



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

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

Autor: Parmpreet Singh
Institut / Klinik: Neurologische Klinik der Universitätsmedizin Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. J. Weishaupt

Die primäre familiäre Gehirnkalkifikation (primary familial brain calcification [PFBC]) ist eine komplexe neurodegenerative Erkrankung, die derzeit mit neun assoziierten Genen in Verbindung gebracht werden kann. In der neuroradiologischen Bildgebung weisen Betroffene häufig symmetrische, gefäßassoziierte Kalziumablagerungen unterschiedlicher Hirnareale auf. Auch das im Fokus dieser Arbeit stehende Gen *myogenesis regulating glycosidase* (MYORG) ist mit der PFBC assoziiert. Es unterliegt einem rezessiven Vererbungsmodus und weist im zentralen Nervensystem eine besonders hohe Expression im endoplasmatischen Retikulum von Astrozyten auf. Obwohl Mutationen in MYORG die zweithäufigste Ursache der genetisch aufgeklärten PFBC darstellen und eine fast 100-prozentige klinische Penetranz aufweisen, fehlen bis heute weitreichende Erkenntnisse zur Funktion von dem gleichnamigen Protein 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 die Erkrankung im Allgemeinen stehen zurzeit nicht zur Verfügung.

Mit dem Ziel, weitere Erkenntnisse zur MYORG-assoziierten PFBC zu generieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Expressionsanalysen unterschiedlicher Proteine in Zellkulturmodellen unter Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen und immortalisierten Astrozyten durchgeführt. Im ersten Teil wurden vier humane embryonale Stammzelllinien verwendet und zu induzierten Astrozyten differenziert. Zwei dieser Stammzelllinien waren genetisch unverändert, während die anderen beiden eine p.75*-Mutation im MYORG-Gen aufwiesen. Die Mutation führt zur Ausbildung eines Stoppcodons an der 75. Stelle des insgesamt aus 714 Aminosäuren bestehenden Proteins. Immunzytochemische Anfärbung von MYORG und dem ER-Marker Calnexin in den induzierten Astrozyten konnte in allen vier Zelllinien ein Signal für den verwendeten MYORG-Antikörper sowie eine Kollokalisierung des MYORG-Signals mit dem Calnexin nachweisen. Da das Vorhandensein der p.75*-Mutation durch eine Genotypisierung bestätigt wurde und diese zu einem Knockout von MYORG führen sollte, ist 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 erarbeitet. Unterschiedliche Konditionen dieses Modells wurden auf die zelluläre und nukleäre Oberfläche sowie die Expression von unterschiedlichen Markern untersucht. 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 können beschrieben werden, was insbesondere bei der Untersuchung der nukleären und zellulären Oberfläche sowie der GFAP- und MYORG-Intensität auffiel. Bezüglich der quantitativen Proteinanalyse der astrozytären Marker und MYORG scheint die Verwendung der Polyester-membraneinsätze und die damit einhergehende Kompartimentierung der Zellkulturplatte ebenfalls eine positive Auswirkung auf die Proteinexpression zu haben.

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 herangezogen werden können. Perspektivisch können daraus durch einige Modifikationen Krankheitsmodelle entwickelt und beispielsweise für die präklinische Verträglichkeits- und Wirksamkeitsprüfung neuer Therapien eingesetzt werden.