



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Neurogenetik
Direktorin Prof. Dr. med. Christine Klein
Universität zu Lübeck

**Primäre Familiäre Gehirnkalzifikation: Molekulare
Krankheitsmechanismen und Faktoren, die den Phänotyp
der Erkrankung modifizieren**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

Vorgelegt von
Christian Schiemenz
aus Forst (Lausitz)

Lübeck 2022

1. Berichterstatter*in: PD Dr. med. Daniel Alvarez Fischer
Ko-Betreuer*in: PD Dr. Ana Westenberger

2. Berichterstatter*in: Prof. Dr. rer. nat. Martin Kircher

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2023

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 31.05.2023

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vii
1. Einleitung	1
1.1 Primäre Familiäre Gehirnkalzifikation	1
1.2 Klinisches Erscheinungsbild der PFBC	2
1.3 Genetisches Grundlage der PFBC	4
1.4 Pathomechanismus der PFBC	9
1.5 Osteoklasten	12
1.6 Mitochondriale Funktion	14
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Geräte.....	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer	23
2.1.5 Enzyme.....	25
2.1.6 Software	25
2.1.7 Kits	25
2.1.8 Primer für die Genotypisierung.....	26
2.1.9 Humane Zellen	26
2.1.10 Mäuse	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere	28
2.2.2 Verhaltensversuche	30
2.2.2.1 Open-Field-Test.....	30
2.2.3 Intrazerebrale Injektion von 6-OHDA	30
2.2.4 Amphetamin-induzierten Rotationstest	32
2.2.5 Maustötung und Probengewinnung.....	32
2.2.6 <i>In-vitro</i> Osteoklastendifferenzierung aus humanen und murinen Monozyten	33
2.2.7 Osteolyse humaner und muriner Osteoklasten	37
2.2.8 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) muriner <i>Striata</i>	37

2.2.9 Mitochondriale Funktion muriner Leberproben	40
2.2.9.1 Mitochondrienisolation	40
2.2.9.2 Murine Komplex-I-Aktivität	41
2.2.9.3 Murine Citrat-Synthase-Aktivität	42
2.2.10 Messung der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate humaner Leukozyten mittels <i>Seahorse Analyzer</i>	43
2.2.11 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) humaner Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie	46
2.2.12 Allgemeine Methoden Zellkultur	50
2.2.13 Statistik	51
3. Ergebnisse	52
3.1 Verhaltensversuche	52
3.1.1 Open-Field-Test	52
3.1.2 Open-Field-Test nach intrazerebraler Injektion von 6-OHDA	54
3.1.3 Amphetamin-induzierter Rotationstest	56
3.2 HPLC – Messung des Dopaminstoffwechsels und der Neurotransmitter	57
3.2.1 Basaler Dopaminstoffwechsel	57
3.2.2 Effekte der 6-OHDA-Läsion auf die Gewebekonzentrationen von Dopamin und den Dopaminstoffwechsel	59
3.3 <i>In-vitro</i> Osteoklastendifferenzierung aus Monozyten und deren osteolytische Kapazität	61
3.3.1 Größe und Anzahl <i>in-vitro</i> differenzierter Osteoklasten	61
3.3.2 Ausmaß der Osteolyse differenzierter Osteoklasten	66
3.4 Murine Komplex-I-Aktivität	69
3.5 Messung der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate humaner Leukozyten mittels <i>Seahorse Analyzer</i>	70
3.6 Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) humaner Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie	70
4. Diskussion	72
4.1 Zeigen sich auch im hypomorphen Mausmodell (<i>Pdgfb^{ret/ret}</i>) Unterschiede im Verhalten im Vergleich zu ihren wildtyp Wurfgeschwistern und sind <i>Pdgfb^{ret/ret}</i> Mäuse empfänglicher auf ein Toxin-basierte Parkinsonmodell?	73
4.2 Zeigt sich im Mausmodell (<i>Pdgfb^{ret/ret}</i>) und bei humanen Mutationsträgern (<i>PDGFB^{wt/del(1-251)}</i>) eine reduzierte Anzahl, Größe und Funktionalität von Osteoklasten im Rahmen einer Differenzierung aus Monozyten/Makrophagen?	76
4.3 Zeigt sich im Mausmodell (<i>Pdgfb^{ret/ret}</i>) und bei humanen Mutationsträgern (<i>PDGFB^{wt/del(1-251)}</i>) eine teilweise reduzierte Aktivität in der Atmungskette und daraus resultierend Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential? ..	79

4.4 Fazit und Ausblick.....	81
5. Zusammenfassung	83
6. Literaturverzeichnis	85
7. Anhang	93
7.1 Ethikvotum.....	91
7.1 Tierversuchsantrag	93
8. Danksagung	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte	18
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialen	20
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	21
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Lösungen, Medien und Puffer	23
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Enzyme	25
Tabelle 6: Übersicht über die verwendete Software	25
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Kits	25
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Primer für die Genotypisierung der Mäuse	26
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Zelllinien	26
Tabelle 10: Reaktionsprofil der <i>touchdown</i> PCR	29
Tabelle 11: Seahorse Assay Protokoll	46
Tabelle 12: Medienzusammensetzung bei der Durchflusszytometrie	47
Tabelle 13: Einstellungsparameter in der Durchflusszytometrie	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CCT Aufnahmen von Patienten mit Mutationen im PDGFB Gen	3
Abbildung 2: Überblick der bisher bekannten Pathomechanismen der PFBC ...	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Osteoklastendifferenzierung mit den verschiedenen Vorläuferzellen.....	13
Abbildung 4: Beispiel einer HPLC-Eichkurve anhand der Bestimmung von Dopamin	39
Abbildung 5: HPLC-Beispielchromatogramm der Neurotransmitterbestimmung	39
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Absorption während der Komplex-I Messung	42
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Absorption während der Citrat-Synthase Messung	43
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Sauerstoffverbrauchsrate	44
Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der Selektionsparameter in der Durchflusszytometrie	49
Abbildung 10: Darstellung der zurückgelegten Wegstrecke für die 4 und 12 Monate alten Mäuse	52
Abbildung 11: Darstellung des Verhältnisses zwischen der in der Kernzone und außerhalb der Kernzone zurückgelegten Strecke für die 4 und 12 Monate alten Mäuse	53
Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung für einen Versuchsaufbau zur Messung der zurückgelegten Wegstrecke	53
Abbildung 13: Darstellung der zurückgelegten Wegstrecke für die 4 Monaten alten Mäuse vor und nach der intrazerebralen Injektion	54
Abbildung 14: Darstellung der zurückgelegten Wegstrecke für die 12 Monate alten Mäuse vor und nach der intrazerebralen Injektion	55
Abbildung 15: Darstellung des Verhältnisses zwischen der in der Kernzone und außerhalb der Kernzone zurückgelegten Strecke vor und nach intrazerebraler Injektion von 6-OHDA für die 4 und 12 Monate alten Mäuse	56
Abbildung 16: Darstellung der netto Drehungen nach rechts nach peritonealer Injektion von Amphetamine für die 4 und 12 Monate alten Mäuse	57
Abbildung 17: Darstellung der basalen Dopaminkonzentrationen der linken Striata für die 4 und 12 Monats Mäuse	58

Abbildung 18: Darstellung des Dopaminumsatzes mittels DOPAC/DA der linken <i>Striata</i> für die 4 und 12 Monats Mäuse	59
Abbildung 19: Darstellung der Dopaminkonzentrationen des rechten <i>Striatums</i> im Verhältnis zur Dopaminkonzentration des linken <i>Striatums</i> für die 4 und 12 Monats Mäuse	60
Abbildung 20: Darstellung des Dopaminumsatzes durch DOPAC/DA im Verhältnis zum kontralateralen <i>Striatum</i> für die 4 und 12 Monats Mäuse	61
Abbildung 21: Darstellung der Anzahl an gebildeten Osteoklasten für die 4 und 12 Monats Mäuse	62
Abbildung 22: Darstellung der Größe der gebildeten Osteoklasten für die 4 und 12 Monats Mäuse	63
Abbildung 23: Darstellung der Anzahl an gebildeten Osteoklasten für die humanen Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und deren Kontrollen	64
Abbildung 24: Darstellung der Größe der gebildeten Osteoklasten für die humanen Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und deren Kontrollen	65
Abbildung 25: Beispielhafte mikroskopische Abbildung von differenzierten humanen Osteoklasten nach 12 Tagen Differenzierung	65
Abbildung 26: Darstellung der durch Osteolyse betroffenen Fläche für die 4 Monats und 12 Monats Mäuse	66
Abbildung 27: Beispielhafte mikroskopische Abbildung der durch Osteolyse betroffenen Fläche für die 4 und 12 Monats Mäuse	67
Abbildung 28: Darstellung der durch Osteolyse betroffenen Fläche für die humanen Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und deren Kontrollen	68
Abbildung 29: Beispielhafte mikroskopische Abbildung der durch Osteolyse betroffenen Fläche für die humanen Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und deren Kontrollen	68
Abbildung 30: Darstellung der Komplex-I-Aktivität bei aus Mäuselebern isolierten Mitochondrien	69
Abbildung 31: Darstellung der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate für die humane Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und deren Kontrollen	70
Abbildung 32: Darstellung des mitochondrialen Membranpotentials für die humanen Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und deren Kontrollen	71

Abkürzungsverzeichnis

®	<i>registered</i>
™	<i>trademark</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cCT	craniale Computertomographie
cMRt	craniale Magnetresonanztomographie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C>T	Mutation, Basenaustausch Cytosin zu Thymin
del	deletiert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	<i>Et alii, al aliae, et alia</i>
fwd	forward
G	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	<i>hour</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
JAM2	<i>junctional adhesion molecule 2</i>
kDa	kilo Dalton
M	Molar
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MYORG	<i>myogenesis regulation glycosidase</i>
NUV	<i>neurovascular unit</i>
PDGFB	<i>platelet-derived growth factor beta</i>
PDGFRB	<i>platelet-derived growth factor receptor beta</i>
PiT2	<i>phosphate inorganic transporter 2</i>
pH	<i>potential hydrogenii</i>
PFBC	<i>Primary familial brain calcification</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
rev	reverse
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler
SLC20A2	<i>solute carrier family 20 member 2</i>
Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TRAP	<i>tartrate acid phosphatase</i>

u. a.	und andere
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	Westernblot
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
XPR1	<i>xenotropic and polytropic murine leukemia retrovirus receptor 1</i>
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Primäre Familiäre Gehirnkalzifikation

Bei der Primären Familiären Gehirnkalzifikation (*engl. primary familiar brain calcification, PFBC*) handelt es sich um eine seltene, genetische, neuropsychiatrische Erkrankung. Sie ist definiert durch bilaterale, gefäßassoziierte, intrazerebrale Kalkablagerungen, vor allem in den Basalganglien, aber auch in der subkortikalen weißen Substanz, dem *Thalamus* und dem *Cerebellum*, ohne das Vorhandensein sekundärer Krankheitsursachen wie zum Beispiel ein Ungleichgewicht im Serum Phosphat-, Calcium- oder Parathormon-Spiegel (Manyam 2005; Westenberger, Balck, und Klein 2019). Ältere Bezeichnungen für diese Erkrankung sind „Morbus Fahr“ und idiopathische Basalganglien Verkalkung (*engl. idiopathic basal ganglia calcification, IBGC*), die heute aufgrund ihrer ungenauen Nomenklatur und nachweislich genetischen Ursache nicht mehr gebräuchlich sind (Klein und Vieregge 1998; Westenberger und Klein 2014). Die Ursache für die Erkrankung und den damit einhergehenden Nachweis der Kalzifikationen liegt an monogenetischen Veränderungen in bisher sechs nachgewiesenen Genen *SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB*, *XPR1*, *MYORG* und *JAM2* (Cen u. a. 2020; Westenberger, Balck, und Klein 2019).

Die vorliegende Arbeit stellt eine umfassende funktionelle Untersuchung des Krankheitsmechanismus eines Subtyps des PFBC dar, nämlich des PFBC, das durch Mutationen im *PDGFB*-Gen verursacht wird. Zur Untersuchung wurde auf ein Mausmodell des Morbus Parkinson zurückgegriffen und sowohl die Osteoklasten- als auch Mitochondrienfunktion am gleichen Mausmodell und an humanen Mutationsträgern untersucht.

Zur allgemeinen Verständlichkeit wird im Folgenden zunächst ein Überblick über das klinische Erscheinungsbild, die genetischen Grundlagen der PFBC und die bisherigen Theorien zum Pathomechanismus dargestellt. Es folgt dann die Beschreibung der Osteoklasten- und Mitochondrienfunktion die in diesem Zusammenhang noch nicht eingehend beleuchtet wurden und die detaillierte Fragestellung dieser Arbeit.

1.2 Klinisches Erscheinungsbild der PFBC

Die Erstbeschreibung von Gehirnkalzifikationen erfolgte im 19. Jahrhundert in einem Autopsiebericht in dem von intrazerebralen, bilateralen Kalzifikationen vor allem im *Striatum* berichtet wurde (A. Delacour 1850). Der Begriff „Morbus Fahr“ wurde dann als Überbegriff für alle bilateralen Kalzifikationen nach einer Fallbeschreibung im Jahr 1930 geprägt (Fahr 1930). Mit nun deutlich besserer Verfügbarkeit und genauerer neuroradiologischer Bildgebung zeigen sich intrazerebrale Kalzifikationen als zufälliger Nebenbefund zu ca. 1 % bei jüngeren und bis über 20 % bei älteren Patienten, wobei sie dem natürlichen Alterungsprozess ohne vermehrte klinische Relevanz zugerechnet werden (Fürstl u. a., 1992; Simoni u. a., 2008; Yamada u. a., 2013). Der genaue Pathomechanismus für die Entstehung der Kalzifikationen ist bisher allerdings ungeklärt.

In der Datenbank der *Movement Disorder Society Genetic mutation database (MDSGene)* waren im Jahr 2021 die klinischen und genetischen Daten von 516 Patienten mit PFBC aufgelistet. Die neuroradiologische Penetranz der Kalzifikationen ist bei PFBC nahezu vollständig, sodass bei 407 dieser Patienten Kalzifikationen nachgewiesen werden konnten. Bei all diesen Patienten zeigten sich Kalzifikationen in den Basalganglien. Zusätzlich zu den Basalganglien waren Kalzifikationen zu 58 % im *Cerebellum*, zu 53 % im *Thalamus* und zu 43 % in der subkortikalen weißen Masse zu finden (Balck u. a. 2021). Der Anteil an Patienten mit nur einer Läsion betrug dabei 28 %, mit zwei Läsionen 21 %, mit drei Läsionen 24 % und mit vier Läsionen bei 27 %. Es zeigte sich außerdem, dass die Anzahl der Läsionen bei höherem Alter der ersten klinischen Untersuchung höher ist und auch das die Gene *JAM2* und *MYORG* zu durchschnittlich mehr Kalzifikationen führen. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Symptomen mit jeder weiteren Läsion zunimmt. Das Ausmaß der Kalzifikationen ist aber sowohl innerhalb einer Familie mit PFBC stark schwankend und nimmt gleichzeitig mit dem Alter weiter zu (Grütz u. a. 2016; Tadic u. a. 2015). Beispielhaft sind in Abbildung 1 einmal ein unterschiedliches Ausmaß und unterschiedliche Lokalisationen für Kalzifikationen dargestellt. Es zeigten sich allerdings zuletzt bei zwei Mutationsträgern von pathogenen Mutationen in *SLC20A2* und *PDGFB*, im Alter von 14 und 20 Jahren noch keine Kalzifikationen in

der durchgeföhrten cranialen Computertomographie (cCT) (Grütz u. a. 2016; Keogh u. a. 2015).

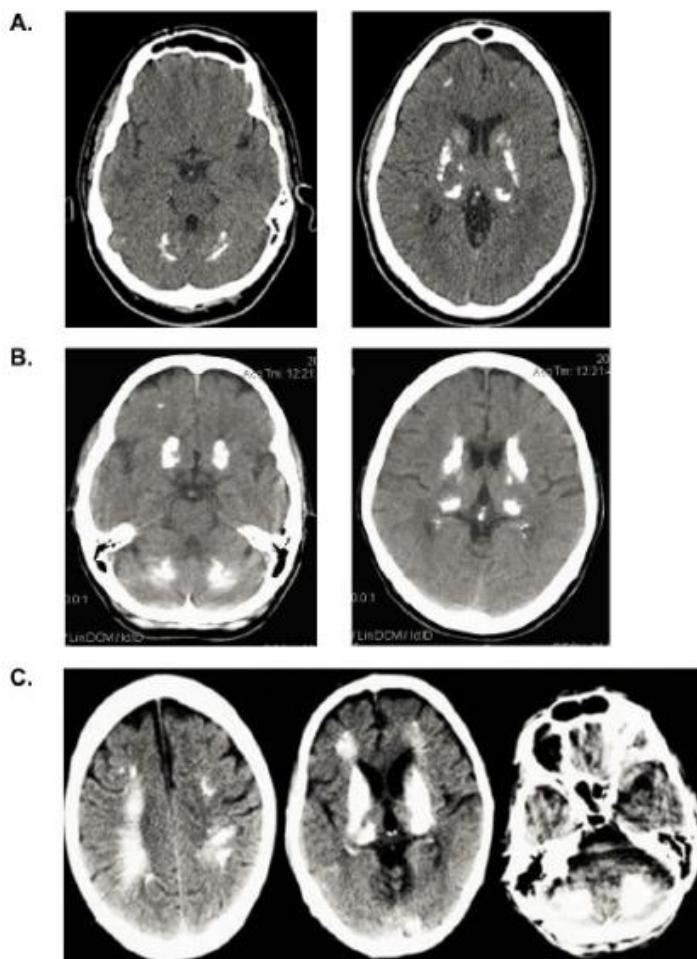


Abbildung 1: CCT Aufnahmen von Patienten mit Mutationen im *PDGFB* Gen.
Gezeigt sind in A milde, in B moderate und in C starke Kalzifikationen. Abbildung entnommen aus Keller u. a., 2013.

Die zweite Ebene der Krankheitsmanifestation ist der klinische Phänotyp. Im Gegensatz zur nahezu vollständigen radiologischen Penetranz zeigen sich Symptome nur bei ca. 67,6 % aller PFBC Patienten im Laufe ihres Lebens. Von den bisher dokumentierten Fällen hatten 22 Patienten einen Krankheitsbeginn unter dem 10. Lebensjahr und 16 Patienten über dem 70. Lebensjahr. Die klinischen Symptome sind sehr heterogen. Etwa 27 % der klinisch betroffen Patienten haben motorische Einschränkungen und bei etwa 31 % zeigen sich nichtmotorische Krankheitssymptome. Dagegen liegen bei etwa 42 % eine Kombination aus beiden Symptomgruppen vor. Das Spektrum der motorischen Einschränkungen ist für die sechs bisher bekannten Gene recht unterschiedlich. Bei den motorischen Einschränkungen entfiel mit 27 % der größte Teil auf Parkinsonismus, welcher sich

vor allem bei *SLC20A2* und *PDGFRB* zeigte. Sprachstörung zeigten sich bei 78 % der Patienten mit Mutationen in *MYORG* und insgesamt bei 26 %. Die restlichen motorischen Störungen wie zum Beispiel Bradykinese oder posturale Instabilität schwankten zwischen 2,5 % und 3 %. Bei den nichtmotorischen Störungen zeigten sich kognitive Defizite in 34 %, Kopfschmerzen in 26 %, Depressionen in 13 %, Psychosen in 9 % und Angststörungen in 6 % der Fälle. Bei *SLC20A2* und *MYORG* standen vor allem die kognitiven Defizite im Vordergrund, während es bei *PDGFB* Kopfschmerzen waren. Das Alter zu Krankheitsbeginn ist schwer festzulegen, da es für den radiologischen Phänotyp bisher nicht exakt ermittelt werden konnte und es für die klinischen Manifestation aufgrund der großen Heterogenität stark variiert. In Bezug auf die klinische Manifestation zeigte sich der Median bei 43 Jahren, wobei die Spannweite vom ersten bis zum 87. Lebensjahr reicht. Es zeigen sich hier auch Unterschiede zwischen den einzelnen Genen. So ist der Median der klinischen Manifestation bei *PDGFB* deutlich niedriger als bei *SLC20A2*, *XPR1* oder *MYORG*. Auch aufgrund der sehr heterogenen klinischen Manifestation scheint PFBC eine deutlich unterdiagnostizierte Erkrankung zu sein. So berechnete Nicolas u. a. durch eine Analyse von ca. 138.000 Genomen eine minimale Prävalenz von 4,5 pro 10.000 (Gaël Nicolas u. a. 2018). Hier ist hinzuzufügen, dass in der Analyse nur nach vier der bisher sechs bekannten Gene gesucht wurde.

1.3 Genetisches Grundlage der PFBC

Bisher sind 219 verschiedene pathogene Mutationen in den sechs verschiedenen PFBC Genen bekannt. Dabei entfallen ca. 54 % der Fälle auf *SLC20A2* – als Gen für einen Phosphatimporter, ca. 22 % auf *MYORG* – einem Regulator für Proteinglykosylierung, ca. 10 % auf *PDGFB* – einem Liganden für die Angiogenese, ca. 5,0 % auf *XPR1* – einem Phosphatexporter und jeweils ca. 4 % auf *PDGFRB* – dem Rezeptor für *PDGFB* und 4 % auf *JAM2* - ein Adhäsionsmolekül bei Zell-Zell-Kontakten. (Balck u. a. 2021) Zu den bisher gefundenen verschiedenen pathogenen Varianten gehören sowohl kleine Sequenzveränderungen wie *missense*, *nonsense*, *frameshift*, *in-frame* Deletionen und Insertionen, *splice-site* Veränderungen, Veränderungen im ersten oder letzten Codon, als auch größere Veränderungen wie Deletionen einzelner Exone, Gruppen von Exonen oder sogar des ganzen Gens. Während es sich bei den Genen *MYORG* und *JAM2* um eine autosomal rezessive

Vererbung handelt, werden die vier anderen Gene autosomal dominant vererbt. (Cen u. a. 2020; Westenberger, Balck, und Klein 2019)

Bei dem zuerst im Jahr 2012 entdeckten und für PFBC verantwortlich Gen, handelt es sich um *SLC20A2* (*engl. solute carrier family 20 member 2*), welches einen Typ III Natrium abhängigen Transporter für anorganisches Phosphat (*engl. phosphate inorganic transporter 2, PiT2*) kodiert und als Homodimer auf der Zellmembran für den Phosphatimport verantwortlich ist (Wang u. a. 2012). Das Gen wird in verschiedenen Geweben auf unterschiedlichem Niveau exprimiert, wobei es genau in den Regionen im Gehirn höher exprimiert wird, in denen es zu den Kalzifikationen kommt. In einem *Knockout* Mausmodell für *SLC20A2* zeigten sich intrazerebrale Kalzifikationen im *Thalamus*, den *Basalganglien* und im *Cortex* die mit zunehmenden Alter in Größe und Anzahl zunehmen (Jensen u. a. 2013; 2018). Außerdem zeigten sich aufgrund reduzierter Mineraldichte Veränderungen im Skelett der Tiere in Form von verkürzter Wirbelsäule, Femur und Tibia (S. Yamada u. a. 2018).

Das nächste Gen, verantwortlich für PFBC, ist *PDGFRB* (*engl. platelet-derived growth factor receptor*) und wurde Anfang 2013 in einer französischen Großfamilie mit drei betroffenen Generationen entdeckt (G. Nicolas u. a. 2013). Es kodiert für eine gleichnamige auf der Zellmembran lokalisierte Rezeptor Tyrosinkinase bei der es durch Bindung ihres Liganden PDGF-B und PDGF-D (*engl. platelet-derived growth factor beta/delta*) in Form eines Homodimers zur Autophosphorylierung der intrazellulären Seitenketten und somit zur Aktivierung der Signalkaskade kommt. Der Rezeptor ist besonders wichtig in der Initiierung der Angiogenese, zur Ausbildung einer dichten Blut-Hirn-Schranke und wird exprimiert in vaskulären glatten Muskelzellen, Perizyten und Neuronen. (Andrae, Gallini, und Betsholtz 2008) In Mausmodellen, bei mit Funktionsverlust entweder von PDGF-R β oder PDGF-B vollständig, kam es zu ausgeprägten Gefäßleckagen und perinataler Letalität (Gaengel u. a. 2009). Bisher wurden zum einen mehrere *missense* Mutationen beschrieben, die durch Haploinsuffizienz im Bereich der Kinase zu einem kompletten oder vollständigen Verlust der Autophosphorylierung führen (Arts u. a. 2015) und zum anderen eine weitere Mutation, welche die Stabilität des Rezeptors verringert (Sanchez-Contreras u. a. 2014).

Ende 2013 konnte dann Keller u. a., durch den Nachweis von *missense* und *nonsense* Mutationen im *PDGFB* Gen in sechs Familien, das dritte verantwortliche Gen finden, indem die Mutationen durch Haploinsuffizienz zu einem Funktions- oder kompletten Verlust des Proteins führen. Gleichzeitig konnten Sie durch ein Mausmodell mit hypomorphen, teilweise inaktivierten *Pdgfb* (*Pdgfb^{ret/ret}*) einen Nachweis für die Pathogenität erbringen, da die Mäuse ebenfalls intrazerebrale Kalzifikationen entwickeln, welche mit dem Alter zunehmen (Keller u. a. 2013). Das gleiche Mausmodell wird auch in dieser Doktorarbeit verwendet. Der Mechanismus für dieses Mausmodell beruht darauf, dass PDGF-B mit seinem C-terminalem Ende, welches als Retentionsmotiv dient, an die Zelloberfläche der Perizyten bzw. an die direkt umgebende extrazelluläre Matrix bindet. Diese räumliche Nähe ist notwendig für die Ausbildung einer dichten Blut-Hirn-Schranke (Gaengel u. a. 2009). In diesem Mausmodell fehlt nun das Retentionsmotiv, weshalb sich das PDGF-B weiter von den Perizyten entfernen kann, somit ein deutlich geringerer lokaler Effekt und eine weniger dichte Blut-Hirn-Schranke entsteht. Die Bezeichnung *Pdgfb^{ret/ret}* wird im Folgenden synonym für *Knockouts* des Retentionsmotivs verwendet wobei weiterhin das hypomorphe PDGF-B sezerniert wird. PDGF-B (*engl. platelet-derived growth factor beta*) ist der hauptsächliche Ligand für PDGF-R β , bindet als Homodimer und wird vor allem von vaskulären glatten Muskelzellen, Perizyten, Megakaryozyten und Neuronen exprimiert (Andrae, Gallini, und Betsholtz 2008). Analog zum *SLC20A2 Knockout* Mausmodell zeigten die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse im Alter von 2 Monaten zunächst kleine, noch nicht kalzifizierte Läsionen, in den gleichen Regionen wie beim Menschen, die im Verlauf in Anzahl, Größe und Grad der Kalzifikation zunehmen (Jensen u. a. 2013; 2018; Keller u. a. 2013). Das Ausmaß der Kalzifikationen zeigte dabei innerhalb der *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse sowie auch beim Menschen starke interindividuelle Unterschiede (Zarb u. a. 2019). Essenziell dabei ist, dass eine transgene Re-Expression von PDGF-B im Endothel, aber nicht in den Neuronen, die Überlebensfähigkeit von *Pdgfb Knockouts* sicherte und damit die Rolle des Gefäß-assoziierten PDGF-B für die Entstehung der Kalzifikationen hervorhebt (Keller u. a. 2013). Im Gegensatz zu den *SLC20A2 Knockouts* zeigten sich bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen aber keinerlei Veränderungen im Skelett (S. Yamada u. a. 2018; Zarb u. a. 2019). Dagegen zeigten sich aber Auffälligkeiten im Verhalten im Sinne von sensormotorischen Defiziten, Hyperaktivität, angeborenes angstähnliches Verhalten und reduziertes Kurzzeitgedächtnis, die auch zum Teil in Patienten mit PFBC zu finden sind (Zarb u. a. 2019). Es konnte auch der

Zusammenhang zwischen den Kalzifikationen aufgrund des gestörten PDGF-B/PDGF-R β -Signalweges und dem daraus resultierenden Perizytenverlustes mit Minderung der Blut-Hirn-Schranke bestätigt werden. Interessanterweise zeigte sich dabei aber bei den *Pdgfb*^{ret/ret} Mäusen, dass genau in den Abschnitten mit den meisten Kalzifikationen eine erhöhte Perizytendichte und geringe Leckage der Blut-Hirn-Schranke vorlag (Vanlandewijck u. a. 2015). Weiterhin wurden im Bereich der gefäßassoziierten Kalzifikationen Zellen mit Expressionsmustern für Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten nachgewiesen, welche ein osteogenes Milieu mit infolgedessen Bildung von Kalkablagerungen erzeugen sollen. Diese Ossifikation im Bereich der neurovaskulären Einheit (*engl. neuro vascular unit, NVU*) führen wohl zu einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten, was neurotoxische Entzündungsprozesse fördert (Zarb u. a. 2019). Inwieweit eine verringerte Differenzierung von Osteoklasten einen Einfluss auf den Abbau der Kalkablagerungen oder ein verändertes mitochondriales Membranpotential als Ausdruck einer höheren Neigung zur Apoptose hat, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Das vierte für PFBC betroffene Gen ist *XPR1* (*engl. xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1*) und wurde 2015 durch den Nachweis einer *missense* Mutation in einer amerikanischen Großfamilie mit neun betroffenen Familienmitgliedern gefunden (Legati u. a. 2015). Es kodiert für einen gleichnamigen membrangebundenen Rezeptor, der für den Export von anorganischem Phosphat verantwortlich ist und somit gemeinsam mit PiT2, kodiert über *SLC20A2*, für die Phosphat-Homöostase verantwortlich ist (Giovannini u. a. 2013). In Mäusen konnte eine besonders hohe Expression im *Cerebellum* und *Striatum* gezeigt werden, welche mit der Expression von PiT2 und den Bereichen der Kalzifikationen korreliert (ref?). Interessanterweise scheint XPR1 gemeinsam mit PDGFR-B einen Komplex auf der Zelloberfläche zu formen, wobei auch gezeigt werden konnte, dass die in *XPR1* gefundene Mutation zu einer Auflösung eben dieses Komplexes zu führen scheint (Yao u. a. 2017). In Zebrafischen, die eine Mutation in *xpr1b*, einem Ortholog für das humane *XPR1*, aufweisen, konnte ein Verlust von Mikroglia und eine Dysfunktion von Makrophagen, welche über eine resultierende Funktionseinschränkung der Osteoklasten zu einer veränderten Knochenstruktur im Sinne einer Osteopetrosen führt, gezeigt werden (Meireles u. a. 2014).

Da bisher nur für etwa die Hälfte der PFBC Patienten eine eindeutige Mutation gefunden wurde, suchte Yao u. a. 2018 spezifisch nach Mutationen in den Familien in denen bis dahin keine Mutation der bisher bekannten Genen gefunden wurde, welche eine autosomal rezessive Form der PFBC hervorrufen können. Sie konnten auf diese Weise in sechs Familien insgesamt neun verschiedene Mutationen in MYORG (*engl. myogenesis-regulating glycosidase*) nachweisen, die jeweils zu einem Funktionsverlust führen. Dabei zeigten sich drei *nonsense*, vier *missense* Mutationen und zwei Insertionen bzw. Deletionen, die relativ gleichmäßig über das Gen verteilt sind und erneut die ausgeprägte Heterogenität in der Genetik der PFBC aufzeigen. MYORG kodiert eine Glycosyl-Hydroxylase, lokalisiert vorrangig im endoplasmatischen Retikulum und teilweise im Golgi-Apparat, die wohl an der Glykolisierung von Proteinen beteiligt ist, deren genaue Funktion bisher unklar bleibt. In Mäusen konnte eine ubiquitäre und besonders hohe Expression im *Cerebellum* nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine spezifische Expression in Astrozyten, nicht aber in Perizyten oder Oligodendrozyten. In einem *Knockout* MYORG Mausmodell zeigten sich erstaunlicherweise zwar intrazerebrale Kalzifikationen, die aber erst im Alter von 9 Monaten festgestellt wurden und somit deutliche später als im *Pdgfb^{ret/ret}* Mausmodell. Weiterhin zeigte sich in den bisher bekannten Mutationsträgern deutlich stärkere und homogener Kalzifikationen. So zeigte sich in 94 % der Patienten Kalzifikationen in drei bis vier unterschiedlichen Regionen (Balck u. a. 2021). Auch die Symptomatik scheint wesentlich ausgeprägter als bisher in PFBC beschrieben (Grangeon u. a. 2019; Yao u. a. 2018).

Auf der weiteren Suche nach Mutationen die zu einer autosomal rezessiven Form der PFBC führen, konnte Cen u. a. und Schottlaender u. a. im Jahr 2020 JAM2 (*engl. junctional adhesion molecule 2*) als sechstes Gen im Zusammenhang mit PFBC identifizieren. Dabei konnten insgesamt sieben verschiedene Mutationen in sieben unterschiedlichen Familien gefunden werden, die zu einem Funktionsverlust bzw. zum kompletten Verlust des Proteins führen (Cen u. a. 2020; Schottlaender u. a. 2020). Das Gen kodiert für das funktionale Adhäsionsmolekül 2, welches an der Zell-Zell Adhäsion von Endothelzellen beteiligt ist, beim Menschen im Gehirn, insbesondere im *Nucleus caudatus* und in der Maus besonders in Astrozyten exprimiert wird (Cen u. a. 2020; Palmeri u. a. 2000). Ebenso wie bei MYORG führt in Funktionsverlust von JAM2 zu besonders ausgeprägten intrazerebralen

Kalzifikationen, die multiple kortikale Regionen occipital, temporal, frontal und parietal betreffen. In der bisher geringen Anzahl an Mutationsträgern zeigte sich eine sehr heterogene Klinik mit vorrangig Parkinsonismus und Sprachstörungen, die ausgeprägter und früher als bei den bisherigen Genen auftritt (Cen u. a. 2020). In einem *Jam2 Knockout* Mausmodell zeigten sich zwar keine intrazerebralen Kalzifikationen, dafür aber eine ausgeprägte Vakuolenbildung in den gleichen Regionen wie die Kalzifikationen beim Menschen. In Verhaltensversuchen zeigten sich dafür aber Bewegungsstörungen ähnlich der humanen Pathologie (Schottlaender u. a. 2020).

Analog zu *PDGFB* und *PDGFRB* zeigen sich auch beim Rezeptor von *JAM2* kodiert über *JAM3* ausgeprägte intrazerebrale Kalzifikationen, wobei es sich hierbei um eine komplexe Störung mit kongenitalen massiven Hämorrhagien, Zystenbildung und subependymalen Kalzifikationen handelt (Mochida u. a. 2010).

Auch Mutationen in *OCLN*, einem Gen welches für Occludin, einem dritten Adhäsionsmolekül im Bereich von *tight junctions* von Endothelzellen kodiert, führen zu einem komplexen kongenitalen Krankheitsbild mit bandförmigen Kalzifikationen und reduzierter Gyrierung (O'Driscoll u. a. 2010).

Beide Störungen werden zwar nicht der PFBC zugeordnet, zeigen aber, dass eine Reduzierung der Zell-Zell Kontakte zu intrazerebralen Kalzifikationen führen kann.

1.4 Pathomechanismus der PFBC

In Anbetracht der bisher entdeckten sechs betroffenen Gene und deren bekannten Funktionen ergeben sich zwei vorrangige, sich nicht gegenseitig ausschließende Hypothesen über die zu Grunde liegenden Pathomechanismen für die Bildung der gefäßassoziierten Kalkablagerungen, deren genaue Entstehung aber nicht endgültig aufgeklärt werden konnte.

Zum einen scheint ein gestörtes Phosphat-Gleichgewicht zur Bildung der Kalkablagerung zu führen, was die gefundenen Mutationen in *SLC20A2* und *XPR1*, welche jeweils für einen Phosphatimporter und -exporter kodieren, nahelegen. Während die Phosphat-Homöostase im Blut mittlerweile ausführlich beschrieben wurde, ist über die genaue Steuerung des intrazellulären Phosphat-Gleichgewichts nur wenig bekannt. Der durch *SLC20A2* kodierte Phosphatimporter PiT2 scheint

dabei gemeinsam mit dem durch *SLC20A1* kodierten Phosphatimporter PiT1 heterodimere in Skeletzellen zu bilden, die den extrazellulären Phosphatgehalt wahrnehmen. Beide sind für den Phosphatimport verantwortlich und beeinflussen dadurch intrazelluläre Signalwege (Bon u. a. 2018). *In-vitro* Experimente zeigten kürzlich die Wechselwirkungen zwischen *XPR1* und *SLC20A2* (ref). Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Überexpression als auch eine Verringerung der Expression an *SLC20A2* durch eine gegenläufige Anpassung des Phosphatexportes über *XPR1* ausgeglichen wurde und der intrazelluläre Phosphatgehalt relativ konstant gehalten werden konnte. Auf der anderen Seite hingegen führte ein Funktionsverlust von *XPR1* zu einem Anstieg des intrazellulären Phosphat- und daraus folgend auch ATP-Gehaltes. *XPR1* scheint dabei über Inositol Pyrophosphate einen regulatorischen Einfluss auf PiT2 zu haben und bildet wie oben schon erwähnt einen Komplex mit PDGF-R β auf der Zelloberfläche, welcher sich durch die bisher in *XPR1* gefundenen Mutation aufzulösen scheint. (López-Sánchez u. a., 2020; Yao u. a., 2017).

Der zweite wahrscheinliche Pathomechanismus beruht auf einer Störung der neurovaskulären Einheit (NVU), die aus Neuronen, Astrozyten, Endothelzellen der Blutgefäße, Myozyten, Perizyten und Komponenten der extrazellulären Matrix besteht. Durch ihre enge anatomische und chemische Verbindung registrieren sie die Bedürfnisse der Neurone und beliefern diese durch entsprechende Anpassungen zum Beispiel im Rahmen von Vasokonstriktion oder Vasodilatation (Muoio, Persson, und Sendeski 2014). Maßgeblich hierbei scheint die Abnahme der Gefäßdichtigkeit zu sein, wie uns *PDGFB*, *PDGFRB* und *JAM2* zeigen. Die genaue Rolle von *MYORG* ist dabei zwar unklar, hier ist aber hervorzuheben, dass es spezifisch in Astrozyten exprimiert wird, welche durch ihre Fortsätze engen Kontakt mit den Perizyten und Endothelzellen haben (Cen u. a. 2020). Abgesehen davon scheinen auch weitere Veränderungen innerhalb der NVU eine Rolle bei der Bildung der Kalkablagerungen zu spielen. So postulierte Zarb u. a. eine osteogenes Milieu innerhalb der NVU die folglich zu neurotoxischen Entzündungsprozesse führen (Zarb u. a. 2019). In Abbildung 2 sind einmal zusammenfassend die einzelnen Mechanismen für die 6 betroffenen Gene dargestellt.

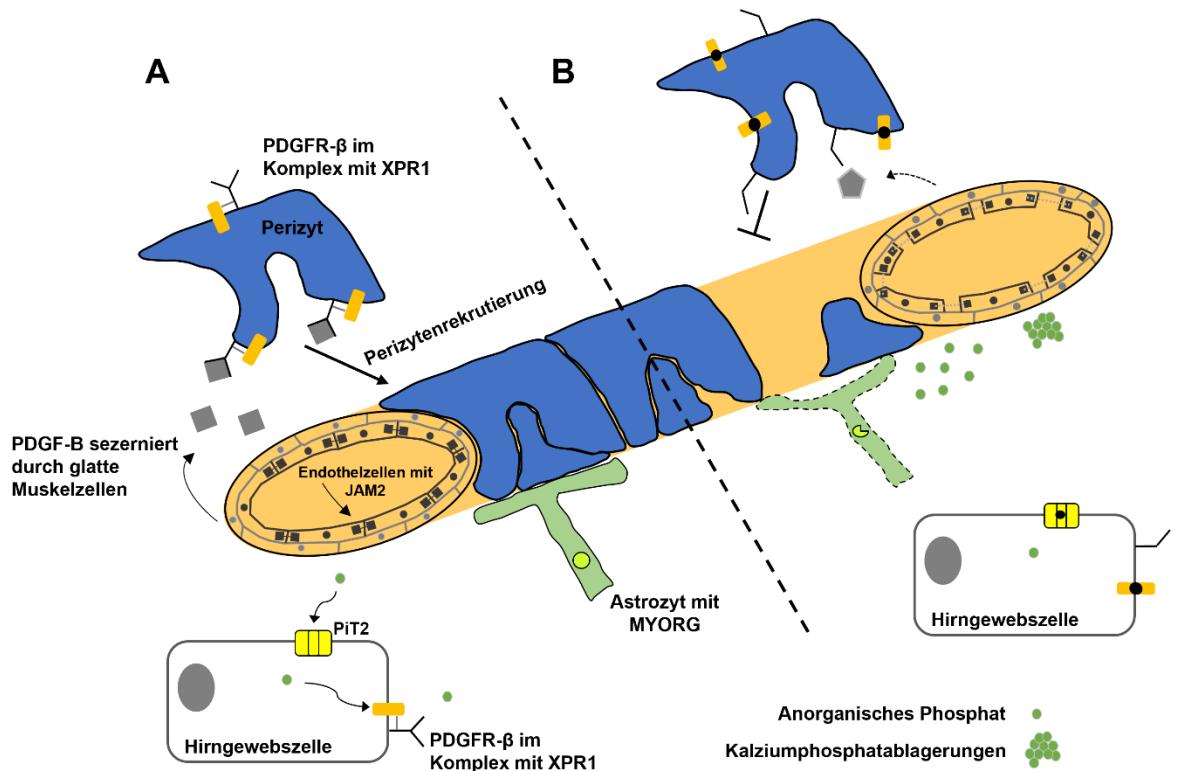


Abbildung 2: Überblick der bisher bekannten Pathomechanismen der PFBC. In A ist der physiologische Zustand gezeigt. Oben mit der Perizytenrekrutierung während der Angiogenese über die Sezernierung von PDGF-B, welches an PDGFR- β bindet. In der Mitte mit einem über JAM2 dicht verschlossenem Endothel und Astrozyten mit funktionsfähigem MYORG, dessen genaue Funktion aber noch unklar ist. Unten mit PiT2 als Phosphatimporter und XPR1 als Phosphatexporter welcher einen Komplex mit PDGFR- β bildet. In B ist der pathologische Zustand gezeigt. Die Perizytenrekrutierung ist wie im oberen Abschnitt gezeigt unvollständig aufgrund von weniger oder fehlerhaften PDGF-B auf der einen Seite und Veränderungen im Rezeptor PDGFR- β auf der anderen Seite. In der Mitte ist ein undichtes Endothel aufgrund des Funktionsverlustes von JAM2 und die Dysfunktion der Astrozyten aufgrund des Funktionsverlustes von MYORG zu sehen. Unten sind der gestörte Phosphatimport und Phosphatexport dargestellt. Man beachte die Auflösung des Komplexes aus XPR1 und PDGF-R β . Aus jeder einzelnen dieser Veränderungen kommt es zu gefäßassoziierten Kalzifikationen. Abbildung entnommen und angepasst aus Tadic u. a., 2015.

Trotz des zuletzt deutlichen Fortschrittes bei den genetischen Ursachen und den daraus zu postulierenden Pathomechanismen ist es bisher nicht gelungen die sehr heterogenen Symptome innerhalb der PFBC zu erklären. In dieser Arbeit beschäftigten wir uns daher ergänzend zu den bereits bestehenden möglichen Pathomechanismen mit der Rolle von *PDGFB* in der Funktionsfähigkeit von Monozyten im Hinblick auf ihre Fähigkeit zu funktionsfähigen Osteoklasten zu differenzieren und mit dem Einfluss auf die mitochondriale Funktion.

1.5 Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die durch Fusion von mononukleären Vorläuferzellen aus der Monozyten-Makrophagen Familie oder dendritischen Zellen entstehen (Miyamoto 2011). Während ihre osteolytische Funktion durch die Bildung von Resorptionslakunen und dem Abbau des Knochenmaterials über die Sekretion von lysosomalen Enzymen wie Cathepsin K, TRAcP (*engl. Tartrate-resistant acid phosphatase*) sowie Protonen schon lange bekannt ist, konnten in den letzten Jahren auch weitere Funktionen wie die Phagozytose von apoptotischen Zellen, die Präsentation von Antigenen, die T-Zell Aktivierung und die Modulation von Immunreaktionen beschrieben werden (Madel u. a. 2019). Die Population der Osteoklasten ist dabei weit weniger homogen als bisher angenommen und kann unter verschiedenen Bedingungen aus verschiedenen Vorläuferzellen entstehen und dadurch auch unterschiedliche Aufgaben erfüllen (Madel u. a. 2019). Udagawa u. a. ist es 1990 erstmals gelungen *in-vitro* Osteoklasten zu differenzieren, wobei hier noch Knochenmarks Stromazellen benötigt wurden, um die richtigen Faktoren zur Differenzierung bereit zu stellen (Udagawa u. a. 1990). In den folgenden Jahren konnten M-CSF (*engl. monocyte macrophage-colony-stimulating factor*) und RANKL (*engl. receptor activator nuclear factor κB ligand*) als die nötigen Faktoren zur Differenzierung von Osteoklasten identifiziert werden, welche durch die Stromazellen im Knochenmark und auch Osteoblasten exprimiert werden. Die Wirkung von M-CSF ist notwendig für die Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen, während RANKL letztendlich für die Differenzierung in Osteoklasten in Anwesenheit von M-CSF verantwortlich ist und deshalb auch als Osteoklasten Differenzierungsfaktor (*engl. osteoclast differentiation factor, ODF*) bezeichnet wird (Takeshita, Kaji, und Kudo 2000; Teitelbaum 2000). Während der Differenzierung kommt es zu spezifischen morphologischen Veränderungen. So entstehen zunächst spindelförmige Pro-Osteoklasten, aus denen sich dann kleine, runde Pre-Osteoklasten entwickeln, welche dann zu den endgültigen Osteoklasten fusionieren, wobei diese eine variable Größe und Anzahl an Zellkernen haben. Parallel zu den morphologischen Veränderungen, kommt es auch zu vielfältigen Änderungen in der Genexpression. So sinkt zum Beispiel die Expression von Osteopontin (OPN), während die Expression von TRAP (*engl. tartrate-resistant acid phosphatase*) immer weiter ansteigt. (Takeshita, Kaji, und Kudo 2000) Eine schematische Darstellung der Osteoklastendifferenzierung mit der einhergehenden

Veränderung der Genexpression ist in Abbildung 3 gezeigt. Eine wichtige Rolle spielt außerdem noch die Zelldichte, welche einen Einfluss sowohl auf die Größe als auch die Aktivität der gebildeten Osteoklasten hat (Lees und Heersche, 1999).

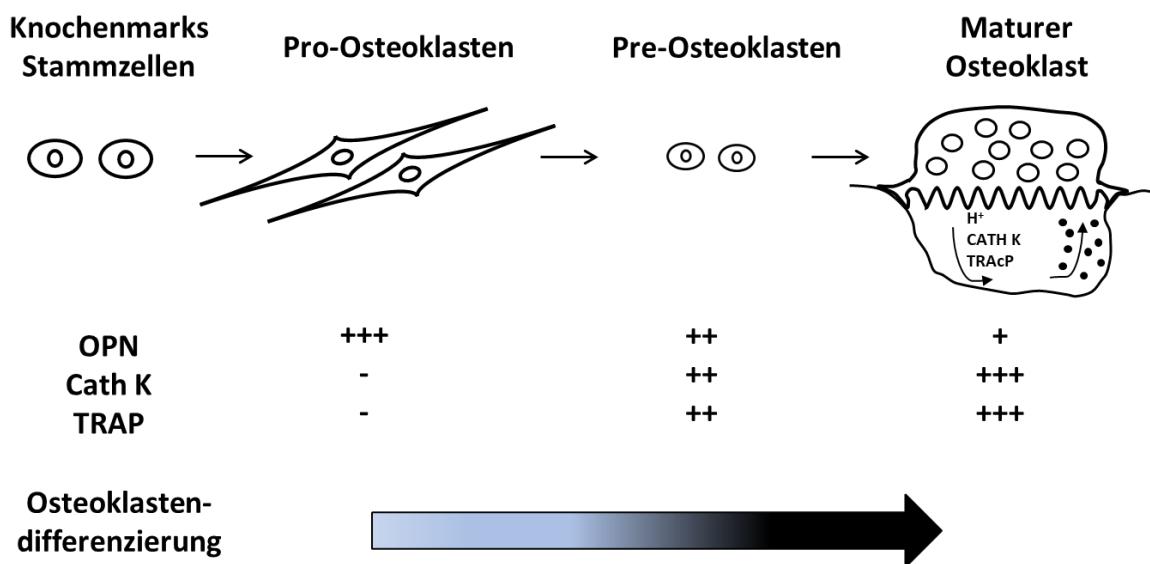


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Osteoklastendifferenzierung. Dargestellt sind die verschiedenen Vorläuferzellen bis hin zu osteolytisch aktiven maturen Osteoklasten mit Sekretion von Cathepsin K, TRAcP und Protonen in die Resorptionslakunen. Gezeigt sind außerdem die morphologischen Veränderungen und Änderung der Genexpression im Verlauf der Differenzierung. Abbildung entnommen und angepasst aus Boyle *u. a.*, 2003 und Teitelbaum, 2000.

Die Stimulation mittels M-CSF führt in Zellkulturen außerdem zur Bildung größerer Osteoklasten und zu einer höheren osteolytischen Aktivität (Lees und Heersche, 1999). Neben dem Beitrag zur Differenzierung sorgt RANKL ebenfalls für eine dosisabhängige Aktivitätssteigerung und verlängert das Überleben maturer Osteoklasten (Boyle, Simonet, und Lacey 2003). Andererseits gehört RANKL aber auch zur Familie der Tumornekrosefaktoren (*engl. tumor necrosis factor, TNF*) was zu einer Aktivierung während Entzündungsvorgängen und somit zu inflammatorischen Läsionen führt (Merkel *u. a.* 1999).

PDGF-B wird unter anderem von Makrophagen produziert und spielt eine große Rolle in der Wundheilungsaktivität sowohl im Knochen als auch im Weichgewebe (D. Li *u. a.* 2017). Präosteoklasten sezernieren PDGF-B um endotheliale Vorläuferzellen (*engl. endothelia progenitor cells, EPCs*) und mesenchymale Stammzellen (*engl. mesenchymal stem cells, MSCs*) während der Angiogenese zu mobilisieren und so die Angiogenese mit der Osteogenese zu verbinden (Xie *u. a.*

2014). Es konnte gezeigt werden, dass PDGF-B dabei an der Chemotaxis und Proliferation von Osteoblasten beteiligt ist, dabei aber gleichzeitig deren Funktion vermindert (Enck, Abushahin, und Bossaer 2014; Kubota u. a. 2002; Sanchez-Fernandez u. a. 2008). Auf der anderen Seite führt PDGF-B auch zu einer verstärkten Chemotaxis von Osteoklasten Vorläuferzellen und führt zu einer verstärkten Osteoklastogenese (D. Li u. a. 2017). Microarray Analysen zeigten kürzlich, dass PDGF-B während der Differenzierung von Osteoklasten mit einem Maximum nach 60 h selbst exprimiert wird. Erfolgte die Differenzierung auf einer Dentinschicht, sodass sie funktionell aktiv sein konnte, erhöhte sich die Sekretion sogar noch weiter. Da auch PDGF-R β transient während der Osteoklastogenese exprimiert wird, ist hier von einer autokrinen oder parakrinen Stimulation auszugehen. (Rahman u. a. 2015) *In-vitro* Experimente zeigten außerdem, dass eine selektive Inhibierung von PDGF-R β zu einer verminderten Bildung von Osteoklasten führte (D. Li u. a. 2017). Nun konnte durch Zarb u. a. der Nachweis von Markern für Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten im Bereich der Gefäß-assoziierten Läsionen erbracht werden (Zarb u. a. 2019). Über die zeitliche Abfolge oder die Funktionalität dieser Zellen gibt es bisher keine Daten. Es ist bisher auch unklar ob die Kalzifikationen durch Osteoblasten gebildet werden oder im Rahmen von Entzündungsprozessen entstehen. Inwieweit ggf. die Kapazität zum Abbau solcher Läsionen vermindert sein kann, ist bisher auch unklar. In dieser Arbeit untersuchten wir die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten und deren Fähigkeit zur Osteolyse als Parameter ihrer Funktionalität.

1.6 Mitochondriale Funktion

Mitochondrien haben neben der Aufgabe die Zellen mit Energie über die Synthese von ATP zu versorgen noch viele wichtige andere Aufgaben. Sie sind unter anderem auch zentraler Bestandteil im Apoptose Signalweg und beeinflussen verschiedene Calcium abhängige Zellprozesse in dem sie als intrazellulärer Calciumspeicher dienen und so auch die intrazelluläre Akkumulation von Kalk verhindern (Camello-Almaraz u. a. 2006; Seifert 1997). Die Assoziation zwischen mitochondrialer Dysfunktion und intrazerebralen Kalkablagerungen zeigt sich im Rahmen der Basalganglien Kalzifikationen bei Mitochondriopathien (Finsterer und Kopsa, 2005) Beispiele hierfür sind das MELAS Syndrom (*engl. mitochondrial encephalopathy*,

lactic acidosis, stroke-like episodes), welches erstmals zusammenhängend 1984 durch Pavlakis u. a. und das MERRF-Syndrom (*engl. myoclonic epilepsy with ragged red fibres*), welches 1973 durch Tsaris u. a. beschrieben wurde (J. Finsterer 2004; Pavlakis u. a. 1984). Einen Hinweis auf eine veränderte mitochondriale Funktion zeigt sich gegebenenfalls in einem veränderten mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$). Dieses entsteht durch die negative Ladung im Inneren des Mitochondriums aufgrund des elektrochemischen Protonengradienten durch den aktiven Protonentransport innerhalb der Atmungskette. Es konnte in einigen Untersuchungen gezeigt werden, dass ein früher Schritt in der Apoptose eine Öffnung von mitochondrialen Poren und die damit verbundene Depolarisation und Freisetzung von apoptotischen Transmittern wie Cytochrom C und Caspasen ist. (Ly, Grubb, und Lawen 2003) Zuletzt konnte auch in Makrophagen eine Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials beim Übergang in Apoptose beschrieben werden. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass die Apoptose von Makrophagen ein wichtiger und charakteristischer Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose ist, auch wenn dies eine andere Erkrankung ist (H. Li u. a. 2018). Im Gegensatz zur Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials und den Übergang in Apoptose konnte Deuse u. a. eine vorübergehende Hyperpolarisierung und damit einhergehend Resistenz gegen Apoptose in glatten Muskelzellen aufzeigen. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass PDGF-B zum einen zu einer Hyperpolarisierung mit erhöhter Proliferation und Resistenz gegenüber Apoptose aber auch zu einer Dedifferenzierung der glatten Muskelzellen führte (Deuse u. a. 2014). Auf der anderen Seite wurde durch Perry et. al gezeigt, dass in Neuronen von Ratten auch eine Hyperpolarisierung im Rahmen der Apoptose stattfinden kann (Perry u. a. 2005). Um herauszufinden ob möglicherweise eine Mitochondriopathie als Ursache oder Einflussfaktor für die Bildung der gefäßassoziierten Kalkablagerung vorliegt, untersuchten wir in dieser Arbeit die mitochondriale Funktion.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, weitere Mechanismen aufzuklären, die zur PFBC führen, indem die Effekte eines partiellen Funktionsverlustes des *platelet-derived growth factors beta* (PDGF-B) auf i) motorische Phänotypen, ii) Osteoklastogenese und Funktion der Osteoklasten und iii) Funktion der Mitochondrien in einem hypomorphen *Pdgfb*-Mausmodell untersucht werden. Für ii) und III) standen auch Proben von humanen Mutationsträger zur Verfügung.

Prämissse 1: Die klinischen Symptome und deren initiales Auftreten in PFBC sind sehr heterogen und reichen von Bewegungsstörungen, psychischen Störungen, kognitiven Einschränkungen bis hin zu epileptischen Anfällen oder lediglich Kopfschmerzen. Als überwiegendes motorisches Defizit zeigt sich hierbei Parkinsonismus.

Hypothese 1: Die Versuchstiere des hypomorphen *Pdgfb*-Mausmodells zeigen ein verändertes Verhalten und sind empfindlicher gegenüber dem dopaminergen Toxin 6-OHDA, das in einem etablierten Modell zur Parkinsonerkrankung verwendet wird.

Ziel 1: Nachweis eines veränderten Verhaltens anhand einer Laufstrecken Analyse im Open-Field-Test und einer erhöhten Suszeptibilität mittels Amphetamine-induzierten Rotationstests im Toxin-basierten Parkinsonmodell mit 6-OHDA bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen, sowie die Analyse auf Transmitterebene mittels HPLC.

Prämissse 2: Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die sich aus mononukleären Vorläuferzellen aus der Monozyten-Makrophagen Familie oder dendritischen Zellen differenzieren und essenziell für die Resorption von Kalzifikationen sind. PDGF-B beeinflusst die Differenzierung und führt unter anderem zu einer verstärkten Chemotaxis von Osteoklasten Vorläuferzellen und zu einer verstärkten Osteoklastogenese.

Hypothese 2: Sowohl im hypomorphen *Pdgfb*-Mausmodell als auch bei humanen Mutationsträgern ist die Differenzierung und Funktionalität von Osteoklasten aus Monozyten/Makrophagen aufgrund eines partiellen Funktionsverlustes gestört.

Ziel 2: Nachweis einer reduzierten Osteoklastogenese mittels *In-vitro* Osteoklastendifferenzierung und einer reduzierten Osteoklastenfunktion mittels Osteolyse Assay bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen und bei humanen Mutationsträgern.

Prämissen 3: Es konnte bereits gezeigt werden, dass PDGF-B zu einer Hyperpolarisierung von glatten Muskelzellen führt. Der partielle Funktionsverlust von PDGF-B und die daraus gegebenenfalls folgende Aktivitätsänderung in der Atmungskette sowie einer möglichen Änderung im mitochondrialen Membranpotential wurden bisher nicht untersucht.

Hypothese 3: Es lassen sich Änderungen in der Atmungskette im *Pdgfb*-Mausmodell und Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential von Monozyten bei humanen Mutationsträgern nachweisen.

Ziel 3: Nachweis einer veränderten Komplex-I-Aktivität bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen mittels Absorptionsanalyse isolierter Mitochondrien aus murinen Leberproben. Ergänzend dazu der Nachweis einer Änderung der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate mittels Seahorse Analyzer und einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials mittels Durchflusszytometrie bei Lymphozyten von humanen Mutationsträgern.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoreseapparatur EPS 301	Armersham Pharmacio Biotech, Little Chalfont (Großbritannien)
Autoklav Systec V-150	Systec, Linden (Deutschland)
CO ₂ -Inkubator Heracell™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<i>Digital mouse stereotactic instrument</i>	Stoelting Co., Wood Dale (USA)
Eismaschine AF80	Scotsman, Vernon Hills (USA)
Elektronisches Rührwerk VOS 14	VWR™, Radnor (USA)
Feinwaage ACJ/ACS	Kern, Balingen Frommen (Deutschland)
<i>Flow Cytometer BD™ LSR II</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Gefrierschrank (- 20 °C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe (Deutschland)
Gefrierschrank TSE Series (- 80 °C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Geldokumentation™ <i>ChemiDoc MP Imaging System</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Gelkamera Canon EOS 700D	Canon, Ota (Japan)
Gelkammer Agarose Typ Mini	G&P-Kunststofftechnik GbR, Kassel (Deutschland)
Hamilton Mikroliter Spritze	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
Heizblock <i>Digital Heatblock</i>	VWR International, Radnor, Deutschland
Heizrührer	IKA Werke GmbH & Co, Staufen im Breisgau (Deutschland)
Homogenisator-Glasgefäße mit PTFE-Pistill, zylindrisch 15 mL	schuett-biotec GmbH, Göttingen (Deutschland)
<i>HPLC Autosampler Ultimate 3000</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
HPLC elektrochemischer Detektor Ultimate 3000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
HPLC Pumpe UltiMate 3000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
HPLC Säule, <i>Column Nucleosil C-18 125 x 3 mm 100-3</i>	Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin (Deutschland)
Infrarot-sensitive Kamera	Biobserve GmbH, Bonn (Deutschland)

Kombi-Vortex-Zentrifuge combispin FVL-2400 N	Biosan, Riga (Lettland)
KOPF® 921, Mikroinjektions Einheit für Stereotakt	David Kopf Instruments, Tujunga (USA)
Kühlschrank (4 °C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe (Deutschland)
Mikroskop ApoTone Axiovert 200 M	Zeiss, Jena (Deutschland)
Mikroskop BX53	Olympus, Hamburg (Deutschland)
Mikroskop BZ 9000	Keyence, Neu-Isenburg (Deutschland)
Mikroskop Wilovert A	Hund, Wetzlar (Deutschland)
Mikrovolumen-Spektralphotometer, Nano Drop™ 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Mikrowelle Microwave 800	Severin, Sundern (Deutschland)
Minizentrifuge Sprout	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
<i>Open-Field-Arenen (50 x 50 cm)</i>	Biobserve GmbH, Bonn (Deutschland)
Pellet Pestle™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
pH-Meter inoLAB	WTW, Weilheim (Deutschland)
Pipettensatz (0,5 - 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipettierhilfer pipetus®	VWR International, Radnor (Deutschland)
Plate Reader Synergy HT	BioTek Instruments Inc., Winooski (USA)
Powersupply Eps 301	Amersham Pharmacia Biotech EPS301, Little Chalfont (Großbritannien)
Powersupply Power Pac Basic Bio RAP	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Rotator	VWR™, Radnor (USA)
Seahorse XFe24 Analyzer	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
Sealsafe plus Kunststoff Mäusekäfig mit Metallabdeckung	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg (Deutschland)
Sicherheitswerkbank HeraSafe™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Sonicator SONOPULS	Bandelin <i>electronic</i> , Berlin (Deutschland)
<i>Thermocycler Mastercycler pro, vapo protect</i>	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
<i>Thermocycler MJ Mini Personal Thermal Cycler</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
<i>Thermocycler PTC-100™ Programmable Thermal Controller</i>	MJ Research Inc., Reno (USA)
Tischzentrifuge Combi-spin	Biosan, Riga (Lettland)

UV-Tisch <i>Dark Hood DH-50</i>	Biostep, Burkhardtsdorf (Deutschland)
Waage 572	Kern, Balingen Frommern (Deutschland)
Wasserbad	VWR, Radnor (Deutschland)
Zählkammer Neubauer <i>Bright-Line</i>	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshof (Deutschland)
Zellzähler Countess™ <i>Automated Cell Counter</i>	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zentrifuge Heraeus <i>Instruments Biofuge stratos</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1 S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
BIOHIT Proline 0,5-10 µL Pipettenspitze	Biohit, Helsinki (Finnland)
Biosphere <i>Filter Tips Low Retension</i> (0,5 - 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Biosphere <i>Plus Filter Tips</i> (0,5 - 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Boerdelflasche 1,1 mL mit 1 mm Rollrand	WICOM Germany GmbH, Heppenheim (Deutschland)
Bordelkappen Alu	WICOM Germany GmbH, Heppenheim (Deutschland)
Countess™ <i>cell counting chamber slides</i>	Invitrogen, Carlsbad, (USA)
Deckgläser	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH, Braunschweig
Flow Cytometrie Tubes 5 mL	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver (Kanada)
Glas Pasteurpipetten	Th. Geyer GmbH und Co. KG, Renningen (Deutschland)
Klebefolie <i>optical clear</i>	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Kryogefäße (2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Mäusefutter, Pellets	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage (Deutschland)
Multiply -µStrip Pro 8er Kette (0,2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)

Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ Systen (8 Well Glas Slide)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Osteo Assay Surface Polystyren 1x8 Stripwell™ Microplate	Corning Inc., Corning (USA)
Pipettenspitzen (0,5 µL – 1000 µL)	Starlab, Hamburg (Deutschland)
Pipettenspitzen TipOne 10/20 µL XL Graduated Tips	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Polypropylen-Röhrchen Falcon™ (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Pre-Separation Filter (40 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5/ mL, 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Seahorse Cell Culture Plates & Cartridges	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
Serologische Pipetten (2 mL, 5 mL, 10 mL und 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Sterilfilter (0,2 µm, Zelluloseacetat-Membran)	GE Healthcare, Little Chalfont (Großbritannien)
Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm²)	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
2,3-Dihydroxybenzoësäure (2,3 DHBA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
2,5-Dihydroxybenzoësäure (2,5 DHBA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoësäure (DTNB)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
6-Hydroxydopamin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Acetonitril HPLC grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
Acetyl-CoA	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Amphetamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Antimycin A	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)

Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg (Deutschland)
Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Cell and Tissue Adhesive CORNING® CELL-TAK™	Corning Inc., Corning (USA)
DAPI Lösung	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DMEM, <i>high glucose</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dopamin (DA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
gepuffertem Formaldehyd nach Lille 4,5 %	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Glukose-Lösung Gibco™ (200 g/L)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Glukose-Lösung (450 g/L) 2,5 M	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Glycerin 30 % (v/v)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Größenstandard 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Hepes Puffer Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Histopaque®-1083	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Homovanillinsäure (HVA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
HPLC-Wasser	Avantor Performance Materials, Center Valley (USA)
Kaliumcyanid (KCN)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ketamin 10 % (v/v)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ladepuffer (NuPage)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
L-Glutamin 200 µM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Midori Green	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Natriumbikarbonat Puffer (NaHCO_3) 0,1 M	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumhypochlorit 10 % (v/v)	VWR International, Radnor (USA)
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)

Natriumpyruvat 100 µM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Oligomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Opti-MEM I Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Oxalacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
PenStrep (10.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Perchlorsäure 0,4 N (HClO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<i>Recombinant Human M-CSF (carrier free)</i>	BioLegend®, San Diego (USA)
<i>Recombinant Human TRANCE (RANKL) (carrier free)</i>	BioLegend®, San Diego (USA)
<i>Recombinant Mouse M-CSF (carrier free)</i>	BioLegend®, San Diego (USA)
<i>Recombinant Mouse TRANCE (RANKL) (carrier free)</i>	BioLegend®, San Diego (USA)
Rotenon (C ₂₃ H ₂₂ O ₆)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Seahorse Medium	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
Test mobile Phase für HPLC	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM ⁺)	Invitrogen, Carlsbad, (USA)
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ubiquinon	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Valinomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Xylazin 2 % (v/v)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Lösungen, Medien und Puffer.

Bezeichnung	Ansatz	Verwendung
6-OHDA Injektionslösung	Zielkonzentration von 2 µg/µL in steril filtrierter, 0,2 mg/mL Ascorbinäsure-Aqua Lösung	Toxin-basiertes 6-OHDA Parkinson Mausmodell
Antimycin A 1µM	1 µL 100 mM Stock Antimycin A + 1000 µL Assay Medium → mischen → 100 µL Mix + 900 µL Assay Medium	Seahorse

DAPI-Lösung 100 µM	10 µL 1 mM Stock DAPI, 990 µL PBS	Durchflusszytometrie
FCCP 2 µM	1 µL 50 mM Stock FCCP + 1250 µL Assay Medium → mischen → 600 µL Mix + 600 µL Assay Medium	Seahorse
FCCP 10 mM	2 µL 50 mM stock FCCP, 8 µL Methanol	Durchflusszytometrie
Fließmittel	1.200 mL Test mobile Phase, 80 mL Acetonitril, Sterilfiltration	Fließmittel für HPLC
Intraperitoneales Maus Betäubungsmittel	Ketamin 10 %, Xylazin 2 %	Betäubungsmittel bei intrazerebraler Injektion
Ladepuffer für Agarosegele	30 % (v/v) Glycerin, 70 % (v/v) Wasser, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau	Genotypisierung
Makrophagen- differenzierungs- medium	DMEM, 1 % (v/v) Natriumpyruvat, 0,1 % (v/v) 2- Mercaptoethanol, 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Penicillin- Streptomycin-Lösung	Osteoklasten- differenzierung
Natriumhydroxid- Lösung 50 mM	100 mg NaOH in 50 mL Aqua Dest.	Genotypisierung
Oligomycin 2 µM	1 µL 40 mM Stock Oligomycin, 2000 µL Assay Medium	Seahorse
RPMI-Medium	RPMI, 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Glukose, 1 % (v/v) Pen/Strep, 1 % (v/v) Hepes, 1 % (v/v) Natriumpyruvat	Kultivierungsmedium Jurkat-Zellen
Seahorse Assay Medium	25 mL Seahorse Medium, 0,1 mL 2,5 M Glukose-Lösung, 0,25 mL 100 µM Natriumpyruvat, 0,25 mL 200 µM L-Glutamin, aufwärmen bis 37 °C, pH mit 1 M NaOH bis 7,4, Sterilfiltration	Medium Seahorse Assay
TBE-Puffer (1x)	89 mM TRIS (pH 8,3 bei 20 °C), 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA	Gelelektrophorese
TMRM ⁺ 100 nM	110 µL 10 µM Stock TMRM ⁺ , 11 mL Opti-MEM	Durchflusszytometrie
TRIS-Puffer 1 M, pH 7,6	121,14 g TRIS, 1 L H ₂ O, HCl bis pH 7,6	Genotypisierung
Valinomycin 1 mM	2 µL 10 mM Stock Valinomycin, 18 µL PBS	Durchflusszytometrie

2.1.5 Enzyme

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Taq DNA Polymerase</i>	MP Biomedicals, Santa Ana (USA)

2.1.6 Software

Tabelle 6: Übersicht über die verwendete Software.

Bezeichnung	Hersteller
Agilent Seahorse Analytics	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (USA)
BD FACSDiva™ Software	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Bildbearbeitungsprogramm imageJ 1.50b	NIH, Bethesda (USA)
Gen5 1.05 Datenanalyse-Software	BioTek Instruments Inc., Winooski (USA)
Image Lab 6.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Integrationssoftware Chromeleon 6.20	Dionex Softron GmbH, Germering (Deutschland)
Microsoft Office 2016 für Windows	Microsoft, Redmond (USA)
Stereo Investigator	MBF Bioscience, Williston (USA)
Tracking Analysis Software	Biobserve GmbH, Bonn (Deutschland)
Zotero	George Mason University (USA)

2.1.7 Kits

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Kits.

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
<i>Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase</i>	Reverse Transkription von RNA in cDNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
TRACP & ALP double-stain Kit	Osteoklastenanfärbung	Takara Bio Inc., Kyoto (Japan)

2.1.8 Primer für die Genotypisierung

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Primer für die Genotypisierung der Mäuse.

Primer	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Annealing Temperature [°C]	Hersteller
WT fwd	CAT GCT GCC TTG TAA TCC GTT C	63,9	Eurofins Scientific SE, Luxemburg (Luxemburg)
WT rev	CGG CGG ATT CTC ACC GT	63,3	Eurofins Scientific SE, Luxemburg (Luxemburg)
Ret fwd	CTC GGG TGA CCA TTC GGT AA	63,1	Eurofins Scientific SE, Luxemburg (Luxemburg)
Ret rev	TCT AAG TCA CAG CCA GGG AGT AGC	63,3	Eurofins Scientific SE, Luxemburg (Luxemburg)

2.1.9 Humane Zellen

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Zelllinien	Hersteller
Jurkat ACC 282	DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig (Deutschland)

Zusätzlich zu der kommerziellen Jurkatzelllinie wurden auch Monozyten bzw. Lymphozyten aus venösem humanem Vollblut isoliert und für die Differenzierung in Osteoklasten, Funktionsanalyse mittels Osteolyse, Messung des mitochondrialen Membranpotentials und Messung der Sauerstoffverbrauchsrate verwendet. Hierfür wurden Blutproben von 2 Mutationsträgern ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) einer Familie – Mutter (71 Jahre alt) und Sohn (41 Jahre alt) - mit jeweils 2 Proben ähnlich alter Kontrollen – 44 und 46 Jahre bzw. 63 und 74 Jahre – verglichen. Bei der festgestellten Mutation handelt es sich um eine heterozygote Deletion des $PDGFB$ Exon eins bis drei (c.(?_+1)_ $(250+1_251-1)del$), welche wahrscheinlich zu einer fehlenden Translation des Proteins führt (Balck u. a. 2020).

2.1.10 Mäuse

Für die Etablierung der eigenen Zucht wurden ursprünglich zusammen 12 Mäuse als hetero- und homozygot *Knockout* für das Retentionsmotiv von *Pdgfb* (*Pdgfb*^{ret/wt} oder *Pdgfb*^{ret/ret}) (Keller u. a., 2013) von dem Institut für Neurochirurgie des Universitätsspitals Zürich geliefert. Alle weiteren Mäuse entstammten der hauseigenen Verpaarung. Die Linie ist auf einen C57/Bl6 Hintergrund mit mehr als 10 Generationen.

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, jeweils an 4 und 12 Monate alten Tieren mit einem Standardgewicht von 20-32 g durchgeführt. In einem Alter von 4 Monaten haben die Tiere erst beginnende Kalzifikationen, während in einem Alter von 12 Monaten eine starke Kalzifikation vorliegt (Keller u. a., 2013). Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen mit einer Raumtemperatur von 23 \pm 1 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit 55 \pm 5% und zwölfständigem Hell-Dunkel-Rhythmus mit Licht an um 6:30 Uhr gehalten. Ein Kunststoffkäfig mit Metallabdeckung und individueller Belüftung wurde mit bis zu maximal 6 Tieren besetzt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter in Form von Pellets und Trinkwasser aus Kunststoffflaschen.

Die Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch die zuständige Behörde, dem Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume (Aktenzeichen V 242-7224.122-20 (50-4/15)).

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurde zunächst DNA aus Gewebeproben isoliert, mit dem Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) spezifische Genabschnitte vervielfältigt und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese auf ihre spezifische Länge überprüft.

Die Genotypisierung erfolgte zweimalig - einmal Anhand von Biopsien nach Geburt der Mäuse und ein zweites Mal mittels Gewebeproben der Schwanzspitzen, nach Tötung der Mäuse. Die Biopsien bzw. Schwanzspitzen wurden nach der Entnahme bzw. Tötung zunächst in 1,5 mL Reaktionsgefäß bei - 80 °C gelagert. Für die Genotypisierung wurden sie auf Eis aufgetaut. Von den Schwanzspitzen wurde jeweils ein etwa 1 mm³ großes Stück mit einer sterilen Schere abgetrennt und für die Genotypisierung verwendet. In jedes Reaktionsgefäß wurden dann 100 µL 50 mM Natriumhydroxid-Lösung hinzugegeben und anschließend für 55 Minuten bei 95 °C und auf einem Schüttler mit einer Rotationsstärke von 200 inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Reaktionsgefäß durch kurzes Invertieren und Zentrifugieren gemischt. Nun wurden je 11 µL 1 M TRIS-Puffer hinzugeben und erneut gemischt, um den pH der Lösung auf 7,6 einzustellen. Nach einer Zentrifugation von 8 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur wurde der DNA-Gehalt des Überstandes stichprobenartig mittels NanoDrop Sepkralphotometer gemessen. Als Lösungsmittelabgleich diente dabei eine Lösung aus 50 mM Natriumhydroxid und 1 M TRIS-Puffer. Die Proben wurden anschließend bei 4 °C gelagert.

Bei der PCR wird ein durch die Oligonukleotid-Sequenzen zweier Primer festgelegter Abschnitt enzymatisch amplifiziert. Die Spezifität einer PCR beruht auf der Anlagerung zweier ca. 20 Nukleotid langen Oligonukleotiden an eine komplementäre Zielsequenz, die eine Bindestelle für Polymerase bildet und dadurch die Länge des Amplifikats festlegen. Anschließend kann diese mittels Agarosegelelektrophorese überprüft werden. Als Matrize für die PCR diente die aus den Biopsien isolierte DNA. Für die PCR-Reaktion dienten jeweils 2 µL der extrahierten DNA als Matrize gemischt mit 7,23 µL *aqua-bidest*, 1,5 µL 10x Puffer, 3 µL 0,1 mM dNTP-Mix, 0,6 µL 0,1 mM *forward* und *reverse* Primer sowie 0,07 µL *Taq*-Polymerase. Das finale Volumen der Ansätze betrug somit 15 µL. Jeder PCR-

Reaktionsdurchlauf beinhaltete auch eine Negativkontrolle mit *aqua-bidest* anstelle der aus den Versuchstieren isolierten DNA und zwei Positivkontrollen mit Wildtyp und heterozygoten Genotyp. Das Reaktionsprofil der PCR mit den einzelnen Teilschritten ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Reaktionsprofil der touchdown PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
Initiale Denaturierung	95 °C	15 Minuten	1x
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	40x
<i>annealing</i>	60/60*/50 °C	30 Sekunden	10x/20x*/10x
Elongation	72 °C	30 Sekunden	40
Finale Elongation	72 °C	10 Minuten	1x
Endtemperatur	4 °C	unbegrenzt	1x

* in diesem Zyklus wird die *annealing* Temperatur in jedem Schritt um 0,5 °C von 60 °C auf 50 °C gesenkt

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die Proben zunächst bei 4 °C gelagert. Die Auf trennung der PCR-Produkte und dadurch folgende Zuordnung der Genotypen in Wildtyp, heterozygot und homozygot für das Retentionsmotiv erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Separierung beruht auf der negativen Ladung der DNA, die dem elektrischen Feld im Agarosegel folgt und durch die Dichte des Gels anhand ihrer Größe getrennt werden.

Für die Herstellung eines 1,5 % (w/v) Agarosegels wurden 4,5 g Agarose in 300 mL 1x TBE gelöst und solange erhitzt, bis keine Schlieren mehr vorhanden waren. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden pro 100 mL Gellösung 5 µL *Midori Green* zugesetzt und gemischt. Anschließend wurde die handwarme Lösung in eine Gelkammer gegossen, um dort bei Raumtemperatur auszuhärten.

Für die Beladung der Ladetaschen wurden 7 µL der PCR Produkte mit 5 µL Lade puffer verdünnt und in die Ladetaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 25 Minuten. Die Bestimmung der Länge der PCR-Produkte erfolgte über den Vergleich zum Größenstandard, der in einer separaten Ladetasche mitgelaufen ist. Die Detektion und Dokumentation der Nukleinsäuren erfolgten mittels UV-Licht und *argusX1 viewer software*. Die Größe für die Sequenz des Wildtyp-Allels betrug 340 Basenpaare. Die Größe für die *Pdgfb*^{ret/ret} mit dem fehlenden Retentionsmotiv betrug 212 Basenpaare. Lagen Banden für beide Allele vor, so handelte es sich um heterozygote Versuchstiere.

2.2.2 Verhaltensversuche

2.2.2.1 Open-Field-Test

Dieser Versuch wurde dazu verwendet, die in einer Box zurückgelegte Wegstrecke innerhalb von 25 Minuten zu messen und zu untersuchen, ob die Mäuse sich in bestimmten Arealen innerhalb der Box vermehrt aufgehalten haben, was ein Hinweis für ein verändertes Verhalten sein kann.

Der Versuchsaufbau bestand aus 8 Tierversuchsboxen mit infrarot Licht beleuchteten Bodenplatten mit einer Größe von jeweils 50 x 50 cm. Über den Boxen waren 2 Kameras angebracht, die jeweils 4 Boxen gleichzeitig filmen konnten. Die Experimente wurden zwischen 9 und 11 Uhr in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, sodass die Mäuse vor hellem Hintergrund gefilmt werden konnten. Durch die Möglichkeit 8 Mäuse parallel zu testen, liegt die Startzeitdifferenz in der Regel bei 30 Minuten. Nach jedem Lauf wurden Kotreste entfernt und die Boxen gründlich mit Wasser gereinigt. Das Bewegungsmuster der Mäuse wurde zeitgleich mittels Viewer-Software dokumentiert und analysiert. Dabei wurde die Position von Kopf, Körper und Schwanz der Mäuse registriert. Aus der gesamten zurückgelegten Strecke ergab sich die Gesamtstrecke, die in Metern angegeben ist. Außerdem wurde mittels Viewer-Software eine Kernzone von 18 x 18 cm in der Mitte jeder Tierversuchsbox festgelegt, um so die Streckenlänge und die Gesamt-aufenthaltsdauer in der Mitte der Box zu analysieren. Alle Tiere durchliefen zuerst eine Habituation, am Folgetag erfolgte dann die Erfassung des Basiswertes. Eine letzte Messung erfolgte 7 Tage nach der intrazerebralen Injektion von 6-OHDA.

2.2.3 Intrazerebrale Injektion von 6-OHDA

Um zu testen, ob die homozygoten Mäuse empfindlicher auf ein Toxin-basiertes Parkinsonmodell mit 6-OHDA reagieren, wurde Wildtypmäusen, *Pdgfb^{ret/wt}* und *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen jeweils einmalig 6-OHDA stereotaktisch unilateral in das *Striatum* der rechten Hemisphäre injiziert. Das 6-OHDA wird dort durch die dopaminergen Neurone aufgenommen, bildet durch Oxidation reaktive Sauerstoffspezies welche zytotoxisch sind und letztendlich zum Zelltod der Neurone und des *nigrostriatalen* Signalweges führen. Dadurch kommt es zu einem motorischen Defizit der kontralateralen Körperhälfte und folglich zu einer Rotation zur ipsilateralen Seite der Injektion. Das Ausmaß der entstehenden Rotation gibt

dann Hinweise auf eine vermehrte bzw. verringert Suszeptibilität für Parkinson. Für die Herstellung der Injektions-Lösung wurden 4 µg 6-OHDA in 2 µl isotonischer Kochsalz-Lösung mit 0,02 % (w/v) Ascorbinsäure als Oxidationsschutz gelöst und lichtgeschützt auf Eis gelagert (Alvarez-Fischer u. a., 2008).

Die Mäuse wurden zunächst mittels intraperitonealer Injektion von 0,1 mL/10 g Körpergewicht einer Ketamin 10 %/Xylazin 2 % Lösung betäubt. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Schmerzreflexprüfung und festgestellter Areflexie wurde der Kopf der Maus in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Mit einem Skalpell wurde durch einen ca. 1 cm langen Schnitt die Haut median über den Schädel eröffnet und der Schädelknochen vom Periost befreit. Anschließend erfolgte ausgehende vom Bregma als Referenzpunkt für die stereotaktische Läsion das Aufsuchen der Injektionsstelle: AP +0,04 cm, ML -0,18 cm, DV -0,35 cm (stereotaktische Koordinaten nach dem Hirnatlas von Franklin und Praxinos, 1997). Hier wurde dann die Kalotte mittels elektrischen Handbohrers eröffnet und die Injektionsnadel vorsichtig in das Gewebe eingeführt. Mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 0,5 µL/min wurde den Mäusen so 2 µL 6-OHDA Injektionslösung in das *Striatum* der rechten Hemisphäre injiziert. Damit eine ausreichende Diffusion ins Gewebe gesichert werden konnte, wurde die Nadel nach erfolgter Injektion 5 Minuten am Injektionsort gelassen (Alvarez-Fischer u. a., 2008). Zwischen den einzelnen Injektionen wurde die Injektionslösung lichtgeschützt auf Eis gelagert.

Nach Ablauf der Injektionszeit, wurde die Nadel vorsichtig aus dem Hirngewebe entfernt, die Wunde gesäubert und der Hautdefekt mittels zwei bis drei Einzelknopfnähten vernäht. Die Mäuse wurden dann für die Aufwachphase in einen Haltungskäfig überführt. Mit einer Infrarot-Wärmelampe wurde für ausreichende Temperaturen gesorgt und die Vitalfunktion regelmäßig überprüft. Sobald die Mäuse wieder aktiv wurden und zielgerichtete Bewegungen durchführten, wurden sie ohne weitere Überwachung in ihre Heimatkäfige überführt.

2.2.4 Amphetamin-induzierten Rotationstest

Um Unterschiede in der Empfindlichkeit auf das Toxin-basierte Parkinsonmodell mit 6-OHDA noch besser darzustellen wurde 7 Tage nach der intrazerebralen Injektion mit 6-OHDA das Drehverhalten für einen Zeitraum von 5 Minuten unter Gabe von 5 mg/kg Körpergewicht Amphetamin gemessen (Alvarez-Fischer u. a., 2011). Amphetamin induziert die Freisetzung und inhibiert gleichzeitig den Rücktransport von Dopamin im *Striatum* und verstärkt somit das motorische Defizit durch die unilaterale 6-OHDA Injektion. Im Gegensatz dazu führt ein Agonist, wie zum Beispiel Apomorphin aufgrund einer gesteigerten Empfindlichkeit der Domaminrezeptoren zu einer Rotation kontralateral zur Injektionsseite (Björklund und Dunnett, 2019).

Zunächst wurden die Mäuse gewogen, um Ihnen anschließend die gewichtsadaptierte Menge an Amphetamin intraperitoneal zu injizieren. Nach der Injektion wurden die Mäuse zunächst noch für 15 Minuten in ihren Heimatkäfigen belassen, um sie dann für 15 Minuten je einen 1000 mL Glaszyylinder zu setzen. Der Versuchsaufbau bestand aus vier 1000 mL Zylindergläsern, mit einem Durchmesser von 9 cm und einer Höhe von 15 cm, die in gleichem Abstand vor einer Kamera positioniert waren. Die Experimente wurden zwischen 9 und 11 Uhr durchgeführt. Durch die Möglichkeit 4 Mäuse parallel zu testen, liegt die Startzeitdifferenz in der Regel bei 30 Minuten. Die Anzahl der Drehungen wurde anschließend anhand des aufgezeichneten Videos manuell ausgezählt. Nach jedem Lauf wurden Kotreste entfernt und die Gläser gründlich mit Flächendesinfektionsmittel und Wasser gereinigt.

2.2.5 Maustötung und Probengewinnung

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die rasche Entnahme von Milz und Leber. Außerdem wurde nach Dekapitation der Schädel mit einer Schere eröffnet und je nach experimentellem Arm verschiedene Teile des Gehirns zur weiteren Aufarbeitung entnommen.

Die Milz wurde in ein 15 mL Zentrifugationsrörchen mit 5 mL gekühltem PBS überführt und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Die Leber wurde in ein 2 mL Kryorörchen überführt, in flüssigen Stickstoff zwischengelagert und anschließend bei - 80 °C gelagert.

Bei allen Mäusen, die eine intrazerebrale Injektion von 6-OHDA erhalten haben, wurde das Vorderhirn durch einen senkrechten Schnitt abgetrennt, in ein 2 mL Kryoröhrchen überführt, in flüssigen Stickstoff zwischengelagert und anschließend bei - 80 °C gelagert. Das rechte und linke *Striatum* der behandelten Mäuse wurde vom Rest des Gehirns disseziert und jeweils in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit 150 µL 0,4 N-Perchlorsäure überführt. Deren Gewicht wurde vor Zugabe der *Striata* mit einer Feinwaage ermittelt, auf Eis zwischengelagert, nach Zugabe der *Striata* erneut gewogen und anschließend bei - 80 °C gelagert. Der übrige Teil des Gehirns und die kompletten Gehirne, der nicht behandelten Mäuse, wurden in einem Stück in 4,5 % gepuffertem Formaldehyd nach Lille überführt und bei 4 °C für mindestens 6 Tage gelagert, bis das Gewebe komplett fixiert war.

Bei allen Mäusen wurde die Schwanzspitze für eine erneute Prüfung des Genotyps bei - 80 °C in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gelagert. Die verbleibenden Teile der Mäuse wurden ordnungsgemäß entsorgt.

2.2.6 *In-vitro* Osteoklastendifferenzierung aus humanen und murinen Monozyten

Um herauszufinden inwieweit die Ausreifung von Osteoklasten durch die Fusion und Differenzierung von Monozyten, sowie deren osteolytische Funktionalität durch eine Mutation im *PDGFB*-Gen eingeschränkt ist, wurden zum einen Monozyten aus humanem venösem Vollblut und zum anderen Monozyten aus Mausmilzen isoliert.

Um Unterschiede in der Differenzierung zu untersuchen, wurden die isolierten Monozyten in Makrophagendifferenzierungsmedium und verschiedenen Konzentrationen von *M-CSF* und *RANKL* für 12 Tage in *Chamberslides* kultiviert. Anschließend wurden die ausgereiften Osteoklasten mittels *TRACP and ACP Double-Stain Kit* gefärbt und im Hinblick auf ihre Anzahl und Größe verglichen.

Monozytenisolation aus venösem humanem Vollblut

Um die Monozyten aus humanem Blut zu isolieren, wurde zunächst eine venöse Blutentnahme mit CPDA-Röhrchen durchgeführt. Bei der Blutentnahme wurde darauf geachtet, die Röhrchen möglichst langsam zu füllen. Pro Person wurden drei CPDA-Röhrchen mit je 8 mL venösen Vollblut entnommen. Anschließend wurden

die Röhrchen aufrecht und lichtgeschützt bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Zur Isolation der Monozyten wurde in einem 15 mL Zentrifugationsröhren 8 mL Blut auf 6 mL *Ficoll Histopaque* vorsichtig aufgebracht, ohne die beiden Phasen miteinander zu mischen und anschließend für 20 Minuten bei 1.500 rpm, Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Das weitere Prozedere erfolgte wie unter Monozytenisolation nach Dichtezentrifugation beschrieben.

Monozytenisolation aus murinen Milzen

Die Milzen wurden nach Tötung der Mäuse operativ entfernt, in ein 15 mL Zentrifugationsröhren mit 5 mL vorgekühlten PBS überführt und auf Eis gelagert. Die Milzen wurden anschließend in einem 40 µm Nylon Zellfilter, der auf einem 50 mL Zentrifugationsröhren aufgebracht wurde, mit einem Spritzenstempel einer 10 mL Spritze vorsichtig durch das Sieb gedrückt, bis nur noch die Kapsel und Fettmasse der Milz übrig war. Das Zellsieb und der Stempel wurden dabei drei Mal mit 10 mL PBS gespült, um möglichst viele Zellen in das Zentrifugationsröhren zu überführen. Nach Abschluss der Überführung wurde das Volumen mit PBS auf 40 mL aufgefüllt und für 8 Minuten bei 1.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach Abschluss der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt, das Pellet in 8 mL PBS resuspendiert und in einem 15 mL Zentrifugationsröhren auf 6 mL *Ficoll Histopaque* vorsichtig aufgebracht, ohne die beiden Phasen miteinander zu mischen. Es folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 1.500 rpm, Raumtemperatur und ohne Bremse. Das weitere Prozedere erfolgte wie unter Monozytenisolation nach Dichtezentrifugation beschrieben.

Monozytenisolation nach Dichtezentrifugation

Nach Abschluss der Dichtezentrifugation zeigte sich ein Gradient, bei dem sich in der untersten Phase die Erythrozyten und Zelltrümmer befanden. Darauf befand sich die Ficoll-Phase, mit einem darüber liegenden Ring aus Leukozyten und ganz oben dann die Plasma-Phase. Das Plasma wurde bis auf etwa 1 bis 2 mL über den Leukozytenring mit Hilfe einer 5 mL Serumpipette vorsichtig abgesaugt und verworfen. Der Leukozytenring wurde dann mit einer 1000 µL Pipette in ein 50 mL Zentrifugationsröhren überführt, in dem 10 mL PBS vorgelegt waren. Nach

Abschluß der Überführung wurde das Volumen mit PBS auf 40 mL aufgefüllt und anschließend für 15 Minuten bei 1.500 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5 mL Makrophagendifferenzierungsmedium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

Kultivierung der Monozyten und Differenzierung zu Osteoklasten

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde das Volumen durch Zugabe von Differenzierungsmedium oder Zentrifugation mit erneuter Resuspendierung so weit eingestellt, dass mit 428 µL der Zellsuspension eine Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/cm² erreicht wurden. In jedes Well eines 8er *Chamberslides* wurden dann 428 µL pipettiert. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre.

Für die Differenzierung erfolgte eine Kultivierung über insgesamt 12 Tage mit einem Mediumwechsel an Tag 1, 5 und 8.

Mit dem Mediumwechsel an Tag 1 begann die Stimulation der Zellen mit *M-CSF* mit einer Konzentration von 75 ng/mL. Durch eine noch unvollständige Adhärenz der Zellen erfolgte am ersten Tag der Inkubation nur ein halber Mediumwechsel. Hierfür wurden vorsichtig 200 µL des alten Mediums pro Well mit einer 1000 µL Pipette abgesaugt und anschließend 222 µL des frischen und mit *M-CSF* versetzten Makrophagendifferenzierungsmediums hinzugegeben.

An Tag 5 und 8 erfolgten dann ein kompletter Mediumwechsel. Ab hier wurden die Zellen mit je 75 ng/mL *M-CSF* und *RANKL* stimuliert. Hierfür wurde jeweils das komplette Medium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und dann 450 µL des Makrophagendifferenzierungsmediums hinzugegeben.

Zellfixierung und TRAP-Färbung

Zur Fixierung und Färbung wurde das TRACP & ALP double-stain Kit. Nach 12 Tagen Differenzierung wurde die Kultivierung beendet, indem das Medium abgesaugt, 150 µL der Fixations-Lösung hinzugegeben und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert wurde. Danach wurde die Fixations-Lösung abgesaugt und jedes Well zwei Mal mit 500 µL bi-destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden je Well 150 µL Substrat-Lösung, bestehend aus 10 Teilen ACP und einem Teil Natriumtartrate, hinzugegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Rotfärbung

wurde mikroskopisch kontrolliert und die Wells gegebenenfalls noch maximal 30 Minuten länger inkubiert. Bei ausreichender Rotfärbung wurde die Substrat-Lösung abgekippt und jedes Well drei Mal mit 500 µL bi-destilliertem Wasser gewaschen.

Für die Kernfärbung wurden zunächst die Wells vom Objektträger abgetrennt. Die Kernfarbe-Lösung wurde dann über den Objektträger verteilt, sodass jede Bodenfläche der abgehobenen Wells, gleichmäßig bedeckt war und dann für 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Kernfarbe-Lösung abgekippt und die Objektträger durch mehrmaliges Eintauchen in bi-destilliertem Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden anschließend an der Luft getrocknet und danach bei Dunkelheit und RT gelagert.

Auswertung mittels stereotaktischen Mikroskops

Um Unterschiede in der Differenzierung zwischen Wildtypen, homozygoten und heterozygoten Mutationsträgern festzustellen, wurden die gefärbten *Chamberslides* mittels stereotaktischen digitalen Lichtmikroskop und Computersoftware *Stereo investigator* auf die Anzahl und Größe der Osteoklasten hin analysiert. Hierbei wurden alle 8 Wells eines *Chamberslides* ausgezählt, wobei mittels *Stereo investigator* ein virtuelles Raster mit einer Zählfeldgröße von 400,16 µm und einer Rastergröße von 800,32 mm über jedes Well gelegt wurde, was der Gesamtfläche von 25 % jedes Wells entspricht. Als Osteoklasten bzw. Osteoklasten ähnliche Zellen wurden Zellen gewertet, die TRAP positiv waren. Dies zeigte sich anhand intensiv rot gefärbten Zellstromas und dem Vorhandensein von mehr als zwei gefärbten Zellkernen. In einem ersten Durchlauf wurden zunächst alle entsprechenden Zellen gezählt und markiert, um dann in einem zweiten Durchlauf mittels des Menüpunktes „*freehand contour drawing*“ die jeweilige Zelle zu umranden und die Fläche automatisch per „*contour measurements*“ zu berechnen.

2.2.7 Osteolyse humaner und muriner Osteoklasten

Um Unterschiede in der Kapazität der Osteolyse und damit zusätzlich zur Morphologie auch einen funktionellen Parameter herauszufinden, erfolgte die Kultivierung in *Osteo Assay Surface Wells* mit Knochenmatrix als Bodenbelag. Pro Well wurden 200 µL der gleichen Zellsuspension wie bei der Differenzierung in den *Chamberslides* verwendet und somit $0,7 \times 10^6$ Zellen/mL eingebracht. Die Kultivierung im Osteo-Well erfolgte innerhalb der ersten 12 Tage nach dem gleichen Protokoll wie bei der Differenzierung der Monozyten, siehe 2.2.6. Um den differenzierten Zellen genügend Zeit für die Osteolyse zu geben, wurden die Zellen noch weitere 13 Tage, insgesamt also für 25 Tage, kultiviert. Für die zusätzlichen 13 Tage wurde das Makrophagendifferenzierungsmedium mit je 75 ng/mL *M-CSF* und *RANKL* versetzt und alle drei Tage vollständig gewechselt.

Nach 25 Tagen Inkubation wurde das Medium abgesaugt, je Well wurden 100 µL 10 % (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung als Bleichmittel hinzugegeben und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde jedes Well zwei Mal mit 150 µL bidestilliertem Wasser gewaschen und für 3 bis 5 Stunden bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und anschließend lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

Die Auswertung erfolgte zunächst an einem digitalen Mikroskop bei 2-facher Vergrößerung und Belichtung zwischen 1/120 s und 1/250 s. Um das Ausmaß der Osteolyse zu analysieren, wurden die Bilder mittels *ImageJ Software* in ein 8 Bit Bild umgewandelt. Anschließend wurde die *Threshold* auf 205 zu 255 mit *default, red* und *dark background* gesetzt, um so die Fläche der Osteolyse in mm² zu ermitteln und zu vergleichen

2.2.8 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) muriner *Striata*

Die HPLC wurde zur Bestimmung von Neurotransmittern sowie ihrer Metabolite und deren Hydroxylierungsprodukten aus den entfernten *Striata* der Mäuse verwendet, um so die Empfindlichkeit auf das 6-OHDA induzierte Parkinsonmodell analysieren zu können. Dabei wurden die homogenisierten Gewebeproben in einem Fließmittel, als mobile Phase, mit hohem Druck durch eine HPLC-Säule, als stationäre Phase, gepumpt und die Inhaltsstoffe dann aufgrund ihrer Affinität zum Säulenmaterial unterschiedlich stark zurückgehalten und so voneinander getrennt. Am Ende der

Säule erfolgt dann die Identifikation mittels Substanz spezifischer Retentionszeit und die Quantifizierung mittels elektrochemischer Detektion (+650 mV).

Gewebepräparation für HPLC-Analyse

Für die Gewebepräparation wurden die bei - 80 °C gelagerten *striatalen* Proben zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Proben mittels Hand *Sonicator* für jeweils 10 Sekunden auf Eis. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal wiederholt, bis das Gewebe vollständig homogenisiert war. Danach wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis gelagert.

Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C. Anschließend wurde jeweils der Überstand, ohne das Pellet mit der Spitze zu berühren, mit einer 1000 µL Pipette abgenommen und in ein *SpinX* Zentrifugationsröhren überführt.

Daraufhin folgte eine weitere Zentrifugation für 1 Minute bei 13.000 rpm und 4 °C. Anschließend wurde das Sieb aus dem *SpinX* Zentrifugationsröhren entfernt und die Proben bei - 80 °C gelagert.

Elektrochemische Auswertung mittels HPLC

Für die Durchführung der HPLC wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 15 µL der Suspension in 1,1 mL *Boerdelflaschen* überführt, in denen bereits 15 µL 0,4 N Perchlorsäure vorgelegt waren, vorsichtig gemischt und dann im *autosampler* der HPLC platziert. Es wurden dann jeweils 20 µL des Homogenisats durch den *autosampler* injiziert.

Zur Analyse wurde die Trennsäule *Column Nucleosil C-18* und eine Platin-Referenzelektrode der *Ultimate 3000* mit einer Detektorenempfindlichkeit bei 2 nA/V und einem Oxidationspotenzial von 650 mV verwendet. Das Fließmittel bestand aus *TEST Mobile Phase* plus 10 % (v/v) Acetontril. Das Fließmittel wurde bei 4 °C gelagert und wöchentlich frisch hergestellt.

Die Mengenbestimmung der eluierten Substanzen erfolgte über eine externe Kalibrierungsgerade mit 7-Punkt-Kalibrierung von 20 µL der Reinstoffe Dopamin (DA), 3,4-Dihydroxyphenylsäure (DOPAC), Homovanilinsäure (HVA), 2,3- und 2,5-Dihydroxybenzoësäure (DHBA) mit Konzentrationen von 1×10^{-4} bis 5×10^{-7} mol/L und ist in Abbildung 4 dargestellt. Außerdem erfolgt eine Pool-Kalibrierung durch Analyse einer Probe mit allen 5 Reinstoffen. Vor jeder Messreihe

wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Das Detektionsminimum lag bei einer Konzentration von 10^{-9} mol/L.

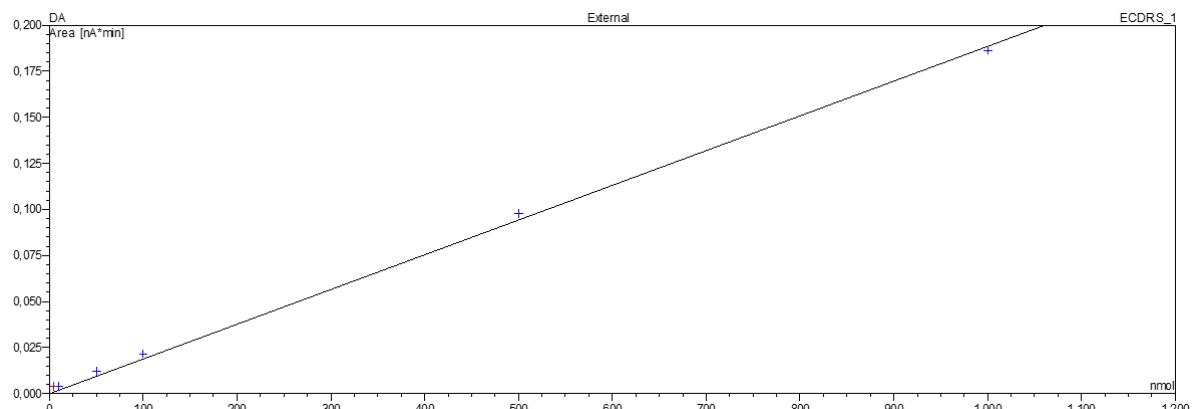


Abbildung 4: Beispiel einer Eichkurve anhand der Bestimmung von Dopamin. Dargestellt ist die Eichgrade einer 7-Punkt-Eichung, vergrößert für die niedrigsten 6 Messpunkte.

Die Zuordnung zwischen Substanz und zugehörigem Peak erfolgte durch Ermittlung der Retentionszeiten der 7 Punkt Kalibrierung und der gepoolten Kalibrierung. Die Retentionszeiten variierten trotz gleichen Drucks und gleicher Säule immer etwas von Lauf zu Lauf.

Die Gehaltsbestimmung der jeweiligen Substanz wurde wie in Abbildung 5 dargestellt über die Kalibriergerade mittels Integrationssoftware Chromleon 6.20 aus der Fläche unter den Peaks ermittelt.

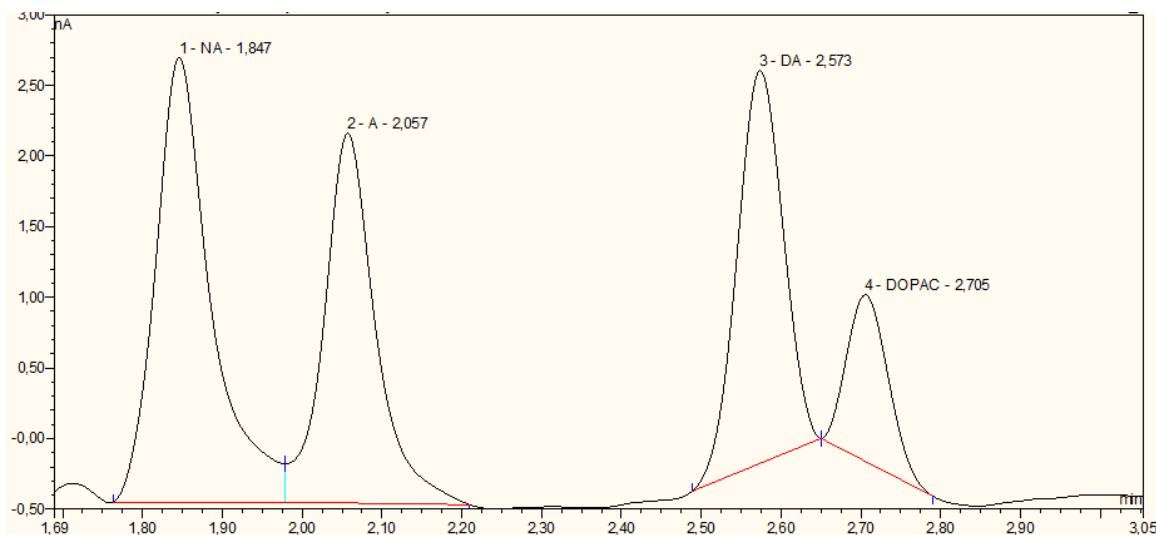


Abbildung 5: Beispielchromatogramm der Neurotransmitterbestimmung. Gezeigt sind Peaks für Noradrenalin (NA), Adrenalin (A), Dopamin (DA) und 3,4-Dihydroxyphenylsäure (DOPAC).

2.2.9 Mitochondriale Funktion muriner Leberproben

2.2.9.1 Mitochondrienisolation

Die bei - 80 °C gelagerten Leberproben wurden zunächst auf Eis angetaut. Auf einer Petrischale wurde mittels Skalpells jeweils ein etwa 2x2 mm großes Stück abgeschnitten, dieses in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und anschließend auf Eis gelagert.

Das abgetrennte Leberstück wurde in ein, mit 2 mL Homogenisationspuffer gefülltes, 15 mL Homogenisationsgefäß überführt. Die Homogenisation erfolgte durch 15 Auf- und Abbewegungen des Homogenisationspistolls mit 1.000 rpm entlang des Homogenisationsgefäßes.

Vom Homogenisat wurden 400 µL in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß für weitere Proteinbestimmungen überführt. Die restlichen 1.600 µL des Homogenisats wurden in ein 15 mL Zentrifugationsrörchen überführt und anschließend bei 4 °C und 1.500 g für 10 Minuten zentrifugiert.

Nach Abschluss der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues 15 mL Zentrifugationsrörchen überführt, 2 mL Homogenisationspuffer hinzugegeben, kurz gemischt und anschließend erneut bei 4 °C und 1.500 g für 10 Minuten zentrifugiert.

Nach Abschluss der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand jeder Probe auf vier 1,5 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt, ohne dabei das Pellet zu berühren. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 rpm für 10 Minuten.

Der Überstand wurde abgenommen, die vier Pellets mit 1 mL Homogenisationpuffer resuspendiert, zusammengeführt und erneut bei 4 °C und 10.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

Nach Abschluss dieser Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 1 mL Homogenisationspuffer resuspendiert und 250 µL dieser Suspension in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 10.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die restlichen 750 µL des Homogenisates wurden ohne weitere Behandlung bei - 80 °C gelagert.

Nach Abschluss der Zentrifugation war der Überstand nun klar. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 200 µL

Homogenisationspuffer resuspendiert und bei - 80 °C gelagert. Diese Proben wurden für die weiteren Experimente verwendet.

2.2.9.2 Murine Komplex-I-Aktivität

Jede Messung erfolgte mit einer Referenz und 6 Proben in Doppelbestimmung, wobei in jedem Messdurchgang *Pdgfb*^{ret/ret} Mäuse mit Wildtypen bzw. *Pdgfb*^{ret/wt} Mäusen verglichen wurden.

Zu Beginn wurden 6 µL der 200 µL isolierten Mitochondrien zu 320 µL Kaliumphosphatpuffer (25 mM, pH 7,2) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß hinzugegeben und gut gemischt. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um direkt danach in der Hand wieder aufgetaut zu werden. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt und diente dem Aufbrechen der Mitochondrien.

In eine 96-Well Platte wurden pro Well 6 µL NADH (5 mM), 2 µL KCN (100 mM), 10 µL BSA (50 mg/mL) und 7 µL H₂O vorgelegt. Es folgte, außer bei der Referenz, die Zugabe von je 150 µL der Schock behandelten Mitochondriensuspension. In die Wells für den Lösungsmittelabgleich wurden lediglich 150 µL des Kaliumphosphatpuffers statt der Mitochondriensuspension eingebracht. Die Wells wurden mit je einem Spatel gemischt, in den Mikroplatten-Reader eingebracht und deren Absorption mittels *Gen5 Datenanalyse-Software* gemessen. Die Absorption wurde pro Well alle 10 Sekunden gemessen (Alvarez-Fischer u. a. 2013).

Nach 60 Sekunden erfolgte, zum Start der Atmungskette, eine Zugabe von 6 µL Ubiquinon (5 mM) in die Wells mit den Proben. Anschließend wurde mit einem Spatel gemischt und die Absorption im Reader erneut gemessen. Bei der nun beginnenden Reaktion wurde das Ubiquinon mit Hilfe von NADH im Komplex-I der Atmungskette zu Ubihydrochinon reduziert, weshalb sich die Absorption durch den Verbrauch von NADH innerhalb der Suspension verringert. Je steiler die Verringerung der Absorption, desto höher war die Komplex-I-Aktivität.

Nach weiteren 420 Sekunden erfolgte außer bei der Referenz die Zugabe von 6 µL Rotenon (1 mM) pro Well. Es wurde erneut mit einem Spatel gemischt und die Absorption für weitere 420 Sekunden gemessen. Rotenon dient zur Inaktivierung der Elektronenübertragung am Komplex-I der Atmungskette. Dadurch kam die

Atmungskette zum Stillstand und der Absorption änderte sich nicht mehr. Der schematische Ablauf der Messung ist noch einmal in Abbildung 6 dargestellt.

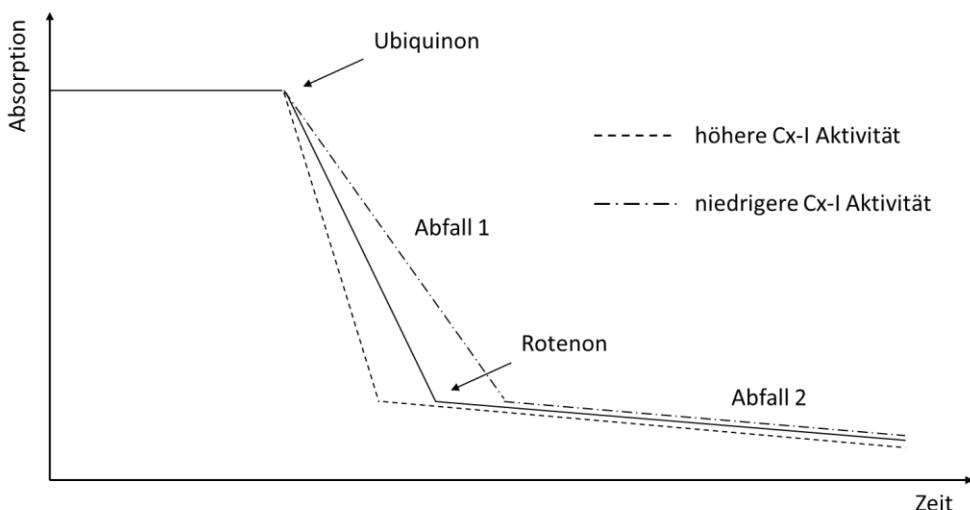


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Absorption während der Komplex-I Messung. Durch die Zugabe von Ubiquinon kann durch den Komplex-I das vorhandene $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert werden, weshalb sich die Absorption im Bereich von 340 nm schnell verringert. Durch die Zugabe von Rotenon wird der Elektronentransport dann blockiert, weshalb sich dann die Absorption kaum noch verändert.

2.2.9.3 Murine Citrat-Synthase-Aktivität

Jede Messung erfolgte mit einer Referenz und 6 Proben in Doppelbestimmung, wobei in jedem Messdurchgang $Pdgfb^{ret/ret}$ Mäuse mit Wildtypen bzw. $Pdgfb^{ret/wt}$ Mäusen verglichen wurden.

In eine 96-Well Platte wurden pro Well 100 μL Tris (200 mM), 4 μL Acetyl CoA (10 mM), 4 μL DTNB (10 mM), 2 μL Triton-X100 (10 % w/v) und 85 μL H₂O vorgelegt. Es folgte dann, außer bei der Referenz, die Zugabe von je 3 μL der Mitochondriensuspension. Die Wells wurden mit je einem Spatel gemischt, in den Mikroplatten-Reader eingebracht und deren Absorption mittels *Gen5 Datenanalyse-Software* gemessen. Die Absorption wurde pro Well alle 10 Sekunden gemessen (Alvarez-Fischer u. a., 2013).

Nach 60 Sekunden erfolgte, zum Start der Citrat-Synthase, eine Zugabe von 2 μL Oxalacetat (10 mM) in jedes Well. Anschließend wurde mit einem Spatel gemischt und die Absorption im Reader erneut gemessen. Durch Zugabe des Oxalacetats lagen nun gemeinsam mit dem vorher eingebrachten Acetyl-CoA die Substrate für

die Citrat-Synthase vor, welche im ersten Schritt des Citrat-Zyklus die Kondensation beider Substanzen zum Citrat katalysiert. Durch DTNB wurde die Enzymaktivität messbar, da es gemeinsam mit CoA-SH in einer irreversiblen Reaktion einen gelben Komplex bildete und somit wie in Abbildung 7 dargestellt zu einem linearen Anstieg der Absorption führte.

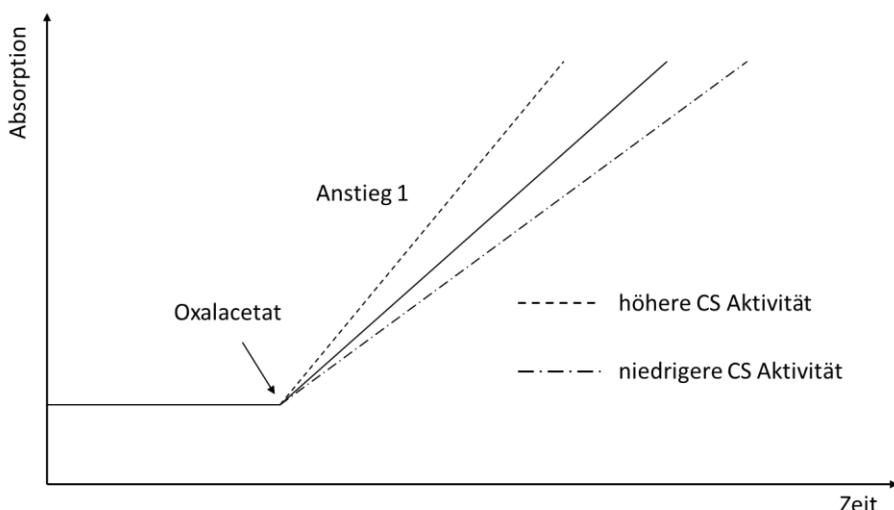


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Absorption während der Citrat-Synthase Messung. Durch die Zugabe von Oxalacetat liegen mit dem Acetyl-CoA beide Substrate für die Kondensation zum Citrat durch die Citrat-Synthase vor. Durch das hinzugegebene DTNB entsteht, mit dem bei der Reaktion entstehenden CoA-SH, bei jeder Reaktion ein irreversibel gebundener Komplex, dessen Absorption bei 412 nm gemessen werden kann und die Aktivität der Citrat-Synthase widerspiegelt.

Die Messung der Citrat-Synthase erfolgte zur Normierung der Komplex-I-Aktivität, indem man die Ratio aus Komplex-I-/Citrat-Synthase-Aktivität berechnet. Die Citrat-Synthase gibt einen Anhalt für die Anzahl der enthaltenen Mitochondrien, da man davon ausgeht, dass der Anteil der Citrat-Synthase pro Mitochondrium gleich ist.

2.2.10 Messung der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate humarer Leukozyten mittels *Seahorse Analyzer*

Um die mitochondriale Aktivität weiter zu untersuchen, wurde in diesem Experiment die mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate mittels *Seahorse Analyzer* photometrisch ermittelt. Dazu misst der *Seahorse Analyzer* den Sauerstoff- und Protonengehalt des Mediums der adhärenten Zellen. Hierzu wurde in einer 24 Well Platte die aus venösem Vollblut isolierten Monozyten von 2 Mutationsträgern (*PDGFB*^{wt/del(1-251)}) und 3 ähnlich alten männlichen Kontrollprobanden in je 4 Wells

untersucht. Dabei wurden in jedes Well die gleich definierte Zellzahl hineingebracht und anschließend die Absorption der Suspension nach Zugabe von Oligomycin, Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) und Antimycin A gemessen. Oligomycin ist ein Antibiotikum, welches an den Protonenkanal des F₀-Teils der ATP-Synthase bindet und dadurch den Abbau des Protonengradienten verlangsamt. Infolgedessen nimmt der Elektronenverbrauch deutlich ab und der Sauerstoffverbrauch sinkt. Die damit gemessene Sauerstoffverbrauchsrate entspricht damit der Basalrate minus des ATP vermittelten Sauerstoffverbrauchs. FCCP ist ein Protonophor und damit Entkoppler der Atmungskette. Durch den Protonentransport über die mitochondriale Membran erreicht der Sauerstoffverbrauch unter Zugabe von FCCP seinen maximalen Wert. Antimycin A bindet an die Qi-Stelle im Cytochrom Komplex des Komplex III der Atmungskette. Es blockiert damit die Übertragung von Elektronen von Coenzym Q auf Cytochrom c und stoppt damit die Funktion des dahinterliegenden Komplex IV und der ATP-Synthase, was zum einen die ATP-Synthese stoppt und der Sauerstoffverbrauch innerhalb der Mitochondrien zum Erliegen kommt. Abbildung 8 verdeutlicht noch einmal den zeitlichen Ablauf und die Sauerstoffverbrauchsrate unter den unterschiedlichen Bedingungen.

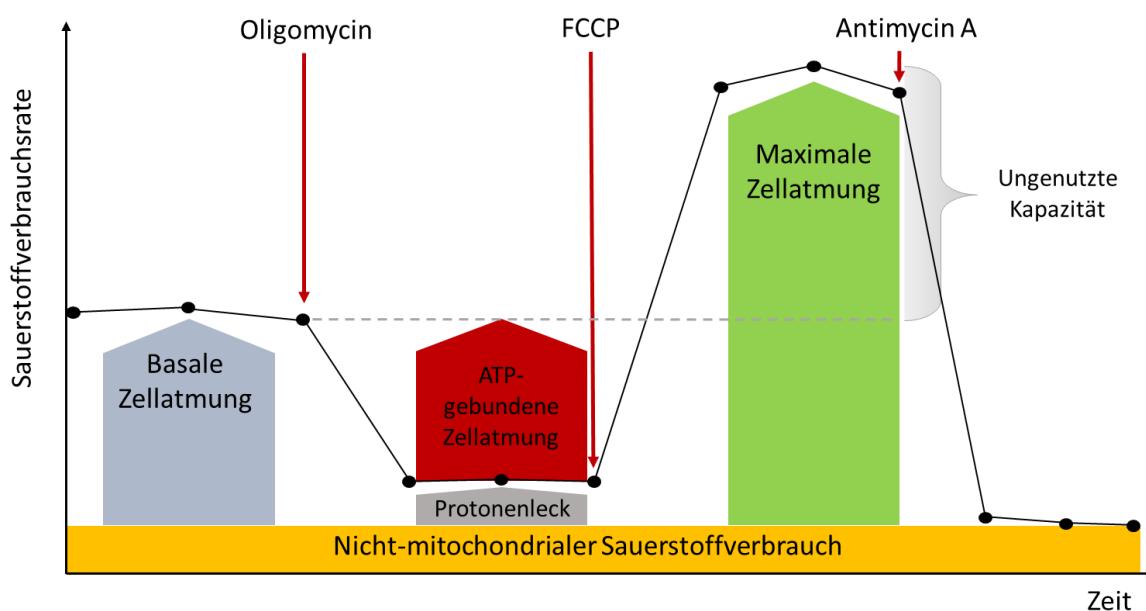


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Sauerstoffverbrauchsrate. Dargestellt ist zunächst die basale Zellatmung mit den Veränderungen der Sauerstoffverbrauchsrate nach Zugabe von Oligomycin zur Blockade der ATP-Synthase. Durch Zugabe von FCCP als Entkoppler wird der Maximalwert erreicht, um dann nach Zugabe von Antimycin A zur Blockade von Komplex III der Atmungskette sein Minimum zu erreichen. Illustriert nach Vorlage von Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit auf www.agilent.com (Stand: 07.10.2020).

Am Tag vor dem Experiment musste zunächst die 24 Well Platte mit *Cell and Tissue Adhesive* beschichtet werden, um eine möglichst gute Adhäsion der Monozyten zu gewährleisten. Dafür wurden 1,4 mL des 0,1 M Natriumbikarbonat-Puffers mit 17,72 µL des *Cell and Tissue Adhesive* gemischt, davon je 50 µL in jedes Well gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jedes Well mit 500 µL sterilem Wasser gespült, die Platte für 30 Minuten an der Luft getrocknet und dann im Kühlschrank bei 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert. Am Vortag wurde ebenfalls eine Kalibrierungsplatte vorbereitet. Hierzu wurde in jedes Well einer 24 Well Platte 1 mL *Seahorse Assay Medium* hinzugegeben und über Nacht bei 37 °C und ohne CO₂ inkubiert.

Die Isolierung der Leukozyten aus venösem humanem Vollblut erfolgte wie unter 2.2.6 beschrieben, abweichend wurden hierfür aber EDTA-Röhrchen verwendet. Anschließend erfolgten eine Zellzählung und die Einstellung der Zelldichte der Leukozyten auf 7×10^5 Zellen. Nach der Zellzählung wurden die Zellen für 5 Minuten bei 800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, das alte Medium abgenommen und das Pellet dann in 100 µL des *Seahorse Assay Mediums* resuspendiert. Es wurden 100 µL der Zellsuspension in jedes Well zugefügt, die Platte bei 200 x g für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Zelladhäsion anschließend mikroskopisch kontrolliert. Nun wurden 400 µL des *Assay Mediums* in jedes Well hinzugegeben, sodass das Gesamtvolumen nun bei 500 µL lag. Die Platte wurde anschließend für 45 bis 60 Minuten bei 37 °C ohne CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Arbeitslösungen für Antimycin A, FCCP und Oligomycin angesetzt. Anschließend wurden 56 µL der Oligomycin-Lösung in Port A, 62 µL der FCCP-Lösung in Port B und 69 µL der Antimycin-Lösung in Port C des Plattenaufsatzes für jedes Well pipettiert. Dieser Aufsatz wurde zunächst auf die Kalibrierungspalte aufgebracht und damit die Kalibrierung durchgeführt. Anschließend wurde der Aufsatz auf die Probenplatte aufgebracht und dann das *Seahorse Assay* durchgeführt. Das Programm für den Assay ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 11: Seahorse Assay Protokoll.

Schritt	Protokoll
Gleichgewichtsmessung	3 Wiederholungen:
Injektion von Port A (Oligomycin)	1 Minute mischen,
Injektion von Port B (FCCP)	30 Sekunden Pause,
Injektion von Port C (Antimycin A)	2 Minuten messen

Nach Abschluss des Assay-Protokolls wurden die Werte der Sauerstoffverbrauchsrate unter FCCP als Maximalwerte mit den basalen Sauerstoffverbrauchswerten normalisiert.

2.2.11 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) humarer Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie

Um ein verändertes Membranpotential humarer Lymphozyten feststellen zu können, wurden diese aus venösem Vollblut von 2 Mutationsträgern ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und 4 ähnlich alten Kontrollen isoliert und das Membranpotential anschließend mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als interne Kontrollen für dieses Experiment wurden Jurkat-Zellen verwendet.

Die Isolierung von Lymphozyten aus venösem humanem Vollblut erfolgte wie unter 2.2.6 beschrieben, abweichend wurden hier aber EDTA-Röhrchen verwendet. Anschließend erfolgte eine Zellzählung und Einstellung der Zelldichte der Monozyten auf 7×10^5 Zellen und der Jurkat-Zellen auf 4×10^5 Zellen in 100 µL. Anschließend wurden 100 µL dieser Zellsuspension in je sechs 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 1.000 rpm und 22 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgenommen und die Pellets in 900 µL Opti-Mem Medium resuspendiert. Das Mitochondriale Membranpotential wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM⁺) gemessen. Der Farbstoff ist nicht zytotoxisch und akkumuliert aufgrund seiner positiven Ladung in den negativ geladenen Mitochondrien. Bei einer Depolarisation der Mitochondrien zum Beispiel im Rahmen der Apoptose, wie sie in diesem Experiment durch Valinomycin und Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) ausgelöst wird, werden dort gespeicherte Anionen und folglich auch TMRM⁺ freigesetzt, weshalb die Konzentration dort sinkt und das Fluoreszenzsignal abnimmt. Besteht dagegen eine Hyperpolarisierung, wie sie teilweise im Vorfeld

einer Apoptose zu beobachten ist, so nimmt die negative Ladung in den Mitochondrien zu, womit auch mehr des Fluoreszenzfarbstoffs akkumuliert und daher das Fluoreszenzsignal zunimmt. Valinomycin wirkt als Ionophor, welches selektiv Kalium-Ionen durch die Zellmembran transportiert, wodurch das Membranpotential zusammenbricht und die Zelle in Apoptose übergeht. FCCP wirkt als Protonophor bzw. Entkoppler, indem es Protonen bindet und über die mitochondriale Membran hinweg transportiert. Dadurch kommt es zur Unterbrechung der Verknüpfung zwischen Oxidation und Phosphorylierung in der Atmungskette und die Zelle geht in Apoptose über. Beide Substanzen verringern somit das Membranpotential auf eine Basislinie und dienen am Ende der Normierung. Die verschiedenen Untersuchungsbedingungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 12: Medienzusammensetzung bei der Durchflusszytometrie.

Anzahl der Läufe	Zusammensetzung der Medien	Ziel
1x	Opti-MEM Medium	Kontrolle
2x	Opti-MEM Medium + 200 nM TMRM ⁺	Messung von $\Delta\Psi_m$
2x	Opti-MEM Medium + 200 nM TMRM ⁺ + 1 mM Valinomycin	$\Delta\Psi_m$ mit Stressor 1, zur Ermittlung des Basiswertes
1x	Opti-MEM Medium + 200 nM TMRM ⁺ + 10 mM FCCP	$\Delta\Psi_m$ mit Stressor 2, zur Ermittlung des Basiswertes

Zunächst wurden 2 μ L des 1 mM Valinomycins und 1 μ L des 10 mM FCCP's in die entsprechenden Reaktionsgefäße gegeben, gut gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden alle Reaktionsgefäße, außer die Kontrolle mit lediglich Medium, bei 800 x g für 5 Minuten und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und 1 mL der 200 nM TMRM⁺-Lösung in die entsprechenden Reaktionsgefäße gegeben. Außerdem wurde auch wie oben beschrieben Valinomycin und FCCP ein zweites Mal in die entsprechenden Reaktionsgefäße gegeben. Alle Reaktionsgefäße wurden nach der Zugabe kurz gevortext und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden alle Reaktionsgefäße mit 800 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dann erfolgte ein Waschschnitt, indem der Überstand abgenommen, das Pellet in 500 μ L PBS resuspendiert, kurz

gevortext und erneut mit 800 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Am Ende wurde der Überstand erneut abgenommen, die Pellets in 500 µL PBS resuspendiert, in 5 mL *Flow Cytometrie Röhrchen* überführt und aufrecht in einer lichtgeschützten Box zum Zytometer transportiert.

Direkt vor Injektion der Zellen in das Zytometer wurden in jedes Röhrchen 20 µL der 100 µM DAPI-Lösung hinzugegeben und durch vorsichtiges Schwenken kurz gemischt. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde das Zytometer *BD™ LSR II* verwendet. Dabei wurden die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen in einem laminären Flüssigkeitsstrom an einem fokussierten monochromatischen Lichtstrahl vorbeigeführt. Je nach Größe, Granularität und Anfärbung der Zellen kam es zu einer spezifischen Streuung und Emission des Fluoreszenzfarbstoffes, die mittels Photodetektoren erfasst und mittels *BD FACSDiva™ Software* analysiert wurde. Das Licht wird dabei auf verschiedene Weisen gestreut. Beim Vorwärtsstreulicht (*engl. forward scatter, FSC*) handelt es sich um Licht, welches in Richtung des Laserstrahls gebeugt wurde. Das FSC ist ein Maß für die Zellgröße. Beim Seitwärtsstreulicht (*engl. side scatter, SSC*) handelt es sich um Licht, welches rechtwinklig vom Laserstrahl gebeugt wurde. Das SSC ist ein Maß für die Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zellen. Um die Genauigkeit der Messung weiter zu erhöhen, wurde mittels der *DIVA Software* ein *Threshold*-Wert als Ausdruck der Zellgrößen vorgegeben. Außerdem ermöglichte die Anfärbung mittels DAPI-Lösung eine Aussortierung bereits verstorbener Zellen. Die Selektionsparameter sind in der folgenden Tabelle 13 zusammengefasst und die Anwendung dieser Parameter innerhalb der Durchflusszytometrie ist in der folgenden Abbildung 9 schematisch dargestellt.

Tabelle 13: Einstellungsparameter in der Durchflusszytometrie.

Selektionsparameter	Lymphozyten	Jurkat-Zellen
FSC	467	375
SSC	346	324
DAPI	363	291
TMRM	231	225
Threshold	35.000	10.000

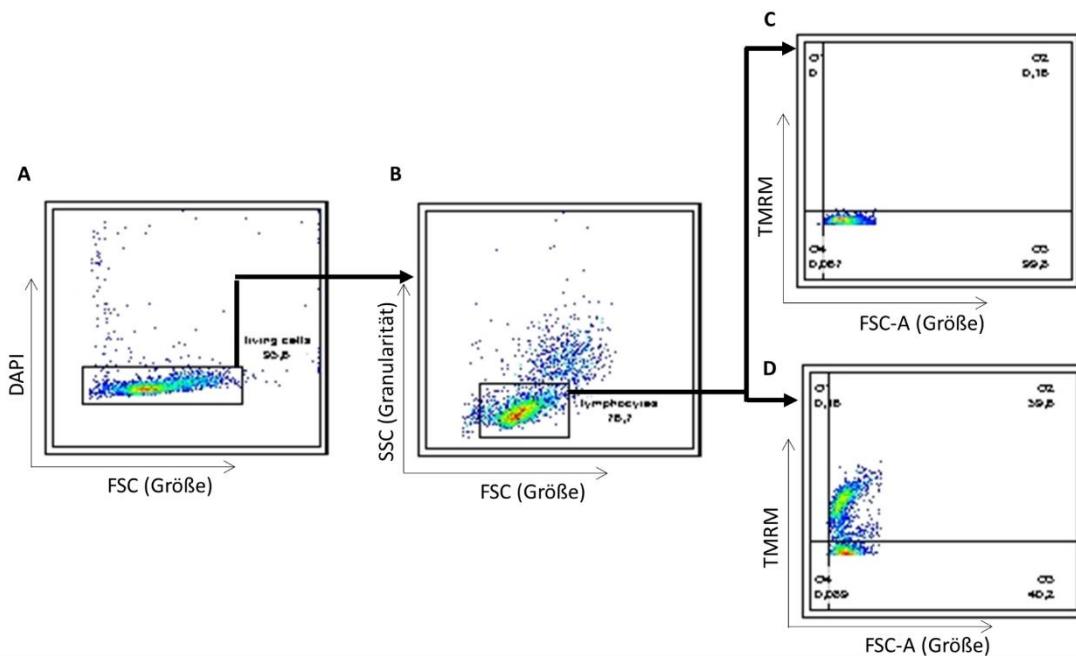


Abbildung 9 Beispielhafte Darstellung der Selektionsparameter in der Durchflusszytometrie. **A:** DAPI positive Zellen repräsentieren tote Zellen, die nicht analysiert werden sollen. Fortgefahrene wird nur mit den DAPI negativen Zellen aus der Markierung. **B:** SSC auf der y-Achse zeigt die Granularität, FSC auf der x-Achse zeigt die Größe der Zellen an. Durch die Isolation sollten nur Leukozyten vorliegen. Große Zellen mit vielen Granula entsprechen Monozyten und Granulozyten, während kleinere Zellen mit weniger Granula Lymphozyten entsprechen. Es wird nur mit der Lymphozyten-Population fortgefahrene. **C/D:** Auf der y-Achse werden nun die mit TMRM⁺ angefärbten Zellen angezeigt, was dem mitochondriales Membranpotential entspricht. Die x-Achse zeigt weiterhin die Größe. In C sind die Zellen mit FCCP behandelt und zeigen somit die Basislinie des mitochondrialen Membranpotentials. In D sind die Zellen mit TMRM angefärbt, aber nicht behandelt.

Zuletzt wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der einzelnen Proben bestimmt, welche dem mitochondrialen Membranpotential entspricht. Für die endgültigen Werte wurde aber noch der MFI der Proben mit FCCP als Basalwert vom MFI der nur mit Medium versetzten Proben abgezogen.

2.2.12 Allgemeine Methoden Zellkultur

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank.

Kultivierung von Jurkat-Zellen

Die Jurkat Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (v/v) Glukose, 1 % Hepes-Puffer und 1 % (v/v) Natriumpyruvat bei 37 °C mit einem Luft-CO₂-Gehalt von 5 % (v/v) und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Kultivierung erfolgte als Suspensionskultur in aufgestellten T-75 Zellkulturflaschen mit 50 mL Medium. Ein Mediumwechsel erfolgte zwei Mal in der Woche im Rahmen einer Passagierung von 1:10.

Zellen auftauen

Die 2 mL Kryoröhrchen wurden einzeln kurz bei 37 °C in einem Wasserbad erwärmt, bis das Eis sich fast komplett aufgelöst hatte. Dann wurde 1 mL vorgewärmtes frisches Medium hinzugegeben, vorsichtig gemischt und die komplette Suspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen mit 7 mL des vorgelegten Kultivierungsmediums überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1.000 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 10 mL des jeweiligen Kultivierungsmediums resuspendiert und in einer T-75 Zellkulturflasche ausgesät. Eine Anwuchskontrolle mit Mediumwechsel und Absaugen abgestorbener Zellen erfolgte nach 24 h Kultivierung.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzählung erfolgte mittels automatischen Zellzähler Countess™. Hierzu wurden 15 µL der zu messenden Einzelzellsuspension in die Countess™ *cell counting chamber slides* eingebracht und dann durch das Gerät ausgezählt. In einer durch das Labor intern durchgeführten Kontrolle der Zellzahlmessungen zeigte eine valide Messung lebender Zellen.

Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurde die gewünschte Menge an Einzelzellsuspension verwendet, in ein 5 bzw. 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Pellet in 900 µL Kultivierungsmedium

resuspendiert, in ein 2 mL Kryoröhrchen mit 100 µL vorgelegten DMSO überführt und vorsichtig gemischt. Das Kryoröhrchen wurde dann in ein mit Isopropanol gefüllten Einfrierkontainer für mindestens 24 h bei - 80 °C und anschließend dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei - 196 °C gelagert.

2.2.13 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *one-way* ANOVA und einem post-hoc Holm-Šídák-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Verhaltensversuche

3.1.1 Open-Field-Test

Die Symptome von PFBC sind sehr heterogen und reichen von Bewegungsstörungen bis hin zu lediglich Kopfschmerzen. In diesem Test untersuchten wir daher den motorischen Phänotyp in Bezug auf die motorische Aktivität. Es zeigte sich vor der intrazerebralen Injektion von 6-OHDA und nach bereits im Vorfeld durchgeföhrter Habituation eine signifikant längere Wegstrecke für die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 10). Für die Mäuse der Kontrollgruppe zeigten sich bei 4 Monaten $163,0 \pm 10,2$ m und bei 12 Monaten $217,1 \pm 9,2$ m. Bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen zeigten sich dagegen bei 4 Monaten $195,5 \pm 17,6$ m und bei 12 Monaten $273,5 \pm 13,7$ m. Die Ergebnisse zeigen somit ein über das Alter hinweg stabil höhere motorische Aktivität für die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse. Vergleicht man außerdem die zurückgelegte Wegstrecke der 4 Monate alten Mäuse mit der Wegstrecke der 12 Monate alten Mäusen zeigt sich, dass diese mit dem Alter für beide Gruppen zugenommen hat.

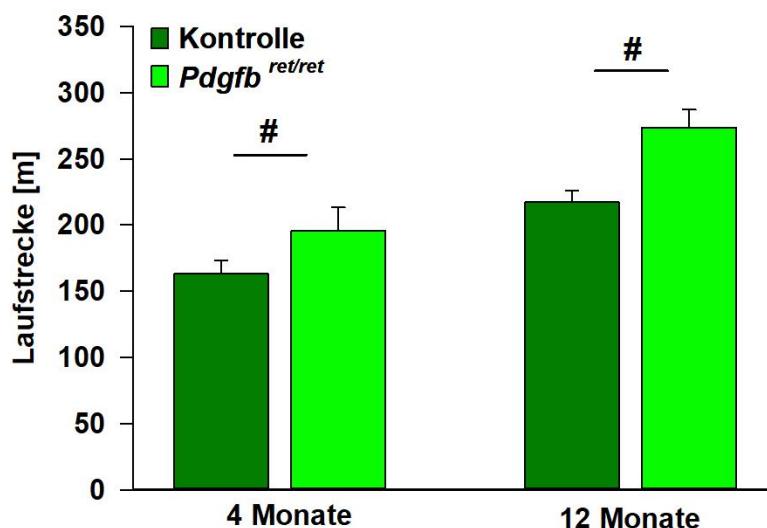


Abbildung 10: Darstellung der innerhalb von 30 Minuten zurückgelegten Wegstrecke für die 4 und 12 Monate alten Mäuse in m ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

Zusätzlich zur insgesamt zurückgelegten Wegstrecke wurde ebenfalls untersucht, inwieweit die 18×18 cm große Kernzone der 50×50 cm großen Fläche der Versuchsbox gemieden wurde. Hierbei zeigte sich mit zunehmendem Alter eine Zunahme der Aufenthaltsdauer in der Kernzone für die Kontrollgruppe, wohingegen

sich die Aufenthaltsdauer für die $Pdgfb^{ret/ret}$ Mäuse im Alter verringerte (siehe Abbildung 11). Für die Mäuse der Kontrollgruppe zeigte sich ein Quotient von $0,05 \pm 0,09$ bei 4 Monaten und von $0,07 \pm 0,014$ bei 12 Monaten. Bei den $Pdgfb^{ret/ret}$ Mäusen ergab sich dagegen ein Quotient von $0,07 \pm 0,001$ bei 4 Monaten und von $0,05 \pm 0,008$ bei 12 Monaten. Ein Beispiel für das Tracking der Wegstrecke und der Verteilung der zurückgelegten Strecke innerhalb der Versuchsbox ist in Abbildung 12 dargestellt.

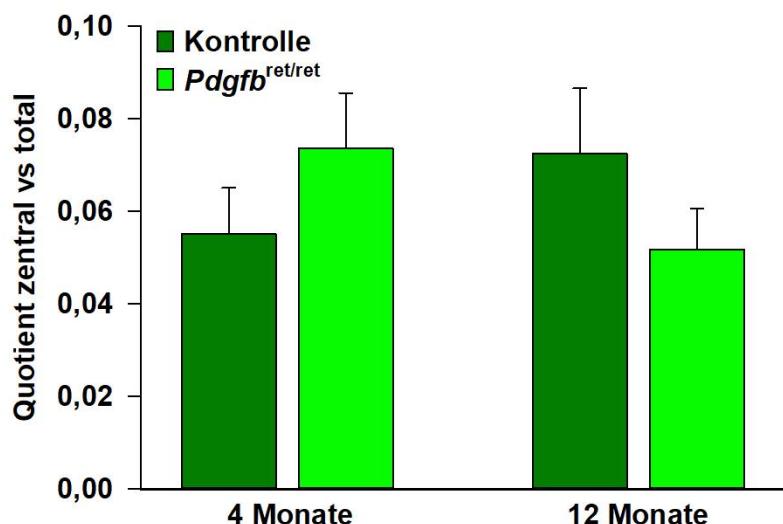


Abbildung 11: Darstellung des Verhältnisses zwischen der in der Kernzone und außerhalb der Kernzone zurückgelegten Strecke für die 4 und 12 Monate alten Mäuse innerhalb von 30 Minuten ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM).

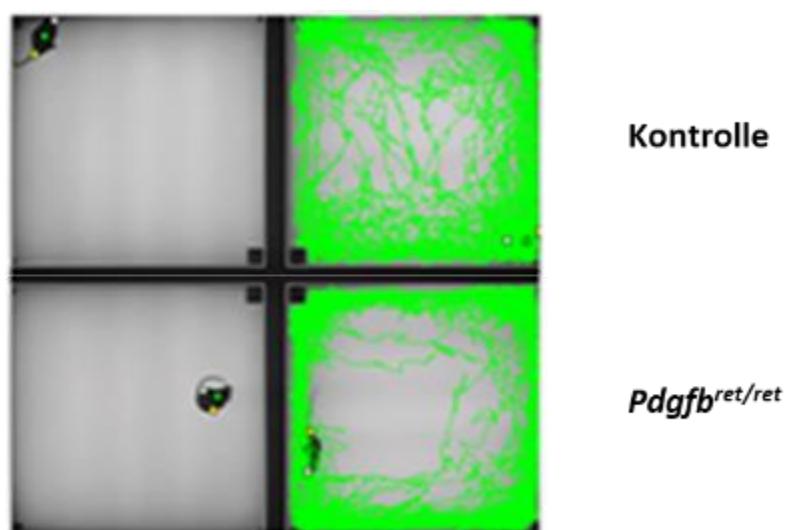


Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung für einen Versuchsaufbau zur Messung der zurückgelegten Wegstrecke. In der linken Bildhälfte ist je Box eine Maus zu erkennen, bei der mit Hilfe der Viewer-Software Kopf, Körper und Schwanz automatisch erfasst wurden. In der rechten Bildhälfte ist für die jeweils in der Box befindlichen Maus, oben Kontrolle und unten $Pdgfb^{ret/ret}$ Maus, die gesamte Wegstrecke als grüne Linie dargestellt. Es zeigt sich hier beispielhaft die Tendenz

zur Meidung der Kernzone, hier aktuell nicht eingezeichnet, durch die $Pdgfb^{ret/ret}$ Maus.

3.1.2 Open-Field-Test nach intrazerebraler Injektion von 6-OHDA

Der Open-Field-Test wurden 6 Tage nach erfolgter intrazerebraler Injektion von 6-OHDA erneut durchgeführt. Da die Motorik nach erfolgter Injektion verändert ist, ist dieser Tests jedoch nur im geringeren Umfang geeignet, um das Verhalten gut bewerten zu können. Da dieser Test auch nicht zur Evaluierung des Toxin-basierten Parkinsonmodells entwickelt wurde, erlauben die Ergebnisse diesbezüglich auch nur eine begrenzte Aussagekraft. Beim Open-Field-Test zeigte sich im Vergleich zu den Kontrolltieren weiterhin eine signifikant längere Wegstrecke für die $Pdgfb^{ret/ret}$ Mäuse über beide Altersklassen hinweg (siehe Abbildungen 13 und 14). Bei den 4 Monats Mäusen zeigte sich nach intrazerebraler Injektion stabile Werte im Vergleich zur Voruntersuchung, wohingegen sich bei den 12 Monatsmäusen für beide Gruppen eine Reduktion der Wegstrecke ergab (siehe Abbildungen 13 und 14). Bei den 4 Monats Mäusen zeigte sich vor der intrazerebralen Injektion eine zurückgelegte Wegstrecke von $163,0 \pm 10,2$ m für die Mäuse der Kontrollgruppe und $195,5 \pm 17,7$ m für die $Pdgfb^{ret/ret}$ Mäuse (siehe Abbildung 13). Nach der Operation änderte sich dies nur unwesentlich auf $164,9 \pm 10,0$ m bzw. $196,2 \pm 24,4$ m. Für die 12 Monats Mäuse zeigte sich $217 \pm 9,2$ m vor und $141 \pm 9,5$ m nach der 6-OHDA Gabe bei den Kontrolltieren, und $273,5 \pm 13,7$ m vor bzw. $231,5 \pm 20,7$ m für die $Pdgfb^{ret/ret}$ Mäuse (siehe Abbildung 14).

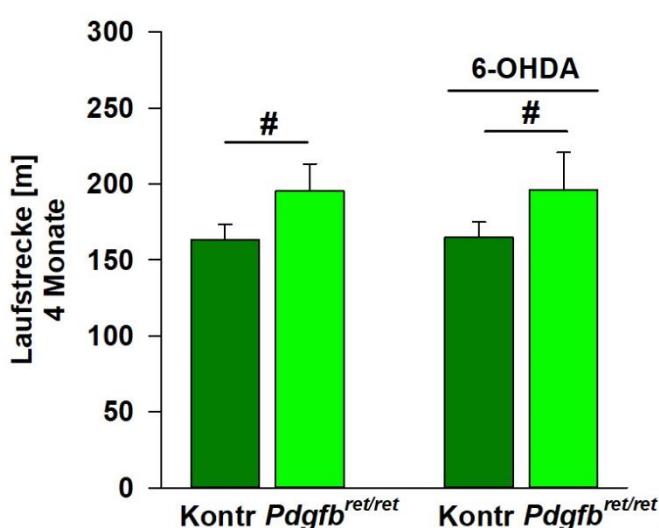


Abbildung 2: Darstellung der gesamt zurückgelegten Wegstrecke in m innerhalb von 30 Minuten für die 4 Monaten alten Mäuse vor und nach der intrazerebralen Injektion ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

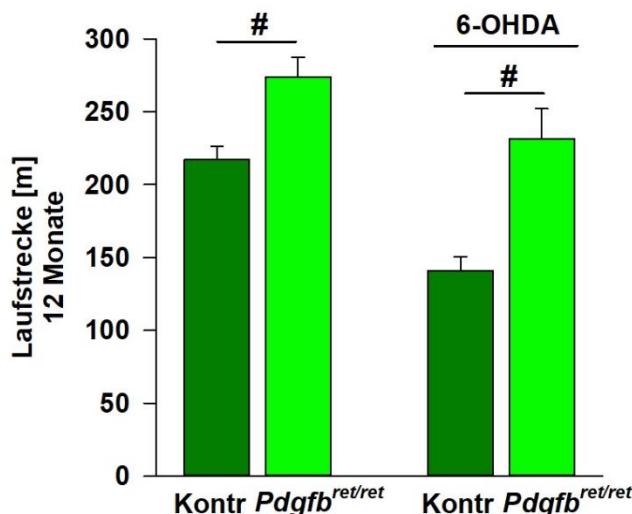


Abbildung 3: Darstellung der gesamt zurückgelegten Wegstrecke in m innerhalb von 30 Minuten für die 12 Monate alten Mäuse vor und nach der intrazerebralen Injektion ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

In Bezug auf die in der Kernzone verbrachten Zeit zeigte sich für die 4 Monats Mäuse der Kontrollgruppe ein leichter Anstieg auf das gleiche Verhältnis wie bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen, während diese hier keine Veränderung zeigten. Bei den 12 Monats Mäusen zeigten sich insgesamt keine wesentliche Veränderung (siehe Abbildung 15). Die Mäuse der Kontrollgruppe zeigten ein Quotient von $0,07 \pm 0,01$ bei 4 Monaten und von $0,08 \pm 0,018$ bei 12 Monaten. Bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen zeigte sich dagegen eine Ratio von $0,07 \pm 0,016$ bei 4 Monaten und von $0,06 \pm 0,013$ bei 12 Monaten.

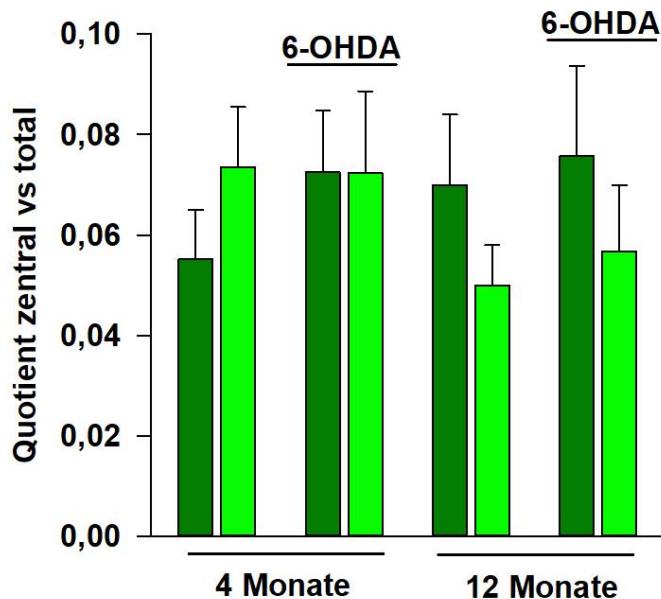


Abbildung 15: Darstellung des Verhältnisses zwischen der in der Kernzone und außerhalb der Kernzone zurückgelegten Strecke vor und nach intrazerebraler Injektion von 6-OHDA, für die 4 und 12 Monate alten Mäuse, innerhalb von 30 Minuten. Die dunkelgrünen Balken symbolisieren die Kontrolltiere und die hellgrünen Balken die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM).

3.1.3 Amphetamine-induzierter Rotationstest

Um die Empfindlichkeit auf das Toxin-basierte Parkinsonmodell mit 6-OHDA in Bezug auf die motorische Ausprägung endgültig zu testen, wurde 7 Tage nach der unilateralen, intrazerebralen Injektion von 6-OHDA in das rechte *Striatum*, das Drehverhalten innerhalb von 5 Minuten unter peritonealer Gabe von Amphetamine untersucht (siehe Abbildung 16). Hierbei zeigte sich für die Mäuse beider Gruppen eine Nettorotation nach rechts, wobei die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse in beiden Altersgruppen ein signifikant höheres Drehverhalten zeigten. Für die Mäuse der Kontrollgruppe zeigten sich bei den 4 Monats Mäusen $4,18 \pm 6,9$ Drehungen und bei den 12 Monats Mäusen $11,38 \pm 5,85$ Drehungen. Bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen ergaben sich jeweils $42,89 \pm 14,45$ und $36,0 \pm 12,04$ Drehungen.

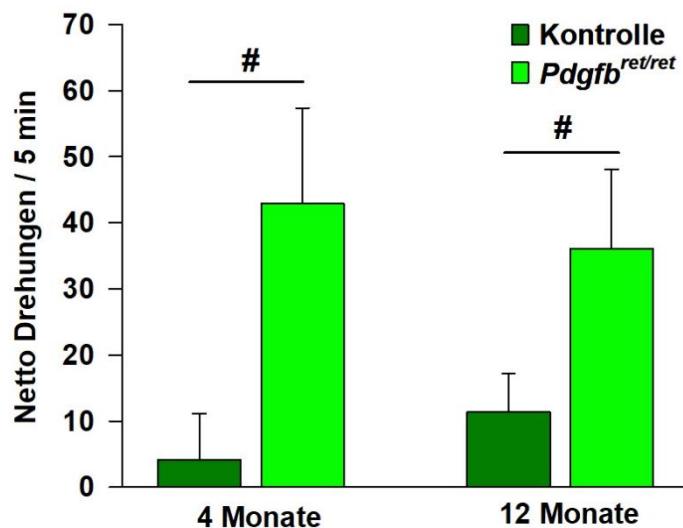


Abbildung 16: Darstellung, für die 4 und 12 Monate alten Mäuse, der netto Drehungen nach rechts innerhalb von 5 Minuten nach peritonealer Injektion von Amphetamin ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

3.2 HPLC – Messung des Dopaminstoffwechsels und der Neurotransmitter

3.2.1 Basaler Dopaminstoffwechsel

Um das zentrale Korrelat der Verhaltensuntersuchung auf Transmitterebene zu untersuchen, wurden die basalen Dopaminkonzentrationen und der Dopaminstoffwechsel durch Messung des Abbau-Metabolites DOPAC der linken Striata untersucht. Für die 4 Monats Kontrollgruppe lag die Dopaminkonzentration bei $15,71 \pm 1,17$ ng/mg Feuchtgewebe und für die 4 Monats *Pdgfb*^{ret/ret} Mäuse bei $17,03 \pm 2,19$ ng/mg, wobei sich hier kein signifikanter Unterschied zeigte. Für die 12 Monats Kontrollgruppe lag die Dopaminkonzentration dagegen bei $10,15 \pm 1,20$ ng/mg Feuchtgewebe und für die 12 Monats *Pdgfb*^{ret/ret} Mäuse bei $11,01 \pm 1,04$ ng/mg, wobei sich hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied zeigte. Im Vergleich der beiden Altersgruppen zeigte sich aber insgesamt eine signifikante Reduktion des Dopaminspiegels im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses (siehe Abbildung 17).

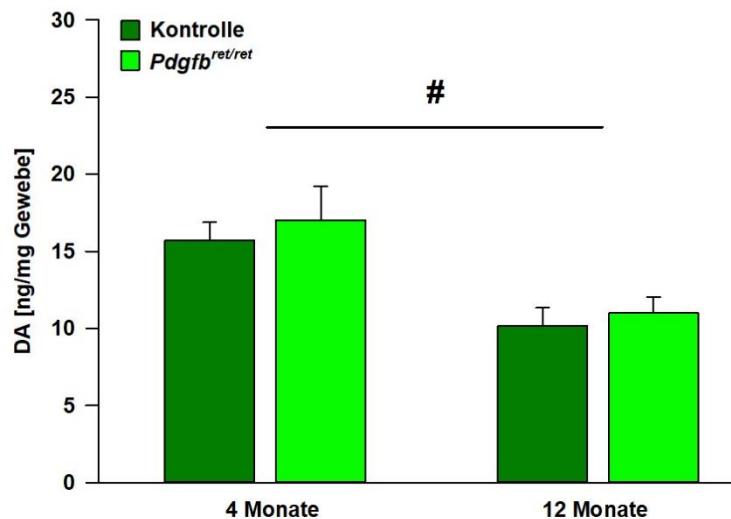


Abbildung 17: Darstellung der basalen Dopaminkonzentrationen in ng/mg Feuchtgewebe der linken *Striata* für die 4 und 12 Monats Mäuse ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

Durch Messung der DOPAC Konzentrationen konnte der DOPAC/Dopamin-Quotient berechnet werden, der den Dopaminumsatz anzeigt. Hier zeigte sich für die 4 Monats Kontrollgruppe ein Dopaminumsatz bei $0,1 \pm 0,015$ und für die 4 Monats *Pdgfb*^{ret/ret} Mäuse ein signifikant höherer Wert bei $0,24 \pm 0,04$. Für die 12 Monats Kontrollgruppe lag der Dopaminumsatz bei $0,15 \pm 0,013$ und für die 12 Monats *Pdgfb*^{ret/ret} Mäuse bei $0,18 \pm 0,015$, wobei sich hier kein signifikanter Unterschied mehr innerhalb der Altersgruppe zeigte. Es zeigte sich aber ein signifikanter Unterschied zu den jüngeren Wurfgeschwister der jeweiligen Gruppe, wobei der Dopaminstoffwechsel in der Kontrollgruppe zunahm und bei den *Pdgfb*^{ret/ret} Mäusen abnahm (siehe Abbildung 18).

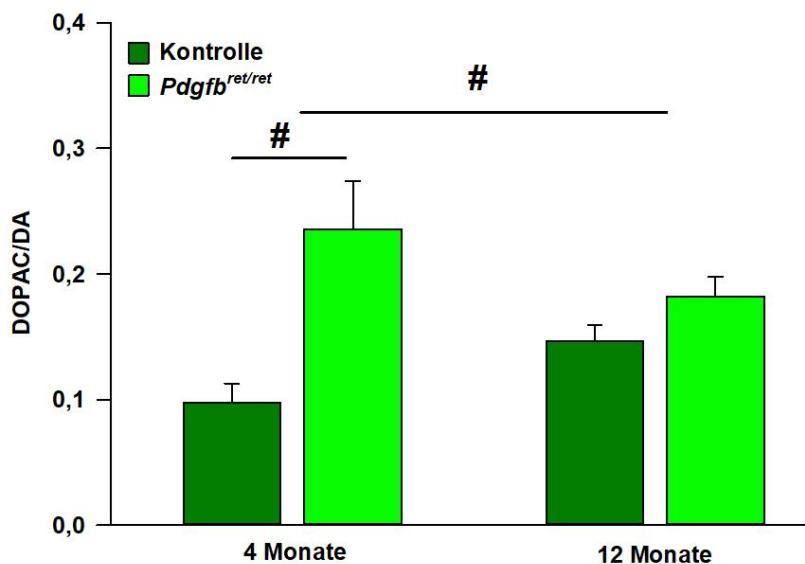


Abbildung 18: Darstellung des Dopaminumsatzes mittels DOPAC/DA der linken *Striata* für die 4 und 12 Monats Mäuse ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

3.2.2 Effekte der 6-OHDA-Läsion auf die Gewebekonzentrationen von Dopamin und den Dopaminstoffwechsel

Um die Empfindlichkeit auf das Toxin-basierten Parkinsonmodells mit 6-OHDA auf Transmitterebene zu untersuchen, wurde die Dopaminkonzentration und der Dopaminumsatz des rechten *Striatums* in Bezug auf die kontralaterale Seite gemessen. Es zeigte sich in Bezug auf die Dopaminkonzentrationen für die 4 Monats Kontrollgruppe ein Wert bei $64,87 \pm 7,98$ und für die 4 Monats *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse ein Wert bei $43,98 \pm 9,47$, was für die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse eine signifikante Reduktion im Bezug zur kontralateralen Seite bedeutet. Für die 12 Monats Kontrollgruppe zeigte sich ein Wert von $59,62 \pm 5,57$ und für die gleichaltrigen *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse ein Wert von $29,71 \pm 8,45$, was ebenfalls eine signifikante Reduktion für die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse bedeutet. Zusammenfassend zeigte sich eine generelle Reduktion der Dopaminkonzentrationen, welche sich deutlich für die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse und knapp nicht signifikant für die Kontrolltiere zeigte (siehe Abbildung 19).

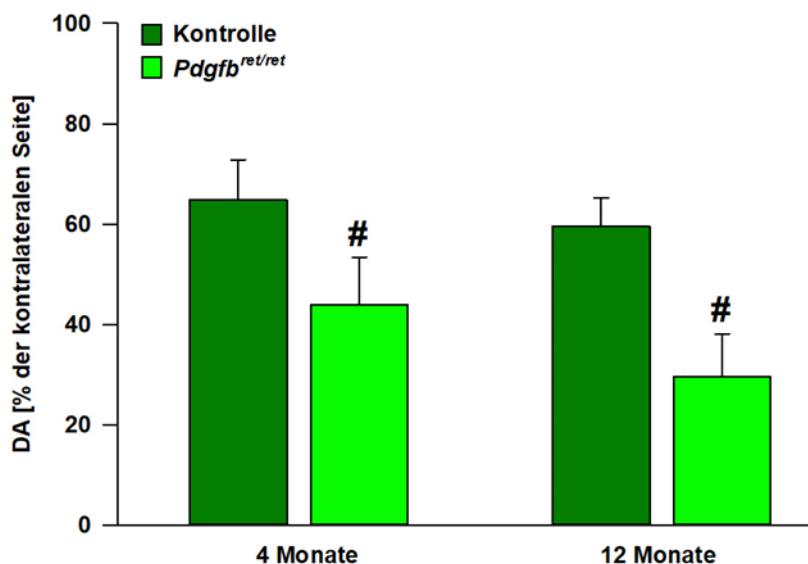


Abbildung 4: Darstellung der Dopaminkonzentrationen des rechten *Striatums* im Verhältnis zur Dopaminkonzentration des linken *Striatums* für die 4 und 12 Monats Mäuse. Als signifikant ist hier die Steigerung im Vergleich zur Dopaminkonzentration vor der intrazerebralen Injektion. ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

Für den Dopaminumsatz konnte eine signifikante 6-OHDA induzierte Steigerung bei den *Pdgfb*^{ret/ret} Mäusen nachgewiesen werden. Für den Dopaminumsatz der 4 Monats Kontrollgruppe ergab sich ein Wert von $0,21 \pm 0,046$. Für die 4 Monats *Pdgfb*^{ret/ret} Mäuse ergab sich dagegen ein Wert von $0,76 \pm 0,166$ und somit eine signifikante Steigerung. Für die 12 Monats Kontrollgruppe zeigte sich ein Wert von $0,25 \pm 0,012$ und somit ein ähnlicher Wert wie bei den 4 Monats Kontrolltieren. Bei den 12 Monats *Pdgfb*^{ret/ret} Tieren zeigte sich ein Wert von $0,62 \pm 0,12$ und somit erneut eine signifikante Steigerung, die auch ähnlich zur den 4 Monats Tieren ist (siehe Abbildung 20).

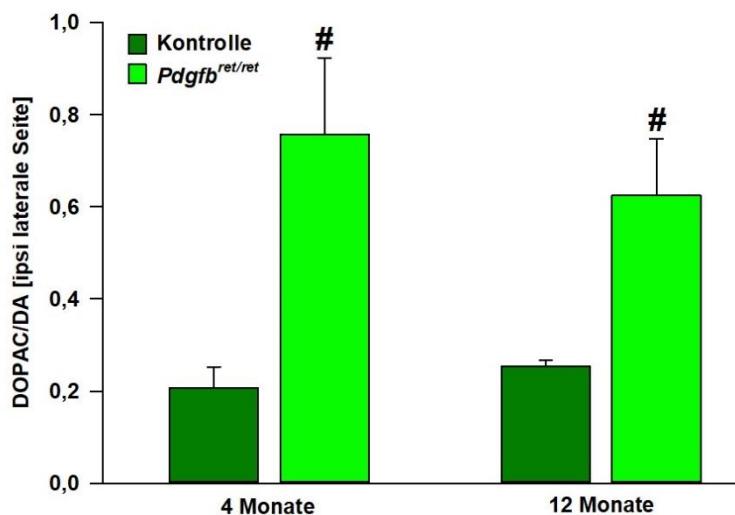


Abbildung 20: Darstellung des Dopaminumsatzes durch DOPAC/DA im Verhältnis zum kontralateralen *Striatum* für die 4 und 12 Monats Mäuse. Als signifikant ist hier die Steigerung im Vergleich zum Dopaminumsatz vor der intrazerebralen Injektion, siehe Abbildung 18 (n = 4 - 15 je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, p < 0,05).

3.3 *In-vitro* Osteoklastendifferenzierung aus Monozyten und deren osteolytische Kapazität

Um den Einfluss der postulierten Monozyten Dysfunktion auf die perivaskulären Kalkablagerungen im Rahmen einer gestörten Kalkresorption zu analysieren, haben wir die *in-vitro* Osteoklastendifferenzierung und deren Funktionalität mittels Osteolyse an humanen und murinen Proben untersucht. Zur besseren Übersicht sind im Folgenden die Ergebnisse der Experimente an den humanen und murinen Proben gemeinsam dargestellt. Die Daten für die Größe und Anzahl der Osteoklasten der 4 Monats Mäuse entstammen der Dissertation von Georg Mahlke und sind hier aus Gründen der Übersichtlichkeit mit den eigenen Daten dargestellt.

3.3.1 Größe und Anzahl *in-vitro* differenzierter Osteoklasten

Murine Proben

Für die Anzahl an gebildeten Osteoklasten zeigte sich bei den 4 Monats *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen eine signifikant geringere Osteoklastenanzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei den 12 Monats *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen zeigte sich ebenfalls eine geringere, aber knapp nicht signifikante Osteoklastenanzahl (siehe Abbildung 21). Für die 4 Monate alten Kontrolltiere ergaben sich $68,88 \pm 7,41$ Osteoklasten und für die gleichaltrigen *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse $40,09 \pm 5,76$ Osteoklasten. Für die 12 Monate

alten Tiere ergaben sich entsprechend $48,92 \pm 0,63$ Osteoklasten und $33,68 \pm 3,38$ Osteoklasten. Die Daten für die 4 Monats Mäuse entstammen dabei der Doktorarbeit von Georg Mahlke. Hier wurde das gleiche Versuchsprotokoll verwendet wie bei den eigenen Versuchen.

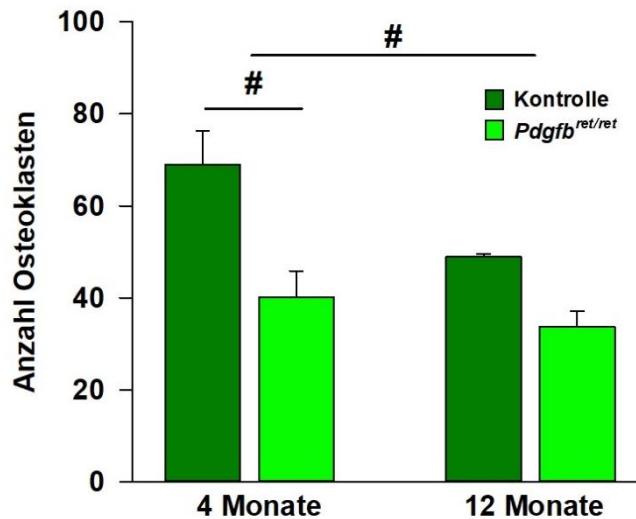


Abbildung 21: Darstellung der Anzahl an gebildeten Osteoklasten innerhalb von 12 Tagen für die 4 und 12 Monats Mäuse ($n = 6-8$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

In Bezug auf die Größe der gebildeten Osteoklasten zeigten sich bei den 4 Monate alten Tieren signifikant kleinere Osteoklasten bei den *Pdgfb*^{ret/ret} Mäusen. Während sich bei den 12 Monats Mäusen etwas kleinere Osteoklasten bei den *Pdgfb*^{ret/ret} Mäusen zeigten (siehe Abbildung 22). Für die 4 Monats Kontrollgruppe ergab sich eine Größe von $100 \pm 4,60 \mu\text{m}^2$ und für die gleichalten *Pdgfb*^{ret/ret} Mäuse $75,25 \pm 5,92 \mu\text{m}^2$. Für die 12 Monate alten Mäuse ergaben sich jeweils $76,89 \pm 3,97 \mu\text{m}^2$ und $66,84 \pm 5,70 \mu\text{m}^2$. Die Daten für die 4 Monats Mäuse entstammen dabei der Doktorarbeit von Georg Mahlke. Hier wurde das gleiche Versuchsprotokoll verwendet wie bei den eigenen Versuchen.

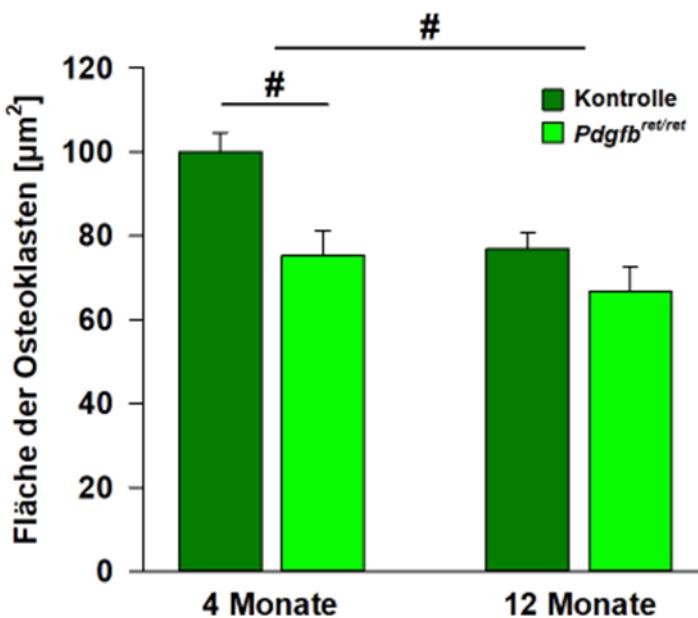


Abbildung 22: Darstellung der Größe in μm^2 der gebildeten Osteoklasten innerhalb von 12 Tagen für die 4 und 12 Monats Mäuse (n = 6 - 8 je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, p < 0,05).

Humane Proben

Für die Anzahl der gebildeten humanen Osteoklasten zeigte sich für beide Altersgruppen eine geringere Anzahl an Osteoklasten bei den Mutationsträgern, wobei hier aufgrund der niedrigen Probenanzahl kein signifikantes Ergebnis erreicht werden konnte. Vergleicht man allerdings die Gruppe mittleren Alters mit der Gruppe höheren Alters, zeigte sich insgesamt eine signifikante Abnahme der gebildeten Osteoklasten (siehe Abbildung 23). Für die Anzahl der Osteoklasten der mittleren Altersgruppe ergaben sich $57 \pm 6,4$ für die Kontrollen und 50 für den Mutationsträger. In der höheren Altersgruppe ergaben sich $37,88 \pm 5,75$ für die Kontrollen und 12,13 für die Mutationsträgerin.

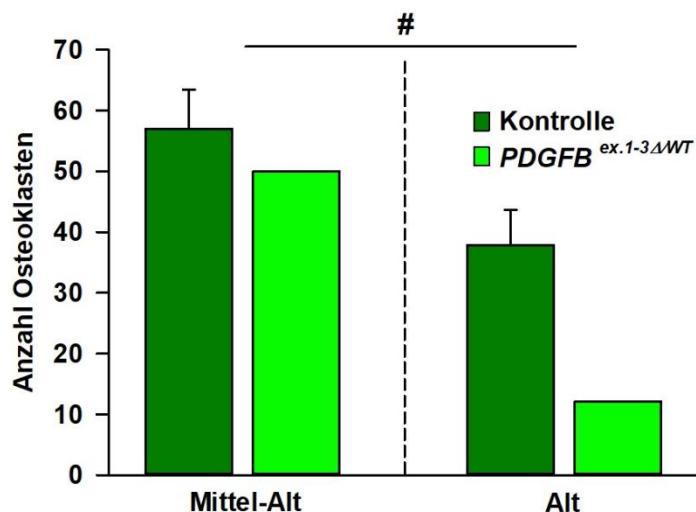


Abbildung 23: Darstellung der Anzahl an gebildeten Osteoklasten innerhalb von 12 Tagen für die Mutationsträger (*PDGFB*^{wt/del(1-251)}) und je 2 ähnlich alte Kontrollen (n = 1 - 2 je Gruppe, Mittelwert ± SEM, p < 0,05).

In Bezug auf die Größe der gebildeten Osteoklasten zeigte sich eine Tendenz, dass die Osteoklasten der Mutationsträger sowohl in der Gruppe mittleren und höheren Alters kleiner sind als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 24). Es zeigte sich auch eine leichte Tendenz, dass Größe der Osteoklasten für Kontrollen und Mutationsträgern im Alter abnimmt. Für beide Aussagen wurde aufgrund der niedrigen Probenanzahl keine Signifikanz erreicht. Für die Größe der Osteoklasten der mittleren Altersgruppe ergaben sich $101,64 \pm 12,84 \mu\text{m}^2$ für die Kontrollen und $62,63 \mu\text{m}^2$ für den Mutationsträger. In der höheren Altersgruppe ergaben sich $84,19 \pm 15,93 \mu\text{m}^2$ für die Kontrollen und $49,73 \mu\text{m}^2$ für die Mutationsträgerin. Mikroskopische Bilder von differenzierten Osteoklasten sind beispielhaft in Abbildung 25 dargestellt.

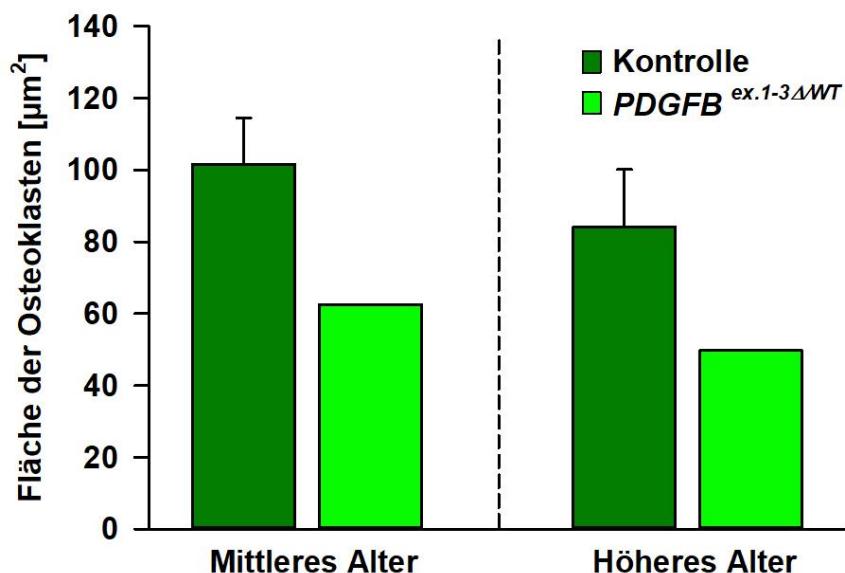


Abbildung 24: Darstellung der Größe in μm^2 der gebildeten Osteoklasten innerhalb von 12 Tagen für die Mutationsträger ($PDGFB^{\text{wt/del}(1-251)}$) und je 2 ähnlich alte Kontrollen (n = 1 - 2 je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, p < 0,05).

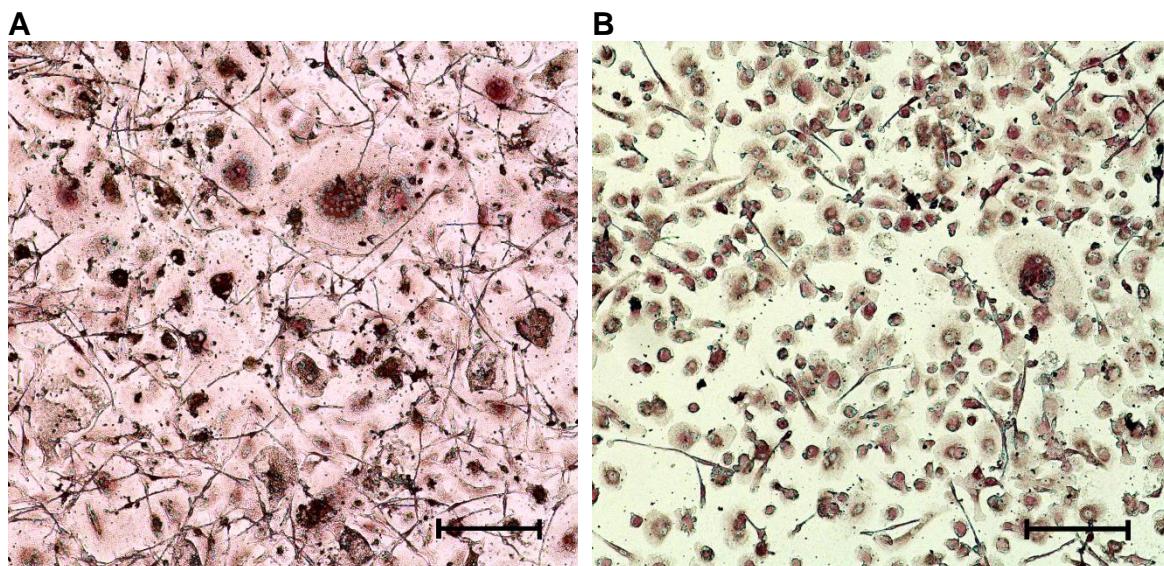


Abbildung 25: Beispielhafte mikroskopische Abbildung von differenzierten humanen Osteoklasten nach 12 Tagen Differenzierung. Bei A handelt es sich um eine Kontrolle. Bei B um Osteoklasten von einem Mutationsträger. Maßbalken 200 μm .

3.3.2 Ausmaß der Osteolyse differenzierter Osteoklasten

Murine Proben

Um eine Aussage über die Funktionalität der differenzierten Osteoklasten treffen zu können, haben wir einen Osteolyse Versuch durchgeführt. Hier zeigte sich bei den 4 Monate alten *Pdgfb^{ret/ret}* Tieren eine signifikant höhere Osteolyse als bei den Kontrolltieren. Bei den 12 Monate alten *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen zeigte sich dagegen eine signifikant niedrigere Osteolyse als bei den Kontrolltieren (siehe Abbildung 26). Bei den 4 Monats Mäuse zeigte sich eine Osteolyse von $4,12 \pm 0,75 \text{ mm}^2$ bei den Kontrollen und $8,20 \pm 1,63 \text{ mm}^2$ bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen. Bei den 12 Monate alten Mäusen zeigte sich eine Osteolyse von $0,10 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ bei den Kontrollen und $0,04 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen. In Abbildung 27 ist das Ausmaß der Osteolyse und Osteoklasten nach Färbung auf dem Osteomatrix beispielhaft anhand von mikroskopischen Bildern dargestellt.

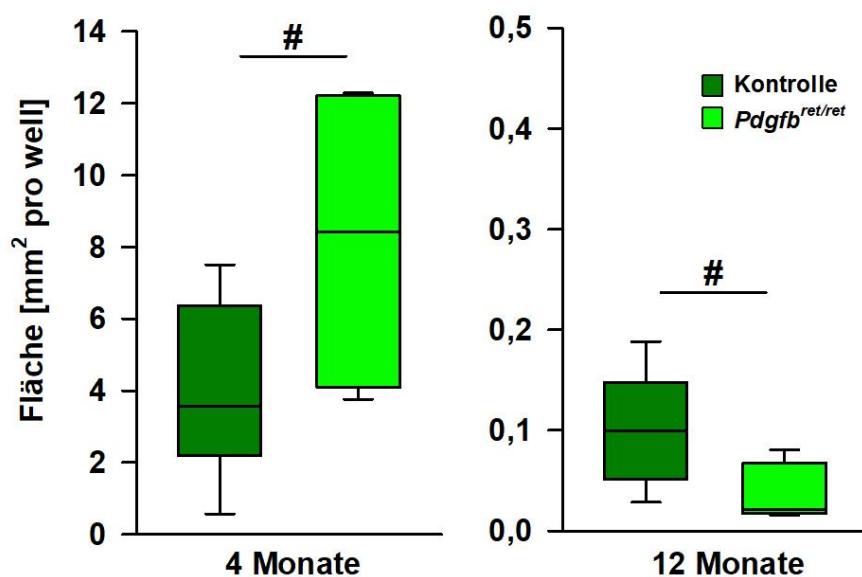


Abbildung 26: Darstellung der durch Osteolyse betroffenen Fläche in mm^2 für die 4 und 12 Monats Mäuse ($n = 4 - 14$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

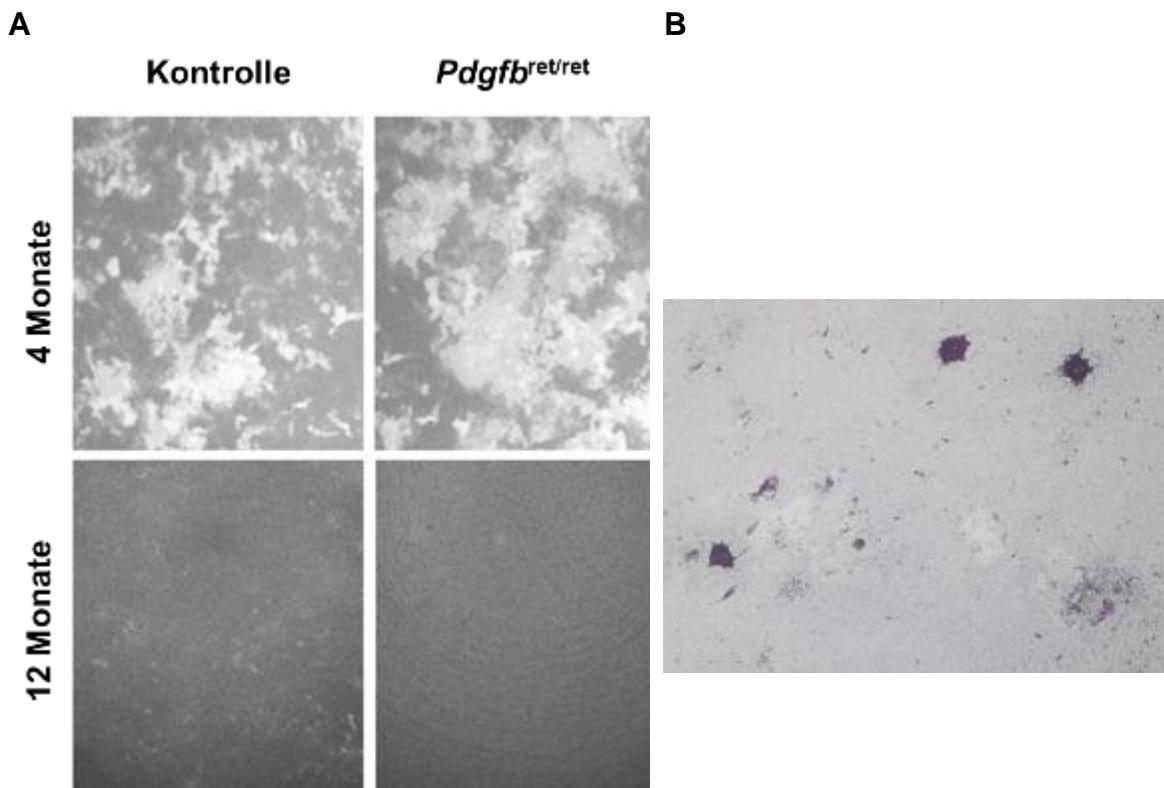


Abbildung 27: Beispielhafte mikroskopische Abbildung der durch Osteolyse betroffenen Fläche für die 4 Monats und 12 Monats Mäuse in **A**. Die dunkelgraue Fläche ist dabei noch intakte Knochenmatrix, während die Knochenmatrix im Bereich der helleren Flächen bereits ausgedünnt bzw. komplett aufgelöst wurde. In **B** sind 3 mehrkernige Osteoklasten nach TRAP-Färbung auf der Osteomatrix zu sehen. Die helleren Bereiche sind durch Osteolyse ausgedünnte Bereiche, wobei die Osteoklasten im Rahmen der Färbung an diesen Stellen bereits abgelöst wurden.

Humane Proben

Bei der Untersuchung des Ausmaßes der Osteolyse zeigte sich in der mittleren Altersgruppe eine deutliche höhere Osteolyse beim Mutationsträger im Vergleich zu den Kontrollen. In der höheren Altersgruppe zeigte sich dagegen ein eher gleiches Ausmaß an Osteolyse (siehe Abbildung 28). Bei den Kontrollen mittleren Alters ergab sich eine Osteolyse von $3,36 \pm 0,52 \text{ mm}^2$ und $1,04 \pm 0,21 \text{ mm}^2$, während sich beim Mutationsträger eine Osteolyse von $20,96 \pm 2,21 \text{ mm}^2$ zeigte. Bei den Kontrollen höheren Alters zeigte sich eine Osteolyse von $0,49 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ und $2,4 \pm 1,5 \text{ mm}^2$, während sich bei der Mutationsträgerin eine Osteolyse von $0,09 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ ergab. In Abbildung 29 ist das Ausmaß der Osteolyse beispielhaft anhand von mikroskopischen Bildern dargestellt.

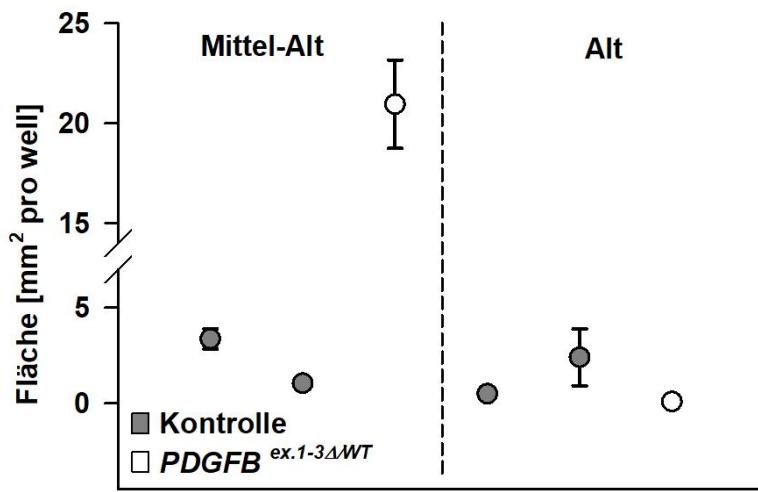


Abbildung 28: Darstellung der durch Osteolyse betroffenen Fläche in mm² für die Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und je 2 ähnlich alte Kontrollen (n = 1 - 2 je Gruppe, Mittelwert ± SEM).

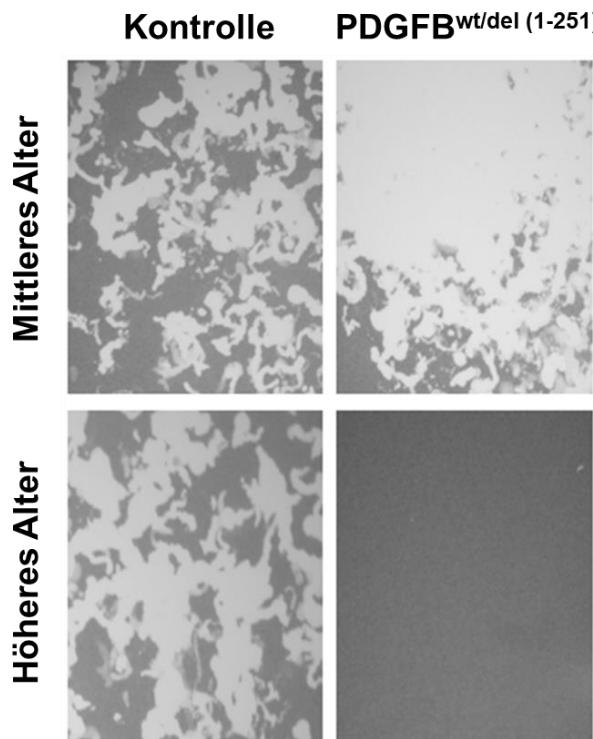


Abbildung 29: Beispielhafte mikroskopische Abbildung der durch Osteolyse betroffenen Fläche für die Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und entsprechende Kontrollen. Die dunkelgraue Fläche ist dabei noch intakte Knochenmatrix, während die Knochenmatrix im Bereich der helleren Flächen bereits ausgedünnt bzw. komplett aufgelöst wurde.

3.4 Murine Komplex-I-Aktivität

Um eine mögliche Ursache für das unterschiedliche Ausmaß der Osteoklastendifferenzierung und deren unterschiedliche osteolytische Kapazität weiter zu untersuchen, analysierten wir die Komplex-I-Aktivität bei den aus Mäuselebern isolierten Mitochondrien. Dabei zeigte sich eine im Verlauf stabile Komplex-I-Aktivität der Kontrollen über alle Altersklassen, wohingegen sich bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen eine über das Alter signifikante Zunahme der Komplex-I-Aktivität zeigte (siehe Abbildung 30). Dabei war die Aktivität in der Altersgruppe von 4 Monaten zunächst auf gleichem Niveau wie bei den Kontrollen, in der Altersgruppe von 8 Monaten zeigte sich ein Anstieg, welcher allerdings knapp nicht signifikant war, während sich dann bei 12 Monaten eine signifikant höhere Aktivität für die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse zeigte. Die Komplex-I-Aktivität in der Kontrollgruppe zeigte sich bei $97,19 \pm 10,93\%$ bei 4 Monaten, $99,0 \pm 9,62\%$ bei 8 Monaten und $100 \pm 4,70\%$ bei 12 Monaten. Bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen betrug die Komplex-I-Aktivität $101,28 \pm 8,48\%$ bei 4 Monaten, $123,61 \pm 7,27\%$ bei 8 Monaten und $152,14 \pm 13,10\%$ bei 12 Monaten.

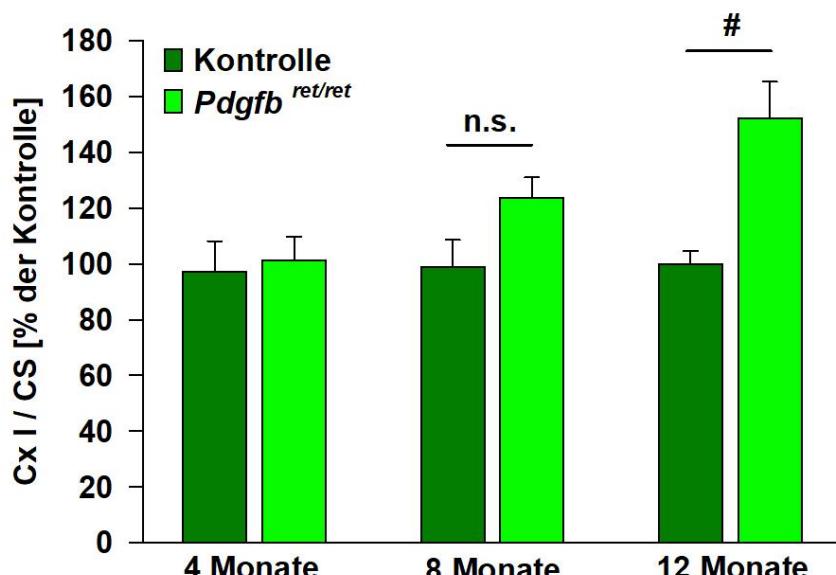


Abbildung 30: Darstellung der Komplex-I-Aktivität in Prozent bei aus Mäuselebern isolierten Mitochondrien für alle Altersklassen ($n = 4 - 15$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

3.5 Messung der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate humaner Leukozyten mittels Seahorse Analyzer

Als weiteres Maß für die mitochondriale Funktionsfähigkeit erfolgte die Messung der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate, in der sich signifikant höhere Werte bei den Mutationsträger beider Altersklassen zeigten (siehe Abbildung 31). Es zeigte sich für die Kontrollen eine Sauerstoffverbrauchsrate von $864,21 \pm 7,98$ und für die Mutationsträger $961,6 \pm 22,25$.

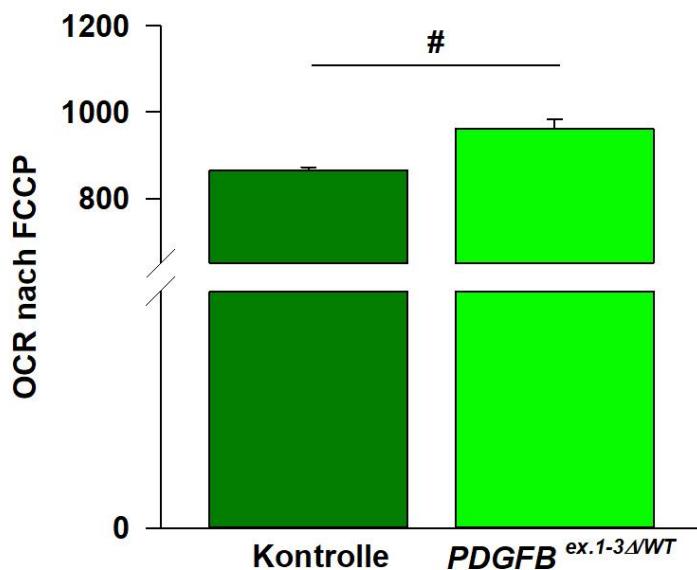


Abbildung 5: Darstellung der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate für die Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und die Kontrollen ähnlichen Alters (n = 1 - 2 je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, p < 0,05).

3.6 Vergleich des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) humaner Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie

Nach den festgestellten Abweichungen in der mitochondrialen Aktivität bei den murinen Proben führten wir eine Durchflusszytometrie der isolierten humanen Leukozyten zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials durch. Hierbei zeigte sich ein signifikant höhere Fluoreszenzintensität bei den Mutationsträgern beider Altersklassen im Vergleich zu den ähnlich alten Kontrollen, was einem negativerem und damit hyperpolarisiertem mitochondrialen Membranpotential entspricht (siehe Abbildung 32).

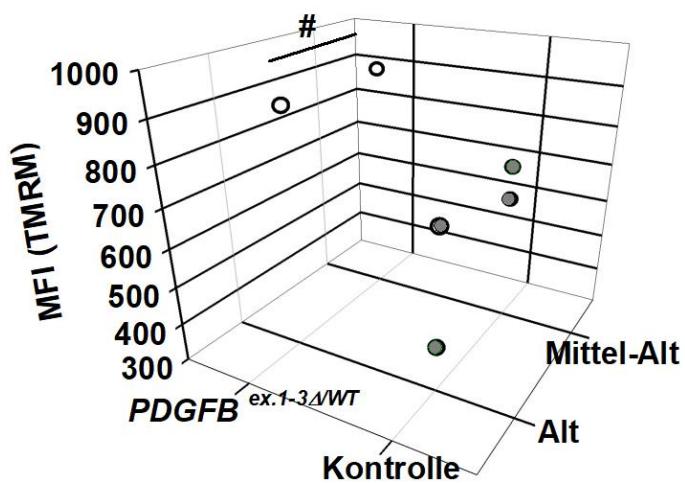


Abbildung 32: Darstellung des mitochondrialen Membranpotentials für die Mutationsträger ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) und die Kontrollen ähnlichen Alters. Je höher die Intensität des positiv geladenen Fluoreszenzfarbstoffes, in diesem Fall TMRM, desto negativer, also hyperpolarisierter das mitochondriale Membranpotential ($n = 1 - 2$ je Gruppe, Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$).

4. Diskussion

Bei der Primären Familiären Gehirnkalzifikation handelt es sich um eine seltene, genetische neuropsychiatrische, Erkrankung, die durch einen Funktionsverlust in einem der bisher 6 bekannten Genen *SLC20A2*, *PDGFRB*, *PDGFB*, *XPR1*, *MYORG* und *JAM2* hervorgerufen wird. Während die Genprodukte von *SLC20A2* und *XPR1* zusätzlich eine Rolle im Phosphatstoffwechsel spielen, sind alle bekannten Genprodukte, deren Mutation zu dieser Erkrankung führt, also auch von *SLC20A2* und *XPR1*, eng mit der neurovaskulären Einheit assoziiert (Alvarez-Fischer und Westenberger, 2019). Die Manifestation der PFBC erfolgt dabei sowohl endophänotypisch als auch klinisch (Balck u. a. 2020). Als Endophänotyp finden sich meist bilaterale, gefäßassoziierte, intrazerebrale Kalbablagerungen, vor allem in den Basalganglien mit einer praktisch 100 %igen Penetranz (Balck u. a. 2021). Eine klinische Manifestation findet sich interessanterweise und über alle bisher bekannten pathogene Genveränderungen hinweg nur bei ca. 2/3 aller Patienten. Dabei reichen die Symptome von Bewegungsstörungen, psychischen Störungen, kognitiven Einschränkungen bis hin zu epileptischen Anfällen oder lediglich Kopfschmerzen (Balck u. a. 2021). Bemerkenswert dabei ist, dass das gesamte Spektrum an Erkrankungen einschließlich eines lebenslangen Fehlens jedweder Krankheitszeichen in derselben Familie auftreten, die die gleiche Mutation im gleichen Gen tragen (Keller u. a., 2013). Ob die Kalzifikationen ursächlich für die Ausbildung der verschiedenen Symptome sind oder unabhängig davon auftreten konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es zeigte sich aber, dass das Ausmaß der klinischen Symptomatik mit Zunahme der Läsionen korreliert (Balck u. a. 2021). Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte eines partiellen Funktionsverlustes des *platelet-derived growth factors beta* (PDGF-B) als eine der bisher 6 bekannten Ursachen bei der Primären Familiären Gehirnkalzifikation zu untersuchen. Da durch den Funktionsverlust des Liganden auch von einem Funktionsverlust des *platelet-derived growth factor receptors* (PDGF-R β) auszugehen ist bzw. diese Veränderung im gleichen Signalweg liegt, scheinen die Ergebnisse mindestens auch zum Teil auf Mutationen in diesem Gen übertragbar zu sein. Die Analyse erfolgte sowohl im Hinblick auf ein verändertes Verhalten und eine höhere Suszeptibilität auf ein Toxin-basiertes Parkinsonmodell im hypomorphen *Pdgfb*-Mausmodell (*Pdgfb*^{ret/ret}), als auch auf die Osteoklastenfunktion und die Rolle der Mitochondrienfunktion im Mausmodell und bei humanen Mutationsträgern. In dem hier verwendeten

Mausmodell mit teilweise inaktivierten *Pdgfb* (*Pdgfb^{ret/ret}*) wird ein relativer Mangel an PDGF-B simuliert. Über dieses Modell konnte der Nachweis über die Pathogenität eines Funktionsverlustes von PDGF-B erbracht werden, da die Mäuse ebenfalls wie die betroffenen Patienten intrazerebrale Kalzifikationen entwickeln, welche mit dem Alter zunehmen (Keller u. a. 2013). Die Mäuse zeigten außerdem auch Verhaltensänderungen, welche zum Teil der Klinik von betroffenen Patienten ähnelt (Zarb u. a. 2019). Bei den Experimenten mit humanen Proben handelte es sich um Blutproben von 2 Mutationsträgern (*PDGFB^{w/del(1-251)}*) einer Familie - Mutter und Sohn - die mit jeweils 2 Blutproben ähnlich alter Kontrollen verglichen wurden.

4.1 Zeigen sich auch im hypomorphen Mausmodell (*Pdgfb^{ret/ret}*) Unterschiede im Verhalten im Vergleich zu ihren wildtyp Wurfgeschwistern und sind *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse empfänglicher auf ein Toxin-basierte Parkinsonmodell?

In Bezug auf ihr Verhalten zeigten die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse über alle Altersklassen hinweg eine signifikant längere zurückgelegte Wegstrecke als ihre gleichalten Wildtyp Wurfgeschwister, was eine erhöhte motorische Aktivität zu jedem untersuchten Zeitpunkt widerspiegelt. Dabei hielten sie sich im gleichen Maß in der Kernzone auf. Bei einem vermehrten Verbleib in der Kernzone des Feldes misst man nicht nur das rein motorisches Verhalten, sondern verminderte Ängstlichkeit (Vincent u. a. 2021), die bei diesen Tieren nicht verändert zu sein scheint. Betrachtet man das zentrale Korrelat der Motorik auf Transmittebene, so zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der *striatalen* Dopaminkonzentration zwischen den Mäusen, wobei die Dopaminkonzentration bei beiden Gruppen im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses mit der Zeit signifikant abgenommen hat. Bei der Analyse des Dopaminumsatzes zeigte sich bei den 4 Monate alten *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen ein signifikant höherer Wert zur Vergleichsgruppe, wobei sich die Werte bei den 12 Monate alten Mäusen soweit einander annäherte, dass sich kein signifikanter Unterschied mehr ergab. Ein erhöhter Umsatz bedeutet dabei, dass die Neurone bereits kompromittiert sind, die Beeinträchtigung bzw. Schädigung aber noch kompensieren können. Es handelt sich also um ein latentes dopaminerges Defizit. Beim basalen Verhalten der *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse zeigte sich somit eine dauerhaft erhöhte motorische Aktivität, die phänotypisch ebenfalls auf eine Schädigung des *nigrostriatalen* Systems hinweist. Somit könnte sich das latente dopaminerge Defizit bereits in diesem Verhaltensauffälligkeiten zeigen, auch wenn

die basale *striatale* Dopaminkonzentration noch nicht beeinträchtigt ist. Letztlich zeigt sich im Phänotyp ja auch hier nur eine latente, gewissermaßen subklinische Auffälligkeit.

Nach Durchführung der intrazerebralen Injektion mit 6-OHDA zeigten die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse weiterhin eine signifikant längere Wegstrecke als die Kontrolltiere. In Bezug auf die Aufenthalte in der Kernzone zeigte sich aber bei den Wildtypmäusen eine Abnahme über das Alter hinweg, wobei die Aufenthalte bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen stabil hoch blieben. Beim Amphetamine induzierten Rotationstest zeigte sich bei den Mäusen beider Gruppen im Alter von 4 und 12 Monaten dagegen eine signifikant höhere Nettorotation, die bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen deutlich höher aus gefallen ist. Bei der Analyse auf Transmitterebene zeigte sich eine signifikante Reduktion der Dopaminkonzentration und eine signifikante Steigerung des Dopaminumsatzes bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen, während sich die Werte für die wildtyp Wurfgeschwister kaum änderten.

Nach Durchführung der intrazerebralen Injektion von 6-OHDA haben die Daten aus der Verhaltensuntersuchungen mittels der Open-Field Untersuchung nur noch eine reduzierte Aussagekraft, da diese Verhaltensversuche nicht sensitiv genug für das 6-OHDA-basierte Parkinsonmodell ist und nun nur noch einen Ausblick geben, in wie weit sich grobe Veränderungen eingestellt haben. Essenziell ist nun jedoch, dass nach Injektion von 6-OHDA und anschließender Stimulation mit Amphetamine eine signifikante Nettorotation bei den Mäusen beider Gruppen und besonders bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen zu sehen war. Diese entsteht dadurch, dass auf der Seite der Injektion mit 6-OHDA die dopaminerigen Neurone abgestorben sind und die Amphetamine-induzierte Freisetzung vor allem auf der kontralateralen Seite stattfindet (Björklund und Dunnett, 2019). Die auch in der Kontrollgruppe festgestellte Nettorotation zeigt dabei, dass die intrazerebrale Injektion erfolgreich appliziert wurde und es zu einer Schädigung im *nigrostriatalen* System gekommen ist. Hier ist nun hervorzuheben, dass sich bei den *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen nach der intrazerebralen Injektion eine altersunabhängige, deutliche Reduktion der Dopaminkonzentration mit folglich reaktiv erhöhten Dopaminumsatz zeigte, was eine höhere Sensitivität gegenüber dem Neurotoxin bedeutet. Diese höhere Suszeptibilität über alle Altersklassen hinweg spiegelte sich dann auch in der höheren Anzahl der Nettorotationen im Drehversuch wider. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Wildtypen Mäusen nur geringe Veränderungen im

Dopaminstoffwechsel, was eine höhere Toleranz der Neurone gegenüber dem Toxin aufzeigt. Dies Toleranz führt zu einer geringeren Apoptoserate dopaminerger Neurone und folglich dazu, dass durch die Stimulation mit Amphetamine auch auf der Injektionsseite Dopamin freigesetzt wird und sich die Maus dadurch deutlich weniger kontralateral zur Injektionsstelle dreht.

Die Open-Field Untersuchung ist eine etablierte und weitläufig genutzte Methode, um die Lokomotion von Versuchstieren auf einfache Weise zu untersuchen. Über die Jahre haben sich allerdings viele verschiedene Versuchsprotokolle etabliert, was zum einen die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Protokollen erschwert und zum anderen verschleiert, dass die Ergebnisse beträchtlich durch unterschiedliche Bedingungen wie Tageszeit oder Lichtverhältnisse variieren können (Seibenhener und Wooten, 2015; Stanford, 2007). Aus diesen Gründen wurde aber darauf geachtet, die Mäuse zur gleichen Uhrzeit und den gleichen Bedingungen zu testen. Um die Lokomotion nach intrazerebraler Injektion von 6-OHDA zu messen ist vor allem der Amphetamine-induzierten Drehversuch und auch der *Rotarod Performance* Test, bei dem sich die Maus auf einem sich drehenden Zylinder halten muss, geeignet (Iancu u. a. 2005). Der *Rotarod Performance* Test wurde in unserem Setting aber nicht verwendet. Die hier angewandte intrazerebrale Injektion von 6-OHDA ist gemeinsam mit dem MPTP-Modell eines der am häufigsten verwendeten Toxin-basierten Parkinson-Modelle und fand in den letzten Jahren auch zunehmend Anwendung in der Maus. Das MPTP-Mausmodell konnte in diesem Fall nicht angewendet werden, da das Toxin intravenös appliziert wird, die Mäuse mit dem fehlendem Retentionsmotiv aber eine weniger dichte Blut-Hirn-Schranke aufweisen und somit eine höhere Toxinkonzentration intrazerebral vorliegt. Das lässt keinen sinnvollen Vergleich mehr mit Kontrolltieren zu. Der Vorteil des 6-OHDA Modells ist in diesem Fall die topische Applikation des Toxins mit einhergehender irreversibler Schädigung des *nigrostriatalen* Systems bei somit gegebener Möglichkeit, Verhaltenen der Tiere mit spontaner oder Medikamenten-induzierter Lokomotion durchzuführen (Iancu u. a. 2005). Allerdings sind auch hier verschiedene Fehlerquellen möglich. So könnte das 6-OHDA schon vor der Injektion oxidieren, falls es nicht ausreichend lichtgeschützt, zu gering gekühlt oder nicht mit Ascorbinsäure als Oxidationsschutz versetzt worden ist. Auch die Injektion bietet mehre Fallstricke. Falls die Injektionskanüle zu schnell entfernt wurde, könnte die Gewebsdiffusion nicht ausreichend sein. Bei zu schneller Injektion, der Injektion

von einem zu großen Volumen oder Verletzungen beim Eröffnen des Schädels oder der Injektion selbst kann es zu unspezifischen Nekrosen kommen. Nachteilige zeigte sich auch die Notwendigkeit einer Narkose, die vor allem bei den 12 Monat alten Mäusen zu einer leicht erhöhten Mortalität führte. Die Eingriffe erfolgten daher standardisiert für alle Mäuse durch einen Operateur mit großer Erfahrung mit stereotaktischen Operationen.

Unsere Ergebnisse unterstützen, die schon durch Zarb u. a. veröffentlichten Daten mit einer länger zurückgelegten Wegstrecke für die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse und keinem Unterschied in der Aufenthaltsdauer in der Kernzone (Zarb u. a. 2019). Es zeigten sich durch verschiedene andere Versuche am hypomorphen Mausmodell außerdem Defizite im sensomotorischem Gating, Hyperaktivität, angeborenes ängstliches Verhalten, reduziertes Arbeitsgedächtnis aber keine Veränderungen in sozialen Interaktionen (Zarb u. a. 2019). In Bezug auf das Parkinsonmodell liegen bisher keine Daten für das hypomorphe Mausmodell zum Vergleich vor. Bei Versuchsreihen mit Kontrolltieren zeigten sich aber identische Ergebnisse die erst nach dem Verlust von 70% TH-positiver Zellen (Tyrosinhydroxylase) im *nigrostriatalen* Systems des *Striatums* entstehen (Iancu u. a. 2005).

4.2 Zeigt sich im Mausmodell (*Pdgfb^{ret/ret}*) und bei humanen Mutationsträgern (*PDGFB^{wt/del(1-251)}*) eine reduzierte Anzahl, Größe und Funktionalität von Osteoklasten im Rahmen einer Differenzierung aus Monozyten/Makrophagen?

In dieser Arbeit ist es gelungen die Größe, Anzahl und Funktionalität von *in-vitro* differenzierten Osteoklasten im hypomorphen *Pdgfb*-Mausmodell und bei humanen Mutationsträgern in *PDGFB* zu untersuchen (Schiemenz u. a. 2020). Es zeigte sich im Mausmodell, dass die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse sowohl bei 4 als auch bei 12 Monaten kleinere und weniger Osteoklasten bildeten. Hierbei ist zu erwähnen, dass der Unterschied im Alter von 4 Monaten am deutlichsten ausgeprägt war und sich die Werte im Alter von 12 Monaten soweit einander annäherten, dass sich kein signifikanter Unterschied mehr ergab. Bei den humanen Proben ist aufgrund der geringen Probenanzahl kein signifikanter Unterschied zu erwarten gewesen. Doch sieht man hier analog zu den Ergebnissen im Mausmodell einen ähnlichen Trend. Hier zeigten die Mutationsträger sowohl im mittleren Alter als auch im höheren Alter

kleinere und weniger Osteoklasten, wobei sich die Werte im höheren Alter hier nicht einander annäherten. In Bezug auf die osteolytische Kapazität zeigte sich im Mausmodell erstaunlicher Weise eine signifikant höhere Aktivität bei den 4 Monats *Pdgfb^{ret/ret}* Mäusen im Vergleich zu den Mäusen der Kontrollgruppe. Diese ist dann für beide Gruppen im Alter von 12 Monaten deutlich abgesunken, wobei die Aktivität für die 12 Monats *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse dann signifikant geringer war als die der gleich alten Kontrollgruppe. Bei den humanen Proben zeigte sich ein ähnlicher Trend. Auch hier war die osteolytische Aktivität beim Mutationsträger mittleren Alters deutlich höher als bei den Kontrollprobanden. Bei den Probanden höheren Alters zeigte sich dann kein Unterschied mehr und das Ausmaß der Osteolyse entsprach auch in etwa dem der Kontrollgruppe im mittleren Alter. Auch wenn die Aussagekraft der humanen Daten aufgrund der geringen Probandenanzahl reduziert ist, unterstützen diese Ergebnisse die Daten aus dem Mausmodell. Für einen Funktionsverlust von PDGF-B zeigen sich somit weniger und kleinere Osteoklasten, welche zunächst eine höhere Aktivität aufweisen, aber dann auf ein ähnliches Aktivitätsniveau absinken.

Nachdem es Udagawa u. a. 1990 gelungen war Osteoklasten *in-vitro* zu differenzieren, entwickelten sich nach Entdeckung von M-CSF und RANKL als die nötigen Faktoren zu Differenzierung schnell etablierte Protokolle, von denen eines in abgewandelter Form auch hier eingesetzt wurde (Takeshita, Kaji, und Kudo 2000; Udagawa u. a. 1990). Es zeigte sich als essenziell dabei eine ausreichend hohe Probenanzahl zu haben, da sich die Differenzierung sensibel hinsichtlich technischer oder sonstiger Schwankungen zeigte. Um diese zu minimieren, wurde auf eine schnelle, schonende Verarbeitung der Zellen geachtet und für jede Probe möglichst viele Wells ausplattiert, um leichte Unterschiede auszugleichen. Für die Auswertung der Differenzierung erfolgte die mikroskopische Begutachtung der Objektträger nach der TRAP- und Kernfärbung, die eine Identifizierung der Osteoklasten ermöglichen. In einige Fällen zeigte sich eine eindeutige Zuordnung als sehr schwierig und vom Untersucher abhängig. Um die Analyse möglichst zu standardisieren, erfolgte die Auswertung der Färbungen nur durch einen einzigen Untersucher, der gegenüber den Präparaten verblindet war. Eine weitere Maßnahme war die Anwendung einer Software, über die nach einem vorgegebenen Muster ausgewertet wurde, wodurch keine Zellen doppelt gezählt und immer der gleiche Anteil eines Wells ausgezählt wurde. Bei der Analyse der Osteolyse erfolgte

die Auswertung standardisiert mittels Software und festgelegten Grenzwerten, die für jedes Well auf Plausibilität geprüft wurden. Als Limitierung beider Versuche ist zu sehen, dass es sich um eine 2-dimensionale Auswertung handelte, sowohl für die Größe der Osteoklasten als auch für das Ausmaß der Osteolyse. Aufgrund der hohen Anzahl der Proben ist dieser Aspekt aber zu vernachlässigen. Die Differenzierung erfolgte auch auf Objekträgern und nicht auf Dentinplatten, die eine funktionelle Aktivität ermöglichen, zu einer verstärkten Sekretion von PDGF-B führen somit die Differenzierung beeinflussen (D. Li u. a. 2017; Rahman u. a. 2015). Eine weitere Limitierung des Versuchsaufbaus ist es, dass das Milieu während der Differenzierung nicht komplett den *in-vivo* Bedingungen entspricht. Zwar werden durch die Isolierung aus den Mausmilzen bzw. dem venösen humanen Vollblut periphere mononukleären Zellen (*engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC's*) mit der Kapazität zur Differenzierung zu Osteoklasten isoliert, doch kann dieser Mix nicht komplett die gegebenenfalls auch pathologischen Bedingungen während der Osteoklastogenese *in-vivo* widerspiegeln. Das bezieht sich sowohl auf die Zytokine als auch die Zelldichte, die im Vergleich zu unseren Experimenten variieren kann. Eben dieses Milieu entlang der gefäßassoziierten Kalzifikationen wurde genauer von Zarb u. a. untersucht, wobei sich zeigte, dass die Kalzifikationen umgeben von Zellen mit Markern für Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten sind, die eine osteogene Umgebung erzeugen und so wohl eine neurotoxische Reaktion der Astrozyten hervorrufen (Zarb u. a. 2019). Das Osteoblasten dabei gemeinsam mit Osteoklasten auftreten ist nicht verwunderlich, da beide Populationen für die Differenzierung erforderlich sind und sich gegenseitig regulieren (Enck, Abushahin, und Bossaer 2014). Ob nun aber dysfunktionale Osteoblasten für die Bildung, eine verringerte Kapazität der Osteoklasten für den Abbau oder die Inflammation verantwortlich für die der Kalzifikationen ist, bleibt an dieser Stelle unklar. Auch wäre die Frage, ob das Milieu in anderen Mausmodellen oder auch beim Menschen ähnlich konfiguriert ist und daher nicht allein auf die Mutation im *PDGFB* Gen beruht. Am Ende entspricht die Umgebung aber mit dem Abbau von Kalzifikation und der Modulation von Immunreaktionen genau dem Aufgabengebiet von Osteoklasten (Madel u. a. 2019). Während in vorangegangen Arbeiten gezeigte werde konnte, dass eine zusätzliche Gabe von PDGF-B zur einer verstärkten und die Blockierung von PDGF-R β mittels Inhibitors dagegen zu einer verringerten Osteoklastogenese führt, wurde in dieser Arbeit der Nachweis erbracht, dass ein Mangel an PDGF-B ebenfalls zu einer verringerten

Osteoklastogenese führt (D. Li u. a. 2017). Inwieweit die geringe Anzahl und Größe der Osteoklasten aber durch eine gesteigerte osteolytische Kapazität ausgeglichen werden kann und auf welchem Mechanismus diese Funktionssteigerung beruht, bedarf weiteren Untersuchungen.

4.3 Zeigt sich im Mausmodell ($Pdgfb^{ret/ret}$) und bei humanen Mutationsträgern ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) eine teilweise reduzierte Aktivität in der Atmungskette und daraus resultierend Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential?

Bei der murinen Komplex-I-Aktivität zeigte sich ein konstanter Wert für die Mäuse in der Kontrollgruppe und für die $Pdgfb^{ret/ret}$ Mäuse eine mit dem Alter ansteigende Aktivität, die bei 12 Monaten signifikant und deutlich höher war als bei den Mäusen der Kontrollgruppe. Bei der Messung der Sauerstoffverbrauchsrate humaner Leukozyten zeigte sich ein signifikant höherer Wert für die humanen Mutationsträger. Auch bei der Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) humaner Lymphozyten zeigte sich ein signifikant höherer Wert für die Mutationsträger als in der Kontrollgruppe (Schiemenz u. a. 2020).

Die photometrische Messung der Komplex-I-Aktivität ist eine seit Jahrzehnten etablierte Methode zur Untersuchung der Atmungskette. Essenziell für eine akkurate Messung der Aktivität ist der freie Zugang der Substrate zur Bindestelle des Komplex-I auf der Innenseite der mitochondrialen Membran. Dies konnte durch eine hochwertige Isolierung der Mitochondrien und einem aufbrechen der Mitochondrienmembran durch mehrere Einfrier- und Auftauzyklen nach obigem Protokoll erreicht werden (Birchmachin u. a. 1994). Weiterhin wurden alle nötigen Substrate im Überschuss hinzugegeben und auf eine gute Mischung der Suspension geachtet. Eine ausreichend hohe Anzahl an Proben reduzierte dabei den Effekt von kleineren Schwankungen innerhalb der Messungen. Die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate mittels *Seahorse Analyzer* ist dagegen ein neueres Verfahren, welches simultane Messungen des Sauerstoff- und Protonenflusses in lebenden Zellen in Echtzeit ermöglicht (Qian und Van Houten, 2010). Eine hohe Anzahl von Proben ist hier besonders wichtig, da Ergebnisse leicht aufgrund von externen Einflüssen variieren können. Hierbei ist unter anderem auf eine schnelle und schonende Vorbereitung der Zellen, auf die optimale Zelldichte und eine standardisierte Vorbereitung der Medien und Zusätze zu achten. Die

Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode, die eine schnelle multi-Parameter Analyse von Einzelzellsuspensionen oder sogar isolierten Zellorganellen ermöglicht. Durch die Anwendung von Antikörpern, Fluoreszenzfarbstoffen oder anderen Zusätzen konnten die Anwendungen über die letzten Jahre ständig erweitert werden und ermöglicht so auch die Messung des mitochondrialen Membranpotentials (McKinnon 2018). Essenziell dabei ist die schnelle und schonende Verarbeitung der Zellen, eine ausreichende Zellzahl und die Selektion nach noch lebenden Zellen. Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff TMRM ist dabei positiv geladen und akkumuliert daher spezifisch in den negativ geladenen Mitochondrien, wobei eine Hyperpolarisierung, also eine stärkere negative Ladung dabei mehr Farbstoff bindet und somit ein negativeres mitochondrales Membranpotential anzeigt. Ein weiterer Vorteil von TMRM ist, dass der Farbstoff nicht giftig und stark fluoreszierend ist, keine Aggregate bildet und relativ geringe Mengen schon ausreichen, um spezifisch Mitochondrien zu färben. (Cottet-Rousselle u. a. 2011; Uribe u. a. 2017)

Der Komplex-I ist der Haupteintrittspunkt für hochenergetische Elektronen in die Atmungskette und agiert dabei als Schrittmacher für die folgenden Komplexe, als hauptsächlicher Produzent des elektrochemischen Gradienten über die innere Mitochondrienmembran hinweg und als Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies (Hur, Stork, und Walker 2014). Eine erhöhte Komplex-I Aktivität konnte dabei mit einer verbesserten mitochondrialen Homöostase und erhöhten Lebenserwartung in Fliegen in Verbindung gebracht werden (Hur, Stork, und Walker 2014). Auf der anderen Seite konnte eine verringerte Komplex-I-Aktivität in neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson gezeigt werden (Holper, Ben-Shachar, und Mann 2019). Passend zur erhöhten Aktivität des Komplex-I in den murinen Proben zeigte sich in den Leukozyten von humanen Mutationsträgern eine erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate, die ebenfalls als Ausdruck einer erhöhten Aktivität der Atmungskette gewertet werden kann. Diese zeigte sich dann auch als Hyperpolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials in den humanen Lymphozyten der Mutationsträger. Welche Rolle eine Hyperpolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials einnimmt, ist aktuell je nach Studie noch unklar. So wird zum einen eine Resistenz gegenüber Apoptose (Deuse u. a. 2014), aber auch der Übergang in Apoptose (Perry u. a. 2005) beschrieben. Zwar konnte in dieser Arbeit eine Hyperpolarisierung von Lymphozyten als Vertreter der

Leukozyten gezeigt werden, wobei jedoch der Nachweis einer Resistenz oder der vermehrte Übergang in Apoptose hier nicht untersucht wurde. Welchen Einfluss das mitochondriale Membranpotential auf die Differenzierung in Osteoklasten hat und ob es sich dort ebenso zeigt, bleibt ebenfalls unklar.

4.4 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit ist es gelungen, verschiedene Veränderungen sowohl im hypomorphen Mausmodell ($Pdgfb^{ret/ret}$) als auch bei humanen Mutationsträgern ($PDGFB^{wt/del(1-251)}$) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen aufzuzeigen. Dabei bildet das Tiermodell die humanen Auffälligkeiten ab. Durch die Verhaltensuntersuchungen und das Toxin-basierte Parkinsonmodell konnten zusätzliche Erkenntnisse im Hinblick auf die klinische Manifestation gewonnen werden, wobei hier noch die Verbindung zum zellulären Pathomechanismus genauer untersucht werden muss. Eine veränderte Osteoklastendifferenzierung und -funktionalität konnte im Mausmodell aufgezeigt werden, während für die humanen Proben noch weitere Untersuchungen erforderlich sind, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bestätigen. Zarb u. a. ist es zwar schon gelungen, das Milieu der gefäßassoziierten Kalzifikationen zu beschreiben, doch müsste hier noch genauer untersucht werden, wie sich dieses mit der Zeit entwickelt und ob es bei den anderen Mutationen auf ähnliche Weise konfiguriert ist. Am Ende konnte nicht geklärt werden, ob die Kalzifikation als Ursache oder Folge zu werten sind und welcher Zusammenhang zur klinischen Manifestation besteht. Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen aber darauf hin, dass unabhängig von der Kalzifikation eine erhöhte neuronale Vulnerabilität besteht. Dies könnte darauf hindeuten, dass Umweltnoxen in einer höheren Konzentration die weniger dichte Blut-Hirn-Schranke passieren und Neurone schneller schädigen, wie in unserem Fall das dopaminerige Toxin 6-OHDA die nigralen dopaminergen Neurone. Spannenderweise zeigen sich sowohl auf Ebene der Osteoklastendifferenzierung, als auch auf Transmitter- und Verhaltensebene in den jungen Tieren ein Phänotyp, der sich stärker ausgebildet in beiden Genotypen in den alten Tieren zeigt. Etwas anders ausgedrückt, könnte man von einem „vorzeitigen Altern“ in den $Pdgfb^{ret/ret}$ Tieren sprechen. Diese Auffälligkeiten lassen sich auf die humane Situation übertragen, auch wenn einschränkend betont werden muss, dass es sich bei den humanen Daten um eine sehr kleine Stichprobe handelt. Wenn man es so

betrachtet, sprechen unsere Daten dafür, dass es sich bei den Kalzifikationen um ein anderes Epiphänomen der gleichen Pathologie handelt, nämlich einer gestörten NVU. Weitere Pathomechanismen sind dabei denkbar. So könnten sich entzündliche Prozesse im Umfeld der NVU als weiterer modulierender Faktor herausstellen und somit für die Symptommanifestation wichtig zeigen. Eine veränderte Mitochondrienfunktion als Pathomechanismus scheint zumindest in Bezug auf PDGF-B und wohl auch PDGF-R β eine Rolle zu spielen, wobei hier insbesondere für die humanen Daten weitere Versuche zur Reproduktion der Ergebnisse erforderlich sind.

Da die bisher sechs bekannten Gene lediglich für ca. 50 % aller PFBC Fälle verantwortlich sind, ist eine weitere Grundlagenforschung unabdingbar, um weitere Pathomechanismen aufzudecken.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Effekt eines partiellen Funktionsverlustes des *platelet-derived growth factors beta* (PDGF-B) als eine der möglichen Ursachen für die Entstehung der Primären Familiären Gehirnkalzifikation (PFBC) untersucht. Verwendet wurde dabei ein hypomorphes Mausmodell (*Pdgfb^{ret/ret}*), als auch Proben von humanen Mutationsträgern (PDGFB^{wt/del(1-251)}). Die Untersuchungen erfolgten im Hinblick auf ein verändertes Verhalten mittels Laufstreckenanalyse im Open-Field-Test, eine höhere Suszeptibilität auf ein Toxin-basiertes Parkinsonmodell mittels intrazerebraler 6-OHDA Injektion mit anschließendem Amphetamine-induzierten Rotationstest und HPLC-Analyse, die Osteoklastenfunktion mittels Differenzierungs- und Osteolyseassays und außerdem die Mitochondrienfunktion mittels Komplex-I-Aktivität, Sauerstoffverbrauchsrate und dem mitochondrialem Membranpotential. In der Verhaltensuntersuchung zeigten die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse eine höhere Aktivität im Sinne einer länger zurückgelegten Wegstrecke. Wobei sich in der durchgeföhrten HPLC-Untersuchung auf Transmitterebene aber keine wesentlichen Unterschiede im basalen Dopaminstoffwechsel, als Ursache für die Unterschiede in der Lokomotion zeigten. Im Toxin-basierten Parkinsonmodell konnte für die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse eine deutliche höhere Suszeptibilität mit signifikant verringriger Dopaminkonzentration und erhöhtem Dopaminumsatz in der HPLC nachgewiesen werden. Dies spiegelte sich dann auch im Rotationstest mit einer deutlich höheren Nettorotation wider. In Bezug auf die Osteoklastogenese zeigte sich, dass die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse kleinere und weniger Osteoklasten bildeten. Die gebildeten Osteoklasten zeigten im Alter von 4 Monaten dafür eine signifikant höhere Aktivität, welche bei 12 Monaten dann aber deutlich geringer als bei den Kontrollen ausfiel. Bei den humanen Proben zeigte sich ein ähnlicher Trend in Bezug auf Größe und Aktivitätsverlauf der gebildeten Osteoklasten. Für die *Pdgfb^{ret/ret}* Mäuse konnte eine stetig ansteigende Komplex-I-Aktivität nachgewiesen werden, wobei die der Kontrollen auf einem geringeren Level stabil blieb. Bei den humanen Proben konnte zum einen eine erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate und ein hyperpolarisiertes Membranpotential nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Mutation in PDGFB einen Einfluss auf das Verhalten hat, die Suszeptibilität für Parkinson erhöht, Veränderungen in der Osteoklastogenese und eine gesteigerte Mitochondrienfunktion verursacht. Ein Teil der bisher bekannten klinischen Manifestationen konnte somit im Mausmodell

bestätigt werden. Es ist außerdem gelungen die Rolle von Osteoklasten und der mitochondrialen Aktivität, als mögliche weitere Pathomechanismen aufzuzeigen.

6. Literaturverzeichnis

- A. Delacour. 1850. „Ossification des capillaires du cerveau“. *Ann Med Psychol (Paris)*, 458–61.
- Alvarez-Fischer, Daniel, Carmen Noelker, Franca Vulinović, Anne Grünewald, Caroline Chevarin, Christine Klein, Wolfgang H. Oertel, Etienne C. Hirsch, Patrick P. Michel, und Andreas Hartmann. 2013. „Bee Venom and Its Component Apamin as Neuroprotective Agents in a Parkinson Disease Mouse Model“. *PLoS One* 8 (4): e61700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061700>.
- Alvarez-Fischer, Daniel, und Ana Westenberger. 2019. „Biallelic MYORG Mutations: Primary Familial Brain Calcification Goes Recessive“. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 34 (3): 322. <https://doi.org/10.1002/mds.27629>.
- Andrae, J., R. Gallini, und C. Betsholtz. 2008. „Role of Platelet-Derived Growth Factors in Physiology and Medicine“. *Genes & Development* 22 (10): 1276–1312. <https://doi.org/10.1101/gad.1653708>.
- Arts, Florence A., Amélie I. Velghe, Monique Stevens, Jean-Christophe Renauld, Ahmed Essaghir, und Jean-Baptiste Demoulin. 2015. „Idiopathic Basal Ganglia Calcification-associated PDGFRB Mutations Impair the Receptor Signalling“. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19 (1): 239–48. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12443>.
- Balck, Alexander, Max Borsche, Karen Grütz, Norbert Brüggemann, Ana Westenberger, Christine Klein, und Daniel Alvarez-Fischer. 2020. „Don't Do Harm by Diagnosis - An Abnormal Cranial CT: Still Fa(h)r from a Disease“. *Parkinsonism & Related Disorders* 75 (Juni): 116–18. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.02.016>.
- Balck, Alexander, Susen Schaake, Neele Sophie Kuhnke, Aloysius Domingo, Harutyun Madoev, Jason Margolesky, Valerija Dobricic, u. a. 2021. „Genotype–Phenotype Relations in Primary Familial Brain Calcification: Systematic MDSGENE Review“. *Movement Disorders* 36 (11): 2468–80. <https://doi.org/10.1002/mds.28753>.
- Birchmachin, M.A., H.L. Briggs, A.A. Saborido, L.A. Bindoff, und D.M. Turnbull. 1994. „An Evaluation of the Measurement of the Activities of Complexes I-IV in the Respiratory Chain of Human Skeletal Muscle Mitochondria“. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 51 (1): 35–42. <https://doi.org/10.1006/bmmb.1994.1004>.
- Björklund, Anders, und Stephen B. Dunnett. 2019. „The Amphetamine Induced Rotation Test: A Re-Assessment of Its Use as a Tool to Monitor Motor Impairment and Functional Recovery in Rodent Models of Parkinson's Disease“. *Journal of Parkinson's Disease* 9 (1): 17–29. <https://doi.org/10.3233/JPD-181525>.
- Bon, Nina, Greig Couasnay, Annabelle Bourgine, Sophie Source, Sarah Beck-Cormier, Jérôme Guicheux, und Laurent Beck. 2018. „Phosphate (P_i)-Regulated Heterodimerization of the High-Affinity Sodium-Dependent P_i Transporters

- PiT1/Slc20a1 and PiT2/Slc20a2 Underlies Extracellular P_i Sensing Independently of P_i Uptake". *Journal of Biological Chemistry* 293 (6): 2102–14.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.807339>.
- Boyle, William J., W. Scott Simonet, und David L. Lacey. 2003. „Osteoclast Differentiation and Activation“. *Nature* 423 (6937): 337–42.
<https://doi.org/10.1038/nature01658>.
- Camello-Almaraz, Cristina, Pedro J. Gomez-Pinilla, Maria J. Pozo, und Pedro J. Camello. 2006. „Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Ca²⁺ Signaling“. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 291 (5): C1082–88.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00217.2006>.
- Cen, Zhidong, You Chen, Si Chen, Hong Wang, Dehao Yang, Hongmei Zhang, Hongwei Wu, u. a. 2020. „Biallelic Loss-of-Function Mutations in JAM2 Cause Primary Familial Brain Calcification“. *Brain* 143 (2): 491–502.
<https://doi.org/10.1093/brain/awz392>.
- Cottet-Rousselle, Cécile, Xavier Ronot, Xavier Leverve, und Jean-François Mayol. 2011. „Cytometric Assessment of Mitochondria Using Fluorescent Probes“. *Cytometry Part A* 79A (6): 405–25. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21061>.
- Deuse, Tobias, Xiaoqin Hua, Dong Wang, Lars Maegdefessel, Joerg Heeren, Ludger Scheja, Juan P. Bolaños, u. a. 2014. „Dichloroacetate Prevents Restenosis in Preclinical Animal Models of Vessel Injury“. *Nature* 509 (7502): 641–44.
<https://doi.org/10.1038/nature13232>.
- Enck, Robert E, Fadi Abushahin, und John B Bossaer. 2014. „Soft Tissue Calcification Secondary to Imatinib Mesylate in a Patient with Gastrointestinal Stromal Tumor“. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* 20 (2): 137–40.
<https://doi.org/10.1177/1078155213480069>.
- Fahr, Theodor. 1930. „Idiopathische Verkalkung der Hirngefäße“. Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Vol 50, pp. 129-33.
- Finsterer, J. 2004. „Mitochondriopathies“. *European Journal of Neurology* 11 (3): 163–86. <https://doi.org/10.1046/j.1351-5101.2003.00728.x>.
- Finsterer, Josef, und Wolfgang Kopsa. 2005. „Basal Ganglia Calcification in Mitochondrial Disorders“. *Metabolic Brain Disease* 20 (3): 219–26.
<https://doi.org/10.1007/s11011-005-7209-9>.
- Förstl, H., B. Krumm, S. Eden, und K. Kohlmeyer. 1992. „Neurological Disorders in 166 Patients with Basal Ganglia Calcification: A Statistical Evaluation“. *Journal of Neurology* 239 (1): 36–38. <https://doi.org/10.1007/BF00839209>.
- Gaengel, Konstantin, Guillem Genové, Annika Armulik, und Christer Betsholtz. 2009. „Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (5): 630–38.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161521>.

Giovannini, Donatella, Jawida Touhami, Pierre Charnet, Marc Sitbon, und Jean-Luc Battini. 2013. „Inorganic Phosphate Export by the Retrovirus Receptor XPR1 in Metazoans“. *Cell Reports* 3 (6): 1866–73.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.035>.

Grangeon, Lou, David Wallon, Camille Charbonnier, Olivier Quenez, Anne-Claire Richard, Stéphane Rousseau, Clara Budowski, u. a. 2019. „Biallelic MYORG Mutation Carriers Exhibit Primary Brain Calcification with a Distinct Phenotype“. *Brain* 142 (6): 1573–86. <https://doi.org/10.1093/brain/awz095>.

Grütz, Karen, Claudia B. Volpato, Aloysius Domingo, Daniel Alvarez-Fischer, Uwe Gebert, Günther Schifferle, Ebba Buffone, u. a. 2016. „Primary Familial Brain Calcification in the ‘IBGC2’ Kindred: All Linkage Roads Lead to SLC20A2: Genetic Cause Of PFBC In The ‘IBGC2’ Kindred“. *Movement Disorders* 31 (12): 1901–4.
<https://doi.org/10.1002/mds.26768>.

Holper, L, D Ben-Shachar, und Jj Mann. 2019. „Multivariate Meta-Analyses of Mitochondrial Complex I and IV in Major Depressive Disorder, Bipolar Disorder, Schizophrenia, Alzheimer Disease, and Parkinson Disease“. *Neuropsychopharmacology* 44 (5): 837–49. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0090-0>.

Hur, Jae H., Devon A. Stork, und David W. Walker. 2014. „Complex-I-Ty in Aging“. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 46 (4): 329–35.
<https://doi.org/10.1007/s10863-014-9553-0>.

Iancu, Ruxandra, Paul Mohapel, Patrik Brundin, und Gesine Paul. 2005. „Behavioral Characterization of a Unilateral 6-OHDA-Lesion Model of Parkinson’s Disease in Mice“. *Behavioural Brain Research* 162 (1): 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.02.023>.

Jensen, Nina, Henrik D. Schrøder, Eva K. Hejbøl, Jesper S. Thomsen, Annemarie Brüel, Frederik T. Larsen, Mikkel C. Vinding, u. a. 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): 1865–81.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.04.010>.

Jensen, Nina, Henrik Daa Schrøder, Eva Kildall Hejbøl, Ernst-Martin Füchtbauer, João Ricardo Mendes de Oliveira, und Lene Pedersen. 2013. „Loss of Function of Slc20a2 Associated with Familial Idiopathic Basal Ganglia Calcification in Humans Causes Brain Calcifications in Mice“. *Journal of Molecular Neuroscience* 51 (3): 994–99. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0085-6>.

Keller, Annika, Ana Westenberger, Maria J. Sobrido, María García-Murias, Aloysius Domingo, Renee L. Sears, Roberta R. Lemos, u. a. 2013. „Mutations in the Gene Encoding PDGF-B Cause Brain Calcifications in Humans and Mice“. *Nature Genetics* 45 (9): 1077–82. <https://doi.org/10.1038/ng.2723>.

- Keogh, Michael J., Angela Pyle, Daniyal Daud, Helen Griffin, Konstantinos Douroudis, Gail Eglon, James Miller, Rita Horvath, und Patrick F. Chinnery. 2015. „Clinical heterogeneity of primary familial brain calcification due to a novel mutation in PDGFB“. *Neurology* 84 (17): 1818–20. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001517>.
- Klein, Christine, und Peter Vieregge. 1998. „Fahr's Disease—Far from a Disease: CLINICAL/SCIENTIFIC NOTES“. *Movement Disorders* 13 (3): 620–21. <https://doi.org/10.1002/mds.870130350>.
- Kubota, Kazuishi, Chisa Sakikawa, Mutsumi Katsumata, Takemichi Nakamura, und Kenji Wakabayashi. 2002. „Platelet-Derived Growth Factor BB Secreted from Osteoclasts Acts as an Osteoblastogenesis Inhibitory Factor“. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17 (2): 257–65. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.2.257>.
- Lees, Rita L., und Johan N. M. Heersche. 1999. „Macrophage Colony Stimulating Factor Increases Bone Resorption in Dispersed Osteoclast Cultures by Increasing Osteoclast Size“. *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (6): 937–45. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.6.937>.
- Legati, Andrea, Donatella Giovannini, Gaël Nicolas, Uriel López-Sánchez, Beatriz Quintáns, João R M Oliveira, Renee L Sears, u. a. 2015. „Mutations in XPR1 Cause Primary Familial Brain Calcification Associated with Altered Phosphate Export“. *Nature Genetics* 47 (6): 579–81. <https://doi.org/10.1038/ng.3289>.
- Li, Dian-qi, Qi-long Wan, Janak L. Pathak, und Zu-bing Li. 2017. „Platelet-Derived Growth Factor BB Enhances Osteoclast Formation and Osteoclast Precursor Cell Chemotaxis“. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 35 (4): 355–65. <https://doi.org/10.1007/s00774-016-0773-8>.
- Li, Hui, Yang Xiao, Lin Tang, Feng Zhong, Gan Huang, Jun-Mei Xu, Ai-Min Xu, Ru-Ping Dai, und Zhi-Guang Zhou. 2018. „Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Promotes Palmitate-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Macrophages“. *Frontiers in Immunology* 9 (Januar): 81. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00081>.
- López-Sánchez, Uriel, Sandrine Tury, Gaël Nicolas, Miranda S. Wilson, Snejana Jurici, Xavier Ayrignac, Valérie Courgaud, Adolfo Saiardi, Marc Sitbon, und Jean-Luc Battini. 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): 9366–78. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011376>.
- Ly, J. D., D. R. Grubb, und A. Lawen. 2003. „The Mitochondrial Membrane Potential (Deltapsi(m)) in Apoptosis; an Update“. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 8 (2): 115–28.
- Madel, Maria-Bernadette, Lidia Ibáñez, Abdelilah Wakkach, Teun J. de Vries, Anna Teti, Florence Apparailly, und Claudine Blin-Wakkach. 2019. „Immune

- Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions“. *Frontiers in Immunology* 10 (Juni): 1408.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01408>.
- Manyam, Bala V. 2005. „What Is and What Is Not ,Fahr’s Disease“ . *Parkinsonism & Related Disorders* 11 (2): 73–80.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.12.001>.
- McKinnon, Katherine M. 2018. „Flow Cytometry: An Overview“. *Current Protocols in Immunology* 120 (1). <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.
- Meireles, Ana M., Celia E. Shiao, Catherine A. Guenther, Harwin Sidik, David M. Kingsley, und William S. Talbot. 2014. „The Phosphate Exporter Xpr1b Is Required for Differentiation of Tissue-Resident Macrophages“. *Cell Reports* 8 (6): 1659–67. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.018>.
- Merkel, Kurt D., Jeanne M. Erdmann, Kevin P. McHugh, Yousef Abu-Amer, F. Patrick Ross, und Steven L. Teitelbaum. 1999. „Tumor Necrosis Factor- α Mediates Orthopedic Implant Osteolysis“. *The American Journal of Pathology* 154 (1): 203–10. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65266-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65266-2).
- Miyamoto, Takeshi. 2011. „Regulators of Osteoclast Differentiation and Cell-Cell Fusion“. *The Keio Journal of Medicine* 60 (4): 101–5.
<https://doi.org/10.2302/kjm.60.101>.
- Mochida, Ganeshwaran H., Vijay S. Ganesh, Jillian M. Felie, Danielle Gleason, R. Sean Hill, Katie Rose Clapham, Daniel Rakiec, u. a. 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): 882–89.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.10.026>.
- Muoio, V., P. B. Persson, und M. M. Sendeski. 2014. „The Neurovascular Unit - Concept Review“. *Acta Physiologica* 210 (4): 790–98.
<https://doi.org/10.1111/apha.12250>.
- Nicolas, G., C. Pottier, D. Maltete, S. Coutant, A. Rovelet-Lecrux, S. Legallic, S. Rousseau, u. a. 2013. „Mutation of the PDGFRB Gene as a Cause of Idiopathic Basal Ganglia Calcification“. *Neurology* 80 (2): 181–87.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827ccf34>.
- Nicolas, Gaël, Camille Charbonnier, Dominique Campion, und Joris A. Veltman. 2018. „Estimation of Minimal Disease Prevalence from Population Genomic Data: Application to Primary Familial Brain Calcification“. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 177 (1): 68–74.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32605>.
- O’Driscoll, Mary C., Sarah B. Daly, Jill E. Urquhart, Graeme C.M. Black, Daniela T. Pilz, Knut Brockmann, Meriel McEntagart, u. a. 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): 354–64. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.012>.

Palmeri, Diana, Annemieke van Zante, Chiao-Chien Huang, Stefan Hemmerich, und Steven D. Rosen. 2000. „Vascular Endothelial Junction-Associated Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily, Is Localized to Intercellular Boundaries of Endothelial Cells“. *Journal of Biological Chemistry* 275 (25): 19139–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003189200>.

Pavlakis, Steven G., Peter C. Phillips, Salvatore DiMauro, Darryl C. De Vivo, und Lewis P. Rowland. 1984. „Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike Episodes: A Distinctive Clinical Syndrome“. *Annals of Neurology* 16 (4): 481–88. <https://doi.org/10.1002/ana.410160409>.

Perry, Seth W., John P. Norman, Angela Litzburg, Dabao Zhang, Stephen Dewhurst, und Harris A. Gelbard. 2005. „HIV-1 Transactivator of Transcription Protein Induces Mitochondrial Hyperpolarization and Synaptic Stress Leading to Apoptosis“. *The Journal of Immunology* 174 (7): 4333–44.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.4333>.

Qian, Wei, und Bennett Van Houten. 2010. „Alterations in Bioenergetics Due to Changes in Mitochondrial DNA Copy Number“. *Methods* 51 (4): 452–57.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.03.006>.

Rahman, M. Motiur, Kazuhiko Matsuoka, Sunao Takeshita, und Kyoji Ikeda. 2015. „Secretion of PDGF Isoforms during Osteoclastogenesis and Its Modulation by Anti-Osteoclast Drugs“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 462 (2): 159–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.115>.

Sanchez-Contreras, Monica, Matthew C. Baker, NiCole A. Finch, Alexandra Nicholson, Aleksandra Wojtas, Zbigniew K. Wszolek, Owen A. Ross, Dennis W. Dickson, und Rosa Rademakers. 2014. „Genetic Screening and Functional Characterization of *PDGFRB* Mutations Associated with Basal Ganglia Calcification of Unknown Etiology“. *Human Mutation* 35 (8): 964–71.
<https://doi.org/10.1002/humu.22582>.

Sanchez-Fernandez, Maria Arantzazu, Anne Gallois, Thilo Riedl, Pierre Jurdic, und Bernard Hoflack. 2008. „Osteoclasts Control Osteoblast Chemotaxis via PDGF-BB/PDGF Receptor Beta Signaling“. *PloS One* 3 (10): e3537.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003537>.

Schiemenz, Christian, Ana Westenberger, Kerstin Tanzer, Karen Grütz, Max Borsche, Georg Mahlke, Susen Schaake, u. a. 2020. „Osteoclast Imbalance in Primary Familial Brain Calcification: Evidence for Its Role in Brain Calcification“. *Brain* 143 (1): e1–e1. <https://doi.org/10.1093/brain/awz351>.

Schottlaender, Lucia V., Rosella Abeti, Zane Jaunmuktane, Carol Macmillan, Viorica Chelban, Benjamin O’Callaghan, John McKinley, u. a. 2020. „Bi-Allelic JAM2 Variants Lead to Early-Onset Recessive Primary Familial Brain Calcification“. *The American Journal of Human Genetics* 106 (3): 412–21.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.02.007>.

- Seibenhener, Michael L., und Michael C. Wooten. 2015. „Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice“. *Journal of Visualized Experiments*, Nr. 96 (Februar): 52434. <https://doi.org/10.3791/52434>.
- Seifert, G. 1997. „Heterotope (extraossäre) Verkalkung (Kalzinose)“. *Der Pathologe* 18 (6): 430–38. <https://doi.org/10.1007/s002920050238>.
- Simoni, M., L. Pantoni, G. Pracucci, B. Palmertz, X. Guo, D. Gustafson, und I. Skoog. 2008. „Prevalence of CT-Detected Cerebral Abnormalities in an Elderly Swedish Population Sample“. *Acta Neurologica Scandinavica* 118 (4): 260–67. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01010.x>.
- Stanford, S. Clare. 2007. „The Open Field Test: Reinventing the Wheel“. *Journal of Psychopharmacology* 21 (2): 134–35. <https://doi.org/10.1177/0269881107073199>.
- Tadic, Vera, Ana Westenberger, Aloysius Domingo, Daniel Alvarez-Fischer, Christine Klein, und Meike Kasten. 2015. „Primary Familial Brain Calcification with Known Gene Mutations: A Systematic Review and Challenges of Phenotypic Characterization“. *JAMA Neurology* 72 (4): 460–67. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3889>.
- Takeshita, Sunao, Keisuke Kaji, und Akira Kudo. 2000. „Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts“. *Journal of Bone and Mineral Research* 15 (8): 1477–88. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.8.1477>.
- Teitelbaum, S. L. 2000. „Bone Resorption by Osteoclasts“. *Science (New York, N.Y.)* 289 (5484): 1504–8.
- Udagawa, N, N Takahashi, T Akatsu, H Tanaka, T Sasaki, T Nishihara, T Koga, T J Martin, und T Suda. 1990. „Origin of Osteoclasts: Mature Monocytes and Macrophages Are Capable of Differentiating into Osteoclasts under a Suitable Microenvironment Prepared by Bone Marrow-Derived Stromal Cells.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (18): 7260–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7260>.
- Uribe, P., J. V. Villegas, R. Boguen, F. Treulen, R. Sánchez, P. Mallmann, V. Isachenko, G. Rahimi, und E. Isachenko. 2017. „Use of the Fluorescent Dye Tetramethylrhodamine Methyl Ester Perchlorate for Mitochondrial Membrane Potential Assessment in Human Spermatozoa“. *Andrologia* 49 (9): e12753. <https://doi.org/10.1111/and.12753>.
- Vanlandewijck, Michael, Thibaud Lebouvier, Maarja AndaluSSI Mäe, Khayrun Nahar, Simone Hornemann, David Kenkel, Sara I. Cunha, u. a. 2015. „Functional Characterization of Germline Mutations in PDGFB and PDGFRB in Primary Familial Brain Calcification“. Herausgegeben von Maria G Castro. *PLOS ONE* 10 (11): e0143407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143407>.
- Vincent, Clémentine, Javier Gilabert-Juan, Rachel Gobel-Russo, Daniel Alvarez-Fischer, Marie-Odile Krebs, Gwenaëlle Le Pen, Alain Prochiantz, und Ariel A. Di

- Nardo. 2021. „Non-Cell-Autonomous OTX2 Transcription Factor Regulates Anxiety-Related Behavior in the Mouse“. *Molecular Psychiatry* 26 (11): 6469–80. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01132-y>.
- Wang, Cheng, Yulei Li, Lei Shi, Jie Ren, Monica Patti, Tao Wang, João R M de Oliveira, u. a. 2012. „Mutations in SLC20A2 Link Familial Idiopathic Basal Ganglia Calcification with Phosphate Homeostasis“. *Nature Genetics* 44 (3): 254–56. <https://doi.org/10.1038/ng.1077>.
- Westenberger, Ana, Alexander Balck, und Christine Klein. 2019. „Primary Familial Brain Calcifications: Genetic and Clinical Update“. *Current Opinion in Neurology* 32 (4): 571–78. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000712>.
- Westenberger, Ana, und Christine Klein. 2014. „The Genetics of Primary Familial Brain Calcifications“. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 14 (10): 490. <https://doi.org/10.1007/s11910-014-0490-4>.
- Xie, Hui, Zhuang Cui, Long Wang, Zhuying Xia, Yin Hu, Lingling Xian, Changjun Li, u. a. 2014. „PDGF-BB Secreted by Preosteoclasts Induces Angiogenesis during Coupling with Osteogenesis“. *Nature Medicine* 20 (11): 1270–78. <https://doi.org/10.1038/nm.3668>.
- Yamada, Megumi, Takahiko Asano, Kouichirou Okamoto, Yuichi Hayashi, Masayuki Kanematsu, Hiroaki Hoshi, Yasuhisa Akaiwa, u. a. 2013. „High Frequency of Calcification in Basal Ganglia on Brain Computed Tomography Images in Japanese Older Adults: Calcification on Brain CT in Japan“. *Geriatrics & Gerontology International* 13 (3): 706–10. <https://doi.org/10.1111/ggi.12004>.
- Yamada, Shunsuke, Mary C. Wallingford, Suhaib Borgeia, Timothy C. Cox, und Cecilia M. Giachelli. 2018. „Loss of PiT-2 Results in Abnormal Bone Development and Decreased Bone Mineral Density and Length in Mice“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (1): 553–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.071>.
- Yao, Xiang-Ping, Xuewen Cheng, Chong Wang, Miao Zhao, Xin-Xin Guo, Hui-Zhen Su, Lu-Lu Lai, u. a. 2018. „Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification“. *Neuron* 98 (6): 1116-1123.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.037>.
- Yao, Xiang-Ping, Miao Zhao, Chong Wang, Xin-Xin Guo, Hui-Zhen Su, En-Lin Dong, Hai-Ting Chen, u. a. 2017. „Analysis of Gene Expression and Functional Characterization of XPR1: A Pathogenic Gene for Primary Familial Brain Calcification“. *Cell and Tissue Research* 370 (2): 267–73. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2663-3>.
- Zarb, Yvette, Ulrike Weber-Stadlbauer, Daniel Kirschenbaum, Diana Rita Kindler, Juliet Richetto, Daniel Keller, Rosa Rademakers, u. a. 2019. „Ossified Blood Vessels in Primary Familial Brain Calcification Elicit a Neurotoxic Astrocyte Response“. *Brain* 142 (4): 885–902. <https://doi.org/10.1093/brain/awz032>.

7. Anhang

7.1 Ethikvotum

Ethikvotum mit den Aktenzeichen 05-030 und 04-155 mit den Schreiben vom 18.03.2005 und 02.03.2006 erteilt. Studienerweiterung zu 05-030 und 04-155 am 10.06.2008 erhalten

7.2 Tierversuchsantrag

Tierversuche mit dem Aktenzeichen V 242-7224.122-20 (50-4/15) mit dem Schreiben vom 02. Juni 2015 genehmigt.

8. Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei PD Dr. med. Daniel Alvarez-Fischer für die sehr gute Betreuung, die inspirierenden Treffen und die großartige gemeinsame Arbeit im Labor.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. med. Christine Klein, Institutsleiterin für das Institut für Neurogenetik, für die Gelegenheit an Ihrem Institut promovieren zu können, sowie die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen in einem außerordentlich motivierten, internationalen Team.

Bei der Universität zu Lübeck möchte ich mich herzlich für die finanzielle Unterstützung durch das Promotionsstipendium Exzellenzmedizin bedanken und für die sehr guten Bedingungen im Rahmen des Studiums.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern des Instituts für Neurogenetik, PD Dr. Sc. Ana Westenberger als meine Co-Betreuerin, die mir das genaue naturwissenschaftliche Arbeiten näherbrachte, sowie Dr. rer. nat. Karen Grütz und Dr. med. Max Borsche für die wissenschaftliche Mitbetreuung und Unterstützung. Insbesondere danke ich den technischen Assistenten – Karin, Susen, Frauke, Britta und Heike für die stete Hilfsbereitschaft bei kleinen und größeren Laborfragen.

Mein besonderer Dank gilt den Studenten und Doktoranden der Neurogenetik, die diese Zeit zu einem ganz besonderen Erlebnis gemacht haben – Evi, Viktor, Hauke, Julia, Sarah, Jonas, Leopold, Charles, Lisa, Charlotte und Johanne.

Mein Dank gilt auch Georg Mahlke, der dieses Projekt begonnen, die ersten Daten erhoben und mich eingearbeitet hat.

Ein weiterer Dank gilt auch an das Institut für Kardiogenetik mit Dr. Zouhair Aherrahrou und Maren Behrensen, die an diesem Projekt beteiligt waren und mich im praktischen Teil meiner Arbeit sehr unterstützt haben.

Ich danke meiner Familie für die Unterstützung, den Rückhalt und das Vertrauen während dieser ganzen Zeit. Ihr habt dieses Studium und diese Arbeit erst ermöglicht.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Ehefrau Christin Rädel für die fortwährende Unterstützung und Motivation.