Homöostase des ZNS sicher, indem sie als selektive Diffusionsbarriere unter physiologischen Bedingungen nur für ungeladene Moleküle mit einem Durchmesser von bis zu 4 nm, Gasmoleküle wie Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid oder Stickstoff sowie fettlösliche Stoffe wie Alkohol, Koffein und Nikotin passierbar ist (Daneman und Prat 2015; Zhao et al. 2022b). Ihr komplexer Aufbau aus Endothelzellen, einer Basalmembran, astrozytären Endfüßen, Perizyten

und Mikroglia stellt die Grundlage für diese Selektivität dar (s. *Abbildung 5*; ebd.). Um eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen sowie den Abtransport von Abfallprodukten zu bewerkstelligen, verfügen die Zellen der BHS über eine Vielzahl von transmembranen Transportmolekülen (ebd.). Sind einzelne Zellen oder Proteine der BHS beeinträchtigt, kann sich dies auf ihre Gesamtheit auswirken, sodass pathophysiologische Veränderungen der BHS häufig bei neurologischen und zum Teil sogar bei systemischen Erkrankungen beobachtet werden können (Daneman und Prat 2015). Zwei der zehn weltweit führenden Todesursachen – Schlaganfälle (Platz 2) sowie Demenzen (Platz 7) – gehen mit pathologischen Veränderungen der BHS einher (Abdullahi et al. 2018; Barberio et al. 2022; Cai et al. 2018; World Health Organization 2020). Doch auch seltenere Erkrankungen wie ALS, Epilepsie, Leberversagen sowie nicht zuletzt die PFBC können damit in Verbindung gebracht werden (Daneman und Prat 2015; Xu et al. 2023). Trotz der beträchtlichen Relevanz der Thematik sind die grundlegenden pathophysiologischen Mechanismen bis heute nicht vollständig aufgeklärt (ebd.). Weitere Forschungsanstrengungen werden daher nötig sein, um dysfunktionale Veränderungen in der BHS zu entschlüsseln und, aufbauend darauf, neuartige Therapeutika zu entwickeln.

1.3.2.1 In-vitro Modelle für die Blut-Hirn-Schranke

In-vitro BHS-Modelle lassen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen einteilen – mikrofluide Modelle sowie Modelle mit Transwell-Membraneinsätzen. Letztere, die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden und in *Abbildung 6* dargestellt sind, ermöglichen es, Zellkulturplatten in unterschiedliche Kompartimente zu unterteilen. Abhängig von der Porengröße und der Anordnung der Zellschichten kann der Grad der Interaktion zwischen den Kompartimenten beeinflusst werden.

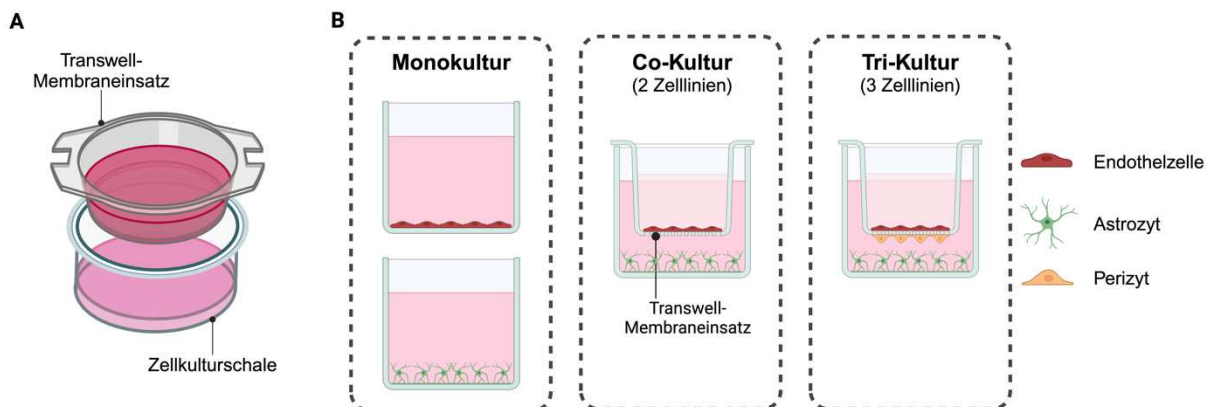


Abbildung 6: Membraneinsatz und Co-Kulturen

A Schematischer Aufbau eines Transwell-Membraneinsatzes. Die Größe kann an die verwendete Zellkulturschale bzw. -platte angepasst werden. Weiterhin gibt es unterschiedliche Porengrößen der Membran. Abbildung erstellt mit BioRender.com. **B** Anfängen von einer einfachen Monokultur (links) können unter Verwendung von Membraneinsätzen in-vitro BHS-Modelle unterschiedlicher Komplexität entwickelt werden. In der mittleren Co-Kultur erfolgt die Aussaat der Endothelzellen auf der Oberseite des Membraneinsatzes und die Astrozyten werden auf der Zellkulturschale gesät. Rechts werden zusätzlich Perizyten auf der Unterseite des Membraneinsatzes kultiviert. Abbildung erstellt mit BioRender.com und modifiziert nach einer ähnlichen Abbildung von Barberio et al. 2022.

Weitere Modifikationen an den Modellen können über die Anzahl und Art verwendeter Zelllinien, ihre Dichte bei der Aussaat, ihre Kultivierungsdauer, die verwendeten Medien sowie die durchgeführten Tests vorgenommen werden. Eine exemplarische Aufführung einiger in-vitro BHS-Modelle ist in *Tabelle 28* zu finden.

Die Validierung der in-vitro BHS-Modelle erfolgt häufig durch Expressionsanalysen von Transportern wie Glukosetransporter 1 (GLUT1), Rezeptoren wie dem Transferrinrezeptor und von Strukturproteinen wie Occludin oder Claudin-5. Neben einer strukturellen Kontrolle erfolgen auch funktionelle Testungen der Permeabilität oder die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands (transendothelial electrical resistance [TEER]) (Helms et al. 2016; Rice et al. 2022). Eine Vielzahl von Studien konnte zeigen, dass 3D Co-Kulturen mit mehreren Zelllinien deutliche Vorteile gegenüber einer 2D-Monokultur aufweisen und sowohl strukturell, als auch funktionell der in-vivo BHS näher kommen (Hatherell et al. 2011; Kim et al. 2022).

Durch die Modellierung der BHS können die Interaktionen zwischen ihren einzelnen zellulären Komponenten erforscht und durch die Deprivation oder Applikation bestimmter Moleküle, Nährstoffe oder Toxine sowie die Verwendung von vorbehandelten oder krankheitsassoziierten Mutationen tragender Zelllinien Krankheitsmodelle entwickelt werden (Rice et al. 2022). Weiterhin bieten sie in der Medikamentenzulassung eine potentielle Alternative zu Tiermodellen, die häufig eine unzureichende Vorhersage zum Einfluss neuer Therapeutika auf den menschlichen Organismus zulassen (Rice et al. 2022; Van Norman 2019).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Mutationen in *MYORG* sind die zweithäufigste Ursache für die genetisch aufgeklärte PFBC, führen bei Mutationsträger*innen besonders häufig zur Ausbildung von intrazerebralen Kalzifikationen und kennzeichnen sich durch eine fast 100-prozentige klinische Penetranz. Trotz weitreichender Forschungsanstrengungen in Tiermodellen aber auch in strukturellen und biochemischen Analysen fehlen bis heute nähere Erkenntnisse zur Funktion von *MYORG* im menschlichen Körper sowie dessen Rolle bei der Pathogenese der PFBC. Laut dem aktuellen Forschungsstand ist *MYORG* im zentralen Nervensystem vor allem im endoplasmatischen Retikulum von Astrozyten lokalisiert und trägt über eine Beeinträchtigung der neurovaskulären Einheit zur Entwicklung der PFBC bei. Ausgehend davon soll im Rahmen dieser Arbeit an unterschiedlichen Zelllinien die Lokalisation und Expression von *MYORG* analysiert und die Grundlage für ein dreidimensionales in-vitro Blut-Hirn-Schranken-Modell geschaffen werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen humane, embryonale Stammzellen mit einem *MYORG*-Knockout (p.W75*-Mutation) sowie deren isogene Wildtyp-Kontrollen anhand von etablierten Protokollen in induzierte Astrozyten differenziert werden. An den induzierten Astrozyten sollen anhand von immunzytochemischen Färbungen Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von *MYORG* durchgeführt und in einer anschließenden Analyse interpretiert werden.

Im zweiten Teil soll ein dreidimensionales in-vitro Blut-Hirn-Schranken-Modell aus immortalisierten humanen Astrozyten (IM-HAs) und Endothelzellen (hCMEC/D3) erarbeitet werden. Neben der Kultivierung der Zellen in herkömmlichen Zellkulturplatten soll dabei auf Polyestermembraneinsätze gesetzt werden, die ein räumlich getrenntes Wachstum der unterschiedlichen Zelllinien ermöglichen. Das Modell soll anhand von Proliferationsanalysen bezüglich der verwendeten Zellkulturmedien, der Zelldichte bei Aussaat sowie der Dauer der Co-Kultur optimiert und im Vergleich mit einer Vielzahl weiterer Konditionen im Hinblick auf die folgenden Parameter charakterisiert werden:

- Nukleäre und zelluläre Oberfläche

- Fluoreszenzmikroskopische *MYORG*- und GFAP-Intensität

- Proteinexpression der astrozytären Reifemarker ALDH1L1, GFAP und SOX9

- Proteinexpression von *MYORG*

- Proteinexpression des Endothelzellmarkers CD31

Damit sollen im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse zur Expression von *MYORG* in unterschiedlichen Zelllinien und einer Vielzahl von Kultivierungsbedingungen geschaffen werden. Weiterhin erfolgt erstmalig eine auf Astrozyten fokussierte Analyse eines dreidimensionalen in-vitro Blut-Hirn-Schranken-Modells.

2 Material

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die Zelllinien in *Tabelle 2* wurden freundlicherweise von Dr. Claudio Acuna (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um die humanen embryonalen Stammzellen WA01 der Zelllinie H1 von WiCell® (hPSCReg ID: WAe001-A). Die Zellen stammen aus einer männlichen Blastozyste und weisen keine bekannte Mutationen mit Krankheitswert auf. Die Arbeitsgruppe von Dr. Claudio Acuna hat mittels der CRISPR/Cas9-Methode Modifikationen am Exon 3 des MYORG-Gens vorgenommen. Die Generierung der Klone ist kein Bestandteil dieser Dissertation.

Tabelle 2: Humane embryonale Stammzellen

Zelllinie	Geschlecht	Klon	Genmodifikation
WA01-H1	Männlich	2 E hom	MYORG-KO
WA01-H1	Männlich	12 E hom	MYORG-KO
WA01-H1	Männlich	10 E WT	MYORG-WT
WA01-H1	Männlich	11 B WT	MYORG-WT

Die Zelllinien hBMEC und hCMEC/D3 (s. *Tabelle 3*) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Christian Schwerk (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsmedizin Mannheim) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Immortalisierte Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Reprogrammierungsmethode	Bestellnummer	Hersteller*in
hBMEC	Humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen	Lenti-Simian-Virus 40 (SV40) Lentivirus	N/A	Kwang Sik Kim (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA)
hCMEC/D3	Humane kardiale mikrovaskuläre Endothelzellen	Lenti-SV40 Lentivirus	SCC066	Merck (Darmstadt, Deutschland)
IM-HA	Humane Astrozyten	Lenti-SV40 Lentivirus	P10251-IM	INNOPROT (Derio, Spanien)

2.1.2 Medien, Lösungen und niedermolekulare Verbindungen für die Zellkultur

Tabelle 4: Lösungen und niedermolekulare Verbindungen für die Zellkultur

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in
Accutase	A1110501	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
B-27 Supplement (50x)	17504044	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Bambanker	BB02	NIPPON Genetics EUROPE GmbH (Düren, Deutschland)
BMP4	120-05ET	Peprtech (Hamburg, Deutschland)
Borsäure	A10896	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
CNTF	450-13	Peprtech (Hamburg, Deutschland)
DBcAMP	D0627	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DMEM mit GlutaMAX	10566016	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DMEM/F12 mit Glutamin und HEPES	11330057	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DMSO	D5879	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Doxycyclin	D9891	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DPBS (1x)	D8537	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol	32205	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FGF-2 (154 AS)	GFH146	Cell Guidance Systems (Cambridge, UK)
FGF-basic (154 AS)	100-18B	Peprtech (Hamburg, Deutschland)
GlutaMAX Supplement (100x)	35050038	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HBEGF	E4643	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hygromycin B	H3274	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Insulin	91077C	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kollagen Typ 1	C3867	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Matrigel	354230	Corning (Corning, USA)
MEM-NEAA (100x)	11140035	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
N-Acetylcystein	A8199	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
N2 Supplement	17502001	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Natriumpyruvat (100x)	11360039	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Natriumselenit	A8960	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NEAA	11140035	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Neurobasal	21103049	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Penicillin/Streptomycin (100x)	15140122	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Poly-D-Lysin (PDL)	P7886	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Poly-L-Lysin (PLL)	P2636	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Polyethylenimin (PEI)	P3143	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Progesteron	P8783	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

MATERIAL

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in
Puromycin	540222	EMD Millipore (Burlington, USA)
Putrescin	51799	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ROCK-Inhibitor	SM02	Cell Guidance Systems (Cambridge, UK)
Transferrin	T3705	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin-EDTA (0,5 %)	10779413	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 5: Kommerzielle Zellkulturmedien

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in
Astrocyte Medium	P60101	INNOPROT (Derio, Spanien)
EndoGRO-MV	SCME004-S	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
mTeSR1	85857	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
Opti-MEM	31985062	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 6: Selbstgemachte Zellkulturmedien und Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
Borat-Puffer	Reinstwasser Borsäure pH-Wert auf 8,4 einstellen	25 mM
Expansionsmedium	DMEM/F12 mit Glutamin und HEPES FBS N2 Supplement GlutaMAX	10 % (v/v) 1 % (v/v) 1 % (v/v)
FGF-Medium	Neurobasal B27 Supplement NEAA GlutaMAX FBS FGF CNTF BMP4	2 % (v/v) 1 % (v/v) 1 % (v/v) 1 % (v/v) 8 ng/mL 5 ng/mL 10 ng/mL
hBMEC-Einfriermedium	Endothelzellmedium DMSO	10 % (v/v)
hBMEC-Medium	DMEM mit GlutaMAX FBS Penicillin/Streptomycin	10 % (v/v) 1 % (v/v)
hCMEC/D3-Einfriermedium	EndoGRO-MV DMSO	10 % (v/v)
HEK-293T-Einfriermedium	HEK-293T-Medium DMSO	10 % (v/v)

MATERIAL

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
HEK-293T-Medium	DMEM mit GlutaMAX	
	FBS	10 % (v/v)
	MEM-NEAA	1 % (v/v)
	Natriumpyruvat	1 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
IM-HA-Einfriermedium	Astrocyte Medium	
	DMSO	10 % (v/v)
N2 Supplement	DMEM/F-12 mit Glutamin	70 % (v/v)
	Insulin	0,5 mg/mL
	Progesteron	630 ng/mL
	Putrescin	1,612 mg/mL
	Natriumselenit	520 ng/mL
	Transferrin	10 mg/mL
Reifemedium (1:1 DMEM/F12 (mit Glutamin und HEPES) und Neurobasal)	N2 Supplement	1 % (v/v)
	Natriumpyruvat	1 % (v/v)
	GlutaMAX	1 % (v/v)
	N-acetyl-cystein	5 g/mL
	HBEGF	5 ng/mL
	CNTF	10 ng/mL
	BMP4	10 ng/mL
	DBcAMP	500 µg/mL

Tabelle 7: Medienzusammensetzung für die Generierung induzierter Astrozyten

Tag	Bestandteile	Konzentration
-3	mTeSR1	
	ROCK-Inhibitor	10 µM
-2	mTeSR1	
-1	mTeSR1	
	ROCK-Inhibitor	10 µM
	Virus	1 µL/Well
0	mTeSR1	
	Doxycyclin	2,5 µg/mL
1 bis 2	Expansionsmedium	
	Doxycyclin	2,5 µg/mL
	Puromycin	1,25 µg/mL
	Hygromycin	200 µg/mL
3	Expansionsmedium	75 % (v/v)
	FGF-Medium	25 % (v/v)
	Doxycyclin	2,5 µg/mL
	Hygromycin	200 µg/mL
4	Expansionsmedium	50 % (v/v)
	FGF-Medium	50 % (v/v)
	Doxycyclin	

MATERIAL

Tag	Bestandteile	Konzentration
5	Hygromycin	2,5 µg/mL
		200 µg/mL
	Expansionsmedium	25 % (v/v)
	FGF-Medium	75 % (v/v)
	Doxycyclin	2,5 µg/mL
6	Hygromycin	200 µg/mL
	FGF-Medium	
	Doxycyclin	2,5 µg/mL
7 bis 8	FGF-Medium	
	Doxycyclin	2,5 µg/mL
10	Reifemedium	
	Doxycyclin	2,5 µg/mL

Tabelle 8: Beschichtungslösungen für die Zellkultur

Zelllinie	Beschichtungsmethode	Konzentration
hCMEC/D3	Kollagen Typ 1	0,01 % (w/v) in PBS
HEK-293T	PLL	0,1 mg/mL in Borat-Puffer
hESC	Matrigel	Verdünnung abhängig von Chargen-spezifischen Hersteller*inangaben
IM-HA	PDL	50 µg/mL in PBS

2.2 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 9: Primäre Antikörper für Immunofluoreszenz

Antigen	Wirt	Verdünnung	Bestell-nummer	Hersteller*in
ALDH1L1	Kaninchen	1:1000	85828	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
Aquaporin 4	Maus	1:100	ab9512	Abcam (Cambridge, England)
Calnexin	Maus	1:100	MA3-027	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
GFAP	Huhn	1:400	ab4674	Abcam (Cambridge, England)
MYORG	Kaninchen	1:50	PA5-63872	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 10: Primäre Antikörper für Western Blot

Antigen	Wirt	Verdünnung	Bestell-nummer	Hersteller*in
ALDH1L1	Kaninchen	1:1000	85828	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)

MATERIAL

Antigen	Wirt	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller*in
CD31	Ziege	1:1000	AF3628	R & D Systems (Minneapolis, USA)
GFAP	Kaninchen	1:5000	ab7260	Abcam (Cambridge, England)
MYORG	Kaninchen	1:400	PA5-63872	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
SOX9	Kaninchen	1:1000	ABE571	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller*in
Anti-Huhn IgY Alexa Fluor-633	Ziege	1:1000	A-21103	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-Kaninchen IgG (H+L), HRP	Ziege	1:10000	G-21234	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor-594	Esel	1:1000	A-11058	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-Kaninchen IgG Alexa-Fluor 555	Ziege	1:1000	A-21428	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-Maus IgG (H+L), HRP	Ziege	1:10000	G-21040	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-Maus IgG Alexa-Fluor 488	Esel	1:1000	A-21202	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-Ziege IgG (H+L), HRP	Kaninchen	1:10000	R-21459	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 12: Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Verdünnung/ Konzentration	Bestellnummer	Hersteller*in
Concanavalin A, Fluor 488	1:1000	CP94881	PerkinElmer (Waltham, USA)
DAPI	300 nM	422801	Biolegend (San Diego, USA)
Phalloidin, Fluor 568	1:1000	CP25681	PerkinElmer (Waltham, USA)

2.3 Kits

Tabelle 13: Kits

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in
Chemilumineszenz-Substrat	34577	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNA Clean & Concentrator-Kit	D4033	ZYMO RESEARCH EUROPE GMBH (Freiburg, Deutschland)
No-Stain Protein-markierungsreagenz	A44449	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pierce BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.4 Molekularbiologie

Tabelle 14: Reagenzien für die Molekularbiologie

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in
100 bp DNA Ladder	N3231	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
Agarose	0710	VWR International (Radnor, USA)
DNA Loading Buffer	10816015	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
dNTPs	147850010	Steinbrenner Laborsysteme (Wiesenbach, Deutschland)
MyTaq DNA-Polymerase	BIO-21105	Meridian Bioscience (Cincinnati, USA)
MyTaq Reaktionspuffer	BIO-37111	Meridian Bioscience (Cincinnati, USA)
Proteinase K	405-001	GeneON Bioscience (Ludwigshafen, Germany)

Die Plasmide in *Tabelle 15* und Primer in *Tabelle 17* wurden freundlicherweise von Dr. Claudio Acuna (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 15: Plasmide für die Lentivirusproduktion

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in/Quelle
GFAP::GFP	N/A	Arbeitsgruppe Dr. Claudio Acuna
M2-rtTA	20342	Addgene (Watertown, USA)
pMD2.G	12259	Addgene (Watertown, USA)
pMDLg/pRRE	12251	Addgene (Watertown, USA)
pRSV-Rev	12253	Addgene (Watertown, USA)
tetO-Sox9-Puro	N/A	Arbeitsgruppe Dr. Claudio Acuna

MATERIAL

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in/Quelle
tetO.Nfib.Hygro	N/A	Arbeitsgruppe Dr. Claudio Acuna

Tabelle 16: Selbstgemachte Lösungen für die Lentivirusproduktion

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration/Menge
DNA-Lösung	Opti-MEM	940 µL
	pMD2.G	7,5 µg
	pRSV-REV	7,5 µg
	pMDLg/pRRE	15 µg
	Vektor	30 µg
PEI-Lösung	Opti-MEM	180 µL
	PEI	180 µL

Tabelle 17: Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
MYORG E3 FWD	AGAACATGGCGTGCTCCAC
MYORG E3 REV	CAGCCCACTAATGCTCCAGA
MYORG GTYP CTRL FWD	GGAGACGCTGTAGTAGCACC
MYORG GTYP MUT FWD	AGGGAGACGCTGTAATAACAT

Tabelle 18: Reaktionsmischung für PCR

Bestandteil	Menge
DNA	5 µL
dNTPs	0,5 µL
MyTaq DNA-Polymerase	0,125 µL
MyTaq Reaktionspuffer	2,5 µL
Reinstwasser	6,875 µL
Rückwärtsprimer	5 µL
Vorwärtsprimer	5 µL

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 19: Kommerzielle Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in
Bolt Antioxidans	BT0005	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
LDS-Probenpuffer (4x)	NP0007	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MOPS SDS-Laufpuffer (20x)	NP0001	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

MATERIAL

Bezeichnung	Bestell-nummer	Hersteller*in
Probenreduktionsmittel (10x)	NP0009	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RIPA Lyse- und Extraktionspuffer	89900	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 20: Selbstgemachte Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
Lysepuffer	TRIS-HCl-Lösung EDTA SDS NaCl Proteinase K	5 mM 0,2 % (m/v) 200 mM 1 % (v/v)
Natriumacetat-Lösung	Reinstwasser Natriumacetat pH-Wert auf 5,5 einstellen	3 M
TAE	Reinstwasser Essigsäure EDTA TRIS	20 mM 1 mM 40 mM
TRIS-HCl-Lösung	Reinstwasser Tris-HCl pH-Wert auf 8 bis 8,5 einstellen	100 mM

Tabelle 21: Selbstgemachte Puffer und Lösungen für Western Blot

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
Laufpuffer	Reinstwasser MOPS SDS-Laufpuffer (20x) Bolt Antioxidans	5 % (v/v) 0,05 % (v/v)
Lysepuffer	RIPA Phosphataseinhibitor Proteaseinhibitor	1 Tablette/10 mL 1 Tablette/10 mL
Stripping Buffer	Reinstwasser Glycin SDS Tween 20 pH-Wert auf 2,2 einstellen	0,2 M 0,1 % (w/v) 1 % (v/v)
TBS 10x	Reinstwasser Trizma Base NaCl pH-Wert auf 7,6 einstellen	2,4 % (w/v) 8,8 % (w/v)

MATERIAL

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
TBS-T	Reinstwasser	
	TBS 10x	10 % (v/v)
	Tween 20	0,05 % (v/v)

Tabelle 22: Selbstgemachte Puffer und Lösungen für Immunzytochemie

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration/Menge
Aufbewahrungslösung	PBS	
	NaN ₃ -Lösung	0,1 % (v/v)
Blocklösung	PBS	
	FBS	10 % (v/v)
	Triton-X	0,1 % (v/v)
DAPI-Fluoreszenzfarbstoff	PBS	
	DAPI	300 nM
Mountinglösung	TRIS-HCl, pH 8,5	100 mM
	Glycerol	25 %
	Mowiol	10 %
	DABCO®	0,6 %
NaN ₃ -Lösung	PBS	
	NaN ₃	10 % (w/v)
PBS	Reinstwasser	
	NaCl	37 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10,0 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
PFA-Lösung	PBS	
	PFA	4 % (w/v)
	pH-Wert auf 7,2 einstellen	

2.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 23: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in
2-Propanol	1157	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
37 % HCl	836.1000	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Aqua-Poly/Mount	18606-20	Polysciences Europe GmbH (Hirschberg an der Bergstraße, Deutschland)
DABCO	0718.2	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA	147850010	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Essigsäure	36289	VWR International (Radnor, USA)
Ethanol	2246.1000	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Ethidiumbromid	7870.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

MATERIAL

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller*in
FBS	10270-106	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Glycerol	15523	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin	10070160	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
KCl	1632	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	1648	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Mowiol 4-88	0713.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	8622	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
NaCl	1367	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
NaN ₃	K305.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumacetat	3856.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	PIER26619	VWR International (Radnor, USA)
PFA	P6148	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	A156.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Phosphatase Inhibitor Mini Tablets	A32957	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Protease Inhibitor Mini Tablets	A32955	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
SDS	D5670	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Skim milk powder	846,150,500	VWR International (Radnor, USA)
TRIS	4855.5	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS-HCl	4855.5	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	1.08603.1000	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Trypan Blue	17-942E	Lonza (Basel, Schweiz)
Tween 20	9127.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 24: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Format	Bestellnummer	Hersteller*in
Blotting- Membranen	150 mm × 4 m	10600012	VWR International (Radnor, USA)
Deckgläser	12 mm	631-1577	VWR International (Radnor, USA)
Einfrierröhrchen	1 mL	123280	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Mini-Protein-Gele	10 Well	NW04120BOX	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
	12 Well	NW04122BOX	
	15 Well	NW04125BOX	
Objektträger	76 x 26 mm	H868.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

MATERIAL

Bezeichnung	Format	Bestellnummer	Hersteller*in
Pasteurpipetten	3 mL	7691064	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
PCR-Streifen	8 x 200 µL	710971	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipettenreservoir	25 mL	B3125-50	Parmer GmbH (Cole- Wertheim, Germany)
Pipettenspitzen	10 µL	70.1130	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
	200 µL	70.760.002	
	1250 µL	701.186	
Reagiergefäße	0,2 mL	72.737.002	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
	0,5 mL	72.699	
	1,5 mL	72.690.001	
	2,0 mL	72.695.200	
Schraubröhre	15 mL	62.554.502	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
	50 mL	62.547.254	
Serologische Pipette	5 mL	861.253.001	Sarstedt (Nümbrecht, Germany)
	10 mL	861.254.001	
	25 mL	861.685.001	
	50 mL	7695555	Th. Geyer (Renningen, Germany)
Skalpell	Cutfix	9409814	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
Transwell	Ø 6,5 mm	3470 (0,4 µm)	Corning (Corning, USA)
Polyester- membraneinsätze	Ø 6,5 mm	3472 (3 µm)	
	Ø 24 mm	3450 (0,4 µm)	
	Ø 24 mm	3452 (3 µm)	
Ultrazentrifugen- röhrchen	25x89 mm	7052	Seton Scientific (Petaluma, USA)
Western Blotting- Filterpapier	0,83 mm Dicke, 7 x 8,4 cm	84783	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturplatten	6 Well	833.920.005	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
	12 Well	833.921.300	
	24 Well	833.922.300	
	48 Well	83.3923.300	
	96 Well	83.3924.005	
Zellkulturschalen	Ø 60 mm	83.3901.002	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellschaber	Größe S	83.3950	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellsieb	Ø Klein, 40 µm	542140	Greiner AG (Kremsmünster, Österreich)

2.8 Laborgeräte und technisches Equipment

Tabelle 25: Laborgeräte und technisches Equipment

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller*in
Analytische Waage	BP121S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Chemolumineszenz-Imager	M6 ECL Chemostar	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator	CB-S 170	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Gefrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gefrierschrank -150 °C	VIP plus	Panasonic (Kadoma, Japan)
Gefrierschrank -80 °C	Hera freeze	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gefrierschrank -80 °C	UF V 700	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Kamera (Mikroskopie)	DFC9000 GT	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Konfokales Mikroskop	TCS SP5 II	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Konfokales Mikroskop	TCS SP8 DLS	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Konfokales Mikroskop	Stellaris 5	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Kreisschüttler	MS 1	IKA-Werke (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Lichtmikroskop	Eclipse Ts2	Nikon (Präfektur Tokio, Japan)
Lichtmikroskop	DM IL LED	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Mikropipetten	Research plus	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Mikroplatten-Spektralphotometer	PowerWave XS	BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Mikroskop	Celldiscoverer 7	Carl Zeiss (Oberkochen, Germany)
Mikrotiterplatten-Spektralphotometer	BioTek Epoch	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
pH-Meter	ProfiLab pH597	Xylem Inc. (Rye Brook, USA)
Pipettierhilfe	Pipet Filler S1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Präzisionswaage	PBP 4202 - 18	VWR International (Radnor, USA)
Reinstwasser-Entnahmeeinheit	Milli-Q Q-POD	EMD Millipore (Burlington, USA)
Sicherheitswerkbank	HERAsafe HS12	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermocycler	Labcycler Basic (011-103)	SensoQuest GmbH (Göttingen, Deutschland)
Thermocycler	T100	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort 5355	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultrazentrifuge	Optima L-100K	Beckman Coulter (Brea, USA)

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller*in
UV-Bildgebungssystem	GelStick Touch	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, Deutschland)
Wasseraufbereitungs-system	Milli-Q Integral 5	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Wasserbad	Hydro H 16	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Western Blot Transfergerät	Power Blotter System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zählkammer	Neubauer improved	Brand GmbH + Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Zentrifuge	Biofuge Primo	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge (Kühlfunktion)	Z216MK	Hermle (Gosheim, Deutschland)

2.9 Datenbearbeitung und Software

Tabelle 26: Computerprogramme

Computerprogramm	Softwareunternehmen
BioRender	BioRender (Toronto, Kanada)
BioTek Gen5	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
ChemoStar TS	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, Deutschland)
EndNote21	Clarivate Analytics (London, England)
Excel (Microsoft 365-Abonnement)	Microsoft (Redmond, USA)
Image Lab	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
ImageJ (FIJI)	National Institutes of Health (Rockville, USA)
Leica Application Suite AF	Leica (Wetzlar, Germany)
Leica Application Suite X	Leica (Wetzlar, Germany)
NanoDrop 1000 (Version 3.7.1)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PowerPoint (Microsoft 365-Abonnement)	Microsoft (Redmond, USA)
Prism 10	GraphPad Software (San Diego, USA)
SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC (San Diego, USA)
Word (Microsoft 365-Abonnement)	Microsoft (Redmond, USA)
ZEN	Carl Zeiss (Oberkochen, Germany)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Arbeiten an den Zellen wurden stets unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt und deren Lagerung erfolgte in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Die in der Zellkultur verwendeten Zelllinien, Medien, niedermolekularen Verbindungen und Lösungen sind im *Kapitel 2.1* in den *Tabellen 2* bis *8* zu finden.

3.1.1 Beschichtung von Zellkulturplatten und Deckgläsern

Abhängig von der Zelllinie wurden für die Beschichtung der Zellkulturplatten unterschiedliche Lösungen verwendet. Die Zusammensetzung der entsprechenden Lösungen wird in *Tabelle 8* näher beschrieben. Nachdem die Lösungen für die Beschichtung auf die Arbeitskonzentration verdünnt und auf die Zellkulturplatten pipettiert wurden (6 Well: 1 mL; 12 Well: 0,5 mL; 24 Well: 0,3 mL; 48 Well: 0,2 mL; 96 Well: 0,1 mL; T25: 3 mL), erfolgt deren Inkubation für mindestens 2 Stunden bei 37 °C. Daraufhin können diese bis zur Anwendung für maximal eine Woche bei 4 °C gelagert werden. Vor der Ausplattierung von Zellen auf die Zellkulturplatten wurden diese zunächst mit Reinstwasser gewaschen.

Für die Färbung der Zellen im Rahmen der Immunofluoreszenz erfolgte deren Ausplattierung auf Deckgläsern. Diese wurden zuvor bei Raumtemperatur für eine Stunde in 37-prozentiger HCl-Lösung behandelt, daraufhin einige Male mit destilliertem Wasser gewaschen, luftgetrocknet und autoklaviert. Die Beschichtung der Deckgläser erfolgte analog zu der der Zellkulturschalen.

3.1.2 Beschichtung und Aussaat von Zellen auf die Transwell-Polyestermembraneinsätze

Die Transwell-Polyestermembraneinsätze stellen im Gegensatz zu normalen Zellkulturplatten oder -schalen eine Besonderheit dar, da auf beiden Seiten der Membran Zellen kultiviert werden können. Dies kann in bestimmten Fällen eine unterschiedliche Beschichtung der zwei Membranseiten erforderlich machen. Hierfür wurde die Oberseite der Polyestermembran durch einfaches Hinzufügen der Kollagen-Beschichtungslösung (6-Well-Einsatz: 1 mL; 24-Well-Einsatz: 200 µL) behandelt. Um die Unterseite der Polyestermembran zu beschichten, wurde die Zellkulturplatte, in der der entsprechende Einsatz eingebracht war, mit PDL-Beschichtungslösung (6-Well-Einsatz: 1,5 mL; 24-Well-Einsatz: 500 µL) befüllt und der Einsatz darin eingelegt. Beide Beschichtungslösungen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und konnten am nächsten Tag aspiriert werden. Der Membraneinsatz wurde daraufhin mit

Reinstwasser abgewaschen und vor der Aussaat der Zellen für 20 bis 30 Minuten getrocknet.

Die Aussaat erfolgte zunächst auf der Unterseite der Membraneinsätze mit IM-HA's. Hierfür wurde die gesamte Zellkulturplatte auf den Kopf gestellt und 0,7 mL AM, die Astrozyten mit der gewünschten Zellzahl enthielten, wurden auf die Membran pipettiert. Die Membraneinsätze wurden mit dem umfunktionierten Deckel abgedeckt und für 2 bis 3 Stunden bei 37 °C im CO₂-Inkubator positioniert. In dieser Zeit können die Zellen an die Membran anhaften, sodass die gesamte Zellkulturplatte im nächsten Schritt wieder invertiert werden konnte. Die Zellkulturplatte wurde abhängig von der Bedingung mit 1 bis 2 mL des entsprechenden Zellkulturmediums (AM oder EG) aufgefüllt. Für die Beschichtung der Membranoberseite wurden die hCMEC/D3 in der gewünschten Zellzahl in 1 mL des entsprechenden Zellkulturmediums (AM oder EG) gelöst und auf den Membraneinsatz gegeben. Die weitere Kultivierung, der nun auf der Unterseite mit IM-HA's und auf der Oberseite mit hCMEC/D3 bewachsenen Polyestermembran, erfolgte in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %.

3.1.3 Kultivierung von hESCs

Die hESCs wurden bei täglichem Mediumwechsel mit mTeSR1-Medium auf Matrigel-beschichteten 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Das Passagieren der hESCs erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 80 %. Dafür wurden die hESCs zunächst mit DPBS gewaschen, daraufhin für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Accutase dissoziiert und mit zusätzlichem Medium vom Boden der Zellkulturschale gespült. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 2 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute [RPM]) zentrifugiert. Die Ausplattierung auf neue Zellkulturplatten erfolgte nach Aspiration des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in mTeSR1 mit ROCK-Inhibitor (10 µM) für die ersten 24 Stunden. Optional kann vor der Ausplattierung die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt werden.

3.1.4 Kultivierung von IM-HAs

Die IM-HAs wurden in PDL-beschichteten T25-Zellkulturflaschen kultiviert und erhielten je nach Konfluenz alle zwei bis drei Tage einen Mediumwechsel mit Astrocyte Medium (AM). Das Passagieren der IM-HAs erfolgte bei einer Konfluenz von 90 %. Dafür wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen, für 4 Minuten bei 37 °C mit Trypsin-EDTA (0,05 % in DPBS) dissoziiert und daraufhin mit zusätzlichem Medium vom Boden der Zellkulturflasche gespült. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force [RCF]) von 1000 zentrifugiert. Die Ausplattierung in neue Zellkulturflaschen erfolgte nach Aspiration des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in AM (meist in einem Verhältnis von 1:2). Optional kann vor der Ausplattierung die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt werden.

3.1.5 Kultivierung von hBMECs

Die hBMECs wurden in unbeschichteten T25-Zellkulturflaschen kultiviert und erhielten alle vier bis fünf Tage einen Mediumwechsel mit Endothelial Cell Medium (EM). Das Passagieren der hBMECs erfolgte bei einer Konfluenz von 90 %. Dafür wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen, für vier Minuten bei 37 °C mit Trypsin-EDTA (0,25 % in DPBS) dissoziiert und daraufhin mit zusätzlichem Medium vom Boden der Zellkulturflasche gespült. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1000 RCF zentrifugiert. Die Ausplattierung in neue Zellkulturflaschen erfolgte nach Aspiration des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in EM (für gewöhnlich in einem Verhältnis von 1:10). Optional kann vor der Ausplattierung die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt werden.

3.1.6 Kultivierung von hCMEC/D3

Die hCMEC/D3s wurden in Kollagen-beschichteten T25-Zellkulturflaschen kultiviert und erhielten alle vier bis fünf Tage einen Mediumwechsel mit EndoGRO-MV (EG). Das Passagieren der hCMEC/D3 erfolgte bei einer Konfluenz von 90 %. Dafür wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen, daraufhin für vier Minuten bei 37 °C mit Trypsin-EDTA (0,25 % in DPBS) dissoziiert und daraufhin mit zusätzlichem Medium vom Boden der Zellkulturflasche gespült. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1000 RCF zentrifugiert. Die Ausplattierung in neue Zellkulturflaschen erfolgte nach Aspiration des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in EG (für gewöhnlich in einem Verhältnis von 1:10 – 1:5). Optional kann vor der Ausplattierung die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt werden.

3.1.7 Kultivierung von HEK-293T-Zellen

Die menschlichen embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney [HEK])-293T-Zellen wurden in PLL-beschichteten 150 mm-Zellkulturschalen kultiviert und erhielten jeden zweiten Tag neues HEK-293T-Medium. Das Passagieren der HEK-293T-Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 90 %. Dafür wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen, daraufhin für vier Minuten bei 37 °C mit TrypLE dissoziiert und daraufhin mit zusätzlichem Medium vom Boden der Zellkulturflasche gespült. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1000 RCF zentrifugiert. Die Ausplattierung in neue Zellkulturflaschen erfolgte nach Aspiration des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in HEK-293T-Medium (für gewöhnlich in einem Verhältnis von 1:20). Optional kann vor der Ausplattierung die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt werden.

3.1.8 Kryokonservierung der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zunächst mit DPBS gewaschen und entsprechend der vorherigen Kapitel dissoziiert sowie zentrifugiert. Nach der Aspiration des Überstandes wurde das Zellpellet in dem zugehörigen Einfriermedium

(siehe *Tabelle 6*) resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Daraufhin wurden die Zellen in einem Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific) platziert und bei -80 °C im Gefrierschrank eingefroren und gelagert.

Für das Auftauen der Zellen wurden diese im Wasserbad Hydro H 16 (LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG) bei 37 °C geschmolzen und mit dem entsprechenden Medium 1:1 in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1000 RCF konnte der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert werden. Im letzten Schritt konnten die Zellen in den entsprechenden Zellkulturplatten oder -schalen gesät werden. Optional kann vor der Zentrifugation die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt und für die Aussaat berücksichtigt werden.

3.1.9 Lentivirusproduktion

Die Lentivirusproduktion fand in Laboratorien mit der biologischen Schutzstufe (biosafety level [BSL]) 2 statt. Die Grundlage für die Lentivirusproduktion ist die Transfektion von HEK-293T-Zellen mit den drei Plasmiden pMD2.G, pRSV-Rev und pMDLg/pRRE, die für unterschiedliche lentivirale Komponenten sowie ein Transferplasmid codieren. Für die Transfektion der HEK-293T-Zellen wurde das stark verzweigte Polymer Polyethylenimin (PEI) genutzt.

Die HEK-293T-Zellen wurden entsprechend der Ausführungen von *Kapitel 3.1.6* bis zu einer Konfluenz von 80 % in einer 150 mm-Zellkulturschale kultiviert. Etwa eine bis drei Stunden vor der Transfektion der HEK-Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Daraufhin wurden die DNA-Lösung und die PEI-Lösung (siehe *Tabelle 16*) separat voneinander in serumreduziertem Medium angesetzt, miteinander kurz auf dem Kreisschüttler gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch aus den beiden Lösungen zu den HEK-293T-Zellen gegeben. Sechs bis acht Stunden später erfolgte ein Waschschriff mit PBS und ein Mediumwechsel. Nach 24 sowie 48 Stunden wurde das mit Lentiviren angereicherte Medium in Ultrazentrifugenröhrchen (Seton Scientific) filtriert und für zwei Stunden bei 25 000 RPM in der Optima L-100K (Beckman Coulter) ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und 200 µL Opti-MEM in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Über Nacht lösten sich die Lentiviren in dem Medium und konnten am nächsten Tag aliquotiert und bis zur Nutzung bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert werden.

3.1.10 Generierung induzierter Astrozyten

Die Generierung induzierter Astrozyten (iAs) aus hESC erfolgte entsprechend des Protokolls von Canals et al., das in den folgenden Absätzen und in *Abbildung 7* näher beschrieben wird. Das Protokoll beruht auf der lentiviralen Transfektion von hESCs zur induzierten Überexpression der Gene *sex determining region of Y (SRY)-box transcription factor 9 (SOX9)* sowie *nuclear factor 1 B-type (Nfib)* zur Induktion

funktioneller Astrozyten. Neben den Genen für SOX9 und Nfib enthalten die Vektoren der Lentiviren weiterhin Resistenzen für die Antibiotika Puromycin und Hygromycin, sodass darüber eine Selektion der transfizierten Zellen erfolgen kann. Eine Einführung in das Protokoll sowie die Zurverfügungstellung diverser Laborgeräte und Reagenzien wurde freundlicherweise durch Dr. Claudio Acuna und seine Arbeitsgruppe (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) ermöglicht.

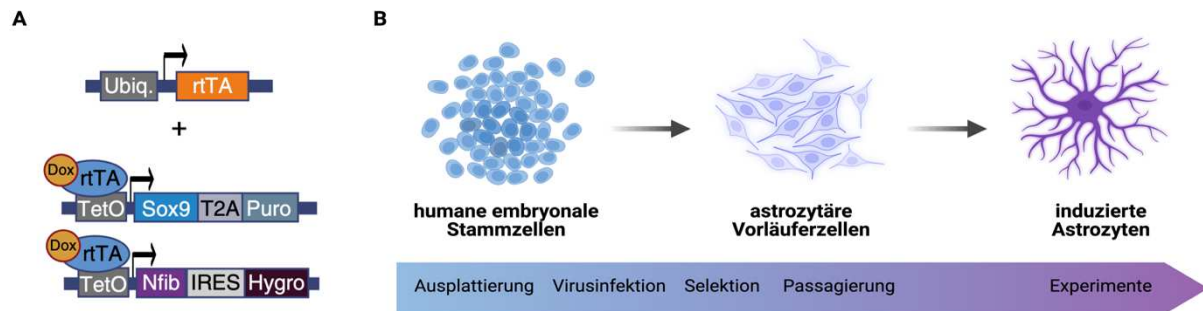


Abbildung 7: Protokoll Astrozytendifferenzierung Canals et al.

A Schematischer Aufbau der Gene, die durch eine lentivirale Transfektion eine Überexpression von Sox9 und Nfib bewirken. Doxycyclin (Dox) ermöglicht über die Bindung an den reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (reverse tetracycline-controlled transactivator [rtTA]) die Transkription der dahinterliegenden Gene. T2A und IRES markieren Spaltungsstellen für Ribosomen, sodass zwei Proteine aus einer mRNA gebildet werden können. Abkürzungen: Ubiq = Ubiquitin; rtTA = reverse tetracycline-controlled transactivator; Puro = Puromycin; hygro = Hygromycin (übernommen von Canals et al. 2018) **B** Darstellung der unterschiedlichen Phasen in der Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen zu induzierten Astrozyten. Eine ähnliche Abbildung wurde im Rahmen meiner Forschungsarbeit genutzt. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Die Zusammensetzung der an den unterschiedlichen Tagen des Protokolls verwendeten Medien ist in *Tabelle 7* zu finden. Gefrorene hESCs wurden an Tag -3 entsprechend der Angaben in *Kapitel 3.1.2* aufgetaut und ausplattiert. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, wurden diese am Tag -1 dissoziiert und deren Zellzahl mit einer Zählkammer ermittelt. Daraufhin wurden die hESCs in einer Zelldichte von 10^4 Zellen/cm² gesät und die Lentiviren hinzugegeben. In den folgenden Tagen wurde durch die Änderung der Medien sowie die Hinzugabe unterschiedlicher Faktoren die Differenzierung der hESCs zu iAs ermöglicht. An Tag 7 wurden die Zellen passagiert, sodass die Aussaat der Zellen entsprechend der geplanten Experimente erfolgen konnte. Ab Tag 10 erfolgte alle 2 bis 3 Tage ein halber Mediumwechsel. Die Färbungen an den iAs wurden zwischen Tag 14 und 17 durchgeführt.

3.2 Orangu-Zellproliferationstest

Orangu ist ein kolorimetrischer Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest, der auf der Messung der Dehydrogenaseaktivität von Zellen beruht. Bei Vorhandensein eines Elektronenmediators, dessen Regeneration durch zelluläre Dehydrogenasen

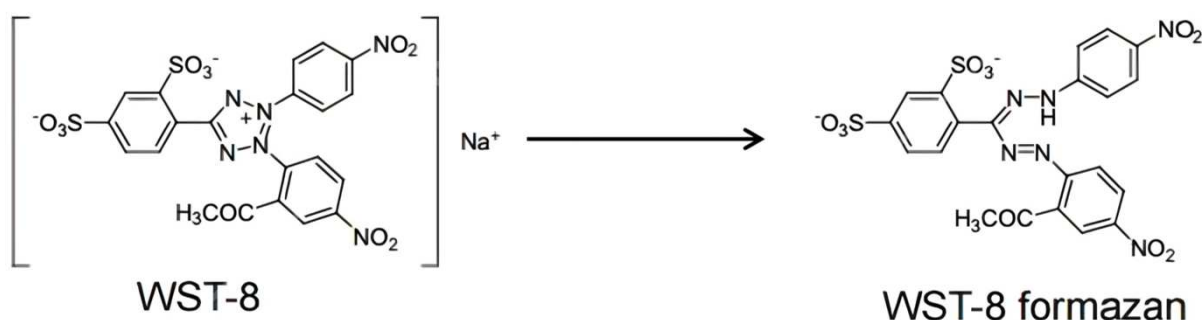


Abbildung 8: Grundlegende Reaktion Orangu-Zellproliferationstest

Reaktionsgleichung mit Strukturformeln des farblosen WST-8, das bei Anwesenheit eines Elektronenmediators zu orangem WST-8-Formazan reduziert wird. (Informationen und Abbildung entnommen aus Orangu Cell Counting Solution User Guide Protocol Version 2.0)

sichergestellt wird, erfolgt die Reduktion von WST-8 zu WST-8-Formazan. Die vorliegende Menge an WST-8-Formazan hängt von der Zahl lebendiger Zellen sowie der Dauer der Inkubation ab und kann durch eine Extinktionsmessung erfasst werden. Zur Messung der Zellproliferation unter unterschiedlichen Konditionen wurden 10 μL Orangu-Lösung zu Zellsuspensionen in 96-Well-Zellkulturplatten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden (bei 37 °C, 5 % CO_2) wurde die Extinktion bei 450 nm im Mikroplatten-Spektralphotometer PowerWave™ XS (BioTek) gemessen. Abhängig vom Experiment wurden die genutzten Wells verworfen oder nach dem Waschen mit DPBS mit neuem Medium aufgefüllt und für die nächste Messung genutzt. Im ersten Fall wurden für die weiteren Messungen neue Wells genutzt, auf denen zu Beginn des Experiments Zellen unter den gleichen Bedingungen ausplattiert wurden. Die Messungen erfolgten alle 24 bis 48 Stunden über einen Zeitraum von bis zu neun Tagen.

3.3 Molekularbiologie

3.3.1 DNA-Extraktion, -Quantifizierung und -Aufreinigung

Für die DNA-Isolation wurde die Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode verwendet. Diese beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit von Proteinen und Zellresten gegenüber Nukleinsäuren. Letztere werden nach der Phasentrennung, die durch eine Zentrifugation erreicht wird, in der oben liegenden, wässrigen Phase sichtbar und können vorsichtig abpipettiert werden. In der Interphase (mittig zwischen den anderen beiden Phasen) und der unten liegenden organischen Phase sind Proteine, Lipide und andere Zellreste gebunden.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert und zur Vorbereitung auf die DNA-Extraktion einmal mit kaltem DPBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen analog zu der Kultivierung der Zellen (siehe *Kapitel 3.1*) mit der entsprechenden Dissoziierungslösung von der Oberfläche der Zellkulturplatte abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1500 RPM für zwei Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 500 µL Lysepuffer resuspendiert und über Nacht bei 55 °C in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) inkubiert. Nachdem der Lösung 420 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugefügt und diese gründlich geschüttelt worden war, konnte im folgenden Schritt eine erneute Zentrifugation bei 10 000 RPM für 10 Minuten erfolgen. Die obere, wässrige Phase (etwa 350 µL) wird abpipettiert, in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und die vorausgegangenen Schritte werden drei bis sechs Mal wiederholt.

Für die Präzipitation der DNA wurde dem Mikroreaktionsgefäß Natriumacetat-Lösung (etwa 10 % des Volumens der vorliegenden Lösung) zugesetzt, durch Invertieren gemischt, mit Isopropanol (2 bis 3-faches Volumen der vorliegenden Lösung) durch erneutes Invertieren gemischt und für 10 Minuten bei 14 000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde im Folgenden vorsichtig abpipettiert und verworfen. Zuletzt wurden dem Präzipitat 500 µL 70-prozentiges Ethanol hinzugefügt, bei 14 000 RPM für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur für 20 Minuten luftgetrocknet. Das DNA-Pellet kann als solches oder in etwa 300 µL Reinstwasser resuspendiert bei -20 °C gelagert werden. Letzteres erfordert ein sehr häufiges Auf- und Abpipettieren (30 bis 40 Mal).

Die folgende Messung der DNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Zuletzt wurde die DNA mit Reinstwasser auf eine Konzentration von $100 \frac{ng}{\mu L}$ verdünnt und entsprechend den Hersteller*angaben mit dem DNA Clean & Concentrator-Kit (Zymo Research) aufgereinigt.

3.3.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction [PCR]) ermöglicht unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase sowie spezifischer Primer die in vitro-Amplifikation von DNA-Sequenzen. Hierfür wurden die aufgereinigten DNA-Proben mit den 5 entsprechenden Primern (siehe *Tabelle 17*) sowie der DNA-Polymerase, einem Reaktionspuffer (Meridian Bioscience) und Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) versetzt (siehe *Tabelle 18*) und im Thermocycler T100 (Bio-Rad Laboratories) unter Durchlaufen der in *Tabelle 27* beschriebenen Zyklen vervielfältigt.

Tabelle 27: Verwendete PCR-Zyklen

Phase	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95 °C	3 Minuten	
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	35 Zyklen
Annealing	60 °C	15 Sekunden	
Elongation	72 °C	1 Minute	
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten	
	4 °C	∞	

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren abhängig von ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierfür wurde ein 1-prozentiges Agarosegel in TEA-Puffer mit 0,1 % Ethidiumbromid hergestellt und in eine Elektrophoresekammer gegossen. Nach 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur sollte das Gel ausgehärtet sein und die Elektrophoresekammer konnte im Folgenden mit TAE-Puffer gefüllt werden, bis das Agarose-Gel komplett davon bedeckt war. Vor dem Beladen des Agarose-Gels wurden die PCR-Produkte mit einem Probenpuffer versetzt. Im nächsten Schritt wurde das Agarose-Gel mit den zu untersuchenden PCR-Produkten sowie einer 100 Basenpaar (bp)-DNA-Leiter beladen und die Auftrennung erfolgte für 45 Minuten bei 100 V. Die Banden wurden unter UV-Licht mit dem GelStick Touch (INTAS Science Imaging Instruments GmbH) dargestellt.

3.3.4 Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzierung wurden 100 bis 200 ng PCR-Produkt mit einer Konzentration von mindestens $1 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$ an die Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) verschickt. Dort erfolgte die DNA-Analyse unter Verwendung von Hochdurchsatzverfahren auf Grundlage des Next Generation Sequencing (NGS). Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit SnapGene (GSL Biotech LLC).

3.4 Biochemie

3.4.1 Zellyse und Proteinquantifikation

Vor der Zellyse wurden die Zellen in der Regel bis zu einer Konfluenz von 100 % kultiviert und einmal mit kaltem DPBS gewaschen. Zellen, die in Zellkulturplatten oder -schalen kultiviert wurden, wurden mit einem Zellschaber in Lysepuffer von der Oberfläche abgelöst. Nach kurzem Auf- und Abpipettieren wurde die Lösung in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Für die Zellyse von, auf Transwell™-Polyestermembraneinsätzen (Corning) kultivierten, Zellen wurde die Pipettenspitze einer Mikropipette (100 µL) unter ständigem Auf- und Abpipettieren des Lysopuffers in kreisförmigen Bewegungen über die Polyestermembran geschabt. Dabei wurde stets ein spitzer Winkel (30–45°) der Pipettenspitze zur Membran des Polyestereinsatzes eingehalten und nicht zu viel Druck ausgeübt, um ein Penetrieren der Membran zu verhindern. Der Lysepuffer schäumt bei diesem Vorgehen stark und wurde daher mit einer größeren Mikropipette (1000 µL) abpipettiert und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt.

Nach einer Inkubationszeit von 20 bis 30 Minuten auf Eis wurde die Lösung im nächsten Schritt kurz auf dem Kreisschüttler MS 1 (IKA) geschüttelt und danach für 10 Minuten bei 12 000 RPM in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge Z216MK (Hermle)

zentrifugiert. Der Überstand bzw. das Proteinlysate wurde abpipettiert, in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Zur Proteinquantifikation wurde das Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid [BCA]) Gesamtprotein-Assay-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Kit beruht auf einer Farbentwicklungsreaktion zwischen BCA und einfach positiv geladenen Kupferionen, die in einer alkalischen Umgebung in Anwesenheit von Proteinen gebildet werden. Produkt der Reaktion ist ein BCA-Kupfer-Komplex, der sich durch Extinktionsmessung bei 562 nm nachweisen lässt und einen annähernd linearen Zusammenhang zur Gesamtproteinkonzentration zeigt. Die Angaben der Hersteller*in wurden befolgt, um das Assay-Reagenz sowie die Standardlösungen herzustellen. Daraufhin wurden 200 µL des Assay-Reagenzes in 96-Well-Zellkulturplatten pipettiert und mit 10 µL der Standardlösungen bzw. der Proteinlysate gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Messung der Extinktion bei 562 nm im Mikroplatten-Spektralphotometer Epoch (BioTek). Die Gesamtproteinkonzentration wurde anhand einer Schätzfunktion, die durch lineare Regression aus den Extinktionswerten der Standardlösungen konstruiert wurde, bestimmt.

3.4.2 Western Blot und SDS-PAGE

Für die Analyse von Proteinen erfolgte deren Auftrennung mittels SDS-PAGE in Mini-Protein-Gelen (Thermo-Fisher-Scientific). Dafür wurden 15 bis 25 µg Gesamtprotein mit Probenreduktionsmittel (10x) und LDS-Probenpuffer (4x) gemischt sowie mit Reinstwasser auf ein Volumen von 30 µL aufgefüllt. Im nächsten Schritt wurden die Proben im Labcycler Basic (SensoQuest GmbH) für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt und dadurch denaturiert. Nach der Beladung der Mini-Protein-Gele erfolgte die Proteinauftrennung bei 180 V für 45 bis 50 Minuten. Nun konnte unter Verwendung des Power-Blotter-Systems (Thermo Fisher Scientific) der halbtrockene Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm erfolgen. Hierfür wurde das Programm *HighMW* bei 25 V und 1,3 mA für eine Dauer von 15 Minuten genutzt.

Nach der Anwendung des No-Stain-Proteinmarkierungsreagenzes (Thermo Fisher Scientific) und der Entwicklung der Membran mit dem Chemostar M6 ECL (Intas Science Imaging Instruments GmbH) zur späteren Quantifizierung und Normalisierung der gemessenen Banden, wurde die Membran zugeschnitten. Das Blocken der Membranstücke erfolgte anschließend mit 5-prozentiger Magermilchlösung (in TBST) oder einer 5-prozentigen Lösung mit Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin [BSA]) (in TBST) bei Raumtemperatur für eine Stunde. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen und im Anschluss bei 4 °C über Nacht mit dem primären Antikörper (siehe *Tabelle 10*) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen erneut für drei 10-minütige Zyklen mit TBST gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe *Tabelle 11*) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachdem

die Membranen erneut drei 10-minütige Waschschr tte mit TBST durchlaufen hatten, konnte letztendlich die Entwicklung der Membranen erfolgen. Dafür wurde das Chemilumineszenz-Substrat (Thermo Fisher Scientific) entsprechend der Hersteller*angaben verwendet. Die abschließende Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte mit Image Lab (Bio-Rad Laboratories).

3.4.3 Immunzytochemie

Um die Expression und Lokalisation bestimmter zellulärer Proteine zu untersuchen, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Dabei werden bestimmte Epitope ausgewählter Proteine durch primäre Antikörper markiert. Ein sekundärer Antikörper, der an ein Fluorophor gekoppelt ist, bindet daraufhin an den primären Antikörper und ermöglicht so die Darstellung des Proteins in der Fluoreszenzmikroskopie.

Dazu wurden die Zellen bis zur gewünschten Konfluenz auf beschichteten Deckgläsern mit einem Durchmesser von 12 mm kultiviert. Nachdem die Zellen einmal mit DPBS gewaschen worden waren, konnten diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 4-prozentigem Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Daraufhin wurden die fixierten Zellen bei Raumtemperatur für eine Stunde in Blocklösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern. In der Zwischenzeit wurde der primäre Antikörper in einer bestimmten Verdünnung (siehe *Tabelle 9*) in Blocklösung gelöst und nach Ablauf der Stunde wurden die Zellen über Nacht bei 4  C in der Antikörperlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit der Blocklösung gewaschen und danach für 45 Minuten bei Raumtemperatur in den sekundären Antikörpern inkubiert. Diese wurden in einem Verhältnis von 1:1000 in Blocklösung verdünnt. Nach insgesamt zwei weiteren Waschschr tten mit Blocklösung und PBS wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt (10 Minuten bei Raumtemperatur). Es folgten weitere Waschschr tte mit PBS (zweimal) und Reinstwasser (einmal) und im Anschluss daran wurden die Zellen mit Aqua-Poly/Mount bzw. Mountingl sung auf dem Objektträger fixiert. Die Objektträger konnten nun in einer lichtgeschützten Umgebung für ein bis zwei Tage bei Raumtemperatur trocknen und im finalen Schritt in der Fluoreszenzmikroskopie evaluiert und analysiert werden.

3.5 Mikroskopie und quantitative Bildanalyse

3.5.1 Bilderfassung

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit den konfokalen Mikroskopen TCS SP5 II, TCS SP8 DLS und Stellaris 5 von Leica. Für die Bilderfassung wurden Objektive mit 40- bzw. 63-facher Vergrößerung verwendet. Die Aufnahmen für die Analyse der Markerintensität wurden ausschließlich mit dem Stellaris 5 (Leica) aufgenommen. Dabei wurde stets eine Farbtiefe von 16 Bit gewählt. Die übrigen Parameter wie Auflösung, Belichtung, Laserintensität, Zahl und Größe der Z-Stacks etc. wurden zur Gewährleistung einer Vergleichbarkeit für die erste Aufnahme eingestellt und für die

weiteren Aufnahmen einer Versuchsreihe beibehalten. Insbesondere eine Überbelichtung einzelner Pixel wurde dabei stets ausgeschlossen. Die Bildbearbeitung sowie -analyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte entsprechend der folgenden Kapitel. Für die Lichtmikroskopie wurden der Celldiscoverer 7 (Carl Zeiss) sowie das Eclipse Ts2 mit Objektiven einer 10- bzw. 20-fachen Vergrößerung verwendet. Die Bildbearbeitung der lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde mit ImageJ durchgeführt.

3.5.2 Analyse der nukleären Oberfläche

Die Aufnahmen mit einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung wurden mit ImageJ analysiert. Die dafür benötigten Bildbearbeitungsschritte sind in *Abbildung 9* dargestellt und näher beschrieben. Einige dieser Schritte wurden durch die Verwendung eines selbstgeschriebenen Makros (siehe Appendix) automatisiert. Die weitere Verarbeitung und Auswertung der Daten erfolgte mit Prism 10 (GraphPad Software).

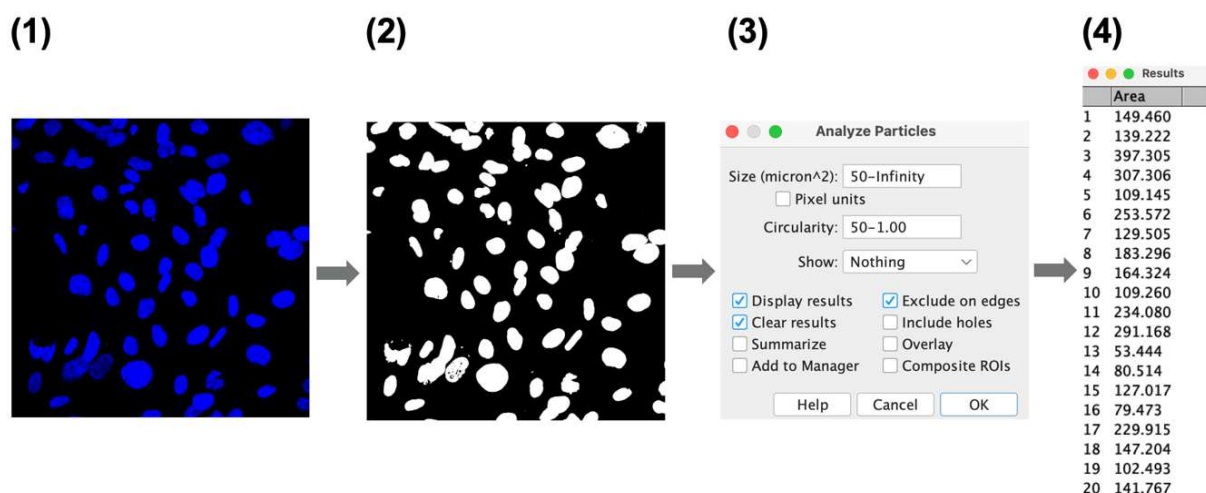


Abbildung 9: Analyse der nukleären Oberfläche mit ImageJ

(1) Zunächst wurde die Aufnahme mit DAPI-Färbung geöffnet und beim Vorliegen eines Z-Stacks eine maximale Projektion erstellt. Daraufhin wurde das Bild mit den Funktionen "Smooth" und "Threshold" bearbeitet. (2) Dadurch entsteht ein binäres Bild, das im Folgenden mit der Funktion "Analyze Particles" analysiert werden kann. (3) Dabei wurde die minimale Partikelgröße auf 50 micron² gesetzt, sodass kleinere Partikel nicht mitgezählt werden. Weiterhin wurden Partikel an der Bildgrenze exkludiert. Die vorherigen Ergebnisse sollen gelöscht und die neuen angezeigt werden. (4) Als Ergebnisse werden die Flächen der Partikel in µm² angezeigt. Die überlappenden Zellkerne wurden vor der weiteren Analyse der Daten manuell exkludiert.

3.5.3 Analyse der Markerintensität und -fläche

Zur Analyse der Markerintensität und -fläche wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der entsprechenden Kanäle mit ImageJ analysiert. Die dafür nötigen Bildbearbeitungsschritte sind in *Abbildung 10* am Beispiel von zwei mit GFAP angefärbten IM-HAs dargestellt und näher beschrieben. Einige dieser Schritte wurden durch die Verwendung eines selbstgeschriebenen Makros (siehe Appendix) automatisiert. Zum Verständnis der angewandten Rechnungen ist es nötig, einige Begriffe näher zu definieren:

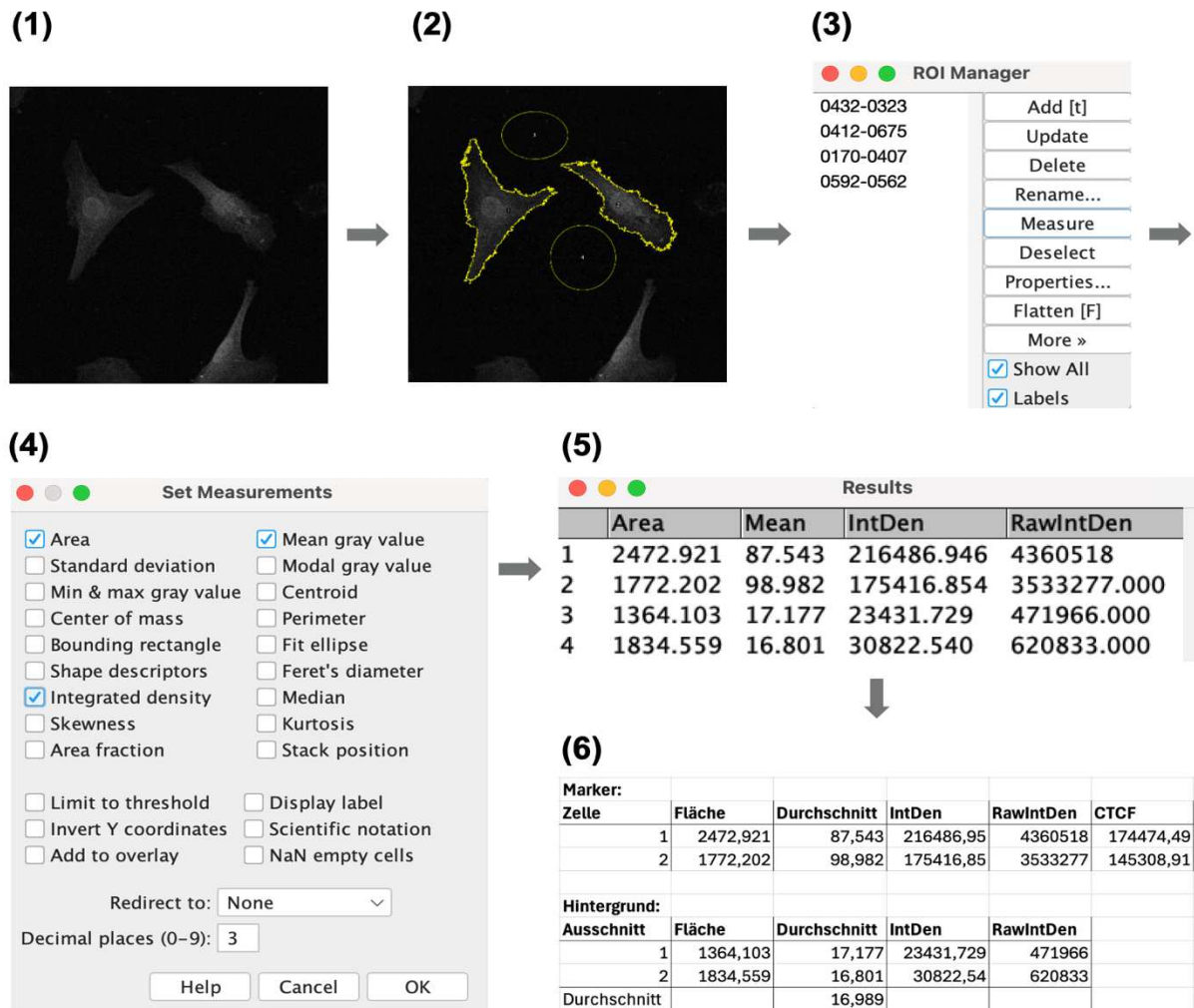


Abbildung 10: Analyse der Markerintensität und -fläche mit ImageJ

(1) Zunächst wurde die Aufnahme des entsprechenden Kanals in der maximalen Projektion geöffnet. In diesem Fall handelt es sich um eine GFAP-Färbung eines IM-HA mit der Fluoreszenzmikroskopie im Kanal 1. (2) Im nächsten Schritt wurden mithilfe des Wand (tracing) tools die Umrisse des IM-HA sowie Abschnitte beliebiger Größe zur Hintergrundsubtraktion markiert und unter Verwendung des ROI Managers (3) organisiert. Der ROI Manager kann im Nachhinein verwendet werden, um andere Markerintensitäten, die in der gleichen Aufnahme, aber einem anderen Kanal akquiriert worden sind, zu erfassen. (4) Bevor die Messung der Markerintensität erfolgen konnte, war es nötig, die Messparameter zu bestimmen. Daraufhin konnte die Messung erfolgen (5) und die Daten konnten in Excel kopiert und analysiert werden (6). Zum Einfügen der Daten in Excel wurde der Text Import Wizard verwendet, da sonst die Kommas nicht als solche erkannt wurden.

Fläche (Area) = markierte Fläche in μm^2

Durchschnittlicher Grauwert (Mean Gray Value) = durchschnittlicher Pixelwert im selektierten Bereich

RawIntDen (Raw Integrated Density) = Summe der Pixelwerte im selektierten Bereich

IntDen (Integrated Density) = RawIntDen x Fläche eines Pixels in μm^2

Zur Subtraktion des Hintergrundrauschens wurde das Signal in Bereichen, in denen keine Zellen vorlagen, bestimmt. Die Größe dieses Bereichs ist dabei nicht von Relevanz, da für die weiteren Berechnungen der durchschnittliche Grauwert (Mean Gray Value) genutzt wird. Die Formel für die Bestimmung der korrigierten Markerintensität (corrected total cell fluorescence [CTCF]) lautet:

$$\text{CTCF} = \text{IntDen} - (\text{Fläche der selektierten Zelle} \times \text{durchschnittlicher Grauwert der Hintergrundmessungen})$$

3.6 Statistische Analyse

Die Durchführung und Darstellung der statistischen Analysen erfolgte mit Prism (GraphPad). Es wurde stets der Durchschnittswert mit den Standardabweichungen abgebildet. Die Größe der Stichprobe (n), die Anzahl der verwendeten biologischen Replikate und die genutzten statistischen Tests wurden stets gekennzeichnet. Bei der Stichprobe handelte es sich um Zellen aus der gleichen Passage, die parallel mit den anderen Proben im gleichen Versuchsdurchlauf behandelt und untersucht wurden. Bei biologischen Replikaten handelte es sich hingegen um andere Passagen, die in einem separaten Experiment ausplattiert und analysiert wurden. Bei großen Stichproben bzw. einer Normalverteilung der Messwerte wurde für zwei Gruppen der t-Test und bei mehr als zwei Gruppen die one-way analysis of variance (ANOVA) genutzt. Wenn keine Normalverteilung vorlag bzw. die Stichprobengröße limitiert war, wurde bei zwei Gruppen der Mann-Whitney-Test und bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Zur Korrektur der Alphafehler-Kumulierung wurde bei multiplen Vergleichen nach one-way ANOVA der Tukey-Test und nach dem Kruskal-Wallis-Test der Dunn-Test angeschlossen. Die Veranschaulichung von signifikanten Beziehungen erfolgt in den Abbildungen wie folgt: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. Für die Erstellung der meisten schematischen Abbildungen wurde BioRender.com verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Genotypisierung der hESCs und Generierung von iAs

Die Inhalte des *Kapitels 4.1* wurden teilweise als Bestandteile meiner Forschungsarbeit mit dem Titel „*Genotypisierung und Differenzierung von H1 humanen embryonalen Stammzellen mit einer p.W75*-Mutation im MYORG-Gen*“ an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg als Prüfungsleistung vorgelegt. Da MYORG im ZNS vor allem im ER von Astrozyten lokalisiert ist, war das Ziel der Forschungsarbeit, eine qualitative Evaluation der Astrozytengenerierung durch das Protokoll von Canals et al. vorzunehmen.

4.1.1 Genotypisierung der hESCs

Für die folgenden Experimente wurden vier hESC-Zelllinien verwendet, die freundlicherweise von Dr. Claudio Acuna (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden. Seine Arbeitsgruppe hat in die zwei Zelllinien 2E hom und 12E hom mittels CRISPR-Cas9 die p.W75*-Mutation sowie zwei Screeningvarianten in *MYORG* eingebracht. Bei der p.W75*-Mutation erfolgt an dem DNA-Nukleotid 225 des *MYORG*-Genes eine Transition von Guanin zu Adenin, wodurch an dieser Stelle ein Stopcodon entsteht. Die zwei Screeningvarianten beinhalten eine Transition von Cytosin durch Thymin, die zu einer stillen Mutation führt und die folgende Detektion der Mutation vereinfachen soll. Das Wildtyp-Gen enthält auf dem codierenden Strang die Codone TGC und TAC, die durch das Einbringen der Mutationen zu TGT und TAT modifiziert werden. In beiden Fällen codieren die Codons für die Aminosäuren Cytosin und Tyrosin. Bei den zwei isogenen Kontrollzelllinien 11B WT und 10G WT wurde keine genetische Modifikation vorgenommen.

Die Genotypisierung der vier hESC-Zelllinien erfolgte mit dem Grund, ein Vorhandensein der p.W75*-Mutation sowie Screeningvarianten in *MYORG* sicherzustellen bzw. auszuschließen, um so eine solide Grundlage für die folgenden Experimente zu schaffen und die Gefahr von Verunreinigungen oder Vertauschungen der unterschiedlichen Zelllinien zu minimieren. Hierfür wurden die Zelllinien bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert und daraufhin erfolgte die DNA-Isolation mit der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode. Nach weiteren Verdünnungs- und Aufreinigungsschritten erfolgte eine PCR zur Amplifikation der modifizierten DNA-Sequenzen von *MYORG*. Hierzu wurden spezifische Primer verwendet. Zuletzt wurde zur Sicherstellung einer erfolgreichen PCR eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und das PCR-Produkt zur Sequenzierung an Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) verschickt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit SnapGene. Eine ausführlichere Beschreibung der Methodik ist in dem *Kapitel 3.3* zu finden.

In der *Abbildung 11* sind die sequenzierten DNA-Stränge untereinander angeordnet, sodass beim Vergleichen mit der Referenz-DNA Unterschiede festgestellt werden können. Es handelt sich dabei stets um den Matrizenstrang. Für die Zelllinien 2E hom und 12E hom liegt gegenüber der Referenz-DNA eine Transition von Cytosin durch Thymin sowie zwei Transitionen von Guanin durch Adenin in *MYORG* vor. Durch die erste Transition ergibt sich daher das Codon *TCA*, das unter Berücksichtigung der Leserichtung für den komplementären DNA-Strang das Stopcodon *TGA* ergibt. Durch die anderen beiden Transitionen ergeben sich die Codone *ATA* und *ACA*, die unter Berücksichtigung der Leserichtung für den komplementären DNA-Strang die Codone *TAT* und *TGT* ergeben. Für die DNA der Zelllinie 11B WT ergeben sich keine Unterschiede zur Referenz-DNA. Hingegen sind bei der Zelllinie 10G WT insgesamt 10 Fehlpaarungen zur Referenz-DNA zu beobachten.



Abbildung 11: Genotypisierung des MYORG-Gens von hESCs

Dargestellt sind DNA-Abschnitte des MYORG-Gens für unterschiedliche hESCs-Zelllinien. Oben ist die Referenz-DNA (oben codogener und unten codierender DNA-Strang) zu sehen, die keine Mutation trägt. Darunter finden sich zwei MYORG-Knockout-Zelllinien (2E hom und 12E hom) sowie deren isogene Kontrollzelllinien (11B WT und 10G WT). Weiterhin sind das Triplet mit der p.W75*-Mutation (grün), die Screeningvarianten (grau) und die DNA-Fehlpaarungen im Vergleich zur Referenz-DNA (rot) abgebildet. Das Ausrichten der DNA-Abschnitte sowie die Darstellung erfolgten mit SnapGene.

In der Auswertung der Genotypisierung zeigt sich, dass die zwei MYORG-Knockout-Zelllinien 2E hom und 12E hom sowohl die p.W75*-Mutation als auch die Screeningvarianten vorweisen. Die beiden Kontrollzelllinien 11B WT und 10G WT weisen keine p.W75*-Mutation auf. Die 11B WT-Zelllinie zeigt über den gesamten genotypisierten DNA-Abschnitt keine Fehlpaarung gegenüber der Referenz-DNA. Bei der 10G WT-Zelllinie fallen allerdings einige Fehlpaarungen auf. Insgesamt liegen über den genotypisierten DNA-Abschnitt zehn Fehlpaarungen gegenüber der Referenz-DNA vor.

4.1.2 Differenzierung der hESCs zu iAs

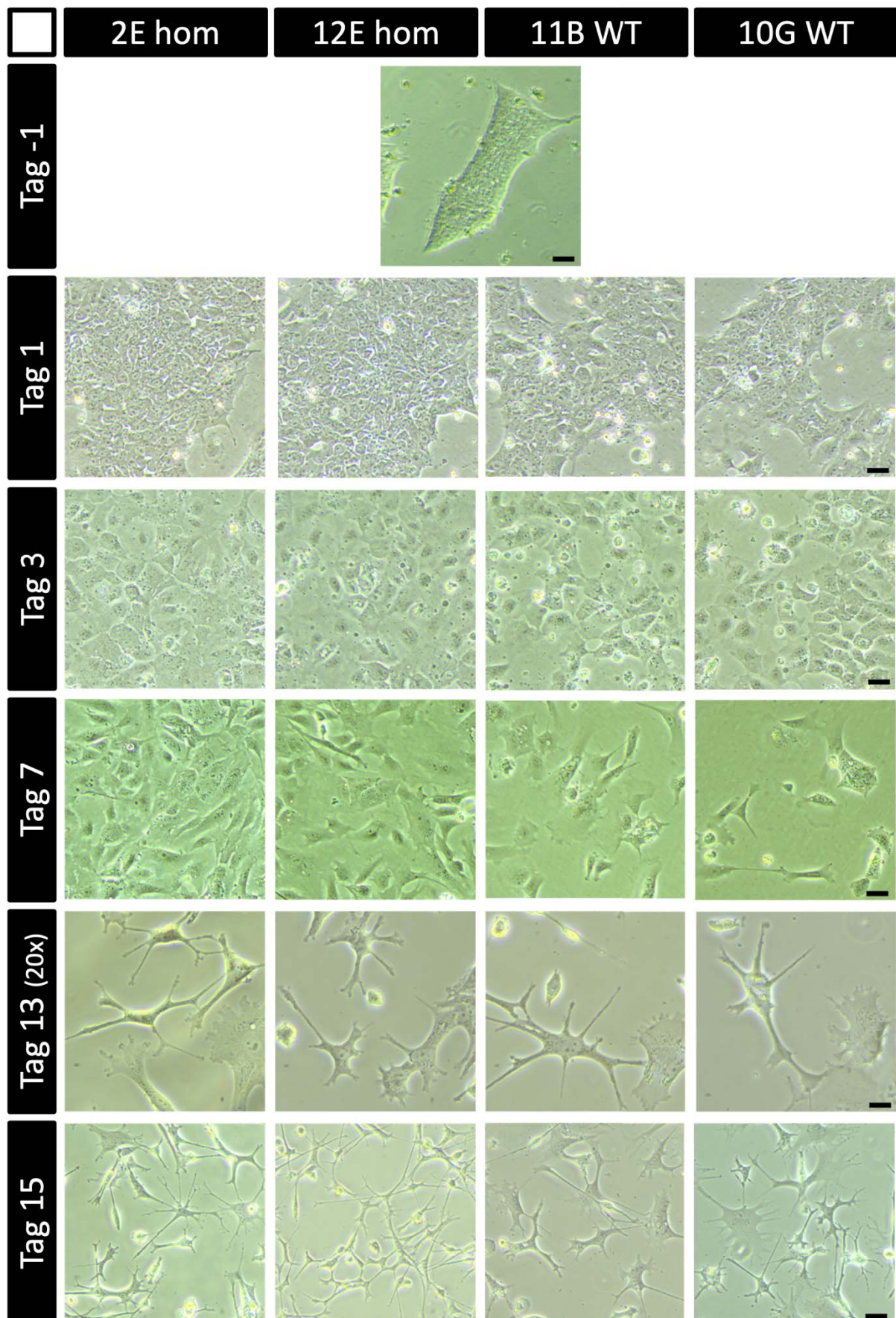


Abbildung 12: Differenzierung von hESCs unterschiedlicher Zelllinien zu iAs

Dargestellt sind die zwei MYORG-KO-Zelllinien (2E hom und 12E hom) sowie zwei isogene Kontrollzelllinien (11B WT und 10G WT), die unter Verwendung des Protokolls von Canals et al. zu iAs differenziert wurden. Die Bilder am Tag -1, 1, 3, 7, 13 und 15 wurden mit einem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse Ts2) akquiriert und mit ImageJ bearbeitet. An Tag 13 wurden die Aufnahmen in 20-facher (Maßstabsleiste $\triangleq 400\ \mu\text{m}$), an den übrigen Tagen in 10-facher Vergrößerung (Maßstabsleiste $\triangleq 200\ \mu\text{m}$) aufgenommen.

Die Differenzierung der hESCs zu iAs erfolgte mit dem Ziel, weitere Untersuchungen an iAs – dem Zelltyp, in dem MYORG im ZNS vornehmlich lokalisiert zu sein scheint – vornehmen zu können. Hierfür wurde das Protokoll von Canals et al. verwendet. Dieses beruht auf einer lentiviralen Transfektion der hESCs, wodurch eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren NFIB und SOX9 induziert wird. Eine kombinierte Überexpression dieser beiden Transkriptionsfaktoren erwies sich dabei als besonders effektiv darin, eine Differenzierung von hESCs in iAs zu erreichen. Eine Evaluation der Differenzierung erfolgte dabei durch die Messung astrozytärer Marker wie S100 β , GFAP und ALDH1L1, die Betrachtung der Zellmorphologie und funktionelle Tests wie unter anderem der Glutamataufnahme (Canals et al. 2018). Im Rahmen dieses Experimentes wurden zunächst hESCs der vier Zelllinien 2E hom, 12E hom, 11B WT und 10G WT ausplattiert und entsprechend dem Protokoll behandelt. Die morphologische Evaluation der Differenzierung erfolgte, wie in *Abbildung 11* dargestellt, unter regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle der vier Zelllinien. Genauere Angaben zur Methodik der Differenzierung und Lentivirusproduktion sowie zur Medienzusammensetzung finden sich in den *Kapiteln 3.1.9, 3.1.10* und in *Tabelle 7*.

In der qualitativen Beurteilung waren am Tag 1 für alle Zelllinien Zellkolonien von hESCs zu sehen. Typisch für dieses Stadium waren runde Zellen mit einem großen Kern, spärlichem Zytoplasma sowie prominenten Nukleoli. In der Entwicklung bis Tag 15 war bei allen Zelllinien eine sukzessive Abnahme der Konfluenz zu erkennen. Weiterhin zeigten die Zellen im Verlauf kleinere Zellkörper sowie eine Vielzahl radialer, vom Zellkörper abgehender Fortsätze, die sich zunehmend verzweigten. Am Tag 15 zeigte die 12E hom-Zelllinie die höchste Konfluenz und zugleich die kleinsten Zellkörper. Die 11B WT-Zelllinie wies die geringste Konfluenz und die größten Zellkörper auf. Die Zelllinien 2E hom und 10G WT zeigten im Vergleich eine mittlere Konfluenz und Größe der Zellkörper.

4.1.3 Immunzytochemische Färbungen der iAs

Für eine qualitative Evaluation der MYORG-Expression und damit auch der Auswirkung des MYORG-Knockouts in den unterschiedlichen Zelllinien erfolgte die immunhistochemische Färbung der iAs mit Calnexin, MYORG und DAPI (Methodik in Kapitel 3.4.3). Ersteres ist ein Lektin, das den Chaperonen zugeordnet werden kann und eine spezifische Expression im ER aufweist. Demnach ist bei einer gleichzeitigen Färbung beider Strukturen eine Kolokalisation im ER zu erwarten. Für die MYORG-KO-Zelllinien 2E hom und 12E hom hingegen ist kein MYORG-Signal zu erwarten.

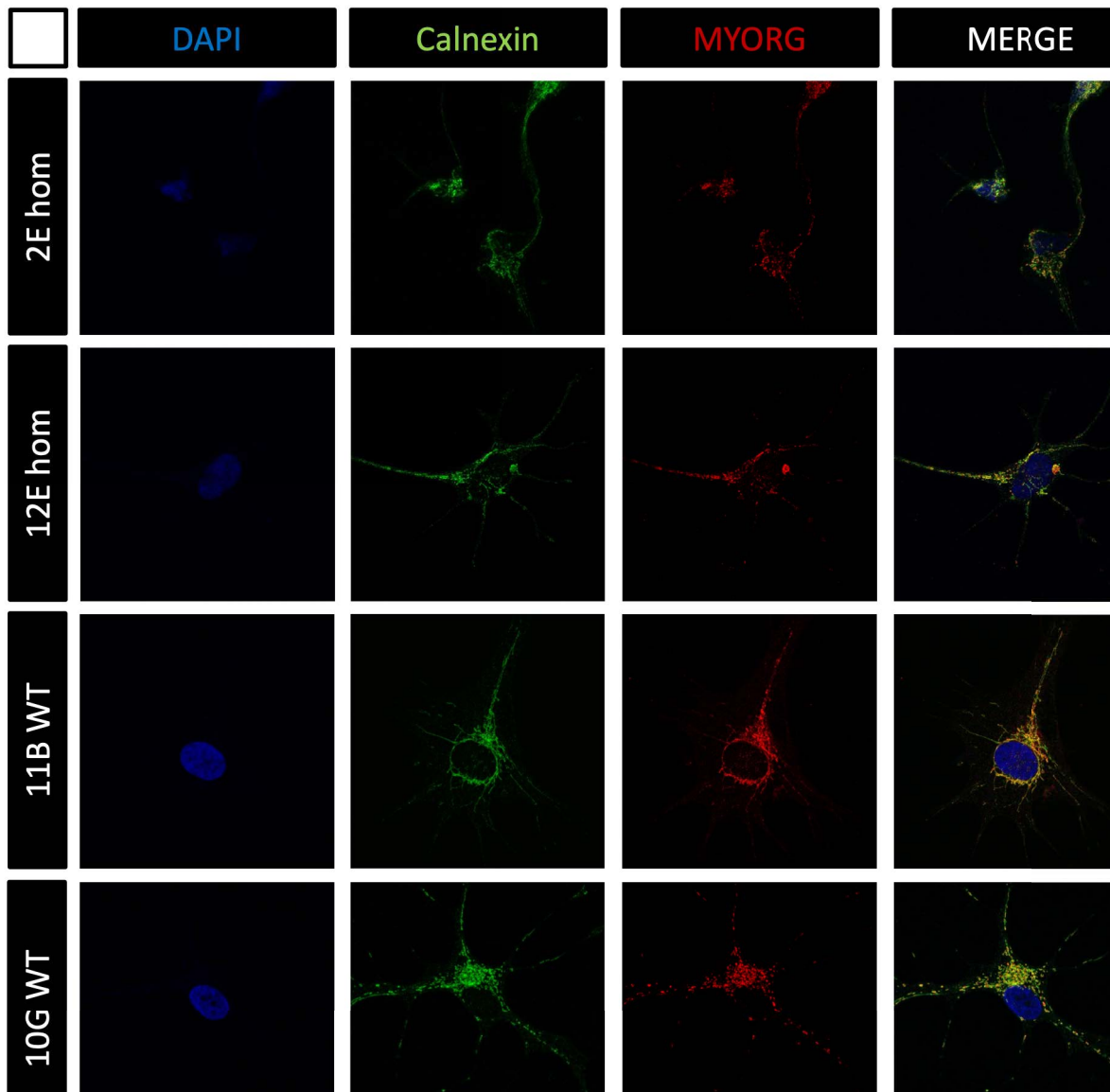


Abbildung 13: Immunzytochemische Färbungen der iAs

Dargestellt sind die iAs, die durch die Differenzierung von hESCs der vier Zelllinien 2E hom, 12E hom, 11B WT und 10G WT unter Verwendung des Protokolls von Canals et al. generiert wurden. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Antikörpern gegen Calnexin (Thermo Fisher Scientific) und MYORG (Thermo Fisher Scientific) sowie dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Biolegend). Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte in 63-facher Vergrößerung mit dem TCS SP5 II (Leica). Die Maßstabsleiste hat eine Länge von 10 µm.

Wie in *Abbildung 13* zu sehen ist, zeigten alle Zelllinien radiale, vom Zellkörper abgehende Fortsätze, die sich zunehmend verzweigten. Die Zellen der Zelllinien 11B WT und 10G WT schienen dahingehend etwas komplexer verzweigt zu sein. Bezüglich des Verhältnisses zwischen Zellkern und Zellkörper hob sich die 2E hom-Zelllinie in der qualitativen Betrachtung durch einen geringeren Zahlenwert im Vergleich zu den anderen Zelllinien ab.

Wie in *Abbildung 14* zu sehen ist, konnte auch für die Zelllinien 2E hom und 12E hom, die einen MYORG-KO beinhalten, ein MYORG-Signal festgestellt werden. Dieses wies in allen Zelllinien eine nahezu vollständige Überlappung zur Calnexin-Färbung auf. Das Muster der Färbung war dabei punktuell bis filamentös mit einer erhöhten Signalstärke in den perinukleären Bereichen (durchgehender weißer Kreis). Im Vergleich zwischen MYORG-KO-Zelllinien (2E hom und 12E hom) und den isogenen Kontrollen wirkte das perinukleäre Signal für Calnexin und MYORG bei Ersteren etwas schwächer. Bei allen vier Zelllinien zogen sich sowohl die Calnexin- als auch die MYORG-Signale bis in die astrozytären Ausläufer (gestrichelter weißer Kreis), wobei

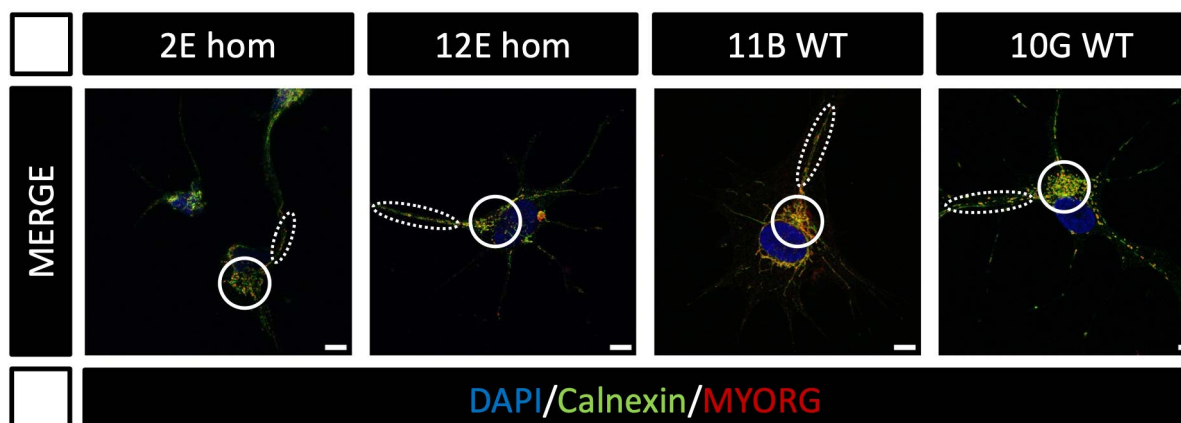


Abbildung 14: Immunzytochemische Färbungen der iAs mit Markierungen

Analog zu *Abbildung 13* sind hier die iAs, die durch die Differenzierung von hESCs der vier Zelllinien 2E hom, 12E hom, 11B WT und 10G WT generiert wurden, dargestellt. Zusätzlich wurde hier eine exemplarische Markierung des perinukleären Bereichs (durchgehender weißer Kreis) sowie der astrozytären Ausläufer (gestrichelter weißer Kreis) vorgenommen.

In der immunzytochemischen Färbung zeigte sich wie zu erwarten eine Kolo-kalisation von MYORG und dem ER-Marker Calnexin. Somit kann eine Lokalisation von MYORG im ER von Astrozyten bestätigt werden. Allerdings war auch ersichtlich, dass MYORG in allen vier Zelllinien, also auch denjenigen mit einem MYORG-KO, nachweisbar war. Da eine korrekte Einbringung der Mutation in der vorausgegangenen Genotypisierung bestätigt wurde, gilt es, zu hinterfragen, ob die Mutation tatsächlich zu einem MYORG-KO führt. Auch eine beeinträchtigte Spezifität des Antikörpers oder weitere mögliche Phänomene wie die Expression einer trunkierten MYORG-Variante gilt es auf der Suche nach potenziellen Fehlerquellen, die im Rahmen der Diskussion im *Kapitel 5.1* erfolgen soll, zu erwägen.

4.2 Co-Kulturen von IM-HAs und endothelialen Zellen

4.2.1 Proliferationsanalysen an IM-HAs und endothelialen Zellen

Mit dem Ziel, im Rahmen dieser Arbeit ein in-vitro Co-Kultur-Modell der BHS zu etablieren, wurden die Kompatibilität der IM-HAs mit unterschiedlichen Zellkulturmedien und der Einfluss der Zelldichte der IM-HAs bei der Ausplattierung auf deren Proliferation betrachtet. Es sollte untersucht werden, ob und wie sich unterschiedliche Zellkulturmedien sowie Zelldichten auf das Wachstum der Astrozytenkulturen auswirken. Die Ergebnisse dieser Proliferationsanalysen sollen zusammen mit einer Literaturrecherche zu in-vitro Blut-Hirn-Schranken-Modellen (s. *Tabelle 28*) dazu beitragen, einen fundierten Versuchsaufbau mit mehreren Co-Kultur-Konditionen zu erarbeiten.

Hierfür wurden die IM-HAs zunächst mit einer Zählkammer gezählt und daraufhin in der festgelegten Zelldichte auf 96-Well-Zellkulturplatten ausplattiert. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen alle 24 Stunden Zellproliferationstestungen mit der Orangu-Lösung durchgeführt. Das Prinzip des Orangu-Zellproliferationstests sowie dessen Anwendung werden näher in *Kapitel 3.2* erläutert. Kurzgefasst entsteht durch die Dehydrogenaseaktivität von Zellen ein Farbstoff, dessen optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert werden kann. Die Dehydrogenaseaktivität ist dabei proportional zur Zellzahl, sodass die optische Dichte bei 450 nm (OD_{450}) Aufschluss über die Zellzahl und bei repetitiven Messungen auch über die Zellproliferation geben kann. Die OD_{450} -Werte wurden in Bezug auf die bekannte Zellzahl bei der Ausplattierung normalisiert und in den folgenden Abbildungen graphisch dargestellt. Anhand eines exponentiellen Wachstumsmodells (Malthusgleichung) erfolgte daraufhin eine nonlineare Regression. Im Zuge der Regressionsanalysen wurden weiterhin Ausreißer identifiziert und aus den weiteren Analysen exkludiert.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der ersten Proliferationsanalyse, in der das, von der Hersteller*in der IM-HAs empfohlene, AM mit zwei weiteren Zellkulturmedien verglichen wurde, die üblicherweise für die Kultivierung von Endothelzellen (hBMEC und hCMEC/D3) verwendet werden. Für alle Medien wurden die IM-HAs anfangs mit einer Zelldichte von 5500 Zellen/ μm^2 ausplattiert, sodass die Kurven bei der gleichen Zellzahl beginnen (A). Im Verlauf nahm die Kurve für EM einen flacheren und für EG einen steileren Verlauf im Vergleich zu AM. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 168 Stunden bestand bei den Analysen für die Zellzahlen bei 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen dem AM und den übrigen zwei Medien (B). Allerdings zeigte sich ab 72 Stunden zwischen den Medien EG und EM ein statistisch signifikanter Unterschied, der bis zum Ende der Betrachtung bestehen bleibt.

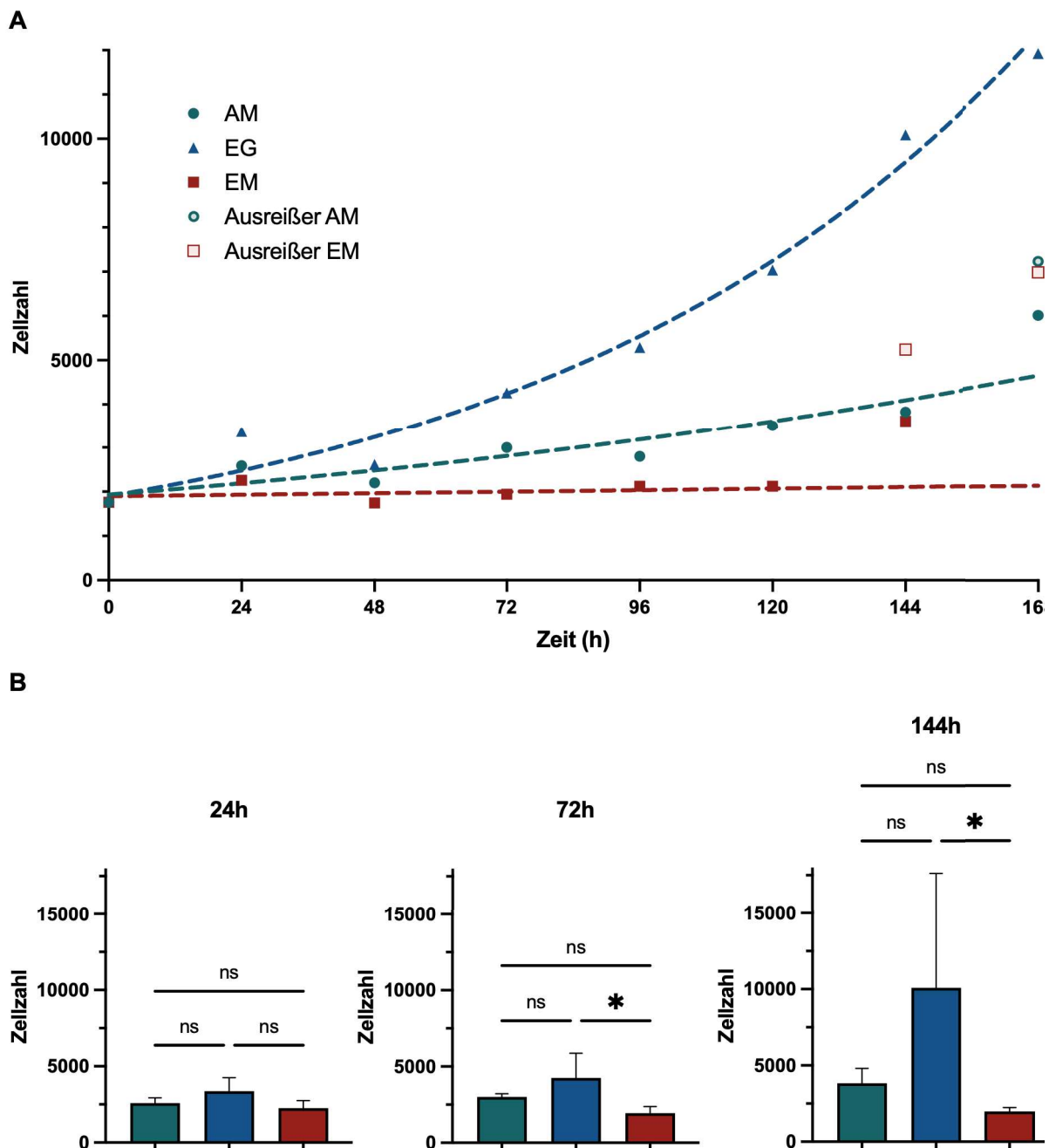


Abbildung 15: Proliferation von IM-HAs in unterschiedlichen Medien

A Dargestellt ist die Zellzahl von IM-HAs, die über einen Zeitraum von 168 Stunden für alle 2 Stunden mithilfe des Orangu-Zellproliferationstests bestimmt wurde. Die IM-HAs wurden dafür in drei unterschiedlichen Medien (AM, EG und EM) kultiviert. Eine approximierter Wachstumskurve wurde durch Anwendung eines exponentiellen Wachstumsmodells im Rahmen einer nonlinearen Regression erstellt. (n = 3-6 separate Wells pro Kondition aus unabhängigen Experimenten) **B** Vergleich der Zellzahl der IM-HAs nach Kultivierung für 24, 72 und 144 Stunden in unterschiedlichen Medien (AM, EG und EM). Statistische Testung mithilfe des Kruskal-Wallis-Test (nonparametrischer Test). (n = 3-6 separate Wells pro Kondition aus 2 unabhängigen Experimenten; Balkendiagramm: Durchschnittswerte Standardabweichung; *p < 0.05, ns: nicht signifikant)

In *Abbildung 16* werden die Ergebnisse der nächsten Proliferationsanalyse dargestellt, in der die Auswirkung von konditionierten Medien (kEG, kEM) auf die Proliferation von IM-HAs untersucht wurde. Bei konditionierten Medien handelt es sich um eine 1:1-Mischung von frischem EG bzw. EM mit den entsprechenden Medien, die zuvor für die Kultivierung von Endothelzellen genutzt wurden. Auch bei diesem Experiment erfolgt die Ausplattierung der IM-HAs mit einer Zelldichte von 5500 Zellen/ μm^2 . Die Proliferationskurven der konditionierten Medien (A und C) zeigen im Vergleich zu den frischen Medien einen flacheren Verlauf. Bei der statistischen Analyse der Zellzahl zu den unterschiedlichen Zeitpunkten zeigten sich nach 24 Stunden für die frischen Medien eine statistisch höhere Zellzahl im Vergleich zu den konditionierten Medien (B und D). Dieser Unterschied lässt sich nach 144 Stunden allerdings nicht mehr nachweisen.

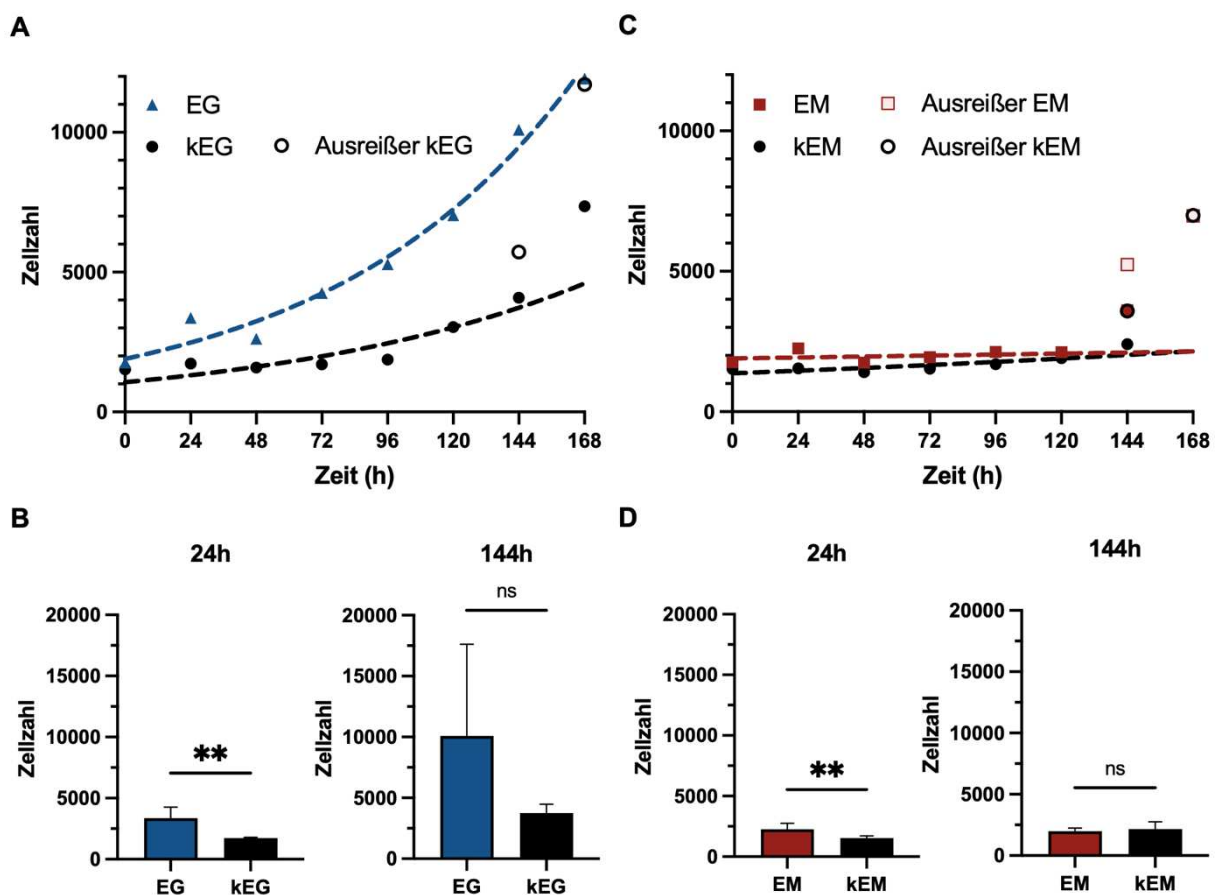


Abbildung 16: Proliferation von IM-HAs in konditionierten Medien

Vergleich der Zellzahl von IM-HAs, die über einen Zeitraum von 168 Stunden für alle 24 Stunden mithilfe des Orangu-Zellproliferationstests bestimmt wurde. **(A, C)** Die IM-HAs wurden dafür in den Medien EG und kEG bzw. EM und kEM kultiviert. Eine approximierte Wachstumskurve wurde durch Anwendung eines exponentiellen Wachstumsmodells im Rahmen einer nonlinearen Regression erstellt. ($n = 3-6$ separate Wells pro Kondition aus 2 unabhängigen Experimenten) **(B, D)** Vergleich der Zellzahl und Standardabweichung der IM-HAs nach Kultivierung in normalem bzw. konditioniertem Medium für 24 und 144 Stunden. Ermittlung statistischer Unterschiede mit einem nonparametrischen Test (Kruskal-Wallis-Test). ($n = 3-6$ separate Wells pro Kondition aus 2 unabhängigen Experimenten; Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung; ** $p < 0.01$, ns: nicht signifikant)

Neben der Frage nach dem Einfluss unterschiedlicher Zellkulturmedien ist es ebenfalls von Bedeutung, die optimale Zelldichte für die Ausplattierung der IM-HAs zu determinieren. Dadurch soll zum einen gewährleistet werden, dass die Zelldichte hoch genug ist, um ein Überleben sowie eine physiologische Proliferation der IM-HAs zu ermöglichen, und zum anderen soll eine übermäßige Zelldichte am Ende der Kultivierung vermieden werden, die sich beispielsweise in Bezug auf immunzytochemische Färbungen als Nachteil erweisen kann. Wie in *Abbildung 17* dargestellt ist, wurden hierfür IM-HAs in einer Zelldichte von 4000, 5500 und 7000 Zellen/ μm^2 in AM ausplattiert und für die folgenden 7 Tage untersucht. Eine Zelldichte von 5500 Zellen/ μm^2 bei der Ausplattierung weist über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikant höhere Zellzahl auf als die Vergleichswerte bei einer Ausplattierungsdichte von 4000 Zellen/ μm^2 (B). Die Vergleiche der übrigen Ausplattierungsdichten bringen keine signifikanten Unterschiede hervor, wobei die Kurve bei einer Dichte von 5500 Zellen/ μm^2 den steilsten Verlauf zeigt.

Die Proliferationsanalysen ergeben, dass IM-HAs in EG ein signifikant höheres Wachstum zeigen als in EM (*Abbildung 15*). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass konditioniertes Medium keinen anhaltend signifikanten Einfluss auf die Proliferation der IM-HAs hat (*Abbildung 16*). Zuletzt weisen die IM-HAs bei einer Ausplattierungsdichte von 5500 Zellen/ μm^2 eine signifikant höhere Proliferation als bei einer Ausplattierungsdichte von 4000 Zellen/ μm^2 auf. Zwischen den Ausplattierungsdichten von 5500 und 7000 Zellen/ μm^2 konnte hingegen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (*Abbildung 17*).

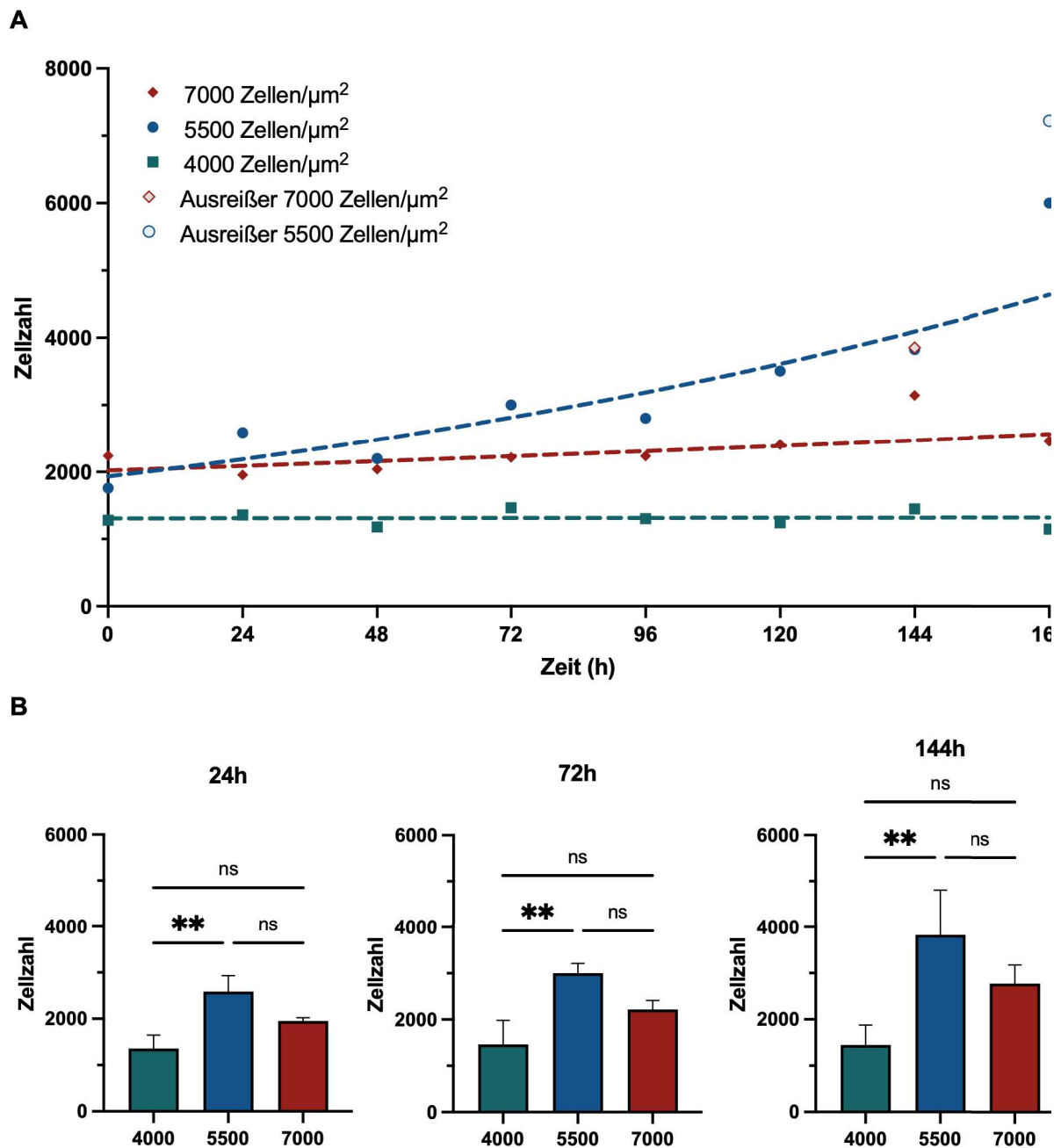


Abbildung 17: Proliferation von IM-HAs unterschiedlicher Ausplattierungsdichte

A Gezeigt ist die Zellzahl von IM-HAs, die über einen Zeitraum von 168 Stunden für alle 2 Stunden mithilfe des Orangu-Zellproliferationstests bestimmt wurde. Die IM-HAs wurden dafür in drei unterschiedlichen Zelldichten (4000, 5500 und 7000 Zellen/ μm^2) ausplattiert. Eine approximierte Wachstumskurve wurde durch Anwendung eines exponentiellen Wachstumsmodells im Rahmen einer nichtlinearen Regression erstellt. (n = 3-6 separate Wells pro Kondition aus 2 unabhängigen Experimenten) **B** Vergleich der Zellzahl der IM-HA unterschiedlicher Zelldichten nach Kultivierung für 24, 72 und 144 Stunden. Ermittlung statistischer Unterschiede mit einem nonparametrischen Test (Kruskal-Wallis-Test). (n = 3-6 separate Wells pro Kondition aus 2 unabhängigen Experimenten; Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung; **p < 0.01, ns: nicht signifikant)

4.2.2 Aufbau und Dauer der Co-Kultur-Konditionen

Es gibt bereits zahlreiche Publikationen über in-vitro BHS-Modelle, die sich in der Anzahl und Art der verwendeten Zelllinien, ihrer Dichte bei der Aussaat, ihrer Kultivierungsdauer, den verwendeten Medien sowie den durchgeführten Tests unterscheiden. Einige dieser Publikationen habe ich im Rahmen einer Literaturrecherche zusammengefasst und als Überblick in *Tabelle 28* zusammengetragen. Auf Grundlage der Proliferationsanalysen sowie der vorherigen Publikationen wurden die, in *Abbildung 18* dargestellten, Konditionen erarbeitet. Mithilfe dieser Konditionen soll über eine graduelle Modifikation der Interaktionen zwischen den IM-HAs und der immortalisierten Endothelzelllinie hCMEC/D3 mehr über den Einfluss von Endothelzellen auf die astrozytäre Entwicklung, Morphologie und Expressionsmuster unterschiedlicher Proteine in Erfahrung gebracht werden.

Angefangen bei Kondition 1, in der die IM-HAs lediglich in unterschiedlichen Zellkulturmedien kultiviert wurden, erfolgte eine Steigerung der Interaktion bis hin zu einer direkten Co-Kultur in Kondition 5. In der zweiten Kondition werden die IM-HAs in konditioniertem Medium kultiviert. Dabei handelt es sich um eine 1:1-Mischung von frischem EG bzw. EM mit den entsprechenden Medien, die zuvor für mindestens ein bis zwei Tage für die Kultivierung von Endothelzellen genutzt wurden. Zur Entfernung von Zellresten wird das erhaltene Medium mithilfe eines 40-µm-Zellsiebs filtriert, bevor es mit dem frischen Medium vermischt und für die Kultivierung der IM-HAs genutzt wird. Dadurch soll eine mögliche Beeinflussung der IM-HAs durch lösliche, von den Endothelzellen ausgeschüttete, Faktoren untersucht werden.

Kondition 3 und 4 kennzeichnen sich durch die Kompartimentierung der Zellkulturplatte durch die Verwendung eines Transwell-Polyestermembraneinsatzes. Die Handhabung und insbesondere die Aussaat der Zellen auf die Membraneinsätze wird in *Kapitel 3.1.2* näher beschrieben. In Kondition 3 werden die IM-HAs auf dem Boden der Zellkulturplatte und die Endothelzellen auf der Oberseite des Membraneinsatzes kultiviert. Wie bei Kondition 2 wird hier der Einfluss von löslichen Faktoren untersucht, während in dieser Kondition durch die gemeinsame Kultivierung beider Zellarten eine gegenseitige Beeinflussung zu Anpassungen im Sekretionsverhalten führen könnte. In der Kondition 3 wird durch eine beidseitige Aussaat von Zellen auf den Membraneinsätzen ein direkter Zell-Zell-Kontakt ermöglicht. Die IM-HAs werden zunächst auf die Unterseite der Membraneinsätze gegeben und nachdem sich diese an die Polyestermembran angeheftet haben, kann der Membraneinsatz umgedreht und darauf hCMEC/D3 ausgesät werden. Trotz einer räumlichen Trennung können die Astrozyten und Endothelzellen so direkt und nicht nur über lösliche Faktoren miteinander interagieren. Eine weitere Modifikation in den Konditionen 3 und 4 erfolgt durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Porendurchmessern. Ein Porendurchmesser von 0,4 µm ist ausschließlich für lösliche Faktoren, während bei einem Porendurchmesser von 3 µm auch zelluläre Ausläufer die Membran durchdringen können.

ERGEBNISSE

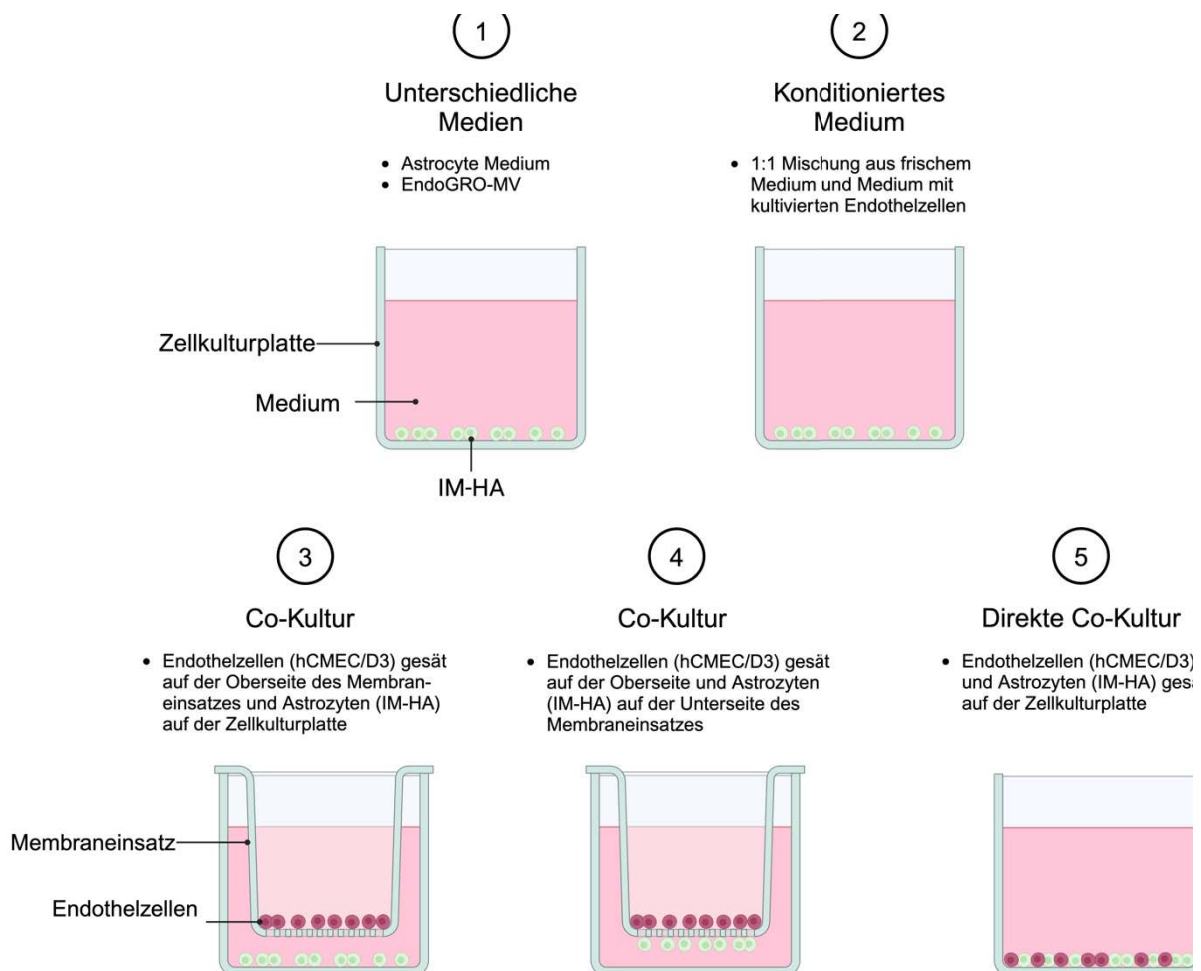
Tabelle 28: Übersicht von in-vitro Blut-Hirn-Schranken-Modellen

Zelltypen	Zelldichte der Endothelzellen (bei Zellaussaat)	Zelldichte der Astrozyten (bei Zellaussaat)	Verhältnis (Endothelzellen zu Astrozyten)	Kultivierungsdauer	Testmethoden	Referenz
BCEC Ratten-Astrozyten	$9,1 \times 10^4$ Zellen/cm ²	$1,4 \times 10^5$ Zellen/cm ²	1:1,54	9 – 10 Tage	Immunhistochemie TEER	(Gaillard et al. 2001)
hCMEC/D3 CC-2565- oder SC1810-Astrozyten	2×10^5 Zellen/cm ²	5×10^3 Zellen/cm ²	1:0,025	10 Tage	TEER	(Hatherell et al. 2011)
hCMEC/D3 primäre humane Astrozyten	1×10^5 Zellen/cm ²	$2,9 \times 10^4$ Zellen/cm ²	1:0,29	10 Tage	Migrations- and Zytokinassays TEER	(Daniels et al. 2013)
hCMEC/D3, primäre humane Astrozyten	1×10^5 Zellen/cm ²	4×10^4 Zellen/cm ²	1:0,4	7 Tage	Permeabilitätsuntersuchungen TEER Zellviabilitäts- und Zellproliferationsassays	(Kulczar et al. 2017)
hBMEC primäre humane Astrozyten	$6,7 \times 10^4$ Zellen/cm ²	$2,8 \times 10^5$ Zellen/cm ²	1:4,18	10 Tage	Dexamethason-behandlung Sauerstoff- und Glucosedeprivation (OGD) TEER	(Stone et al. 2019)
hCMEC/D3 immortalisierte humane Astrozyten	$1,8 \times 10^4$ Zellen/cm ²	$9,1 \times 10^4$ Zellen/cm ²	1:5,06	9 Tage	Immunfluoreszenz Zellviabilitäts- und Zellproliferationsassays	(Kim et al. 2022)
hCMEC/D3 I321N1-Astrozyten	1×10^5 Zellen/cm ²	4×10^4 Zellen/cm ²	1:0,4	10 Tage	Immunfluoreszenz Permeabilitätsuntersuchungen TEER	(Barberio et al. 2022)
HBEC-5i primäre humane Astrozyten	$2,55 \times 10^5$ Zellen/cm ²	$1,45 \times 10^5$ Zellen/cm ²	1:0,57	4 – 5 Tage	Immunhistochemie Permeabilitäts- und Leitfähigkeitsuntersuchungen TEER Western Blot	(Bolden et al. 2023)

Abkürzungen: hCMEC/D3 = humane kardiale mikrovaskuläre Endothelzelllinie D3; BCEC= zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen (brain capillary endothelial cells); TEER = transendothelialer elektrischer Widerstand (transendothelial electrical resistance); HBEC-5i = humane zerebrale Endothelzelllinie 5i (human brain endothelial cell line 5i); OGD = oxygen–glucose deprivation

ERGEBNISSE

Die Dauer der Kultivierung in der Co-Kultur wurde auf 7 Tage festgelegt, sodass einerseits genügend Zeit vorhanden ist, in der sich Veränderungen auf Ebene der zellulären Morphologie und Expression von Proteinen ausprägen können und sich andererseits das Zellwachstum in einem Rahmen bewegt, der immunzytochemische Analysen ermöglicht. In den in-vitro BHS-Modellen der Literaturrecherche erfolgt die Kultivierung der Zellen für einen Zeitraum zwischen 4 und 10 Tagen, sodass 7 Tage einen guten Kompromiss darstellen sollten.



Schematischer Aufbau der, in dieser Arbeit verwendeten, Co-Kultur-Konditionen. Von den Konditionen 1 bis 5 erfolgt eine Zunahme der möglichen Interaktionen zwischen den IM-HA und den hCMEC/D3. In den Konditionen 3 und 4 wurden Polyester-Membraneinsätze in einer Porengröße von 0,4 μm bzw. 3 μm verwendet. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Für das Verständnis von Endothelzellen zu Astrozyten wurde hier gewählt, da wir, ähnlich wie auch Kim et al. bezüglich der Methodik vor allem auf Immunzytochemie sowie auf Proliferationsanalysen setzten und der Fokus der Betrachtungen auf den Astrozyten liegen soll. Dies ergibt eine Ausplattierungsichte der hCMEC/D3 von 1100 Zellen/ μm^2 für die Proliferationsanalysen und Immunzytochemie sowie 3300 Zellen/ μm^2 für die Proteinexpressionsanalysen im Western Blot.

In den folgenden Untersuchungen der nukleären Oberfläche sowie der Analyse von immunzytochemischen GFAP- und MYORG-Färbungen (*Kapitel 4.2.3* und *4.2.4*) wurden die Konditionen 4 und 5 exkludiert. Dieser Schritt war nötig, da für die Untersuchung der Kondition 4 eine immunzytochemische Anfärbung sowie Mikroskopie der Polyestermembranen nötig geworden wäre. Dies ist zwar grundsätzlich möglich, allerdings gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die Methode ausreichend zu optimieren. Für Kondition 5 hingegen zeigte sich eine zu hohe Konfluenz, sodass Analysen an einzelnen Zellen nicht durchführbar waren.

4.2.3 Untersuchung der nukleären Oberfläche

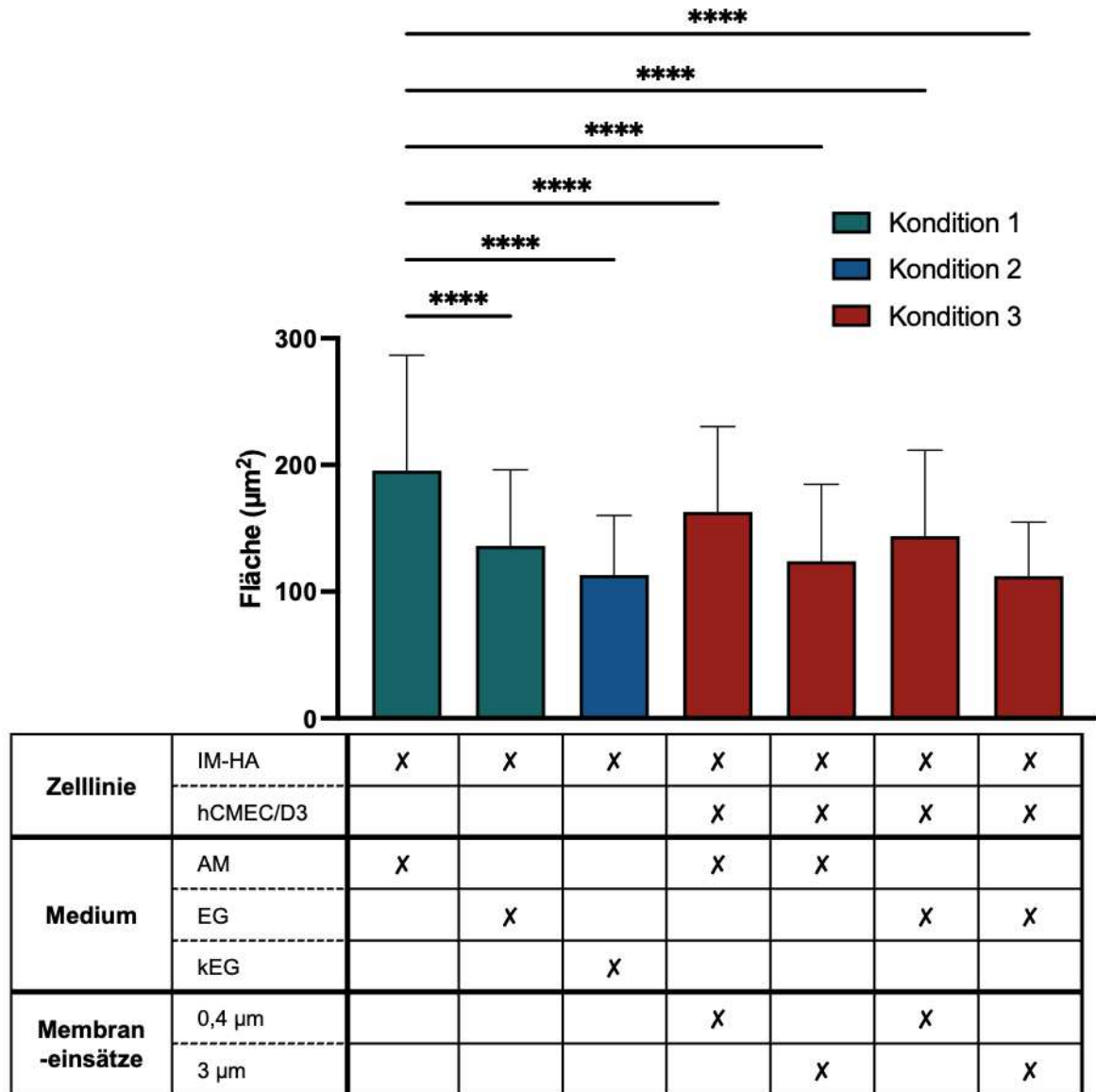
In der qualitativen Betrachtung von immunzytochemischen Färbungen der IM-HAs in den verschiedenen Co-Kultur-Konditionen fiel ein Unterschied in der nukleären Fläche auf, der im Folgenden quantifiziert und in der *Abbildung 19* dargestellt wurde. Veränderungen der nukleären Größe und Morphologie können nicht nur auf die Zelldifferenzierung, -entwicklung und -krankheit zurückzuführen sein, sondern auch durch perinukleäre Strukturen wie das ER beeinflusst werden (Jevtić et al. 2014). Diese Analyse erfolgte mit dem Ziel, weitere Auswirkungen der unterschiedlichen Medien und Konditionen auf die astrozytäre Morphologie zu beschreiben und diese so in der Gesamtheit aller Ergebnisse einordnen zu können.

Hierfür wurden die Astrozyten der unterschiedlichen Konditionen mit DAPI angefärbt und fixiert (s. *Kapitel 3.4.3*). Die Analyse der in der Fluoreszenzmikroskopie akquirierten Aufnahmen erfolgte mit ImageJ. Die verwendete Methodik ist in *Kapitel 3.5.2* zu finden und das zur Automatisierung verfasste Makro kann dem Appendix entnommen werden.

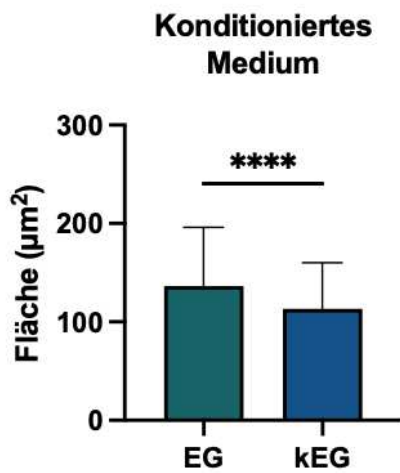
Wie in *Abbildung 19* zu sehen ist, zeigten die IM-HAs in AM gegenüber allen anderen Konditionen eine signifikant höhere nukleäre Fläche von durchschnittlich etwa 195,6 μm^2 (A). Auch zwischen normalem und konditioniertem EG konnte ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Während die Nuclei von IM-HAs nach einer Woche der Kultivierung in EG eine Fläche von durchschnittlich 136,3 μm^2 haben, weisen sie im kEG einen Wert von nur 113,2 μm^2 auf (B). Eine weitere Auffälligkeit zeigte sich beim Vergleich der unterschiedlichen Kombinationen in der Kondition 3. Der Vergleich von Nuclei von IM-HAs, die im gleichen Medium, aber bei unterschiedlichen Porendurchmessern kultiviert wurden, zeigte sowohl bei AM als auch bei EG eine signifikant höhere nukleäre Fläche für einen Porendurchmesser von 0,4 μm (C).

Demnach führen in AM oder unbehandeltem Medium kultivierte Astrozyten sowie ein kleinerer Porendurchmesser von 0,4 μm zu einer größeren nukleären Fläche als in konditioniertem Medium kultivierte Astrozyten sowie ein größerer Porendurchmesser von 3 μm . Eine nähere Betrachtung, wie der Unterschied der nukleären Fläche gewertet werden sollte und welche Ursachen dafür in Betracht kommen, erfolgt in *Kapitel 5.3.1* der Diskussion.

A



B



C

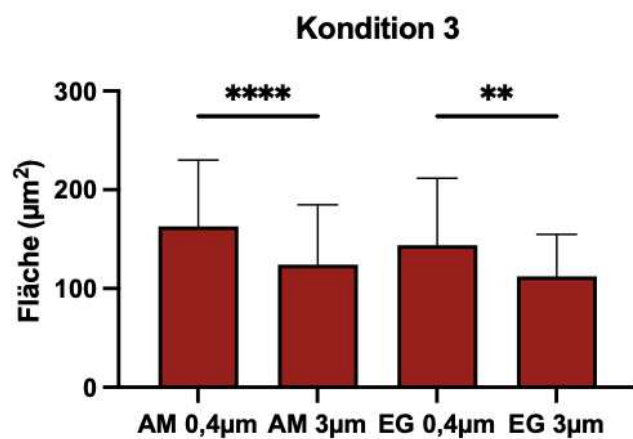


Abbildung 19: Analyse der nukleären Oberfläche

Grafische Darstellung der nukleären Oberfläche in den Konditionen 1, 2 und 3 (**A**) in normalem und konditioniertem EG (**B**) sowie den unterschiedlichen Kombinationen bezüglich der Medien und Porendurchmesser in der Kondition 3 (**C**). Die statistische Analyse erfolgt mit one-way ANOVA. (n = 122 – 371 Zellkerne aus 2-3 unabhängigen Experimenten; Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung; **p < 0.01, ****p < 0.0001, nicht signifikante Unterschiede wurden nicht markiert)

4.2.4 Analyse von immunzytochemischen GFAP- und MYORG-Färbungen

Zur Analyse des Einflusses der unterschiedlichen Co-Kulturen auf die Entwicklung von Astrozyten anhand des astrozytären Reifemarkers GFAP sowie auf die Expression von MYORG wurden immunzytochemische Färbungen angefertigt. Untersuchungen an Co-Kultur-Modellen der BHS konnten zeigen, dass diese gegenüber Monokulturen eine größere Übereinstimmung mit physiologischen Bedingungen des menschlichen Organismus aufweisen. Dies kann an der Expression struktureller Marker sowie der Überlegenheit gegenüber Monokulturen in funktionellen Testungen festgemacht werden (Hatherell et al. 2011; Kim et al. 2022). Zudem ergaben Untersuchungen der astrozytären Morphologie, dass neurodegenerative Erkrankungen wie Chorea Huntington unter anderem durch Einbußen in der Komplexität der astrozytären Zellfortsätze zu einer Verringerung des Volumens der Astrozyten beitragen können (Zhou et al. 2019).

Aus diesen Beobachtungen heraus entstand die Hypothese, dass durch die Kultivierung der Astrozyten in einer Co-Kultur Unterschiede in der Morphologie und der Expression von GFAP sowie MYORG resultieren könnten. Neben Analysen der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgt im *Kapitel 4.2.5* zum gleichen Zweck auch eine quantitative Proteinanalytik der Co-Kulturen.

Die immunzytochemischen Färbungen, die Fluoreszenzmikroskopie und die Auswertung der Aufnahmen erfolgten entsprechend den Schilderungen in den *Kapiteln 3.4.3* und *3.5*. Das Makro für die Automatisierung der Analyseschritte kann dem Appendix entnommen werden. Untersucht wurden neben der GFAP- und MYORG-Intensität auch die Fläche, die GFAP-positiv gefärbt war. Die GFAP-positive Fläche fungierte in dieser Analyse als Annäherung für die zelluläre Oberfläche. Für die Analyse wurden lediglich singuläre Zellen bzw. Zellen mit einer geringfügigen Überlappung mit naheliegenden Zellen genutzt, sodass die Messwerte in den folgenden drei Abbildungen pro Zelle angegeben werden können.

In der *Abbildung 20* ist die mit GFAP gefärbte Fläche pro Zelle in μm^2 für die unterschiedlichen Konditionen aufgetragen. Es kann beobachtet werden, dass die Kontrollkondition mit IM-HAs in AM gegenüber den anderen Konditionen keinen signifikanten Unterschied aufwies. Nur die Kondition 3 in AM mit einem Porendurchmesser von $0,4 \mu\text{m}$ zeigte im Vergleich zu den anderen Zellen der Kondition 3 sowie zu Zellen der Kondition 2 eine signifikant höhere zelluläre Oberfläche. Mit einer durchschnittlichen GFAP-positiven Fläche von $1103,4 \mu\text{m}^2$ hatte diese Kondition damit den höchsten Durchschnittswert dieser Analyse.

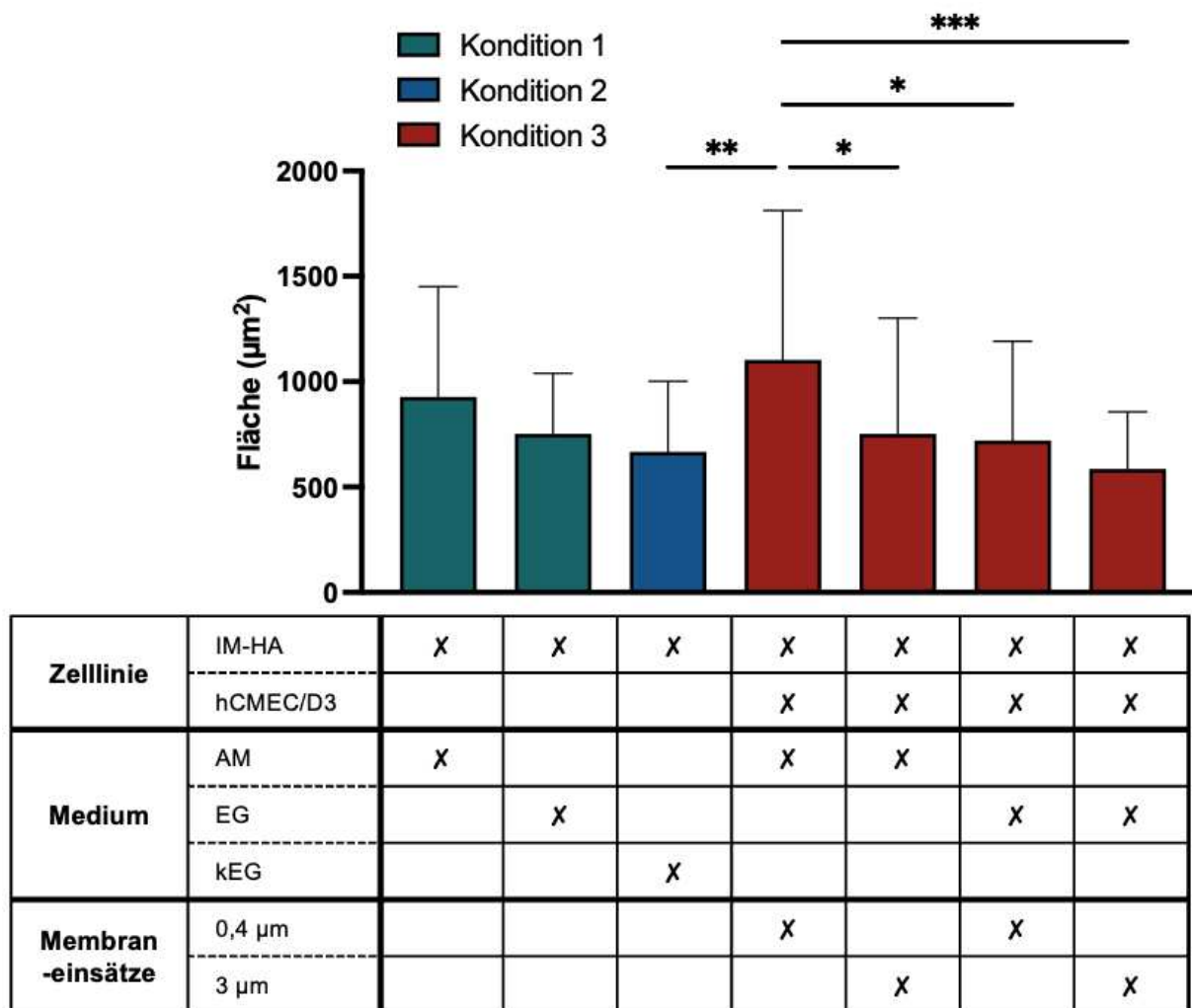


Abbildung 20: Analyse der zellulären Oberfläche (GFAP-Fläche)

Dargestellt ist die GFAP-positive Fläche pro Zelle in den Konditionen 1, 2 und 3. Die Normalisierung der Werte erfolgte an den IM-HAs in AM (Kondition 1). Die statistische Analyse wurde mit one-way ANOVA durchgeführt. Zur Korrektur der Alpha-Kumulation wurde der Tukey-Test angewandt. ($n = 30 - 34$ separate Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten; Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, nicht signifikante Unterschiede wurden nicht markiert)

Die *Abbildung 21* zeigt die GFAP-Fluoreszenzintensität pro Zelle in willkürlichen Einheiten für die unterschiedlichen Konditionen. Die Messwerte wurden anhand der Kontrollkondition (IM-HAs in AM) normalisiert. Lediglich zwischen IM-HAs in AM und der Kondition 3 in EG mit einem Porendurchmesser von 3 μm gab es einen signifikanten Unterschied. Zwischen den restlichen Zellen konnte kein solcher Unterschied beschrieben werden. Die höchste GFAP-Intensität konnte für IM-HAs in AM beobachtet werden, während die Kondition 3 in EG mit einem Porendurchmesser von 3 μm sowohl die kleinste zelluläre Oberfläche (586,9 μm^2), als auch die geringste GFAP-Intensität (0,43) aufwies.

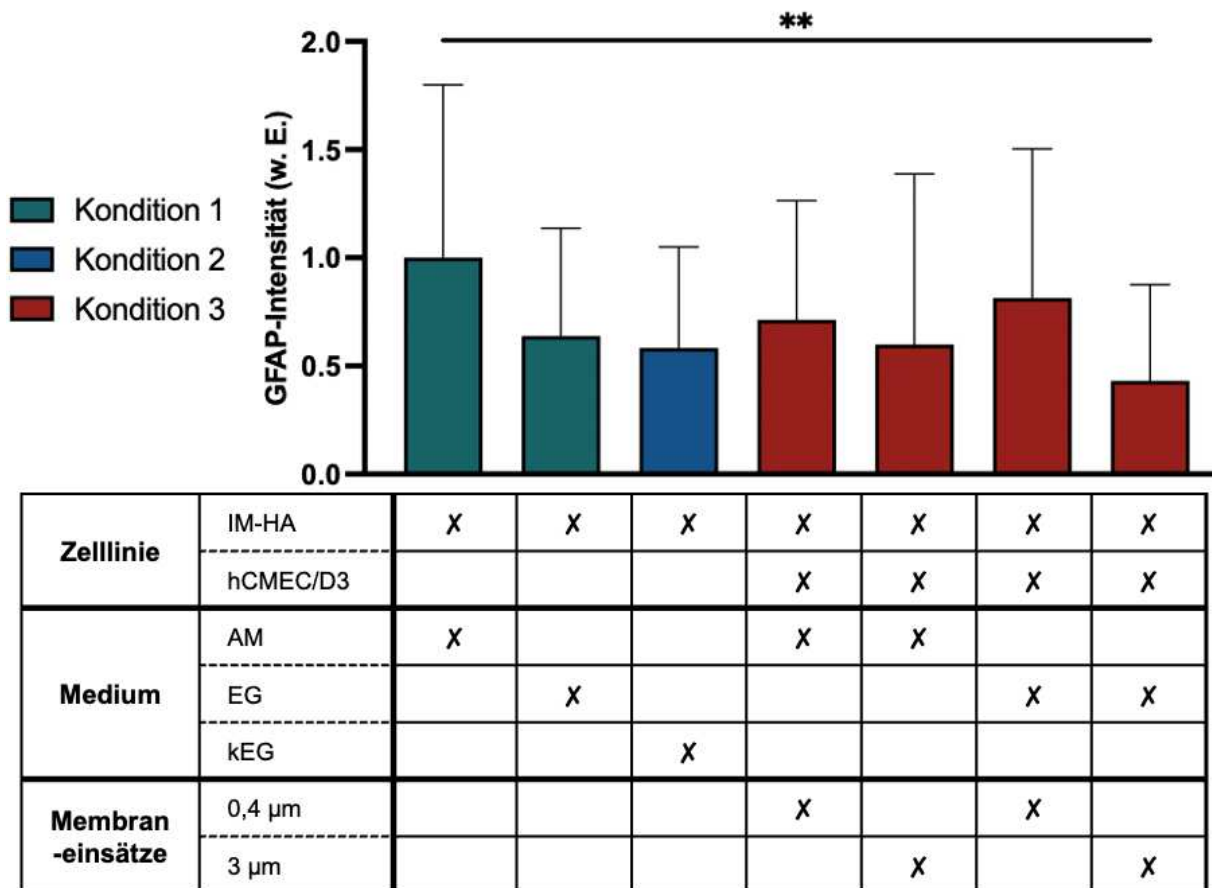


Abbildung 21: Analyse der GFAP-Fluoreszenzintensität

Dargestellt ist die GFAP-Fluoreszenzintensität pro Zelle in den Konditionen 1, 2 und 3. Die Normalisierung der Werte erfolgte an den IM-HAs in AM (Kondition 1). Die statistische Analyse wurde mit one-way ANOVA durchgeführt. Zur Korrektur der Alpha-Kumulation wurde der Tukey-Test angewandt. (n = 30–34 separate Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten; Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung; **p < 0.01, nicht signifikante Unterschiede wurden nicht markiert)

Die *Abbildung 22* zeigt die MYORG-Fluoreszenzintensität pro Zelle in willkürlichen Einheiten für die unterschiedlichen Konditionen. Die Messwerte wurden anhand der Kontrollkondition (IM-HAs in AM) normalisiert. Wie auch bei der GFAP-Intensität hatte die Kontrollkondition die höchste Intensität für MYORG. Gegenüber den drei Konditionen mit der geringsten MYORG-Intensität (Kondition 2; Kondition 3, AM, 3 µm; Kondition 3, EG, 3 µm) bestand zudem ein signifikanter Unterschied.

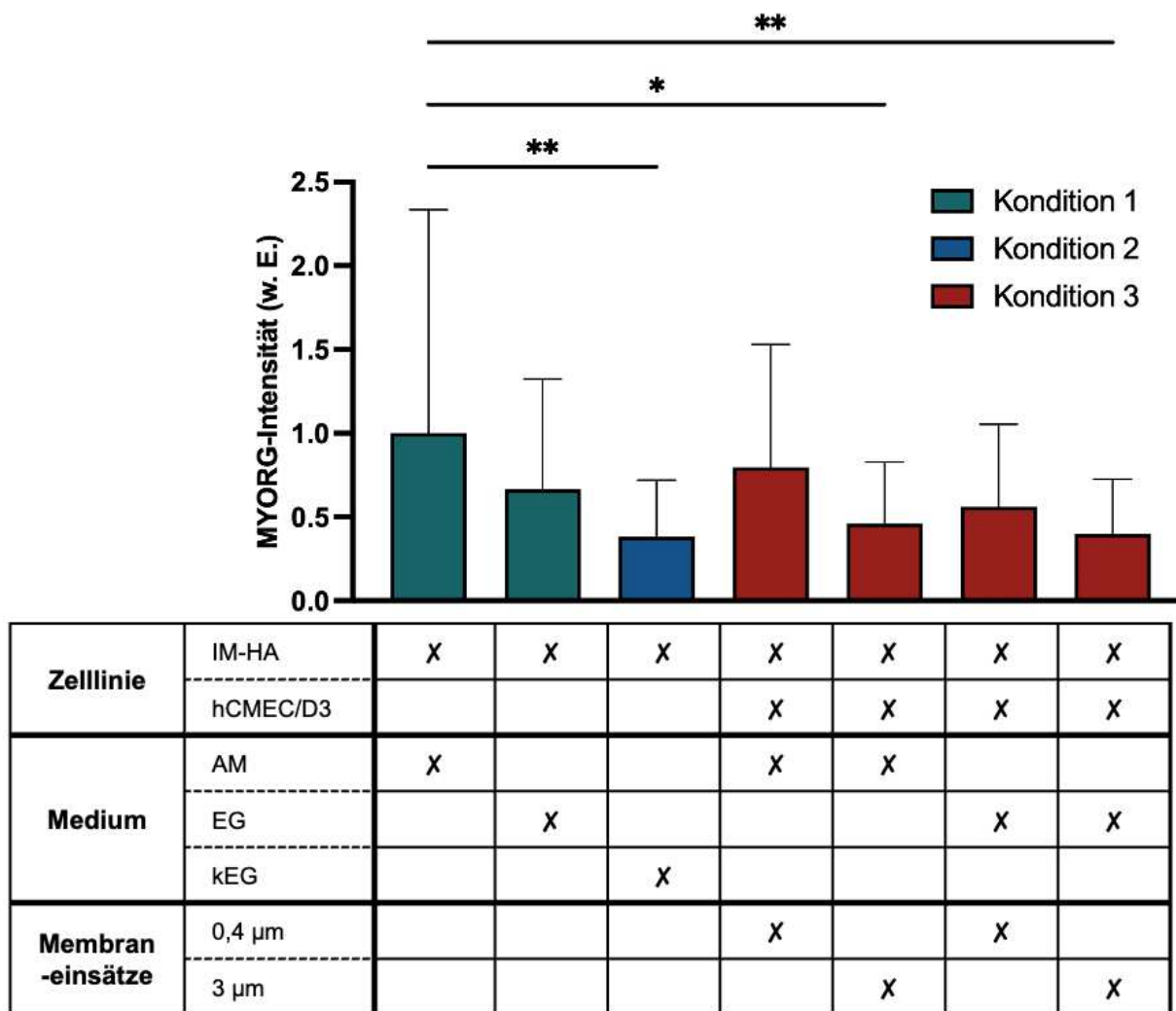


Abbildung 22: Analyse der MYORG-Fluoreszenzintensität

Dargestellt ist die MYORG-Fluoreszenzintensität pro Zelle in einer willkürlichen Einheit in den Konditionen 1, 2 und 3. Die Normalisierung der Werte erfolgte an den IM-HAs in AM (Kondition 1). Die statistische Analyse wurde mit one-way ANOVA durchgeführt. Zur Korrektur der Alpha-Kumulation wurde der Tukey-Test angewandt. (n = 30–34 separate Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten; Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung; *p < 0.05, **p < 0.01, nicht signifikante Unterschiede wurden nicht markiert)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kontrollkondition sowohl bezüglich der nukleären und zellulären Fläche als auch betreffend der GFAP- und MYORG-Fluoreszenzintensität stets zu den Konditionen mit den höchsten Werten gehörte und sich damit teilweise signifikant von den anderen Konditionen abhob. Die betrachteten Parameter wie ein alternatives (Kondition 1, EG) oder vorbehandeltes Medium (Kondition 2) sowie auch die Kultivierung der Astrozyten in Co-Kulturen mit Endothelzellen (Kondition 3) schienen gegenüber der Kontrollkondition demnach keinen positiven Einfluss auf die untersuchten Faktoren vorzuweisen.

Innerhalb der Co-Kultur-Konditionen zeigte sich bei der nukleären Fläche, dass kleinere Porendurchmesser zu signifikant größeren, nukleären Flächen beitrugen. Zumal für diese Zusammenhänge betreffend der zellulären Fläche sowie der GFAP- und MYORG-Fluoreszenzintensität nur vereinzelt signifikante Unterschiede erkennbar waren, ist in der Tendenz doch zu erkennen, dass ein kleinerer Porendurchmesser von 0,4 μm zu höheren Werten führte. Ein, über alle Versuche hinweg bestehender, Einfluss des verwendeten Mediums in der Co-Kultur konnte dabei nicht beschrieben werden.

4.2.5 Quantitative Proteinanalytik der Co-Kulturen

Die quantitative Proteinanalytik erfolgte an den Konditionen 1 bis 5, wie sie in *Kapitel 4.2.2* beschrieben sind. Bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse in der Kondition 5 gilt es, zu berücksichtigen, dass eine direkte Co-Kultur von IM-HAs und hCMEC/D3 vorliegt. Somit wird im Gegensatz zu allen anderen Konditionen das Proteinlysate von zwei unterschiedlichen Zelltypen analysiert.

4.2.5.1 Astrozytäre Marker: ALDH1L1, GFAP und SOX9

Zur weiteren Evaluation der astrozytären Entwicklung in den unterschiedlichen Konditionen der Co-Kultur wurden Western Blots mit den astrozytären Reifemarkern ALDH1L1, GFAP und SOX9 durchgeführt. Grund hierfür war, dass analog zu den Analysen der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ein, durch die wechselseitigen Interaktionen der Astrozyten und Endothelzellen bedingter, Anstieg der Markerexpression vermutet wurde. Ein solcher Unterschied konnte bereits für Endothelzellmarker wie Occludin, Claudin 5 oder Zonula Occludens-1 (ZO-1) beschrieben werden (Helms et al. 2016). Entsprechende quantitative Proteinanalysen von Astrozyten sind bis jetzt nicht beschrieben und sollen in den nächsten Abschnitten geliefert werden.

Nach der Kultivierung der unterschiedlichen Konditionen für 7 Tage erfolgte die Gewinnung des Proteinlysats sowie der darauffolgende Western Blot entsprechend der *Kapitel 3.4.1* und *3.4.2*. Im nächsten Schritt wurde die Proteinkonzentration der Banden bestimmt und auf die Gesamtproteinmenge sowie die Kontrollkondition (IM-HA in AM) normalisiert.

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse des Western Blots für ALDH1L1. Es gab keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollkondition (IM-HAs in AM) in der Analyse. Für die Konditionen 2, 3 und 5 sowie für die IM-HAs in EG zeigten sich dennoch 1,82- bis 4,26-fach höhere Durchschnittswerte als für die Kontrollkondition. Für die hCMEC/D3 (0,04) war eine sehr geringe durchschnittliche Markerexpression für ALDH1L1 erkennbar und in der Kondition 4 schwankten die Expressionslevel, wobei (bei fehlender Signifikanz) für einen Porendurchmesser von 0,4 μm ein höherer Durchschnittswert vorlag als bei 3 μm (AM: 2,02 vs. 0,82; EG: 1,23 vs. 0,64). Wie zu erwarten war, zeigten die hCMEC/D3 damit eine sehr geringe ALDH1L1-Expression. Allerdings scheinen die hier verwendeten Variationen bezüglich des Zellkulturmediums und der Kultivierung in Co-Kulturen keinen signifikanten Einfluss auf die ALDH1L1-Expression der Astrozyten zu haben.

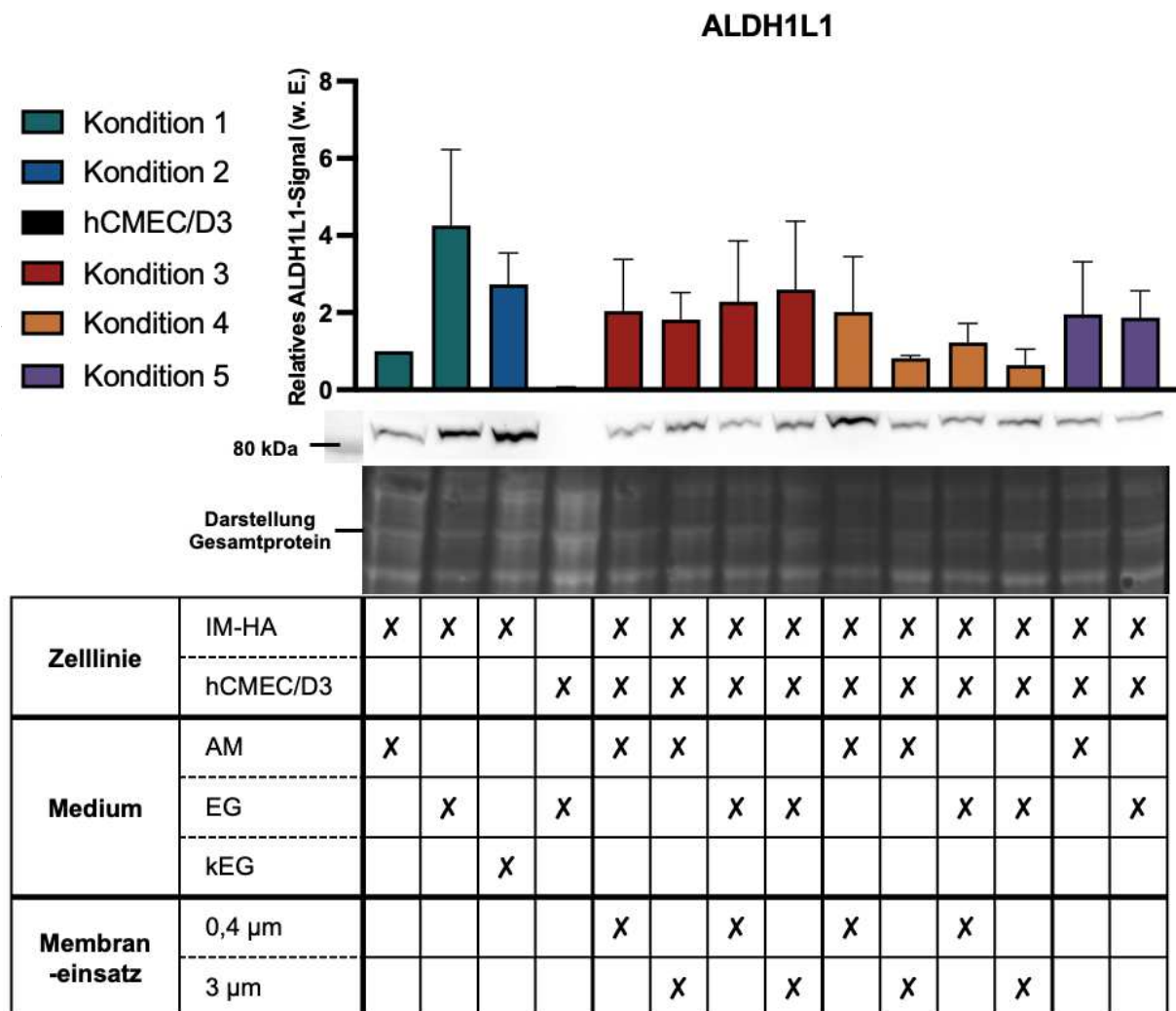


Abbildung 23: Quantitative Proteinanalyse von ALDH1L1

Darstellung der WB-Membran für ALDH1L1, der zugehörigen relativen Proteinquantifizierung sowie einer Färbung für das Gesamtprotein, die eine Normalisierung der Werte ermöglichte. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. (n = 2-3 separate Membranen aus 2-3 unabhängigen Experimenten, Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung; nicht signifikante Unterschiede wurden nicht

Auch für GFAP, dessen Expressionslevel in *Abbildung 24* dargestellt wird, lagen keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollkondition (IM-HAs in AM) in der Analyse vor. Für die Konditionen 3 und 4 in AM zeigte sich eine auffallend hohe Markerexpression (3,15 – 9,55) im Vergleich zur Kontrollkondition (1), während für die übrigen Konditionen keine klaren Unterschiede erkennbar waren. Auch für GFAP zeigten die hCMEC/D3 eine kaum vorhandene Expression von 0,34. Allerdings schienen die hier verwendeten Variationen bezüglich des Zellkulturmediums und der Kultivierung in Co-Kulturen keinen signifikanten Einfluss auf die GFAP-Expression der Astrozyten zu haben.

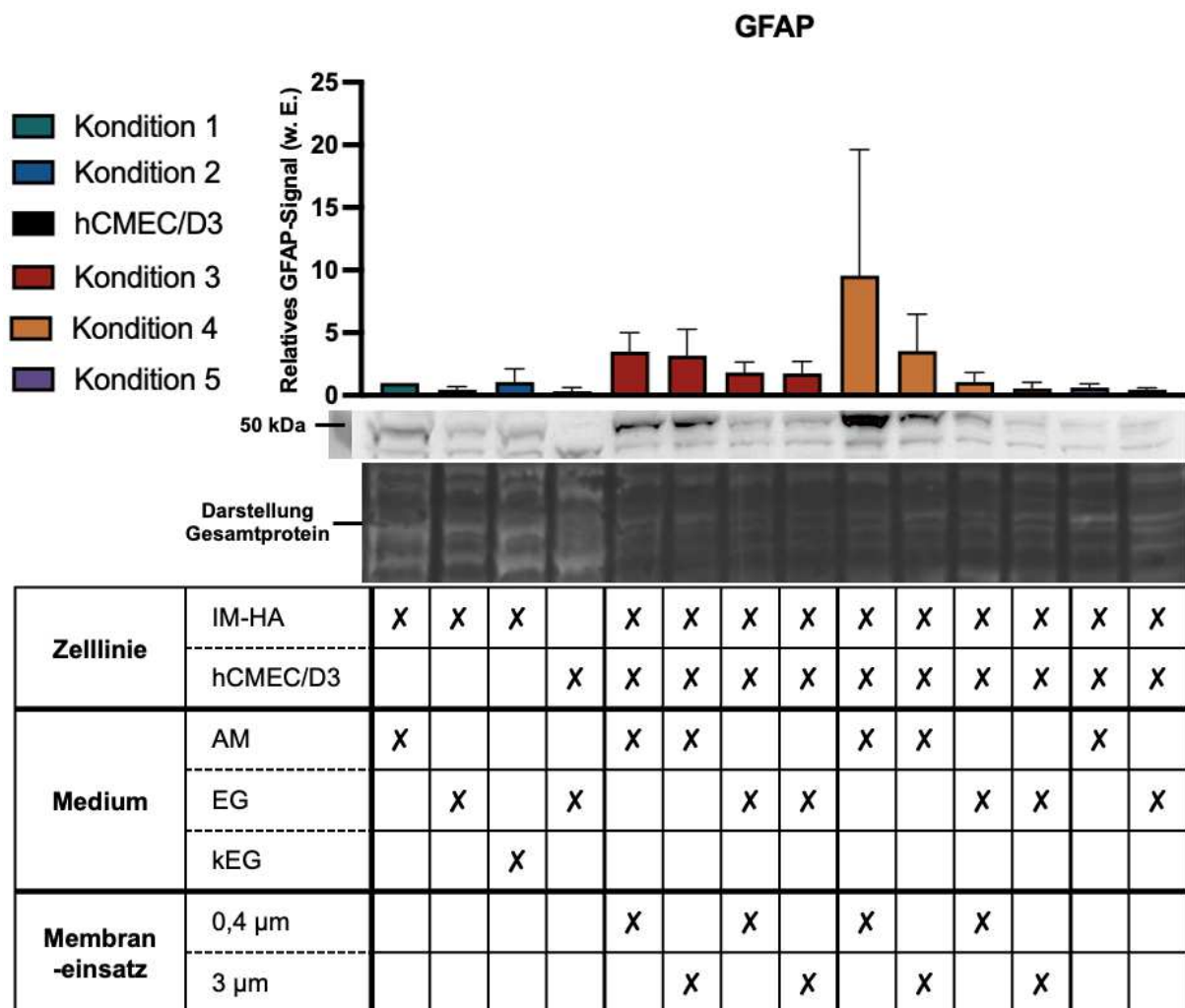


Abbildung 24: Quantitative Proteinanalyse von GFAP

Darstellung der WB-Membran für GFAP, der zugehörigen relativen Proteinquantifizierung sowie einer Färbung für das Gesamtprotein, die eine Normalisierung der Werte ermöglichte. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. (n = 3-5 separate Membranen aus 2-3 unabhängigen Experimenten, Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung, nicht signifikante Unterschiede wurden nicht markiert)

Bezüglich der SOX9-Expression (siehe *Abbildung 25*) konnten für einige Kombinationen der Konditionen 3 und 4 signifikante Unterschiede zur Kontrollkondition (IM-HAs in AM) festgestellt werden. Diese wiesen eine 10- bis 33-fach höhere SOX9-Expression auf als die Kontrollkondition. Dabei fiel eine besonders geringe Expression der IM-HAs in AM für SOX9 (1) auf, die sogar unter dem Level der hCMEC/D3 (3,12) lag (nicht signifikant). Die weiteren Kombinationen für die Konditionen 1, 2 und 5 wiesen ebenfalls eine vergleichsweise geringe SOX9-Expression (3,34 – 5,23) auf. Demnach führte die Kultivierung von IM-HAs mit hCMEC/D3 unter Verwendung von Polyestermembraneinsätzen in bestimmten Fällen (AM: 3 µm unabhängig von Zellausplattierung; EG: 0,4 µm, IM-HAs auf Zellkulturplatte ausplattiert) zu einer signifikanten Zunahme der SOX9-Expression.

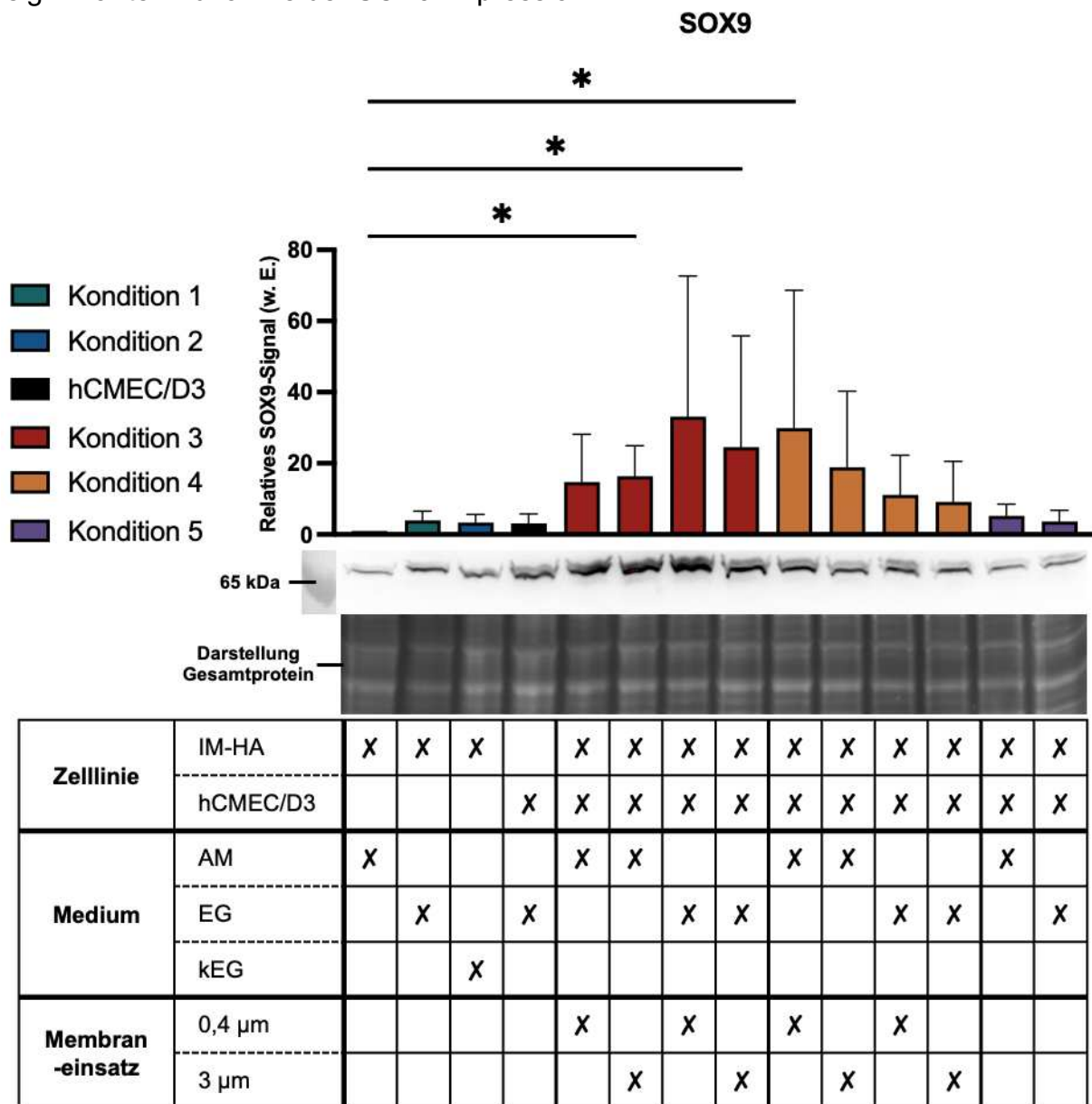


Abbildung 25: Quantitative Proteinanalyse von SOX9

Darstellung der WB-Membran für SOX9, der zugehörigen relativen Proteinquantifizierung sowie einer Färbung für das Gesamtprotein, die eine Normalisierung der Werte ermöglichte. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. (n = 3-4 separate Membranen aus 2-3 unabhängigen Experimenten, Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung, *p < 0.05)

4.2.5.2 MYORG

Zur Analyse der MYORG-Expression in den unterschiedlichen Konditionen der Co-Kultur wurden Western Blots mit einem MYORG-Antikörper durchgeführt. Nach der Kultivierung der unterschiedlichen Konditionen für 7 Tage erfolgte die Gewinnung des Proteinlysats sowie der darauffolgende Western Blot entsprechend den *Kapiteln 3.4.1* und *3.4.2*. Im nächsten Schritt wurde die Proteinkonzentration der Banden bestimmt und auf die Gesamtproteinmenge sowie die Kontrollkondition (IM-HA in AM) normalisiert.

Die quantitative Proteinanalyse von MYORG ist in *Abbildung 26* dargestellt. Auf der Membran des Western Blots waren drei Banden zu erkennen, die eine Molekülmasse zwischen 80 und 65 kDa aufwiesen. MYORG hat eine Molekülmasse von etwa 81 kDa. Je nach Bedingung sind die Banden unterschiedlich gut erkennbar, allerdings scheint eine klare Antikörperbindung an dem vorhandenen Protein stattgefunden zu haben. Aufgrund dessen wurden alle dargestellten Banden in die Quantifizierung impliziert.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollkondition (IM-HAs in AM), allerdings sind einige Tendenzen erkennbar, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden. Die Konditionen 3 und 4 wiesen im Vergleich zur Kontrollkondition eine 2,68 bis 5,59-fach höhere MYORG-Expression auf. Die übrigen Konditionen zeigten eine recht geringe MYORG-Expression, die sich in einem ähnlichen Bereich wie die der Kontrollkondition befand (1,21 – 2,02). Somit ergab sich kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Konditionen auf die MYORG-Expression von Astrozyten.

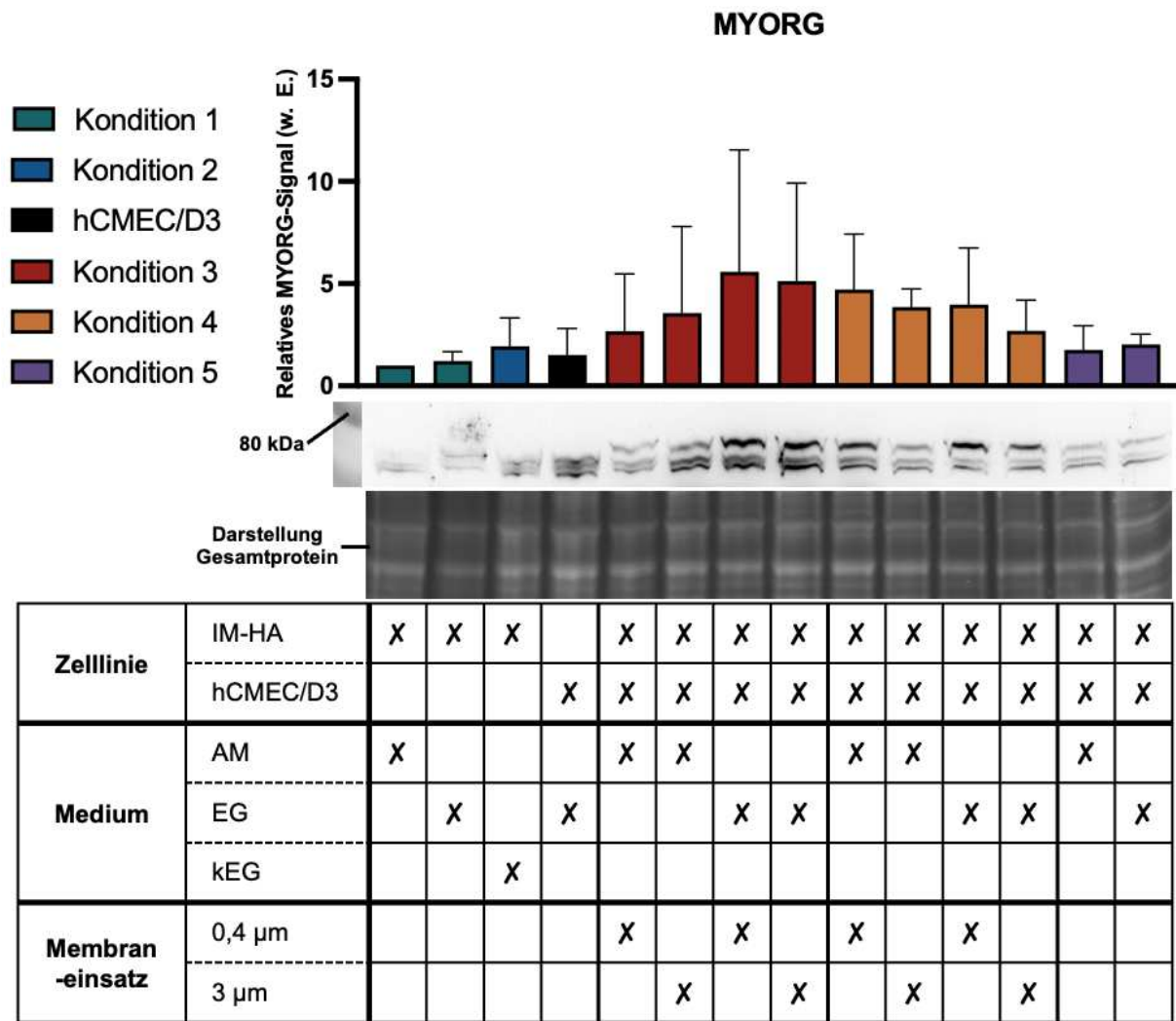


Abbildung 26: Quantitative Proteinanalyse von MYORG

Darstellung der WB-Membran für MYORG, der zugehörigen relativen Proteinquantifizierung sowie einer Färbung für das Gesamtprotein, die eine Normalisierung der Werte ermöglichte. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. (n = 3-4 separate Membranen aus 2-3 unabhängigen Experimenten, Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung)

4.2.5.3 CD31

Zur Bewertung des Vorhandenseins bzw. des Übertritts von hCMEC/D3 in das astrozytäre Kompartiment der unterschiedlichen Co-Kultur-Konditionen wurden Western Blots mit einem Cluster of Differentiation 31 (CD31)-Antikörper, auch bekannt als Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 [PECAM-1])-Antikörper, durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen spezifischen Marker für Endothelzellen. Die Proteinkonzentration der Banden wurde bestimmt und daraufhin auf die Gesamtproteinmenge sowie die Kontrollkondition (hCMEC in EG) normalisiert.

Wie in *Abbildung 27* zu sehen ist, zeigte die Kontrollkondition (hCMEC/D3 in EG) eine besonders hohe CD31-Expression (1). Für die ersten beiden Konditionen waren kaum Banden (Mittelwerte < 0,02) zu erkennen und es bestand zudem ein signifikanter Unterschied zur Kontrollkondition. Auch für alle Kombinationen der Kondition 3, Kondition 4 in EG mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm und Kondition 5 in AM ließen sich kaum Banden erkennen (Mittelwerte < 0,06; nur einzelne Unterschiede sind signifikant). Für die übrigen Kombinationen der Konditionen 4 und 5 waren klare Banden erkennbar (0,21–0,47). Zusammenfassend konnte damit in einzelnen Kombinationen der Konditionen 4 und 5 hCMEC/D3 nachgewiesen werden. In den Konditionen 1, 2 und 3 lagen keine oder nur sehr geringe Mengen der hCMEC/D3 vor.

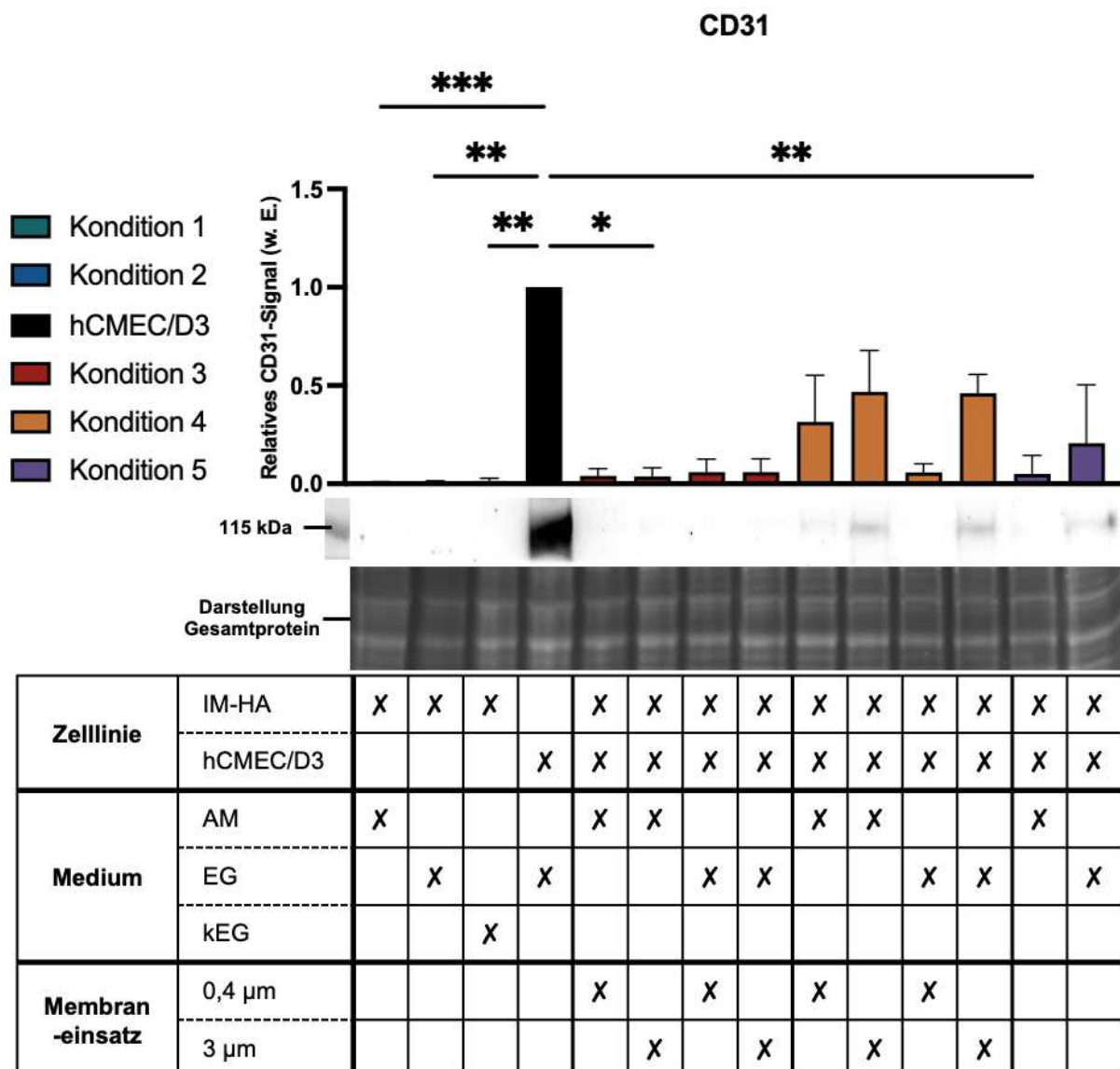


Abbildung 27: Quantitative Proteinanalyse von CD31

Darstellung der WB-Membran für CD31, der zugehörigen relativen Proteinquantifizierung sowie einer Färbung für das Gesamtprotein, die eine Normalisierung der Werte ermöglichte. Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. (n = 3-5 separate Membranen aus 2-3 unabhängigen Experimenten, Balkendiagramm: Durchschnittswerte + Standardabweichung, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

5 Diskussion

5.1 Evaluation von iAs aus hESCs mit einer p.W75*-Mutation in *MYORG*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Wildtyp-hESCs sowie solche mit einer p.W75*-Mutation im *MYORG*-Gen verwendet, um die Expression und Lokalisation von *MYORG* zu untersuchen. Bei der Mutation handelt es sich um eine Transition, die im transmembranen Fragment des Proteins an Stelle der Aminosäure Tryptophan (W) zur Ausbildung eines Stoppcodons (TGA) führt (s. *Abbildung 28*). Ob die p.W75*-Mutation erfolgreich in *MYORG* integriert wurde, inwiefern die anschließende Differenzierung der hESCs zu induzierten Astrozyten funktioniert und wie die Expression von *MYORG* in immunzytochemischen Färbungen der iAs zu bewerten ist, soll in den nächsten Abschnitten diskutiert werden.

5.1.1 Genotypisierung der hESCs

Die Ergebnisse der Genotypisierung bestätigen, dass die zwei *MYORG*-KO-Zelllinien eine p.W75*-Mutation enthalten und dass die Kontrollzelllinien die Mutation nicht enthalten. Lediglich die 10, in dem DNA-Abschnitt der 10G WT-Zelllinie vorliegenden, Fehlpaarungen sind kritisch zu bewerten. Diese könnten Resultat einer Verunreinigung sein, aber auch Mutationen widerspiegeln, welche sich im Verlauf der Einbringung der p.W75*-Mutation mittels CRISPR-Cas9 ausgebildet haben. Aufgrund der im Allgemeinen sehr hohen Übereinstimmung zur Referenz-DNA scheint es wahrscheinlicher, dass es sich um eine Verunreinigung handelt, welche sich im Verlauf der vielen Extraktions- und Aufreinigungsschritte ereignet hat. Verunreinigungen können beispielsweise durch kleine Stücke von genomischer DNA, die zugesetzten Primer oder durch unspezifische Amplikons bedingt sein.

5.1.2 Differenzierung der hESCs zu iAs

Die Differenzierung der hESCs zu iAs zeigt vielversprechende Resultate. Am Tag 15 des Protokolls von Canals et al. präsentieren sich die Zellen aller Zelllinien – zumindest morphologisch – mit typischen Charakteristika von Astrozyten. Die zu Beginn in Zellkolonien vorliegenden hESCs mit runder Zellform und großem Kern haben sich durch die Überexpression von Sox9 und Nfib und die Behandlung mit unterschiedlichen Medien und Faktoren augenscheinlich zu Astrozyten entwickelt. Zudem ergeben sich in der qualitativen Beurteilung einige Unterschiede in der Konfluenz der iAs sowie in der Größe der Zellkörper. Bei ansonsten gleichen Kulturbedingungen könnte dies auf einen, durch den *MYORG*-KO bedingten, Einfluss auf die Proliferation zurückzuführen sein.

Diese Aussagen lassen sich an dieser Stelle mit einigen Einschränkungen treffen, da hier lediglich eine qualitative Evaluation erfolgt ist. Für eine weitere Bestätigung der Ergebnisse gilt es, im nächsten Schritt nachzuweisen, dass nicht nur morphologisch, sondern auch funktionelle Astrozyten vorliegen. Neben der Quantifizierung astrozytärer Marker durch die Verwendung von immunzytochemischen Färbungen und Western Blots müssen somit auch funktionelle Testungen wie Calcium-Bildgebung oder Glutamataufnahme durchgeführt werden. Durch den Vergleich der oben genannten Parameter könnten weitere Unterschiede zwischen den vorliegenden Zelllinien beschrieben und dadurch auf die Auswirkungen eines MYORG-KOs bzw. die Funktion von MYORG geschlossen werden.

5.1.3 MYORG-Expression auch in iAs mit einer p.W75*-Mutation?

Die immunzytochemischen Färbungen der iAs zeigten eine Kolo-kalisation des ER-Markers Calnexin mit MYORG. Dies war zu erwarten und deckt sich mit den Beobachtungen von Yao et al. aus dem Jahre 2018. Fraglich ist hingegen der Nachweis von MYORG in den zwei KO-Zelllinien 2E hom und 12 hom. In diesen beiden Zelllinien wurde vor dem Versuch mittels einer Genotypisierung das Vorliegen einer p.W75*-Mutation bestätigt. Diese bedingt am DNA-Nukleotid 225 des MYORG-Genes eine Transition von Guanin zu Adenin, wodurch an dieser Stelle ein Stopcodon entsteht. Infolgedessen sollte MYORG nicht exprimiert werden und auch nicht anfärbbar sein. In der Fehlerbetrachtung kommen mehrere Begründungen in Betracht, die in dem folgenden Absatz diskutiert werden sollen.

Es besteht die Möglichkeit, dass trotz des eingebrachten Stoppcodons eine trunkierte Variante von MYORG exprimiert wird und folglich auch angefärbt werden kann. Die Mutation betrifft die 75. Aminosäure von MYORG und wie in der *Abbildung 28* dargestellt ist, erstreckt sich das transmembrane Fragment von MYORG bis zur Aminosäure 79. Demnach ist es fraglich, ob das trunkierte MYORG weiterhin eine Lokalisation in der Membran des ERs aufweisen würde, aber es kann nicht ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt stellt sich die Frage, wo sich das Epitop des MYORG-Antikörpers (Thermo Fisher Scientific, PA5-66926) befindet. Die Immunogensequenz des Antikörpers zeigt eine Spezifität gegenüber den Aminosäuren 169 bis 248 von MYORG. Da diese bei einer erfolgreichen Einbringung des Stopcodons gar nicht transkribiert werden sollten, erscheint es fraglich, woran der Antikörper im Rahmen der immunzytochemischen Färbungen gebunden hat. Eine Kreuzreaktion des MYORG-Antikörpers gegenüber einem anderen Protein, das im ER lokalisiert ist, kann dabei nicht ausgeschlossen werden und sollte anhand von weiteren MYORG-Antikörpern mit anderen Immunogensequenzen untersucht werden. Auch der Nachweis von MYORG im Western Blot bzw. die Untersuchung des Transkriptoms von Zelllinien mit einer p.W75*-Mutation in *MYORG* könnten Aufschluss über die immunzytochemischen Färbungen von MYORG in den iAs liefern.

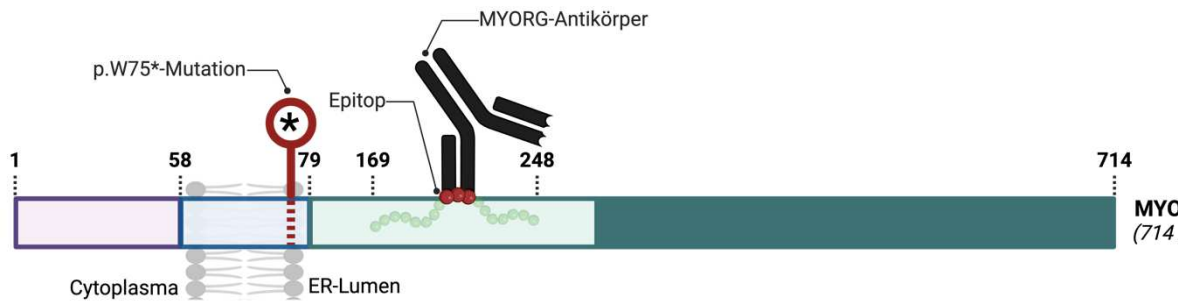


Abbildung 28: p.W75*-Mutation und Epitop des MYORG-Antikörpers CD31

Darstellung von MYORG mit der N-terminalen und C-terminalen Domäne sowie d transmembranen Fragment. Hervorgehoben ist die p.W75*-Mutation, die zur Ausbildung eir Stoppcodons im Bereich des transmembranen Fragmentes führt. Das Epitop des MYOF Antikörpers (Thermo Fisher Scientific, PA5-66926) befindet sich im Bereich der Aminosäui 169 bis 248 der C-terminalen Domäne. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

erfolgreiche Einbringung der p.W75*-Mutation demonstriert wurde und somit eine Bindung des MYORG-Antikörpers am entsprechenden Epitop (AS 169–248) sehr unplausibel erscheint. Wahrscheinlicher ist es, dass der MYORG-Antikörper unspezifisch war und eine Kreuzreaktion zu einem anderen, im ER exprimierten, Protein aufwies. Zur endgültigen Einordnung der Ergebnisse wird es nötig werden, die Spezifität des Antikörpers entsprechend dem oben geschilderten Vorgehen zu prüfen.

5.2 In-vitro BHS-Modell: Etablierung und Limitationen

Wie bereits im *Kapitel 4.2.1* erläutert wurde, soll im Rahmen dieser Arbeit ein in-vitro BHS-Modell unter Verwendung von IM-HAs sowie hCMEC/D3 etabliert werden. Anhand von Proliferationsanalysen sowie einer Literaturrecherche wurden dabei unterschiedliche Konditionen erarbeitet. Die Auswahl der Zellkulturmedien, Ausplattierungsdichten und Konditionen sowie die Vorteile und Limitationen des gewählten BHS-Modells sollen in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

5.2.1 Zellkulturmedien, Ausplattierungsdichte und Konditionen

Zunächst stellte sich die Frage, welches Zellkulturmedium verwendet werden soll. Da hier mit zwei unterschiedlichen Zelllinien gearbeitet wird und diese für die optimale Kultivierung verschiedene Medienzusammensetzungen benötigen, wurden hier die drei verschiedenen Medien AM, EG und EM bezüglich ihres Einflusses auf die Proliferation von IM-HAs verglichen (s. *Abbildung 15*). Bei AM handelt es sich um ein speziell für IM-HAs entwickeltes Medium, während EG und EM für die Kultivierung von immortalisierten Endothelzellen optimiert sind. Zusätzlich zum Vergleich der drei Zellkulturmedien wurde in *Abbildung 16* der Einfluss von konditioniertem Medium als weitere Kondition untersucht. Dabei handelt es sich um eine 1:1-Mischung aus frischem EG bzw. EM mit den entsprechenden Medien, die zuvor für die Kultivierung von Endothelzellen genutzt wurden. Dabei sollte untersucht werden, ob die im konditionierten Medium enthaltenen, löslichen, von den Endothelzellen sezernierten Faktoren einen Einfluss auf die Proliferation von IM-HAs haben.

In den Proliferationsanalysen zeigte sich, dass IM-HAs nach 72 Stunden der Kultivierung in EG gegenüber denen in EM eine signifikant höhere Zellzahl aufwiesen (s. *Abbildung 15*). EG ist im Aspekt der Proliferation dem EM überlegen und scheint ein geeigneteres Milieu für das Wachstum der IM-HAs zu schaffen. Für den Vergleich von frischen zum konditionierten Medium zeigte sich kein anhaltend signifikanter Unterschied, wobei die Proliferationskurven der konditionierten Medien einen flacheren Verlauf hatten. Somit scheinen die löslichen, von den hCMEC/D3 sezernierten Faktoren keinen positiven Einfluss auf die Proliferation von IM-HAs zu haben. Es erscheint sogar plausibler, dass der Teil des konditionierten Mediums, der zuvor zur Kultivierung von hCMEC/D3 genutzt wurde, weniger Faktoren und Nährstoffe enthält und somit eine schlechtere Grundlage für das Wachstum der IM-HAs darstellt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde EM als Zellkulturmedium für die folgenden Experimente ausgeschlossen. Dadurch konnte der experimentelle Aufwand deutlich reduziert werden und mit EG liegt weiterhin ein alternatives Zellkulturmedium vor, welches für Vergleiche mit dem, speziell für IM-HAs entwickelten, AM herangezogen werden konnte. Das kEG wurde als Kondition beibehalten. Es hat zwar keinen

maßgeblichen Einfluss auf die Proliferation der IM-HAs, könnte aber trotzdem die Proteinexpression modulieren.

Neben dem Zellkulturmedium sollten auch die optimale Ausplattierungsdichte sowie das Verhältnis von Endothelzellen zu Astrozyten ermittelt werden. Wie in der *Tabelle 28* zu sehen ist, schwanken diese maßgeblich in den unterschiedlichen BHS-Modellen und in den meisten Fällen wird eine höhere Zahl an Endothelzellen ausplattiert. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus der Untersuchung allerdings auf den IM-HAs und spezifischer sollten Analysen bezüglich der Morphologie und der Markerexpression mit Methoden wie Immunzytochemie und Western Blots erfolgen. Es sollte zunächst keine Testung der Barrierefunktion durch Messung der Permeabilität oder des transendothelialen, elektrischen Widerstands (transendothelial electrical resistance [TEER]), wie sie beispielsweise bei Kulczar et al., Barberio et al. oder Bolden et al. im Fokus stand, durchgeführt werden. Deswegen wurde, ähnlich wie bei Stone et al. oder Kim et al., bewusst darauf gesetzt, ein Verhältnis von etwa 1:5 (Endothelzellen zu Astrozyten) zu wählen. Zudem wurde für die immunzytochemischen Analysen eine geringere Ausplattierungsdichte angestrebt, um einer zu hohen Zelldichte am Ende des Experiments entgegenzuwirken. Ziel des Versuchsaufbaus war es, genügend IM-HAs für die mikroskopischen Analysen zu haben, ohne jedoch das Auffinden einzelner Zellen aufgrund einer zu hohen Zelldichte zu erschweren.

Der Vergleich erfolgte für die Ausplattierungsdichten von 4000, 5500 und 7000 Zellen/ μm^2 und ist in *Abbildung 17* dargestellt. IM-HAs weisen bei einer Ausplattierungsdichte von 5500 Zellen/ μm^2 eine signifikant höhere Proliferation als bei einer Ausplattierungsdichte von 4000 Zellen/ μm^2 auf. Zwischen den Ausplattierungsdichten von 5500 und 7000 Zellen/ μm^2 konnte hingegen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Dies kann dadurch begründet werden, dass eine zu geringe Zelldichte in einem Mangel an Zell-Zell-Interaktionen resultieren kann. Diese Zell-Zell-Interaktionen sind grundlegend für das Wachstum von Zellen (Karvinen und Kellomäki 2023). Eine zu hohe Zelldichte kann durch einen Mangel an Nährstoffen, aber auch durch von den Zellen sezernierte Faktoren dazu führen, dass ein weiteres Wachstum limitiert wird (Chang 2011). Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass für die folgenden Experimente und insbesondere die immunzytochemischen Färbungen eine Ausplattierungsdichte von 5500 Zellen/ μm^2 verwendet werden sollte. Für die Untersuchungen der Proteinexpression im Western Blot wurde eine Ausplattierungsdichte von 16500 Zellen/ μm^2 gewählt, um ausreichend Proteinlysate zu erhalten. Für die hCMEC/D3 ergibt sich bei einem Verhältnis von 1:5 (Endothelzellen zu Astrozyten) eine Ausplattierungsdichte von 1100 (Immunzytochemie) bzw. 3300 Zellen/ μm^2 (Western Blot).

5.2.2 Vorteile und Limitationen des in-vitro BHS-Modells

In-vitro BHS-Modelle haben sich im Laufe der letzten 50 Jahre sukzessive weiterentwickelt und sich als wertvolle Ergänzung zur Erforschung physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in der BHS sowie der Entwicklung ZNS-gängiger Medikamente herausgestellt (Helms et al. 2016). Auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Co-Kultur-Konditionen sollen dazu beitragen, ein tieferes Verständnis der BHS und der daran beteiligten Zellen zu erlangen. Nichtsdestotrotz wird bei der Reduzierung solch hochkomplexer Strukturen auf einige wenige Aspekte zwangsläufig ein stark vereinfachtes Modell geschaffen, das nicht ohne Einschränkungen betrachtet werden sollte. Einige dieser Limitationen des erarbeiteten BHS-Modells bzw. auch der übrigen Konditionen sollen im Folgenden benannt und erläutert werden.

Zur Etablierung des in-vitro BHS-Modells wurden die immortalisierten Zelllinien IM-HA und hCMEC/D3 verwendet. Diese haben gegenüber primären Zellen den Vorteil, dass sie leichter gewonnen und kultiviert werden können. Bei immortalisierten Zelllinien handelt es sich um umfassend charakterisierte, genetisch identische und homogene Zellpopulationen, die eine optimale Grundlage für gleichbleibende Versuchsbedingungen und reproduzierbare Ergebnisse liefern. Sie weisen hohe Proliferationsraten auf, sodass Versuche einfach und schnell wiederholt werden können. Zudem sind keine langwierigen und komplexen Vorbehandlungen nötig, wie sie teils bei der Kultivierung und Differenzierung von Stammzellen erforderlich werden. Dennoch erfolgen genetische Modifikationen an immortalisierten Zelllinien, weswegen sich diese wesentlich von Zelltypen, die in vivo vorgefunden werden, abheben können. Ein Beispiel hierfür ist die vergleichsweise geringe Barrierefunktion, die hCMEC/D3 gegenüber aus Stammzellen abgeleiteten Modellen aufweisen. (Carter und Shieh 2015; Helms et al. 2016)

Für die Kompartimentierung der Zellkulturplatte und die Generierung eines 3D-BHS-Modells wurden Transwell-Polyestermembraneinsätze verwendet. Diese gehören zu den statischen Modellen und zeichnen sich durch eine einfache Handhabung und hohe Kosteneffizienz aus, ermöglichen eine fortlaufende, nicht-destruktive Mikroskopie und ermöglichen funktionelle Testungen wie z. B. Permeabilitätsuntersuchungen und TEER. Ein großer Nachteil der Polyestermembraneinsätze ist jedoch, dass keine Scherspannung auf die Endothelzellen ausgeübt wird. In diesem Aspekt erweisen sich dynamische Modelle als vorteilhaft. (He et al. 2014)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das verwendete Co-Kultur-Modell aus immortalisierten Zelllinien und unter der Verwendung von Transwell-Polyestermembraneinsätzen eine Vielzahl an Vorteilen bietet und sich im Rahmen dieser Arbeit insbesondere aufgrund einer guten Reproduzierbarkeit und einfachen Handhabung eignet. Dennoch sollte die Notwendigkeit von Anpassungen im Versuchsaufbau, wie z. B. durch die Verwendung von primären Zellkulturen oder von dynamischen Modellen, fortlaufend evaluiert werden.

5.3 In-vitro BHS-Modell: Einordnung der Analysen

5.3.1 Analyse der nukleären und zellulären Fläche der IM-HAs

Alterationen in der nukleären und zellulären Fläche können unter anderem auf die Zelldifferenzierung, -entwicklung und -krankheit zurückgeführt werden (Jevtić et al. 2014; Zhou et al. 2019). Beispielsweise ergaben Untersuchungen der astrozytären Morphologie, dass neurodegenerative Erkrankungen wie Chorea Huntington unter anderem durch Einbußen in der Komplexität der astrozytären Zellfortsätze zu einer Verringerung des Volumens der Astrozyten beitragen können (Zhou et al. 2019). Mit diesem Hintergrund wurden auch in dieser Arbeit Analysen der zellulären und nukleären Fläche der IM-HAs durchgeführt.

Die Ergebnisse der Oberflächenanalysen ergeben, dass die Kontrollkondition stets zu den Konditionen mit den höchsten Werten gehört und sich bezüglich der nukleären Fläche sogar signifikant von allen anderen Konditionen abhebt. Weiterhin kann beobachtet werden, dass unbehandeltes Medium gegenüber dem konditionierten Medium und kleine Porendurchmesser von 0,4 μm gegenüber einem Porendurchmesser von 3 μm zu größeren zellulären und nukleären Flächen führen. Zur Einordnung dieser Ergebnisse soll ein Vergleich zwischen der Kontrollkondition, die sehr hohe nukleäre und zelluläre Flächen aufweist, und der Kondition 2 (kEG), die stets zu den Konditionen mit der geringsten zellulären Fläche gehört, erfolgen. Die Kondition 2 erwies sich bereits im Rahmen der Proliferationsanalysen gegenüber den anderen Konditionen als unterlegen (nicht signifikant) und zeigt auch bezüglich der MYORG-Fluoreszenzintensität signifikant geringere Werte als die Kontrollkondition. Somit scheint es möglich, dass analog den Beobachtungen von Zhou et al. bezüglich neurodegenerativer Erkrankungen auch hier eine geringere zelluläre bzw. nukleäre Fläche auf Einbußen in der Nährstoffversorgung bzw. den Kultivierungsbedingungen der Astrozyten zurückzuführen ist.

Bezogen auf alle Konditionen bedeutet dies, dass konditioniertes Medium sowie ein größerer Porendurchmesser von 3 μm zu schlechteren Kultivierungsbedingungen führen. Beim konditionierten Medium scheint die Vorbehandlung des Mediums eine plausible Erklärung zu liefern. Durch die Verwendung von EG, welches zuvor für ein bis zwei Tage für die Kultivierung von hCMEC/D3 genutzt wurde, sollte untersucht werden, wie sich die von den Endothelzellen sezernierten löslichen Faktoren auf die IM-HAs auswirken. Um den Nährstoffverbrauch, der in diesen Tagen in dem Medium stattfindet, auszugleichen, wurde frisches Medium in einem Verhältnis von 1:1 beigemischt. Möglicherweise hat die Menge an Nährstoffen in dem konditionierten Medium nicht genügt, um eine ausreichende Versorgung der IM-HAs zu gewährleisten, oder lösliche, von den hCMEC/D3 ausgeschüttete Faktoren haben sich negativ auf das Wachstum der IM-HAs ausgewirkt. Auch weitere Veränderungen des Mediums durch die Vorbehandlung, wie z. B. Unterschiede im pH-Wert, kommen als Erklärung in Frage.

Der durch die Porengrößen von 0,4 bzw. 3 µm bedingte Unterschied in der zellulären bzw. nukleären Oberfläche ist am ehesten durch einen indirekten Einfluss der hCMEC/D3 auf die IM-HAs erklärbar. Die IM-HAs wurden unabhängig von der Porengröße auf dem Boden der Zellkulturplatte ausplattiert und zwischen dem Boden und dem Polyestermembraneinsatz besteht kein direkter Kontakt. Die Ausplattierung der hCMEC/D3 erfolgte dann auf der Oberseite des Membraneinsatzes. Die durchschnittliche Endothelzelle ist 50–70 µm lang, 10–30 µm breit und 0,1–10 µm dick, sodass sowohl bei einer Porengröße von 0,4 als auch bei einer von 3 µm keine Penetration der Zellen durch die Polyestermembran zu erwarten ist (Félétou 2011). Auch die Ergebnisse des Western Blots für den Endothelzellmarker CD-31 in *Abbildung 27* bestätigen diese Aussage. Wie genau dieser indirekte Einfluss durch die hCMEC/D3 ausgeübt wird, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Es ist möglich, dass eine der beiden Porengrößen bessere Bedingungen für das Wachstum der hCMEC/D3 bieten und dadurch die Zunahme der nukleären und zellulären Fläche der IM-HAs unterstützen. Auf der anderen Seite kann es auch sein, dass die Co-Kultur mit den hCMEC/D3 in diesem Versuchsaufbau zur Abnahme der nukleären und zellulären Fläche der IM-HAs beiträgt und somit die gegenteilige Wechselbeziehung vorliegt. Um diese Frage beantworten zu können, wären weitere Experimente nötig, die eine Evaluation des Wachstums der hCMEC/D3 auf den Membraneinsätzen abhängig von der Porengröße ermöglichen.

5.3.2 Quantitative Proteinanalytik

Eine Verbesserung struktureller und funktioneller Parameter für 3D-BHS-Modelle gegenüber einer 2D-Monokultur von Endothelzellen ist vielfach beschrieben (Hatherell et al. 2011; Kim et al. 2022). Der Fokus dieser Untersuchungen lag in der Regel auf Endothelzellmarkern wie Occludin und Claudin-5 oder der Testung der Barrierefunktion durch Permeabilitätsuntersuchungen sowie der Messung des TEER (Helms et al. 2016; Rice et al. 2022). Obwohl Astrozyten in den 3D-BHS-Modellen regelhafter eingesetzt werden, wurden diese bis jetzt noch nicht näher charakterisiert. Aufgrund dessen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Proteinanalyse bezüglich der astrozytären Reifemarker ALDH1L1, GFAP, SOX9, des im Fokus dieser Arbeit stehenden Proteins MYORG und des Endothelzellmarkers CD31.

5.3.2.1 Analyse der GFAP- und MYORG-Fluoreszenzintensität

Im Rahmen der Fluoreszenzintensitätsmessungen zeigt sich analog zu der Analyse der nukleären und zellulären Fläche der IM-HAs, dass die Kontrollkondition sowohl betreffend des GFAP- als auch des MYORG-Signals stets die Kondition mit den höchsten Werten ist. Teilweise können signifikante Unterschiede im Vergleich zu den anderen Konditionen beobachtet werden. Bei der Analyse der übrigen Parameter wie ein alternatives (EG) oder vorbehandeltes Zellkulturmedium (kEG) oder auch die Kultivierung der Astrozyten in Co-Kulturen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Dennoch ist in der Tendenz erneut zu erkennen, dass eine Vorbehandlung des Mediums und auch eine größere Porengröße von 3 µm zu einer

Verringerung der Signalstärke beitragen. Mögliche Interpretationen dieser Beobachtung können dem *Kapitel 5.3.1* entnommen werden.

5.3.2.2 Astrozytäre Reifemarker: ALDH1L1, GFAP und SOX9

Die Ergebnisse der quantitativen Proteinanalyse der astrozytären Reifemarker zeigen ein inkonsistentes Bild mit nur wenigen signifikanten Unterschieden. Die Kultivierung der IM-HAs in EG scheint keinen maßgeblichen Einfluss auf die Reifung der Astrozyten zu haben. Zwar zeigt sich für ALDH1L1 eine nicht signifikante, erhöhte Markerexpression, allerdings ist für GFAP ein geringeres Signal im Vergleich zur Kontrollkondition ersichtlich und für SOX9 zeigt sich nur eine geringfügige Erhöhung. Ähnliches kann für das vorbehandelte Zellkulturmedium kEG beschrieben werden. Insbesondere beim Vergleich des EG mit kEG zeigen sich nur minimale Unterschiede, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine Vorbehandlung des Mediums ebenfalls keinen Einfluss auf die astrozytäre Reifung hat. Für die hCMEC/D3 wird keine Expression der astrozytären Marker erwartet, was sich für ALDH1L1 und GFAP auch bestätigt. Lediglich für SOX9 scheint eine Expression vorzuliegen, die kritisch zu bewerten ist.

Für die Kondition 3, also die Co-Kultur, bei der IM-HAs auf der Oberseite der Polyestermembraneinsätze und hCMEC/D3 am Boden der Zellkulturplatte ausplattiert werden, zeigt sich im Vergleich zur Kontrollkondition eine durchweg höhere Markerexpression für die drei astrozytären Reifemarker. Vereinzelt liegen für SOX9 sogar signifikante Unterschiede zur Kontrollkondition vor. Demnach ist davon auszugehen, dass die Kultivierung der Astrozyten in einer Co-Kultur mit Endothelzellen das Potential hat, positiv zur Reifung von Astrozyten beizutragen. Ähnliches lässt sich auch für die erste Subkondition der Kondition 4 (IM-HAs der Oberseite und hCMEC/D3 an der Unterseite des Polyestermembraneinsatzes mit einer Porengröße von 0,4 µm in EM) beobachten. Die restlichen drei Subkonditionen der Kondition 4 sowie die direkten Co-Kulturen in Kondition 5 lassen hierbei keinen klaren Trend im Vergleich zur Kontrollkondition erkennen.

Auch beim Vergleich der Konditionen 3, 4 und 5, die alle eine Co-Kultur von IM-HAs und hCMED/D3 enthalten und bei denen der Grad der möglichen Interaktionen zwischen beiden Zelltypen mit aufsteigender Zahl zunimmt, wurde keine klare Tendenz beobachtet. Dementsprechend scheint der direkte Zellkontakt im Vergleich zu einer räumlichen Trennung durch Polyestermembraneinsätze sowie auch die Porengröße der Membraneinsätze in diesem Versuch keinen erkennbaren Vorteil für die Expression von astrozytären Reifemarkern zu haben.

5.3.2.3 MYORG

Der Nachweis von MYORG im Western Blot erwies sich in unserer Arbeitsgruppe als besondere Herausforderung. Als Ursache dafür kam unter anderem eine zu niedrige Expression des Proteins in Frage. Eine Möglichkeit, die Proteinexpression zu erhöhen, besteht darin, die Kultivierungsbedingungen zu optimieren. Wie bereits zu Beginn des Kapitels beschrieben wurde, konnte in einigen 3D-BHS-Modellen eine erhöhte Expression von Endothelzellmarkern gegenüber der 2D-Monokultur nachgewiesen werden. Mit der Aussicht, einen ähnlichen Effekt für die MYORG-Expression in IM-HAs beobachten zu können, wurden quantitative Proteinanalysen für diverse Co-Kultur-Konditionen durchgeführt.

In der Auswertung der Western Blots fiel zunächst auf, dass auf der Membran drei Banden durch den Antikörper erkannt wurden. Diese befanden sich zwischen 80 und 65 kDa, während MYORG eine Molekülmasse von etwa 81 kDa aufweist. Im Rahmen der Analyse wurden alle dargestellten Banden in die Quantifizierung einbezogen, da diese klar von dem Antikörper erkannt wurden und reproduzierbar waren. Dennoch muss beachtet werden, dass diese Banden auch ein Resultat von einer unspezifischen Bindung durch den Antikörper sein können. Eine ähnliche Problematik wurde bereits im Rahmen der immunzytochemischen Färbungen in *Kapitel 4.1.3* beschrieben und in *Kapitel 5.1.3* diskutiert. Für die Zukunft sollten daher unbedingt weitere MYORG-Antikörper genutzt und mit dem vorliegenden Antikörper (Thermo Fisher Scientific, PA5-66926) verglichen werden.

Die Analysen zeigten keine signifikanten Ergebnisse, weswegen an dieser Stelle nur Tendenzen beschrieben werden können. Bezüglich des verwendeten Mediums sowie der Vorbehandlung des Mediums (Konditionen 1 und 2) bestanden nur geringfügige Unterschiede, sodass die Verwendung von EG oder kEG anstelle von AM vermutlich keinen Einfluss auf die MYORG-Expression hat. Weiterhin zeigten die Co-Kultur-Konditionen (Konditionen 3, 4 und 5) in der Tendenz eine höhere MYORG-Expression gegenüber den übrigen Konditionen. Dabei scheint die Verwendung der Polyestermembraneinsätze und die damit einhergehende Kompartimentierung der Zellkulturplatte eine positive Auswirkung auf die MYORG-Expression zu haben. Die Porengröße und die Art und Weise der Aussaat der Zellen auf die Membraneinsätze scheinen dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Trotz der fehlenden Signifikanz zeigen die Analysen das Potential, durch die weitere Optimierung der Kultivierungsbedingungen möglicherweise eine Erhöhung der MYORG-Expression zu erreichen. Diese Aussage muss unter der Einschränkung erfolgen, dass die Frage nach der Spezifität des verwendeten Antikörpers für MYORG fraglich ist und zunächst in Folgeexperimenten geklärt werden sollte.

5.3.2.4 CD31

CD31 ist ein Endothelzellmarker, der im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurde, um den Übertritt von hCMEC/D3 in das astrozytäre Kompartiment der unterschiedlichen Co-Kultur-Konditionen zu evaluieren. In den Konditionen 1, 2 und 3 liegen keine oder nur sehr geringe Mengen der hCMEC/D3 vor, sodass davon ausgegangen werden kann, dass kein Übertritt der Endothelzellen erfolgt ist.

Für Kondition 4 liegen für 3 von 4 Subkonditionen erhöhte Werte für hCMEC/D3 vor. Dies könnte für einen Übertritt der Endothelzellen sprechen, allerdings ist es wahrscheinlicher, dass diese im Rahmen der Zelllyse, wie sie in *Kapitel 3.4.1* beschrieben ist, in das Proteinlysat übergetreten sind. Dies lässt sich bei Verwendung der sehr feinen Polyestermembranen nur bedingt verhindern und sollte bei der Interpretation der vorliegenden Proteinanalysen bedacht werden.

Für Kondition 5 wird ein Vorliegen von hCMEC/D3 erwartet, da diese zusammen mit den IM-HAs ausplattiert werden. Für die erste Subkondition der Kondition 5 (direkte Co-Kultur in AM) lässt sich ein nur sehr geringes Signal für CD31 erkennen. Dies könnte möglicherweise durch eine Verdrängung der hCMEC/D3 begründet werden, da AM als Zellkulturmedium speziell für IM-HAs entwickelt wurde und somit optimale Proliferationsbedingungen für diese sicherstellt. Im Gegensatz dazu zeigt die zweite Subkondition der Kondition 5 (direkte Co-Kultur in EG) eine höhere Expression von CD31. Zwar ist dieser Unterschied nicht signifikant, allerdings erscheint er dennoch plausibel, da davon auszugehen ist, dass für die hCMEC/D3 in EG, einem speziell für die Kultivierung von hCMEC/D3 entwickelten Medium, bessere Kultivierungsbedingungen vorliegen als für die IM-HAs.

6 Zusammenfassung

Die primäre familiäre Gehirnkalkifizierung (primary familial brain calcification [PFBC]) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sich mit einem heterogenen klinischen Erscheinungsbild präsentiert. Die geschätzte Prävalenz liegt bei 2,1 bis 6,6 pro 1000 und zu den häufigsten Symptomen gehören Parkinsonismus, kognitive Defizite und Depressionen. Derzeit sind neun PFBC-assoziierte Gene bekannt, deren Mutationen zur Entwicklung von symmetrischen, gefäßassoziierten Kalziumablagerungen unterschiedlicher Hirnareale beitragen. Auch das, im Fokus dieser Arbeit stehende, Gen *myogenesis regulating glycosidase (MYORG)* kann mit der PFBC in Verbindung gebracht werden. Es unterliegt einem rezessiven Vererbungsmodus, weist im zentralen Nervensystem eine besonders hohe Expression im endoplasmatischen Retikulum von Astrozyten auf und kodiert für eine α -Galaktosidase, die vermutlich eine Rolle bei der posttranslationalen Modifikation von Glykoproteinen spielt. Obwohl Mutationen in *MYORG* mit einem Anteil von 13,59 % die zweithäufigste Ursache der genetisch aufgeklärten PFBC darstellen und eine fast 100-prozentige klinische Penetranz aufweisen, fehlen bis heute weitreichende Erkenntnisse zur Funktion des gleichnamigen Proteins MYORG im menschlichen Körper sowie dessen Rolle bei der Pathogenese der PFBC. Auch kausale Therapieansätze, prognostische Marker oder in-vitro Krankheitsmodelle für die MYORG-assoziierte PFBC sowie das Krankheitsbild im Allgemeinen stehen zurzeit nicht zur Verfügung.

Mit dem Ziel, weitere Grundlagen und Erkenntnisse zur MYORG-assoziierten PFBC zu generieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit MYORG-Expressionsanalysen in Zellkulturmodellen unter Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen und immortalisierten Astrozyten durchgeführt.

Im ersten Teil wurden vier humane embryonale Stammzelllinien verwendet. Zwei dieser Stammzelllinien waren genetisch unverändert, während die anderen beiden eine p.75*-Mutation im MYORG-Gen aufwiesen. Bei der Mutation handelt es sich um eine Transition, die anstelle der Aminosäure Tryptophan zur Ausbildung eines Stoppcodons an der 75. Position des insgesamt aus 714 Aminosäuren bestehenden Proteins führt. An diesen Stammzelllinien wurden zunächst Genotypisierungen durchgeführt, um das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit der soeben beschriebenen Mutation zu bestätigen. Im nächsten Schritt erfolgte eine Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu induzierten Astrozyten unter Verwendung eines Protokolls von Canals et al. Zuletzt erfolgte eine immunzytochemische Anfärbung von MYORG und dem ER-Marker Calnexin in den induzierten Astrozyten. Die Ergebnisse der Genotypisierung bestätigten, dass zwei der vorliegenden humanen embryonalen Stammzelllinien eine p.75*-Mutation im MYORG-Gen trugen und die anderen beiden nicht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich das verwendete Protokoll von Canals et al. unter morphologischen Gesichtspunkten zur Generierung von induzierten Astrozyten aus hESCs eignet. In den Färbungen

konnte in allen vier Zelllinien ein Signal für den verwendeten MYORG-Antikörper sowie eine Kolokalisation des MYORG-Signals mit Calnexin nachgewiesen werden. Da das Vorhandensein der p.75*-Mutation durch eine Genotypisierung bestätigt wurde und diese zu einem Knockout von MYORG führt, war das vorhandene Signal des MYORG-Antikörpers am ehesten auf eine fehlende Spezifität oder darüber hinaus eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem anderen, im ER exprimierten Protein zurückzuführen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein in-vitro Blut-Hirn-Schranken-Modell aus immortalisierten humanen Astrozyten und Endothelzellen unter Verwendung von Polyestermembraneinsätzen erarbeitet. Durch eine dezidierte Literaturrecherche und eine Proliferationsanalyse wurden optimale Ausplattierungsdichten und Verhältnisse für die beiden Zelllinien bestimmt. Im Anschluss daran konnten durch Alterationen der genutzten Zellkulturmedien, Porengrößen der Membraneinsätze und Co-Kultur-Bedingungen unterschiedliche Konditionen erarbeitet und auf die zelluläre und nukleäre Oberfläche sowie die Expression von astrozytären Markern, MYORG und endothelialen Markern untersucht werden. In der Auswertung zeigen sich zwar nur vereinzelt signifikante Ergebnisse, allerdings konnte in der Tendenz dennoch beobachtet werden, dass eine Co-Kultur von immortalisierten Astrozyten und immortalisierten Endothelzellen mit einer Kompartimentierung durch Membraneinsätze Vorteile gegenüber der Monokultur in unterschiedlichen Medien, aber auch gegenüber einer direkten Co-Kultur beider Zelllinien aufweist. Auch Unterschiede bezüglich der verwendeten Porengröße und der Vorbehandlung des Zellkulturmediums konnten beschrieben werden, sodass insbesondere bei der Untersuchung der nukleären und zellulären Oberfläche sowie der GFAP- und MYORG-Intensität auffiel, dass eine kleinere Porengröße von 0,4 µm und ein nicht vorbehandeltes Medium größere Oberflächen bzw. stärkere Intensitäten hervorbrachten als eine größere Porengröße von 3 µm und ein vorbehandeltes Zellkulturmedium. Bezüglich der quantitativen Proteinanalyse der astrozytären Marker und MYORG schien die Verwendung der Polyestermembraneinsätze und die damit einhergehende Kompartimentierung der Zellkulturplatte ebenfalls eine positive Auswirkung auf die Proteinexpression zu haben. Die Porengröße und die Art und Weise der Aussaat der Zellen auf die Membraneinsätze schienen in diesem Fall eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in beiden Teilen dieser Arbeit vielversprechende Modelle präsentiert wurden, die neben den beschriebenen Expressionsanalysen auch als Grundlage für weitere Experimente wie z. B. für die funktionellen Testungen der Permeabilität, die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands oder die Durchführung einer Calciumbildgebung herangezogen werden können. Die in-vitro-Modelle könnten darüber hinaus auch zu Krankheitsmodellen umfunktioniert und durch eine Anpassung der Kultivierungsbedingungen weiterentwickelt werden, sodass sie langfristig auch zur Verträglichkeits- und Wirksamkeitsprüfung neuer Therapien im Rahmen von präklinischen Testungen genutzt werden könnten.

7 Literaturverzeichnis

- Abdullahi, W., Tripathi, D. und Ronaldson, P. T. (2018). **Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 315 (3), C343-C356.
- Aksnes, H., Van Damme, P., Goris, M., Starheim, K. K., Marie, M., Støve, S. I., Hoel, C., Kalvik, T. V., Hole, K. und Glomnes, N. (2015). **An organellar α -acetyltransferase, naa60, acetylates cytosolic N termini of transmembrane proteins and maintains Golgi integrity.** *Cell reports* 10 (8), 1362-1374.
- Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M., Eid, T., De Lanerolle, N. C., Nagelhus, E. A., Adams, M. E., Froehner, S. C., Agre, P. und Ottersen, O. P. (2003). **Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of α -syntrophin-null mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (23), 13615-13620.
- Andrae, J., Gallini, R. und Betsholtz, C. (2008). **Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine.** *Genes & development* 22 (10), 1276-1312.
- Andreone, B. J., Chow, B. W., Tata, A., Lacoste, B., Ben-Zvi, A., Bullock, K., Deik, A. A., Ginty, D. D., Clish, C. B. und Gu, C. (2017). **Blood-brain barrier permeability is regulated by lipid transport-dependent suppression of caveolae-mediated transcytosis.** *Neuron* 94 (3), 581-594. e585.
- Arai, K. und Lo, E. H. (2009). **An oligovascular niche: cerebral endothelial cells promote the survival and proliferation of oligodendrocyte precursor cells.** *Journal of Neuroscience* 29 (14), 4351-4355.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H., Robitaille, R. und Volterra, A. (2014). **Gliotransmitters travel in time and space.** *Neuron* 81 (4), 728-739.
- Arkadir, D., Lossos, A., Rahat, D., Abu Snineh, M., Schueler-Furman, O., Nitschke, S., Minassian, B. A., Sadaka, Y., Lerer, I. und Tabach, Y. (2019). **MYORG is associated with recessive primary familial brain calcification.** *Annals of clinical and translational neurology* 6 (1), 106-113.
- Armulik, A., Genové, G. und Betsholtz, C. (2011). **Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises.** *Developmental cell* 21 (2), 193-215.
- Azevedo, C. und Saiardi, A. (2017). **Eukaryotic phosphate homeostasis: the inositol pyrophosphate perspective.** *Trends in biochemical sciences* 42 (3), 219-231.

- Balck, A., Schaake, S., Kuhnke, N. S., Domingo, A., Madoev, H., Margolesky, J., Dobricic, V., Alvarez-Fischer, D., Laabs, B. H., Kasten, M., Luo, W., Nicolas, G., Marras, C., Lohmann, K., Klein, C. und Westenberger, A. (2021). **Genotype-Phenotype Relations in Primary Familial Brain Calcification: Systematic MDSGene Review**. *Mov Disord* 36 (11), 2468-2480, doi: 10.1002/mds.28753.
- Barberio, C., Withers, A., Mishra, Y., Couraud, P.-O., Romero, I. A., Weksler, B. und Owens, R. M. (2022). **A human-derived neurovascular unit in vitro model to study the effects of cellular cross-talk and soluble factors on barrier integrity**. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 16, 1065193.
- Bolden, C. T., Skibber, M. A., Olson, S. D., Zamorano Rojas, M., Milewicz, S., Gill, B. S. und Cox Jr, C. S. (2023). **Validation and characterization of a novel blood–brain barrier platform for investigating traumatic brain injury**. *Scientific Reports* 13 (1), 16150.
- Boulay, A.-C., Saubaméa, B., Adam, N., Chasseigneaux, S., Mazaré, N., Gilbert, A., Bahin, M., Bastianelli, L., Blugeon, C. und Perrin, S. (2017). **Translation in astrocyte distal processes sets molecular heterogeneity at the gliovascular interface**. *Cell discovery* 3 (1), 1-20.
- Bradl, M. und Lassmann, H. (2010). **Oligodendrocytes: biology and pathology**. *Acta neuropathologica* 119, 37-53.
- Cai, Z., Qiao, P.-F., Wan, C.-Q., Cai, M., Zhou, N.-K. und Li, Q. (2018). **Role of blood-brain barrier in Alzheimer's disease**. *Journal of Alzheimer's Disease* 63 (4), 1223-1234.
- Canals, I., Ginisty, A., Quist, E., Timmerman, R., Fritze, J., Miskinyte, G., Monni, E., Hansen, M. G., Hidalgo, I., Bryder, D., Bengzon, J. und Ahlenius, H. (2018). **Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells**. *Nat Methods* 15 (9), 693-696, doi: 10.1038/s41592-018-0103-2.
- Carecchio, M., Mainardi, M. und Bonato, G. (2023). **The clinical and genetic spectrum of primary familial brain calcification**. *Journal of Neurology* 270 (6), 3270-3277.
- Carter, M. und Shieh, J. C. (2015). **Guide to research techniques in neuroscience**, Academic Press.
- Castro Dias, M., Mapunda, J. A., Vladymyrov, M. und Engelhardt, B. (2019). **Structure and junctional complexes of endothelial, epithelial and glial brain barriers**. *International journal of molecular sciences* 20 (21), 5372.
- Ceafalan, L. C., Fertig, T. E., Gheorghe, T. C., Hinescu, M. E., Popescu, B. O., Pahnke, J. und Gherghiceanu, M. (2019). **Age-related ultrastructural changes of the basement membrane in the mouse blood-brain barrier**. *Journal of cellular and molecular medicine* 23 (2), 819-827.

- Cen, Z., Chen, Y., Chen, S., Wang, H., Yang, D., Zhang, H., Wu, H., Wang, L., Tang, S., Ye, J., Shen, J., Wang, H., Fu, F., Chen, X., Xie, F., Liu, P., Xu, X., Cao, J., Cai, P., Pan, Q., Li, J., Yang, W., Shan, P. F., Li, Y., Liu, J. Y., Zhang, B. und Luo, W. (2020). **Biallelic loss-of-function mutations in JAM2 cause primary familial brain calcification.** *Brain* 143 (2), 491-502, doi: 10.1093/brain/awz392.
- Chang, H. (2011). **Multistage continuous high cell density culture.**
- Chelban, V., Aksnes, H., Maroofian, R., LaMonica, L. C., Seabra, L., Siggervag, A., Devic, P., Shamseldin, H. E., Vandrovcova, J., Murphy, D., Richard, A. C., Quenez, O., Bonnevalle, A., Zanetti, M. N., Kaiyrzhanov, R., Salpietro, V., Efthymiou, S., Schottlaender, L. V., Morsy, H., Scardamaglia, A., Tariq, A., Pagnamenta, A. T., Pennavaria, A., Krogstad, L. S., Bekkelund, A. K., Caiella, A., Glomnes, N., Bronstad, K. M., Tury, S., Moreno De Luca, A., Boland-Auge, A., Olaso, R., Deleuze, J. F., Anheim, M., Cretin, B., Vona, B., Alajlan, F., Abdulwahab, F., Battini, J. L., Ipek, R., Bauer, P., Zifarelli, G., Gungor, S., Kurul, S. H., Lochmuller, H., Da'as, S. I., Fakhro, K. A., Gomez-Pascual, A., Botia, J. A., Wood, N. W., Horvath, R., Ernst, A. M., Rothman, J. E., McEntagart, M., Crow, Y. J., Alkuraya, F. S., Nicolas, G., Group, S. Y. S., Arnesen, T. und Houlden, H. (2024). **Biallelic NAA60 variants with impaired n-terminal acetylation capacity cause autosomal recessive primary familial brain calcifications.** *Nat Commun* 15 (1), 2269, doi: 10.1038/s41467-024-46354-0.
- Chelban, V., Carecchio, M., Rea, G., Bowirrat, A., Kirmani, S., Magistrelli, L., Efthymiou, S., Schottlaender, L., Vandrovcova, J. und Salpietro, V. (2020). **MYORG-related disease is associated with central pontine calcifications and atypical parkinsonism.** *Neurology: Genetics* 6 (2), e399.
- Chen, I.-H. B., Huber, M., Guan, T., Bubeck, A. und Gerace, L. (2006). **Nuclear envelope transmembrane proteins (NETs) that are up-regulated during myogenesis.** *BMC cell biology* 7, 1-16.
- Chen, S., Cen, Z., Fu, F., Chen, Y., Chen, X., Yang, D., Wang, H., Wu, H., Zheng, X. und Xie, F. (2019). **Underestimated disease prevalence and severe phenotypes in patients with biallelic variants: a cohort study of primary familial brain calcification from China.** *Parkinsonism & Related Disorders* 64, 211-219.
- Chen, S.-Y., Ho, C.-J., Lu, Y.-T., Lin, C.-H., Lan, M.-Y. und Tsai, M.-H. (2023). **The genetics of primary familial brain calcification: a literature review.** *International Journal of Molecular Sciences* 24 (13), 10886.
- Chen, S.-Y., Lin, W.-C., Chang, Y.-Y., Lin, T.-K. und Lan, M.-Y. (2020a). **Brain hypoperfusion and nigrostriatal dopaminergic dysfunction in primary familial brain calcification caused by novel MYORG variants: case report.** *BMC neurology* 20, 1-6.

- Chen, Y., Cen, Z., Chen, X., Wang, H., Chen, S., Yang, D., Fu, F., Wang, L., Liu, P. und Wu, H. (2020b). **MYORG mutation heterozygosity is associated with brain calcification**. *Movement Disorders* 35 (4), 679-686.
- Chow, B. W. und Gu, C. (2017). **Gradual suppression of transcytosis governs functional blood-retinal barrier formation**. *Neuron* 93 (6), 1325-1333. e1323.
- Christ, G. J., Spray, D. C., El-Sabban, M., Moore, L. K. und Brink, P. R. (1996). **Gap junctions in vascular tissues: evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone**. *Circulation research* 79 (4), 631-646.
- Clasadonte, J., Scemes, E., Wang, Z., Boison, D. und Haydon, P. G. (2017). **Connexin 43-mediated astroglial metabolic networks contribute to the regulation of the sleep-wake cycle**. *Neuron* 95 (6), 1365-1380. e1365.
- Coelho-Santos, V. und Shih, A. Y. (2020). **Postnatal development of cerebrovascular structure and the neurogliovascular unit**. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 9 (2), e363.
- Cornford, E. M. und Hyman, S. (2005). **Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy**. *NeuroRx* 2 (1), 27-43.
- Cuddapah, V. A., Zhang, S. L. und Sehgal, A. (2019). **Regulation of the blood–brain barrier by circadian rhythms and sleep**. *Trends in neurosciences* 42 (7), 500-510.
- Dahlmann, W. und Prill, A. (1974). **Chronic secondary hypoparathyroidism in connection with a partially reversible psycho-organic syndrome**. *Zeitschrift für Neurologie* 206, 223-234.
- Daneman, R. und Prat, A. (2015). **The blood-brain barrier**. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (1), a020412, doi: 10.1101/cshperspect.a020412.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A. und Barres, B. A. (2010). **Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis**. *Nature* 468 (7323), 562-566.
- Daniels, B. P., Cruz-Orengo, L., Pasieka, T. J., Couraud, P.-O., Romero, I. A., Weksler, B., Cooper, J. A., Doering, T. L. und Klein, R. S. (2013). **Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells maintain the properties of primary cells in an in vitro model of immune migration across the blood brain barrier**. *Journal of neuroscience methods* 212 (1), 173-179.
- Datta, K., Guan, T. und Gerace, L. (2009). **NET37, a nuclear envelope transmembrane protein with glycosidase homology, is involved in myoblast differentiation**. *Journal of Biological Chemistry* 284 (43), 29666-29676.

- de Brouwer, E. J., Kockelkoren, R., Jill, B., Dankbaar, J. W., Velthuis, B. K., Takx, R. A., De Jonghe, A., Emmelot-Vonk, M. H., Koek, H. L. und de Jong, P. A. (2020). **Prevalence and vascular risk factors of basal ganglia calcifications in patients at risk for cerebrovascular disease.** Journal of Neuroradiology 47 (5), 337-342.
- Del Zoppo, G. (2010). **The neurovascular unit in the setting of stroke.** Journal of internal medicine 267 (2), 156-171.
- Delacour, A. (1850). **Ossification des capillaires du cerveau.** Ann Med Psychol 2, 458-461.
- Ellie, E., Julien, J. und Ferrer, X. (1989). **Familial idiopathic striopallidodentate calcifications.** Neurology 39 (3), 381-381.
- Eskandary, H., Sabba, M., Khajehpour, F. und Eskandari, M. (2005). **Incidental findings in brain computed tomography scans of 3000 head trauma patients.** Surgical neurology 63 (6), 550-553.
- Fagerberg, L., Hallström, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpour, S., Danielsson, A. und Edlund, K. (2014). **Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics.** Molecular & cellular proteomics 13 (2), 397-406.
- Fahr, K. T. (1930). **Idiopathische verkalkung der hirne fass.** Zbl Allg Path 50, 129-133.
- Feldman, G. J., Mullin, J. M. und Ryan, M. P. (2005). **Occludin: structure, function and regulation.** Advanced drug delivery reviews 57 (6), 883-917.
- Félétou, M. (2011). **The endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators.**
- Fenn, A. M., Hall, J. C., Gensel, J. C., Popovich, P. G. und Godbout, J. P. (2014). **IL-4 signaling drives a unique arginase+/IL-1 β + microglia phenotype and recruits macrophages to the inflammatory CNS: consequences of age-related deficits in IL-4R α after traumatic spinal cord injury.** Journal of Neuroscience 34 (26), 8904-8917.
- Förstl, H., Krumm, B., Eden, S. und Kohlmeyer, K. (1992). **Neurological disorders in 166 patients with basal ganglia calcification: a statistical evaluation.** Journal of neurology 239, 36-38.
- Fredriksson, L., Li, H. und Eriksson, U. (2004). **The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms.** Cytokine & growth factor reviews 15 (4), 197-204.

- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. und Tsukita, S. (1993). **Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions**. *The Journal of cell biology* 123 (6), 1777-1788.
- Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A. und Betsholtz, C. (2009). **Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis**. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29 (5), 630-638.
- Gaillard, P. J., Voorwinden, L. H., Nielsen, J. L., Ivanov, A., Atsumi, R., Engman, H., Ringbom, C., de Boer, A. G. und Breimer, D. D. (2001). **Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood–brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes**. *European journal of pharmaceutical sciences* 12 (3), 215-222.
- Golüke, N. M., Meijer, E., van Maren, E. A., de Jonghe, A., Emmelot-Vonk, M. H., van Valen, E., de Jong, P. A. und Koek, H. L. (2023). **Amount and Distribution of Intracranial Calcification in Symptomatic and Asymptomatic Primary Familial Brain Calcification**. *Neurology: Clinical Practice* 13 (4), e200163.
- Gonzales, A. L., Klug, N. R., Moshkforoush, A., Lee, J. C., Lee, F. K., Shui, B., Tsoukias, N. M., Kotlikoff, M. I., Hill-Eubanks, D. und Nelson, M. T. (2020). **Contractile pericytes determine the direction of blood flow at capillary junctions**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (43), 27022-27033.
- Grangeon, L., Wallon, D., Charbonnier, C., Quenez, O., Richard, A.-C., Rousseau, S., Budowski, C., Lebouvier, T., Corbille, A.-G. und Vidailhet, M. (2019). **Biallelic MYORG mutation carriers exhibit primary brain calcification with a distinct phenotype**. *Brain* 142 (6), 1573-1586.
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., O'Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M. und Attwell, D. (2014). **Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease**. *Nature* 508 (7494), 55-60.
- Hamanaka, G., Ohtomo, R., Takase, H., Lok, J. und Arai, K. (2018). **White-matter repair: Interaction between oligodendrocytes and the neurovascular unit**. *Brain circulation* 4 (3), 118-123.
- Hatherell, K., Couraud, P.-O., Romero, I. A., Weksler, B. und Pilkington, G. J. (2011). **Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood–brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models**. *Journal of neuroscience methods* 199 (2), 223-229.
- Hawkins, B. T. und Davis, T. P. (2005). **The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease**. *Pharmacological reviews* 57 (2), 173-185.
- He, Y., Yao, Y., Tsirka, S. E. und Cao, Y. (2014). **Cell-culture models of the blood–brain barrier**. *Stroke* 45 (8), 2514-2526.

- Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H. und Betsholtz, C. (2001). **Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis**. *The Journal of cell biology* 153 (3), 543-554.
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A. und Betsholtz, C. (1999). **Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse**. *Development* 126 (14), 3047-3055.
- Helms, H. C., Abbott, N. J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P.-O., Deli, M. A., Förster, C., Galla, H. J., Romero, I. A. und Shusta, E. V. (2016). **In vitro models of the blood–brain barrier: an overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use**. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 36 (5), 862-890.
- Howarth, C., Mishra, A. und Hall, C. N. (2021). **More than just summed neuronal activity: how multiple cell types shape the BOLD response**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 376 (1815), 20190630.
- Hozumi, I., Kurita, H., Ozawa, K., Furuta, N., Inden, M., Sekine, S.-i., Yamada, M., Hayashi, Y., Kimura, A. und Inuzuka, T. (2018). **Inorganic phosphorus (Pi) in CSF is a biomarker for SLC20A2-associated idiopathic basal ganglia calcification (IBGC1)**. *Journal of the neurological sciences* 388, 150-154.
- Iadecola, C. (2017). **The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease**. *Neuron* 96 (1), 17-42.
- Ichikawa, Y., Tanaka, M., Kurita, E., Nakajima, M., Tanaka, M., Oishi, C., Goto, J., Tsuji, S. und Chiba, A. (2019). **Novel SLC20A2 variant in a Japanese patient with idiopathic basal ganglia calcification-1 (IBGC1) associated with dopa-responsive parkinsonism**. *Human Genome Variation* 6 (1), 44.
- Ishii, M., Horio, Y., Tada, Y., Hibino, H., Inanobe, A., Ito, M., Yamada, M., Gotow, T., Uchiyama, Y. und Kurachi, Y. (1997). **Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4. 1, on mammalian retinal Müller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals**. *Journal of Neuroscience* 17 (20), 7725-7735.
- Jain, V., Langham, M. C. und Wehrli, F. W. (2010). **MRI estimation of global brain oxygen consumption rate**. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30 (9), 1598-1607.
- Jambusaria, A., Hong, Z., Zhang, L., Srivastava, S., Jana, A., Toth, P. T., Dai, Y., Malik, A. B. und Rehman, J. (2020). **Endothelial heterogeneity across distinct vascular beds during homeostasis and inflammation**. *Elife* 9, e51413.
- Jensen, N., Schrøder, H. D., Hejbøl, E. K., Thomsen, J. S., Brüel, A., Larsen, F. T., Vinding, M. C., Orłowski, D., Füchtbauer, E.-M. und Oliveira, J. R. (2018). **Mice**

- knocked out for the primary brain calcification–associated gene Slc20a2 show unimpaired prenatal survival but retarded growth and nodules in the brain that grow and calcify over time.** *The American Journal of Pathology* 188 (8), 1865-1881.
- Jevtić, P., Edens, L. J., Vuković, L. D. und Levy, D. L. (2014). **Sizing and shaping the nucleus: mechanisms and significance.** *Current opinion in cell biology* 28, 16-27.
- Karvinen, J. und Kellomäki, M. (2023). **Design aspects and characterization of hydrogel-based bioinks for extrusion-based bioprinting.** *Bioprinting* 32, e00274.
- Keller, A., Westenberger, A., Sobrido, M. J., Garcia-Murias, M., Domingo, A., Sears, R. L., Lemos, R. R., Ordonez-Ugalde, A., Nicolas, G. und Da Cunha, J. E. G. (2013). **Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice.** *Nature genetics* 45 (9), 1077-1082.
- Kim, K. J., Iddings, J. A., Stern, J. E., Blanco, V. M., Croom, D., Kirov, S. A. und Filosa, J. A. (2015). **Astrocyte contributions to flow/pressure-evoked parenchymal arteriole vasoconstriction.** *Journal of Neuroscience* 35 (21), 8245-8257.
- Kim, W., Kim, J., Lee, S.-Y., Kim, H.-M., Joo, K. M. und Nam, D.-H. (2022). **Simplified in vitro 3D co-culture-based blood-brain barrier model using transwell.** *Biochemical and biophysical research communications* 620, 63-68.
- Kulczar, C., Lubin, K. E., Lefebvre, S., Miller, D. W. und Knipp, G. T. (2017). **Development of a direct contact astrocyte-human cerebral microvessel endothelial cells blood–brain barrier coculture model.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 69 (12), 1684-1696.
- Kumar, N. und Jog, M. (2017). **Fahr’s Disease Presenting as Late-Onset Levodopa-Responsive Parkinsonism.** *Canadian Journal of Neurological Sciences* 44 (3), 322-323.
- Kume, K., Takata, T., Morino, H., Matsuda, Y., Ohsawa, R., Tada, Y., Kurashige, T. und Kawakami, H. (2020). **The first Japanese case of primary familial brain calcification caused by an MYORG variant.** *Journal of Human Genetics* 65 (10), 917-920, doi: 10.1038/s10038-020-0779-x.
- Legati, A., Giovannini, D., Nicolas, G., López-Sánchez, U., Quintáns, B., Oliveira, J. R., Sears, R. L., Ramos, E. M., Spiteri, E. und Sobrido, M.-J. (2015). **Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export.** *Nature genetics* 47 (6), 579-581.
- Li, L., Acioglu, C., Heary, R. F. und Elkabes, S. (2021). **Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases.** *Brain, behavior, and immunity* 91, 740-755.

- Loeb, J. A. (1998). **Functional improvement in a patient with cerebral calcinosis using a bisphosphonate.** *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 13 (2), 345-349.
- López-Sánchez, U., Tury, S., Nicolas, G., Wilson, M. S., Jurici, S., Ayrignac, X., Courgnaud, V., Saiardi, A., Sitbon, M. und Battini, J.-L. (2020). **Interplay between primary familial brain calcification-associated SLC20A2 and XPR1 phosphate transporters requires inositol polyphosphates for control of cellular phosphate homeostasis.** *Journal of Biological Chemistry* 295 (28), 9366-9378.
- Lovick, T., Brown, L. und Key, B. (1999). **Neurovascular relationships in hippocampal slices: physiological and anatomical studies of mechanisms underlying flow-metabolism coupling in intraparenchymal microvessels.** *Neuroscience* 92 (1), 47-60.
- Magistretti, P. J. und Allaman, I. (2015). **A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging.** *Neuron* 86 (4), 883-901.
- Manyam, B. V. (2005). **What is and what is not 'Fahr's disease'.** *Parkinsonism & related disorders* 11 (2), 73-80.
- Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C. und Ottersen, O. P. (2010). **The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction.** *Glia* 58 (9), 1094-1103.
- McConnell, H. L. und Mishra, A. (2022). **Cells of the blood–brain barrier: an overview of the neurovascular unit in health and disease.** *The Blood-Brain Barrier: Methods and Protocols*, 3-24.
- Meek, R. W., Brockerman, J., Fordwour, O. B., Zandberg, W. F., Davies, G. J. und Vocadlo, D. J. (2022). **The primary familial brain calcification-associated protein MYORG is an α -galactosidase with restricted substrate specificity.** *PLoS Biology* 20 (9), e3001764.
- Menezes, M. J., McClenahan, F. K., Leiton, C. V., Aranmolate, A., Shan, X. und Colognato, H. (2014). **The extracellular matrix protein laminin α 2 regulates the maturation and function of the blood–brain barrier.** *Journal of Neuroscience* 34 (46), 15260-15280.
- Meyer, N., Richter, N., Fan, Z., Siemonsmeier, G., Pivneva, T., Jordan, P., Steinhäuser, C., Semtner, M., Nolte, C. und Kettenmann, H. (2018). **Oligodendrocytes in the mouse corpus callosum maintain axonal function by delivery of glucose.** *Cell reports* 22 (9), 2383-2394.
- Miyamoto, N., Maki, T., Shindo, A., Liang, A. C., Maeda, M., Egawa, N., Itoh, K., Lo, E. K., Lok, J. und Ihara, M. (2015). **Astrocytes promote oligodendrogenesis**

- after white matter damage via brain-derived neurotrophic factor.** *Journal of Neuroscience* 35 (41), 14002-14008.
- Miyamoto, N., Pham, L.-D. D., Seo, J. H., Kim, K.-W., Lo, E. H. und Arai, K. (2014). **Crosstalk between cerebral endothelium and oligodendrocyte.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, 1055-1066.
- Mochida, G. H., Ganesh, V. S., Felie, J. M., Gleason, D., Hill, R. S., Clapham, K. R., Rakiec, D., Tan, W.-H., Akawi, N. und Al-Saffar, M. (2010). **A homozygous mutation in the tight-junction protein JAM3 causes hemorrhagic destruction of the brain, subependymal calcification, and congenital cataracts.** *The American Journal of Human Genetics* 87 (6), 882-889.
- Moskowitz, M. A., Winickoff, R. N. und Heinz, E. R. (1971). **Familial calcification of the basal ganglions: a metabolic and genetic study.** *New England journal of medicine* 285 (2), 72-77.
- Murphy-Royal, C., Johnston, A. D., Boyce, A. K., Diaz-Castro, B., Institoris, A., Peringod, G., Zhang, O., Stout, R. F., Spray, D. C. und Thompson, R. J. (2020). **Stress gates an astrocytic energy reservoir to impair synaptic plasticity.** *Nature communications* 11 (1), 2014.
- Nicolas, G., Charbonnier, C., Campion, D. und Veltman, J. A. (2018). **Estimation of minimal disease prevalence from population genomic data: Application to primary familial brain calcification.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 177 (1), 68-74, doi: 10.1002/ajmg.b.32605.
- Nicolas, G., Pottier, C., Charbonnier, C., Guyant-Marechal, L., Le Ber, I., Pariente, J., Labauge, P., Aygnac, X., Defebvre, L., Maltete, D., Martinaud, O., Lefaucheur, R., Guillin, O., Wallon, D., Chaumette, B., Rondepierre, P., Derache, N., Fromager, G., Schaeffer, S., Krystkowiak, P., Verny, C., Jurici, S., Sauvee, M., Verin, M., Lebouvier, T., Rouaud, O., Thauvin-Robinet, C., Rousseau, S., Rovelet-Lecrux, A., Frebourg, T., Campion, D., Hannequin, D. und French, I. S. G. (2013a). **Phenotypic spectrum of probable and genetically-confirmed idiopathic basal ganglia calcification.** *Brain* 136 (Pt 11), 3395-3407, doi: 10.1093/brain/awt255.
- Nicolas, G., Pottier, C., Maltête, D., Coutant, S., Rovelet-Lecrux, A., Legallic, S., Rousseau, S., Vaschalde, Y., Guyant-Maréchal, L. und Augustin, J. (2013b). **Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification.** *Neurology* 80 (2), 181-187.
- O'Driscoll, M. C., Daly, S. B., Urquhart, J. E., Black, G. C., Pilz, D. T., Brockmann, K., McEntagart, M., Abdel-Salam, G., Zaki, M. und Wolf, N. I. (2010). **Recessive mutations in the gene encoding the tight junction protein occludin cause band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria.** *The American Journal of Human Genetics* 87 (3), 354-364.

- Oliveira, J. M. und Oliveira, M. (2016). **Primary brain calcification in patients undergoing treatment with the biphosphonate alendronate**. Scientific reports 6 (1), 22961.
- Orgun, L. T., Besen, Ş., Sangün, Ö., Bisgin, A., Alkan, Ö. und Erol, I. (2021). **First pediatric case with primary familial brain calcification due to a novel variant on the MYORG gene and review of the literature**. Brain and Development 43 (7), 789-797.
- Osipova, E. D., Semyachkina-Glushkovskaya, O. V., Morgun, A. V., Pisareva, N. V., Malinovskaya, N. A., Boitsova, E. B., Pozhilenkova, E. A., Belova, O. A., Salmin, V. V. und Taranushenko, T. E. (2018). **Gliotransmitters and cytokines in the control of blood-brain barrier permeability**. Reviews in the Neurosciences 29 (5), 567-591.
- Rajput, P., Brookshier, A., Kothari, S., Eckstein, L., Chang, H., Liska, S., Lamb, J., Sances, S. und Lyden, P. (2024). **Differential Vulnerability and Response to Injury among Brain Cell Types Comprising the Neurovascular Unit**. Journal of Neuroscience 44 (22).
- Ramos, E. M., Oliveira, J., Sobrido, M. J. und Coppola, G. (2017). **Primary Familial Brain Calcification**. In: GeneReviews((R)), Hrsg. Adam, M. P., Feldman, J., Mirzaa, G. M., et al., Seattle (WA).
- Ramos, E. M., Roca, A., Chumchim, N., Dokuru, D. R., Van Berlo, V., De Michele, G., Lieto, M., Tedeschi, E., De Michele, G. und Coppola, G. (2019). **Primary familial brain calcification caused by a novel homozygous MYORG mutation in a consanguineous Italian family**. Neurogenetics 20, 99-102.
- Ravera, S., Virkki, L. V., Murer, H. und Forster, I. C. (2007). **Deciphering PiT transport kinetics and substrate specificity using electrophysiology and flux measurements**. American Journal of Physiology-Cell Physiology 293 (2), C606-C620.
- Regulation, O. M. P. (2000). **Regulation (EC) No 141/2000 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products**. Off J 18, 15.
- Ribatti, D., Nico, B. und Crivellato, E. (2011). **The role of pericytes in angiogenesis**. The International journal of developmental biology 55 (3), 261-268.
- Rice, O., Surian, A. und Chen, Y. (2022). **Modeling the blood-brain barrier for treatment of central nervous system (CNS) diseases**. Journal of Tissue Engineering 13, 20417314221095997.
- Robel, S., Mori, T., Zoubaa, S., Schlegel, J., Sirko, S., Faissner, A., Goebbels, S., Dimou, L. und Götz, M. (2009). **Conditional deletion of β 1-integrin in astroglia causes partial reactive gliosis**. Glia 57 (15), 1630-1647.

- Ronaldson, P. T. und Davis, T. P. (2020). **Regulation of blood-brain barrier integrity by microglia in health and disease: A therapeutic opportunity.** J Cereb Blood Flow Metab 40 (1_suppl), S6-S24, doi: 10.1177/0271678X20951995.
- Rosenegger, D. G., Tran, C. H. T., Cusulin, J. I. W. und Gordon, G. R. (2015). **Tonic local brain blood flow control by astrocytes independent of phasic neurovascular coupling.** Journal of Neuroscience 35 (39), 13463-13474.
- Rouach, N., Avignone, E., Meme, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F. und Giaume, C. (2002). **Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system.** Biology of the Cell 94 (7-8), 457-475.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K. und Giaume, C. (2008). **Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission.** science 322 (5907), 1551-1555.
- Scemes, E. und Spray, D. C. (2003). **The astrocytic syncytium.** Advances in Molecular and Cell Biology 31, 165-179.
- Schottlaender, L. V., Abeti, R., Jaunmuktane, Z., Macmillan, C., Chelban, V., O'callaghan, B., McKinley, J., Maroofian, R., Efthymiou, S. und Athanasiou-Fragkouli, A. (2020). **Bi-allelic JAM2 variants lead to early-onset recessive primary familial brain calcification.** The American Journal of Human Genetics 106 (3), 412-421.
- Seo, J. H., Maki, T., Maeda, M., Miyamoto, N., Liang, A. C., Hayakawa, K., Pham, L.-D. D., Suwa, F., Taguchi, A. und Matsuyama, T. (2014). **Oligodendrocyte precursor cells support blood-brain barrier integrity via TGF- β signaling.** PloS one 9 (7), e103174.
- Smeyers-Verbeke, J., Michotte, Y., Pelsmaeckers, J., Lowenthal, A., Massart, D. L., Dekegel, D. und Karcher, D. (1975). **The chemical composition of idiopathic nonarteriosclerotic cerebral calcifications.** Neurology 25 (1), 48-48.
- Snijders, B. M., Mathijssen, G., Peters, M. J., Emmelot-Vonk, M. H., de Jong, P. A., Bakker, S., Crommelin, H. A., Ruigrok, Y. M., Brilstra, E. H. und Schepers, V. P. (2024). **The effects of etidronate on brain calcifications in Fahr's disease or syndrome: rationale and design of the randomised, placebo-controlled, double-blind CALCIFADE trial.** Orphanet Journal of Rare Diseases 19 (1), 49.
- Sofroniew, M. V. und Vinters, H. V. (2010). **Astrocytes: biology and pathology.** Acta neuropathologica 119, 7-35.
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I. und Mazor, Y. (2016). **The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses.** Current protocols in bioinformatics 54 (1), 1.30. 31-31.30. 33.

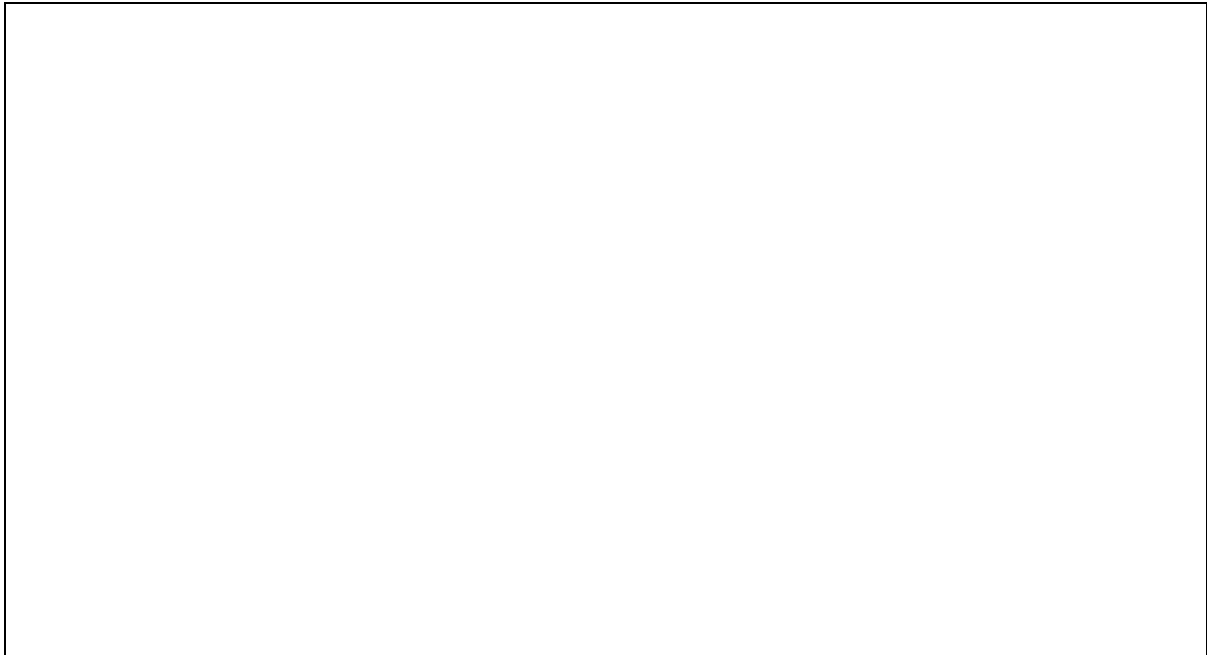
- Stone, N., England, T. und O'Sullivan, S. (2019). **A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells.** *Front Cell Neurosci* 13: 230 (
- Tadic, V., Westenberger, A., Domingo, A., Alvarez-Fischer, D., Klein, C. und Kasten, M. (2015). **Primary familial brain calcification with known gene mutations: a systematic review and challenges of phenotypic characterization.** *JAMA neurology* 72 (4), 460-467.
- Takeda, E., Taketani, Y., Sawada, N., Sato, T. und Yamamoto, H. (2004). **The regulation and function of phosphate in the human body.** *Biofactors* 21 (1-4), 345-355.
- Tallquist, M. D., Klinghoffer, R. A., Heuchel, R., Mueting-Nelsen, P. F., Corrin, P. D., Heldin, C.-H., Johnson, R. J. und Soriano, P. (2000). **Retention of PDGFR- β function in mice in the absence of phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C γ signaling pathways.** *Genes & development* 14 (24), 3179-3190.
- Thion, M. S., Ginhoux, F. und Garel, S. (2018). **Microglia and early brain development: An intimate journey.** *Science* 362 (6411), 185-189.
- Van Norman, G. A. (2019). **Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials: is it time to rethink our current approach?** *JACC: Basic to Translational Science* 4 (7), 845-854.
- Vanlandewijck, M., Lebouvier, T., Andaloussi Mäe, M., Nahar, K., Hornemann, S., Kenkel, D., Cunha, S. I., Lennartsson, J., Boss, A. und Heldin, C.-H. (2015). **Functional characterization of germline mutations in PDGFB and PDGFRB in primary familial brain calcification.** *PloS one* 10 (11), e0143407.
- Wang, C., Li, Y., Shi, L., Ren, J., Patti, M., Wang, T., de Oliveira, J. R., Sobrido, M.-J., Quintáns, B. und Baquero, M. (2012). **Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis.** *Nature genetics* 44 (3), 254-256.
- Warren, E. und Gerecht, S. (2023). **Beyond the endothelium: the role of mural cells in vascular biology: in vitro systems to study endothelial/pericyte cell interactions.** *Vascular Biology* 5 (1).
- Westenberger, A., Balck, A. und Klein, C. (2019). **Primary familial brain calcifications: genetic and clinical update.** *Curr Opin Neurol* 32 (4), 571-578, doi: 10.1097/WCO.0000000000000712.
- Wild, R., Gerasimaite, R., Jung, J.-Y., Truffault, V., Pavlovic, I., Schmidt, A., Saiardi, A., Jessen, H. J., Poirier, Y. und Hothorn, M. (2016). **Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains.** *Science* 352 (6288), 986-990.

- World Health Organization (2020). **The top 10 causes of death**. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Stand:02.08.2024].
- Xavier, A. L., Menezes, J. R., Goldman, S. A. und Nedergaard, M. (2014). **Fine-tuning the central nervous system: microglial modelling of cells and synapses**. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369 (1654), 20130593, doi: 10.1098/rstb.2013.0593.
- Xing, C., Li, W., Deng, W., Ning, M. und Lo, E. H. (2018). **A potential gliovascular mechanism for microglial activation: differential phenotypic switching of microglia by endothelium versus astrocytes**. *Journal of neuroinflammation* 15, 1-11.
- Xu, L., Nirwane, A. und Yao, Y. (2019). **Basement membrane and blood–brain barrier**. *Stroke and vascular neurology* 4 (2).
- Xu, X., Sun, H., Luo, J., Cheng, X., Lv, W., Luo, W., Chen, W.-J., Xiong, Z.-Q. und Liu, J.-Y. (2023). **The pathology of primary familial brain calcification: implications for treatment**. *Neuroscience Bulletin* 39 (4), 659-674.
- Yamada, M., Asano, T., Okamoto, K., Hayashi, Y., Kanematsu, M., Hoshi, H., Akaiwa, Y., Shimohata, T., Nishizawa, M. und Inuzuka, T. (2013). **High frequency of calcification in basal ganglia on brain computed tomography images in Japanese older adults**. *Geriatrics & Gerontology International* 13 (3), 706-710.
- Yao, X. P., Cheng, X., Wang, C., Zhao, M., Guo, X. X., Su, H. Z., Lai, L. L., Zou, X. H., Chen, X. J., Zhao, Y., Dong, E. L., Lu, Y. Q., Wu, S., Li, X., Fan, G., Yu, H., Xu, J., Wang, N., Xiong, Z. Q. und Chen, W. J. (2018). **Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification**. *Neuron* 98 (6), 1116-1123 e1115, doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.037.
- Zhao, M., Lin, X.-H., Zeng, Y.-H., Su, H.-Z., Wang, C., Yang, K., Chen, Y.-K., Lin, B.-W., Yao, X.-P. und Chen, W.-J. (2022a). **Knockdown of myorg leads to brain calcification in zebrafish**. *Molecular Brain* 15 (1), 65.
- Zhao, Y., Gan, L., Ren, L., Lin, Y., Ma, C. und Lin, X. (2022b). **Factors influencing the blood-brain barrier permeability**. *Brain research* 1788, 147937.
- Zhou, B., Zuo, Y. X. und Jiang, R. T. (2019). **Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases**. *CNS neuroscience & therapeutics* 25 (6), 665-673.
- Zlokovic, B. V. (2010). **Neurodegeneration and the neurovascular unit**. *Nature medicine* 16 (12), 1370-1371.

Appendix

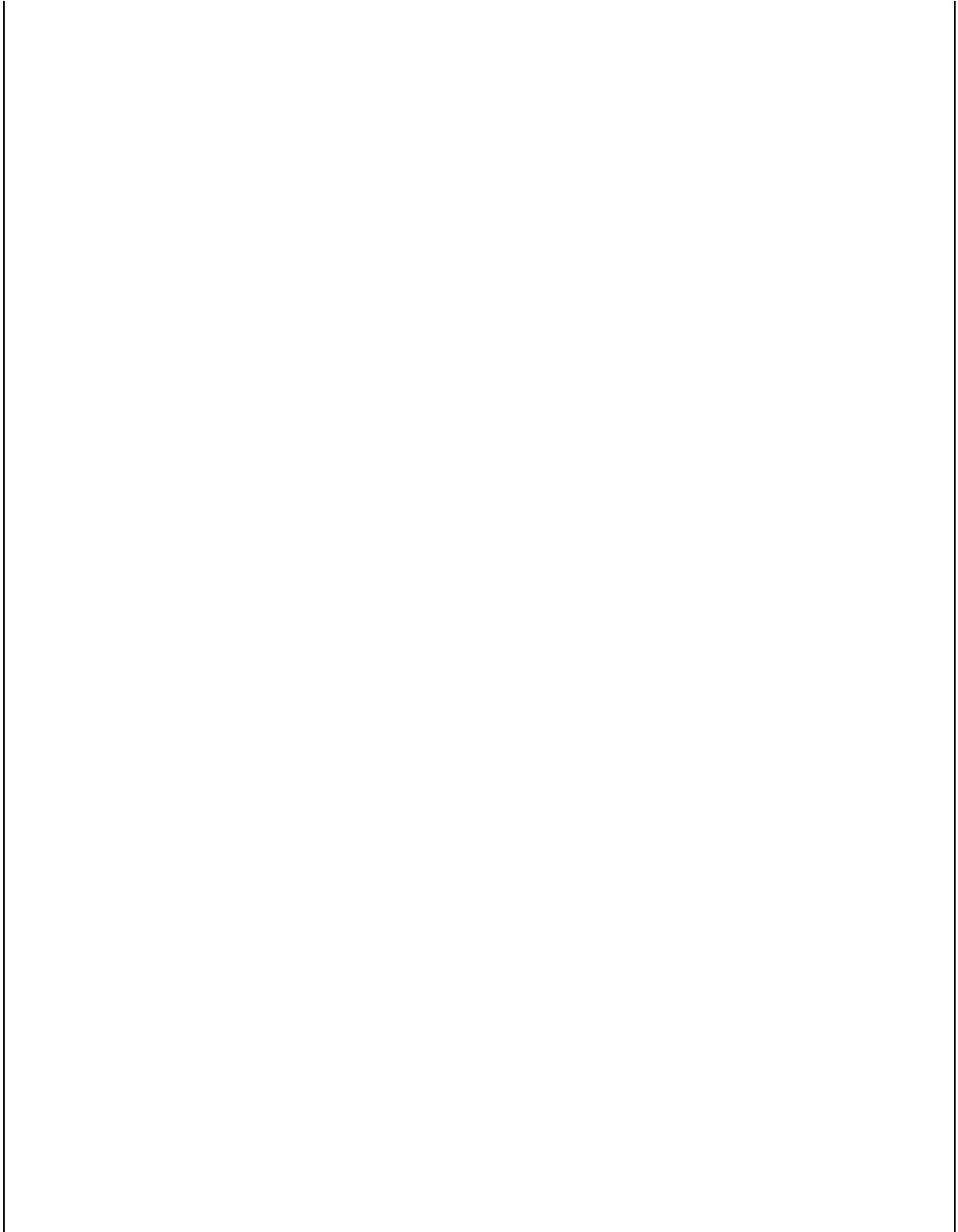
Verwendete Makros für die Bildbearbeitung und Analyse mit ImageJ

Das folgende Makro wurde für die Automatisierung einiger Schritte bei der Analyse der nukleären Oberfläche von den IM-HAs verwendet.



Das folgende Makro wurde für die Automatisierung einiger Schritte bei der Analyse der Markerintensität von MYORG und GFAP sowie der GFAP-Fläche in den IM-HAs verwendet.





Lebenslauf

NAME: Parmpreet Singh | **GEBURTSDATEN:** 08.09.1998 in Witzenhausen

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

- 08.2019 – 01.2020 **Københavns Universitet, Dänemark**
Auslandssemester mit Erasmus+ Förderung
- 10.2018 – 12.2023 **Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**
Studium der Humanmedizin, Durchschnittsnote: 1,8
3. Staatsexamen am 01.12.2023
2. Staatsexamen am 13.10.2022
- 10.2016 – 09.2018 **Goethe-Universität Frankfurt am Main**
1. Staatsexamen am 14.09.2018

SCHULISCHER WERDEGANG

- 2008 – 2016 **Werratschule, Heringen**
Abitur am 17.06.2016, Durchschnittsnote: 1,2
- 2005 – 2008 **Schule am Rhäden, Obersuhl**
- 2004 – 2005 **Grundschule Am Brunnen vor dem Tore, Bad Sooden-Allendorf**

Danksagung

Die Arbeit an dieser Dissertation war eine lehrreiche und prägende Erfahrung, die mich persönlich wachsen ließ und mir wertvolle Einblicke in die Welt der Wissenschaft eröffnete. Mein Dank gilt allen, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Ich danke Prof. Dr. med. Jochen Weishaupt für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Schaffung der Rahmenbedingungen, um es bearbeiten zu können.

Ich danke Prof. Dr. Philipp Koch für die Kooperation und die Möglichkeit, die Räumlichkeiten und Materialien seines Labors sowie die Expertise seines Teams nutzen zu dürfen.

I am deeply grateful to Dr. Claudio Acuna Goycolea for his invaluable advice and for the opportunity to use the laboratory facilities of his research group.

Für die Bereitstellung der immortalisierten Endothelzellen möchte ich Prof. Dr. Christian Schwerk und PD Dr. Walter Muranyi danken.

Weiterer Dank gilt Dr. Rosanna Parlato für die Durchsicht meiner Arbeit und die wertvollen Hinweise, die zur Vollendung der Arbeit beigetragen haben.

I would like to extend my deepest appreciation to Ketrin Dimco for the knowledgeable guidance and the insightful feedback that enriched this work.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Malin Schmidt, Dr. Ammar Jabali und Dr. Fabio Marsoner, die mich herzlich in das Team am ZI integriert haben und mir stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite standen.

I truly appreciate the support and inspiration provided by Joaquin Campos. Thank you so much for your advice and the pleasant conversations.

Ein überaus herzlicher Dank geht an Lukas, Helene, Gina und Carolin. Ohne eure unzähligen Ratschläge und die Schaffung eines reibungslosen Ablaufs im Labor wäre diese Dissertation so nicht möglich gewesen.

Dankeschön an Elena, Jonas und Lukas für die regelmäßige und stets willkommene Ablenkung während unserer Weltreiseplanung – und an Simon und Pierre für das entspannte und angenehme WG-Leben in dieser Zeit.

Danke, Maxi, für dein geduldiges Korrekturlesen, deine ehrlichen Rückmeldungen – und dafür, dass du bei jeder Aktion mit am Start bist.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie – meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester – für ihre bedingungslose Unterstützung und all das, was sie im Kleinen wie im Großen für mich getan haben. Euch sind die folgenden Worte gewidmet:

ਇਸ ਦੁਨੀਆਂ ਦੀ ਕਿਸੇ ਵੀ ਭਾਸ਼ਾ ਵਿੱਚ ਉਹ ਸ਼ਬਦ ਨਹੀਂ ਬਣੇ, ਜਿਨ੍ਹਾਂ ਦੁਆਰਾ ਮੈਂ ਤੁਹਾਡਾ ਸ਼ੁਕਰੀਆ ਅਦਾ ਕਰ ਸਕਾਂ।

ਇਹ ਪੰਜਾਬੀ ਵਿੱਚ ਮੇਰੀ ਨਿਮਾਣੀ ਜਿਹੀ ਕੋਸ਼ਿਸ਼ ਹੈ, "ਧੰਨਵਾਦ"