

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

**Funktionelle Mechanismen der *PDGFB*-Mutation  
für die Krankheitsausbildung der Primären  
Familiären Gehirnkalkifikation**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Sektion Medizin -**

vorgelegt von  
Georg Mahlke  
aus Wismar

Lübeck 2026

**1. Berichterstatter\*in: PD Dr. med. Daniel Alvarez Fischer**

**Ko-Betreuer\*in: PD Dr. Sc. Ana Westenberger**

**2. Berichterstatter\*in: PD Dr.med. York Hellenbroich**

**Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2026**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 05.03.2026**

**Promotionskommission der Sektion Medizin-**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Primäre Familiäre Gehirnkalkifizierung.....	1
1.2	Genetik und Krankheitsmechanismen der PFBC.....	3
1.3	Platelet-derived growth factor (PDGF).....	8
1.4	PDGF-B in pathologischen Prozessen.....	10
1.5	PDGF-B in Osteoklastengnese und Mitochondrien Funktion.....	13
1.5.1	Osteoklasten.....	13
1.5.2	Mitochondriales Membranpotential.....	15
<b>2</b>	<b>Ziele.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Material &amp; Methoden.....</b>	<b>17</b>
3.1	Tiere & Tierhaltung.....	17
3.2	Zellen.....	17
3.3	Material.....	18
3.3.1	Chemikalien.....	18
3.3.2	Primer.....	20
3.3.3	Antikörper.....	20
3.3.4	Gerätschaften.....	21
3.3.5	Ansätze.....	22
3.3.6	Verbrauchsmaterialien.....	23
3.4	Methoden.....	24
3.4.1	Osteoklastendifferenzierung.....	24
3.4.2	Histologie.....	29
3.4.3	Zellkultur mit Fibroblasten.....	31
3.5	Statistik.....	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
4.1	Genetische Kontrolle der Versuchstiere.....	35
4.2	Anzahl und Größe der Osteoklasten nach in vitro Differenzierung.....	35
4.3	Histologie.....	39
4.3.1	Kalkfärbung mit Alizarinrot S.....	39
4.3.2	CD 68 Färbung.....	40
4.4	Mitochondriales Membranpotential von Fibroblasten.....	41
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>46</b>

5.1	Diskussion der Methoden.....	47
5.1.1	Osteoklastenassay .....	47
5.1.2	Mitochondriales Membranpotential.....	48
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	49
5.2.1	Osteoklasten.....	49
5.2.2	Membranpotential .....	52
5.3	Fazit.....	54
5.4	Ausblick.....	57
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>69</b>
8.1	Ethikvotum .....	69
8.2	Eidesstattliche Erklärung.....	70
8.3	Danksagung .....	71
8.4	Lebenslauf .....	72
8.5	Publikationsliste .....	74

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 cCT/ cMRT Aufnahmen von Patienten mit PFBC aus [6] .....	2
Abbildung 1.2. Initial vermuteter Krankheitsmechanismus der PFBC aus [2] .....	6
Abbildung 1.3 Dimerisation und Aktivierung der PDGF-R.....	8
Abbildung 1.4 Schematische Osteoklastengnese aus [52] OC =Osteoklast .....	14
Abbildung 3.1 Beispielhaftes Auszählungsmuster der Osteoklastendifferenzierung in „Stereo investigator“ .....	29
Abbildung 4.1 Osteoklastenzahlen / Well nach Osteoklastengnese aus murinen Milz-Monozyten von WT Mäusen $Pdgfb^{wt/wt}$ (n=8) und Mäusen mit einem homozygoten retention-motif knockout $Pdgfb^{ret/ret}$ (n=7). Alle Daten sind als Median mit oberer und unterer Quartile $\pm$ Maximal- und Minimalwerte angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. (*= $p < 0.05$ ). .....	36
Abbildung 4.2 Fläche der Osteoklasten nach Osteoklastengnese aus murinen Milz-Monozyten von WT-Mäusen ( $Pdgfb^{wt/wt}$ ) (n=8) und Mäusen mit einem homozygoten retention-motif knockout $Pdgfb^{ret/ret}$ (n=7). Alle Daten sind als Median mit oberer und unterer Quartile $\pm$ Maximal- und Minimalwerte angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. (*= $p < 0.05$ ). .....	37
Abbildung 4.3 typisches Bild einer Lichtmikroskopie nach Abschluss der Osteoklastenreifung; oben: bei Zellen mit homozygoten retention-motif knockout $Pdgfb^{ret/ret}$ ; unten: Wildtyp. Das Zellplasma ist rot gefärbt durch die Aktivität der tartrate-resistance-acide-Phosphatase (TRAP) als ein Merkmal der Osteoklasten. Zellkerne sind türkis gefärbt. Zellen mit mehr als zwei Kernen sind markiert und wurden als Osteoklast gezählt. (Eigene Darstellung) .....	38
Abbildung 4.4 Lichtmikroskopie einer Alizarinrot S Färbung eines Saggitalschnitts einer rechten Hirnhälfte von $Pdgfb^{ret/ret}$ Mäusen im Alter von circa 4 Monaten. Rot eingefärbt sind die Kalkdepots im Bereich des Thalamus. (Eigene Darstellung).....	39
Abbildung 4.5 Ausschnitt eines CD 68 angefärbten Mäusehirn als nativ-Aufnahme ohne Fluoreszenz. (Eigene Darstellung).....	40
Abbildung 4.6 Ausschnitt wie Abb. 4.5 mit fluoreszierendem Licht. Sichtbar werden grün leuchtenden Areale als Nachweis von CD68-positiven Zellen. (adaptiert von Schiemenz et al., 2019).....	40

Abbildung 4.7 Westernblot zum Nachweis von PDGF-R- $\beta$ in den Zellreihen der Versuchsfibroblasten. (Eigene Darstellung) .....	41
Abbildung 4.8 Mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) der Fibroblastenzellreihen in gesunde Kontrollen (n=4), verschiedener PDGFB missense (n=2) und nonsense (n=2) Mutationsträgern nach Stimulation mit PDGF-BB. Ausgangswert mit 100% waren jeweils Fibroblastenzellen ohne Stimulation. Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. (*= $p < 0.05$ ) .....	42
Abbildung 4.9 Mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) von Fibroblasten der PDGFB nonsense-Mutation (n=2) nach Behandlung mit PDGF-BB, mit Imatinib und mit PDGF-BB und Imatinib. Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. (*= $p < 0.05$ ) Signifikante Reduktion des $\Delta\Psi_m$ im Vergleich von Kontrolle zu PDGF-BB.....	43
Abbildung 4.10 Mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) von Fibroblasten der PDGFB Kontrollgruppe ohne Mutation (n=4) nach Behandlung mit PDGF-BB, mit Imatinib und mit PDGF-BB und Imatinib. Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. (*= $p < 0.05$ ) Es zeigte sich keine signifikante Reduktion des $\Delta\Psi_m$ . ...	44

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Verwendete Chemikalien.....	20
Tabelle 3.2 Verwendete Primer .....	20
Tabelle 3.3 Verwendete Antikörper.....	20
Tabelle 3.4 Verwendete Geräte.....	22
Tabelle 3.5 Verwendete Ansätze .....	23
Tabelle 3.6 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 3.7 PCR-Ansatz für die Genotypisierung .....	25
Tabelle 3.8 PCR-Programm zur Genotypisierung .....	25

## Abkürzungsverzeichnis

ACP	<i>Acid phosphatase</i> (Saure Phosphatase)
AML	Akute Myeloische Leukämie
BHS	Blut-Hirn-Schranke
cCT	craniale Computertomographie
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
IBGC	<i>Idiopathic basal ganglia calcification</i> (Idiopathische Basalganglienkalzifizierung)
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i> (Junktionales Adhäsionsmolekül)
(M-)CSF	<i>(makrophages-)colony stimulating factor</i>
MYORG	<i>myogenesis regulation glycosidase</i>
NFATc 1	<i>Nuclear factor of activated T-cells 1</i>
NVU	<i>Neurovascular unit</i> (Blut-Hirn-Schranke)
OCLs	<i>Osteoclast-like-cells</i> (Osteoklast-ähnliche-Zellen)
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGFB	<i>Platelet-derived growth factor beta</i>
PDGFRB	<i>Platelet-derived growth factor receptor polypeptide beta</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFBC	<i>Primary familial brain calcification</i> (Primäre Familiäre Gehirnkalkifikation)
PiT2	<i>phosphate inorganic transporter 2</i>

RANKL	<i>receptor nuclear factor <math>\kappa</math>B ligand</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SLC20A2	<i>solute carrier family 20 member 2</i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i> (Glatte Muskelzelle)
TRAP	<i>tartrate resistance acid phosphatase</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp
XPR1	<i>Xenotropic and polytropic murine leukemia retrovirus receptor 1</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 Primäre Familiäre Gehirnkalkifikation

Bei der Primären Familiären Gehirnkalkifikation (engl. *Primary familial brain calcification, PFBC*) handelt es sich um eine seltene, genetisch bedingte Erkrankung. Patienten entwickeln bilaterale und symmetrische Kalkablagerungen in verschiedenen Bereichen des Gehirns. Die Basalganglien sind immer betroffen. Weitere Regionen sind unter anderem auch das Kleinhirn (58%), der Thalamus (53%) und die weiße Substanz (43%). [1] Charakteristisch dabei ist die symmetrische Anordnung der Verkalkungen (Abbildung 1.1).

Die Penetranz des Endophänotyps, also ein Nachweis mit Hilfe radiologischer Diagnostik, beträgt im Alter von 50 Jahren praktisch 100%. Die klinische Symptomatik beginnt in der Regel im Alter zwischen 20 und 60 Jahren. Bemerkenswert ist jedoch, dass etwa 30% der Mutationsträger das gesamte Leben ohne klinisch relevante Symptome bleiben. Somit ist die klinische Penetranz der Mutationen deutlich geringer als beim Endophänotyp. Zudem ist das klinische Spektrum, trotz ähnlicher Verkalkungsmuster und gleichen genetischen Ursprungs, sehr heterogen und umfasst sowohl neurologische/motorische als auch psychische Symptome. Häufige Symptome sind parkinsonoide Bewegungsstörungen und Sprachstörungen. [2] Es treten aber auch epileptische Anfälle, Migräne oder choreateforme Störungen auf. Zu den psychischen Symptomen zählen kognitive und affektive Störungen sowie schizophreniforme Krankheitsbilder. [1][2]

Wichtig in diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Hirnverkalkungen generell ein häufiger Zufallsbefund bei bildgebenden Untersuchungen des Kopfes älterer Menschen sind. Am häufigsten betroffen ist dabei die Epiphyse und der Plexus choroideus mit ca. 70%. Die Basalganglien weisen bei ca. 1% der Menschen Verkalkungen auf. [3] Man geht davon aus, dass sie eine Folge des generellen Alterungsprozesses sind und meist keinen Krankheitswert haben. [4]

Bisher ist man davon ausgegangen, dass die PFBC eine seltene Erkrankung ist. Mit Blick auf die heterogene Klinik und die altersabhängige klinische Penetranz zeigt sich die Schwierigkeit für das Erkennen und Diagnostizieren der PFBC. Neuere Untersuchungen hinsichtlich der Prävalenz von PFBC lassen vermuten, dass es sich nicht um eine außergewöhnlich seltene Erkrankung handelt, sondern sie bisher eher unterschätzt und

## Einleitung

unterdiagnostiziert wurde. Nach Analyse einer Gendatenbank kann man von einer Prävalenz von 4,5/10.000 ausgehen. [5]

Die erste Dokumentation dieser Erkrankung reicht in das Jahr 1850 zurück. Bevor genetische Ursachen der Erkrankung bekannt waren, nannte man die Erkrankung auch idiopathische Basalganglien Verkalkung (*engl.: Idiopathic Basal Ganglia Calcification IBGC*). Allerdings gab es weit mehr Bezeichnungen und vor allem international war der Name „*Fahr's disease*“ sehr geläufig.[6]

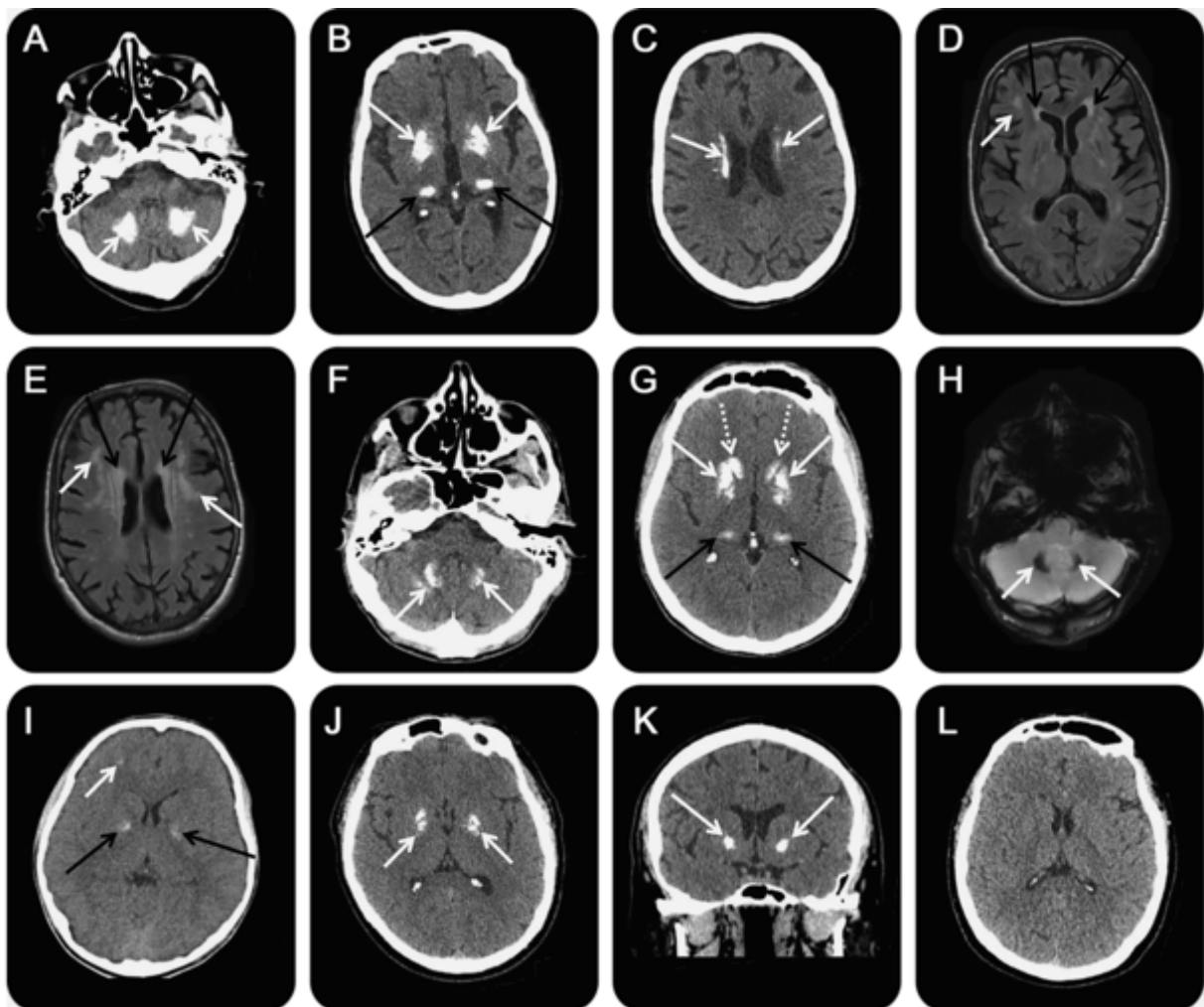


Abbildung 1.1 cCT/ cMRT Aufnahmen von Patienten mit PFBC aus [6]

Gezeigt sind cCTs und cMRTs mehrerer Patienten mit PFBC. Die Pfeile deutet auf die Verkalkungen; Zu erkennen ist das symmetrische Muster und die typisch betroffenen Regionen der Verkalkungsherde; A: nucleus dentatus; B: Striatum (weiß) und Thalamus (schwarz); C: Nucleus caudatus; D und E: (MRT) periventriculär (schwarz) und juxtakortikal (weiß); F: Putamen, G: Putamen (weiß), Nucl. Caudatus (gestrichelt weiß), Thalamus (schwarz), H: (MRT) Nucl. Dentatus, I: Globus Pallidus (schwarz), Subcortex (weiß), J, K: Globus Pallidus und Putamen, L: normales cCT

## 1.2 Genetik und Krankheitsmechanismen der PFBC

Das Verständnis der Krankheitsentstehung von PFBC führt zu allererst über die Entstehung der Verkalkungen im Gehirn. Mit Bekanntwerden des genetischen Hintergrundes der Erkrankung konnte ein Anfangspunkt der aktuell fortbestehenden Forschung hergestellt werden. So heterogen wie die verschiedenen Mutationen, sind auch die Erklärungsansätze der Pathologie. Es stellt sich die Frage, ob es möglich ist, eine Verbindung der einzelnen pathophysiologischen Ansätze zu einem gemeinsamen Komplex herzustellen. Eine Korrelation zwischen den Verkalkungsmustern oder klinischen Symptomen und den verschiedenen Genen ist bisher schwer zu erkennen.

Bisher sind Mutationen in sechs verschiedenen Genen beschrieben, die als Ursache der PFBC gelten. [7] Zunächst waren es zwei Gene für Phosphattransporter (*SLC20A2* und *XPR1*) und zwei weitere für die PDGF-B/PDGF-R- $\beta$  - Achse (*PDGFB* und *PDGFRB*). Hierbei handelt es sich um eine autosomal-dominante Vererbung. Später kamen das *MYORG* und das *JAM2*-Gen dazu, deren Mutationen nach einem autosomal-rezessiven Vererbungsmuster zur PFBC führen.

Als erstes wurden Mutationen in *SLC20A2* (*solute carrier family 20 member 2*) beschrieben. *SLC20A2* codiert für PiT2 (phosphate inorganic transporter 2), einen Natrium-abhängigen Transporter anorganischen Phosphats, der für die Aufnahme von anorganischem Phosphat in die Zelle verantwortlich ist. Bei einer Mutation, die zu einem Funktionsverlust des Transporters führt, würde also Phosphat vermehrt extrazellulär anfallen und in Verbindung mit Kalzium zu den Kalziumphosphatablagerungen bei der Krankheit führen. (siehe Abb. 1.2) Dieser Subtyp der Transportfamilie ist zwar in vielen Geweben anzutreffen, seine höchste Expression findet sich in Gehirnregionen, die typischerweise bei PFBC verkalkt sind. [8] Eine Kalzifikation außerhalb des Gehirns ist bei diesen Patienten auch nicht beobachtet. Die Kalzifikationen der Patienten befinden sich hauptsächlich in den Wänden von kleinsten Blutgefäßen. Gefäßmuskulzellen exprimieren aber eher die *SLC20A1* und nicht *SLC20A2*. Der endgültige Pathomechanismus ist also in diesem Zusammenhang noch offen.

Ein weiteres Gen, dessen Mutation zur PFBC führt, ist *XPR1* (*Xenotropic and polytropic murine leukemia retrovirus receptor 1*). Dieses Gen codiert für einen gleichnamigen anorganischen-Phosphat-Exporter, XPR1, einen der wichtigsten Transporter mit dieser

## Einleitung

Funktion. [9] Bei dessen Funktionsverlust kommt es zu vermehrter Konzentration von Phosphat innerhalb der Zelle, sodass eine Ablagerung von Kalziumphosphat im Intrazellularraum die Folge sein könnte. (siehe Abb.1.2)

XPR1 kommt ubiquitär vor und wurde in Endothelzellen und in verschiedenen humanen Stammzellen, wie mesenchymalen oder neuronalen Stammzellen nachgewiesen. [10] Das Kleinhirn sowie das Striatum, beides Regionen die bei der PFBC häufig betroffen sind, zeigen die höchsten Level an Proteingehalt des XPR1. [11]

Die Mutationen *SLC20A2* und *XPR1* haben also eine pathologisch lokal veränderte Phosphathomöostase gemeinsam. [8] [9]

Neben der vermuteten biochemischen Aufgabe von XPR1 zeigen andere Untersuchungen, dass XPR1, zumindest in Zebrafischen wichtig für die Differenzierung und Migration von gewebespezifischen Makrophagen sind. Entsprechende Mutationen zeigen eine Reduktion von Microglia im Gehirn, sowie einen osteopetrotischen Phänotyp als Ausdruck von mangelnden Osteoklasten. [12]

Bei dem *MYORG* (*myogenesis regulation glycosidase*) Gen führt dessen biallelische Mutation zur rezessiven Vererbung der PFBC. [13] Über die Funktion der MYORG ist bisher wenig bekannt. Nachgewiesen ist eine ubiquitäre Expression im Gehirn von Mäusen, vor allem im endoplasmatischen Retikulum von Astrozyten. Es wird angenommen, dass die MYORG dort für die Glykolisierung von Proteinen zuständig ist und durch die fehlende Glykolisierung von Mukopolysacchariden diese angehäuft werden und die Vorstufe zur Kalkablagerung darstellen. [13] Außerdem bilden Astrozyten zusammen mit anderen Zelltypen wie Perizyten oder Endothelzellen die Neurovaskuläre Einheit (NVU). Man vermutet deshalb auch, dass die Funktion der NVU insgesamt durch *MYORG* Mutationen gestört sein könnte.

*JAM2* ist das bisher zuletzt entdeckte Gen, dessen Mutationen für PFBC verantwortlich sein können. [14] Auch hierbei sind biallelische Mutationen bei Patienten mit PFBC nachgewiesen. Das *Junctional-adhesion-molecule-2* (*JAM2*) findet sich in tight junctions von Endothelzellen und Zellen der NVU. Ursprünglich ging man davon aus, dass sowohl die Permeabilität der Endothelzellen, als auch die Migration von Leukozyten durch *JAM2* beeinflusst wird.

Die zunächst vermutet Blut-Hirn-Schranken (BHS)-Dysfunktion und veränderte Immunzell-Migration über die BHS konnten allerdings bisher nicht bestätigt werden. [15]

## Einleitung

Im Focus dieser Arbeit steht aber *PDGFB*, also das Gen, das für den Liganden, den PDGF-B (*platelet-derived growth factor beta*) codiert. [16] Hierfür sind bis heute insgesamt über 20 verschiedene Mutationen bekannt, [1] die vermutlich über ein Haploinsuffizienz zu einem Funktionsverlust des Proteins zur PFBC führen. [17] PDGF-B ist das Monomer von PDGF-BB. Er gilt als einer der Hauptliganden des Rezeptors PDGF-R- $\beta$  (*platelet-derived growth factor receptor polypeptide beta*) und wird hauptsächlich in Gefäßendothelzellen, Megakaryozyten und Neuronen exprimiert. [18]

Mutationen für *PDGFRB* führen ebenfalls zur PFBC. Dieses Gen kodiert für die gleichnamige Untereinheit des PDGF-Rezeptor-beta (PDGF-R- $\beta$ ). PDGF-R- $\beta$  ist eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) an der Zelloberfläche, deren Hauptliganden neben PDGF-BB auch PDGF-DD ist. [18] PDGF-R- $\beta$  wird im menschlichen Gehirn exprimiert, vor allem in Zellen mesenchymalen Ursprungs. Dazu gehören glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten. [19] Außerdem wird es auch in Neuronen exprimiert. [20] Bisher sind neun missense Mutationen bekannt, die ebenfalls über eine Haploinsuffizienz zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. [1][21]

Mechanismen der Mutation von *PDGFB* und *PDGFR $\beta$* , die zu Verkalkungen führen könnten, werden gemeinsam betrachtet, da sie als Ligand und Rezeptor in einer Einheit fungieren. Wichtigste bekannte Funktion bisher ist, die Angiogenese und im Gehirn die korrekte Ausbildung der BHS. [22] Im Detail geht es dabei um die Rekrutierung der Perizyten, die sich im Normalfall den neu gebildeten Blutgefäßen anlagern und so stabilisieren. In Abb.1.2 ist schematisch dargestellt, dass Perizyten den PDGF-R- $\beta$  tragen und durch PDGF-B, das in diesem Fall von den Endothelzellen produziert wird, angelockt werden. Bei fehlendem Ligand oder Rezeptor kommt es zu verminderter Rekrutierung und einer instabilen BHS. [23] [24] Dies könnte zur Folge haben das Moleküle verschiedener Größe und chemischer Eigenschaft vermehrt in das Hirn-Parenchym übertreten. [22] Die Konsequenz dieser Veränderung im Hinblick auf die Pathogenese der Verkalkung der PFBC ist noch nicht bekannt.

## Einleitung

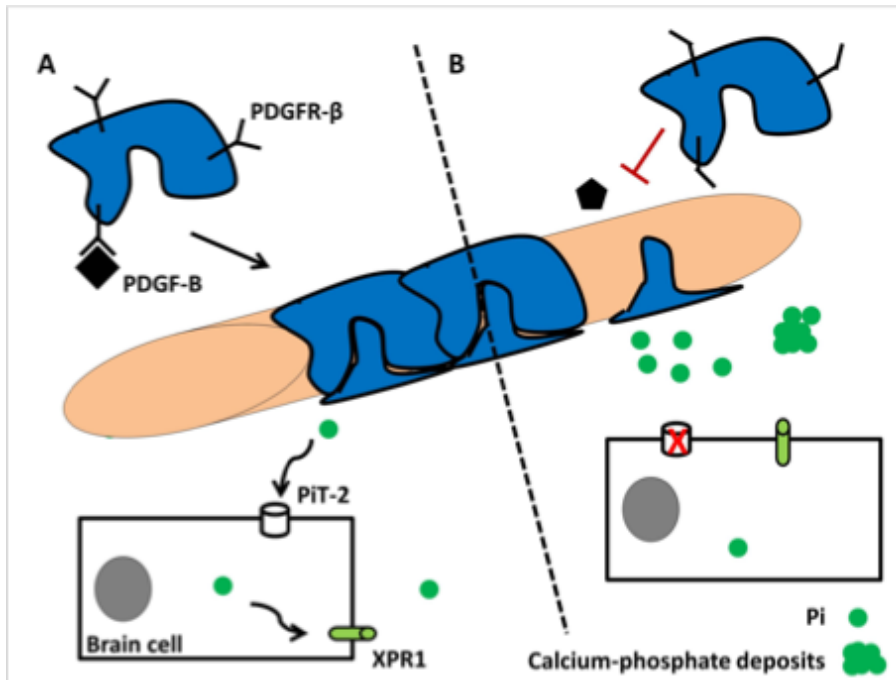


Abbildung 1.2. Initial vermuteter Krankheitsmechanismus der PFBC aus [2]

A: physiologische Bedingungen; oben: die PDGF-B und PDGF-R- $\beta$  Interaktion ist notwendig zur Perizytenrekrutierung und während der Angiogenese; unten: anorganisches Phosphat wird durch PiT-2 in die Zelle aufgenommen und durch XPR1 aus der Zelle transportiert; B pathologische Bedingungen: oben: PDGF-B oder PDGF-R- $\beta$  verlieren ihre Funktion und Perizyten werden nicht an die Blutgefäße angelagert; unten: anorganisches Phosphat wird nicht transportiert und akkumuliert extrazellulär

Die individuell sehr unterschiedliche Ausprägung der Krankheit bei Trägern gleicher Mutation und auch die Vielseitigkeit der Funktionen von PDGF-B lassen einen weitaus komplexeren Mechanismus vermuten. Gleiches zeigt auch das Tiermodell. Mäuse, die homozygot für ein teilweise inaktiviertes *Pdgfb*-Gen sind, zeigen ähnliche Verkalkungsmuster wie bei der PFBC. Die Ausprägung ist aber auch bei den Mäusen trotz identischer Genetik und Lebensumstände interindividuell verschieden. Eine neue Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um Vanlandewijck et al. [17] zeigte, dass sowohl die Verkalkungen perivaskulär sind als auch die BHS fehlerhaft ist, und bekräftigt damit den bereits vermuteten Krankheitsmechanismus. Andererseits zeigten genaue Analysen der Arbeit, dass an den Orten der Verkalkung die BHS und die Perizytenbedeckung der Gefäße intakter ist, als in nicht-kalzifizierten Arealen. [17] Dies widerspricht dem unmittelbaren Zusammenhang von BHS-Permeabilität und Verkalkung.

Grundsätzlich kann man verschiedene Ansätze zusammenfassen. Dabei handelt es sich für *SLC20A2* und *XPR1* scheinbar um eine lokal-veränderte Phosphathomöostase, für

## Einleitung

*PDGFRB/PDGFB* um eine unzureichend ausgebildete BHS und bei *MYORG* um eine gestörte Astrozytenfunktion, die die NVU alteriert. Das jüngst gefundene Gen *JAM2* ist im Hinblick auf den Pathomechanismus für PFBC noch weitgehend unerforscht, scheint aber auch für eine funktionierende NVU wichtig zu sein.

Bemerkenswert ist außerdem, dass *XPR1* und PDGF-R- $\beta$  einen Komplex auf der Zellmembran bilden und Mutationen in *XPR1* diese Komplexbildung reduzieren. [11]

In Zusammenschau des aktuellen Wissens zu den sechs verschiedenen Genen, der Veränderungen zur PFBC führen, wird deutlich, dass die initial vermuteten Ansätze der Pathomechanismen zum Teil durch neuere Forschungsergebnisse in Frage gestellt wurden. Darüber hinaus ist bemerkenswert, dass Astrozyten funktionell verwandt sind mit Endothelzellen, Perizyten, Neuronen, Myozyten und extrazellulärer Matrix und gemeinsam die NVU bilden. Angesichts der Bedeutung von PDGF-B und PDGF-R- $\beta$  für die BHS, der Feststellung, dass *XPR1* und PDGF-R- $\beta$  kolokalisieren, der Tatsache, dass *SLC20A2* in Astrozyten und Neuronen exprimiert wird und *JAM2* ebenfalls bei der Ausbildung der BHS eine Rolle spielt, scheinen alle sechs mit der PFBC assoziierten Proteine funktionell miteinander verbunden zu sein und demselben Signalweg anzugehören.

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung anderer möglicher Mechanismen verfolgt, die in der Vergangenheit mit Verkalkungen in Verbindung gebracht wurden und eine Rolle bei der PFBC spielen könnten.

Erstens wurde getestet, inwieweit auch der Abbau von Verkalkungen gestört sein könnte und es dadurch zu einer vermehrten Akkumulation kommt. Zweitens wurde der Einfluss von PDGF-B auf das mitochondriale Membranpotential und damit auf die Apoptoseresistenz von Zellen untersucht.

Zu erstens ist anzumerken, dass punktuelle Gehirnverkalkungen altersabhängig eine große Anzahl der gesunden Bevölkerung betrifft. [25] Die Verkalkungen, die bei der PFBC vorliegen, gehören zu der dystrophen Form. Sie werden definiert als extraossäre Verkalkungen, bei denen der Blut-Kalziumspiegel im Normalbereich liegt. Grundsätzlich kann es zu dystrophen Verkalkungen durch Gewebeschädigung kommen. Durch Traumata, Entzündung oder Ischämien wird das Gewebe degenerativ verändert und es kommt zur Ablagerung von Kalzium. [26]

### 1.3 Platelet-derived growth factor (PDGF)

Um zu untersuchen, warum *PDGFB* Mutationen zur PFBC führen, wird zuerst der Kenntnisstand zu PDGF wiederholt.

Das PDGF-Protein ist ein Dimer, bestehend aus möglichen Untereinheiten A, B, C und D. Sie gehören zusammen mit den VEGFs (*vascular endothelial growth factor*) zur Familie der Wachstumsfaktoren. Neben dem Wachstum der Zellen bewirken die PDGFs auch Chemotaxis, Differenzierung und Modulation von Zellfunktionen. Ursprünglich wurde die Familie der PDGFs als Sekretionsprodukt der Thrombozyten (engl. *platelet*) entdeckt, [27] aber in der Folge auch bei vielen anderen Zellen wie Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Plazenta Zytotrophoblasten oder Neuronen nachgewiesen. [28] Der Rezeptor der PDGFs ist der *platelet-derived growth factor receptor* besteht auch aus zwei gleichartigen Untereinheiten, die sich bei Verbindung mit einem Liganden dimerisieren (s. Abb. 1.3). Die Dimerisation ist der entscheidende Schritt in der Aktivierung, denn dadurch wird die Autophosphorylierung begonnen. Für die jeweilige Untereinheit des Rezeptors kodieren die Gene *PDGFRA* und *PDGFRB* und die bei Dimerisation entstehenden Rezeptoren sind PDGF-R- $\alpha$  und PDGF-R- $\beta$ . Theoretisch sind viele PDGF-PDGFR Interaktionen denkbar und teilweise in vitro nachgewiesen (vgl. Abb.1.3). In vivo sind bisher nur die Kombination von PDGF-AA und PDGF-CC mit PDGFR- $\alpha$  und die Verbindung PDGF-BB und PDGF-DD mit PDGFR- $\beta$  bekannt. [18]

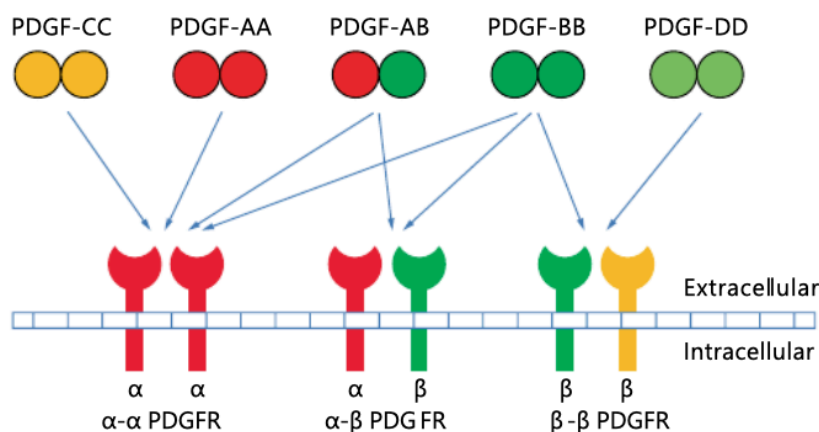


Abbildung 1.3 Dimerisation und Aktivierung der PDGF-R [29]

Physiologisch agieren PDGFs parakrin, während autokrine Stimulationen nur in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen auftreten. [18]

## Einleitung

Bisher beschriebene Funktionen von PDGFs finden sich hauptsächlich bei der Entwicklung von Organsystemen. Für die Aufrechterhaltung der Funktionen im Körper hingegen sind bisher nur wenige Nachweise erbracht. Man unterscheidet die Funktion des PDGFR- $\alpha$  und des PDGF-R- $\beta$  Signalweges, da sie unterschiedliche Organsysteme betreffen. Aber auch gleiche PDGF-R haben an unterschiedlichen Expressionsorten im Organismus aber auch unterschiedliche Funktionen.

Zum einen findet sich PDGF-R- $\beta$  Expression an endothelialen Vorläuferzellen. PDGF-B stimuliert hier die Angiogenese durch Endothel-Organisation und Längenwachstum der Gefäße und beschleunigte endotheliale Zelldifferenzierung. [30] Weiterhin findet sich PDGF-R- $\beta$  Expression auf Zellen der Gefäßwand, die, je nach Morphologie, entweder als Perizyten oder glatte Gefäßmuskelzellen (engl. smooth muscle cells, *SMC*) bezeichnet werden. [31] Es wird angenommen, dass PDGF-R- $\beta$  Aktivierung in einigen Organen, wie z.B. im Gehirn, für die Rekrutierung eben dieser Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen während der Entwicklung von Blutgefäßen entscheidend ist. In anderen Organen, vor allem der Leber, scheint die Rekrutierung der Perizyten oder *SMCs* anders abzulaufen, da Gefäße trotz Abwesenheit von PDGF-B oder PDGF-R- $\beta$  normal entwickelt sind. [32][24] Die reduzierte Rekrutierung von Perizyten und *SMCs* sorgt für vergrößerte Gefäßdurchmesser bis hin zu Aneurysmata der Gefäße. Dieses Phänomen ist beschrieben für Blutgefäße des Gehirns und analog auch der Placenta. [33]

Darüber hinaus spielt PDGF-B auch eine Rolle in der Entwicklung der Nieren. Es wird angenommen, dass PDGF-B als parakriner Stimulus zur Rekrutierung von Mesangiumzellen dient, die entscheidend für die Formung des kapillaren Netzwerks innerhalb eines Glomerulus sind. [34]

Ein weiteres Organ, dessen Entwicklung von PDGF-B und PDGF-R- $\beta$  abhängt, ist das Herz. Hier sind Endothelzellen der Koronarien und Endokardzellen vermutlich ein wichtiger Produzent von PDGF-B, dessen Ziel sog. *Epicardium-derived cells* und *cardiac neural crest cells* sind, deren Rekrutierung für eine physiologische Entwicklung des Herzens eine wichtige Rolle spielt. [35]

Alle bisher genannten Beispiele zeigen eine unverzichtbare Funktion von PDGF-B und PDGF-R- $\beta$  während der Organogenese in verschiedenen Organsystemen. Jede einzelne Funktion ist unabdingbar für das postnatale Überleben. Allen Funktionen gemeinsam ist eine Migrationswirkung auf Vorläuferzellen zum Ort der PDGF-B Produktion.

## Einleitung

Aus diesem Schema fällt die Wirkung auf hämatopoetische Vorläuferzellen. Auch sie tragen den PDGF-R- $\beta$ . Ihre Stimulation durch PDGF-B zeigte eine gehemmte Differenzierung und hat somit eine negativ-regulatorische Wirkung auf die Hämatopoese. [30]

Eine weitere Besonderheit gibt es bei dem Effekt von PDGF-B im Gehirn. Neuronen exprimieren sowohl den Rezeptor als auch den Liganden. Doch scheinbar ist für ihre Entwicklung PDGF-B nicht essentiell, da embryonale Neuronen ebenfalls PDGF-A und PDGF-R- $\alpha$  exprimieren und diese Signaltransduktion für die Entwicklung des ZNS ausreicht. [36] PDGF-B/PDGF-R- $\beta$  Signaltransduktion hat im ZNS postnatal eine neuroprotektiven Funktion. In Experimenten mit kryogene Läsionen ist gezeigt worden, dass PDGF-B/PDGF-R- $\beta$  neuronalen Zelluntergang vermindert und Excitotoxizität durch Inhibierung von NMDA-Rezeptoren reduziert. [37] [20]

Zusammenfassend kann man sagen, dass PDGF-B im Gehirn zwei unterschiedliche Funktionen aufweist. Zum einen ist es im Gehirn, wie auch in anderen Organsystemen, essentiell für die Entwicklung des Gefäßsystems. Vor allem für eine funktionale Ausbildung der BHS ist PDGF-B unabdingbar. Zum anderen ist bekannt, dass PDGF-B in Neuronen eine protektive Wirkung hat und vor Zelluntergang oder Apoptose schützt. [20] [37]

## 1.4 PDGF-B in pathologischen Prozessen

PFBC ist die bisher einzige hereditäre Erkrankung, der eine verminderte Funktion von PDGF-B oder PDGF-R- $\beta$  zugrunde liegt.

Erkrankungen mit erhöhter Synthese oder Sekretion von PDGF hingegen sind bekannt und lassen sich verschiedenen Tumorerkrankungen zuordnen.

### *Maligne Erkrankungen*

Das Dermatofibrosarkom protuberans ist ein seltener, infiltrativ wachsender Hauttumor, dessen Ursache eine Überexpression von PDGF-B in Hautfibroblasten ist. Eine Fusion der Gene für PDGF-B und Kollagen Typ 1 $\alpha$ 1 bewirkt eine ungebremste Synthese von PDGF-B. Infolge dessen kommt es zu einer autokrinen Stimulation der Fibroblasten mit unkontrollierter Zellproliferation. [38]

Auch bei Leukämien sind PDGF Signalwege involviert. Beispielsweise zeigt sich bei der Chronisch Monomyeloischen Leukämie (CMML), eine Form des Myelodysplastischen Syndroms, eine Translokation im PDGF-R- $\beta$  Gen. Diese Translokation führt zur Entstehung

## Einleitung

eines Fusionsproteins mit PDGF-R- $\beta$  und hat zur Folge, dass die Tyrosinkinase des Rezeptors unabhängig von der Bindung mit einem Liganden aktiv ist. Es wird angenommen, dass hier ein Meilenstein in der multifaktoriellen Entwicklung der CMML zur akuten myeloischen Leukämie (AML) liegt. [39] Auch bei der *Large Granular Lymphocyte Leukemia* (LGLL) hat PDGF eine Schlüsselrolle bei der Krankheitsentstehung. Hier sorgt eine autokrine Stimulation durch PDGF-B für ein Überleben leukämischer Zellen. [40]

Diese Beispiele zeigen, dass erhöhte Synthese von PDGF-B für unkontrollierte, autarke Wachstumssignale in Tumorzellen sorgen kann. In der Tumorbiologie werden PDGF weitere Funktionen zugeschrieben. So hat ein parakriner Stimulus Einfluss auf die Rekrutierung von Tumor-Stromazellen. [41] Zudem unterliegt auch im Tumorgewebe die Angiogenese dem PDGF-Signalweg und hat damit Einfluss auf Versorgung und das Wachstum des Tumorgewebes. [42] Außerdem wurde PDGF-R- $\beta$  Expression in epithelialen Tumorentitäten gezeigt. Epitheliale Zellen weisen physiologisch keine Expression von PDGF auf, jedoch wird in der Tumorgenese eine epithelial-mesenchymale Transformation postuliert, wodurch PDGF Expression entsteht und dadurch zur Malignität des Tumors beiträgt. [43][44]

### *Fibrotische Erkrankungen*

Fibrotische Umformungen des Organparenchyms sind die Folge vorangegangener Erkrankungen. Der Prozess der Fibrose beinhaltet im Wesentlichen die Anhäufung von mesenchymalen Zellen und die Ablagerung von extrazellulärer Matrix, die vor allem aus Kollagen besteht. Dabei spielt PDGF eine wichtige Rolle. Speziell PDGF-B/PDGF-R- $\beta$  sind vor allem bei der Leber- und der Nierenfibrose involviert.

Da in der Leber vermehrt PDGF- $\alpha$  Rezeptoren exprimiert werden, zeigt sich keine Abhängigkeit von PDGF-B in ihrer Entwicklung. Beim fibrotischen Umbau des Gewebes, für den vor allem die hepatischen Stern-Zellen verantwortlich sind, wird bei diesen Zellen die PDGF-R- $\beta$  Expression aber aktiviert. So können z.B. Entzündungszellen wie leberspezifische Makrophagen (sog. Kupfer Zellen) durch PDGF-B stimulierend auf die hepatischen-Stern-Zellen den fibrotischen Umbau hervorrufen. [45] [46]

Analog dazu ist in der Niere die Mesangiumzelle für die fibrotischen Prozesse im Glomerulus verantwortlich. [47] Die Fibrosierung der Niere findet Ausdruck in der klinischen Form der Niereninsuffizienz. Ursächlich sind verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Glomerulonephritiden. Anders als in der Leber ist PDGF-B in der

## Einleitung

Niere schon in der Entwicklung wichtig. Bei der Fibrosierung wird PDGF-B/PDGF-R- $\beta$  hochreguliert. [48] [49]

### *Atherosklerose*

Atherosklerose ist eine weit verbreitete Erkrankung deren Hauptursache das metabolische Syndrom darstellt. Der eigentliche Prozess, die Atherogenese ist multifaktoriell und beinhaltet im Wesentlichen die Intimaverdickung und Lipidablagerungen. Bei der chronischen, lokalen Entzündung, die den Hauptauslöser darstellt, werden Immunzellen, wie Makrophagen, aktiviert, die PDGF-B ausschütten und damit SMCs aus der Media in die Intima der Gefäße locken. [50] Auf der anderen Seite ist PDGF-B auch bedeutsam für die Limitierung der Entzündungsreaktion, indem es die Einwanderung der Makrophagen an den Ort der Entzündung begrenzt. Dadurch wirkt es negativ modulatorisch auf die Atherogenese. [51] Mit der Immunmodulatorischen Wirkung bei Atherosklerose zeigt PDGF-B eine weitere Funktion, die auch bei anderen Erkrankungen, wie der PFBC eine Rolle spielen könnte.

## 1.5 PDGF-B in Osteoklastengnese und Mitochondrien Funktion

### 1.5.1 Osteoklasten

Osteoklasten sind multinukleäre Riesenzellen, die durch proteolytische Enzyme befähigt sind Knochenmatrix und ihre Mineralien abzubauen. Forschung bezüglich Osteoporose und deren Behandlung erbrachte den Nachweis, dass auch Osteoklastengnese von PDGF-B Stimulation abhängen. [52] Da davon ausgegangen wird, dass die Verkalkungen der PFBC, ähnlich wie Knochenmaterial, zum überwiegenden Anteil aus Kalzium-Phosphat besteht [16], lohnt sich ein genauerer Blick auf diese Zellart.

Osteoklasten entstehen aus Makrophagen, die im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden. [53] Die Entwicklung verläuft aus diesen Stammzellen zunächst über myeloide Vorläuferzellen und anschließend zu Monozyten. Aus diesen entstehen dann die Makrophagen, aus deren Weiterentwicklung und Fusion letztlich die Osteoklasten hervorgehen. Dabei kann sowohl die Größe der Zellen, als auch die Anzahl der Zellkerne stark variieren und beträgt meist zwischen 2-12.

Zellen des Monozyten/Makrophagensystems, also auch Osteoklasten, besitzen das Oberflächenantigen CD 68 (auch: Microsialin) und können unter anderem mit diesem identifiziert werden. [54] [55]

Monozyten, die zunächst aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf übergehen, wandern über die Gefäßwand ab und entwickeln sich zu gewebsspezifischen Makrophagen. Makrophagen, die sich auf diese Weise im Gehirn gebildet haben, sind sogenannte Mikrogliazellen. Auch Gewebsspezifische Makrophagen können sich weiter differenzieren und zu Osteoklasten weiterentwickeln. [53]

Die Schritte der Differenzierung (siehe Abb. 1.4) können morphologisch beobachtet werden. So entstehen aus Stammzellen die Monozyten/Makrophagen zunächst spiralförmige pro-Osteoklasten (pro-OC) und anschließend runde prä-Osteoklasten (pre-OC), die dann zu den reifen Osteoklasten fusionieren. [56]

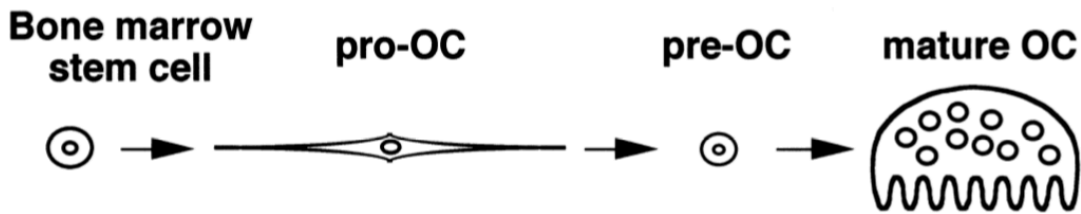


Abbildung 1.4 Schematische Osteoklastengnese aus [52] OC =Osteoklast

Die wichtigsten Faktoren zur Induktion der Differenzierung sind *makrophages-colony stimulating factor* (M-CSF) und der *receptor activator nuclear factor  $\kappa$ B ligand* (RANKL). M-CSF (synonym auch: CSF-1) wirkt über den CSF-1 Rezeptor auf Monozyten- und Makrophagenvorläuferzellen und induziert deren Reifung. Außerdem bewirkt M-CSF eine Steigerung der Aktivität der späteren Osteoklasten. M-CSF wird von Osteoblasten produziert und stimuliert die Reifung der Osteoklasten parakrin. [57] [58] Interessanterweise ist der CSF-1 Rezeptor ebenfalls eine Rezeptortyrosinkinase wie der PDGF-R- $\beta$ . Die Gene beider Rezeptoren liegen nebeneinander auf Chromosom 5. Eine Fehlfunktion könnte Einfluss auf Differenzierung und Zellwanderung bedeuten.

RANKL wird ebenfalls von Osteoblasten, aber auch von Lymphozyten produziert. Es wirkt über den Rezeptor RANK, der sich auf reifen und unreifen Osteoklasten befindet. Er steuert die Zellreifung und die Aktivität der Osteoklasten. [59] [60]

PDGF-B ist in der physiologischen Differenzierung von Osteoklasten aus Makrophagen bisher nicht explizit beschrieben. Fest steht aber, dass Makrophagen den PDGF-R- $\beta$  besitzen. [61] Außerdem ist bekannt, dass PDGF-B für Monozyten/Makrophagen einen Chemotaktischen Reiz im Rahmen von Entzündungsprozessen oder Verletzungen darstellt. [51] [62] Außerdem wurde beschrieben, dass exogenes PDGF-BB Osteoklastenformation beeinflusst. [52]

Osteoblasten sind Knochen-aufbauende Zellen, und haben somit eine gegensätzliche Funktion zu den Osteoklasten. Die Osteoblastenreifung, -differenzierung und -aktivität ist wiederum von Signalwegen abhängig, zu denen auch PDGF-R- $\beta$  gehört. [63] [64] PDGF-B wird auch im Knochenmark synthetisiert und wirkt auf den PDGF-Rezeptor der Osteoblasten. [65] Durch eine enge Verknüpfung von Osteoklasten und Osteoblasten hat PDGF Signaltransduktion im Endeffekt Einfluss auf beide Zelltypen und kann bei einer Mutation zu Veränderungen in Aktivität und Differenzierung sowohl in Osteoblasten als

## Einleitung

auch in Osteoklasten führen. Deshalb erscheint es zielführend die Osteoklastengenese für solche *PDGFB*-Mutationen zu prüfen, die auch zu PFBC führt.

### 1.5.2 Mitochondriales Membranpotential

Außerdem sollte geprüft werden, ob auch die Mitochondrienfunktion bei der PFBC eine Rolle spielen könnte. Mitochondrien sind pathogenetisch eine wichtige Zellorganelle bei der Entstehung von dystrophen Verkalkungen. Sie sorgen für eine Regulation der Kalziumkonzentration zwischen intra- und extrazellulär. [26] Erkrankungen mit mitochondrialer Dysfunktion zeigen unter anderem auch Basalganglienverkalkung. [66] [67] Dazu zählen Erkrankungen wie MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis stroke-like episodes)[68] oder MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibres) [69] [70]. Mitochondrien sind demzufolge ein interessanter Ansatz bei der Klärung der Verkalkungsmechanismen der PFBC. Im physiologischen Fall werden an der inneren Mitochondrienmembran mithilfe der Atmungskette Protonen aus dem inneren des Mitochondriums ausgeschleust, sodass ein elektrochemischer Protonengradient entsteht. Ein Einstrom von Protonen entlang des Gradienten sorgt für die ATP Synthese, die Hauptaufgabe des Mitochondriums. Die negative Ladung im Inneren des Mitochondriums, wird auch als mitochondriales Membranpotential bezeichnet und zeigt also ein intaktes Mitochondrium an.

Die Depolarisation der Mitochondrienmembran ist bekannt als ein früher Prozess oder sogar Induktor des programmierten Zelltods. Während der Apoptose werden Poren der Mitochondrienmembran geöffnet, sodass apoptogene Faktoren freigesetzt werden. Im gleichen Zug strömen durch die Öffnung der Poren Protonen in das Innere des Mitochondriums und das Membranpotential wird aufgehoben. [71] Apoptose steht vor allem im Rahmen der Reifung von Zellen, wie bei der Osteoklastengenese der Proliferation gegenüber. In Bezug auf PDGF-B und mitochondriales Membranpotential gibt es bereits eine Studie, die zeigt, dass externes PDGF-B in kultivierten glatten Muskelzellen eine Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials hervorruft und damit eine Resistenz gegen Apoptose erzeugen könnte. [72] Ob eine Mutation der PFBC, die einen Funktionsverlust des PDGF-B bewirkt auch Einfluss auf das Membranpotential hat, damit die Apoptoseresistenz von Zellen negativ beeinflusst, und konsekutiv Zellgleichgewicht verändert soll in dieser Arbeit untersucht werden.

## 2 Ziele

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es die genetische Mutation im Gen des *PDGFB* bei der PFBC im Hinblick auf Osteoklastenfunktion und Zellapoptose zu untersuchen, um somit ein besseres Verständnis der Entstehungsmechanismen der Kalzifikationen zu erhalten.

Prämisse 1: Osteoklasten sind multinukleäre Riesenzellen, die sich aus Makrophagen differenzieren und durch proteolytische Enzyme befähigt sind Knochenmatrix und ihre Mineralien abzubauen. Makrophagen exprimieren PDGF-R- $\beta$ , dessen Aktivierung durch seinen Liganden PDGF-B einen chemotaktischen Reiz hin zu Entzündungsprozessen oder Verletzungen darstellt. Externes PDGF-BB stimuliert Osteoklastengnese.

Hypothese 1: Kalzifizierungen bei der PFBC sind das Ergebnis verminderter Kalkabräumung durch Osteoklasten, deren Reifung aus Monozyten/Makrophagen durch *PDGFB* Mutationen gestört ist.

Ziel 1: Mithilfe eines Maus-Models sollte geprüft werden, ob *PDGFB*-Mutationen zu einer veränderten Reife und Funktion von Osteoklasten führt.

Prämisse 2: Gefäßmuskelzellen erlangen durch die Behandlung mit PDGF ein erhöhtes Membranpotential der Mitochondrien wodurch sie vor Apoptose geschützt sind.

Hypothese 2: Ein beeinträchtigter PDGF-Signalweg durch eine Mutation im *PDGFB*-Gene führt zu Depolarisation und erleichtert Apoptose der Zellen.

Ziel 2: Mithilfe von Zellkulturen von Fibroblasten von Mutationsträgern und gesunden Kontrollpatienten sollte geprüft werden, ob es Unterschiede im mitochondrialen Membranpotential durch Mutationen im *PDGFB*-Gen gibt und ob die Unterschiede durch direkte PDGF-B Applikation verändert werden können.

## 3 Material & Methoden

### 3.1 Tiere & Tierhaltung

Alle Versuche wurden an vier Monate alten weiblichen Mäusen der Linie C57/Bl6 durchgeführt. Ursprünglich wurden 12 Mäuse hetero- oder homozygot eines Retention-motif knockouts in *Pdgfb* (*Pdgfb*<sup>ret/wt</sup> oder *Pdgfb*<sup>ret/ret</sup>) von dem Institut für Neurochirurgie des Universitätsspitals Zürich geliefert. Beim Retention-motif handelt es sich um ein C-terminales Protein Motiv, das zum Verbleib des Proteins im perizellulären Raum/Matrix sorgt. Der knockout sorgt zwar für ein funktionsfähiges Pdgf-b, das dann aber in geringerer Konzentration im perizellulären Raum vorliegt [73] Man spricht deshalb von einem hypomorphe *Pdgfb*-Gen. Tiere mit einem kompletten knockout im *Pdgfb*-Gen sind aufgrund der fehlerhaft ausgebildeten Gefäßstruktur mit perinatalen Hämorrhagien nicht lebensfähig. Das hypomorphe *Pdgfb*-Allel kann somit in Tierexperimenten die genetischen Mutationen der Patienten mit einer haploiden Mutation im Bereich der *PDGFB* imitieren.

### 3.2 Zellen

Alle im Folgendem beschriebenen Zellkulturversuche wurden unter einer sterilen Werkbank (CleanAir Clean Bench) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Verwendet wurden primäre humane Hautfibroblasten, gewonnen durch Hautbiopsien von Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Insgesamt wurden sechs verschiedene Zellreihen kultiviert. Vier davon sind von PFBC Patienten und zwei von gesunden Personen. Unter den PFBC Patienten tragen zwei eine nonsense-Mutation und zwei eine missense-Mutation im *PDGFB*-Gen. Im Detail handelt es sich bei der nonsense-Mutation um die Variante c.433C>T (p.Gln145\*) und bei der missense-Mutation um die Variante c.26T>G (p.Leu9Arg). Zur Minderung der Kontamination wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% kultiviert. Als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Dieses Medium wurde ergänzt mit fetalen Kälberserum (FCS) in einer Konzentration von 10 %. FCS enthält Proteine, vor allem Wachstumsfaktoren, die zur Verbesserung des Zellwachstums dienen. Antibiotika mit Streptomycin/Penicillin wurde in 1%iger Konzentration beigefügt.

### 3.3 Material

#### 3.3.1 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	Life Technologies; Carlsbad (USA)
Accutase	Life Technologies; Carlsbad (USA)
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Alizarinrot S	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Antioxidanz	NuPage Invitrogen
aqua bidest	Fresenius Kabi Deutschland, GmbH, Bad Homburg von der Höhe
BCA ProteinKit (#23225)	Thermo Scientific, Rockfor
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Chemieluminiszenz: Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachussets, (USA)
Clear Media Opti MEM	Life Technologies; Carlsbad (USA)
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc., Herkules, (USA)
DNA Längenstandard (100bp)	Invitrogen (Thermo Fischer Scientific), Carlsbad, (USA)
Donkey Serum 10 %	abcam, Cambridge (UK)
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	life technologies; Carlsbad (USA)
Ethanol	Merck, Darmstadt
Eukitt	ORSAtec, Freiburg
fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies; Carlsbad (USA)
Formamid-Farbstoff	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien (USA)
Gelatine	Merck, Darmstadt
Histopaque	GE Healthcare, Chalfon St Giles(BG)
Imatinib SML1027	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri (USA)

## Material & Methoden

JC-1 (T31168)	Invitrogen (Thermo Fischer Scientific), Carlsbad (USA)
Ladepuffer	Novex, Carlsbad (USA)
MES-Puffer-Konzentrat	Novex, Carlsbad (USA)
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid 0,1 %	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
PDGF-BB (P3201)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Penicillin/ Streptomycin	life technologies; Carlsbad (USA)
Phosphataseinhibitor	Roche, Mannheim
phosphatgepufferte Salzlösung	life technologies; Carlsbad (USA)
Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix	New England BioLabs, Ipswich, (USA)
Recombinat mouse M-CSF	BioLegend, San Diego (USA)
Recombinat mouse TRANCE RANKL	BioLegend, San Diego (USA)
Saccharose	Merck, Darmstadt
Sodium Pyruvat	Biochrom AG, Berlin
Tissue-Tek® Cryomold	Sakura Finetek Europe B.V. Alphen aan den Rijn, Netherland
TRACP & ALP double-stain kit	Takara, Otsu (Japan)
Transfer-Puffer-Konzentrat	Novex, Carlsbad
TRIS Base, 99,9& p.a.	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trocken-Milch	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Fluca Analytical, St. Gallen (CHE)
Tween 20 0,05 %	Merck, Darmstadt

## Material & Methoden

UltraCruz<sup>®</sup> Aqueous Mounting Medium mit DAPI SantaCruz Biotechnology INC., Dallas, (USA)

Valinomycin Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)  
Xylol Merck, Darmstadt

Tabelle 3.1 Verwendete Chemikalien

### 3.3.2 Primer

<b>Primer</b>	<b>Hersteller</b>
Primer: WT	Eurofins Genomics, Luxemburg
Fw: 5' CAT GCT TTG TAA TCC GTTC 3'	(Luxemburg)
Rev: 5' CGG CGG ATT CTC ACC GT 3'	

Tabelle 3.2 Verwendete Primer

### 3.3.3 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
primärer Anti-Maus CD 68 Antikörper	BioLegend, San Diego (USA)
sekundärer Donkey-Anti-Rat IgG	Molecular Probes, Eugene, Oregon, (USA)
Antikörper Alexa Fluor 488 2mg/ml	
sekundärer Anti-Hase Antikörper IgG-HRP, #H1015	SantaCruz Biotechnology INC., Dallas (USA)
sekundärer Anti-Maus- Antikörper IgG-HRP, #DO116	SantaCruz Biotechnology INC., Dallas (USA)
monoklonaler anti- $\beta$ -actin-peroxidase Antikörper #A3854	Sigma-Aldrich, St. Louis, (USA)
primärer PDGFR- $\beta$ -Antikörper (ab185735)	abcam, Cambridge, UK

Tabelle 3.3 Verwendete Antikörper

### 3.3.4 Gerätschaften

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
BioDoc Analyze Darkhood	Dark Hood DH 50, biostep, Burkhardtsdorf
Butschrank Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
Clean Bench	CleanAIR, Minneapolis Gladbach
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder, Tuttlingen
Cryostat (Leica CM 3050S)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany
Duomax 1030 Schüttler	Heidolph, Schwabach
Entwickler	AGFA, Mortsel (Belgien)
Gelelektrophorese: biotech EPS301	GE Healthcare, Chalfron St Giles(BG)
Gelkammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien (USA)
Kühlschrank	Privilege, Hamburg
Laminiergerät	CIA Tronic
Mikroskop Axiovert 200 M	Zeiss
Mikroskop BX53	Olympus, Hamburg
Mikroskop BZ 9000	Keyence, Neu-Isenburg
Mikroskop Wilovert A	Hund, Wetzlar
Mikrovolumen-Spektralphotometer, NanoDrop 1000	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachussets (USA)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plate Reader; Synergy HAT	BioTek, Winooski (USA)
Rotator	VWR, Radnor (USA)
Sepatech Varifuge 3.0	Heraeus, Hanau
Sprout Mini Zentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf
Thermocycler: MJ Mini Personal Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien (USA)
Vortex Combi-Spin FVL2400N	Biosan, Riga (Lettland)
Zählkammer Neubauer Bright-Line	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda- Königshof

## Material & Methoden

Zellzähler Countes Automated Cell Counter	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien (USA)
Zentrifuge (Microfuge 22R)	Beckman Coulter, Brea (USA)
Zentrifuge (Multifuge 1 S-R)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau

Tabelle 3.4 Verwendete Geräte

### 3.3.5 Ansätze

<b>Ansätze</b>	<b>Zusammensetzung</b>
NaOH (0,25 M)	1 g NaOH Pellet (40 g/mol) in 100 ml H <sub>2</sub> O
PB-Puffer (0,2M)	230 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 52,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 10 l aqua bidest; pH auf 7,4 mit 2M NaOH
Alizarinrot S in TRIS pH 9 (0,5 %)	50 mg Alizarin; 10 ml TRIS-Puffer 50 mM pH 9
Alizarinrot S in TRIS pH 7 (0,5%)	50 mg Alizarin; 10 ml TRIS-Puffer 50 mM pH 7
10x TBE-Puffer:	890 mM TRIS; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA
10xTBS-Puffer	24,2 g Tris; 90 g NaCl; 1 l H <sub>2</sub> O, mit Hcl auf pH 7,5
Valinomycin (1mM)	2 µl Stock Valinomycin(10mM) + 18 µl Methanol
1x TBST-Puffer	100 ml 10xTBS; 900 ml H <sub>2</sub> O; 1 ml Tween 20 (BioRad)
Saccharose (30%)	30 g Saccharose auf 100 ml 0,1 M PB-Puffer
PFA (4%)	241,66 ml aqua bidest (60 °C), 20 g PFA, 1 Tropfen 30 % NaOH, 241,66 ml 0,2 M PB-Puffer
Formamid-Farbstoff:	47,5 ml Formamid; 2,0 ml 0,5 ml EDTA; 0,01 g Bromphenolblau
Ladepuffer	

## Material & Methoden

Makrophagenmedium	DMEM; 1 % Natrium Pyruvat; 0,1 % 2-Mercaptoethanol; 10 % FCS (30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert); 1% Penicillin/Streptomycin
MES-Puffer	35 ml Konzentrat auf 700 ml H <sub>2</sub> O
Permeabilisierung-Lösung	500 ml 1M Tris pH7,5; 2,5 ml 0,5 % Triton-X 100
RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) – Puffer	25 mM Tris mit HCl auf pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 % NP-40, 1 % Natrium desoxycholat; 0,1 % SDS
Transfer-Puffer	45 ml Konzentrat + 90 ml Ethanol auf 900 ml H <sub>2</sub> O
TRIS-Puffer 50 mM pH 7	TRIS-Puffer 50 mM pH 9; HCl bis pH 7
TRIS-Puffer 50 mM pH 9	6,057 g TRIS; 800 ml H <sub>2</sub> O; HCl bis pH 9; H <sub>2</sub> O bis Gesamtvolumen 1 l
TRIS-Puffer pH 7,5	121,14 g TRIS; 800 ml H <sub>2</sub> O; ca. 65 ml HCl bis pH 7,5; H <sub>2</sub> O bis Gesamtvolumen 1 l
Waschpuffer	10 ml 1M Tris pH 7,5; 5,85 g NaCl; 0,05 ml Tween 20; 1 l H <sub>2</sub> O

Tabelle 3.5 Verwendete Ansätze

### 3.3.6 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
12-well/ 6-well Platten	Greiner-bio-one, Kremsmünster (AUT)
96-Well PCR TW-MT Platte	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Biospore Filter Tips	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Cellulose-Membran	GE Healthcare, Amersham (UK)
Chamber Slide, 8 well Glass Slide (0,7cm <sup>2</sup> )	LabTek, Brendale (AUS)
Countess cell counting chamber slides	Invitrogen, Carlsbad, (USA)
Deckgläser	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH, Braunschweig

## Material & Methoden

Einmalpipetten	Sarstedt AG & Co, Nürnberg
Eppendorf Reaktionsgefäß	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Eppendorf Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugationsröhrchen	Sarstedt AG & Co, Nürnberg
Färbekörbchen	Corning, Corning, (USA)
Gradienten Gel	Invitrogen, Carlsbad, (USA)
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gel	
Kulturflaschen	Sarstedt AG & Co, Nürnberg
Pre-Separation Filter (40µm)	Milteny Biotec, Teterow
Superfrost Gold Objektträger	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH, Braunschweig

Tabelle 3.6 Verwendete Verbrauchsmaterialien

## 3.4 Methoden

### 3.4.1 Osteoklastendifferenzierung

#### 3.4.1.1 Versuchsaufbau

Das Osteoklasten-Assay bestimmt Unterschiede zwischen Anzahl und Größe der Osteoklasten nach einer in vitro Reifung aus murinen Milz-Monozyten. Dabei wurden gesunde Mäuse mit Mäusen homozygot für hypomorphe *Pdgfb* Allele (*Pdgfb<sup>ret/ret</sup>*) verglichen. Der Ansatz der Versuchsreihen wurde aufgrund zeitlicher Limitationen auf mehrere Tage aufgeteilt. Die Auszählungen am Ende des Versuchs erfolgten verblindet und zeitgleich. Die entstehenden Zellen werden im folgenden dann Osteoklasten genannt, obwohl sie korrekt eigentlich als Osteoclast-like cells bezeichnet werden müssten.

#### 3.4.1.2 Genotypisierung der Versuchstiere

Zur Genotypisierung wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) genutzt. Dazu musste zunächst DNA aus den Versuchstieren isoliert werden. Dies gelang mithilfe einer kleinen Ohrloch-Biopsie. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde diese mit 100 µl 50mM Natriumhydroxid-Lösung auf einem Schüttler für 20 min auf 95°C erhitzt. Mit einem TRIS-Puffer wurde der Ansatz auf pH 7,6 eingestellt, gevortext und anschließend 8 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt genügend DNA und konnte zur

## Material & Methoden

Weiterverarbeitung genutzt werden. Mithilfe eines Spektralphotometers konnte der DNA-Gehalt geprüft werden.

Die PCR dient zur enzymatischen Vervielfältigung eines bestimmten DNA- Abschnittes. Die Spezifität wird erreicht durch zwei Oligonukleotide (Primer) die den Randbereich der Zielsequenz markieren. Die Primer können an ihre komplementäre DNA binden, nachdem die DNA durch Erhitzen auf 96°C denaturiert wurde. Die Primeranlagerungen, auch Annealing genannt, erfolgen dann bei wiederabkühlen auf 55°C. In der dritten Phase, bei 72°C, arbeitet die Polymerase und synthetisiert neue DNA-Stränge zwischen den Primern (Extension). Durch vielfaches Wiederholen der drei Schritte kommt es zur exponentiellen Zunahme der gewünschten Zielsequenz.

Für die PCR wurde ein Hot Start Q5-High-Fidelity Master Mix verwendet. Dieser beinhaltet eine Q5 Polymerase mit im Vergleich zur Taq-Polymerase geringerer Fehleranfälligkeit. Gleiches gilt für die Hot Start Modifikation. Beides sorgt für geringere unspezifische Banden und mehr korrekt synthetisierte DNA.

Der Ansatz für eine Probe lautet:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Menge</b>
Q5-Mix	2mM	6,25µl
Fw-Primer	10µM	0,625µl
Rev-Primer	10µM	0,625µl
aqua-bidest		3,75µl
DNA		1µl

Tabelle 3.7 PCR-Ansatz für die Genotypisierung

Das PCR-Programm lief nach dem folgenden Schema ab.

Temperatur °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
98	30 s	1
98	10 s	35
55	10 s	35
72	10 s	35
72	1 min	1
4	Endtemperatur	

Tabelle 3.8 PCR-Programm zur Genotypisierung

Zur Analyse des entstandenen PCR Produkts dient die Gelelektrophorese. Hierbei wird die DNA mithilfe eines elektrischen Feldes der Größe nach getrennt. Die Auftrennung ist

## Material & Methoden

möglich aufgrund der negativen Ladung der DNA. Das Agarosegel stellt dabei das Medium dar, indem die Moleküle wandern können. Es wurde dazu ein 1,5 % Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 6 g Agarose in 400ml TBE suspendiert, anschließend in der Mikrowelle aufgeköcht und 7,5µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Anschließend konnte das Gel in eine entsprechende Kammer gegossen werden.

Die Ladetaschen des Gels wurden jeweils mit 5µl PCR-Produkt und 5µl Formamidfarbstoff geladen. Die Auftrennung der DNA- Bestandteile erfolgte dann bei 120V für 45 Minuten. Die benutzten Primer sorgen für die Amplifikation des Wildtyp Allels. Die Größe beträgt 340 Basenpaare. Mithilfe des in der letzten Ladetasche mitgelaufenen Längenstandards konnte das Wildtyp-Allel identifiziert werden.

### *3.4.1.3 Isolation muriner Milzmonozyten*

Für die Gewinnung der Monozyten wurden Milzen aus den getöteten Mäusen entnommen und in PBS kühl gelagert. Zur Freisetzung der Zellen wurden die Milzen jeweils durch ein 40µm Nylon Filter in ein 50 ml Falcon Röhrchen gequetscht und 3x mit 10 ml PBS gespült bis nur noch Fettmasse der Milz im Sieb vorhanden war. Anschließend wurden die Zellen mit 1200 rpm für 8 min bei Raumtemperatur herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 6 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann im Verhältnis 1:1 auf Ficoll Histopaque geschichtet. Dabei bildeten sich zwei Phasen, die notwendig waren zur nachfolgenden Dichtezentrifugation. Bei diesem Zentrifugationsschritt (20 min 1500 rpm, RT) musste die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet sein. Der entstandene Gradient erhält in der untersten Phase Erythrozyten und Zelltrümmer, darauf liegt die Ficoll-Phase, darüber ein Ring aus Leukozyten und die Plasma-Phase. Die Monozyten befinden sich in dem Ring aus Leukozyten. Die Zellen wurden in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, in dem 10 ml PBS vorgelegt wurden. Anschließend wurde auf ein Volumen von 40 ml mit PBS aufgefüllt.

Nach einer Zentrifugation für 15 Minuten bei 1500 rpm und 4°C zum Zweck des Waschens der Zellen, wurde das Pellet in 5 ml Makrophagenmedium resuspendiert und bis zum Aussäen auf Eis gelagert.

### *3.4.1.4 Anlegen der Zellkultur aus Milzmonozyten*

Die Monozyten Suspension wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer auf eine Sollkonzentration eingestellt. Dazu wurden 25 µl Zellsuspension mit 25 µl Trypanblau

## Material & Methoden

versetzt. Mit dieser Technik konnten lebende und tote Zellen oder Zelltrümmer voneinander abgegrenzt werden. 10 µl dieser gefärbten Zellsuspension wurden in eine Zellkammer pipettiert und die Zählung unter einem Zeiss Lichtmikroskop vorgenommen.

Die aus den vier Teilquadranten im Mittel erhaltene Zahl multipliziert mit  $10^4/\text{ml}$  entspricht der Zellkonzentration. Aufgrund der 1:1 Verdünnung mit Trypanblau muss zusätzlich mit 2 multipliziert werden um auf die Konzentration in der ursprünglichen Zellsuspension zu kommen. Mithilfe dieses Wertes wurde die Zellzahl der Suspension auf  $3,5 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt.

Aus der eingestellten Zellsuspension wurden 428 µl auf jedes der 8 Wells eines Chamber Slides gegeben. Um keine Abweichungen der Zellkonzentration zwischen den Wells zuzulassen, musste die Zellsuspension gut durchmischt sein. Das gleichmäßige Ausplattieren der Zellen in einzelnen Well konnte erreicht werden indem die Zellsuspension mit Schwung mittig in das Well pipettiert wurde. Anschließend wurden die Slides vorsichtig mit möglichst wenig Erschütterungen in den Brutschrank gestellt und dort bis zum nächsten Tag bei 37 °C und 4 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre gelagert (Tag 0).

### 3.4.1.5 Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten

Die Stimulation zur Differenzierung konnte 24 h nach dem Anlegen der Kultur erfolgen. Dazu wurden 200 µl des alten Makrophagenmediums aus den Wells abpipettiert und durch 222 µl neues Makrophagenmedium, welches mit 75 ng/ml M-CSF angereichert wurde, ersetzt. Der M-CSF Stock befand sich in einer Konzentration von 200 µg/ml. Um eine Konzentration von 75 ng/ml in 450 µl (Volumen eines jeden Wells) zu erreichen berechnete man folgendermaßen:

$$V_{M-CSF}(\text{pro Well}) = \frac{75 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \times 450 \mu\text{l}}{200 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} = 0,169 \mu\text{l M-CSF/Well}$$

Bei 8 Wells ergibt sich also:

$$V_{\text{Medium}} = 8 \times 222 \mu\text{l} = 1776 \mu\text{l}$$

$$V_{M-CSF} = 8 \times 0,169 \mu\text{l} = 1,352 \mu\text{l}$$

Auch bei diesem Arbeitsschritt wurde auf eine gute Durchmischung des Mediums mit M-CSF geachtet, um eine gleiche Konzentration in jedem Well zu erreichen. Außerdem musste auf behutsames ab und auf pipettieren geachtet werden, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch eine geringe Adhärenz aufweisen. Anschließend wurden die Zellen wieder in den Brutschrank zur Kultivierung gestellt.

## Material & Methoden

An Tag 6 wurde das Medium vollständig ersetzt. Durch die Stimulation mit M-CSF sind die Monozyten zu großen Teilen zu Makrophagen differenziert. Zur Differenzierung zu Osteoklasten wird neben M-CSF auch RANKL benötigt. Das neue Medium wurde deshalb erneut mit 75 mg/ml M-CSF und zusätzlich mit 75 ng/ml RANKL angereichert. Die Konzentration des Grundstocks von RANKL war identisch mit der des M-CSF, sodass obenstehende Berechnung gleichermaßen für RANKL benutzt werden konnte.

Am Tag 9 erfolgte ein halber Mediumwechsel. Dazu wurden 200 µl des alten Mediums entfernt und durch 222 µl frisches Medium ersetzt. Auch das neue Medium wurde mit M-CSF (75ng/ml) und RANKL (75ng/ml) angereichert.

Die Lagerung erfolgte weiterhin im Brutschrank bis zum Tag 12.

### 3.4.1.6 Zell Fixierung und TRAP-Färbung

Zur Fixierung und Färbung wurde das TaKaRa Double Staining-Kit verwendet. Als erstes wurde das alte Medium komplett abgesaugt und anschließend 150µl Fixierlösung in jedes Well pipettiert und die slides 10 Minuten unter der Werkbank stehen gelassen. Anschließend wurde die Fixierlösung abgesaugt und jedes Well zweimal mit bi-distilliertem Wasser gewaschen.

Zunächst musste die Färbelösung angesetzt werden. Dazu wurde Natriumtartrat und das gelöste Substrat für ACP (acid phosphatase) im Verhältnis 1 zu 10 gemischt. 150 µl dieses Ansatzes wurden je Well benötigt. Die TRAP (*tartrate resistance acid phosphatase*) – Färbung war nach zwei Stunden Inkubation im Brutschrank abgeschlossen.

Für die Kernfärbung wurde zunächst die Färbelösung entfernt. Anschließend konnte die Kammer der Chamber Slides von den Slides entfernt werden. Die Slides wurden dreimal mit bi-distilliertem Wasser gewaschen und die komplette Wellfläche mit Kernfärbemittel aus dem Staining-Kit benetzt, 10 Minuten inkubiert und das Kernfärbereagenz mit bi-distilliertem Wasser komplett abgewaschen. Nach der Lufttrocknung konnten die Zellen mikroskopiert und gezählt werden.

### 3.4.1.7 Zellzahl – und Zellflächenauswertung

Die Quantifizierung der Osteoklasten wurde mit einem Olympus Lichtmikroskop und der Computersoftware „Stereo Investigator“ durchgeführt. Als Osteoklasten wurde Zellen gewertet, die TRAP positiv waren, deren Zellstroma sich also deutlich rot gefärbt hatte und die mehr als zwei gefärbte Zellkerne aufwiesen. Exemplarisch ist dies in Abb 4.3

## Material & Methoden

nachzuvollziehen. Ausgezählt wurden alle 8 Wells eines Slides, wobei nur 25 % eines jeden Wells gezählt wurden. Hierzu wurde mit dem „Stereo Investigator“ ein virtuelles Raster über ein Well gelegt. Zellen wurden primär quantifiziert und in einem zweiten Schritt wurden die Fläche der gezählten Zellen ermittelt

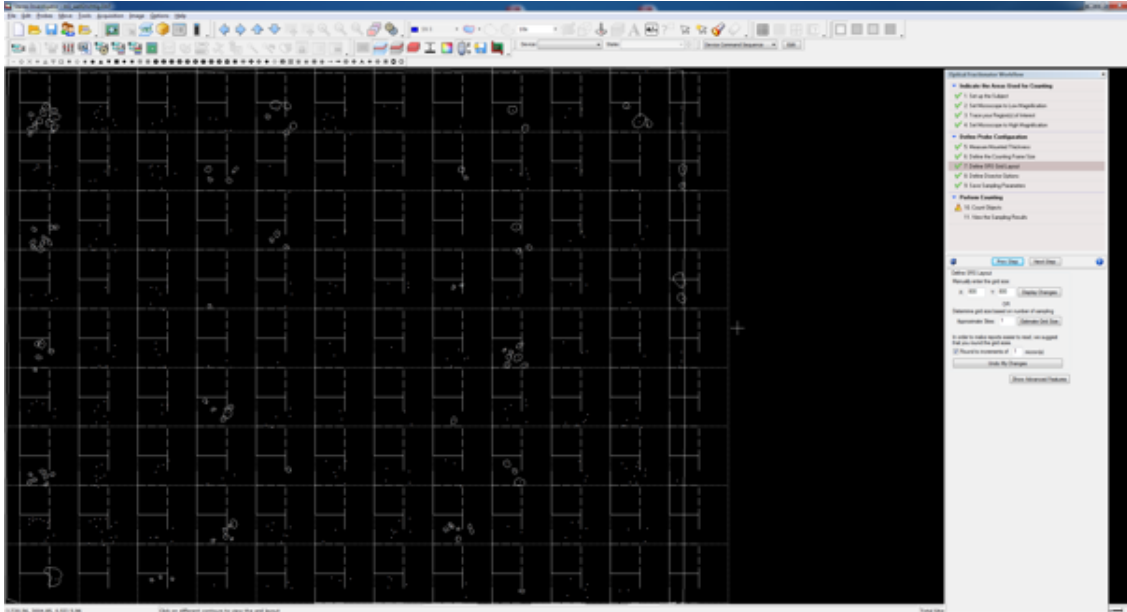


Abbildung 3.1 Beispielhaftes Auszählungsmuster der Osteoklastendifferenzierung in „Stereo investigator“

### 3.4.2 Histologie

#### 3.4.2.1 Anfertigung der Gehirnschnitte

Nach Entnahme der Gehirne wurden beide Hirnhälften sagittal in der Mittellinie getrennt. Zur Vorbereitung der Schnitte wurde die rechte Hirnhälfte dann in 4% PFA-Lösung für mindestens 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden die Hirnhälften in 30% Saccharose/PBS – Lösung für mindestens 2 Tage im Kühlschrank dehydratisiert. Dieser Prozess ist abgeschlossen, sobald die Präparate auf den Boden der Lösung gesunken sind. Zur Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  müssen die Gehirne Schockgefrostet werden. Dazu werden sie aus der Zuckerlösung direkt in  $-30^{\circ}\text{C}$  kaltes Isopentan für 1 Minute gegeben. Anschließend wurden sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Mittels Kryostat wurden  $35\ \mu\text{m}$  dicke coronare Schnitte angefertigt. Dazu wurden die Hirne bei einer Arbeitstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  am Kryostat zunächst auf den Stempel gestellt und mit Tissue Tek stabilisiert. Sobald die Hirne in aufrechter Position stabil auf dem Stempel standen, wurde mithilfe der der TRIM-Funktion am Kryostat das Messer an das Präparat herangeführt. Sobald die interessanten Regionen (beginnend am basalen Vorderhirn über Thalamus, Mittelhirn bis zum Pons) des

## Material & Methoden

Gehirns erreicht wurden, wurde die Schnittdicke auf 35µm gestellt. Jedes Gehirn wurde beim Schneiden in 10 gleiche Serien geteilt. Die Lagerung erfolgte frei-schwimmend in 0,1 M PBS mit zusätzlich 0,01 % Natrium-Azid. Eine der Serien wurde direkt auf Objektträger aufgezogen. Die frei-schwimmenden Schnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

### *3.4.2.2 Alizarinrot S Färbung*

Die Alizarinrot S Färbung ist eine Methode um Kalziumablagerungen nachzuweisen. Die OH-Gruppen des Alizarinrot S bindet zweiwertige Kationen, wie z. B. Kalzium und bildet eine Chelatverbindung. Kalziumablagerungen stellen sich durch diese Komplexbildung rot-orange dar.

Für die Färbung wurde ein 50 mM Tris-Puffer mit pH 9 sowie pH 7 hergestellt. Zuerst wurden die frei schwimmenden Schnitte kurz im TRIS-Puffer pH 9 gewaschen und anschließend in 0,05% Alizarinrot S in TRIS-Puffer pH 9 für 60 min gefärbt. Um die Schnitte möglichst wenig mechanischer Belastung auszusetzen, wurden sie bei allen Färbeschritten mit einem Sieb bewegt. Nach Ablauf der ersten Färbung wurden die Schnitte in 0,5% Alizarinrot S in TRIS-Puffer pH 7 für 5 Minuten weiter gefärbt. Anschließend erfolgten Waschungen in TRIS-Puffer. Zunächst in pH 9 anschließend in pH 7. Danach wurden die Präparate in 0,9% NaCl überführt und von hier schnellstmöglich auf gelatinierte Objektträger gezogen. Dazu wurde erst ein Tropfen Natriumchlorid-Lösung auf den Objektträger gegeben und dann mit einem feinen Pinsel ein Schnitt aus der NaCl-Lösung entnommen und auf den Tropfen gegeben. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit Zellstoff abgesaugt, sodass sich das Präparat auf dem Objektträger absenkte. Anschließend wurden die Objektträger auf einer Heizplatte getrocknet. Dann wurden die Schnitte zweimal mit Xylol entwässert und mit einem Tropfen Eukitt eingedeckelt.

### *3.4.2.3 CD 68 Färbung*

Die Hirnschnitte wurden ebenfalls frei-schwimmend zum Nachweis von CD 68 positiven Zellen gefärbt. Um die Präparate möglichst wenig mechanischer Belastung auszusetzen, wurden sie bei den nachfolgenden Färbeschritten mit einem Sieb bewegt. Zunächst wurde das Gewebe für 15 Minuten auf einem Schüttler mit einer 0,5%igen Triton-X Lösung permeabilisiert und anschließend für ca. 60 Minuten mit 10% Affen-Serum blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem CD-68 Antikörper in 1%igem BSA in Tris-Puffer (pH 7,5)

## Material & Methoden

mit einer Arbeitskonzentration von 2 µg/ml für 90 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen, bevor die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Donkey Anti-Rat IgG AK in einer Arbeitskonzentration von 5 µg/ml) für 45 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit (Aluminiumfolie) folgte. Danach folgten nochmals drei Waschschrritte für je 15 Minuten in Dunkelheit. Danach wurden die Schnitte mit einem Pinsel auf die Objektträger gebracht und anschließend, ohne zu trocknen mit dem UltraCruz Medium eingedeckt. Die Lagerung bis zur Auswertung erfolgte im Kühlschrank.

### 3.4.3 Zellkultur mit Fibroblasten

Für die Versuche mit Fibroblasten wurden Zellkulturen angelegt. Das Medium wurde ein- bis zweimal in der Woche erneuert. Bei etwa 80-%iger Konfluenz der Zellen wurden die Zellen geerntet und/oder geteilt und in die nächste Zellpassage überführt. Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt, die an der Kulturflasche adhärenen Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 2 ml Accutase zur Ablösung der Zellen hinzugegeben. Dazu wurde die Zellkulturflasche für zehn Minuten zurück in den Brutschrank gestellt, damit Accutase die optimalen Bedingungen erhält. Accutase wurde mit der Zugabe von frischem Nährmedium inaktiviert, sobald alle Zellen vom Boden der Flasche gelöst und vereinzelt waren. In der Regel wurde ein Drittel der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche zur weiteren Kultivierung überführt. Der Rest wurde entweder verworfen oder stand für Versuche zur Verfügung.

#### 3.4.3.1 *Western Blotting*

Zum Nachweis des PDGF-Rezeptors der Fibroblasten diente der Western Blot. Vorbereitend wurden die zu untersuchenden Zellen in einer 6-well Platte zu 100.000 Zellen/well ausplattiert. Bei 80-prozentiger Konfluenz der Zellen wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen, mit Accutase inkubiert und nach ca. 10 Minuten mit 1 ml Medium in Eppendorf-Reaktionsgefäße geerntet. Anschließend bei 4 °C für 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellt auf Eis gelagert. Die Proteinextraktion erfolgte stets unter Kühlung der Substanzen. Zunächst erfolgte die Inkubation des Zellpellets mit 20-30 µl RIPA-Puffer für 25 min. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt mit 13.000 rpm für 20 min. Nach der Zentrifugation konnte ein Pellet mit den Zellresten von dem Überstand mit den Zellproteinen getrennt werden.

## Material & Methoden

Als nächstes wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt. Dazu wurde das Protein Assay Kit der Firma BioRad verwendet. Reagenz A und S des Kits wurden im Verhältnis 50:1 vermischt. 2 µl dieser Mischung wurden mit 2 µl der Probe bzw. den Proteinstandards des Kits in einer 96-well PCR Platte mit 200 µl der Reagenz B des Kits zunächst gevortext und anschließend für 30 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Nun konnten 150 µl aus jedem Well in einer neuen Platte in einem Plate-Reader analysiert werden. 10 µg des Proteinlysats wurden auf 10 µl Gesamtvolumen mit RIPA-Puffer gestreckt und zusammen mit 5,3 µl Ladepuffer für 4 min bei 95 °C erhitzt. Dieser Schritt dient der Denaturierung des zu untersuchenden Proteins. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese). Dazu diente ein fertig geliefertes Gradienten-Gel (4-12%). Die Gelkammer wurde mit MES-Puffer befüllt und die Taschen des Gels mit 15 µl des Lysats geladen. Nach zuerst 4 min bei 100 V und später 150 V für 90 min wurden die nach der Größe aufgetrennten Proteine im eigentlichen Westernblotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Blotting Kammer wurde mit Transferpuffer befüllt und lief für 60 min bei 32 V.

Die Membran wurde mit 1 %iger Milchlösung in TBST für 60 min inkubiert. Somit wurden unspezifische Bindungen der Primäantikörper verhindert. Die Inkubationslösung der Primäantikörper bestand aus 4 ml 1 %iger Milch, 4 µl aus dem Stock der PDGF-R-β-AK-Lösung (Arbeitsverdünnung von 1/1000) und 40 µl aus dem Stock der β-actin-AK-Lösung (1:10<sup>5</sup>) zur Ladekontrolle. Nach einer Inkubationszeit bei 4 °C übernacht wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen. Die Lösung für die Sekundäantikörper bestand aus 10ml 1%ger Milchlösung, 1 µl anti-Maus Sekundäantikörper und 1 µl anti-Hase Sekundäantikörper, die mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Die Inkubation erfolgte für 60 min. Anschließend, nach erneuten Waschgängen mit 1x TBST, erfolgte die Behandlung mit der Chemieluminiszenzlösung. Dies ermöglichte die Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe auf einem Röntgenfilm.

### 3.4.3.2 Membranpotentialmessung

Für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials diente der kationische, lipophile Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'- Tetrachloro- 1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin iodid (JC-1). Er kann, je nach Umgebung, in unterschiedlich fluoreszierenden Formen vorliegen. In gesunde Mitochondrien mit stabiler Spannung über die innere Membran wird JC-1 aufgenommen und liegt in der Mitochondrienmatrix als J-Aggregat vor. Durch

## Material & Methoden

Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm emittieren diese Aggregate rotes Licht der Wellenlänge 585 nm. Bei Depolarisation der Mitochondrien zerfallen die Aggregate in Monomere, diffundieren ins Zytosol und emittieren nach gleicher Anregung grünes Licht mit der Wellenlänge 530 nm. Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale der beiden Formen beschreibt das mitochondriale Membranpotential.

Das Ionophor Valinomycin kann selektiv Kaliumionen über Zellmembranen transportieren. Inkubiert man Zellen mit Valinomycin bricht durch diesen Transportvorgang das Membranpotential der Mitochondrien zusammen und die Zelle stirbt ab. Die Messung dieses depolarisierten Membranpotentials ergibt eine Untersuchungsinterne positiv-Kontrolle und eine Baseline der Messung.

Vorbereitend zur Messung des Membranpotentials wurden die Zellen zu 100.000 Zellen/Well auf einer 12-Well Platte ausplattiert und stimuliert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Accutase für 10 min inkubiert, mit 10 ml Medium aufgenommen und in ein Falcon-Röhrchen überführt. 10 µl der Zellsuspension wurden auf die Kammerobjektträger für den automatischen Zellzähler pipettiert und die Zellzahl automatisch bestimmt.

Die Stimulation mit PDGF-BB erfolgte in einer Konzentration von 50 ng/ml. Die Inhibierung der Stimulation erfolgte mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib in einer Konzentration von 2,5 µg/ml eine Stunde vor der PDGF-BB Gabe.

Die Messung des Membranpotentials wurde 48 Stunden nach Stimulation durchgeführt.

Da der JC-1 Farbstoff lichtempfindlich ist, musste zügig und in möglichst lichtarmer Umgebung gearbeitet werden. Vor dem Versuchsbeginn wurden die Falcon-Röhrchen vorbereitend mit Aluminium-Folie umwickelt um den Inhalt vor Licht zu schützen.

In Falcon a) befand sich Opti-MEM, ein Nährersatzmedium für den Zeitraum des Versuchs mit reduziertem fetalem Rinderserum. Falcon b) enthielt Opti-MEM und JC-1 im Verhältnis 1000:1 und Falcon c) Opti-MEM, JC-1 und Valinomycin im Verhältnis 1000:1:1. Valinomycin musste im Vorfeld mit Methanol im Verhältnis 1:10 vorverdünnt werden. Nach der Vorbereitung wurde aus den Wells das Medium vorsichtig entfernt und anschließend mit den Medien aus Falcon a), b) oder c) bestückt. Es erfolgte eine Inkubation von 15 Minuten im Brutschrank. Die Messung der Extinktionen erfolgte automatisiert mit einem Mikroplatten Reader. Dazu musste das Inkubationsmedium abgesaugt werden, die Wells einmalig mit PBS gespült und anschließend mit 400 µl PBS bestückt werden.

Eventuelle Abweichungen der ausplattierten Zellzahl oder Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurde bei der Berechnung ausgeglichen, in dem im Anschluss an die Messung die Proteinmenge eines jeden Wells bestimmt wurde. Die

## Material & Methoden

Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay. Peptidbindungen sind in der Lage die in dem Assay erhaltenen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen zu reduzieren. Die reduzierten Ionen bilden dann ein Chelatkomplex mit der BCA aus dem Kit und dieser Komplex hat sein Absorptionsmaximum bei 562 nm Wellenlänge. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben des BCA-Protein Kit (Thermo Fischer) mit einem Mikroplatten Reader. Jede Probe wurde als Duplikat analysiert. Die Proben wurden zunächst mit 25  $\mu\text{l}$  0,25 M NaOH gemischt und für 30 min inkubiert und anschließend mit den Reagenzien A und B des Kits im Verhältnis von 50:1 bestückt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die photometrische Messung bei 562 nm Wellenlänge.

## 3.5 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gentische Kontrolle der Versuchstiere

Die Zuordnung der Versuchstiere zu den genetischen Gruppen erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) aus Biopsiematerial. Nach entsprechender Verpaarung wurden die Tiere genotypisiert. Heterozygote und Wildtyp (WT) Tiere verhalten sich hinsichtlich der Verkalkung gleich und wurden in den Kontrollgruppen zusammengefasst. Bei der Verpaarung wurden männlichen homozygoten Versuchstiere (*Pdgfb<sup>ret/ret</sup>*) und weibliche heterozygoten Mäuse (*Pdgfb<sup>ret/wt</sup>*) genutzt. Bei den neuen Würfen wurde dann zwischen homozygot und heterozygot durch eine PCR auf das WT-Allel unterschieden. Tiere, die ein WT-Allel besitzen wurden in die Gruppe der heterozygoten Mäuse (*Pdgfb<sup>ret/wt</sup>*) einsortiert.

### 4.2 Anzahl und Größe der Osteoklasten nach in vitro Differenzierung

Die absolute Zahl der Osteoklasten nach einer in vitro Reifung aus Monozyten der *Pdgfb<sup>ret/ret</sup>* Mäuse zeigte sich vermindert im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Mäusen. Insgesamt konnten acht Tiere in die Kontrollgruppe (n=8) und sieben Tiere in der Untersuchungsgruppe (n=7) ausgewertet werden. Nach dem Auflegen des oben genannten Zählrasters konnten in Wildtyp Mäusen eine durchschnittliche Zahl von  $68,89 \pm 22,42$  Osteoklasten je Well ausgezählt werden. In der Gruppe der homozygot Mutations-tragenden Tiere wurden durchschnittlich  $38,61 \pm 16,63$  Osteoklasten je Well ausgezählt. Prozentual entwickelten die Zellen der Mutationsmäuse im Durchschnitt 56,05 % weniger Osteoklasten als die der Wildtypmäuse bei gleicher Stimulation. Nach statistischer Auswertung zeigte sich diese Reduktion signifikant.

## Ergebnisse

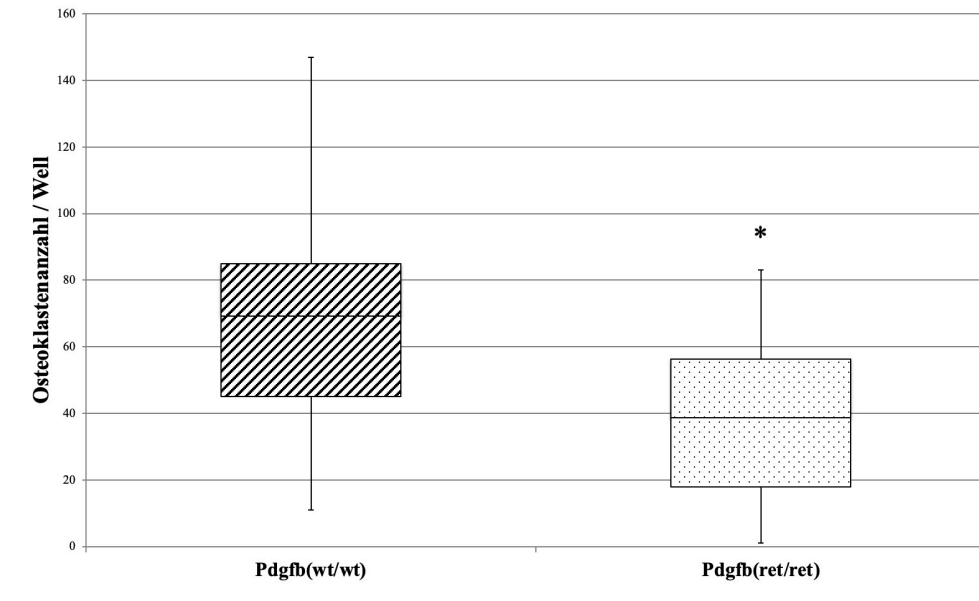


Abbildung 4.1 Osteoklastenzahlen / Well nach Osteoklastengengese aus murinen Milz-Monozyten von WT Mäusen  $Pdgfb^{wt/wt}$  (n=8) und Mäusen mit einem homozygoten retention-motif knockout  $Pdgfb^{ret/ret}$  (n=7). Alle Daten sind als Median mit oberer und unterer Quartile  $\pm$  Maximal- und Minimalwerte angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. (\*= $p < 0.05$ ).

Es wurde aber nicht nur die Anzahl, sondern auch die Morphologie der Osteoklasten bestimmt, um Größenunterschiede zu untersuchen. So wurde die mittlere Größe der Osteoklasten ermittelt. Die Größe wurde in diesem Zusammenhang mit der messbaren Fläche einer Zelle gleichgesetzt. In der Gruppe der Kontrollmäuse wurde eine mittlere Osteoklastenfläche von  $5492,65 \mu\text{m}^2/\text{Osteoklast}$  ermittelt. Die Standardabweichung dieser Messwerte lag bei  $1335,91 \mu\text{m}^2/\text{Osteoklast}$ . In der anderen Gruppe waren es  $3981,30 \mu\text{m}^2/\text{Osteoklast}$  (Standardabweichung  $808,62 \mu\text{m}^2/\text{Osteoklast}$ ). Die Osteoklastenfläche nach Reifung aus murinen Milz-Monozyten der  $Pdgfb^{ret/ret}$ -Maus zeigte sich ebenfalls statistisch signifikant reduziert. In Abb. 4.3 ist eine typische Mikroskopie dargestellt, in der ausgezählt und ausgemessen wurde.

## Ergebnisse

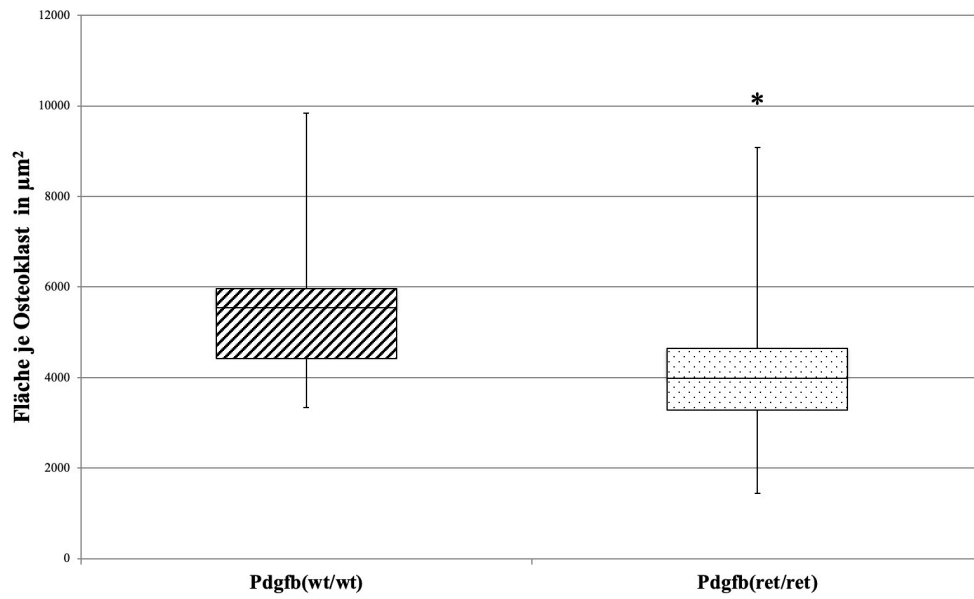


Abbildung 4.2 Fläche der Osteoklasten nach Osteoklastengenesse aus murinen Milz-Monozyten von WT-Mäusen ( $Pdgfb^{wt/wt}$ ) (n=8) und Mäusen mit einem homozygoten retention-motif knockout  $Pdgfb^{ret/ret}$  (n=7). Alle Daten sind als Median mit oberer und unterer Quartile  $\pm$  Maximal- und Minimalwerte angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. (\*= $p < 0.05$ ).

## Ergebnisse

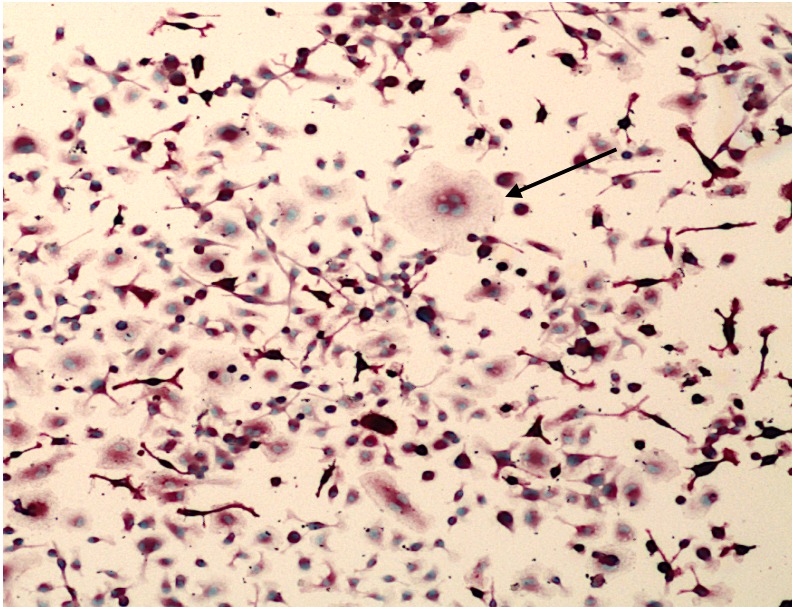
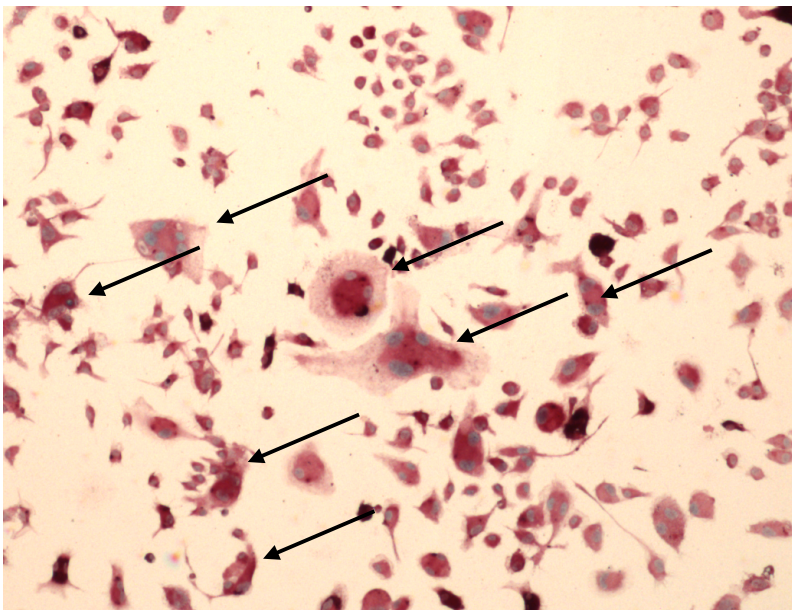


Abbildung 4.3 typisches Bild einer Lichtmikroskopie nach Abschluss der Osteoklastenreifung; oben: bei Zellen mit homozygoten retention-motif knockout  $Pdgfb^{ret/ret}$ , unten: Wildtyp. Das Zellplasma ist rot gefärbt durch die Aktivität der tartrate-resistance-acide-Phosphatase (TRAP) als ein Merkmal der Osteoklasten. Zellkerne sind türkis gefärbt. Zellen mit mehr als zwei Kernen sind markiert und wurden als Osteoklast gezählt. (Eigene Darstellung)



## 4.3 Histologie

### 4.3.1 Kalkfärbung mit Alizarinrot S

Der Nachweis der Kalkherde in den Hirnen der vier Monate alten Versuchsmäuse gelang mittels Alizarinrot S Anfärbung. Die Kalkherde sind deutlich sichtbar als stark rot gefärbte Knoten im Bereich des Thalamus. Abgebildet ist eine rechte Hirnhälfte im Saggitalschnitt.

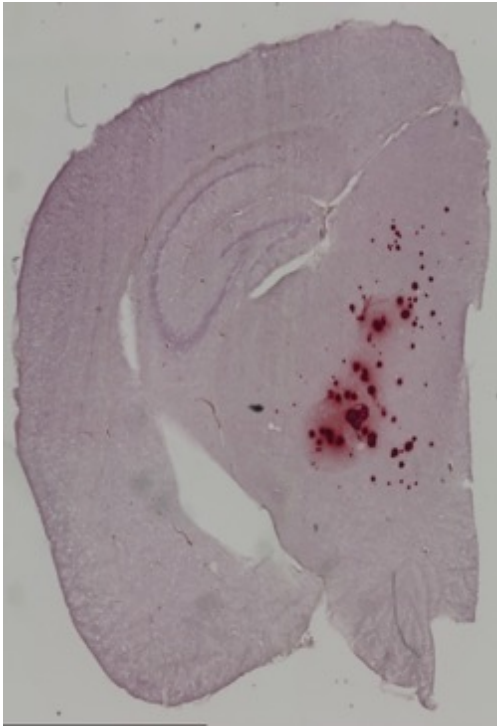


Abbildung 4.4 Lichtmikroskopie einer Alizarinrot S Färbung eines Saggitalschnitts einer rechten Hirnhälfte von  $Pdgb^{ret/ret}$  Mäusen im Alter von circa 4 Monaten. Rot eingefärbt sind die Kalkdepots im Bereich des Thalamus. (Eigene Darstellung)

### 4.3.2 CD 68 Färbung

In der Anfärbung der 35 µm dicken Hirnschnitte zeigte sich eine Positivität für den Zellmarker CD 68. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die CD 68 positiven Zellen unmittelbar an den Kalkherden lokalisiert sind. Mithilfe des zweiten Antikörpers wird der primäre, an das CD 68 Oberflächenantigen bindende, Antikörper in der Fluoreszenz cyan-grün. Die Zuordnung zu den Kalkherden der CD 68 positiven Zellen gelang durch Überlagerung mit der entsprechenden Nativ-Aufnahme.

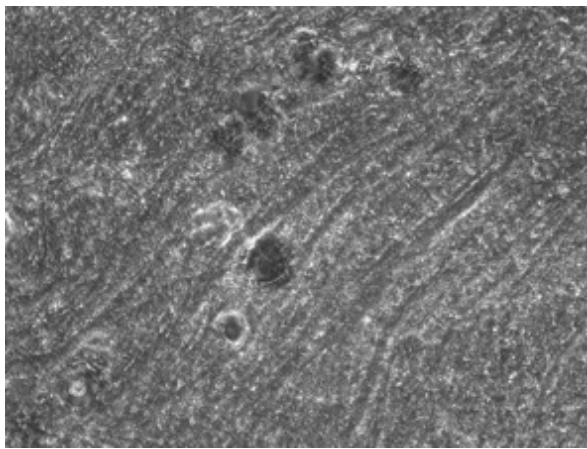


Abbildung 4.5 Ausschnitt eines CD 68 angefärbten Mäusehirn als nativ-Aufnahme ohne Fluoreszenz. (Eigene Darstellung)

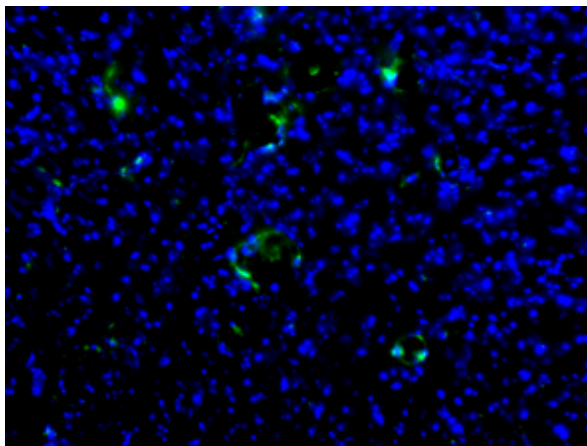


Abbildung 4.6 Ausschnitt wie Abb. 4.5 mit fluoreszierendem Licht. Sichtbar werden grün leuchtenden Areale als Nachweis von CD68-positiven Zellen. (adaptiert von Schiemenz et al., 2019)

## 4.4 Mitochondriales Membranpotential von Fibroblasten

Wichtige theoretische Grundvoraussetzung für die mögliche Wirksamkeit der Stimulation mit PDGF-BB an den Fibroblasten ist das Vorhandensein eines entsprechenden Rezeptors. PDGF-BB korrespondiert vor allem mit dem PDGF-R- $\beta$ . Der Nachweis in den Fibroblasten, die für die Membranpotentialversuche herangezogen wurden erfolgte mittels Westernblot. Als negativ-Kontrolle wurde die Zelllinie SH-SY5Y benutzt, eine humane Neuroblastom-Zelllinie. Sowohl Fibroblasten als auch Neuroblastom Zellen, zeigten eine positive Bande zwischen 37 und 50 kiloDalton. Diese Bande entspricht dem Protein  $\beta$ -actin, das somit in allen Zellen vertreten ist. Es diente als Ladekontrolle. Bei den Proben der Fibroblasten ist eine zweite Bande bei circa 150 kiloDalton aufgetreten. Diese Bande fehlt bei den SH-SY5Y Zellen. Auch wenn die erwartete Bande für die PDGF-R- $\beta$  laut Herstellerangabe bei 123 kiloDalton liegt, wurde diese als Nachweis für das Vorhandensein des PDGF-R- $\beta$  gewertet. Eine Aussage zu unterschiedlichen Konzentrationen des Rezeptors ließen diese Ergebnisse nicht zu.

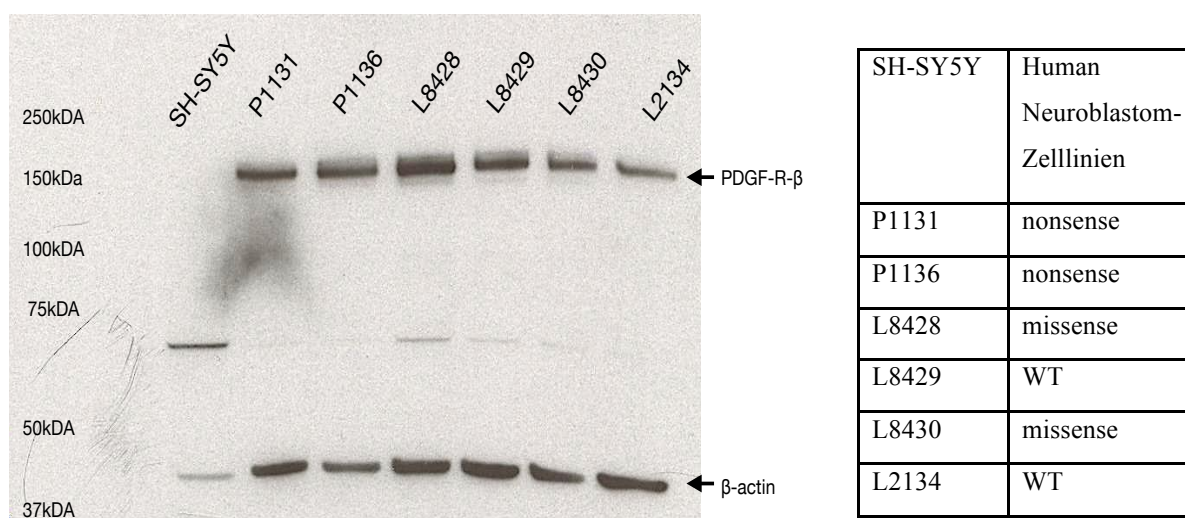


Abbildung 4.7 Westernblot zum Nachweis von PDGF-R- $\beta$  in den Zellreihen der Versuchsfibroblasten. (Eigene Darstellung)

Bei der Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurde zunächst der Effekt der Stimulation von PDGF-BB auf die Fibroblasten und deren mitochondriales Membranpotential gemessen. Gleichzeitig wurde gemessen, inwieweit der Effekt mit Hilfe des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib blockiert werden kann. Dabei wurden Fibroblasten gesunder Probanden und gesunder Verwandter mit Fibroblasten von Patienten, die eine nonsense-Mutation oder eine missense-Mutation tragen, verglichen. Die Messung des Membranpotentials in absoluten Werten war zwischen den Zellzyklen stark schwankend.

## Ergebnisse

Zur Auswertung wurde deshalb jeweils der gemessene Wert mit einer unbehandelten Zelle ins Verhältnis gesetzt.

Zunächst zeigte sich eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials bei den Zellen der Mutationsträger. Das Membranpotential nach Stimulation mit PDGF-BB betrug im Durchschnitt  $47,68\% \pm 20,41\%$  im Vergleich zu der jeweiligen unbehandelten Zellgruppe. Damit wurde statistische Signifikanz erreicht. Interessant wurde die Analyse nach Aufteilung in Kontrollgruppe, missense-Mutation und nonsense-Mutation (siehe Abbildung 4.8). Bei der nonsense-Mutation lag das Membranpotential nach Stimulation bei  $32,11\% \pm 9,04\%$  und bei den Zellen der missense-Mutation bei  $60,84\% \pm 17,90\%$ . In beiden Gruppen wurde Signifikanz erreicht. Die Zellen der gesunden Kontrollgruppe zeigten ebenfalls einen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials nach Stimulation. Dieses fiel mit  $86,51\% \pm 20,17\%$  geringer aus und erreichte kein Signifikanzniveau.

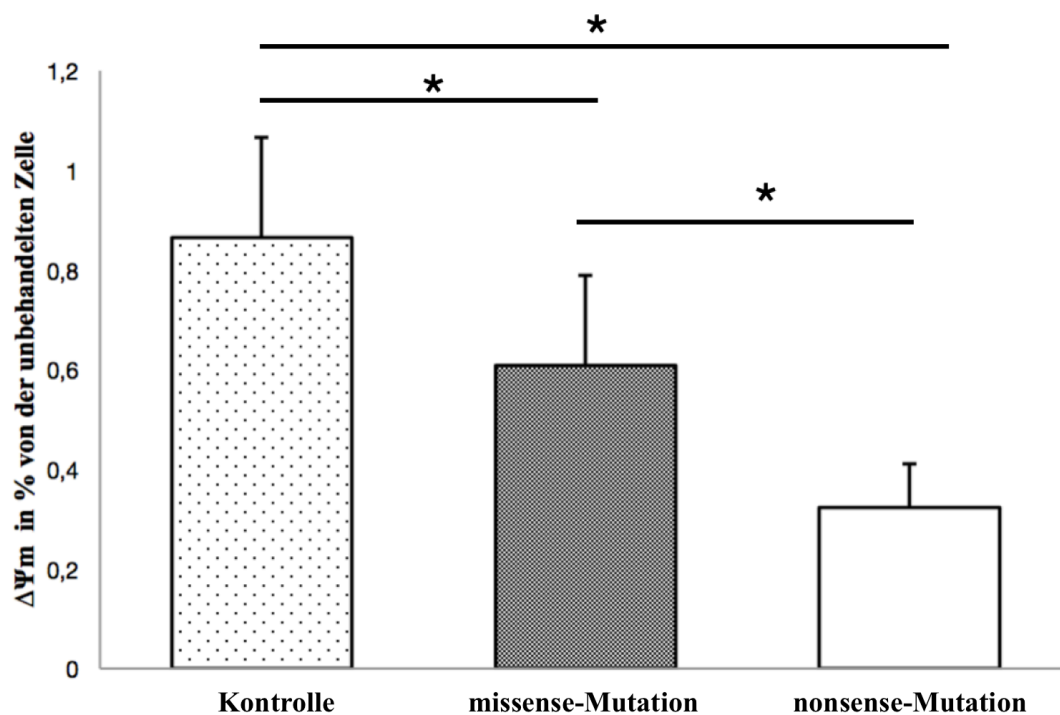


Abbildung 4.8 Mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) der Fibroblastenzellreihen in gesunde Kontrollen (n=4), verschiedener PDGFB missense (n=2) und nonsense (n=2) Mutationsträgern nach Stimulation mit PDGF-BB. Ausgangswert mit 100% waren jeweils Fibroblastenzellen ohne Stimulation. Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. (\*= $p < 0.05$ )

Um die Ergebnisse zu verifizieren wurde bei gleichem Versuchsaufbau getestet, ob die Wirkung von PDGF-BB auf die Zellen durch den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib zu

## Ergebnisse

blockieren sei. Dazu wurden neben der unbehandelten Zelle drei Bedingungen erstellt. Die Behandlung der Zelle nur mit PDGF-BB, nur mit Imatinib und mit Imatinib und PDGF-BB. In der nonsense Gruppe war wie oben beschrieben das Membranpotential durch PDGF-BB signifikant reduziert, nach alleiniger Imatinibgabe lag es bei  $74,44 \% \pm 30,32 \%$  und nach Imatinibgabe und PDGF-BB Gabe bei  $69,51 \% \pm 38,85 \%$  (siehe Abbildung 4.9)

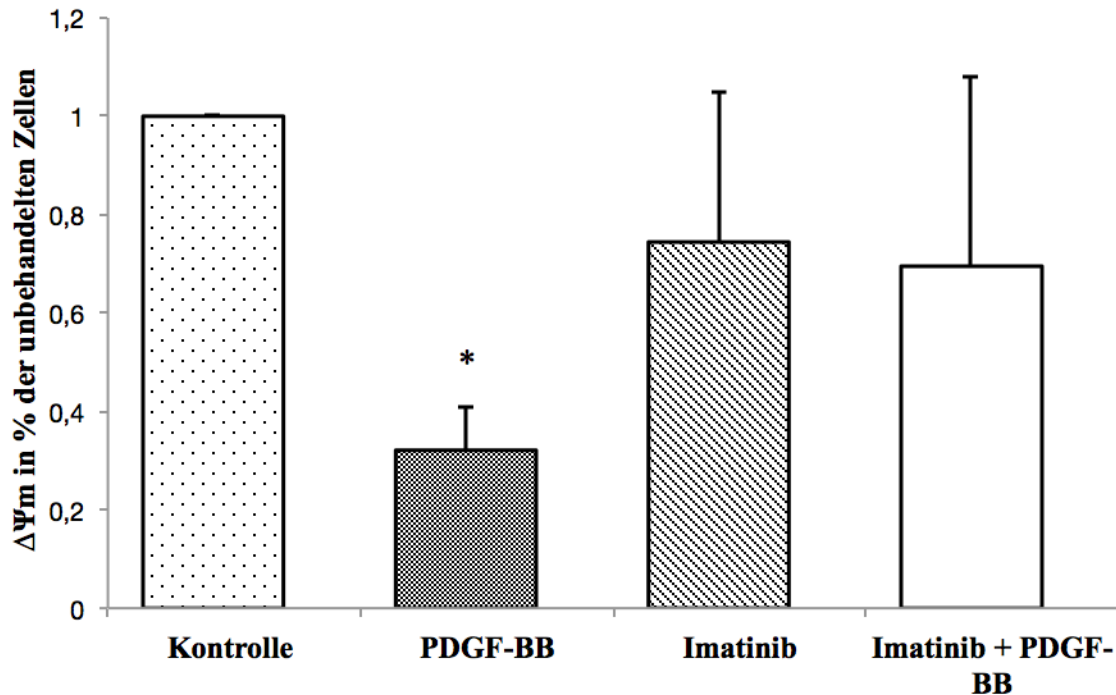


Abbildung 4.9 Mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) von Fibroblasten der PDGFB nonsense-Mutation (n=2) nach Behandlung mit PDGF-BB, mit Imatinib und mit PDGF-BB und Imatinib. Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. (\*= $p < 0.05$ ) Signifikante Reduktion des  $\Delta\Psi_m$  im Vergleich von Kontrolle zu PDGF-BB

## Ergebnisse

In der Missense Gruppe zeigten sich Werte von  $68,57 \% \pm 23,09$  für die alleinige Imatinibgabe und bei der kombinierten Gabe  $75,40 \% \pm 26,41\%$ . In der Kontrollgruppe erreichte das mitochondriale Membranpotential nach Imatinibgabe durchschnittlich  $84,71 \% \pm 10,95\%$  und nach kombinierter Gabe  $88,18 \% \pm 8,46 \%$  (siehe Abbildung 4.10).

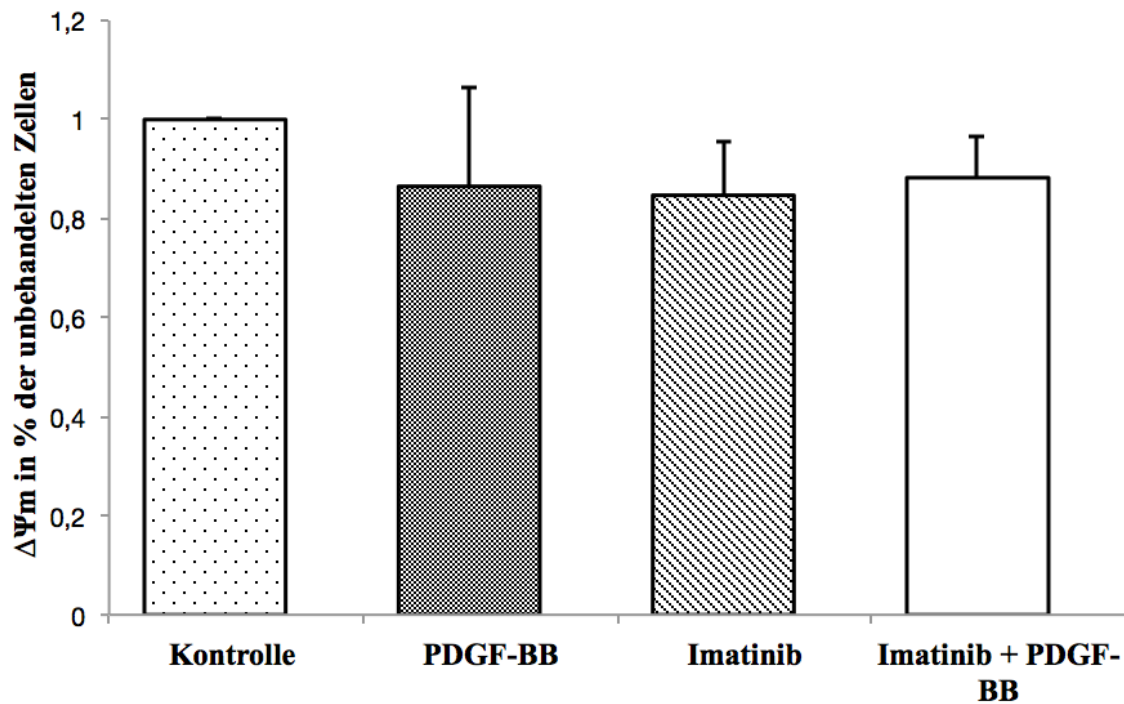


Abbildung 4.10 Mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) von Fibroblasten der PDGFBB Kontrollgruppe ohne Mutation ( $n=4$ ) nach Behandlung mit PDGF-BB, mit Imatinib und mit PDGF-BB und Imatinib. Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA mit einem post-hoc Holm Sidak's test durchgeführt. ( $*=p < 0.05$ ) Es zeigte sich keine signifikante Reduktion des  $\Delta\Psi_m$ .

Ergänzend wurden weitere Messungen des Effektes von PDGF-BB auf die Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration durchgeführt. Hierbei wurden ausgehend von der Konzentration des vorausgegangenen Versuchs mit 50 ng/ml Konzentrationen von 25ng/ml ( $1/2$ -fach), 12,5ng/ml ( $1/4$ -fach), 100 ng/ml (2-fach) und 200ng/ml (4-fach) verwendet. Diese Messungen wurden an der Zellgruppe ohne Mutation und der Gruppe mit nonsense-Mutation getestet. In beiden Gruppen zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit des Effektes von der Konzentration. Das Membranpotential bei der Nonsense Gruppe lag im Durchschnitt bei  $40,62\% \pm 16,36 \%$  mit einem Maximum von 47,84% bei 200 ng/ml (4fach) und einem Minimum von 34,52 % bei 25 ng/ml ( $1/2$ ). Für die Zellen der Kontrollgruppe wurde ein

## Ergebnisse

Abfall des Membranpotentials nach Stimulation auf durchschnittlich  $67,71\% \pm 13,99\%$  gemessen. Der maximale Wert wurde bei der 4-fachen Konzentration mit  $76,24\% \pm 10,79$  und der Minimalwert mit  $\frac{1}{4}$  der Konzentration (12,5 ng/ml) von  $64,71\% \pm 11,57\%$  erreicht.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der verschiedenen Versuche zunächst einen signifikanten Abfall des Membranpotentials von Fibroblasten von *PDGFB*-Mutationsträgern nach Stimulation mit PDGF-BB. Dieser Effekt war bei gesunden Fibroblasten geringer ausgeprägt und nicht signifikant. Von großem Interesse ist hierbei der Vergleich dieser Membranpotentialverluste zwischen den einzelnen Zellreihen. Bei den Zellen der nonsense-Mutation ist der Abfall des Membranpotentials deutlich stärker ausgefallen, als bei Zellen der missense-Mutation. Eine Hemmung des Effekts durch Imatinib, einen Tyrosinkinaseinhibitor, bestätigt die PDGF-Rezeptor Vermittlung.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden pathophysiologische Grundlagen der PFBC untersucht. Bisher sind sechs Gene bekannt, deren Veränderungen zu dieser Erkrankung führen. Die Produkte all dieser Gene weisen auf eine führende Rolle der NVU hin.

Ein Kardinalsymptom der Erkrankung ist die bilaterale Kalzifikation verschiedener Hirnregionen, die bei 100% der Mutationsträger auftritt. Erstaunlicherweise manifestiert sich die Erkrankung mit klinischer Symptomatik aber nur in etwa 2/3 aller Patienten. Welche Rolle die Verkalkung dabei spielt, ist im Detail nicht abschließend geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Veränderung im *PDGFB*-Gen im Hinblick auf die Verkalkungsprozesse bei der PFBC zu untersuchen. Durch die sehr komplexen und nicht vollständig geklärten Funktionen von PDGF-B in der humanen Physiologie gibt es in der Literatur verschiedene Theorien zur Krankheitsentstehung der PFBC. In dieser Arbeit wurde sich auf die Rolle der Osteoklastenreifung fokussiert.

Dies geschah anhand von in vitro Experimenten an murinen und humanen Zellen.

Mithilfe des Mausmodells, das den retention-motif knockout *Pdgfb<sup>ret/ret</sup>* trägt, wird die *PDGFB*-Mutation der Patienten imitiert. Aus Milzmonozyten dieser Mäuse wurde die Osteoklastenreifung in vitro nachempfunden. Diese Experimente zeigten, dass durch einen Funktionsverlust von PDGF-B die absolute Anzahl der herangereiften Osteoklasten-ähnliche-Zellen geringer ausfällt. Auch die Größe der Zellen ist dezimiert, sodass möglicherweise auch die osteoklastische Aktivität dieser Zellen reduziert ist. Ein zweiter Teil der Versuche liefert Hinweise, dass die Osteoklastengenese negativ beeinflusst wird, indem PDGF-B auf das Mitochondriale Membranpotential und somit auf die Apoptoseresistenz von Zellen Einfluss nimmt.

Die Ergebnisse können die Pathomechanismen der Verkalkung nicht abschließend klären, geben aber plausible Erklärungsansätze, die es lohnenswert erscheinen lassen, weiter verfolgt zu werden.

## 5.1 Diskussion der Methoden

### 5.1.1 Osteoklastenassay

Für die Studie der PDGF-B Mutationen an der Maus wurde ein Modell benutzt, das die *Pdgfb*<sup>ret/ret</sup> Mutation trägt. Dieses ist ein etabliertes Modell [16], das die eigentliche genetische Veränderung der Betroffenen gut imitiert. Die kennzeichnenden bilateralen, mit dem Alter zunehmenden Gehirnverkalkungen tragen auch die Versuchsmäuse. Zu dessen Nachweis dienen die Färbungen mit Alizarinrot S. Das Protokoll der Osteoklastengnese ist in ähnlicher Form bereits in der Literatur beschrieben [74] und wurde in dieser Arbeit in leicht modifizierter Form angewandt. Die Stimulation der Differenzierung gelang mittels M-CSF und RANKL, die als die wichtigsten Induktoren der Differenzierung gelten. Allerdings sind während der in vivo Genese auch andere Faktoren involviert, die für diesen Versuchsaufbau vernachlässigt wurden. Zum Beispiel ist beschrieben, dass für die endgültige Formung der Osteoklasten in vivo der Kontakt mit Knochenmatrix von Bedeutung ist. Dieses konnte in vitro nicht realisiert werden, denn Versuche, ein solches Modell zu etablieren blieben bislang erfolglos. Dennoch gelang es Osteoclast-like-cells, die der Definition TRAP-positiv und mehrkernig entsprechen, zu differenzieren. Dass die in vitro entstandenen Zellen tatsächlich funktional aktiv sind, konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, während andere Veröffentlichungen, die mit einem ähnlichen Protokoll gearbeitet haben, eine Aktivität belegen. [75] Die Kultivierung der Milzmonozyten zur Differenzierung erwies sich als relativ sensibel hinsichtlich technischer Fehler, sodass eine gleichmäßige Differenzierung erst mit mehreren Versuchen gelang. Ein aussagekräftiges Ergebnis lag vor, wenn die Zellen in den acht ausgesäten Kulturen einer Maus gleichmäßig verteilt differenziert sind. Außerdem konnten leichte Schwankungen gut abgefangen werden, da bei jeder Maus acht wells differenziert und ausgewertet wurden.

Für die Auswertung der Differenzierung mussten die Osteoklasten zunächst zweifelsfrei identifiziert werden. Dies gelang mithilfe der TRAP und der Kernfärbung in den meisten Fällen. Bei einigen Zellen war entweder die TRAP oder Kernfärbung zweifelhaft und die Entscheidung untersucherabhängig. Dafür war der Untersucher gegenüber dem vorliegenden Präparat verblindet. Darüber hinaus wurde für die Auszählung nur ein Untersucher eingesetzt, sodass große Schwankungen in der Interpretation vermieden wurden. Optimiert wurde die Auszählung mithilfe einer Software, mit der es möglich war, die Fläche der Zellkultur nach einem standardisierten Muster auszuzählen und sicherzustellen, dass keine Zelle doppelt gezählt oder ausgelassen wurde.

## Diskussion

Die Größenbestimmung der Zellen gelang mithilfe der Messung des Umfangs, also der zweidimensionalen Fläche. Die Flächen der Zellen wurden vom Untersucher per Hand umfahren und von einer Software berechnet. Der Rückschluss der Fläche der Zelle auf die dreidimensionale Größe wird in diesem Fall vorausgesetzt und ist durchaus legitim, da es sich um einen systematisch zufällig ausgewählten Anschnitt handelt. Außerdem wurden in beiden Gruppen mehr als 1000 Zellen ausgewertet, sodass Abweichungen vernachlässigbar klein wurden.

### 5.1.2 Mitochondriales Membranpotential

Das mitochondriale Membranpotential kann mit verschiedenen Indikatorfarbstoffen gemessen werden. Das hier verwendete JC-1 Assay hat den Vorteil, dass der Einfluss des Plasmamembranpotentials gering ist. [71] Durch den Einsatz von Valinomycin als Kalium-Ionophore wird in jeder Messung eine Kontrolle durchgeführt, die als Referenz der Extinktionen gilt. Die Absoluten Werte der Extinktionsmessung konnten nicht verwendet werden, da zwischen den Versuchstagen große Abweichungen der Absolutwerte der gleichen Versuche bestand. Eine mögliche Ursache dieser Unterschiede sind einerseits verschiedene Passagen der Zellreihen, denn mit fortgeschrittener Passage reduziert sich die Proliferationsrate und Proliferation ist eher mit einer Hyperpolarisation des mitochondrialen Membranpotentials verknüpft. Außerdem könnten die gemessenen Werte auch mit der Charge des JC-1 Farbstoffs variieren, da dieser lichtempfindlich ist. Um dem Problem bei der Auswertung zu begegnen wurde Vergleichbarkeit geschaffen indem jeder Versuch eine Kontrollmessung ohne Behandlung der Zellen beinhaltete, der dann als jeweiliger Referenzwert genutzt wurde. Für den Versuch wurden Zellen in einer bestimmten Konzentration ausgesät um ebenfalls Vergleichbarkeit zu schaffen. Die Zellreihen zeigten jedoch verschiedene Proliferationsraten, sodass am Tag der Messung durchaus Unterschiede der Zelldichte zu erkennen waren. Deshalb wurden die Werte der Membranpotentialmessung mithilfe der Proteinmessung normiert.

Eine weitere Limitation der Studie ist die geringe Anzahl der getesteten Zellreihen. Da es sich bei der PFBC um eine seltene Krankheit handelt, standen für diesen Versuch nur insgesamt vier verschiedene Fibroblastenzellreihen zur Verfügung, die nochmal unterteilt wurden in je zwei Patienten mit einer nonsense-Mutation und zwei Patienten mit einer missense-Mutation.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Osteoklasten

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Osteoklastendifferenzierung aus murinen Milzmonozyten durch eine Funktionseinschränkung im *Pdgfb*-Gen signifikant verringert ist. Hierbei handelt es sich um einen neuen Ansatz in Bezug auf die Pathophysiologie der *PDGFB*-Mutationen. Zum einen ist bisher nicht beschrieben, dass *PDGFB*-Mutationen mit Funktionsverlusten eine direkte Bedeutung für die Osteoklastengnese darstellen. Bezogen auf die hier untersuchte Erkrankung PFBC ist zum anderen bisher auch nicht beschrieben, dass die Osteoklastenfunktion oder – differenzierung eingeschränkt ist.

Im Folgenden soll dieses Ergebnis im Kontext bestehender Literatur auf ihre Plausibilität überprüft werden.

Bekannt ist, dass sowohl Monozyten, als auch Makrophagen den PDGF-Rezeptor- $\beta$  besitzen. Dies ist der Interaktionspartner des gleichnamigen PDGF-B Liganden, der ebenfalls von Makrophagen synthetisiert werden kann. [28] Die Grundsätzlichen Voraussetzungen sind also gegeben. Es ist bei den Ergebnissen dieser Arbeit anzunehmen, dass PDGF-B Signale auf den entsprechenden PDGF-R- $\beta$  eine zusätzliche Stimulation für die Osteoklastendifferenzierung neben M-CSF und RANKL darstellt.

Die wichtigsten bisher beschriebenen Faktoren der Osteoklastengnese sind M-CSF und RANKL als Stimulatoren und Osteoprotegrin (OPG) als Inhibitor der Osteoklastenreife. [76] Im Hinblick auf Osteoblasten ist PDGF-B als Modulator auch bekannt. Synthetisiert von Knochenzellen stimuliert es die Osteoblastenproliferation und inhibiert die Bildung der Knochenmatrix. [77] In diesem Zusammenhang ist außerdem bemerkenswert, dass die Kommunikation zwischen Osteoklasten und Osteoblasten ebenfalls über PDGF-B erfolgt. Reife Osteoklasten synthetisieren PDGF-B und kontrollieren so die Chemotaxis der Osteoblasten. [78] Die Kontrolle über die Bildung von Osteoklasten geht in vivo von den Osteoblasten aus. Sie bilden die wichtigen Faktoren M-CSF, RANKL, und OPG [77]. Dadurch entsteht im gesunden Knochen ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Knochen, das durch Blockierung von Rezeptoren oder die Abwesenheit von Liganden gestört werden kann.

Erste Hinweise, dass PDGF-B die Osteoklastenreifung quantitativ beeinflusst brachten Untersuchungen des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib. Durch die Behandlung mit diesem

## Diskussion

Medikament bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) zeigten sich als Langzeitfolgen Veränderungen der Knochenparameter. Erstens erhöhte sich bei den Patienten die Knochendichte und zweitens zeigte sich bei Patienten der Calcium- und Phosphathaushalt verändert. [79]

Darüber hinaus zeigen in-vitro Studien zu Imatinib ganz ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit. Anzahl und Aktivität von Osteoklasten nach Genese in der Zellkultur aus humane Blut-Monozyten, sowie aus primären Knochenmarkszellen bei Ratten waren in Anwesenheit von Imatinib signifikant reduziert. [80][81]

Einschränkend bleibt, dass Imatinib als Tyrosin-Kinase-Inhibitor nicht nur den PDGFR, sondern auch c-fms (Rezeptor für M-CSF) und c-kit (Rezeptor für CSF) inhibiert, die ebenfalls Schaltstellen der Osteoklastenreifung darstellen.

Währenddessen ist bereits nachgewiesen, dass die Aktivität reifer Osteoklasten durch externes PDGF-B positiv regulierbar ist. [82] [83] Dabei wurde die Untersuchung an reinem Osteoklastenmedium durchgeführt, sodass ebenfalls eine Interaktion mit Osteoblasten nicht vorhanden war. Im Unterschied wurde hier ein Medium mit bereits differenzierten Osteoklasten untersucht, sodass eine Aussage über die Osteoklastengenese nicht getroffen wurde.

In den Zellen der *Pdgfb<sup>ret/ret</sup>* Mäusen dieser Arbeit, liegt ein relativer Mangel an PDGF-B vor. Zwar wurde hier nicht die Osteoklastenaktivität, sondern die Anzahl und Größe der Osteoklasten gemessen, aber die Osteoklastenaktivität geht auch mit Anzahl und Größe einher. [84]

Schließlich konnte ähnliches Ergebnis auch für die Osteoklastengenese mit einer externen Stimulation durch PDGF-B erzielt werden. [52] Li et al. kultivierten Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen und eine murine Monozyten-Makrophagen-Zelllinie und führten eine Osteoklastendifferenzierung in einem ähnlichen Ablauf durch, wie es in dieser Arbeit beschrieben ist. Sie konnten eine von PDGF-B dosisabhängige Steigerung der Anzahl der Osteoklasten nach Ende der Differenzierung feststellen. Des Weiteren ließ sich der Effekt durch eine Inhibierung des PDGF-R- $\beta$  mittels direktem PDGF-R- $\beta$ -Blocker (AG1295) verhindern. Diese Untersuchungen konnte außerdem zeigen, dass PDGF-B Stimulation *nuclear factor of activated T-cells 1* (NFATc 1) erhöht. [52] NFATc1 ist einer der wichtigsten bisher bekannten Transkriptionsfaktoren der Osteoklastengenese. Bemerkenswert ist, dass in den o.g. Versuchen eine Zugabe von PDGF-Rezeptor- $\beta$  Blockern keine verminderte Osteoklastenreifung gegenüber der Kontrolle, sondern nur gegenüber der externen Stimulation mit PDGF-B erzeugt hat. Dabei handelt es sich nicht um eine

## Diskussion

Auswertung der Autoren und sollte in der Zukunft in einem dafür vorgesehenen Versuchsaufbau erneut evaluiert werden.

Ein Beispiel für endogen veränderte PDGF-Expression ist beim Prostatakarzinoms zu finden. Dessen Zellen weisen eine gesteigerte PDGF-D Konzentration auf. PDGF-D ist neben PDGF-B, der zweite wichtige Ligand von PDGF-R- $\beta$ . Die ossären Metastasen mit ihren osteolytische Komponenten werden durch erhöhte Osteoklastenaktivität hervorgerufen.

In Versuchen (aus [85]) konnte gezeigt werden, dass erhöhte PDGF-D Expression die Differenzierung von Osteoklasten in einer Kultur aus Vorläuferzellen ebenfalls erhöht.

Huang et al. postulieren, dass PDGF-D sogar allein, ohne RANKL die Differenzierung der Osteoklasten aus Pre-Osteoklasten bewirken kann. Dazu wurde die Wirkung von RANKL mit Hilfe von Osteoprotegerin (OPG) blockiert. Damit wird gezeigt, dass alleinige Veränderung der PDGF-Stimulation die Osteoklastenreife verändert. Gleiches müsste dann auch für Mutationen im PDGF-Rezeptor gelten und sollte in der Zukunft geprüft werden. Neben der einfachen Anzahl der differenzierten Osteoklasten wurde außerdem auch die Veränderung von dem NFATc 1 durch PDGF-D untersucht. Dieser wurde bisher in RANKL/RANK induzierten Osteoklastendifferenzierungen untersucht. Auch NFATc1 konnte allein durch PDGF-D Stimulation auf Pre-Osteoklasten erhöht werden. Sodass zusammenfassend Huang et al. im Vergleich zu dieser Arbeit zusätzlich evaluiert haben, dass PDGF-D nicht über RANKL stimuliert aber dennoch den Transkriptionsfaktor NFATc1 erhöht, obwohl NFATc1 bisher nur bei einer durch RANKL/RANK stimulierten Osteoklastengenese erhöht werden konnte.

Die zitierten Arbeiten zeigen allesamt eine Steigerung der Osteoklastengenese durch ein Plus an PDGF-B Stimulation. Im Gegensatz dazu ist in der hier vorgelegten Arbeit eine Reduktion der Osteoklastengenese durch einen PDGF-B Mangel eingetreten.

Es wird davon ausgegangen, dass das Protein des *Pdgfb*<sup>ret</sup>-Allels, zwar in Funktion gleich ist, aber durch seine ausbleibende Retention praktisch ein relativer Mangel an PDGF-B vorliegt. Dass dieser Mangel zu der Reduktion in Osteoklastenzahl und Osteoklastengröße nach standardisierter Osteoklastengenese führt erscheint im Vergleich mit bestehender Literatur plausibel. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass dieser Pfad in Patienten der PFBC gestört ist und ein Baustein zur Entstehung der Verkalkungsprozesse sein könnte.

Außerdem scheint die PDGF-B Stimulation über den dazugehörigen Rezeptor (PDGF-R- $\beta$ ) zu funktionieren, sodass eine Mutation den Rezeptor betreffend ebenfalls zur Alteration der Osteoklastenreifung führen sollte.

Aufgrund der bekannten PDGF-B Synthese von Osteoklasten selbst [86] und auch Makrophagen ist mindestens für die Situation der Zellkultur mit Monozyten ohne Kontakt zu Knochen oder Knochen-bildenden Zellen eine parakrine Stimulation der Osteoklasten bzw. dessen Vorläuferzellen denkbar. So lässt sich erklären, wie die die Reduktion der Reifung bei der Mutation mit dem Funktionsverlust des *PDPFB* zu Stande kommt.

### 5.2.2 Membranpotential

Gesteigertes mitochondriales Membranpotential erhöht die Apoptoseresistenz und umgekehrt reduziert sich das mitochondriale Membranpotential im Rahmen der Apoptose und kann als indirekter Marker für Apoptose im Allgemeinen gemessen werden. [87] Es sollte überprüft werden, dass die geringere Zellproliferation aus der Osteoklastengnese durch eine reduzierte Apoptoseresistenz belegt werden kann.

Als initiales Zellmodell konnten Fibroblasten genutzt werden, die sich zunächst stabiler kultivieren lassen und eine Messung des Membranpotentials ermöglichen.

In diesem Fibroblastenversuch handelt es sich um ein erstes Zellmodell, dass in der Zukunft auf andere Zelllinien wie Monozyten/Makrophagen oder sogar Osteoklasten übertragen werden sollte.

Hautfibroblasten von gesunden Kontrollpersonen und erkrankten *PDGFB*-Mutationsträgern haben in unseren Versuchen auf eine Stimulation mit externem PDGF-BB mit einem zum Teil signifikanten Abfall des mitochondrialen Membranpotentials reagiert. Erwartet wurde eine Steigerung des Membranpotentials, somit wurde mit vorliegendem Ergebnis die Arbeitshypothese wiederlegt.

Festzuhalten bleibt, dass durch den gemessenen Abfall des Membranpotentials ein Effekt eingetreten ist und dieser bei Fibroblasten der Träger von Mutation in *PDGFB* höher ausfällt als bei gesunden Fibroblasten. Zudem zeigt sich durch eine Blockierung des Effekts mit Imatinib (Rezeptortyrosinkinaseinhibitor) eine Abhängigkeit von der PDGF- $\beta$ -Rezeptor Interaktion.

In einem zu dieser Arbeit ähnlichem Versuchsaufbau (mit anderer Messmethode des mitochondrialen Membranpotentials) wurde in Kulturen mit glatten Gefäßmuskelzellen eine Stimulation mit PDGF durchgeführt und die Veränderung des Membranpotentials gemessen. In diesem Kontext konnte die erwartete Hyperpolarisierung und damit Apoptoseresistenz durch Stimulation nachgewiesen werden. [72] In einer Kooperation mit dieser Arbeitsgruppe wurde dann statt den SMCs auch Fibroblasten in jenen Versuchsaufbau

## Diskussion

eingebettet. Es zeigte ich dabei eine Steigerung des mitochondrialen Membranpotentials in gesunden Fibroblasten aber auch hier ein geringeres Membranpotential für Fibroblasten von Mutationsträgern im *PDGFB*-Gen nach Stimulation mit PDGF-B. Das bedeutet, dass hier relativ gesehen ein ähnliches Ergebnis vorliegt.

Dieses Ergebnis lässt mehrere Interpretationen zu. Wenn ein Effekt von extern zugeführtem PDGF-B in Fibroblastenkulturen höher bzw. signifikant gegenüber Kulturen von gesunden Zellen ist, scheinen Fibroblasten in diesem Setting PDGF-B zu produzieren. Es ist davon auszugehen, dass durch die Mutationen im *PDGFB* weniger oder kein PDGF zur parakrinen Stimulation der Fibroblasten zur Verfügung steht. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen aus einer Studie in der der PDGF-B Gehalt im Zellkulturmedium von Endothelzellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen mit *PDGFB*-Mutationen gemessen wurde. [88] Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Reduktion des PDGF-BB Gehalts im Zellkulturmedium im Vergleich zu nicht-Mutationsträgern. Außerdem wurde in jener Studie eine signifikante Reduktion vom PDGF-B Gehalt im Blutserum von Patienten gemessen.

Eine Reduktion von PDGF-B im Medium der mutationstragenden Fibroblastenkulturen ist mit gängiger Meinung aus Literatur und Forschung konform.

Wenn man davon ausgeht, dass ein Mangel an PDGF-B vorliegt, erwartet man eine Steigerung des Membranpotentials, wenn man PDGF-BB hinzufügt. Erstaunlich und unerwartet ist aber, dass Membranpotential in den mutationstragenden Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert ist, obwohl PDGF-BB im Überschuss substituiert wurde.

Andrea et al. 2008 beispielsweise diskutiert die Rolle von PDGF und VEGF für Oligodendrozyten oder Perizyten. Sie postulierten, dass die Zellen ohne Wachstumsstimulatoren zu Apoptose neigen.

Diese Ergebnisse sind nicht einheitlich und teilweise konträr, sodass eine abschließende Interpretation schwerfällt. Bemerkenswert ist, dass es sich um Mutationen im *PDGFB* handelt und eigentlich der PDGF-R- $\beta$  ohne Mutation ist, sodass eine Stimulation mit PDGF-B nicht beeinträchtigt sein sollte.

Alle Ergebnisse haben gemeinsam, dass bei den mutationstragenden Fibroblasten auch nach Stimulation mit PDGF-B eine Hyperpolarisation ausbleibt oder sogar eine verstärkte Hypopolarisation eintritt. Damit zeigen diese Zellen a priori eine geringere Apoptoseresistenz bzw. sind geringere Proliferationsraten zu erwarten.

## Diskussion

Ließe sich diese Vermutung auf andere Zelltypen übertragen wie zum Beispiel auf Monozyten, Makrophagen oder Osteoklasten könnte durch eine geringere Proliferation auch die reduzierte Anzahl an Osteoklasten nach Differenzierung aus Monozyten erklärt werden. Darüber hinaus könnte eine ausgeprägtere Entzündungsreaktion und ein geringerer Kalkabbau an den Stellen der Gehirnverkalkung ausgelöst sein und trägt so zur Krankheitsentstehung der PFBC bei.

## 5.3 Fazit

Mit der neu aufgestellten Theorie, dass Osteoklastenfunktion einen Faktor des Pathomechanismus der Gehirnverkalkungen bei der PFBC darstellen und mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, dass *PDGFB*-Mutation zu einer verminderten Osteoklastenreifung und –funktion führen ergeben sich viele neue Fragen und es eröffnet sich ein weiterer Raum für Überlegungen zu den pathologischen Faktoren der Krankheit.

Osteoklasten sind bisher mit Knochen und den Knochen betreffende Krankheiten in Verbindung gebracht worden. Wenn Osteoklasten verantwortlich für Gehirnverkalkungen sein sollen, muss geklärt sein ob sich diese Zellen im Gehirn befinden können und ob Sie räumlich mit den Verkalkungen zusammenhängen.

In dieser Arbeit konnten CD68-positive Zellen im Gehirn von Mäusen, direkt anliegend an den Verkalkungen, nachgewiesen werden. Das Glycoprotein CD68 ist Bestandteil der Osteoklasten, aber kein spezifischer Marker. Es findet sich auch auf anderen zur Monozyten-Makrophagen Zelllinie gehörenden Zellen wie Langerhans Zellen oder dendritischen Zellen. [89] Diese Information ist aber trotzdem sehr wertvoll, da bekannt ist, dass Osteoklasten oder, wie im Experiment, Osteoklasten-ähnliche-Zellen eben aus diesen Monozyten/Makrophagen differenzieren. Hinzu kommt, dass die Knochen-ähnlichen Kalkablagerungen einen Stimulus zur Osteoklastendifferenzierung aus Makrophagen darstellen. [86]

Einen Schritt weiter gehen die Ergebnisse einer aktuellen Studie von Zarb et al., in der weitere Osteoklasten- und Osteoblastenmarker im Gehirn von PFBC-Mäusen nachgewiesen werden konnten. [90] Hierbei handelt es sich um Osteokalzin, einen spezifischen Marker für Osteoblasten und cathepsin-K und RANK als spezifischen Marker für Osteoklasten. Letztere befanden sich in unmittelbarer Umgebung zu den Kalkfoci. Auch Zarb et al. ist es nicht gelungen Osteoklasten selbst, also TRAP-positive, mehrkernige Zellen im Gehirn

## Diskussion

nachzuweisen, sodass eine letzte Unsicherheit bleibt, doch mit o.g. Nachweisen ist ein Vorkommen von zumindest Osteoklasten-ähnlichen Zellen im Gehirn wahrscheinlich.

Simultan zu diesen Ergebnissen wurden Nachweise erbracht, dass Osteoklasten auch an anderen Stellen außerhalb des Knochens zu finden sind. Prominentestes Beispiel sind atherosklerotische Plaques, die ebenfalls Kalzifizierungen aufweisen. Qiao et al. berichten über das Vorkommen von mehrkernigen, TRAP-positive Riesenzellen in der Umgebung von artherosklerotischen Läsionen mit dem Nachweis von CD68, RANK, cathepsin-K und OPG in diesen Zellen. [91] Mit diesen Ergebnissen nimmt man ebenfalls an, dass diesen Osteoklasten-ähnlichen-Zellen für ein Gleichgewicht zwischen Verkalkungsab- und -aufbau in atherosklerotischen Plaques eine wichtige Rolle spielen.

Weitere Studien zeigen das Vorkommen von RANKL auch in anderen Geweben wie Lunge oder Thymus.[60] Außerdem konnte gezeigt werden, dass Osteoklasten in vitro auch aus Gewebsmakrophagen, z.B. aus Alveolarmakrophagen differenziert werden konnten. [53]

Mit dieser Aussage würde man vermuten, dass Patienten bzw. Mäuse mit einem Funktionsverlust bzw. hypofunktionellen *PDGFB*-Gen nicht nur Verkalkungen im Gehirn, sondern auch an anderen Stellen im Weichgewebe, wie zum Beispiel an Prädilektionsstellen für Artherosklerose der Gefäße, vermehrte Verkalkungen und vor allem eine veränderte Knochenstruktur aufweisen.

Bisher sind alle beschriebenen krankhaften Veränderungen bei der PFBC auf das Gehirn bzw. die Psyche beschränkt. Erste Hinweise ergeben sich aus einer neueren Arbeit bei der über Auffälligkeiten in Hautbiopsien berichtet wurde. Dabei fand man in den Biopsien von Patienten der PFBC mit je einer *PDGFB* und einer *XPRI*-Mutation Mikroangiopathien mit Mikroverkalkungen in der Basallamina und den Perizyten der Kapillaren. [92]

Tatsächlich werden auch Skelettanomalien bei der PFBC berichtet. Einschränkend handelt es sich hierbei bisher nur um Fälle von PFBC bei genetischen Veränderungen in *XPRI*. Von Meireless et al. wurde berichtet, dass Zebrafische mit einer loss-of function-Mutation in *XPRI* insgesamt kleiner sind und vertebrale Anomalitäten sowie größeres Knochenvolumen insgesamt aufweisen. Darüber hinaus wird berichtet, dass *XPRI* in Zebrafischen eine wichtige Funktion für die Entwicklung von gewebespezifischen Makrophagen wie der Mikroglia hat und schließen daher, dass der osteopetrotische Phänotyp der Tiere durch eine Osteoklastendysfunktion, die auch gewebespezifische Makrophagen darstellen, verursacht ist. [12]

Nicht nur die Skelettanomalien aus dieser Veröffentlichung sind interessant in Bezug auf die Ergebnisse aus dieser Arbeit, denn mit den Ergebnissen, dass *XPRI* auch

## Diskussion

Makrophagendifferenzierung beeinflusst ließe sich an dieser Stelle eine Verbindung der verschiedenen Mutationen der PFBC herstellen.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse untersuchten Zarb et al. *Pdgfb<sup>ret/ret</sup>* Mäuse mittels Mikro-CT auf Kalzifizierungen außerhalb des Gehirns. Hierbei konnten weder skeletalen Anomalitäten noch Weichgewebsskalzifizierungen und Verkalkungen der Aorta oder der Femoralarterien gesehen werden. [90]

Festhaltend an der These, dass Osteoklastendifferenzierung in eben diesen Mäusen gestört ist, wäre es gut möglich, dass in der Knochenstruktur keine Auffälligkeiten ersichtlich werden, da die Interaktion von Knochen-bildende und Knochen-abbauenden Zellen sehr eng ist, sie zum Teil auch PDGFB gesteuert ist und auch die Osteoblastenaktivität PDGFB abhängig ist. Es ist vorstellbar, dass dadurch im Hinblick auf die Knochenarchitektur trotz des hypomorphen *PDGFB*-Allels ein Gleichgewicht zwischen diesen Zellen entstanden ist, sodass Knochenauf- und abbau im Gleichgewicht sind und größere Auffälligkeiten verhindert werden.

Die veränderte Osteoklastenfunktion ist nur eines von vielen Ergebnissen der Forschung rund um die PFBC bei *PDGFB/PDGFRB* -Mutationen. Bis jetzt besitzt nach wie vor die dysfunktionelle BHS als Hauptfaktor des Pathomechanismus die größte Akzeptanz. Wenngleich genauere Untersuchungen zeigten, dass die perivaskulären Verkalkungen eher an Stellen zu finden sind, die eine relativ gut ausgeprägte BHS aufweisen. [17] Trotzdem bleibt erstens, dass die Verkalkungen in unmittelbarer Nähe zu Gefäßen auftreten und zweitens, dass der *PDGFB*-knockout in den Endothelzellen ursächlich für die Verkalkungen ist. [16] Die Endothelzelle ist ein Teil der NVU, zu der auch die Perizyten, Mikroglia, die Astrozyten und natürlich die Neuronen zählen. Hierhin führen alle bisher gefunden Genmutationen. Im Falle der *PDGFB/PDGFRB* Mutationen wissen wir von einer reduzierten Perizytenrekrutierung [22], [24] und, wie hier beschrieben, von einer reduzierten Differenzierung der Osteoklasten aus Makrophagen/Mikroglia. Osteoklasten werden allerdings erst dann nötig, wenn eine Verkalkung eintritt. Somit wird klar, dass wenn die Osteoklastenfunktion eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielt, hier nicht der Auslöser der Erkrankung zu finden ist, sondern nur ein Teil eines multifaktoriellen Geschehens.

## 5.4 Ausblick

Es wurde am Tiermodell mit *Pdgfb<sup>ret/ret</sup>* – Mäusen gezeigt, dass die Differenzierung der Osteoklasten aus murinen Milzmonozyten gestört ist. Nun bleibt in einem ersten Schritt zu überprüfen, ob diese Ergebnisse für Patienten der PFBC mit einer *PDGFB*-Mutation reproduzierbar sind. Dazu wurde bereits ein Protokoll etabliert, dass Osteoklasten-ähnliche Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes differenziert (PBMC). Ein Problem welches darüber hinaus aber weiterhin besteht ist, dass die Blutproben der Patienten einen zu langen Transportweg haben, um in ein und demselben Labor untersucht zu werden. Hierfür gilt es eine Lösung zu finden um die These weiter zu verfolgen.

In einem nächsten Schritt wird es notwendig sein, die Rolle der Osteoklasten in dem Prozess der Verkalkung zu bestimmen. Angenommen, dass die Funktion der Osteoklasten erst dann zum Tragen kommt, wenn eine Verkalkung bereits entstanden ist, muss geklärt werden, welche initialen Prozesse für die Anhäufung der Kalkherde von Bedeutung sind. Hierbei spielen entzündliche Prozesse mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle.

Die PFBC insgesamt betrachtet, untersucht diese Arbeit den Funktionsverlust im *PDGFB*-Gen. Hierdurch wird in einem Zuge auch der Funktionsverlust des PDGF-Rezeptors untersucht. Übrig bleiben noch vier weitere Gene sowie ein Anteil an PFBC-Patienten mit noch unbekanntem Mutationen. *SLC20A2* Mutationen sind bisher die häufigsten Mutationen bei der PFBC. Sie führen zu einem Funktionsverlust des Phosphattransporter PiT2, der nach neuestem Erkenntnis für die Phosphatthomöostase des Liquors verantwortlich ist. Steigender Phosphatgehalt im Liquor sorgt bei den SMCs, die auch ohne PiT2 ausgestattet sind, für eine erhöhte Empfindlichkeit für eine Kalzifizierung. [93]

Bei der *XPR1*-Mutation ist der Phosphathaushalt ebenfalls gestört, genauer gesagt ist der Phosphatexport aus der Zelle reduziert, sodass es zur Akkumulation von Calciumphosphat in der Zelle kommen kann. [9] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *XPR1* und PDGF-R- $\beta$  einen Komplex bilden, sodass wahrscheinlich auch die Ergebnisse aus den Untersuchungen zu *PDGFB/PDGFRB* auch für *XPR1* zu überprüfen sind. Gezeigt wurde, wie bereits erwähnt, dass Zebrafische mit einer *XPR1* Mutation einen osteopetrotischen Phänotyp aufweisen [12], sodass es zukünftig auch interessant wäre, die Osteoklastenreifung oder die Perizytenfunktion und Ausbildung der BHS in einer *XPR1* Mutation zu untersuchen.

*JAM2* würde sich pathophysiologisch in die Ausbildung der BHS einreihen, da es für die Bildung der tight-junctions von Endothelzellen benötigt wird.

## Diskussion

MYORG scheint aufgrund seiner relativ exklusiven Expression in Astrozyten zu deren Dysfunktion zu führen.[13] Astrozyten sind ebenfalls Zellen der NVU, ihre Funktion bei der PFBC ist bisher noch nicht weiter aufgefallen.

Eine zukünftige Forschung bezüglich dieser Zellen und Aufklärung der bislang noch ungeklärten Gene, die ursächlich sind für die PFBC wäre hilfreich für ein vollständiges Verständnis der Pathomechanismen der PFBC.

## 6 Zusammenfassung

**Zielstellung:** In dieser Arbeit sollten Erkenntnisse gewonnen werden, welche Rolle die Osteoklastendifferenzierung bei der humanen Erkrankung der primären familiären Gehirnkalkifizierung (PFBC) spielt. Dafür wurde auf ein Mausmodell zurückgegriffen, bei dem hypomorphe *Pdgfb* Allele vorliegen. *PDGFB* ist eins von bisher sechs bekannten Genen, bei dem eine Mutation das ursächlich für die Entwicklung der PFBC ist.

Darüber hinaus sollte geprüft werden, inwieweit eine *PDGFB*-Mutation Einfluss auf die Apoptoseresistenz von Zellen hat, die indirekt anhand der Veränderung des mitochondrialen Membrandpotentials gemessen wurde.

**Material und Methoden:** Milzmonozyten von Mäusen mit dem *Pdgfb*<sup>ret/ret</sup> Gen und von Wildtyp-mäuse wurden kultiviert und zur Osteoklastenreifung mittels M-CSF und RANKL stimuliert. Osteoklastenzahl und -größe wurden nach Abschluss der Osteoklastendifferenzierung ausgezählt bzw. ausgemessen. Bezüglich der Apoptoseresistenz wurden Fibroblastenkulturen von Patienten mit missense- und nonsense-Mutation für *PDGFB* sowie von Kontrollpersonen angelegt und das mitochondriale Membranpotential nach Stimulation mit PDGF-BB untersucht.

**Ergebnisse:** Bei der Osteoklastendifferenzierung zeigte sich, dass die Reifung aus Monozyten von *Pdgfb*<sup>ret/ret</sup> Mäusen hinsichtlich Anzahl und Größe signifikant reduziert war. Bezogen auf das Membranpotential zeigten Fibroblasten der PFBC-Patienten eine signifikant verringerte Apoptoseresistenz der PFBC-Patienten nach Stimulation mit PDGF-BB. Außerdem war dieser Effekt blockierbar durch einen Tyrosinkinaseinhibitor.

**Schlussfolgerung:** Durch die gefundenen Unterschiede der Kapazität der Osteoklastenreifung konnte die Hypothese gestützt werden, dass die Verkalkung im Gehirn der betroffenen Patienten mit einer reduzierten Differenzierung der Osteoklasten korreliert. Dies könnte einen neuen Pathomechanismus zeigen. Im Gehirn der betroffenen Mäuse konnten Osteoklasten-ähnliche Zellen am Rand der Verkalkungen nachweisen werden. Eine mögliche Ursache für die reduzierte Osteoklastenzahl und der Entstehung der Kalkherde selbst ist eine verringerte Apoptoseresistenz von Osteoklasten oder anderen Zelltypen, die die Entstehung der Kalkherde begünstigen.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] A. Balck *u. a.*, „Genotype–Phenotype Relations in Primary Familial Brain Calcification: Systematic MDSGENE Review“, *Mov. Disord.*, Bd. 36, Nr. 11, S. 2468–2480, Nov. 2021, doi: 10.1002/mds.28753.
- [2] V. Tadic, A. Westenberger, A. Domingo, D. Alvarez-Fischer, C. Klein, und M. Kasten, „Primary Familial Brain Calcification With Known Gene Mutations: A Systematic Review and Challenges of Phenotypic Characterization“, *JAMA Neurol.*, Bd. 72, Nr. 4, S. 460, Apr. 2015, doi: 10.1001/jamaneurol.2014.3889.
- [3] A. Yalcin, M. Ceylan, O. F. Bayraktutan, A. R. Sonkaya, und I. Yuce, „Age and gender related prevalence of intracranial calcifications in CT imaging; data from 12,000 healthy subjects“, *J. Chem. Neuroanat.*, Bd. 78, S. 20–24, Dez. 2016, doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.07.008.
- [4] H. Förstl, B. Krumm, S. Eden, und K. Kohlmeyer, „Neurological disorders in 166 patients with basal ganglia calcification: a statistical evaluation“, *J. Neurol.*, Bd. 239, Nr. 1, S. 36–38, 1992, doi: 10.1007/BF00839209.
- [5] G. Nicolas, C. Charbonnier, D. Champion, und J. A. Veltman, „Estimation of minimal disease prevalence from population genomic data: Application to primary familial brain calcification“, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, Bd. 177, Nr. 1, S. 68–74, Jan. 2018, doi: 10.1002/ajmg.b.32605.
- [6] A. Westenberger und C. Klein, „The Genetics of Primary Familial Brain Calcifications“, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, Bd. 14, Nr. 10, S. 490, Okt. 2014, doi: 10.1007/s11910-014-0490-4.
- [7] A. Westenberger, A. Balck, und C. Klein, „Primary familial brain calcifications: genetic and clinical update“, *Curr. Opin. Neurol.*, Bd. 32, Nr. 4, S. 571–578, Aug. 2019, doi: 10.1097/WCO.0000000000000712.
- [8] C. Wang *u. a.*, „Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis“, *Nat. Genet.*, Bd. 44, Nr. 3, S. 254–256, Feb. 2012, doi: 10.1038/ng.1077.
- [9] A. Legati *u. a.*, „Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export“, *Nat. Genet.*, Bd. 47, Nr. 6, S. 579–581, Mai 2015, doi: 10.1038/ng.3289.

- [10] D. Giovannini, J. Touhami, P. Charnet, M. Sitbon, und J.-L. Battini, „Inorganic Phosphate Export by the Retrovirus Receptor XPR1 in Metazoans“, *Cell Rep.*, Bd. 3, Nr. 6, S. 1866–1873, Juni 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.035.
- [11] X.-P. Yao u. a., „Analysis of gene expression and functional characterization of XPR1: a pathogenic gene for primary familial brain calcification“, *Cell Tissue Res.*, Bd. 370, Nr. 2, S. 267–273, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00441-017-2663-3.
- [12] A. M. Meireles, C. E. Shiau, C. A. Guenther, H. Sidik, D. M. Kingsley, und W. S. Talbot, „The Phosphate Exporter *xpr1b* Is Required for Differentiation of Tissue-Resident Macrophages“, *Cell Rep.*, Bd. 8, Nr. 6, S. 1659–1667, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.018.
- [13] X.-P. Yao u. a., „Biallelic Mutations in MYORG Cause Autosomal Recessive Primary Familial Brain Calcification“, *Neuron*, Bd. 98, Nr. 6, S. 1116–1123.e5, Juni 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.037.
- [14] L. V. Schottlaender u. a., „Bi-allelic JAM2 Variants Lead to Early-Onset Recessive Primary Familial Brain Calcification“, *Am. J. Hum. Genet.*, Bd. 106, Nr. 3, S. 412–421, März 2020, doi: 10.1016/j.ajhg.2020.02.007.
- [15] S. Tietz u. a., „Lack of junctional adhesion molecule (JAM)-B ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis“, *Brain. Behav. Immun.*, Bd. 73, S. 3–20, Okt. 2018, doi: 10.1016/j.bbi.2018.06.014.
- [16] A. Keller u. a., „Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice“, *Nat. Genet.*, Bd. 45, Nr. 9, S. 1077–1082, Aug. 2013, doi: 10.1038/ng.2723.
- [17] M. Vanlandewijck u. a., „Functional Characterization of Germline Mutations in PDGFB and PDGFRB in Primary Familial Brain Calcification“, *PLOS ONE*, Bd. 10, Nr. 11, S. e0143407, Nov. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0143407.
- [18] J. Andrae, R. Gallini, und C. Betsholtz, „Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine“, *Genes Dev.*, Bd. 22, Nr. 10, S. 1276–1312, Mai 2008, doi: 10.1101/gad.1653708.
- [19] G. Nicolas u. a., „Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification“, *Neurology*, Bd. 80, Nr. 2, S. 181–187, Jan. 2013, doi: 10.1212/WNL.0b013e31827ccf34.
- [20] Y. Ishii u. a., „Mouse brains deficient in neuronal PDGF receptor-beta develop normally but are vulnerable to injury“, *J. Neurochem.*, Bd. 98, Nr. 2, S. 588–600, Juli 2006, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03922.x.

- [21] M. Sanchez-Contreras *u. a.*, „Genetic Screening and Functional Characterization of *PDGFRB* Mutations Associated with Basal Ganglia Calcification of Unknown Etiology“, *Hum. Mutat.*, Bd. 35, Nr. 8, S. 964–971, Aug. 2014, doi: 10.1002/humu.22582.
- [22] A. Armulik *u. a.*, „Pericytes regulate the blood–brain barrier“, *Nature*, Bd. 468, Nr. 7323, S. 557–561, Nov. 2010, doi: 10.1038/nature09522.
- [23] V. Tadic, A. Westenberger, A. Domingo, D. Alvarez-Fischer, C. Klein, und M. Kasten, „Primary familial brain calcification with known gene mutations: a systematic review and challenges of phenotypic characterization“, *JAMA Neurol.*, Bd. 72, Nr. 4, S. 460–467, 2015.
- [24] C. Betsholtz und A. Keller, „PDGF, Pericytes and the Pathogenesis of Idiopathic Basal Ganglia Calcification (IBGC): PDGF, Pericytes and the Pathogenesis of IBGC“, *Brain Pathol.*, Bd. 24, Nr. 4, S. 387–395, Juli 2014, doi: 10.1111/bpa.12158.
- [25] M. H. Daghighi, V. Rezaei, S. Zarrintan, und H. Pourfathi, „Intracranial physiological calcifications in adults on computed tomography in Tabriz, Iran“, *Folia Morphol.*, Bd. 66, Nr. 2, S. 115–119, 2007.
- [26] G. Seifert, „Heterotope (extraossäre) Verkalkung (Kalzinose) Ätiologie, Pathogenese und klinische Bedeutung“, *Pathol.*, Bd. 18, Nr. 6, S. 430–438, 1997.
- [27] C. Busch, A. Wasteson, und B. Westermark, „Release of a cell growth promoting factor from human platelets“, *Thromb. Res.*, Bd. 8, Nr. 4, S. 493–500, Apr. 1976.
- [28] C.-H. Heldin und B. Westermark, „Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor“, *Physiol. Rev.*, Bd. 79, Nr. 4, S. 1283–1316, 1999.
- [29] M. A. Sadiq *u. a.*, „Platelet-Derived Growth Factor Inhibitors: A Potential Therapeutic Approach for Ocular Neovascularization“, in *Developments in Ophthalmology*, Bd. 55, Q. D. Nguyen, E. B. Rodrigues, M. E. Farah, W. F. Mieler, und D. V. Do, Hrsg., S. Karger AG, 2016, S. 310–316. doi: 10.1159/000438953.
- [30] C. Rolny, „Platelet-derived growth factor receptor-beta promotes early endothelial cell differentiation“, *Blood*, Bd. 108, Nr. 6, S. 1877–1886, Sep. 2006, doi: 10.1182/blood-2006-04-014894.
- [31] P. Lindahl, B. R. Johansson, P. Leveén, und C. Betsholtz, „Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice“, *Science*, Bd. 277, Nr. 5323, S. 242, Juli 1997, doi: 10.1126/science.277.5323.242.
- [32] M. Hellstrom, P. Lindahl, A. Abramsson, und C. Betsholtz, „Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse“, *Development*, Bd. 126, Nr. 14, S. 3047–3055, 1999.

- [33] R. Ohlsson *u. a.*, „PDGFB Regulates the Development of the Labyrinthine Layer of the Mouse Fetal Placenta“, *Dev. Biol.*, Bd. 212, Nr. 1, S. 124–136, Aug. 1999, doi: 10.1006/dbio.1999.9306.
- [34] P. Levéen, M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, und C. Betsholtz, „Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities.“, *Genes Dev.*, Bd. 8, Nr. 16, S. 1875–1887, 1994.
- [35] N. M. S. Van den Akker *u. a.*, „PDGF-B signaling is important for murine cardiac development: Its role in developing atrioventricular valves, coronaries, and cardiac innervation“, *Dev. Dyn.*, Bd. 237, Nr. 2, S. 494–503, Feb. 2008, doi: 10.1002/dvdy.21436.
- [36] A. Erlandsson, M. Enarsson, und K. Forsberg-Nilsson, „Immature neurons from CNS stem cells proliferate in response to platelet-derived growth factor“, *J. Neurosci.*, Bd. 21, Nr. 10, S. 3483–3491, 2001.
- [37] T. Egawa-Tsuzuki *u. a.*, „The PDGF B-chain is involved in the ontogenic susceptibility of the developing rat brain to NMDA toxicity“, *Exp. Neurol.*, Bd. 186, Nr. 1, S. 89–98, März 2004, doi: 10.1016/j.expneurol.2003.11.001.
- [38] M. P. Simon *u. a.*, „Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma“, *Nat. Genet.*, Bd. 15, Nr. 1, S. 95–98, Jan. 1997, doi: 10.1038/ng0197-95.
- [39] T. R. Golub, G. F. Barker, M. Lovett, und D. G. Gilliland, „Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation“, *Cell*, Bd. 77, Nr. 2, S. 307–316, Apr. 1994.
- [40] J. Yang *u. a.*, „Platelet-derived growth factor mediates survival of leukemic large granular lymphocytes via an autocrine regulatory pathway“, *Blood*, Bd. 115, Nr. 1, S. 51–60, Jan. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-06-223719.
- [41] K. Forsberg, I. Valyi-Nagy, C. H. Heldin, M. Herlyn, und B. Westermark, „Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 90, Nr. 2, S. 393–397, Jan. 1993.
- [42] M. Furuhashi *u. a.*, „Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate“, *Cancer Res.*, Bd. 64, Nr. 8, S. 2725–2733, Apr. 2004.
- [43] E. J. A. Steller *u. a.*, „PDGFRB promotes liver metastasis formation of mesenchymal-like colorectal tumor cells“, *Neoplasia N. Y. N.*, Bd. 15, Nr. 2, S. 204–217, Feb. 2013.

- [44] A. J. Najy, J. J. Won, L. S. Movilla, und H.-R. C. Kim, „Differential tumorigenic potential and matriptase activation between PDGF B versus PDGF D in prostate cancer“, *Mol. Cancer Res. MCR*, Bd. 10, Nr. 8, S. 1087–1097, Aug. 2012, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0071.
- [45] S. L. Friedman und M. J. Arthur, „Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 84, Nr. 6, S. 1780–1785, Dez. 1989, doi: 10.1172/JCI114362.
- [46] M. Pinzani u. a., „Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 148, Nr. 3, S. 785–800, März 1996.
- [47] J. Floege, R. J. Johnson, und W. G. Couser, „Mesangial cells in the pathogenesis of progressive glomerular disease in animal models“, *Clin. Investig.*, Bd. 70, Nr. 9, S. 857–864, Sep. 1992.
- [48] C. E. Alpers, R. A. Seifert, K. L. Hudkins, R. J. Johnson, und D. F. Bowen-Pope, „Developmental patterns of PDGF B-chain, PDGF-receptor, and alpha-actin expression in human glomerulogenesis“, *Kidney Int.*, Bd. 42, Nr. 2, S. 390–399, Aug. 1992.
- [49] B. Fellström u. a., „Platelet-derived growth factor receptors in the kidney--upregulated expression in inflammation“, *Kidney Int.*, Bd. 36, Nr. 6, S. 1099–1102, Dez. 1989.
- [50] A. Jawien, D. F. Bowen-Pope, V. Lindner, S. M. Schwartz, und A. W. Clowes, „Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 89, Nr. 2, S. 507–511, Feb. 1992, doi: 10.1172/JCI115613.
- [51] J. Tang u. a., „The absence of platelet-derived growth factor-B in circulating cells promotes immune and inflammatory responses in atherosclerosis-prone ApoE<sup>-/-</sup> mice“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 167, Nr. 3, S. 901–912, Sep. 2005, doi: 10.1016/S0002-9440(10)62061-5.
- [52] D. Li, Q. Wan, J. L. Pathak, und Z. Li, „Platelet-derived growth factor BB enhances osteoclast formation and osteoclast precursor cell chemotaxis“, *J. Bone Miner. Metab.*, Bd. 35, Nr. 4, S. 355–365, Juli 2017, doi: 10.1007/s00774-016-0773-8.
- [53] N. Udagawa u. a., „Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells.“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 87, Nr. 18, S. 7260–7264, 1990.

- [54] K. Micklem *u. a.*, „A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies“, *Br. J. Haematol.*, Bd. 73, Nr. 1, S. 6–11, Sep. 1989.
- [55] J.-M. Hou, J.-L. Lin, J.-P. Wen, L. Jin, und F.-Q. Tang, „Immunohistochemical identification of osteoclasts and multinucleated macrophages“, *Cell. Immunol.*, Bd. 292, Nr. 1–2, S. 53–56, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.cellimm.2014.09.002.
- [56] S. Takeshita, K. Kaji, und A. Kudo, „Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts“, *J. Bone Miner. Res.*, Bd. 15, Nr. 8, S. 1477–1488, 2000.
- [57] G.-Q. Yao, B. H. Sun, E. C. Weir, und K. L. Insogna, „A Role for Cell-Surface CSF-1 in Osteoblast-mediated Osteoclastogenesis“, *Calcif. Tissue Int.*, Bd. 70, Nr. 4, S. 339–346, Apr. 2002, doi: 10.1007/s00223-001-1079-x.
- [58] K. L. Insogna *u. a.*, „Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts.“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 100, Nr. 10, S. 2476–2485, Nov. 1997, doi: 10.1172/JCI119790.
- [59] D. L. Lacey *u. a.*, „Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation“, *Cell*, Bd. 93, Nr. 2, S. 165–176, Apr. 1998.
- [60] H. Yasuda *u. a.*, „Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 95, Nr. 7, S. 3597–3602, März 1998.
- [61] T. Inaba *u. a.*, „Expression of platelet-derived growth factor beta receptor on human monocyte-derived macrophages and effects of platelet-derived growth factor BB dimer on the cellular function“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 268, Nr. 32, S. 24353–24360, Nov. 1993.
- [62] T. F. Deuel, R. M. Senior, J. S. Huang, und G. L. Griffin, „Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor.“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 69, Nr. 4, S. 1046, 1982.
- [63] D. A. Goodkin und G. F. Pierce, „Role of platelet-derived growth factor in osteoblast function and bone synthesis“, *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.*, Bd. 1, Nr. 4, S. 203–212, Okt. 1993, doi: 10.1046/j.1524-475X.1993.10405.x.
- [64] D. Tibullo *u. a.*, „Effects of second-generation tyrosine kinase inhibitors towards osteogenic differentiation of human mesenchymal cells of healthy donors“, *Hematol. Oncol.*, Bd. 30, Nr. 1, S. 27–33, März 2012, doi: 10.1002/hon.988.
- [65] E. Canalis, T. L. McCarthy, und M. Centrella, „Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro“, *J. Cell. Physiol.*, Bd. 140, Nr. 3, S. 530–537, Sep. 1989,

doi: 10.1002/jcp.1041400319.

[66] E. M. Ramos, J. Oliveira, M. J. Sobrido, und G. Coppola, „Primary Familial Brain Calcification“, in *GeneReviews*(®), M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, H. C. Mefford, K. Stephens, A. Amemiya, und N. Ledbetter, Hrsg., Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993. Zugriffen: 26. November 2017. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1421/>

[67] S. Saleem u. a., „Fahr’s syndrome: literature review of current evidence“, *Orphanet J. Rare Dis.*, Bd. 8, S. 156, Okt. 2013, doi: 10.1186/1750-1172-8-156.

[68] S. DiMauro und M. Hirano, „MELAS“, in *GeneReviews*(®), M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, H. C. Mefford, K. Stephens, A. Amemiya, und N. Ledbetter, Hrsg., Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993. Zugriffen: 26. November 2017. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1233/>

[69] S. DiMauro und M. Hirano, „MERRF“, in *GeneReviews*(®), M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, H. C. Mefford, K. Stephens, A. Amemiya, und N. Ledbetter, Hrsg., Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993. Zugriffen: 26. November 2017. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1520/>

[70] S. Ito, W. Shirai, M. Asahina, und T. Hattori, „Clinical and brain MR imaging features focusing on the brain stem and cerebellum in patients with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers due to mitochondrial A8344G mutation“, *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, Bd. 29, Nr. 2, S. 392–395, Feb. 2008, doi: 10.3174/ajnr.A0865.

[71] J. D. Ly, D. R. Grubb, und A. Lawen, „The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis; an update“, *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*, Bd. 8, Nr. 2, S. 115–128, März 2003.

[72] T. Deuse u. a., „Dichloroacetate prevents restenosis in preclinical animal models of vessel injury“, *Nature*, Bd. 509, Nr. 7502, S. 641–644, Apr. 2014, doi: 10.1038/nature13232.

[73] P. Lindblom u. a., „Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall“, *Genes Dev.*, Bd. 17, Nr. 15, S. 1835–1840, Aug. 2003, doi: 10.1101/gad.266803.

[74] Y. Chabbi-Achengli u. a., „Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 109, Nr. 7, S. 2567–2572, Feb. 2012, doi: 10.1073/pnas.1117792109.

[75] C. Schiemenz u. a., „Osteoclast imbalance in primary familial brain calcification:

evidence for its role in brain calcification“, *Brain*, Bd. 143, Nr. 1, S. e1–e1, Jan. 2020, doi: 10.1093/brain/awz351.

[76] B. F. Boyce und L. Xing, „Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin“, *Arthritis Res. Ther.*, Bd. 9, Nr. 1, S. S1, 2007.

[77] R. E. Enck, F. Abushahin, und J. B. Bossaer, „Soft tissue calcification secondary to imatinib mesylate in a patient with gastrointestinal stromal tumor“, *J. Oncol. Pharm. Pract.*, Bd. 20, Nr. 2, S. 137–140, Apr. 2014, doi: 10.1177/1078155213480069.

[78] M. A. Sanchez-Fernandez, A. Gallois, T. Riedl, P. Jurdic, und B. Hoflack, „Osteoclasts Control Osteoblast Chemotaxis via PDGF-BB/PDGF Receptor Beta Signaling“, *PLoS ONE*, Bd. 3, Nr. 10, S. e3537, Okt. 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0003537.

[79] S. O’Sullivan *u. a.*, „Decreased Bone Turnover Despite Persistent Secondary Hyperparathyroidism during Prolonged Treatment with Imatinib“, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Bd. 94, Nr. 4, S. 1131–1136, Apr. 2009, doi: 10.1210/jc.2008-2324.

[80] I. El Hajj Dib, M. Gallet, R. Mentaverri, N. Sévenet, M. Brazier, und S. Kamel, „Imatinib mesylate (Gleevec®) enhances mature osteoclast apoptosis and suppresses osteoclast bone resorbing activity“, *Eur. J. Pharmacol.*, Bd. 551, Nr. 1–3, S. 27–33, Dez. 2006, doi: 10.1016/j.ejphar.2006.09.007.

[81] A. L. Dewar *u. a.*, „Imatinib as a potential antiresorptive therapy for bone disease“, *Blood*, Bd. 107, Nr. 11, S. 4334–4337, Juni 2006, doi: 10.1182/blood-2005-09-3568.

[82] Z. Zhang, J. Chen, und D. Jin, „Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)-BB Stimulates Osteoclastic Bone Resorption Directly: The Role of Receptor  $\alpha$ “, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 251, Nr. 1, S. 5, 1998.

[83] J. M. Hock und E. Canalis, „Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts.“, Nr. 3, S. 6, 1994.

[84] R. L. Lees und J. N. M. Heersche, „Macrophage Colony Stimulating Factor Increases Bone Resorption in Dispersed Osteoclast Cultures by Increasing Osteoclast Size“, *J. Bone Miner. Res.*, Bd. 14, Nr. 6, S. 937–945, Juni 1999, doi: 10.1359/jbmr.1999.14.6.937.

[85] W. Huang *u. a.*, „A novel function for platelet-derived growth factor D: induction of osteoclastic differentiation for intraosseous tumor growth“, *Oncogene*, Bd. 31, Nr. 42, S. 4527–4535, Okt. 2012, doi: 10.1038/onc.2011.573.

[86] M. M. Rahman, K. Matsuoka, S. Takeshita, und K. Ikeda, „Secretion of PDGF isoforms during osteoclastogenesis and its modulation by anti-osteoclast drugs“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 462, Nr. 2, S. 159–164, Juni 2015, doi:

10.1016/j.bbrc.2015.04.115.

[87] G. Kroemer, L. Galluzzi, und C. Brenner, „Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death“, *Physiol. Rev.*, Bd. 87, Nr. 1, S. 99–163, Jan. 2007, doi: 10.1152/physrev.00013.2006.

[88] S. Sekine *u. a.*, „Functional evaluation of PDGFB-variants in idiopathic basal ganglia calcification, using patient-derived iPS cells“, *Sci. Rep.*, Bd. 9, Nr. 1, S. 5698, Dez. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-42115-y.

[89] K. A. Pulford, A. Sipos, J. L. Cordell, W. P. Stross, und D. Y. Mason, „Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen“, *Int. Immunol.*, Bd. 2, Nr. 10, S. 973–980, 1990.

[90] Y. Zarb *u. a.*, „Ossified blood vessels in primary familial brain calcification elicit a neurotoxic astrocyte response“, *Brain*, Bd. 142, Nr. 4, S. 885–902, Apr. 2019, doi: 10.1093/brain/awz032.

[91] J.-H. Qiao, V. Mishra, M. C. Fishbein, S. K. Sinha, und T. B. Rajavashisth, „Multinucleated giant cells in atherosclerotic plaques of human carotid arteries: Identification of osteoclast-like cells and their specific proteins in artery wall“, *Exp. Mol. Pathol.*, Bd. 99, Nr. 3, S. 654–662, Dez. 2015, doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.010.

[92] G. Nicolas, F. Marguet, A. Laquerrière, J. R. Mendes de Oliveira, und D. Hannequin, „Microangiopathy in primary familial brain calcification: Evidence from skin biopsies“, *Neurol. Genet.*, Bd. 3, Nr. 2, S. e134, Apr. 2017, doi: 10.1212/NXG.0000000000000134.

[93] N. Jensen, J. K. Autzen, und L. Pedersen, „Slc20a2 is critical for maintaining a physiologic inorganic phosphate level in cerebrospinal fluid“, *neurogenetics*, Bd. 17, Nr. 2, S. 125–130, Apr. 2016, doi: 10.1007/s10048-015-0469-6.

## 8 Anhang

### 8.1 Ethikvotum

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden durch ein Schreiben der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vom 03.03.2016 mit dem Aktenzeichen 16-039 genehmigt.

## 8.2 Eidesstattliche Erklärung

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ort, Datum

Unterschrift

### 8.3 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei der Leiterin des Institutes für Neurogenetik der Universität zu Lübeck Prof. Dr. med. Christine Klein. Unter optimalen Bedingungen hatte ich dort die Möglichkeit ein sehr interessantes Thema zu bearbeiten.

Ein außerordentlicher Dank gilt Herrn PD Dr. med. Daniel Alvarez-Fischer für die sehr gute Betreuung, freundschaftliche und geduldige Zusammenarbeit im Labor und am Schreibtisch und schließlich die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern des Instituts für Neurogenetik. Allen voran PD Dr. sc. Ana Westenberger als meiner Ko-betreuerin. Ihre motivierende Unterstützung und wissenschaftliche Schärfe in Detailfragen hatten großen Einfluss auf meine Arbeit.

Ich möchte weiterhin von ganzem Herzen PD Dr. hum. biol. Zouhair Aherrahrou und Maren Behrensen aus dem Institut für Kardiogenetik danken, die einen Teil der praktischen Arbeit geprägt und begleitet haben.

Schließlich gebührt großer Dank meiner Familie für die Motivation, den nötigen Ansporn und die lebenswerte Unterstützung während der gesamten Promotionsphase.

## 8.4 Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Georg Mahlke

Geboren 1990 in Wismar

### **Hochschulstudium**

10/2010 – 06/2017	Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
19.09.2012	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2013 – 06/2014	Auslandssemester an der medizinischen Fakultät der Universität degli studi di Bari „Aldo Moro“, Bari – Italien
14.04.2016	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2016 – 04/2017	Praktisches Jahr
08.06.2017	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Beruflicher Werdegang**

01/2018- 09/2019	Arzt in Weiterbildung in der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universitätsmedizin Greifwald
12/2019 – 07/2020	Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Innere Medizin/Bereich Kardiologie im Klinikum Karlsburg
10/2020 – 03/2022	Arzt in Weiterbildung in den Inneren Kliniken im Sana HANSE-Klinikum Wismar
10/2022 – 03/2023	Arzt in Weiterbildung in der Kinderarztpraxis Christian Güttel, Schwerin
04/2023 – 10/2023	Arzt in Weiterbildung in der Abteilung für Chirurgie/Unfallchirurgie/Orthopädie des MVZ am Burgwall GbR, Wismar
12/2023 – aktuell	Arzt in Weiterbildung in der „Hausärztlichen Gemeinschaftspraxis am Alten Hafen“ von Dr. med. K. Kohlen und Dr. med. A. Hattendorff-Beitz

## Anhang

### **Promotion**

Seit 04/2015	Promotionsarbeit mit dem Thema „Funktionelle Mechanismen der PDGFB-Mutation für die Krankheitsausbildung der Primären Familiären Gehirnkalkifikation“, Betreuer: PD Dr. med. Daniel Alvarez-Fischer, Institut für Neurogenetik, Universität zu Lübeck
04/2015 – 12/2015	Experimentelle Untersuchungen in den Laboren des Instituts für Neurogenetik, Universität zu Lübeck
01 /2016 – 07/2017	Unterbrechung der Dissertation aufgrund von Staatsexamina und Praktischem Jahr
08/2017 – 12/2017	Beendigung der Untersuchungen in den Laboren, Auswertung und Beginn der Verfassung der Dissertation
01/2018 – 03/2023	Unterbrechung der Dissertation aufgrund von Berufsstart und Familiengründung, Änderung der Promotionsordnung, Habilitation und beruflichen Veränderung des Betreuers

## 8.5 Publikationsliste

### **Originalarbeit**

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>.