



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Der Einfluss von MeCP2 auf Barriereigenschaften
der Blut-Hirn Schranke“

verfasst von / submitted by

Alexander Reitner

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2018 / Vienna, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. Winfried Neuhaus

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig verfasst, und in der Bearbeitung und Abfassung keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe. Die vorliegende Diplomarbeit wurde noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt.“

Datum: 06.12.2018

Alexander REITNER

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. Winfried Neuhaus bedanken, der trotz eines sehr engen Terminkalenders immer Zeit gefunden hat, mich sowohl fachlich als auch persönlich bei der Entstehung dieser Arbeit zu unterstützen.

Weiters möchte ich einen großen Dank an das Institut für medizinische Genetik aussprechen, wo ich in der Arbeitsgruppe von Ass. Prof. Priv. Doz. Dr. Franco Laccone im Zeitraum von Oktober 2016 bis März 2017 im Bereich meiner Diplomarbeit forschen durfte. Zusätzlich danke ich besonders Mag. Dr. Hannes Steinkellner und Anna Magdalena Huber, die mir stets mit ihrem Wissen und ihrer Hilfsbereitschaft beistanden.

Am meisten jedoch möchte ich mich bei meinen Eltern Andrea und Rudolf und meiner Freundin Anna bedanken, die mir immer mit so viel Liebe, Vertrauen und Verständnis den gesamten Weg meines Studiums zur Seite standen. Ohne eure Unterstützung wäre all dies nie möglich gewesen.

Schlussendlich möchte ich mich noch bei meinen Freunden und Studienkollegen und Studienkolleginnen für ihren Zuspruch und ihre Hilfe bedanken.

Abstract Deutsch

Das Rett-Syndrom ist eine schwere, progressiv verlaufende neurologische Entwicklungsstörung mit der Prävalenz von 1:15000 in Österreich. Als häufigste Ursache für das klassische Rett-Syndrom wird eine Mutation des Methyl-CpG-bindenden Proteins 2 (MECP2)-Gens beschrieben. MECP2-Mutationen beziehungsweise eine veränderte Expression des MeCP2-Proteins sind jedoch auch mit einem breiten Spektrum von anderen neurologischen Entwicklungsstörungen assoziiert. Da dieses Gen/Protein für eine normale neurologische Entwicklung essentiell ist, wurde in dieser Arbeit versucht, die Auswirkung von MeCP2 auf die Barrierefunktion der Blut-Hirn Schranke zu zeigen. Die Blut-Hirn Schranke stellt eine physiologische Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem peripheren Blutkreislauf dar und ist deshalb essentiell für die Entwicklung einer normalen Gehirnfunktion.

In dieser Arbeit wurde mit MeCP2 knock-out (MeCP2-KO) Mäusen gearbeitet, in denen das MECP2-Gen spezifisch mutiert wurde, was zu einem funktionellen knock-out des Proteins führte. Ein Ziel war die Untersuchung der Auswirkung des MeCP2-KO's auf die Expression wichtiger Blut-Hirn Schranken Parameter auf Proteinebene. Es konnte keine statistisch signifikante Regulation von Parametern, die für die physikalische Barrierefunktion der Blut-Hirn Schranke essentiell waren, durch den MeCP2-KO beobachtet werden. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass andere Systeme, wie das Transportsystem der Blut-Hirn Schranke, durch den MeCP2-KO reguliert werden könnten.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines siRNA knock-down Protokolls für MeCP2 in Mausgehirnendothelzellen. Dieses konnte entwickelt werden, in dem ein stabiler knock-down von MeCP2 auf 20-30% erreicht wurde. Dieser siRNA knock-down von MeCP2 führte zu keiner Änderung der untersuchten Blut-Hirn Schranken Marker. Da die Restmenge an MeCP2 jedoch für die normale Funktion der Zelle ausreichen könnte, wäre für die Untersuchung wichtiger Blut-Hirn Schranken Parameter im Zellmodell die Entwicklung eines MeCP2-KO's in Zellen, beispielsweise durch die CRISPR/Cas9-Methode, ein nächster möglicher Schritt.

Schlüsselwörter: Rett-Syndrom, Methyl-CpG-bindendes Protein 2 (MeCP2), Blut-Hirn Schranke

Abstract Englisch

Rett syndrome is a severe, progressive neurodevelopmental disorder with a prevalence of 1:15000 in Austria. The most common cause of classical Rett syndrome is a mutation of the methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) gene. However, MECP2 mutations or altered expression of MeCP2 protein are also associated with a wide range of other neurodevelopmental disorders. Because this gene/protein is essential for normal neurological development, this thesis attempts to demonstrate the effect of MeCP2 on the barrier function of the blood-brain barrier. The blood-brain barrier is a physiological barrier between the central nervous system and the peripheral blood circulation and is essential for the development of normal brain function.

In the course of this work MeCP2 knock-out (MeCP2-KO) mice were used, in which the gene was specifically mutated, which led to a functional knock-out of the protein. One aim was to investigate the effect of MeCP2-KO on the expression of important physical blood-brain barrier parameters at the protein level. No statistically significant regulation of these blood-brain barrier parameters was found. However, the results suggested that other properties, such as active transporters, could also be regulated by MeCP2-KO.

The second aim of this thesis was the development and establishment of a siRNA knock-down protocol for MeCP2 in mouse brain endothelial cells. A protocol was developed leading to a stable knock-down of MeCP2 to 20-30%. This knock-down did not result in the regulation of tightness markers and suggested that the residual amount of MeCP2 could be sufficient for a normal function of the cell. Further studies might focus on the development of MeCP2-KO cells, by for example CRISPR/Cas9 and the investigation of the regulation of blood-brain barrier properties.

Key words: Rett syndrome, methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2), blood-brain barrier

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Danksagung	II
Abstract Deutsch	III
Abstract Englisch	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Rett-Syndrom	1
1.1.1 Entdeckung und geschichtlicher Hintergrund	1
1.1.2 Diagnosekriterien	2
1.1.3 Krankheitsverlauf und Symptome	4
1.1.4 Ursachen.....	5
1.1.5 MeCP2: Aufbau, Funktion und assoziierte Erkrankungen.....	6
1.1.6 Therapeutische Angriffspunkte	7
1.1.6.1 MECP2-Gen und MeCP2-Protein als direkter therapeutischer Angriffspunkt.....	9
1.1.6.2 Pharmakologische Therapieansätze	10
1.1.6.3 Knochenmarkstransplantation	11
1.2 Die Blut-Hirn Schranke	11
1.2.1 Aufbau und zelluläre Struktur der Blut-Hirn Schranke.....	11
1.2.2 Funktion und Transportwege der Blut-Hirn Schranke	13
1.2.3 Die Blut-Hirn Schranke und assoziierte Erkrankungen	15
2 Zielsetzung	17
2.1 Tierversuche (<i>in vivo</i>)	17
2.2 Zellkulturversuche (<i>in vitro</i>)	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material.....	19
3.2 Methoden	32
3.2.1 Betreuung und Überwachung der Mäuse	32

3.2.2	Genotypisierung.....	33
3.2.2.1	Gewebeentnahme und DNA-Extraktion.....	33
3.2.2.2	PCR – Polymerase Kettenreaktion	34
3.2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	35
3.2.2.4	Detektion	36
3.2.3	Gehirnentnahme	36
3.2.4	Isolierung von Proteinen aus Mäusegehirnen	37
3.2.5	Kultivierung von Mausgehirnendothelzellen.....	40
3.2.5.1	Beurteilung der Konfluenz	40
3.2.5.2	Subkultivieren	41
3.2.5.3	Mediumswechsel	42
3.2.5.4	Aussaat.....	42
3.2.6	MeCP2 siRNA knock-down.....	44
3.2.6.1	siRNA Resuspension.....	44
3.2.6.2	Durchführung der Transfektion	45
3.2.6.3	Beurteilung der Mausgehirnendothelzellen nach Transfektion ..	46
3.2.7	Zellyse und Proteinisolierung	50
3.2.8	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot	51
3.2.8.1	BCA-Proteinbestimmung	51
3.2.8.2	Probenvorbereitung	53
3.2.8.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	54
3.2.8.4	Blotting	57
3.2.8.5	Inkubation mit Antikörpern	58
3.2.8.6	Detektion	60
3.2.8.7	Stripping der Western Blot Membranen.....	62
3.2.8.8	Densitometrische Auswertung der Western Blots.....	63
4	Resultate.....	65
4.1	Einfluss von MeCP2 knock-out auf Marker der Blut-Hirn Schranke im Mausmodell	65
4.1.1	Genotypisierung.....	65
4.1.2	Überwachung der Mäuse	68
4.1.3	Der Einfluss des MeCP2-KO auf die Expression der Proteine ZO-1, Occludin, Claudin-5, S100 β , MAP2 und GFAP	75
4.1.3.1	Western Blots	76

4.1.3.2	Densitometrische Auswertung	80
4.2	Etablierung eines siRNA MeCP2 knock-down Protokolls für Mausgehirnendothelzellen.....	84
4.2.1	Vergleich der Expression von MeCP2 im Western Blot nach einfacher Transfektion in Abhängigkeit der Zeit.....	86
4.2.2	Vergleich der Expression von MeCP2 im Western Blot in Abhängigkeit der Anzahl der durchgeführten Transfektionen	90
4.2.3	Expression von Claudin-5 nach dreifacher Transfektion	92
5	Diskussion	94
5.1	Mausmodelle für das Rett-Syndrom	94
5.1.1	MeCP2-/y Mäuse (MeCP2 knock-out)	94
5.1.2	MeCP2308/y Mäuse	95
5.1.3	MeCP2Tg Mäuse	95
5.2	Limitierung der Gesamtproteinexpression in der Western Blot Analyse ...	96
5.3	Erhöhtes Gesamteiweiß im Liquor und der Einfluss auf die Blut-Hirn Schranke	97
5.4	Veränderung von ABC-Transportern in neurodegenerativen Erkrankungen	98
5.4.1	Auswirkungen der Überexpression von ABC-Transportern auf die Pharmakotherapie.....	100
5.5	Limitierung des MeCP2 siRNA knock-down im Zellmodell	102
5.6	Auswirkung von MeCP2-Defiziten im Zellmodell	103
	Literaturverzeichnis	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des MECP2-Genaufbaus und der beiden Protein-Isoformen MeCP2E1 und MeCP2E2.....	6
Abbildung 2: Aufbau und zelluläre Struktur der Blut-Hirn Schranke.	12
Abbildung 3: Transportwege der Blut-Hirn Schranke	15
Abbildung 4: Überblick der in vivo Arbeitsschritte.	17
Abbildung 5: Überblick der in vitro Arbeitsschritte.....	18
Abbildung 6: Organisation und Beschriftung der 1,5 mL Eppendorf Gefäße und 15 mL Zentrifugenröhrchen bei der Isolierung von Proteinen aus Mäusegehirnen.....	37
Abbildung 7: Gehirnhälfte in RIPA/PIC vor der Zerkleinerung (A) und nach der Zerkleinerung (B) mit dem Mikropistill.	38
Abbildung 8: CerebEND Zellen bei vollständiger Konfluenz im Lichtmikroskop	41
Abbildung 9: Beispiel für die Behandlung der einzelnen Wells bei der Transfektion von cerebEND Zellen.	46
Abbildung 10: Beurteilung der cerebEND Zellen am Beispiel der Dreifachtransfektion nach der ersten Transfektion.....	47
Abbildung 11: Beurteilung der cerebEND Zellen am Beispiel der Dreifachtransfektion nach der zweiten Transfektion.....	48
Abbildung 12: Beurteilung der cerebEND Zellen am Beispiel der Dreifachtransfektion nach der dritten Transfektion.....	49
Abbildung 13: Beispiel für das Auftrage-Schema der Proteinstandards und Probenreihe bei der BCA-Proteinbestimmung der Tierversuche auf einer 96-Well-Platte	52
Abbildung 14: Marker pEqGOLD Protein Marker V (A) und Marker PageRuler (B).	56
Abbildung 15: Inkubation der Blots mit der primären Antikörper-Lösung bei 4°C.	59
Abbildung 16: Inkubation der Blots mit der sekundären Antikörper-Lösung bei Raumtemperatur auf der Schwenkplatte.....	60
Abbildung 17: Aufbringen und Inkubation der Blots mit den Lumineszenz-Reagenzien, um die untersuchten Proteine sichtbar zu machen.	61
Abbildung 18: Inkubation der Blots mit Stripping Puffer und β -Mercaptoethanol bei 56°C im Wasserbad.....	63
Abbildung 19: Beispiel für eine densitometrische Auswertung eines Blots mit Hilfe des Programms Chemilmager.....	64

Abbildung 20: Darstellung der Auswertung des Gels bei der Genotypisierung Maus #1-Maus#12.....	65
Abbildung 21: Darstellung der Auswertung des Gels bei der Genotypisierung Maus #77-Maus #82.....	66
Abbildung 22: Darstellung der Auswertung des Gels bei der Genotypisierung Maus #65-Maus #72.....	66
Abbildung 23: Maus ohne Aufweisen von Claspings (A) und Maus mit fortgeschrittenem Claspings (B).....	68
Abbildung 24: Gewichtsverlauf des ersten Mäusepaars (1.Paar, Tabelle 11).	69
Abbildung 25: Gewichtsverlauf des zweiten Mäusepaars (2.Paar, Tabelle 11).	70
Abbildung 26: Gewichtsverlauf des dritten Mäusepaars (3.Paar, Tabelle 11).	70
Abbildung 27: Gewichtsverlauf des vierten Mäusepaars (4.Paar, Tabelle 11).	71
Abbildung 28: Gewichtsverlauf des fünften Mäusepaars (5.Paar, Tabelle 11).	71
Abbildung 29: Gewichtsverlauf des sechsten Mäusepaars (6.Paar, Tabelle 11).....	72
Abbildung 30: Gewichtsverlauf des siebenten Mäusepaars (7.Paar, Tabelle 11).....	72
Abbildung 31: Gewichtsverlauf des achten Mäusepaars (8.Paar, Tabelle 11).	73
Abbildung 32: Gewichtsverlauf des neunten Mäusepaars (9.Paar, Tabelle 11).	73
Abbildung 33: Zusammenfassende Grafik des Gewichtsbereiches während des Beobachtungszeitraumes aller betreuten Wild-Typ und MeCP2-KO Mäusen.	74
Abbildung 34: Überblick über den signifikanten Gewichtsverlust der MeCP2-KO Mäuse.	75
Abbildung 35: Western Blot 1 der Mausgehirnlysate: Expression der Proteine ZO-1, Occludin, MeCP2, Claudin-5 und S100 β nach absteigender Größe und den endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin.....	76
Abbildung 36: Western Blot 2 der Mausgehirnlysate: Expression der Proteine ZO-1, Occludin, MeCP2, Claudin-5 und S100 β nach absteigender Größe und der endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin.....	77
Abbildung 37: Western Blot 1 der Mausgehirnlysate: Expression der Proteine MAP2, MeCP2 und GFAP nach absteigender Größe und den endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin	78
Abbildung 38: Western Blot 2 der Mausgehirnlysate: Expression der Proteine MAP2, MeCP2 und GFAP nach absteigender Größe und den endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin	79
Abbildung 39: Expression von MeCP2 bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin.....	80

Abbildung 40: Expression von Claudin-5 bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin.....	81
Abbildung 41: Expression von Occludin bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin.....	81
Abbildung 42: Expression von ZO-1 bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin.....	82
Abbildung 43: Expression von S100 β bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin.....	82
Abbildung 44: Expression von GFAP bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin.....	83
Abbildung 45: Expression von MAP2 bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin.....	83
Abbildung 46: Gegenüberstellung der Western Blots mit der Expression von MeCP2 nach Behandlung der Wells mit den Transfektionsreagentien in Abhängigkeit der Zeit nach 24h (Versuchsnummer: 5, Endogene Kontrolle: β -Actin), 48h (Versuchsnummer: 5, Endogene Kontrolle: β -Actin) und 72h (Versuchsnummer: 2, Endogene Kontrolle: Tubulin).	87
Abbildung 47: Expression von MeCP2 nach Einmaltransfektion nach 24h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 5).....	88
Abbildung 48: Expression von MeCP2 nach Einmaltransfektion nach 48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 5).....	89
Abbildung 49: Expression von MeCP2 nach Einmaltransfektion nach 72h, normalisiert auf die endogene Kontrolle Tubulin (Versuchsnummer: 2).	89
Abbildung 50: Gegenüberstellung der Western Blots mit der Expression von MeCP2 in Abhängigkeit der Anzahl der durchgeführten Transfektionen: Vergleich der Expression von MeCP2 nach der Einmaltransfektion (Versuchsnummer: 5, Endogene Kontrolle: β -Actin, Zeit der Behandlung mit den Transfektionsreagentien: 48h) und nach der Dreifachtransfektion (Versuchsnummer: 10, Endogene Kontrolle: β -Actin, Zeit der Behandlung mit den Transfektionsreagentien: 72h-48h-48h).....	90
Abbildung 51: Expression von MeCP2 nach Einmaltransfektion nach 48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 5).....	91
Abbildung 52: Expression von MeCP2 nach Dreifachtransfektion nach 72h-48h-48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 10).....	91

Abbildung 53: Expression von Claudin-5 im Western Blot nach Dreifachtransfektion nach 72h-48h-48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 10)	92
Abbildung 54: Expression von Claudin-5 nach Dreifachtransfektion nach 72h-48h-48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 10)	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Therapeutische Ansätze in Präklinik und Klinik zur Behandlung des Rett-Syndroms.	8
Tabelle 2: Übersicht der in der Arbeit verwendeten primären Antikörper.	23
Tabelle 3: Übersicht der in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper.	23
Tabelle 4: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Primer bei der Genotypisierung.	28
Tabelle 5: Genaue Bezeichnung der verwendeten MeCP2-KO und WT-Mäuse.	28
Tabelle 6: Gewicht der einzelnen Gehirnhälften mit zu ergänzendem RIPA/PIC-Puffervolumen und der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode	39
Tabelle 7: Übersicht und Zeitplan des siRNA knock-downs bei der Dreifachtransfektion.	46
Tabelle 8: Verdünnungsschema der Proteinstandards bei der BCA-Proteinbestimmung.	51
Tabelle 9: UV-Absorptionen der Proteinbestimmung am Beispiel der Tierversuche	53
Tabelle 10: Pipettierschema am Beispiel der Tierversuche	54
Tabelle 11: Übersicht aller betreuten WT-Mäuse und MeCP2-KO Mäuse.	67
Tabelle 12: Übersicht über die Veränderung der Parameter bei der Entwicklung eines siRNA knock-down Protokolls von MeCP2 in cerebEND Zellen.	85

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
bp	Basenpaar
g	Gramm
kDa	Kilodalton
M	molar
mg	Milligramm
mL	Milliliter
n	Stoffmenge, mol
nM	nanomolar
nm	Nanometer
nmol	nanomol
rcf = g	<i>englisch:</i> relative centrifugal force = g-force
rpm	<i>englisch:</i> revolutions per minute
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
V	Volt

A

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ABC	<i>englisch:</i> ATP-binding cassette
ad	<i>lateinisch:</i> zu, an, bei, auf
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Azidothymidin

B

BCA	<i>englisch:</i> Bicinchoninic Acid
BCRP	<i>englisch:</i> Breast Cancer Resistance Protein
BDNF	<i>englisch:</i> Brain-derived Neurotrophic Factor
BL	Basallamina
BSA	Bovines Serumalbumin

C

CASY	<i>englisch:</i> Cell Counter and Analyzer System
CDKL5	<i>englisch:</i> Cyclin-dependent Kinase-like 5
CNF-1	<i>englisch:</i> Cytotoxic Necrotizing Factor 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CRISPR/Cas	<i>englisch:</i> Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated
CTD	C-terminale Domäne

D

ddH ₂ O	<i>englisch:</i> Double Distilled Water
DMEM	<i>englisch:</i> Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>englisch:</i> Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	<i>englisch:</i> Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

E

EDTA	<i>englisch:</i> Ethylenediaminetetraacetic Acid
------	--

F

FBS	<i>englisch:</i> Fetal Bovine Serum
FOXP1	<i>englisch:</i> Forkhead Box Protein G1
F-Primer	<i>englisch:</i> Forward Primer

G

GABA	<i>englisch:</i> Gamma Amino Butyric Acid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>englisch:</i> Glial Fibrillary Acidic Protein

H

HCl	Salzsäure
hMECP2	Humanes MECP2
HPLC	<i>englisch:</i> High Performance Liquid Chromatography
HPSF	<i>englisch:</i> High Purity Salt Free

I

ID	Interaktive Domäne
IGF-1	<i>englisch:</i> Insulin-like Growth Factor 1
IgG	Immunglobulin-G

K

K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	<i>englisch:</i> Knock-out

L

LBR	Lamin-B Rezeptor
li	Links

M

MAP2	<i>englisch:</i> Microtubule-associated Protein 2
MBD	<i>englisch:</i> Methyl-binding Domain
MeCP2	<i>englisch:</i> Methyl-CpG-binding Protein 2
MECP2	<i>englisch:</i> Methyl-CpG-binding Protein 2 - Gen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>englisch:</i> messenger RNA
MRP	<i>englisch:</i> Multidrug Resistance-associated Protein
MUT	Mutant = MeCP2-KO (im Zusammenhang der Diplomarbeit gemeint)

N

Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NLS	Nukläere Lokalisationssequenz
NT-siRNA	Non-targeting siRNA

P

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>englisch:</i> Phosphate Buffered Saline
PCR	<i>englisch:</i> Polymerase Chain Reaction
PenStrep	Penicillin Streptomycin
P-gp	P-Glykoprotein
pH	<i>lateinisch:</i> potentia Hydrogenii
PIC	<i>englisch:</i> Protease Inhibitor Cocktail
Puffer AE	<i>englisch:</i> Animal Elution Buffer
Puffer AL	<i>englisch:</i> Animal Lysis Buffer
Puffer ATL	<i>englisch:</i> Animal Tissue Lysis Buffer
Puffer AW	<i>englisch:</i> Animal Wash Buffer

R

re	Rechts
RIPA-Puffer	<i>englisch:</i> Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
RNA	<i>englisch:</i> Ribonucleic Acid
RNase	Ribunukleasen
R-Primer	<i>englisch:</i> Reverse Primer

S

SDS	<i>englisch:</i> Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	<i>englisch:</i> small interfering RNA

T

T75	Zellkulturflasche mit einer Wachstumsoberfläche von 75cm ²
Taq DNA Polymerase	Thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRD	Transkriptionsrepressor-Domäne
TRICIN	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U

USB	<i>englisch:</i> Universal Serial Bus
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

W

WT Wild-Typ

Z

ZNS Zentralnervensystem

ZO-1 *lateinisch*: Zonula Occludens 1

1 Einleitung

1.1 Rett-Syndrom

Das Rett-Syndrom (RTT) ist eine progressiv verlaufende, genetisch verursachte Entwicklungsstörung, die mit dem Verlust bereits erlernter Fähigkeiten in einem bestimmten Entwicklungszeitraum einhergeht (Chahrour & Zoghbi, 2007).

Das Rett-Syndrom betrifft fast ausschließlich das weibliche Geschlecht mit einer Inzidenz von 1:10000-20000 Lebendgeburten in der Allgemeinbevölkerung, wobei selten Fälle von jungen Männern gemeldet werden (Liyanage & Rastegar, 2014). In Österreich wird eine Häufigkeit des Rett-Syndroms mit 1 auf 15000 lebendgeborene Mädchen angenommen - somit erkranken jedes Jahr drei bis fünf Mädchen in ganz Österreich (Österreichische Rett-Syndrom Gesellschaft, 2012).

Obwohl das Rett-Syndrom zu den seltenen Erkrankungen zählt, ist es eine der häufigsten genetischen Ursachen für mentale Retardierung bei Frauen nach dem Down-Syndrom (Weaving, Ellaway, Gecz, & Christodoulou, 2005).

1.1.1 Entdeckung und geschichtlicher Hintergrund

Das Rett-Syndrom wurde erstmals 1966 von dem Wiener Kinderarzt Dr. Andreas Rett beschrieben, als er zwei Mädchen im Wartezimmer auf den Schößen ihrer Mütter beobachtete. Beide Kinder waren wegen epileptischer Anfälle in Behandlung und wurden von ihren Müttern an den Armen festgehalten. Als er erneut an ihnen vorbeiging, ließen die Mütter unbeabsichtigt die Arme ihrer Kinder los. Sofort begannen die Kinder fast identisch aussehende Handbewegungen auszuüben. Rett konnte sich erinnern, so ein Verhalten schon einmal bei früheren Patienten gesehen zu haben. Schnell konnten mehrere Mädchen mit demselben Verhaltensmuster und Merkmalen gefunden werden (Rett, 1966).

Erst siebzehn Jahre später fand das Rett-Syndrom einen Platz in der Medizin, als 35 weitere Fälle von dem schwedischen Neurologen Dr. Bengt Hagberg und seinen Kollegen und Kolleginnen beschrieben wurden. Die 35 Patienten, welche ausschließlich Mädchen waren, schienen sich anfangs bis zu dem Alter von sieben bis achtzehn Monaten normal zu entwickeln. Ab dieser Entwicklungsphase kam es jedoch zur Stagnation und zum Ver-

lust bereits erlernter motorischer Fähigkeiten. Diese Erkrankung ähnelte dem bereits von Rett in der Literatur beschriebenen Syndrom (Hagberg, Aicardi, Dias, & Ramos, 1983).

Abgesehen von der weltweiten Anerkennung des Rett-Syndroms in der Medizin, gab es in den 1980er Jahren noch weitere Fortschritte in der Wissenschaft im Bereich der DNA-Methylierung. Erstmals konnte ein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und der erblichen Veränderung der Genexpression hergestellt werden. Dr. Adrian Bird und seine Kollegen und Kolleginnen konnten 1992 herausfinden, dass die Methylierung von Säugetier-DNA zu einer Repression der Transkription und zu einer Veränderung der Chromatinstruktur führen kann. Die Forschungsgruppe konnte zum ersten Mal das neuartige Säugetierprotein, das Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2) identifizieren (Lewis, et al., 1992).

Während weiterhin versucht wurde, mehr über diese schwer zu verstehende Krankheit und deren Pathophysiologie herauszufinden, gelang es 1999 Amir und seiner Forschungsgruppe, die Mutation des MECP2-Gens als Ursache des Rett-Syndroms zu bestimmen (Amir, Van Den Veyver, Wan, Tran, Francke, & Zonghbi, 1999). Dr. Rett starb im Jahr 1997 in Wien und konnte diese Entdeckung leider nicht mehr miterleben.

1.1.2 Diagnosekriterien

Im Wesentlichen unterscheidet man bei der klinischen Diagnose des Rett-Syndroms drei wichtige Gruppen von Kriterien. Die Hauptkriterien, welche alle zutreffen müssen, um die Diagnose des typischen oder klassischen Rett-Syndroms stellen zu können. Wenn nicht alle dieser Hauptkriterien erfüllt werden, spricht man vom atypischen Rett-Syndrom. Zusätzlich gibt es unterstützende Kriterien, die nicht unbedingt für die Diagnose erforderlich sind, jedoch den Verdacht erhärten. Letztendlich werden noch sogenannte Ausschlusskriterien beschrieben (Neul, et al., 2010):

Hauptkriterien:

- Teilweiser oder vollständiger Verlust erworbener Handfunktionen
- Teilweiser oder vollständiger Verlust bereits erworbener Sprache
- Ganganomalien: Gangstörungen oder Gehunfähigkeit
- Charakteristische stereotype Handbewegungen, wie Handwringen, -klatschen, -klopfen, -quetschen, sowie Wasch- oder Reibbewegungen

(Neul, et al., 2010)

Unterstützende Kriterien:

- Atmungsstörungen
- Zähneknirschen (Bruxismus)
- Schlafstörungen
- Abnormaler Muskeltonus
- Periphere, vasomotorische Störungen
- Skoliose
- Wachstumsretardierung
- Häufiges Kältegefühl in den äußeren Extremitäten
- Ungewöhnliche Phasen von Lachen und Schreien
- Verminderte Schmerzempfindlichkeit (Hypoalgesie)
- Intensiver Augenkontakt

(Neul, et al., 2010)

Ausschlusskriterien (für typisches Rett-Syndrom):

- Gehirnverletzungen nach Trauma, neurologische Erkrankungen oder schwere Infektion, die eine neurologische Erkrankung verursachen können
- Starke, abnormale psychomotorische Entwicklung in den ersten sechs Lebensmonaten

(Neul, et al., 2010)

Sollte nun aufgrund der klinischen Untersuchung der Verdacht auf Rett-Syndrom vorliegen, wird eine genetische Untersuchung vorgenommen. Mittels eines Gentests wird untersucht, ob eine Mutation im MECP2-Gen vorliegt. In über 90% der Fälle bestätigt der Gentest den Verdacht. Es gibt jedoch auch Patienten, bei denen es zu keiner genetischen Veränderung kommt, sie jedoch trotzdem das klinische Bild des Rett-Syndroms erfüllen (Freilinger, 2017).

Es gibt auch Varianten des Rett-Syndroms, die nicht auf eine Mutation des MECP2-Gens zurückzuführen sind. In zwei dieser Varianten kommt es zu einer Mutation des CDKL5-Gens oder FOXP1-Gens. CDKL5 ist essentiell für eine normale Gehirnfunktion und FOXP1 ist ein Transkriptionsfaktor und reguliert die Aktivität anderer Gene (Neul, et al., 2010).

1.1.3 Krankheitsverlauf und Symptome

Laut dem „Rett Syndrome Handbook“ wird der Krankheitsverlauf des Rett-Syndroms in ein vierstufiges Verlaufsmodell gegliedert (Hunter, 2007):

1. Stadium:

Das erste Stadium beginnt üblicherweise zwischen dem sechsten und achtzehnten Lebensmonat. Dieses Stadium des Rett-Syndroms wird von Ärzten und Eltern häufig übersehen, da die Symptome noch nicht stark ausgeprägt sind und die geringe Verlangsamung der Entwicklung oft noch nicht bemerkbar ist. Der Säugling könnte sich langsamer oder später entwickeln als ein „normales“ Kind in diesem Alter. Die psychomotorische Entwicklung scheint sich anfangs zu verlangsamen und stagniert letztendlich. Diese Phase dauert in der Regel ein paar Monate, kann jedoch auch mehr als ein Jahr anhalten. Die Aufmerksamkeit und Aktivität der Kinder werden geringer und sie weisen weniger Interesse an Spielzeug auf. Es scheint ihnen auch schwerer zu fallen, Augenkontakt zu halten. Grobmotorische Fähigkeiten, wie beispielweise Stehenbleiben, Krabbeln oder Sitzen nehmen langsam ab. Zusätzlich sind unspezifische Handbewegungen und eine Verlangsamung des Kopfwachstums zu beobachten. Leider sind diese Symptome oft nicht ausschlaggebend genug, um eine Aufmerksamkeit auf die Krankheit auszulösen (Hunter, 2007).

2. Stadium:

Das zweite Stadium beginnt üblicherweise zwischen dem ersten und vierten Lebensjahr, wobei die Dauer stark variiert. Dieses Stadium ist durch eine allgemeine Entwicklungsregression und dem Verlust bereits erworbener Fähigkeiten gekennzeichnet. Die Kinder verlieren zuerst die Fähigkeit zu sprechen und ihre Hände sinnvoll zu nutzen. Sie beginnen charakteristische stereotype Handbewegungen, wie Hand-zu-Mund Bewegungen, Klatsch-, Waschbewegungen oder Händewringen, auszuführen. Diese Handbewegungen bleiben im Wachzustand bestehen, verschwinden jedoch während des Schlafes. Außerdem sind Unregelmäßigkeiten in der Atmung und Hyperventilation zu beobachten, die sich während des Schlafes normalisieren können. Einige der Mädchen scheinen ein autistisches Verhalten an den Tag zu legen, welches durch verminderte soziale Interaktion und Kommunikation charakterisiert ist. Zusätzlich können allgemeine Reizbarkeit und Schlafstörungen auftreten. Weitere Symptome in dieser Phase sind unkoordinierte, ruckartige Gangbewegungen, Bruxismus und eine Verlangsamung des Kopfwachstums (Hunter, 2007).

3. Stadium:

Das dritte Stadium beginnt normalerweise zwischen dem zweiten und zehnten Lebensjahr und kann viele Jahre andauern. Viele der Mädchen, die an dem Rett-Syndrom erkrankt sind, bleiben die meiste Zeit ihres Lebens in dieser Phase. Nach einer starken Regression in Stadium 2 stabilisiert sich die Entwicklung in dieser Phase. Teilweise kommt es sogar zu einer Verbesserung der bereits bestehenden Symptome, wie beispielweise verminderte Reizbarkeit und Verringerung der autistischen Merkmale. Es scheint, dass die Kinder wieder eine erhöhte Aufmerksamkeit und Kommunikationsfähigkeit aufweisen und mehr Interesse an ihrer Umgebung zeigen. Jedoch ist dieses Stadium auch durch Apraxie, Ataxie, motorische Probleme, Skoliose und epileptische Anfälle gekennzeichnet (Hunter, 2007).

4. Stadium:

In der Regel beginnt das vierte Stadium nach dem zehnten Lebensjahr und variiert wieder stark in der Dauer. Diese Phase zeichnet sich durch eine stabile Kognition und Kommunikation und einer starken Einschränkung der Mobilität aus. Es kommt hierbei zu einer Verschlechterung des physischen Gesamtzustandes. Muskelschwäche, Rigidität, spastische Anfälle und Skoliose führen zu einer Abnahme der Bewegungsfähigkeit. Somit sind die meisten Mädchen in dieser Phase auf einen Rollstuhl angewiesen. Allgemein erscheinen Mädchen/Frauen mit Rett-Syndrom jünger als ihr tatsächliches Alter (Hunter, 2007).

1.1.4 Ursachen

Jahrelang konnte das Rett-Syndrom nur hinsichtlich der ausgeprägten Symptome diagnostiziert werden. 1998 konnte die Ursache der vermuteten genetischen Mutation auf Bande 28 des langen Arms des X-Chromosoms (Xq28) beschränkt werden, bei der eine brasilianische Rett-Familie mit drei betroffenen und drei nicht betroffenen Töchtern untersucht wurde (Sirianni, Naidu, Pereira, Pillotto, & Hoffman, 1998).

Der Durchbruch kam 1999, als Amir und seine Kollegen und Kolleginnen bis zu 100 potentielle Gene in der Xq28-Region bei Rett-Patienten untersuchte, die für das Auftreten des Rett-Syndroms verantwortlich sein konnten. Durch das Screening der genomischen DNA konnte bei sieben Patienten eine gestörte Missense-, Frameshift- und Nonsense-Mutation in der kodierenden Region des MECP2-Gens gefunden werden (Amir, Van Den Veyver, Wan, Tran, Francke, & Zonghbi, 1999).

Heutzutage weiß man laut einer US-amerikanischen Natural History Study, dass bei bis zu 96% der Rett-kranken Patienten eine Mutation des MECP2-Gens vorliegt. Eine MECP2-Mutation weist jedoch nicht auf eine klinische Diagnose des Rett-Syndroms hin. Es gibt Patienten, die eine MECP2-Mutation aufweisen, jedoch keine klinischen Merkmale des Rett-Syndroms zeigen. Auf der anderen Seite gibt es bis zu 4% der Patienten, bei denen bereits Rett-Syndrom diagnostiziert wurde, aber keine MECP2-Mutation vorliegt (Cuddapah, et al., 2014).

1.1.5 MeCP2: Aufbau, Funktion und assoziierte Erkrankungen

Das MECP2-Gen befindet sich auf dem X-Chromosom und besteht aus vier Exons, die für zwei verschiedene Isoformen des Proteins (MeCP2E1 und MeCP2E2) kodieren (Lewis, et al., 1992). Das MeCP2-Protein gehört zu der Familie der methyl-CpG-bindenden Proteine und besteht aus vier essentiellen Domänen: der N-terminalen Sequenz, der methyl-bindenden Domäne (MBD), der Transkriptionsrepressor-Domäne (TRD) mit einer zusätzlichen nukläeren Lokalisationssequenz (NLS) und einer C-terminalen Domäne (CTD). Die beiden Protein-Isoformen MeCP2E1 und MeCP2E2 unterscheiden sich in ihrer N-terminalen Sequenz. Der genaue Aufbau wird in Abbildung 1 dargestellt (Zachariah & Rastegar, 2012).

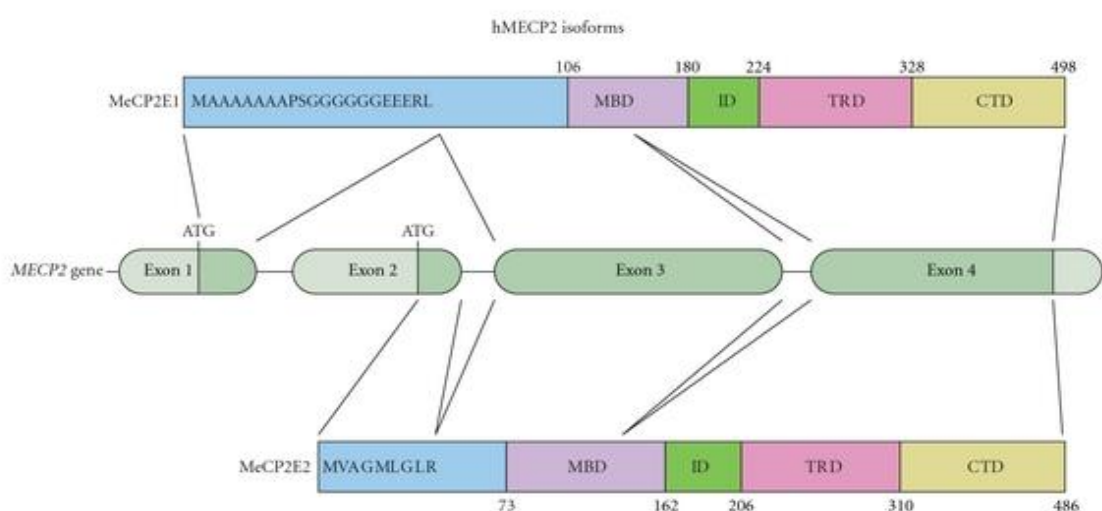


Abbildung 1: Darstellung des MECP2-Genaufbaus und der beiden Protein-Isoformen MeCP2E1 (498 Aminosäuren) und MeCP2E2 (486 Aminosäuren). Die primäre Aminosäuresequenz des N-Terminus von MeCP2E1 und MeCP2E2 wird dargestellt (blau unterlegt). MBD=Methyl-bindende Domäne, TRD=Transkriptionsrepressor-Domäne, ID=Interaktive Domäne, CTD=C-terminale Domäne, hMECP2=humanes MECP2, ATG=Startcodon (Zachariah & Rastegar, 2012).

Funktion und Aufgaben von MeCP2:

- MeCP2 kann abhängig von seinen assoziierten Partnern als Repressor oder Aktivator der Transkription wirken
- MeCP2 hat einen Einfluss auf die Genomstabilität durch Unterdrückung inadäquater Transkription von sich wiederholenden Elementen (repetitive elements)
- MeCP2 bindet an Heterochromatin und reguliert dessen Kondensation. Dadurch wird die Genomarchitektur beeinflusst und geformt.

(Della Ragione, Vacca, Fioriniello, Pepe, & D'Esposito, 2016)

Die MeCP2-Proteinexpression ist innerhalb der embryonalen Entwicklung gering und steigt im Laufe der postnatalen neuronalen Entwicklung stetig an (Shahbazian, Antalffy, Armstrong, & Zoghbi, 2002). Die maximale Expression des MeCP2-Proteins wird im Zellkern ausgereifter Neuronen erreicht, jedoch kann man es in beinahe allen anderen Zelltypen in geringerer Menge vorfinden (Jung, Jugloff, Zhang, Logan, Brown, & Eubanks, 2003).

Sowohl ein MeCP2-Funktionsverlust (loss of function) als auch eine Erhöhung der Proteinmenge (overexpression) wirkt schädlich auf das Nervensystem und hat eine Auswirkung auf die neurologische Entwicklung. Folgende Erkrankungen und Symptome sind mit einer MeCP2-Dysfunktion assoziiert (Chahrour & Zoghbi, 2007):

- Rett-Syndrom
- Angelman-like-syndrom
- Autismus
- Schizophrenie
- Bipolare Störungen
- Mentale und motorische Retardierung, Tremor

(Chahrour & Zoghbi, 2007)

1.1.6 Therapeutische Angriffspunkte

Die Entwicklung von therapeutischen Strategien konnte durch das verbesserte Verständnis der MeCP2-Funktion an Zell- und Tiermodellen ermöglicht werden (Katz, et al., 2016).

Zu den Angriffspunkten für die Therapie des RETT-Syndroms zählen Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und metabolische Faktoren sowie das direkte Ziel MECP2 auf der Ebene des Gens, der RNA oder des Proteins, wie in Tabelle 1 genauer beschrieben wird (Leonard, Cobb, & Downs, 2017).

Neurotransmittersystem	Wachstumsfaktoren, Zellmetabolismus und Homöostase	MECP2/MeCP2
<u>Glutamat:</u> - Dextromethorphan* - Ketamin* - Memantin	<u>Neurotrophe Faktoren:</u> - Glatirameracetat 7,8-Dihydroxyflavone - Fingolimod* - Mecasermin* (rekombinant humanes IGF-1) - Trofinetide* (terminales Tripeptid von IGF-1)	<u>Gentherapie:</u> - Gentherapie - Genom-Editing - MECP2-Aktivierung auf inaktivem X-Chromosom - Read-through Verbindungen für Nonsense-Mutationen
<u>GABA:</u> Midazolam	<u>Metabolische Faktoren:</u> - Fluvastatin - Lovastatin*	<u>Proteinersatztherapie:</u> Rekombinant humanes MeCP2
<u>Monoamine:</u> - Benserazid - Clenbuterol - Citalopram - Desipramin* - Sarizotan*	<u>Mitochondriale Funktion/ Oxidativer Stress:</u> - CNF-1 - Triheptanoin*	
<u>Acetylcholin:</u> - Acetyl-L-cholin - Cholin		

Tabelle 1: Therapeutische Ansätze in Präklinik und Klinik zur Behandlung des Rett-Syndroms; * =Wirkstoffe, die sich bereits in klinischer Phase befinden (Leonard, Cobb, & Downs, 2017).

1.1.6.1 MECP2-Gen und MeCP2-Protein als direkter therapeutischer Angriffspunkt

Das Hauptziel der Therapieansätze, die direkt auf MECP2 als Angriffspunkt abzielen, wäre, dessen Konzentration zu normalisieren, ohne dabei die Expression anderer Gene zu beeinflussen. Dabei muss jedoch achtsam die MeCP2-Dosierung berücksichtigt werden, da auch ein Überschuss an MeCP2 die neuronale Entwicklung beeinträchtigt und somit zu schweren neuronalen Schäden führen kann (Katz, et al., 2016).

Gentherapie:

Mit Hilfe eines adeno-assoziierten Virus-Vektors (AAV), wie beispielweise AAV9, konnte ein Gentransfer erreicht werden, der einen neuen Ansatz als Gentherapie beim Rett-Syndrom eröffnete (Duque, et al., 2009). Damit konnte gezeigt werden, dass durch intravenöse Gabe eines AAV9/MECP2-Vektors bei MeCP2-KO Mäusen eine verlängerte Lebensdauer und eine Normalisierung der Verhaltensmuster bewirkte. Die große Herausforderung der Gentherapie liegt jedoch darin, MeCP2 in einem bestimmten therapeutischen Bereich zu liefern und zu exprimieren, ohne eine Überexpression des Proteins zu erzeugen. Zudem ist die gleichmäßige Verteilung im menschlichen ZNS eine deutlich größere Herausforderung als die im kleineren ZNS der Maus (Gadalla, et al., 2013).

Genom-Editing:

Prinzipiell könnte man mit der Gen- bzw. mRNA-Editing Methode Probleme vermeiden, die mit der MeCP2-Dosierung mittels Viren oder Ersatztherapie in Zusammenhang gebracht werden, da als Ziel nur das mutierte MECP2 repariert werden soll und die gesamte endogene MeCP2-Regulation beibehalten wird (Savic & Schwank, 2016).

Jedoch kann der Gen-Editing Ansatz als Therapiemethode durch folgende Probleme erschwert werden:

- Einschleusung der Nuklease- und Editing-Vorlage in alle Zellen
- Geringe Effizienz des Gen-Editing *in vivo* in postmitotischen Zellen
- Mögliche unspezifische Nuklease-Spaltung an anderen Stellen des Genoms
- Immunantwort gegen die Nuklease (nicht-menschliches Protein)

(Katz, et al., 2016)

MECP2-Aktivierung auf inaktivem X-Chromosom und Read-through Verbindungen für Nonsense-Mutationen:

Dieser Therapieansatz hat das Ziel, kleine Moleküle zu entwickeln, die auf genomischer Ebene wirken, um das MECP2-Allel auf dem inaktiven X-Chromosom zu reaktivieren (Bhatnagar, et al., 2014), oder auf RNA-Ebene aktiv sind, um das Durchlesen von Nonsense-Mutationen zu ermöglichen (Brendel, et al., 2011).

Proteinersatztherapie:

Die Proteinersatzmethode zielt durch Substitution eines humanen MeCP2-Proteins darauf ab, einen geeigneten MeCP2-Spiegel zu erreichen. Folgende Hindernisse müssen jedoch von dieser Therapiemethode überwunden werden:

- Richtige posttranslationale Modifikation
- Kontinuierliche Abgabe des geeigneten Spiegels über die Blut-Hirn Schranke
- Einschleusung in die Zelle und Lokalisierung des zugeführten MeCP2 im Zellkern (Katz, et al., 2016)

1.1.6.2 Pharmakologische Therapieansätze

Im Gegensatz zu dem Therapieansatz, der auf das MECP2-Gen und das MeCP2-Protein abzielt, versucht der pharmakologische Therapieansatz Substanzen und Verbindungen zum Einsatz zu bringen, die bereits für andere Indikationen entwickelt oder zugelassen wurden, um die Komorbiditäten der Rett-Patienten symptomatisch zu behandeln (Katz, et al., 2016). Die pharmakologische Therapie behandelt somit nicht die Ursache des Rett-Syndroms, sondern versucht durch eine symptomatische Behandlung die spezifischen Krankheitssymptome zu lindern (Leonard, Cobb, & Downs, 2017).

Wie in Tabelle 1 genauer beschrieben wird, lässt sich der pharmakologische Therapieansatz in drei Kategorien einteilen: Dem Neurotransmitter- und Neuromodulatorsystem (Glutamat, GABA, Monoamine und Acetylcholin), Wachstumsfaktoren und neurotrophe Faktoren (vor allem BDNF und IGF-1) und dem metabolischen Signalweg (Cholesterinbiosyntheseweg und mitochondriale Funktion), abhängig vom Angriffspunkt der Pharmakotherapie (Leonard, Cobb, & Downs, 2017).

1.1.6.3 Knochenmarkstransplantation

2009 wurde in einer Studie gezeigt, dass auch Astrozyten MeCP2 exprimieren und dass ein Mangel an MeCP2 in Astrozyten zu einer abnormalen neurologischen Entwicklung beitragen kann. Dieser MeCP2-Mangelzustand konnte sich zumindest teilweise über Gap-junction-Kommunikation ausbreiten (Maezawa, Swanberg, Harvey, LaSalle, & Jin, 2009). Zusätzlich können bei MeCP2-defizienten Mäusen Mikroglia eine starke Beeinträchtigung aufweisen. 2012 konnte Derecki und seine Forschungsgruppe zeigen, dass eine Knochenmarkstransplantation bei MeCP2-KO Mäusen, zur Neubildung und Einwanderung von Mikroglia im Gehirn führen kann. Außerdem kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Symptomatik und zu einer verlängerten Überlebensdauer der Mäuse. Zudem wurden Anzeichen für schwere Krämpfe und Unregelmäßigkeiten in der Atmung stark reduziert (Derecki, et al., 2012).

1.2 Die Blut-Hirn Schranke

Neuronen verwenden eine Kombination aus chemischen und elektrischen Signalen, um innerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) zu kommunizieren. Um diesen Signalweg aufrecht zu erhalten, sind besondere Milieubedingungen für das Nervengewebe essentiell (Homöostase). Hierbei spielt eine spezielle Barrierschicht zwischen Blut- und Nervensystem eine wichtige Rolle (Abbott, Rönnbäck, & Hansson, 2006).

Die Blut-Hirn Schranke ist eine vielzellige Gefäßstruktur, die das Zentralnervensystem vom peripheren Blutkreislauf trennt (Obermeier, Daneman, & Ransohoff, 2013) und kommt in allen Organismen mit einem gut entwickelten ZNS vor (Abbott J. N., 2005).

1.2.1 Aufbau und zelluläre Struktur der Blut-Hirn Schranke

Insgesamt gibt es drei ZNS-Barrierschichten, die den molekularen Austausch zwischen dem Blutkreislauf und dem neuronalen Gewebe bzw. seinen Flüssigkeitsräumen begrenzen und regeln: Die Blut-Hirn Schranke (gebildet von zerebrovaskulären Endothelzellen), dem Plexus Choroideus (gebildet von Plexusepithelzellen) und das Arachnoideaepithel (Abbott J. N., 2004). Die Blut-Hirn Schranke nimmt unter den verschiedenen ZNS-Barrieren die wichtigste Rolle ein, indem sie die unmittelbare Mikroumgebung der neuronalen Zellen kontrolliert (Abbott, Rönnbäck, & Hansson, 2006).

In Abbildung 2 wird der Aufbau und die zelluläre Struktur der Blut-Hirn Schranke dargestellt. Die Blut-Hirn Schranke wird von Endothelzellen gebildet, die die Wand der Gehirnkapillaren formen. Die Endothelzellen sind durch spezielle Proteinketten miteinander verbunden, den sogenannten „Tight Junctions“. Tight Junctions bestehen aus Membranproteinen, die eine sehr enge Verbindung zwischen benachbarten Zellen erzeugen. Sie verhindern den unregulierten, parazellulären Fluss von Molekülen und tragen zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität bei. Das Endothel ist weiters von einer Basallamina auf der ZNS-Seite umgeben, in der diskontinuierlich verteilte Perizyten eingelagert sind. Die Perizyten tragen zur Bildung der lokalen Basalmembran bei. Den Abschluss bilden Astrozyten, die sowohl die von den Endothelzellen gebildete Kapillare, als auch die Basallamina umgeben. Die Astrozyten bilden ein komplexes Netzwerk und stellen die zelluläre Verbindung zu den Neuronen her (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010).

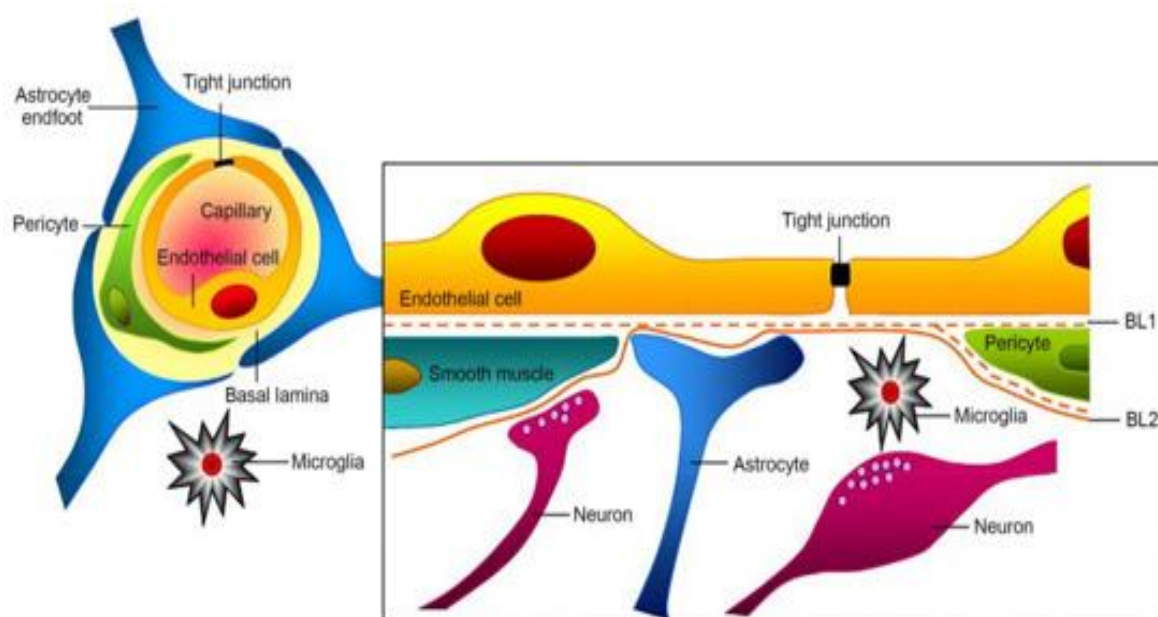


Abbildung 2: Aufbau und zelluläre Struktur der Blut-Hirn Schranke: Die Barriere wird von kapillaren Endothelzellen gebildet und ist von einer Basallamina, in der diskontinuierlich Perizyten eingelagert sind, umgeben. Astrozyten stellen die zelluläre Verbindung zu den Neuronen her. Die Abbildung zeigt außerdem „Tight Junctions“, welche eine enge Verbindung zwischen den benachbarten Endothelzellen erzeugen und Mikrogliazellen. BL1=Basallamina 1, BL2=Basallamina 2 (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010), Bildrechte mit dem Verlag Elsevier unter der Lizenznummer 4472410627268 geklärt.

1.2.2 Funktion und Transportwege der Blut-Hirn Schranke

Die Funktion der ZNS-Barrieren beruht auf einer Kombination aus physikalischer Barriere (Tight Junctions), einer Transportbarriere (spezielle Transportmechanismen) und einer metabolischen Barriere (Enzyme). Die Barriere-Funktion ist hierbei flexibel und kann sowohl in der Physiologie, als auch in der Pathologie reguliert werden (Abbott, Rönnebäck, & Hansson, 2006).

Die Blut-Hirn Schranke übernimmt viele verschiedene Rollen in seiner Funktion (Begley & Brightman, 2003):

- Ionenregulation:
Die Blut-Hirn Schranke stellt durch eine Kombination spezifischer Ionenkanäle und Transporter eine optimale Ionenumgebung für die synaptische Signalfunktion der Neuronen her (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010).
- Neurotransmitter:
Das Blutplasma beinhaltet hohe Spiegel an der neuroexzitatorischen Aminosäure Glutamat, welche nach der Nahrungsaufnahme starken Schwankungen unterlegen ist. Wenn zu viel Glutamat in die interstitielle Flüssigkeit des Gehirns freigesetzt wird, kann es zu einem neurotoxischen bzw. neuroexzitatorischen Schaden des neuronalen Gewebes kommen. Die Blut-Hirn Schranke hält zusätzlich zentrale und periphere Transmitter voneinander getrennt (Abbott, Rönnebäck, & Hansson, 2006).
- Makromoleküle:
Die Blut-Hirn Schranke verhindert, dass Makromoleküle unreguliert in das Gehirn gelangen. Der Proteingehalt der zerebrospinalen Flüssigkeit ist deutlich höher als im Plasma und unterscheidet sich zusätzlich in der Proteinzusammensetzung (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010). Plasmaproteine, wie Albumin, Pro-Thrombin und Plasminogen schädigen das Nervengewebe und aktivieren zelluläre Prozesse, die Apoptose auslösen können (Nadal, Fuentes, Pastor, & McNaughton, 1995). Aus diesem Grund kann das Austreten von Serumproteinen mit hohem Molekulargewicht in das Gehirn über eine geschädigte Blut-Hirn Schranke schwere pathologische Folgen haben (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010).

- Neurotoxine:

Die Blut-Hirn Schranke fungiert als Schutzbarriere und schützt das ZNS vor neurotoxischen Substanzen, die im Blut zirkulieren. Diese Neurotoxine können endogene Metaboliten, Proteine oder Xenobiotika sein, die aus der Nahrung oder anderweitig aus der Umgebung aufgenommen werden (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010).

In Abbildung 3 werden die verschiedenen Transportwege über die Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke dargestellt (Abbott, Rönnbäck, & Hansson, 2006):

- Parazellulärer Transportweg (von hydrophilen Substanzen):

Normalerweise wird das Eindringen hydrophiler Verbindungen und polarer Arzneistoffe durch Tight Junction-Proteine stark eingeschränkt (Abbott, Rönnbäck, & Hansson, 2006).

- Transzellulärer Transportweg (passive Diffusion):

Durch die große Oberfläche der Endothel-Lipidmembran können lipophile Substanzen passiv durch das Endothel transportiert werden (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010).

- Transportproteine:

Das Endothel enthält Transportproteine für verschiedene Substanzen:

Efflux Transporter (ABC-Transporter) können passiv-durchdringende Substanzen, wie Vinca Alkaloide, Cyclosporin A oder Azidothymidin abfangen und wieder aus der Endothelzelle in den Blutkreislauf hinaus pumpen. Influx Transporter (Carriers) können den Transport von Molekülen, wie Glukose, Aminosäuren, Purinbasen oder Nukleosiden durch das Endothel in das ZNS begünstigen (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010).

- Rezeptor-vermittelte Transzytose:

Bestimmte Proteine, wie beispielsweise Transferrin, werden durch spezifische Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen (Abbott, Rönnbäck, & Hansson, 2006).

- Adsorptive Transzytose:

Native Plasmaproteine, wie zum Beispiel Albumin, können normalerweise schlecht transportiert werden. Durch Kationisierung kann jedoch ihre Aufnahme durch adsorptiv-vermittelte Endozytose und Transzytose erhöht werden (Abbott, Rönnbäck, & Hansson, 2006).

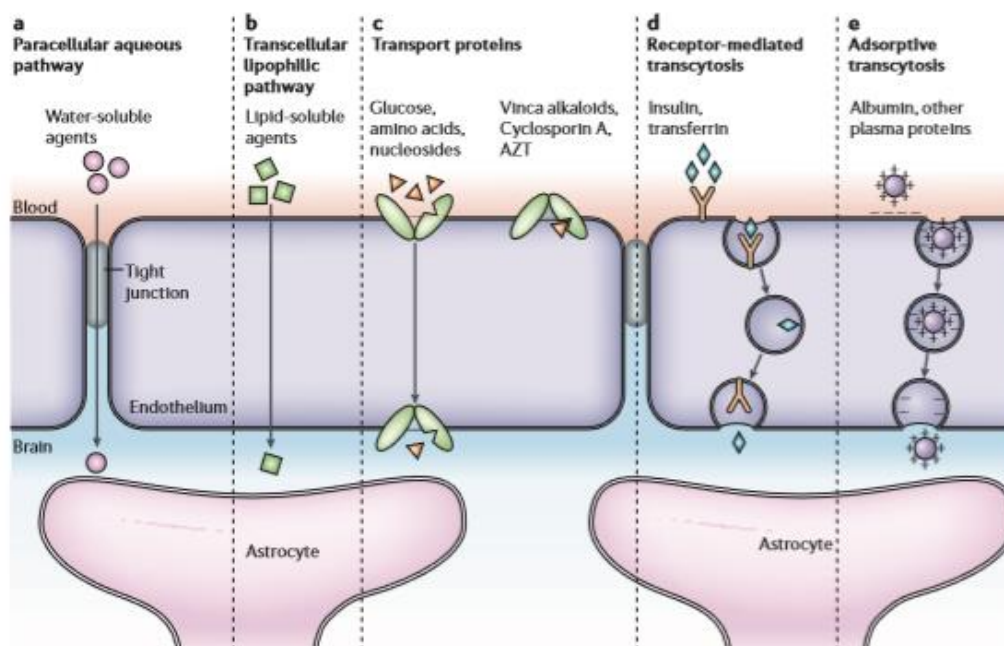


Abbildung 3: Transportwege der Blut-Hirn Schranke: In der Abbildung werden die wichtigsten Transportwege der Blut-Hirn Schranke, welche von den Endothelzellen gebildet wird und deren Assoziation mit den Astrozyten schematisch dargestellt. **a** Parazellulärer Transport von hydrophilen Verbindungen wird durch Tight Junctions stark eingeschränkt. **b** Transzellulärer Transport (Passive Diffusion) von lipophilen Substanzen. **c** Transportproteine: Efflux Transporter (ABC-Transporter) können passiv-durchdringende Substanzen abfangen und wieder aus der Endothelzelle heraus-pumpen (Vinca Alkaloide, Cyclosporin A, Azidothymidin); Influx Transporter (Carriers) können den Transport von Molekülen, wie Glukose, Aminosäuren und Nukleosiden in das ZNS begünstigen. **d** Rezeptorvermittelte Transzytose: Durch Bindung von Liganden (Insulin, Transferrin) an Rezeptoren können diese Substanzen durch das Endothel transportiert werden. **e** Adsorptive Transzytose: native Plasmaproteine, wie Albumin können durch Kationisierung durch das Endothel transportiert werden. AZT=Azidothymidin (Abbott, Rönnbäck, & Hansson, 2006), Bildrechte mit dem Verlag Springer Nature unter der Lizenznummer 4472530083485 geklärt.

1.2.3 Die Blut-Hirn Schranke und assoziierte Erkrankungen

Es gibt eine Vielzahl von ZNS-Pathologien, die mit einer Blut-Hirn Schranken Dysfunktion in Verbindung gebracht werden (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010). Die Barriere-Dysfunktion kann von leichten und transienten Tight Junction-Öffnungen bis zu chronischem Barriereabbau reichen. Es können auch Veränderungen in Transportsystemen und Enzymen auftreten (Förster, 2008).

Zu den ZNS-Erkrankungen, in denen eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke vorliegt, zählen unter anderem:

- Multiple Sklerose (Correale & Villa, 2007)
- Hypoxie und Ischämie (Kaur & Ling, 2008)
- Ödeme (Rosenberg & Yang, 2007)
- Parkinson und Alzheimer (Desai, Monahan, Carvey, & Hendey, 2007)
- Epilepsie (Remy & Beck, 2006)
- Gehirntumore (Bronger, et al., 2005)
- Glaukom (Grieshaber & Flammer, 2007)
- Lysosomale Speicherkrankheit (Begley, Pontikis, & Scarpa, 2008)

In den meisten Fällen ist es nicht möglich, zu bestimmen, ob die Barriere-Dysfunktion beim Ausbruch der Krankheit kausal mitwirkt. Es kann jedoch beobachtet werden, dass die Barriere-Dysfunktionen zur Entwicklung der Pathologien beitragen beziehungsweise sie verschlimmern (Persidsky, Ramirez, Haorah, & Kanmogne, 2006). Es ist von enormer Bedeutung, bessere Diagnosemethoden zu entwickeln, um die genaue Lokalisation der Barriere-Dysfunktion zu identifizieren, da eine frühe Behandlung den Krankheitsverlauf und die Symptomatik verbessern kann (Abbott, Rönnbäck, & Hansson, 2006).

2 Zielsetzung

Die Arbeit gliederte sich grob in zwei große Arbeitsbereiche:

Die Arbeit im Bereich der Tierversuche (*in vivo*) und die Arbeit im Bereich der Zellkulturversuche (*in vitro*). Im Vordergrund stand die Untersuchung wichtiger Blut-Hirn Schranken Marker auf Proteinebene.

2.1 Tierversuche (*in vivo*)

In diesem Teilbereich erstreckte sich das Ziel auf die Zucht und Betreuung von MeCP2-KO Mäusen und die anschließende Untersuchung der Expression von wichtigen Blut-Hirn Schranken Marker in Wild-Typ und MeCP2-KO Mäusen, um mögliche Unterschiede der Blut-Hirn Schranke im Rett-Syndrom zu identifizieren.

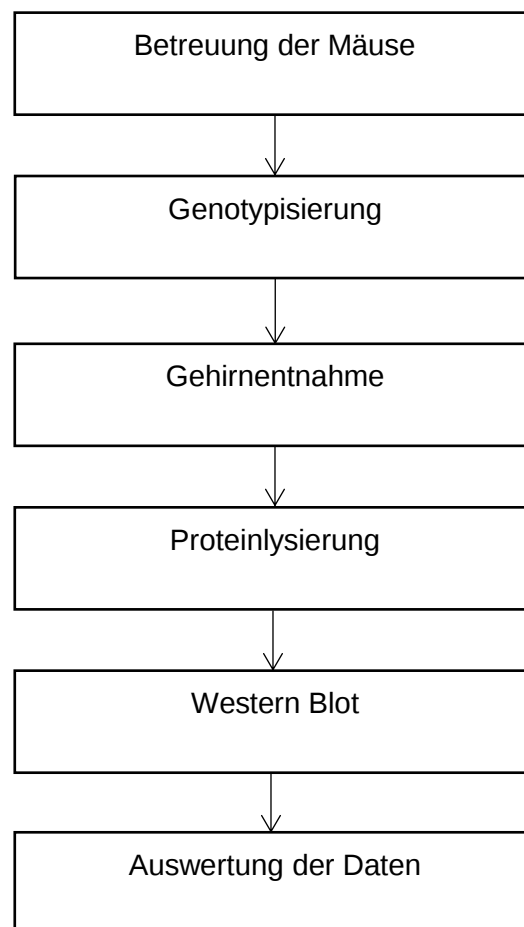


Abbildung 4: Überblick der *in vivo* Arbeitsschritte.

2.2 Zellkulturversuche (*in vitro*)

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass das MeCP2-Protein auch in Mausgehirnendothelzellen (isolierte Primärzellen und cerebEND's) vorliegt.

In diesem Teilbereich waren die Ziele die Entwicklung und Etablierung eines siRNA knock-down Protokolls und die anschließende Überprüfung, ob der knock-down von MeCP2 einen Einfluss auf die Expression von Blut-Hirn Schranken Markern (Tight Junction-Proteine) hat.

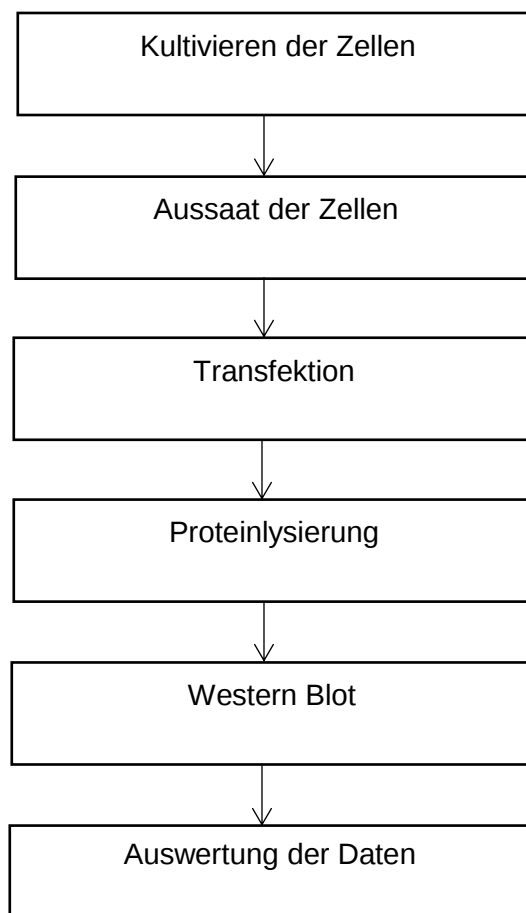


Abbildung 5: Überblick der *in vitro* Arbeitsschritte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In dieser Arbeit wurden folgende Materialien und Geräte verwendet:

Reagentien:	Firma / Produktnummer
A	
APS	Sigma / A3678
B	
β -Mercaptoethanol	Sigma / M3148
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific / 23228
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific / 1859078
Borsäure	Sigma / B6768
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich / B0126
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma / A9647
C	
Chemiglow Luminol Solution	Proteinsimple / 60-12596-00
Chemiglow Peroxid Puffer	Proteinsimple / 60-12596-00
D	
DPBS	Gibco / 14190-094
DMEM, high glucose	Sigma / D5796

E

EDTA-Na₂ Sigma / E5134

F

FBS (Fetal Bovine Serum) Sigma / F9665

G

Gelatine Serva / 22151.02

Glycerin Sigma / G2025

Glycin Sigma / S0046

I

Igepal Sigma-Aldrich / I3021

Interferin Polyplus / 409-10

Isopentan 2-Methylbutane Sigma / M32631

Isopropanol Fluka Analytical / 34965

K

KCl Merck / 1 049 361 000

KH₂PO₄ Merck / 1 048 771 000

L

LE Agarose Biozym / 840004

M

Methanol	Roth / T909.1
Midori Green Advance	Biozym / 617004
Milchpulver	Maresi / 115710-01

N

Na-deoxycholat	Sigma-Aldrich / D6750
Na ₂ HPO ₄	Merck / 1 065 801 000
Na-Azid	Sigma / S2002
NaCl	Sigma / S3014
Non-targeting siRNA	Thermo Scientific Dharmacon / D-001810-01-05

O

ON-TARGETplus Mouse MeCP2 siRNA	Dharmacon / L-0440034-01
---------------------------------	--------------------------

P

Page Ruler	Thermo Scientific / 26616
PenStrep, 100x	Gibco / 15140-122
peqGOLD Protein Marker V	Peqlab / 27-2210
PIC (Protease Inhibitor Cocktail)	Thermo Scientific / 1861278
Ponceau-Red	Sigma / S78376
Pro Siev Gel Solution	Lonza / 50618

R

RNase free Buffer (5x)

Thermo Scientific /
B-002000-UB-100

RNase free water (steril)

Sigma / W3500-1L

S

SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)

Calbiochem / 428023

T

TEMED

Merck / 1 107 320 100

Tricin

Sigma / T0377

TRIS

Sigma / T6066

Tween 20

Sigma / P9416

Trypsin

Gibco / 25300-054

Kits:

BCA Protein Assay Kit

Thermo Scientific / 23227

DNeasy Blood and Tissue Kit

Qiagen / 69506

Antikörper:

Primäre Antikörper:

Antigen	Spezies	Verdünnung	Klonalität	Firma / Produktnummer
MeCP2	Kaninchen	1:400	Monoklonal	Cell Signaling / 3456S
Claudin-5	Kaninchen	1:100	Monoklonal	Life Technologies / 341600
Occludin	Kaninchen	1:100	Monoklonal	Life Technologies / 711500
ZO-1	Kaninchen	1:100	Polyklonal	Thermo Scientific / 40-2300
MAP2	Maus	1:1000	Polyklonal	Merck Millepore / MAB 3418
S100 β	Kaninchen	1:1000	Monoklonal	Abcam / ab52642
GFAP	Kaninchen	1:100	Polyklonal	Dako / Z0334
GAPDH	Maus	1:2000	Monoklonal	Temecula / MAB 374
α - β Tubulin	Maus	1:1500	Monoklonal	Sigma / T4026
β -Actin	Maus	1:30000	Monoklonal	Sigma / A2854-200UL

Tabelle 2: Übersicht der in der Arbeit verwendeten primären Antikörper.

Sekundäre Antikörper:

Antigen	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Firma / Produktnummer
Maus IgG	Pferd	Meerrettich-Peroxidase	1:10000	Cell Signaling / 7076S
Kaninchen IgG	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1:10000	Cell Signaling / 7074S

Tabelle 3: Übersicht der in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper.

Medien:**DMEM++**

DMEM, high glucose	445 mL
FBS	50 mL
PenStrep, 100x	5 mL

Selbsthergestellte Lösungen und Puffer:**10x PBS**

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	9,6 g
KH ₂ PO ₄	2 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL

1x PBS

10x PBS	100 mL
ddH ₂ O	ad 1000 mL

1x PBS/0,1% Tween 20

Tween 20	1 mL
10x PBS	100 mL
ddH ₂ O	ad 1000 mL

5% Milchpulver in 1xPBS/0,1% Tween 20

Milchpulver	5 g
1x PBS/0,1% Tween 20	100 mL

1M TRIS-HCl pH 6,8

TRIS	121 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL
pH-Wert einstellen auf 6,8 mit HCl 10%	

1M TRIS pH 8

TRIS	24,228 g
ddH ₂ O	ad 200 mL
pH-Wert einstellen auf 8 mit HCl 10%	

10% SDS-Lösung

SDS	10 g
ddH ₂ O	ad 100 mL

20% SDS-Lösung

SDS	20 g
ddH ₂ O	ad 100 mL

RIPA-Puffer

1M TRIS pH 8	12,5 mL
NaCl	2,19 g
20% SDS-Lösung	1,25 mL
Na-deoxycholat	1,25 g
Igepal	2,5 mL
ddH ₂ O	ad 250 mL

10x TRIS/TRICIN Puffer

TRIS	121 g
TRICIN	179 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL

10x TRIS/Glycin Puffer

TRIS	30 g
Glycin	144 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL

Elektrophorese Puffer

10x TRIS/TRICIN Puffer	100 mL
10% SDS-Lösung	10 mL
ddH ₂ O	ad 1000 mL

Blot Puffer

10x TRIS/Glycin Puffer	100 mL
Methanol	200 mL
10% SDS-Lösung	200 µL
ddH ₂ O	ad 1000 mL

Stripping Puffer

SDS	10 g
TRIS-HCl	31,5 mL
ddH ₂ O	ad 500 mL
β-Mercaptoethanol	71,6 µL/10 mL frisch zugeben

6x Sample Puffer

TRIS-HCl	7 mL
Glycerol	6 mL
SDS	2 g
Bromphenol Blau	2,4 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL
β-Mercaptoethanol	5% frisch zugeben

10x TBE

TRIS	108 g
Borsäure	55 g
EDTA-Na ₂	9,3 g
ddH ₂ O	Ad 1000 mL

0,5x TBE

10x TBE

50 mL

ddH₂O

ad 1000 mL

PCR-Primer für die MeCP2 Genotypisierung:

Primer	Sequenz 5'→3'	Primer Typ	Firma / Aufreinigung
9875	AAA TTG GGT TAC ACC GCT GA	Common	Eurofins / HPSF, HPLC+PAGE
9877	CCA CCT AGC CTG CCT GTA CT	Mutant Reverse	
oIMR7172	CTG TAT CCT TGG GTC AAG CTG	Wild Typ Reverse	

Tabelle 4: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Primer bei der Genotypisierung.

Zellen:

Mausgehirnendothelzellen cerebEND

AIT, Wien, Österreich; großzügige Überlassung von Professor Carola Förster, Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland (Förster, et al., 2005)

Mäuse:

Mäuse	Bezeichnung	Firma / Produktnummer
MeCP2 Knock-out Mäuse	B6.129P2(C)-Mecp2 ^{tm1.1Bird} /J	The Jackson Laboratory / 000664
Wild-Typ Mäuse	C57BL6/J	The Jackson Laboratory / 003890

Tabelle 5: Genaue Bezeichnung der verwendeten MeCP2-KO und WT-Mäuse.

Tierversuchsantragsnummer

Genehmigungszahl:

66.009/0218-II/10b/2008

Geräte:	Bezeichnung / Firma / Produktnummer
A	
Agarose-Gelelektrophorese	Mupid®-One / Advance / 071249
B	
Bead Bath	Lab Armor / Sheldon Manufacturing / 07020016
C	
CASY	CASY Model TT / Schärfe System / TT-2CA-1066
G	
Gelelektrophorese-/Blotting-Apparatur	Mini PROTEAN® Tetra System / BioRad / 552BR192447
I	
Imager (Agarose-Gelelektrophorese)	FluorChem HD2 protein simple / Biozym
Imager (Western Blot)	ChemiDOC / BioRad
Inkubator (Labor)	Typ UT 6060 / Heraeus instruments / 95111946
Inkubator (Zellkultur)	CO2 Inkubator Modell CB210 / Binder / 9040 0040

K

Kühlraum (4°C)	Echberger & Co
Kühlschrank (4°C)	Comfort / Liebherr
Kühlschrank (-20°C)	Premium / Liebherr
Kühlschrank (-80°C)	Forma 900 Series / Thermo Scientific / 814566-3274

L

Laborroller	Roller 6 basic / IKA / 1001 3035
Lichtmikroskop	Primo Vert AxioCam ERc 5s / Carl Zeiss Microscopy / 426540-9901-000

M

Mikrowelle	AKL 526 / IGNIS / 8541 526 30221
------------	----------------------------------

S

Schwenkplatte	Typ 3014 / GFL / 1023 6114 H
Sterilwerkbank	Biowizard Silver LINE / Kojair / 025969

T

Thermocycler	Gene Amp® PCR System 9700PE / Applied Biosystems
Thermomixer	Thermomixer comfort / Eppendorf / 5355 01990

U

UV-Spektrometer	Synergy HT / BioTek / 238 255
-----------------	-------------------------------

W

Wasserbad

Typ 1083 / GFL / 1130 8096 J

Z

Zentrifuge (für Eppendorf Gefäße)

Centrifuge 5415R / Eppendorf /
153328

Zentrifuge (für Zentrifugenröhrchen)

3-18ks Tischzentrifuge / Sigma / 10370

3.2 Methoden

3.2.1 Betreuung und Überwachung der Mäuse

Insgesamt wurden neun MeCP2-KO Mäuse und neun Wild-Typ Mäuse (insgesamt 18 Mäuse) über ein Jahr betreut. Die Mäuse wurden aus dem Tierstall des Allgemeinen Krankenhauses Wiens erhalten und danach im Mäusestall des Instituts für medizinische Genetik Wien weiter betreut (Tierversuchsantragsnummer: Genehmigungszahl 66.009/0218-II/10b/2008).

Die Haltung der Mäuse erfolgte in konventionellen Käfigen für Kleinnagetiere (Tecniplast). Einmal pro Woche wurden die Käfige gereinigt und mit neuer Einstreu ausgebettet und die Mäuse mit frischem Wasser und Futter versorgt. Den Mäusen war es stetig möglich, an Essen und Wasser zu gelangen. Zusätzlich wurden die Käfige mit einer Klopapierrolle und Zellstoff als Spielmöglichkeit versehen.

Hinsichtlich der Hygiene durfte der Tierstall nur mit Überschuhen, Handschuhen und einem frischen Kittel betreten werden.

Beurteilung der Mäuse:

Bevor die Mäuse getötet und die Gehirne für weitere Versuche entnommen wurden, sollten alle MeCP2-KO Mäuse ein ähnliches phänotypisches Fortschreiten der Krankheit aufweisen - die dazugehörigen Wild-Typ Mäusepaaren wurden dabei gleich behandelt. Aus diesem Grund mussten alle MeCP2-KO und Wild-Typ Mäuse dreimal die Woche gewogen und auf das Auftreten von Claspings beurteilt werden. Hierzu wurde eine Liste mit Gewichtsverläufen angelegt. Die Mäusepaare 1-6 stammten dabei aus demselben Wurf – die Mäusepaare 7-9 wurden nicht aus demselben Wurf herangezogen (siehe Tabelle 11).

Bei einem Gewichtsverlust von ~1g zwischen den einzelnen Wägungen und dem Auftreten von Claspings wurde die MeCP2-KO Maus getötet und das Gehirn entnommen. Als Referenz musste auch das Gehirn einer gleichaltrigen Wild Typ Maus entnommen werden.

3.2.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung ist eine molekulargenetische Untersuchungsmethode, bei dem der Genotyp eines Labortieres untersucht wird. Dieses Verfahren diente zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit spezifischer DNA-Sequenzen im Genom der Maus.

Die Schritte der Genotypisierung unterteilten sich in Isolierung und Aufreinigung der DNA und die anschließende Quantifizierung der DNA mittels einer PCR (Polymerase Kettenreaktion).

3.2.2.1 Gewebeentnahme und DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) durchgeführt:

Zu Beginn wurde ein Gewebestück der Maus durch Stechen eines Ohrlochs entnommen. Das Gewebestück wurde anschließend mit einem Skalpell in einer Petrischale in kleine Stücke geschnitten und mit 180 µL Puffer ATL in einem 1,5 mL Eppendorf Gefäß aufgenommen. Nach Zugabe von 20 µL Proteinkinase K wurde das 1,5 mL Eppendorf Gefäß kurz gevortext und danach für etwa 20 Stunden auf dem Thermomixer bei 56°C und 300rpm inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das 1,5 mL Eppendorf Gefäß weitere 15 Sekunden gevortext. Danach wurden 200 µL Puffer AL und 200 µL 96% Ethanol hinzugefügt und noch einmal gevortext. Die Mischung wurde anschließend auf eine DNeasy mini spin column pipettiert und die Säule auf ein 2 mL Eppendorf Gefäß gesetzt. Nun musste das 2 mL Eppendorf Gefäß mit der aufgesetzten Säule eine Minute bei 6000g zentrifugiert werden. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule auf ein neues 2 mL Eppendorf Gefäß gesetzt. Danach wurden 500 µL Puffer AW1 auf die Säule pipettiert und erneut eine Minute bei 6000g zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen und die Säule auf ein neues 2 mL Eppendorf Gefäß gesetzt. Nun musste 500 µL Puffer AW2 auf die Säule pipettiert werden und fünf Minuten bei 16000g zentrifugiert werden. Das Filtrat wurde ein letztes Mal verworfen und die Säule auf ein neues, beschriftetes 1,5 mL Eppendorf Gefäß gesetzt. Anschließend wurden 100 µL Puffer AE direkt auf die Membran der Säule pipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Das 1,5 mL Eppendorf Gefäß mit der Säule musste daraufhin eine Minute bei 6000g zentrifugiert werden. Dieses Mal wurde die Säule verworfen. Das 1,5 mL Eppendorf Gefäß enthielt nun 100 µL der isolierten DNA und wurde bis zur weiteren Analytik bei -20°C im Kühlschrank gelagert.

3.2.2.2 PCR – Polymerase Kettenreaktion

Nachdem die DNA der Mäuse isoliert und aufgereinigt wurde, konnten die spezifischen DNA-Sequenzen, die von Interesse für die Untersuchung waren, mittels der Polymerasen Kettenreaktion vervielfältigt werden.

Vorbereitung der Reaktionsmischung:

Für jede extrahierte DNA der Maus wurde folgende Reaktionsmischung angelegt:

1,00 µL	Nuclease-free water
1,00 µL	Primer 9875 (100µM Stockkonzentration)
1,00 µL	Primer 9877 (100µM Stockkonzentration)
1,00 µL	Primer oIMR7172 (100µM Stockkonzentration)
6,00 µL	QIAGEN Hot Star Master Mix
10,00 µL	Reaktionsmischung

Zu dieser hergestellten 10 µL Reaktionsmischung wurden nun jeweils 2 µL der extrahierten DNA der Maus hinzugefügt und alles in einem PCR-Reaktionsgefäß gesammelt.

Die Primer wurden verwendet, um jeweils den Startpunkt auf den beiden DNA-Einzelsträngen für die DNA-Synthese festzulegen:

F-Primer: 9875 (Common)
R-Primer: 9877 (Mutant Reverse)
oIMR7172 (Wild-Typ Reverse)

Der QIAGEN Hot Star Master Mix beinhaltet eine Taq DNA Polymerase, einen PCR Puffer mit MgCl₂ und eine dNTP-Mischung.

Ablauf und Prozess der PCR:

Nachdem die Reaktionsmischungen mit den jeweiligen DNA-Proben der Mäuse vorbereitet wurden, konnten die Proben in einem Thermocycler platziert werden. Mit Hilfe des

Thermocyclers konnten die unterschiedlichen Reaktionen, die die PCR-Proben bei verschiedenen Temperaturen durchlaufen mussten, automatisch durchgeführt werden.

Folgendes PCR-Programm wurde dabei im Thermocycler eingestellt:

95°C	15 Minuten	
95°C	30 Sekunden	} 35x
51°C	40 Sekunden	
72°C	50 Sekunden	
72°C	10 Minuten	
4°C	Abkühlen	

Abschließend kühlte der Thermocycler, nach Vollendung aller Zyklen, die PCR-Produkte auf 4°C ab, welches eine Lagerung und Weiterverwendung der Proben gewährleistete.

3.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Herstellung von Agarosegelen 2% (zwei Gele):

Es wurden 2 g Agarose in einem Erlenmeyer-Kolben eingewogen und 100 mL TBE 0,5x hinzugefügt. Die Mischung musste daraufhin zwei bis drei Minuten in der Mikrowelle erhitzt werden, bis die Agarose völlig gelöst war. In der Zwischenzeit konnten die gewaschenen Gelträger in den Gelkammern platziert und die Kämme eingesetzt werden. Anschließend wurden 6 µL Midori Green in das noch flüssige Gel pipettiert und durch Schwenken vermischt. Midori Green ist ein Farbstoff, der zum Anfärben von DNA-Fragmenten verwendet wird. Das Gel konnte dann in die bereits vorbereiteten Gelträger gegossen werden. Nach dem Aushärten des Gels (etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur) konnten die Kämme entfernt werden.

Ablauf und Prozess der Agarose-Gelelektrophorese:

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäure-Stränge (DNA) nach ihrer Größe aufgetrennt werden und mit DNA-Strängen bereits bekannter Größe verglichen werden. Nachdem die Kämme gleichmäßig entfernt wurden, wurde der Gelträger mit dem

ausgehärteten Gel in die Agarose-Gelelektrophorese übertragen. Anschließend wurde TBE 0,5x als Laufpuffer hinzugefügt. Es wurde nun je 7 µL Reaktionsmischung mit den jeweiligen DNA-Produkten und ein Marker (Gene Ruler / Thermo Scientific / #SM1333) in die Kammern des Agarosegels aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde anschließend bei 135 V und der Laufzeit von 30 Minuten gestartet.

3.2.2.4 Detektion

Nachdem das Gel fertig gelaufen war, konnten die DNA-Fragmente auf dem Gel detektiert werden. Die Detektion wurde mit Hilfe eines Imagers durchgeführt. Das Gel wurde aus dem Gelträger entfernt, mit ddH₂O gereinigt und luftblasenfrei auf einer Glasplatte im Imager platziert. Anschließend wurde durch Einstellung des Programms Alpha View-FluorChem HD2 und Auswahl von „Acquire“ ein Bild angefertigt und auf einen USB-Stick übertragen. Durch Betrachten des Gels unter UV-Licht konnten die Banden der DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden:

Bande bei 240bp: Mutant (MeCP2-KO)

Banden bei 240bp + 465bp: Heterozygote

Bande bei 465bp: Wild-Typ (MeCP2 vorhanden)

3.2.3 Gehirnentnahme

Nachdem eine MeCP2-KO Maus bei der Beurteilung einen Gewichtsverlust von ~1 g seit der letzten Wägung aufwies und Anzeichen von Claspings zeigte, wurde sie und die dazugehörige WT-Maus getötet und das Gehirn entnommen.

Vorgehensweise:

Zuerst wurde die Maus durch Brechen des Genicks (mit Hilfe einer Pinzette zum Runterdrücken am Genick) getötet und mit den vier Beinen, mit Hilfe von Nadeln, auf einer Styroporbox befestigt. Anschließend wurde die Maus mit 70% Ethanol besprüht und die Haut auf ihrem Oberkopf mit einer Schere entfernt. Es wurden die seitlichen Knochen bei den Ohren mit einer Schere durchgeschnitten und die Schädeldecke vorsichtig entfernt. Zum

Fixieren des Kopfes konnte eine Pinzette verwendet werden. Wichtig dabei war, dass man das Gehirn nicht mit der Schere oder Pinzette verletzte. Nachdem die Schädeldecke entfernt wurde, musste das Gehirn mit einem Löffel vorsichtig herausgehoben werden. Das Gehirn wurde gleich darauf in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen mit eiskaltem 1xPBS gegeben und kurz gewaschen. Nun wurde das Gehirn sorgfältig in der Hälfte mit einem Skalpell geteilt. Die Gehirnhälften wurden anschließend auf einem Parafilm platziert und für drei Minuten, in -80°C auf Trockeneis gekühlten Isopentan, schockgefroren.

Die gefrorenen Gehirnhälften wurden letztendlich in beschriftete Alufolie gewickelt, in extra beschriftete Säckchen verpackt und bei -80°C gelagert.

3.2.4 Isolierung von Proteinen aus Mäusegehirnen

Zuerst wurde in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen eine Mischung von RIPA-Puffer und PIC(100x) hergestellt und auf Eis gestellt. 1,5 mL Eppendorf Gefäße und 15 mL Zentrifugenröhrchen wurden, mit der jeweiligen Bezeichnung der Gehirne, beschriftet und ebenfalls auf Eis gestellt. Alle Arbeitsschritte mussten in der Kälte auf Eis durchgeführt werden, da die Gehirne und die darin enthaltenen Proteine temperaturempfindlich waren (siehe Abbildung 6).

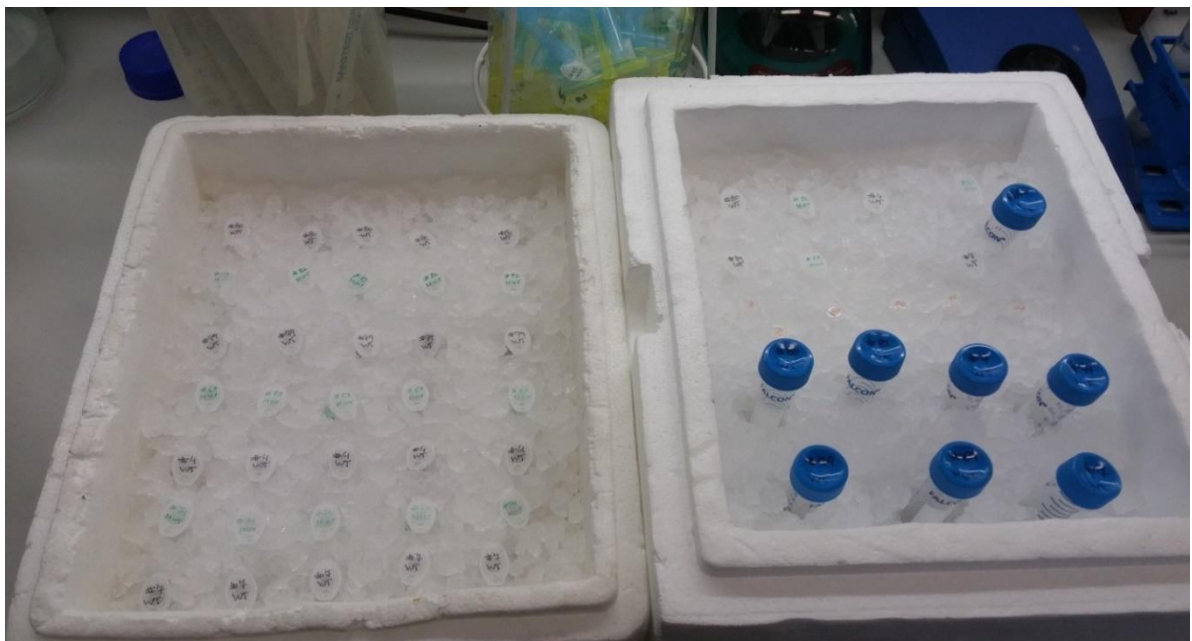


Abbildung 6: Organisation und Beschriftung der 1,5 mL Eppendorf Gefäße und 15 mL Zentrifugenröhrchen bei der Isolierung von Proteinen aus Mäusegehirnen.

Jeweils eine Gehirnhälfte wurde nun in ein tariertes und beschriftetes 1,5 mL Eppendorf Gefäß gegeben und das Gewicht bestimmt. Es wurde dabei darauf geachtet, immer einheitlich die linke Gehirnhälfte zu verwenden. Die Gehirnhälften wurden anschließend in 800 μ L RIPA/PIC aufgenommen und mit einem Mikropistill (Eppendorf, #0030 120.973) zerkleinert (siehe Abbildung 7).

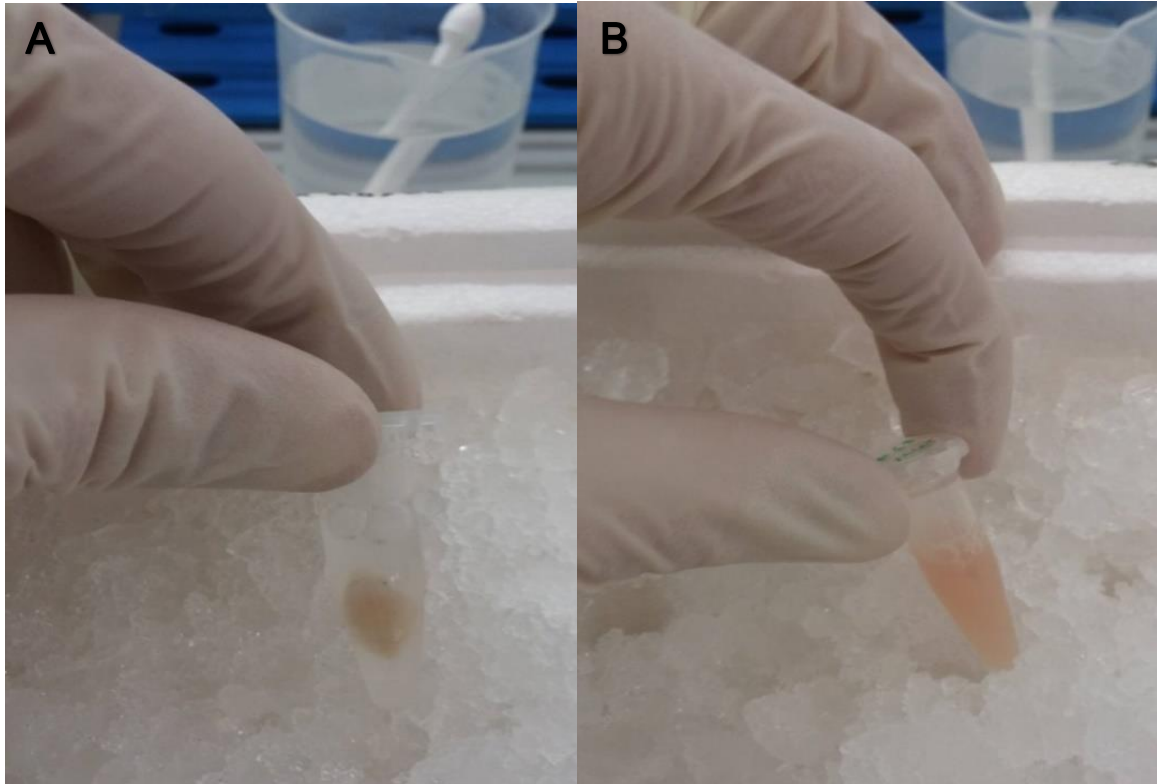


Abbildung 7: Gehirnhälfte in RIPA/PIC vor der Zerkleinerung (A) und nach der Zerkleinerung (B) mit dem Mikropistill.

Das 1,5 mL Eppendorf Gefäß wurde immer wieder zwischen der Zerkleinerung mit dem Mikropistill gevortext, um eine gute Homogenisierung zu gewährleisten. Insgesamt sollte 1 mL RIPA/PIC pro 160 mg Gehirn vorliegen. Daher wurde das entsprechende RIPA/PIC-Puffervolumen in den 1,5 mL Eppendorf Gefäßen mit den jeweiligen Gehirnhälften angepasst. Da die Gehirnhälfte der #78 MeCP2-KO Maus nur 122 mg wog, wurde hier kein RIPA/PIC-Puffervolumen ergänzt (siehe Tabelle 6).

Nummer	Genotyp	Gewicht der Gehirnhälfte [mg]	+RIPA/PIC [µL]	Proteinkonzentration nach BCA-Methode [µg/µL]
#1	Wild Typ	212	525	13,38
#2	MeCP2-KO	146	112,5	13,61
#4	Wild Typ	230	637,5	11,94
#6	MeCP2-KO	160	200	12,64
#8	Wild Typ	212	525	13,71
#9	MeCP2-KO	168	250	13,82
#10	MeCP2-KO	174	287,5	15,43
#11	Wild Typ	148	125	14,48
#12	Wild Typ	194	412,5	12,70
#69	MeCP2-KO	152	150	14,64
#71	MeCP2-KO	168	250	13,46
#77	Wild Typ	174	287,5	14,84
#78	MeCP2-KO	122	0	13,56
#79	Wild Typ	232	650	12,18
#80	Wild Typ	212	525	13,41
#82	MeCP2-KO	202	462,5	13,01

Tabelle 6: Gewicht der einzelnen Gehirnhälften mit zu ergänzendem RIPA/PIC-Puffervolumen und der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode (siehe Punkt 3.2.8.1).

Danach wurde das Lysat in ein beschriftetes und gekühltes 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt, das 1,5 mL Eppendorf Gefäß mit dem jeweils zu ergänzendem RIPA/PIC-Puffervolumen kurz gespült, gevortext und danach zu dem 15 mL Zentrifugenröhrchen hinzugefügt. Nachdem alle Lysate in den 15 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt und mit dem entsprechendem RIPA/PIC-Puffervolumen ergänzt wurden, mussten die 15 mL Zent-

rifugenröhrchen zehn Minuten bei 4°C, 2000g zentrifugiert werden. Nach erfolgreicher Zentrifugation sollte sich ein Pellet am Boden des 15 mL Zentrifugenröhrchens gebildet haben. Der Überstand (=Lysat) wurde vorsichtig mit einer Kolbenhubpipette abgehoben und in einem beschrifteten 1,5 mL Eppendorf Gefäß gesammelt.

Schlussendlich wurden die Lysate in weitere 1,5 mL Eppendorf Gefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.5 Kultivierung von Mausgehirnendothelzellen

Die cerebEND Zellen wurden einmal pro Woche subkultiviert und an jedem zweiten/dritten Tag (Montag, Mittwoch, Freitag) das Medium gewechselt und die Konfluenz durch ein Lichtmikroskop beurteilt.

3.2.5.1 Beurteilung der Konfluenz

Bevor die Zellen einmal pro Woche gesplittet werden konnten, mussten sie eine ausreichende Konfluenz aufweisen und dabei einen dichten Zellrasen bilden. Dies wurde durch Betrachten der Zellen unter einem Lichtmikroskop beurteilt.

Morphologische Merkmale der cerebEND Zellen unter dem Lichtmikroskop bei vollständiger Konfluenz:

- Schmales, dünnes und längliches Aussehen
- Bilden konzentrische Kreise

In Abbildung 8 kann man die morphologischen Merkmale bei vollständiger Konfluenz unter dem Lichtmikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen erkennen.

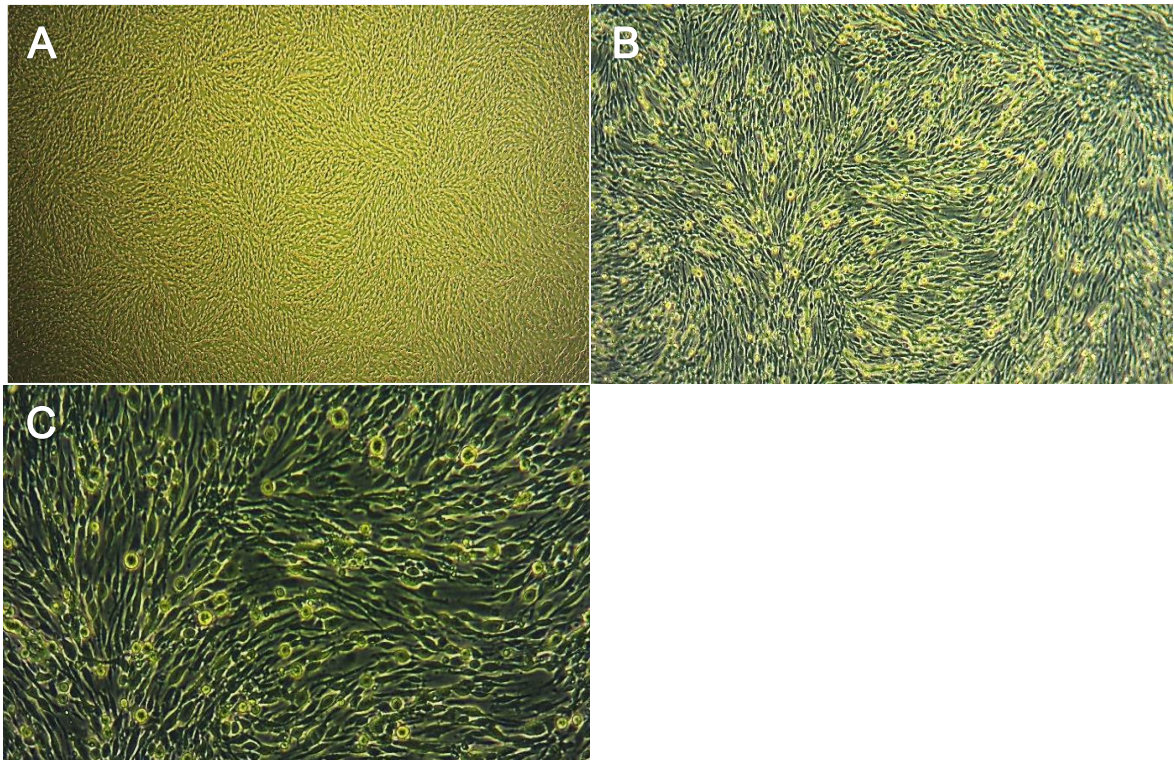


Abbildung 8: CerebEND Zellen bei vollständiger Konfluenz im Lichtmikroskop: 4xVergrößerung (A), 10xVergrößerung (B) und 20xVergrößerung (C).

3.2.5.2 Subkultivieren

Nachdem die Konfluenz der Zellen beurteilt wurde, konnte mit dem Subkultivieren der Zellen begonnen werden. Dieser Vorgang diente zur Weitervermehrung oder zur Weiterverwendung der Zellen für neue Versuche. Alle Arbeitsschritte fanden in einer Sterilwerkbank statt.

Zu Beginn wurden 6 mL 0,5% Gelatine in eine neu vorbereitete T75-Kulturflasche hinzugefügt und die Gelatine durch Schwenken gleichmäßig am Boden verteilt. Die T75-Kulturflasche mit der Gelatine wurde anschließend mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Sterilwerkbank inkubiert. Dieser Vorgang wurde als „Coating“ bezeichnet. In der Zwischenzeit wurde das DMEM++ Medium und 0,05% Trypsin zirka 30 Minuten im Bead Bath bei 37°C vorgewärmt.

Nach Ablauf der 30 Minuten konnte die überschüssige Gelatine aus der T75-Kulturflasche abgesaugt werden. Das verbrauchte Medium wurde nun vorsichtig aus der T75-Kulturflasche abgesaugt und die Zellen anschließend dreimal mit 6 mL 1xDPBS gewaschen. Um den Zellrasen vom Boden der T75-Kulturflasche zu lösen, wurden 2 mL 0,05%

Trypsin in die T75-Kulturflasche hinzugefügt und durch Schwenken gleichmäßig am Boden verteilt. Die T75-Kulturflasche wurde für etwa vier Minuten bei 37°C im Inkubator inkubiert. Danach konnten, durch starkes Abklopfen auf dem Tisch an den Seitenrändern der T75-Kulturflasche, zusätzlich die Zellen vom Boden gelöst werden. Um sicherzugehen, dass die Zellen nicht mehr am Boden der T75-Kulturflasche hafteten, wurde dies unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Die vereinzelt Zellen nahmen eine runde, kugelförmige Gestalt an. Danach wurde 7 mL frisches DMEM++ Medium hinzugegeben, um die enzymatische Funktion des Trypsins zu stoppen. Durch häufiges Spülen der Zellsuspension über den Rasen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren fand eine ausreichende Resuspendierung statt. Im Anschluss wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet, indem 3 mL der Zellsuspension entnommen und in die neue, bereits mit Gelatine beschichtete T75-Kulturflasche gegeben wurden. Danach wurden 12 mL frisches DMEM++ Medium hinzugefügt und die T75-Kulturflasche in kreisenden Bewegungen geschwenkt, um eine bessere Verteilung der Zellen auf der mit Gelatine beschichteten T75-Kulturflasche zu gewährleisten.

Abschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ + 95% Luftfeuchtigkeit in den Inkubator gestellt.

3.2.5.3 Mediumswechsel

Das frische DMEM++ Medium wurde für zirka 30 Minuten im Bead Bath bei 37°C vorgewärmt, das alte, verbrauchte Medium vorsichtig aus der T75-Kulturflasche abgesaugt und durch 15 mL frisches DMEM++ Medium ersetzt. Dabei musste beim Zugeben des frischen Mediums darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht von der Flaschenwand abgespült wurden.

3.2.5.4 Aussaat

Für weitere Versuche mussten die Zellen in einer bestimmten Zellzahl in Wellplatten ausgesät werden, damit eine entsprechende Konfluenz bei der Transfektion erreicht wurde.

Die ersten Schritte waren gleich wie beim Subkultivieren. Nachdem die Trypsinisierung durch 7 mL DMEM++ Medium gestoppt und die Zellsuspension sorgfältig mit einer serologischen Pipette resuspendiert wurde, konnten etwa 200 µL der Zellsuspension mit einer

Pipette in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß überführt werden. Diese 200 µL Zellsuspension wurde nun für die Zellzahlbestimmung verwendet.

Zellzahl-Bestimmung:

Da für weitere Versuche eine bestimmte Zellzahl nötig war und die Zellen eine bestimmte Konfluenz bei den Transfektionen aufweisen mussten, wurde die Zellzahl mittels eines CASY bestimmt. Der CASY ist ein Gerät zur Zellzählung, mit der die genaue Zellzahl einer Suspension bestimmt werden kann.

Im bearbeiteten Fall sollte eine Zellzahl von $1,28 \times 10^5$ Zellen/mL angestrebt werden, wobei jeweils 3 mL/Well dieser Zellsuspension in einer 6-Wellplatte verteilt wurde, um letztendlich 40000 Zellen/cm² anzusetzen.

In einem Plastikröhrchen wurden 10 mL CASY tone und 50 µL der Zellsuspension gut vermischt und die Zellzählung im CASY gestartet. Nachdem das Gerät mehrere Messungen durchgeführt hatte, gab es dann die Zellzahl der Suspension an.

Beispiel für die Berechnung:

Durch CASY bestimmte Zellzahl der Suspension: $2,802 \times 10^6$

Zellzahl, die für weitere Versuche benötigt wurde: $1,28 \times 10^5$

$$\frac{2,802 \times 10^6}{1,28 \times 10^5} = 21,89 \longrightarrow \text{Verdünnungsfaktor}$$

Es sollte eine 6-Wellplatte mit 3 mL/Well befüllt werden:

$$1 \times 6 \times 3 = 18 \text{ mL} + 2 \text{ mL (Reserve)} = 20 \text{ mL} \rightarrow \text{benötigtes Volumen}$$

$$\frac{20}{21,89} = 0,913 \text{ mL Zellsuspension}$$

$$20 - 0,913 = 19,087 \text{ mL DMEM++ Medium}$$

Die genau vorgeschriebenen Volumina der Zellsuspension und des vorgewärmten DMEM++ Mediums wurden nun in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen zusammengemischt, um die gewünschte Zellkonzentration von $1,28 \times 10^5$ Zellen/mL zu erhalten.

Aussäen in einer 6-Wellplatte:

Die 6-Wellplatte wurde zuerst mit 1 mL 0,5% Gelatine pro Well beschichtet und für etwa 30 Minuten in der Sterilwerkbank stehen gelassen. Nach Ablauf der Zeit konnte die überschüssige Gelatine mit einer Pasteurpipette abgesaugt werden. Anschließend wurden jeweils 3 mL der vorher hergestellten Zellsuspension/Medium Mischung mit der Zellzahl $1,28 \times 10^5$ Zellen/mL auf jedes Well mittels einer Kolbenhubpipette aufgetragen. Es war wichtig, die Mischung vor dem Auftragen auf das jeweilige Well, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, zu resuspendieren. Am Ende wurde durch kreisende Schwenkbewegungen der 6-Wellplatte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen am Boden der Platte gewährleistet.

Im Anschluss wurde die 6-Wellplatte mit den Zellen wieder bei 37°C und 5% CO₂ + 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.6 MeCP2 siRNA knock-down

Für die Transfektion mittels siRNA mussten alle Arbeitsschritte in einer Sterilwerkbank durchgeführt werden.

3.2.6.1 siRNA Resuspension

Die siRNA wurde in Form eines trockenen Pellets in einem 1,5 mL Eppendorf Gefäß mit der Stoffmenge 5 nmol erhalten. Für die Resuspension wurden 250 µL RNase-freier steriler Puffer (1x) hinzugefügt, um eine Stocklösung von 20 nM herzustellen.

Das siRNA-Pellet wurde nun im 250 µL RNase-freien sterilen Puffer (1x) aufgenommen und mit einer Kolbenhubpipette mehrmals auf- und abpipettiert. Anschließend musste das 1,5 mL Eppendorf Gefäß 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Thermomixer verbringen. Nach Ablauf der Zeit wurde das 1,5 mL Eppendorf Gefäß kurz abzentrifugiert und die resuspendierte siRNA-Lösung in kleinere 0,2 mL Eppendorf Gefäße aliquotiert.

Abschließend wurden die aliquotierten 0,2 mL Eppendorf Gefäße mit der siRNA in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei -20 gelagert.

3.2.6.2 Durchführung der Transfektion

Zu Beginn wurde das DMEM++ Medium und das serumfreie Medium für zirka 30 Minuten im Bead Bath bei 37°C vorgewärmt. Das serumfreie Medium war DMEM, high glucose Medium ohne Zugabe von FBS und des Antibiotikums PenStrep. Die siRNA, die non-targeting siRNA und das Interferin wurden auf Eis gestellt und für die Transfektion vorbereitet. Es musste jeweils ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß pro Well vorbereitet und für die jeweils richtigen Transfektionsmischungen beschriftet werden, mit welchen die Wells nachher behandelt wurden. Das serumfreie Medium wurde in entsprechender Menge vorgelegt und danach die siRNA beziehungsweise non-targeting siRNA hinzugefügt. Am Ende wurde noch das Interferin in die entsprechenden 1,5 mL Eppendorf Gefäße beigegeben. Es war sehr wichtig, dass bei jedem Arbeitsschritt eine neue Pipettenspitze verwendet wurde. Alle 1,5 mL Eppendorf Gefäße mussten nun gut gevortext und danach zehn Minuten bei Raumtemperatur in der Sterilwerkbank inkubiert werden. Währenddessen konnte der Medienwechsel der 6-Wellplatte cerebEND's durchgeführt werden. Das alte, verbrauchte Medium wurde mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und jeweils 2 mL frisches DMEM++ Medium pro Well hinzugefügt. Nach der zehnminütigen Inkubation konnten die Transfektionslösungen auf die vorgesehenen Wells tropfenweise aufgebracht werden (siehe Abbildung 9).

Genaue Zusammensetzung der hergestellten Transfektionslösungen:

<u>Kontrolle 1:</u>	200 µL Serumfreies Medium
<u>Kontrolle 2:</u>	200 µL Serumfreies Medium
<u>1 nM siRNA:</u>	180 µL Serumfreies Medium +20 µL der Mischung (=10 nM siRNA) +8 µL Interferin
<u>10 nM siRNA:</u>	220 µL Serumfreies Medium +1,21µL siRNA (20µL dieser Mischung wurden zur Herstellung der oben angeführten 1 nM siRNA-Lösung verwendet und vor der Interferinzugabe abgenommen) +12 µL Interferin
<u>10 nM NT-siRNA:</u>	200 µL Serumfreies Medium +1,1 µL Non-targeting siRNA +12 µL Interferin
<u>Kontrolle + Interferin:</u>	200 µL Serumfreies Medium +8 µL Interferin

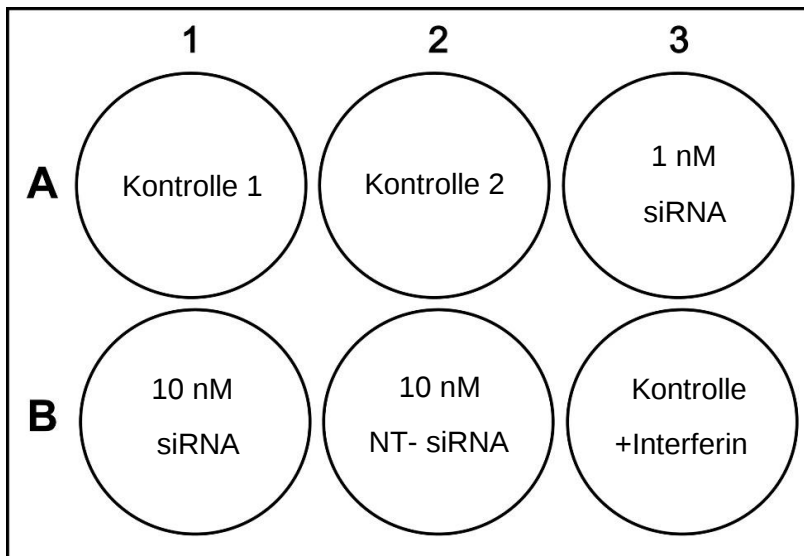


Abbildung 9: Beispiel für die Behandlung der einzelnen Wells bei der Transfektion von cerebEND Zellen.

Die Transfektionsmischungen wurden zusätzlich durch Schwenken der 6-Wellplatte gleichmäßig verteilt und die 6-Wellplatte danach bei 37°C und 5% CO₂ + 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Insgesamt wurden drei Transfektionen (an Tag 1, Tag 4 und Tag 6 nach der Aussaat) beim Versuch der Dreifachtransfektion durchgeführt (siehe Tabelle 7).

Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag	Montag	Dienstag	Mittwoch
Aussaat	1. Transfektion			2. Transfektion		3. Transfektion
Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag	Montag	Dienstag	
	Lysierung			Western Blot	Detektion	

Tabelle 7: Übersicht und Zeitplan des siRNA knock-downs bei der Dreifachtransfektion.

3.2.6.3 Beurteilung der Mausgehirnendothelzellen nach Transfektion

Das Wachstum der Zellen konnte in den Wells durch die Zugabe der einzelnen Transfektionslösungen (siRNA, non-targeting siRNA, Interferin) beeinflusst werden. Daher musste die Entwicklung der Zellen immer nach der Transfektion, mittels eines Lichtmikroskops, überprüft werden. Es wurden dabei immer die Kontroll-Wells mit dem Well, welches mit

10 nM siRNA behandelt wurde, miteinander verglichen, um zu sehen, ob die Zellen sich in der Entwicklung unterschieden (siehe Abbildungen 10-12).

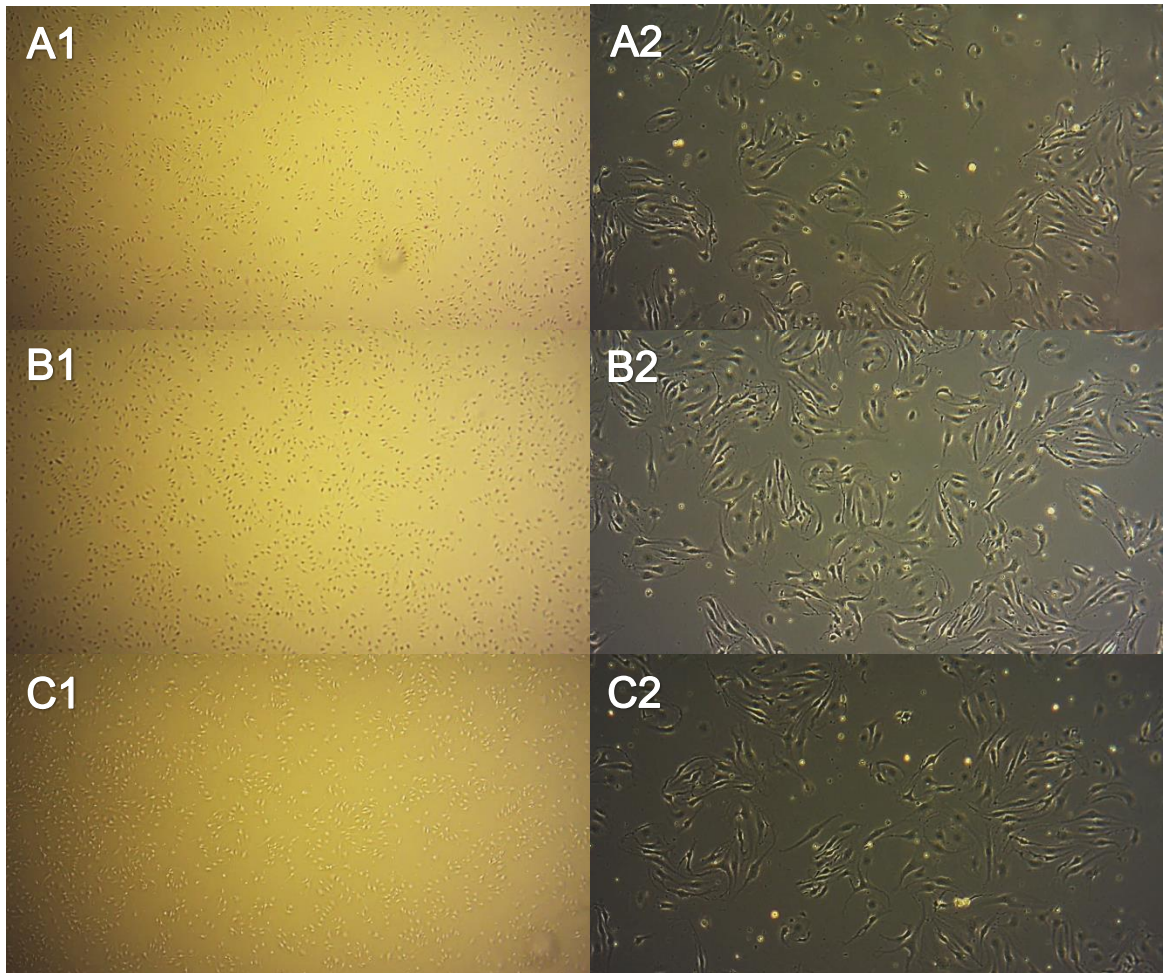


Abbildung 10: Beurteilung der cerebEND Zellen am Beispiel der Dreifachtransfektion nach der ersten Transfektion (nach Behandlung mit den Transfektionreagentien an Tag 1 nach der Aussaat); Kontroll-Well 1 in 4xVergrößerung (A1) und 10xVergrößerung (A2), Kontroll-Well 2 in 4xVergrößerung (B1) und 10xVergrößerung (B2), 10nM siRNA Well in 4xVergrößerung (C1) und 10xVergrößerung (C2).

Nach der 1. Transfektion entwickelten sich die Zellen, welche mit 10 nM siRNA behandelt wurden, sehr gut. Sie wuchsen adhärent, es gab wenig freischwimmende Zellen und auch das Wachstum war annähernd gleich, verglichen mit den beiden Kontroll-Wells (siehe Abbildung 10).

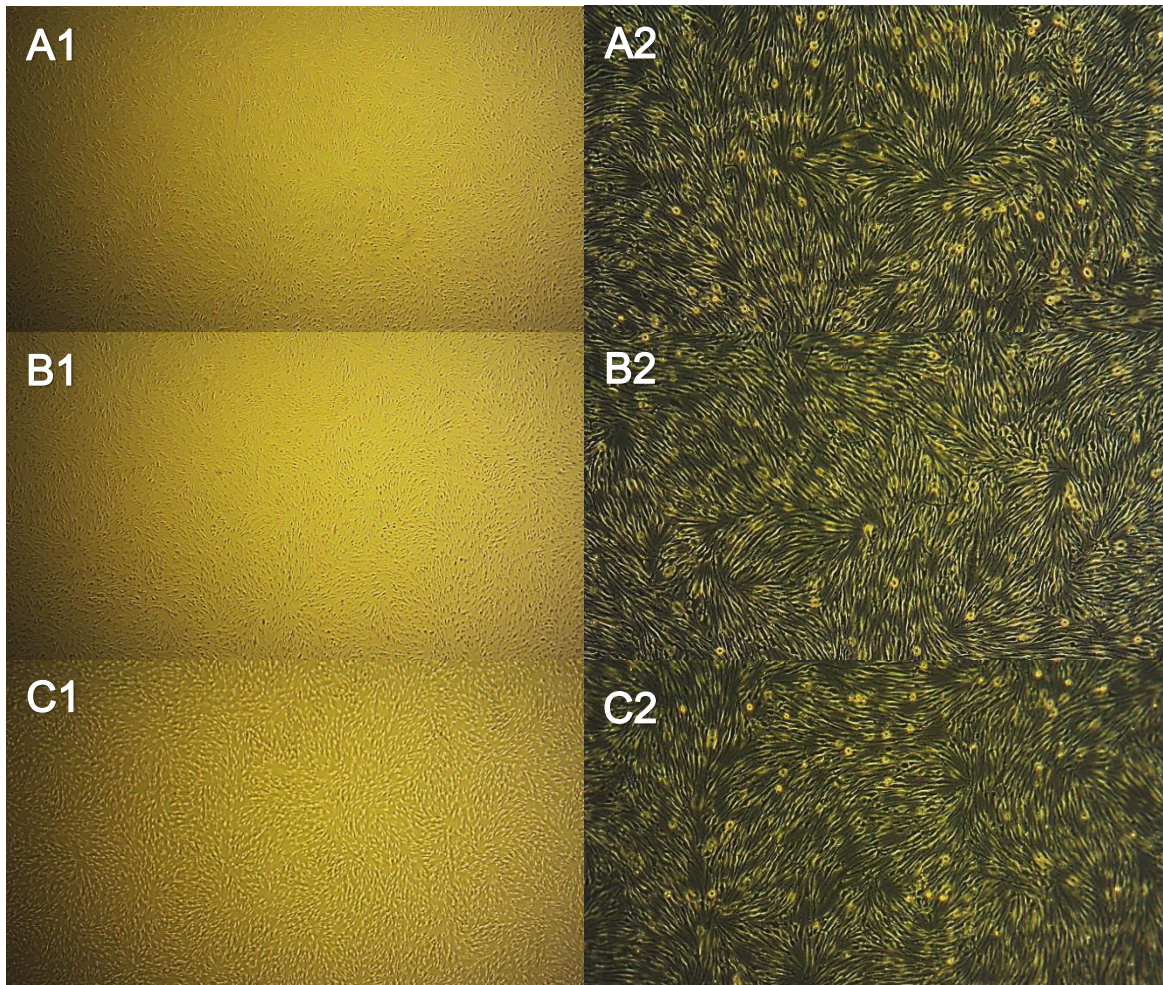


Abbildung 11: Beurteilung der cerebEND Zellen am Beispiel der Dreifachtransfektion nach der zweiten Transfektion (nach Behandlung mit den Transfektionreagentien an Tag 4 nach der Aussaat); Kontroll-Well 1 in 4xVergrößerung (A1) und 10xVergrößerung (A2), Kontroll-Well 2 in 4xVergrößerung (B1) und 10xVergrößerung (B2), 10nm siRNA Well in 4xVergrößerung (C1) und 10xVergrößerung (C2).

Nach der 2. Transfektion war ein starkes Wachstum der Zellen zu beobachten. Auch die Zellen, die mit 10 nM siRNA behandelt wurden, vermehrten sich sehr rasch und unterschieden sich, bezüglich des Wachstums, kaum von den Kontroll-Zellen. Dies war ein guter Hinweis darauf, dass die Zellen die siRNA und das Interferin gut vertrugen (siehe Abbildung 11).

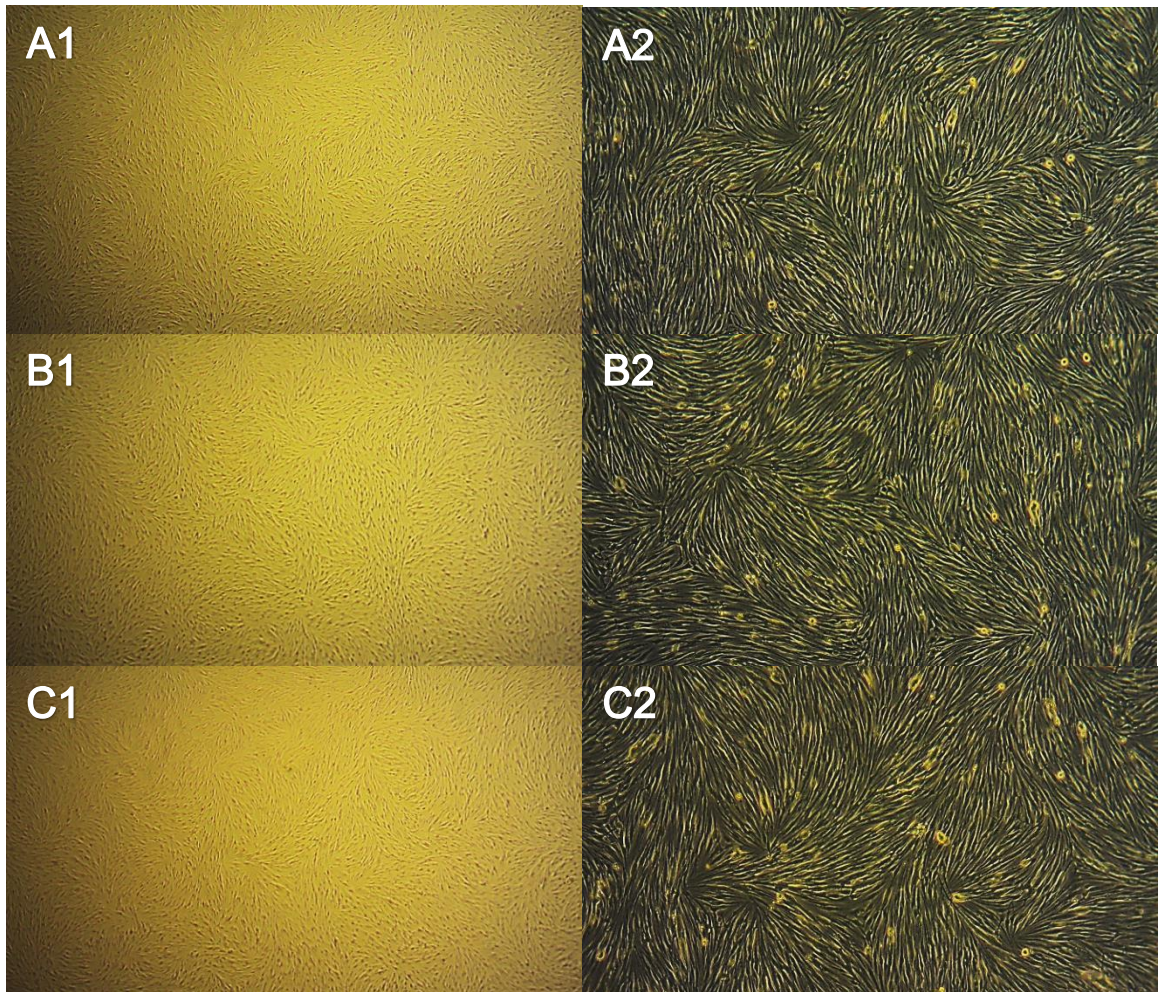


Abbildung 12: Beurteilung der cerebEND Zellen am Beispiel der Dreifachtransfektion nach der dritten Transfektion (nach Behandlung mit den Transfektionreagentien an Tag 6 nach der Aussaat); Kontroll-Well 1 in 4xVergrößerung (A1) und 10xVergrößerung (A2), Kontroll-Well 2 in 4xVergrößerung (B1) und 10xVergrößerung (B2), 10nm siRNA Well in 4xVergrößerung (C1) und 10xVergrößerung (C2).

Nach der 3. Transfektion war ein sehr dichtes Wachstum der Zellen zu beobachten. Morphologisch betrachtet, wurden die Zellen immer schmäler und dünner und formten konzentrische Gebilde. Auch die Zellen, welche mit 10 nM siRNA behandelt wurden, entwickelten sich weiterhin sehr gut und unterschieden sich, bezüglich des Wachstums, kaum von den Kontroll-Zellen (siehe Abbildung 12).

3.2.7 Zellyse und Proteinisolierung

Nachdem die Transfektionen, wie beschrieben, durchgeführt wurden, mussten die Proteine aus den Zellen isoliert werden.

Die 6-Wellplatte wurde aus dem Inkubator geholt und direkt auf Eis gestellt. Dann wurde das Medium vorsichtig mit einer Kolbenhubpipette am Rand der Wells abgesaugt. Es war sehr wichtig, dass man bei jedem Well eine neue Pipettenspitze verwendete. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 mL eiskaltem PBS (1x) gewaschen und wieder abgesaugt. Die Lysierung wurde mit RIPA-Puffer durchgeführt. Zuerst mussten 300 µL RIPA-Puffer mit 3 µL PIC(100x) in einem 1,5 mL Eppendorf Gefäß gut vermischt, kurz gevortext und auf Eis gestellt werden. Danach wurden jeweils 50 µL dieser Mischung tropfenweise auf die Wells aufgebracht. Die Zellen wurden nun mit einem Zellschaber gründlich vom Boden der Wells abgeschabt. Das Lysat wurde danach, mittels einer Kolbenhubpipette, in ein vorgekühltes und bereits beschriftetes 1,5 mL Eppendorf Gefäß überführt. Zwischen der Behandlung der Wells musste darauf geachtet werden, dass der Zellschaber immer sorgfältig zuerst mit Ethanol, dann mit ddH₂O gereinigt wurde. Nachdem die Lysate aller Wells in die beschrifteten 1,5 mL Eppendorf Gefäße überführt wurden, wurden sie 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation auf Eis wurden die 1,5 mL Eppendorf Gefäße mit den Lysaten zehn Minuten bei 10000g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Kolbenhubpipette in ein neues vorgekühltes und beschriftetes 1,5 mL Eppendorf Gefäß überführt. Im Überstand befanden sich nun die aus den lysierten Zellen isolierten Proteine, die für den weiteren Versuch von Bedeutung waren. Die abzentrifugierten Pellets mit den restlichen Zellbestandteilen wurden verworfen.

Die 1,5 mL Eppendorf Gefäße mit den Lysaten mussten kurz in flüssigen Stickstoff getaucht werden, danach konnten sie bei -80°C gelagert werden. Der Vorgang, indem die Eppendorf Gefäße mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, wurde als „Snapfreezing“ bezeichnet.

3.2.8 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot

3.2.8.1 BCA-Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde durchgeführt, um die exakte Proteinkonzentration zu wissen, damit später die gleiche Menge an Protein bei der Gelelektrophorese aufgetragen werden konnte.

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™) durchgeführt:

Die BSA-Standardreihe wurde im Lysepuffer hergestellt. Das Lösungsmittel (Lysepuffer) wurde durch Mischen von 15 mL RIPA-Puffer mit 150 µL PIC(100x) in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen hergestellt. Die Herstellung der BSA-Stocklösung erfolgte durch genaues Einwiegen von 10 mg BSA auf einer Analysenwaage und durch Zugabe von 5 mL des Lösungsmittels in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen. Anschließend wurden Proteinstandards nach einem geeigneten Verdünnungsschema in 1,5 mL Eppendorf Gefäße hergestellt (siehe Tabelle 8).

Eppendorf Gefäß	Lösungsmittel (Lysepuffer)	BSA-Stock	BSA Endkonzentration
A	75 µL	225 µL	1500 µg/mL
B	250 µL	250 µL	1000 µg/mL
C	175 µL	175 µL von A	750 µg/mL
D	325 µL	325 µL von B	500 µg/mL
E	325 µL	325 µL von D	250 µg/mL
F	325 µL	325 µL von E	125 µg/mL
G	400 µL	100 µL von F	25 µg/mL
H	400 µL		

Tabelle 8: Verdünnungsschema der Proteinstandards bei der BCA-Proteinbestimmung.

Vorbereitung der Probenreihe:

Die Proben mit den Lysaten mussten zuerst langsam auf Eis aufgetaut werden. Zur Herstellung der Probenreihe wurden die Proben im Verhältnis 1:12,5 mit dem Lösungsmittel

verdünnt. Da Triplikate für die Bestimmung verwendet wurden, mussten jeweils 7 µL Probe und 80,5 µL Lösungsmittel in einem 1,5 mL Eppendorf Gefäß gemischt werden.

Jeweils 25 µL der Proteinstandards und der Probenreihe wurden nun auf einer 96-Wellplatte aufgetragen (siehe Abbildung 13).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	A	#1	#1	#1	#77	#77	#77			
B	B	B	B	#2	#2	#2	#78	#78	#78			
C	C	C	C	#8	#8	#8	#80	#80	#80			
D	D	D	D	#6	#6	#6	#82	#82	#82			
E	E	E	E	#12	#12	#12	#79	#79	#79			
F	F	F	F	#9	#9	#9	#69	#69	#69			
G	G	G	G	#11	#11	#11	#4	#4	#4			
H	H	H	H	#10	#10	#10	#71	#71	#71			

Copyright © 2009 Edita Aksantiene

Abbildung 13: Beispiel für das Auftrags-Schema der Proteinstandards und Probenreihe bei der BCA-Proteinbestimmung der Tierversuche auf einer 96-Well-Platte; # =bezeichnet die Probennummer der Mausgehirnproben.

Herstellung des BCA-Reagens:

Reagens A und Reagens B des Kits mussten im Verhältnis 50:1 vermischt werden. Somit wurden 15 mL des Reagens A mit 300 µL des Reagens B gemischt und kurz gevortext. Nun wurden 200 µL des fertig gemischten BCA-Reagens pro Well mit Hilfe einer Multikanalpipette aufgetragen. Die 96-Wellplatte musste anschließend für 30 Minuten bei 37°C inkubiert werden, damit das BCA-Reagens mit den Proteinstandards und den Proben reagieren konnte.

Danach wurde die 96-Wellplatte mit Hilfe eines UV-Spektrometers bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen (siehe Tabelle 9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1,24	1,2718	1,2216	0,911	0,9646	0,9784	0,9938	1,0385	1,0825
B	0,9247	0,9115	0,9187	0,9286	0,9387	1,0278	0,9267	0,9895	0,9713
C	0,7204	0,7523	0,68	0,8853	1,0212	1,0079	0,9248	0,9623	0,9724
D	0,5642	0,5526	0,543	0,8449	0,9286	0,9482	0,9345	0,9143	0,9392
E	0,3614	0,3632	0,3596	0,8276	0,9327	0,9726	0,8479	0,8819	0,9109
F	0,2455	0,2415	0,251	0,8913	1,0254	1,016	1,0037	1,0215	1,0548
G	0,1464	0,205	0,1473	0,9656	1,0629	1,0218	0,834	0,8615	0,9027
H	0,1288	0,124	0,1118	1,0077	1,1361	1,0775	0,9228	0,95	0,9969

Tabelle 9: UV-Absorptionen der Proteinbestimmung am Beispiel der Tierversuche (siehe Abbildung 13).

Auswertung der Proteinbestimmung:

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. In diesem Programm konnte man die genaue Proteinkonzentration mit Hilfe der UV-Absorptionen ermitteln und sofort die Menge an Lysat und ddH₂O berechnen, die benötigt wurde, um später eine bestimmte Menge des Proteins bei der Gelelektrophorese zu laden. Im bearbeiteten Fall wurden 20 µg Protein im Bereich der Zellkulturversuche und 40 µg Protein im Bereich der Tierversuche aufgetragen. Im Anschluss wurde dazu ein Pipettierschema für den Western Blot erstellt (siehe Tabelle 10).

3.2.8.2 Probenvorbereitung

Nachdem die Proteinkonzentration der Proben ermittelt und ein Pipettierschema erstellt wurde, konnte die entsprechende Menge an Lysat und ddH₂O in vorgekühlte 1,5 mL Eppendorf Gefäße gemischt werden (siehe Tabelle 10). Alle Arbeitsschritte mussten auf Eis durchgeführt werden.

Eppendorf Gefäß	Lysat [μL]	ddH ₂ O [μL]
#1 WT	2,99	17,01
#2 MeCP2-KO	2,94	17,06
#8 WT	2,92	17,08
#6 MeCP2-KO	3,17	16,83
#12 WT	3,15	16,85
#9 MeCP2-KO	2,89	17,11
#11 WT	2,76	17,24
#10 MeCP2-KO	2,59	17,41
#77 WT	2,70	17,30
#78 MeCP2-KO	2,95	17,05
#80 WT	2,98	17,02
#82 MeCP2-KO	3,08	16,92
#79 WT	3,28	16,72
#69 MeCP2-KO	2,73	17,27
#4 WT	3,35	16,65
#71 MeCP2-KO	2,97	17,03

Tabelle 10: Pipettierschema am Beispiel der Tierversuche: Die entsprechende Menge an ddH₂O und Lysat wurde gemischt um 40 μg Protein beim Western Blot aufzutragen.

Die 1,5 mL Eppendorf Gefäße wurden gut beschriftet, zuerst das ddH₂O vorgelegt und dann mit der entsprechenden Menge an Lysat ergänzt. In einem neuen 1,5 mL Eppendorf Gefäß wurden Sample Buffer (6x) mit β -Mercaptoethanol im Verhältnis 19:1 gemischt. Nun wurden je 4 μL dieser Sample Puffer/ β -Mercaptoethanol Mischung zu jedem 1,5 mL Eppendorf Gefäß mit den Proben hinzugefügt, kurz gevortext und gespinnt. Anschließend wurden die 1,5 mL Eppendorf Gefäße für fünf Minuten bei 95°C erhitzt und danach sofort wieder auf Eis gestellt.

3.2.8.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde mit der Apparatur Mini PROTEAN® Tetra System (BioRad) durchgeführt.

Herstellung der Gele:

Am Anfang mussten der Gel-Gießstand (BioRad), der Gel-Gießrahmen (BioRad), die Glasplatten und die Kämme (BioRad, 1,5mm, 10 Well) gut mit Wasser und Ethanol gerei-

nigt werden. Danach wurden die Glasplatten zuerst in den Gel-Gießrahmen und dann in den Gel-Gießstand eingesetzt, vollständig mit Wasser gefüllt und für fünf Minuten stehen gelassen. Dies war wichtig, um zu sehen, ob kein Wasser zwischen den Glasplatten austrat. Anschließend wurde das Wasser wieder entleert und die Gele nach folgendem Schema hergestellt:

<u>1. Trenngel 10%:</u>	<u>Volumen für zwei Gele:</u>
ddH ₂ O	10,6 mL
Pro Sieve Gel Solution	4,0 mL
1M pH 8,8 TRIS/HCl	5,0 mL
10% SDS	200 µL
10% APS	200 µL

Alle Reagenzien wurden in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen gemischt. Am Ende wurden noch 8 µL TEMED hinzugefügt und kurz geschwenkt. Ab diesem Zeitpunkt musste man schnell arbeiten, da das Gel zu polymerisieren begann und dadurch fest wurde. Das Gel wurde nun mit Hilfe einer Kolbenhubpipette zwischen den Glasplatten so gefüllt, dass nach oben noch zwei Fingerbreit frei blieben. Danach wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Durch den Isopropanol schaffte man eine klare Grenze zwischen Trenngel und Sammelgel. Nun musste man das Trenngel 20 bis 30 Minuten polymerisieren lassen, damit es sich verfestigte. Danach wurde der Isopropanol wieder entleert.

<u>2. Sammelgel 5%:</u>	<u>Volumen für zwei Gele:</u>
ddH ₂ O	3,75 mL
Pro Sieve Gel Solution	0,5 mL
1M pH 6,8 TRIS/HCl	0,65 mL
10% SDS	50 µL
10% APS	50 µL

Alle Reagenzien wurden in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen gemischt. Am Ende wurden noch 5 µL TEMED hinzugefügt und kurz geschwenkt. Das Sammelgel konnte nun vollständig zwischen den Glasplatten mit einer Kolbenhubpipette befüllt werden. Abschließend wurden noch die Kämme (BioRad, 1,5mm, 10 Well) blasenfrei zwischen den Glasplatten in das Sammelgel eingesetzt und das Gel für 20 bis 30 Minuten polymerisiert.

In der Regel wurden die Gele immer einen Tag vor Durchführung des Western Blots hergestellt. Die Glasplatten mit den Gelen konnten ohne Probleme mehrere Tag zwischen befeuchtetem Papier im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

Im Anschluss wurden die Glasplatten mit dem Gel, richtig positioniert, in den Elektrodenrahmen (Gasket) eingesetzt und gut verschlossen. Der Elektrodenrahmen mit den Gelen wurde in den Puffer-Tank eingesetzt und durch Einfüllen des Elektrophorese Puffers in der Kammer bis zur Markierung aufgefüllt. Nach Entnahme der Kämme wurden die Taschen gut mit dem Elektrophorese Puffer, mit Hilfe einer Kolbenhubpipette, gespült. Das Spülen diente dazu, dass keine Gelreste mehr in den Taschen vorhanden waren und die Proben damit gleichmäßig aufgetragen werden konnten.

Probenauftrag:

In die erste beziehungsweise letzte Tasche der Banden wurden 5 µL des Markers aufgetragen (siehe Abbildung 14). In den anderen Taschen wurden jeweils 24 µL der fertig vorbereiteten Proben (siehe 3.2.8.2 Probenvorbereitung) aufgetragen. Man musste darauf Acht geben, dass der Marker und die Proben sehr langsam aufgetragen wurden, damit es zu keiner Vermischung der Proben oder zum Überlaufen der Taschen kam.

Folgende Marker wurden in der Arbeit verwendet:

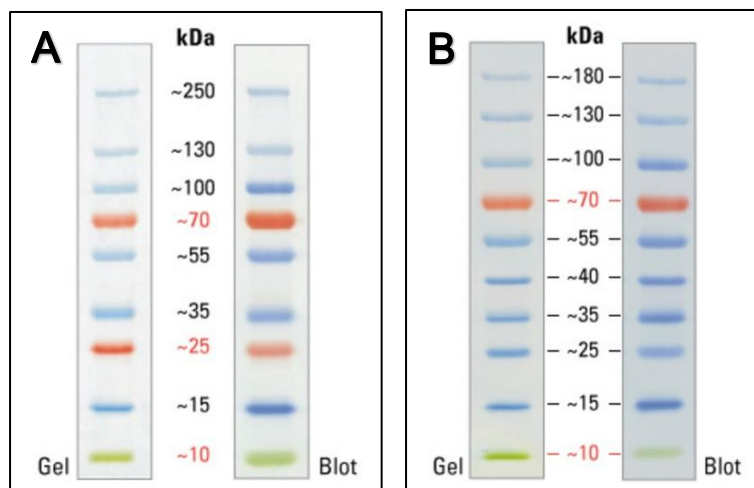


Abbildung 14: Marker peqGOLD Protein Marker V (A) und Marker PageRuler (B).

Danach wurde der Deckel mit den Spannungsanschlüssen auf die Elektrophoreseapparatur gesetzt. Die Elektrophoreseapparatur wurde auf 180V mit der Laufzeit von etwa 40 Minuten eingestellt und gestartet. Man musste immer zwischendurch nachsehen, wie weit der Marker schon gelaufen war. Die Elektrophorese konnte beendet werden, wenn gerade noch die grüne Bande des Markers auf dem Gel sichtbar war.

3.2.8.4 Blotting

Nachdem die Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese erfolgt war, mussten die Proteine vom Gel auf eine Trägermembran (Nitrocellulose Membran 0,2 µm, BioRad, #1620112) übertragen werden. Dieser Vorgang wurde auch als Blotting bezeichnet. Das Blotting wurde mit der Apparatur Mini PROTEAN® Tetra System (BioRad) durchgeführt.

Das Gel wurde mit Hilfe eines Keils aus den Glasplatten genommen und das Sammelgel weggeschnitten und verworfen. Es wurde eine Wanne, gefüllt mit Blot Puffer, vorbereitet. In diese Wanne legte man anschließend die Gitterplatten (BioRad) mit der schwarzen Seite nach unten. Die Schichten zwischen den Gitterplatten wurden nach einem bestimmten Schema befüllt. Auf jede Seite der Gitterplatte kamen zuerst ein Schwamm und dann ein Filterpapier. Alles musste gut mit Blot Puffer befeuchtet und die Trägermembran zu-rechtgeschnitten werden. Die Trägermembran wurde daraufhin auf die obere Seite und das Gel auf die untere Seite des Filterpapiers gelegt. Nun konnte man Schicht für Schicht auf das Gel legen – zuerst die Trägermembran, dann das Filterpapier und dann den Schwamm. Nun wurde sorgfältig mit einem 50 mL Zentrifugenröhrchen darüber gerollt, um eventuelle Blasen zu beseitigen, die später auf der Trägermembran sichtbar sein konnten. Die Gitterplatten wurden anschließend verschlossen, in die vorgesehenen Elekt-ronenrahmen eingesetzt und in den Puffer-Tank platziert. Es wurde zusätzlich ein Eis-block in den Puffer-Tank gegeben, da es beim Blotting zu einer stärkeren Erwärmung in der Blottingapparatur kam. Schlussendlich wurde der Puffer-Tank mit Blot Puffer bis zur Markierung Blotting befüllt, der Deckel mit den Spannungsanschlüssen aufgesetzt und die Blottingapparatur bei einer Stromstärke von 0,5 A und einer Laufzeit von 35 Minuten ge-startet. Nachdem die Laufzeit abgelaufen war, wurde die Trägermembran vorsichtig aus der Blottingapparatur und den Gitterplatten genommen und mit wenig Ponceau Red in einer Wanne angefärbt. Die Trägermembran wurde noch mit etwas ddH₂O, am Rand der Membran, gespült. Nun sah man den Verlauf der Banden und den Marker, was sehr hilf-reich beim Schneiden des Blots war.

Schneiden der Blots:

Das Schneiden der Blots wurde dann angewandt, wenn mehrere Proteine gleichzeitig auf einem Blot analysiert wurden und der Blot dabei mit mehreren Antikörpern behandelt wurde. Somit war es möglich, den oberen Teil des Blots mit einem Antikörper und gleichzeitig den unteren Teil des Blots mit einem anderen Antikörper zu inkubieren.

Waschschritt:

Die Blots wurden in einer Wanne dreimal für etwa fünf Minuten mit 1xPBS auf einer Schwenkplatte gewaschen, bis sie vom Ponceau Red entfärbt waren.

Blockieren:

Die Blots wurden anschließend eine Stunde in einer Lösung aus 5% Milchpulver in 1xPBS/0,1%Tween 20 auf einer Schwenkplatte inkubiert. Die Milchpulver-Lösung besetzte die freien Bindungsstellen auf der Trägermembran und blockierte sie durch Proteine, die nicht von den Antikörpern erkannt werden konnten.

3.2.8.5 Inkubation mit Antikörpern

Nach dem Blockieren wurden die Blots mit den Antikörpern behandelt:

Primärer Antikörper:

Der primäre Antikörper war gegen das Protein gerichtet, welches man genauer untersuchen wollte. Dabei wurde eine bestimmte Verdünnung des Antikörpers (siehe Tabelle 2) in 5 mL 5% Milchpulver in 1xPBS/0,1%Tween 20 in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen hergestellt. Der entsprechende Blot wurde daraufhin vorsichtig, mit der Vorderseite nach innen blickend, in das 50 mL Zentrifugenröhrchen mit der Antikörper-Lösung gerollt.

Die Blots wurden anschließend im 50 mL Zentrifugenröhrchen mit der Antikörper-Lösung über Nacht bei 4°C im Kühlraum gerollt (siehe Abbildung 15).

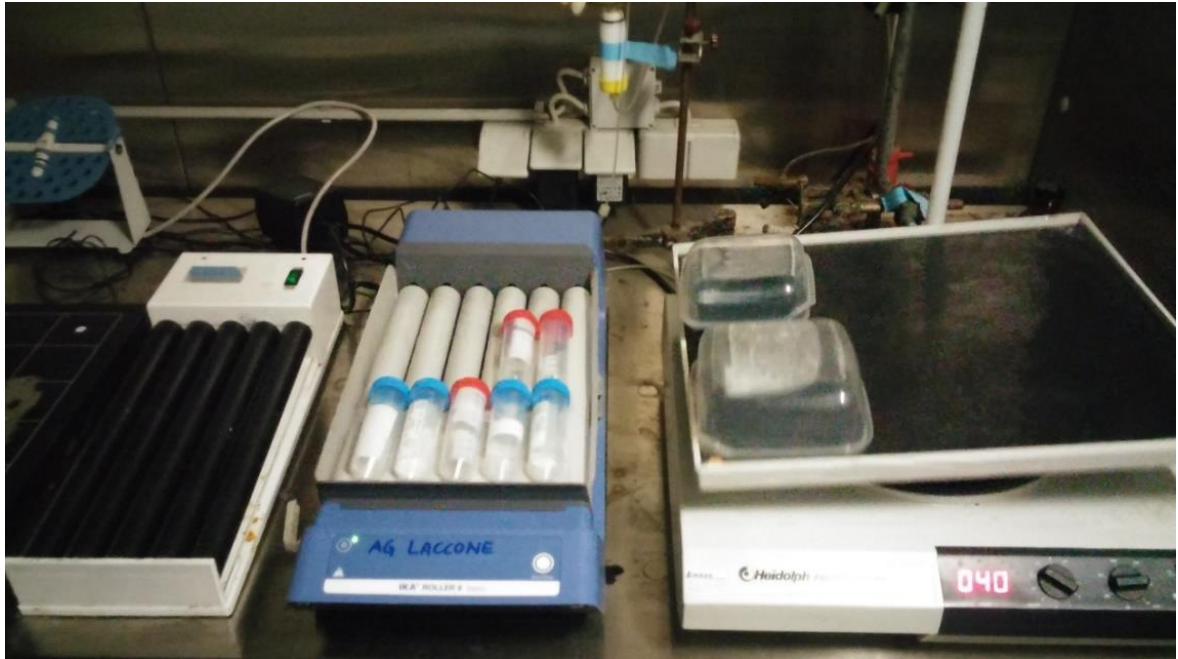


Abbildung 15: Inkubation der Blots mit der primären Antikörper-Lösung bei 4°C.

Waschschritt:

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Blots in eine Wanne gegeben und anschließend dreimal fünf Minuten mit einer 1xPBS/0,1%Tween 20-Lösung gewaschen.

Sekundärer Antikörper:

Der sekundäre Antikörper war gegen den primären Antikörper gerichtet und an einem Enzym gekoppelt, welches später bei der Detektion eine Farbreaktion auslöste. Hierbei wurde eine bestimmte Verdünnung des sekundären Antikörpers (siehe Tabelle 3) in 20mL 5% Milchpulver in 1xPBS/0,1%Tween 20 hergestellt. Die Blots wurden anschließend, für eine Stunde bei Raumtemperatur, mit der Antikörper-Lösung in einer Wanne auf der Schwenkplatte inkubiert (siehe Abbildung 16).



Abbildung 16: Inkubation der Blots mit der sekundären Antikörper-Lösung bei Raumtemperatur auf der Schwenkplatte.

Waschschritt:

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Blots in eine frische Wanne gegeben und anschließend dreimal fünf Minuten mit einer 1xPBS/0,1%Tween 20-Lösung gewaschen.

3.2.8.6 Detektion

Die Detektion der interessierenden Proteine auf den Blots wurde mit Hilfe der Chemolumineszenz und des Imagers ChemiDOC (BioRad) durchgeführt.

Zuerst wurde eine Mischung des Chemiglow Peroxid Puffers (Lumineszenz Reagens A) und der Chemiglow Luminol Solution (Lumineszenz Reagens B) im Verhältnis 1 Teil + 1 Teil in einem 1,5 mL Eppendorf Gefäß vorbereitet. Danach wurde die fertig vorbereitete Lumineszenz-Mischung tropfenweise mit einer Kolbenhubpipette auf die Blots aufgebracht. Die Lumineszenz-Mischung musste nun fünf Minuten mit den Proteinen auf dem Blot reagieren (siehe Abbildung 17).



Abbildung 17: Aufbringen und Inkubation der Blots mit den Lumineszenz-Reagenzien, um die untersuchten Proteine sichtbar zu machen.

Danach wurden die Blots luftblasenfrei zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und anschließend auf einer Glasplatte im Imager platziert.

Anfertigen der Bilder:

Nachdem der Blot richtig im Imager platziert wurde, konnte mit Hilfe der Option „Image Size“ die Größe des Bildes so geändert werden, dass der Blot und der Marker gut am Bildschirm ersichtlich waren. Das erste Bild wurde mit Hilfe der Einstellung „Colorimetrie“ angefertigt. Dieses Bild erfasste einzig und allein ein colorimetrisches Bild des Markers. Danach wurde, durch die Einstellung „Chemolumineszenz“ und „Auto Exposure“, das zweite Bild angefertigt. Dieses Bild hingegen erfasste die Signale des interessierenden Proteins. Anschließend konnte man mit Hilfe der Option „Merge“ das erste Bild des Markers und das zweite Bild des Proteins zusammenfügen. Alle Bilder und Daten wurden dann, für die weitere Auswertung, auf einen USB-Stick übertragen.

Waschschritt:

Nach Behandlung der Blots mit den Lumineszenz-Reagenzien und Durchführung der Detektion, wurden die Blots wieder dreimal fünf Minuten mit einer 1xPBS/0,1%Tween 20-Lösung gewaschen.

Danach war es möglich, die Blots in 1xPBS/0,1%Tween 20 in einer Wanne im Kühlschrank bei 4°C für weitere Versuche zu lagern. Die Wanne wurde mit einem Parafilm abgedeckt.

3.2.8.7 Stripping der Western Blot Membranen

Stripping ist ein Prozess, bei dem die primären und sekundären Antikörper von bereits untersuchten Proteinen von den Blots entfernt werden konnten. Dies war sehr hilfreich, wenn man mehr als nur ein Protein auf demselben Blot untersuchen wollte. Ein großer Vorteil dieser Methode war, dass nicht der ganze Prozess der SDS-PAGE und des Western Blots wiederholt werden musste. Somit konnte der Verbrauch der Proben verringert und auch Zeit eingespart werden. Einziger Nachteil dieser Methode war, dass die Signale manchmal schlechter oder schwächer detektiert wurden.

Als Erstes wurden die Blots dreimal zehn Minuten mit einer 1xPBS/0,1%Tween 20-Lösung, auf einer Schwenkplatte in einer Wanne, gewaschen. In der Zwischenzeit wurde für jeden Blot 30 mL Stripping Puffer in einer 250 mL Glasflasche vorbereitet und 215 µL β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Nun wurden die Blots vorsichtig in die Glasflaschen mit dem Stripping Puffer und β-Mercaptoethanol gegeben und darauf geachtet, dass die Bänder der Blots nach innen blickten. Die 250 mL Glasflaschen sollten danach gut verschlossen und zusätzlich mit Parafilm abgedichtet werden. Im Anschluss wurden die Blots in den 250 mL Glasflaschen mit Stripping Puffer und β-Mercaptoethanol 20 Minuten in einem Wasserbad bei 56°C geschwenkt. Die Glasflaschen konnten zusätzlich mit Ringen beschwert werden, damit sie gleichmäßig in das Wasserbad eintauchten (siehe Abbildung 18).



Abbildung 18: Inkubation der Blots mit Stripping Puffer und β -Mercaptoethanol bei 56°C im Wasserbad.

Danach wurden die Blots vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette aus den 250 mL Glasflaschen genommen und anschließend wieder dreimal zehn Minuten mit einer 1xPBS/0,1%Tween 20-Lösung auf einer Schwenkplatte in einer Wanne gewaschen. Die Blots konnten daraufhin wie nach dem Blotting behandelt werden.

Blockieren:

Die Blots wurden eine Stunde in einer Lösung aus 5% Milchpulver in 1xPBS/0,1%Tween 20 auf einer Schwenkplatte inkubiert. Danach war es möglich, die Blots mit neuen Antikörpern zu inkubieren und damit neue Proteine auf den Blots zu untersuchen.

3.2.8.8 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Nachdem die Detektion der Blots abgeschlossen war, wurde die densitometrische Auswertung der Daten, mit Hilfe des Programms Chemilmager durchgeführt. Hierbei wurden immer die Banden einer endogenen Kontrolle mit den Banden der zu interessierenden Proteine verglichen. Die endogene Kontrolle sollte bei der Detektion gleichmäßig große und starke Banden darstellen. Die Banden der Proteine, welche untersucht wurden, konn-

ten nun auf die endogene Kontrolle normalisiert und die Expression der Banden damit untereinander verglichen werden.

Zuerst wurde der Blot der endogenen Kontrolle mit dem Programm Chemilmager geöffnet. Mit Hilfe der Einstellungen „Reverse“, „Auto Kontrast“ und der manuellen Regelung des Kontrasts, konnten die Banden gut und scharf sichtbar dargestellt werden. Nun wurde mit der Option „Object“ jede einzelne Bande mit einem Kästchen umrahmt. Alle Kästchen mussten dabei die exakt gleiche Größe haben und dementsprechend angepasst werden (siehe Abbildung 19).

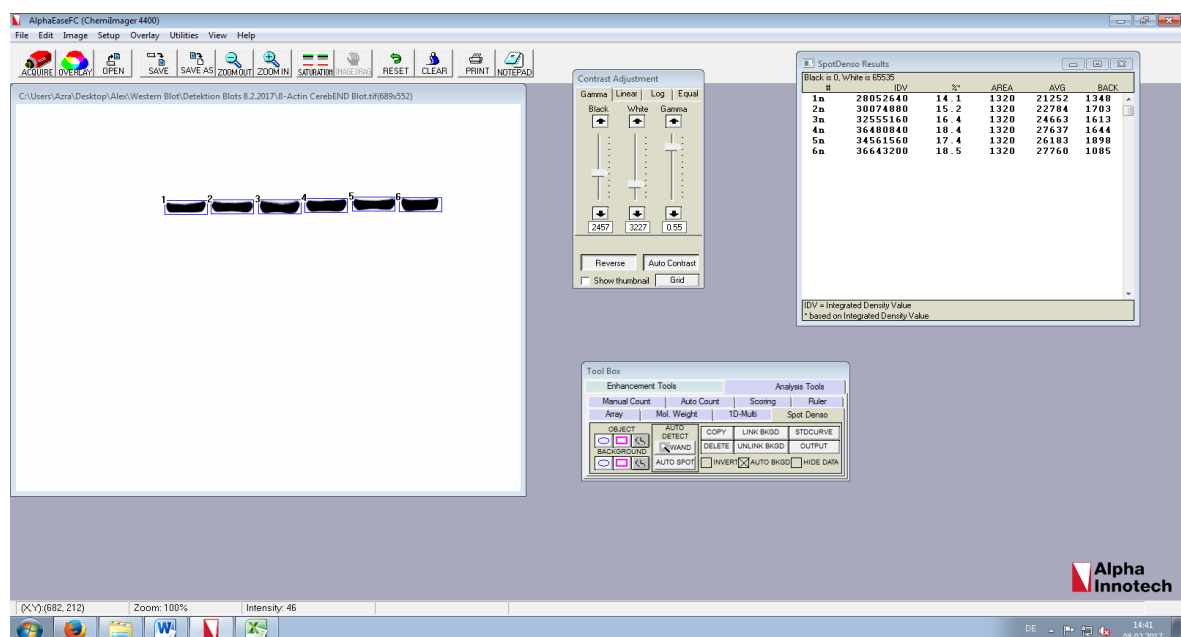


Abbildung 19: Beispiel für eine densitometrische Auswertung eines Blots mit Hilfe des Programms Chemilmager.

Mittels der Funktion „Output“ wurden die Daten in das Programm Excel übernommen. Dieser Vorgang wurde gleich für den Blot mit den Banden des Proteins, welches man untersuchte, durchgeführt. Mit dem Programm Excel wurde anschließend eine Tabelle angelegt. In der ersten Spalte wurden die Werte des Proteins auf die endogene Kontrolle normalisiert. In der zweiten Spalte konnte man nun prozentuell die normalisierten Banden miteinander vergleichen.

4 Resultate

4.1 Einfluss von MeCP2 knock-out auf Marker der Blut-Hirn Schranke im Mausmodell

4.1.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse wurde wie in Punkt 3.2.2 beschrieben durchgeführt.

Bei der Detektion wurden mit Hilfe der DNA-Proben der Mäuse der Genotyp der jeweiligen Maus hinsichtlich homozygot, heterozygot für MeCP2 oder WT untersucht (siehe Abbildungen 20-22):

Bande bei 240bp: Mutant (MeCP2-KO)

Banden bei 240bp + 465bp: Heterozygote

Bande bei 465bp: Wild-Typ (MeCP2 vorhanden)

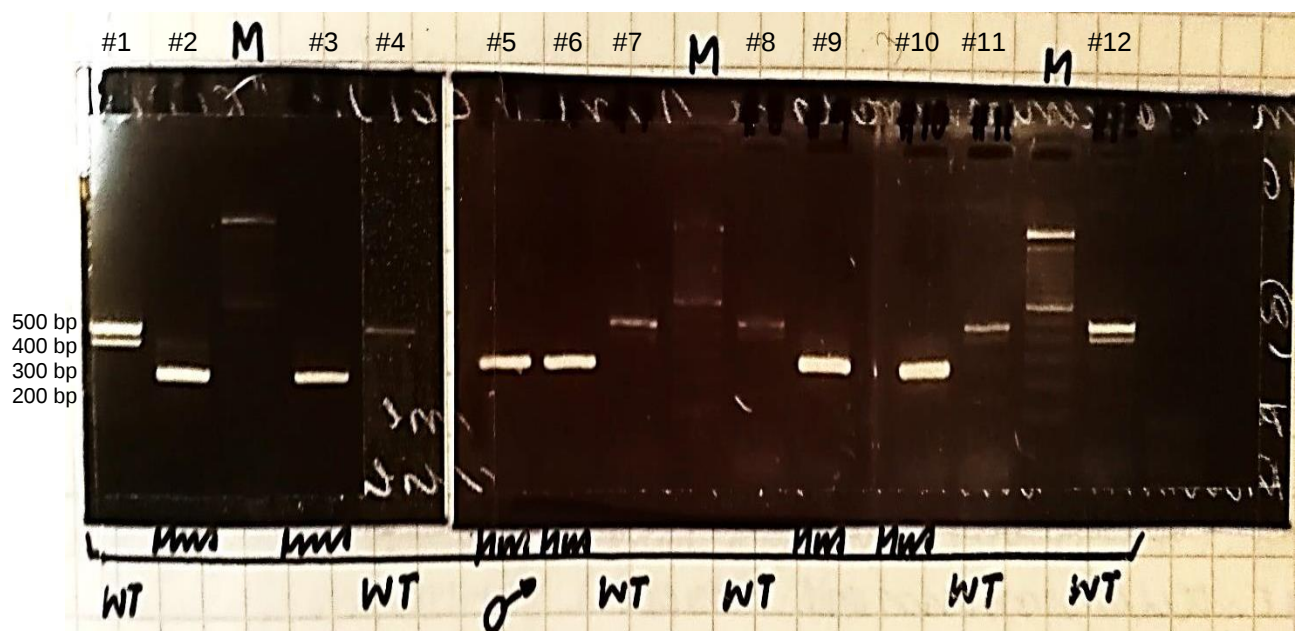


Abbildung 20: Darstellung der Auswertung des Gels bei der Genotypisierung Maus #1-Maus#12, 240bp: Mutant (MeCP2-KO, #2, #3, #5, #6, #9, #10), 240bp + 465bp: Heterozygote, 465bp: Wild-Typ (MeCP2 vorhanden, #1, #4, #7, #8, #11, #12), MUT=Mutant, M=Marker, WT=Wild Typ, bp=Basenpaare.

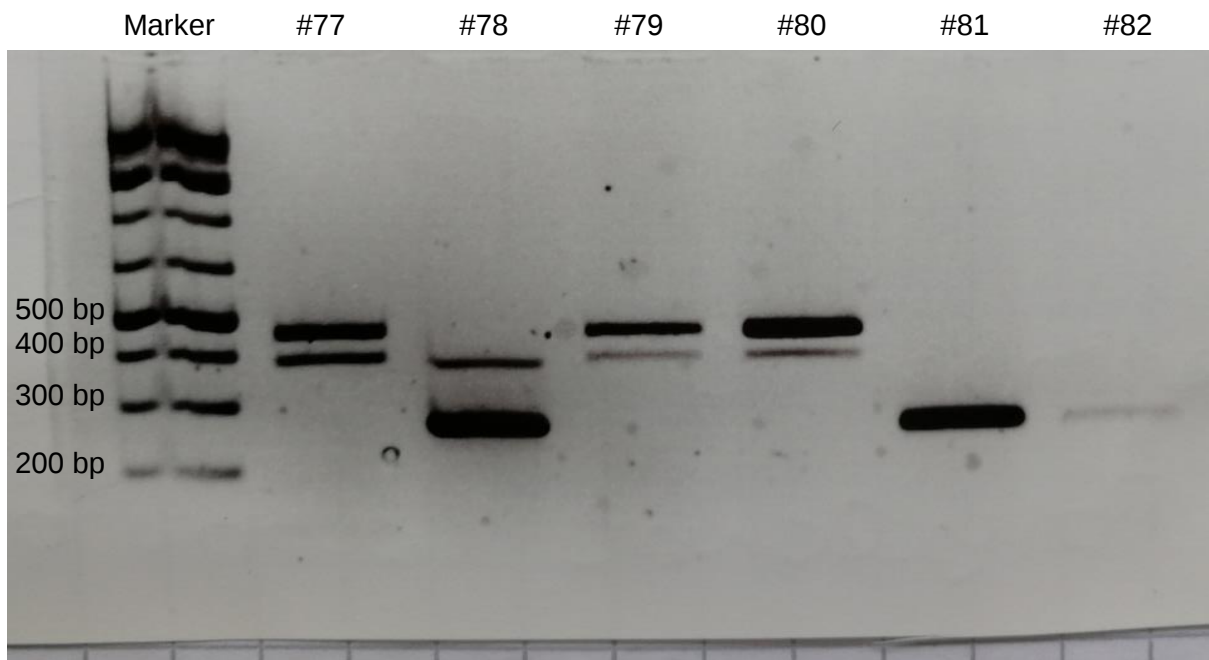


Abbildung 21: Darstellung der Auswertung des Gels bei der Genotypisierung Maus #77-Maus #82, 240bp: Mutant (MeCP2-KO, #78, #81, #82), 240bp + 465bp: Heterozygote, 465bp: Wild-Typ (MeCP2 vorhanden, #77, #79, #80), bp=Basenpaare.

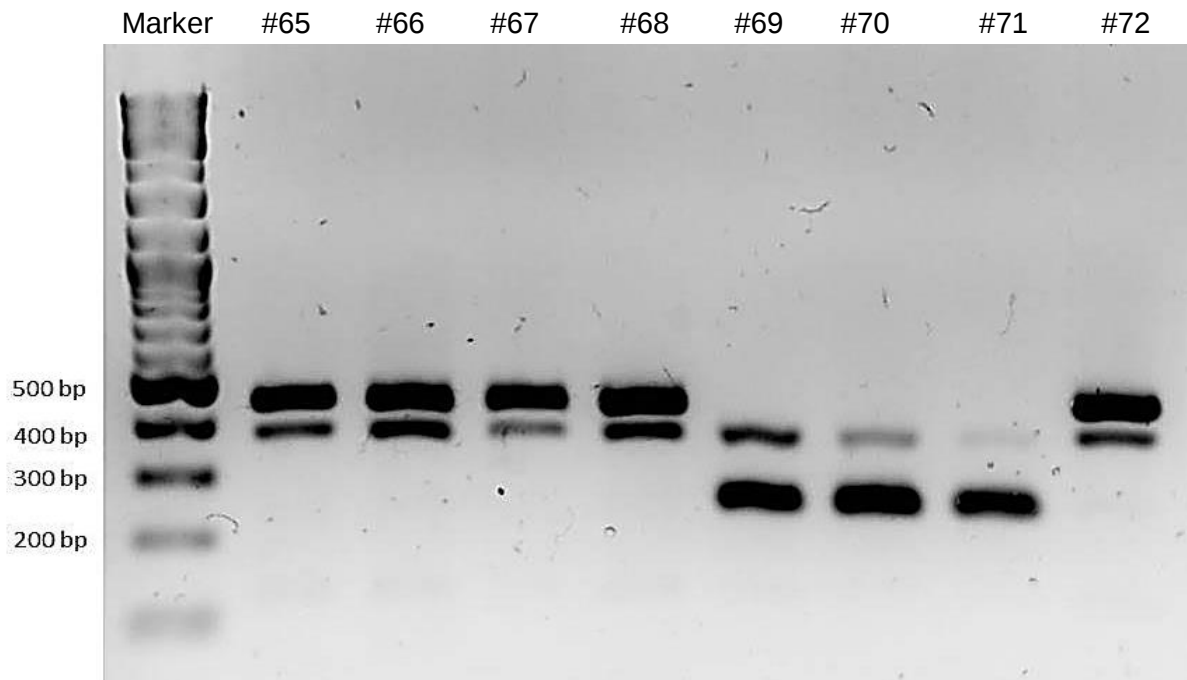


Abbildung 22: Darstellung der Auswertung des Gels bei der Genotypisierung Maus #65-Maus #72, 240bp: Mutant (MeCP2-KO, #69, #70, #71), 240bp + 465bp: Heterozygote, 465bp: Wild-Typ (MeCP2 vorhanden, #65, #66, #67, #68, #72), bp=Basenpaare.

Basierend auf den Genotypisierungen wurden die MeCP2-KO und WT-Mäuse für die Versuche in zusammengehörige Paare eingeteilt (siehe Tabelle 11).

Paar	Mausnummer	Geburt	Ohrmarkierung	Genotyp	Exitus	Alter (Tage)
1.Paar	#1	11./12.11.16	re1	WT	17.01.2017	67
	#2	11./12.11.16	li1	MeCP2-KO	17.01.2017	67
2.Paar	#6	11./12.11.16	re1	MeCP2-KO	30.01.2017	80
	#8	11./12.11.16	re1,li1	WT	30.01.2017	80
3.Paar	#9	13.11.16	re1	MeCP2-KO	30.01.2017	78
	#12	13.11.16	re2	WT	30.01.2017	78
4.Paar	#10	13.11.16	li1	MeCP2-KO	09.01.2017	57
	#11	13.11.16	re1,li1	WT	09.01.2017	57
5.Paar	#78	08.05.2016	re1	MeCP2-KO	06.07.2016	59
	#77	08.05.2016	li1	WT	06.07.2016	59
6.Paar	#82	31.05.2016	re2	MeCP2-KO	12.07.2016	42
	#80	31.05.2016	re1	WT	12.07.2016	42
7.Paar	#69	06.12.2015	re1	MeCP2-KO	03.02.2016	59
	#79	31.05.2016	li1	WT	29.07.2016	59
8.Paar	#71	06.12.2015	li2	MeCP2-KO	10.02.2016	66
	#4	11./12.11.16	re2	WT	16.01.2017	66
9.Paar	#7	11./12.11.16	li1	WT	02.01.2017	52
	#70	06.12.2015	re1,li1	MeCP2-KO	27.01.2016	52

Tabelle 11: Übersicht aller betreuten WT-Mäuse und MeCP2-KO Mäuse.

Die Mäusepaare 1-6 stammten aus demselben Wurf. Im Fall von den Paaren 7-9 wurden die MeCP2-KO und WT-Mäuse nicht aus demselben Wurf herangezogen. Entsprechend des phänotypischen Krankheitsverlaufes dieser MeCP2-KO Mäuse wurden altersgleiche WT-Mäuse separat gezüchtet und als Kontrollen eingesetzt. Insgesamt wurden 18 Mäuse (neun WT-Mäuse und neun MeCP2-KO Mäuse) über einen Zeitraum von einem Jahr und 27 Tagen betreut und versorgt (siehe Tabelle 11). Das durchschnittliche Alter der WT sowie der MeCP2-KO Mäuse bei der Tötung betrug 62 ± 11 Tage ($n=9$).

4.1.2 Überwachung der Mäuse

Die MeCP2-KO Mäuse und WT-Mäuse wurden dreimal die Woche gewogen und hinsichtlich des Auftretens von Claspings beurteilt (siehe Abbildung 23).

Der MeCP2-KO verläuft in der Regel für die Maus tödlich. Um rechtzeitig vor dem Tod, aber schon bei phänotypischer Ausprägung die Veränderung der Blut-Hirn Schranke im Mausmodell untersuchen zu können, wurden die MeCP2-KO Mäuse und die dazugehörigen gleichaltrigen „Wild-Typ-Kontroll“ Mäuse, bei einem Gewichtsverlust von ~ 1 g zwischen den Wägungen und gleichzeitigem Claspings getötet und das Gehirn entnommen.

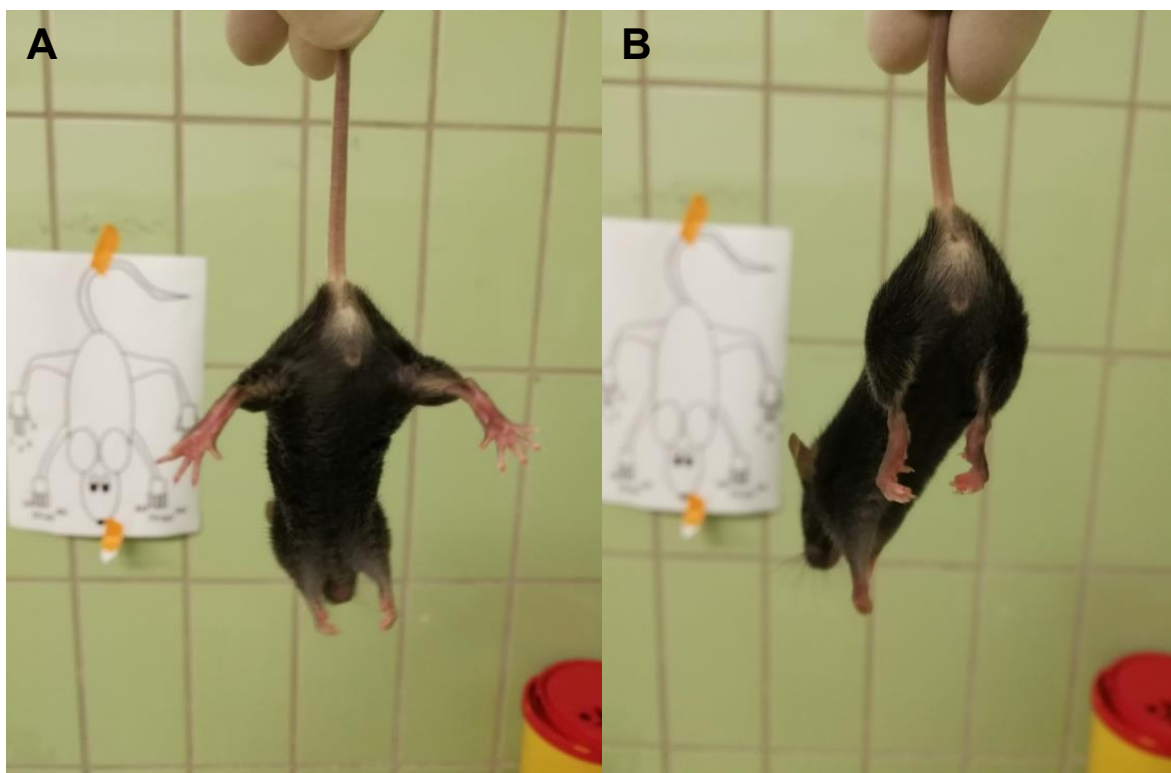


Abbildung 23: Maus ohne Aufweisen von Claspings (A) und Maus mit fortgeschrittenem Claspings (B).

Grundsätzlich wiesen die MeCP2-KO Mäuse bereits am Beginn ein deutlich geringeres Gewicht auf und waren lethargisch im Gegensatz zu den WT-Mäusen. Dies verstärkte sich bei zunehmendem Alter der Mäuse.

Folgende Abbildungen geben eine Übersicht über die Gewichtsverläufe der Mäuse in einem bestimmten Zeitraum bis zur Tötung der Maus und Entnahme ihres Gehirns (siehe Abbildungen 24-32).

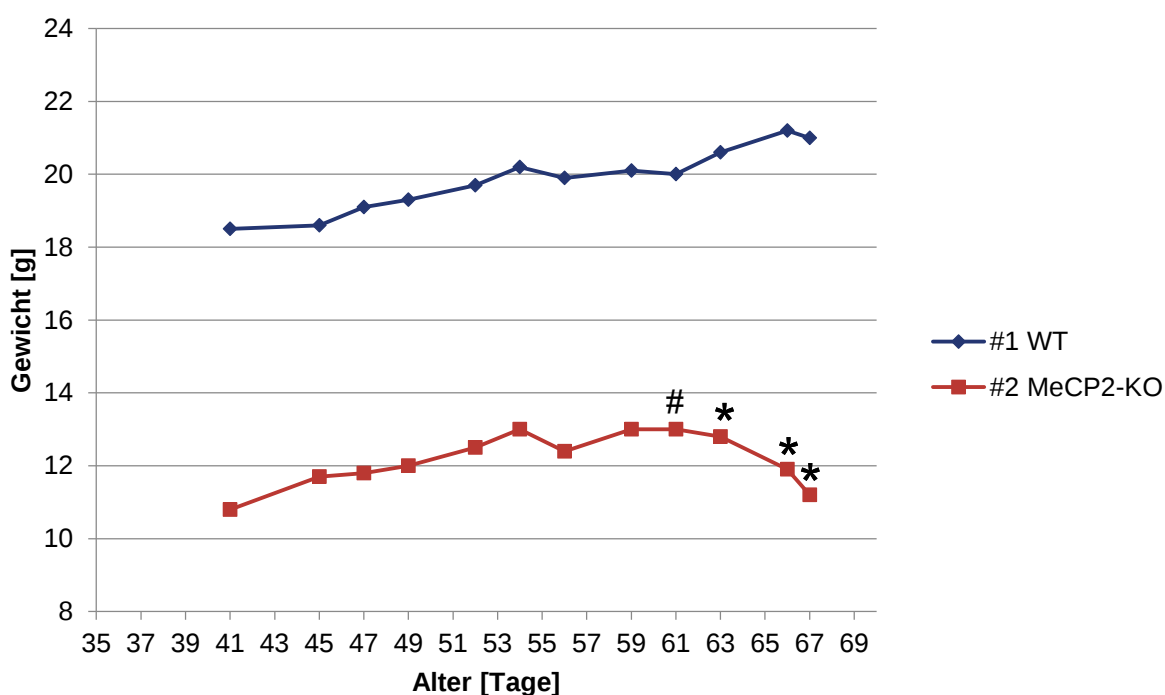


Abbildung 24: Gewichtsverlauf des ersten Mäusepaars (1.Paar, Tabelle 11). Das Alter der Mäuse bei der Tötung betrug 67 Tage, * =eindeutiges Aufweisen von Claspings, # =Zeitpunkt, ab dem die Gewichtsänderung für Abbildung 34 berechnet wurde.

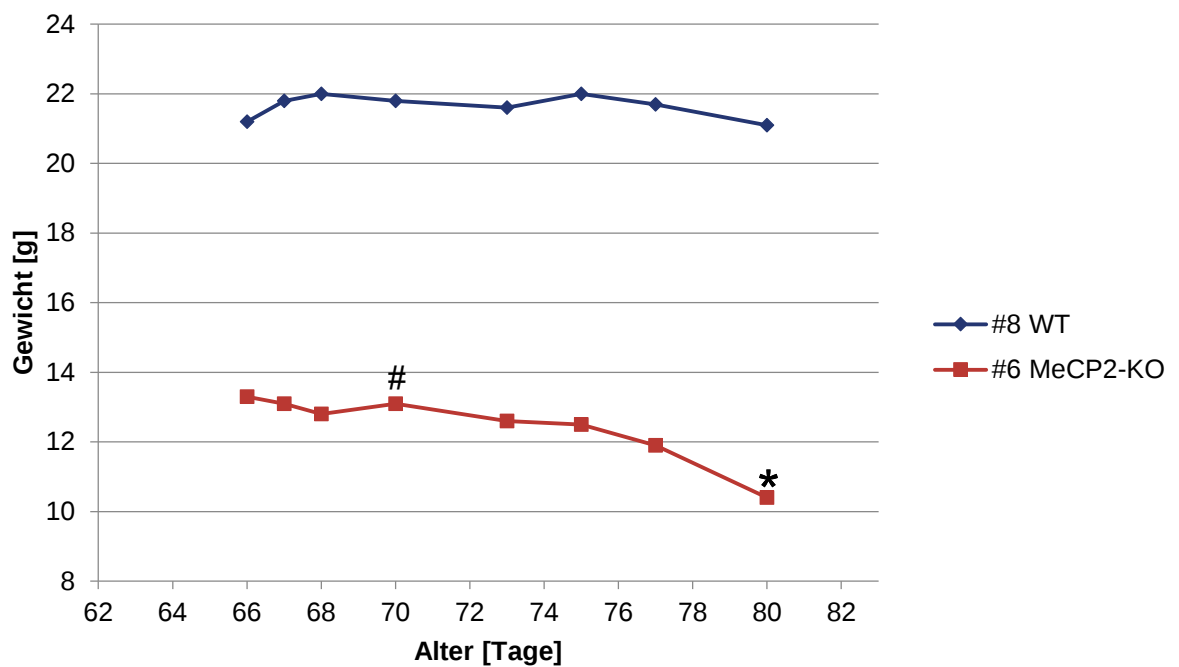


Abbildung 25: Gewichtsverlauf des zweiten Mäusepaars (2. Paar, Tabelle 11). Das Alter der Mäuse bei der Tötung betrug 80 Tage, * = eindeutiges Aufweisen von Clasping, # = Zeitpunkt, ab dem die Gewichtsänderung für Abbildung 34 berechnet wurde.

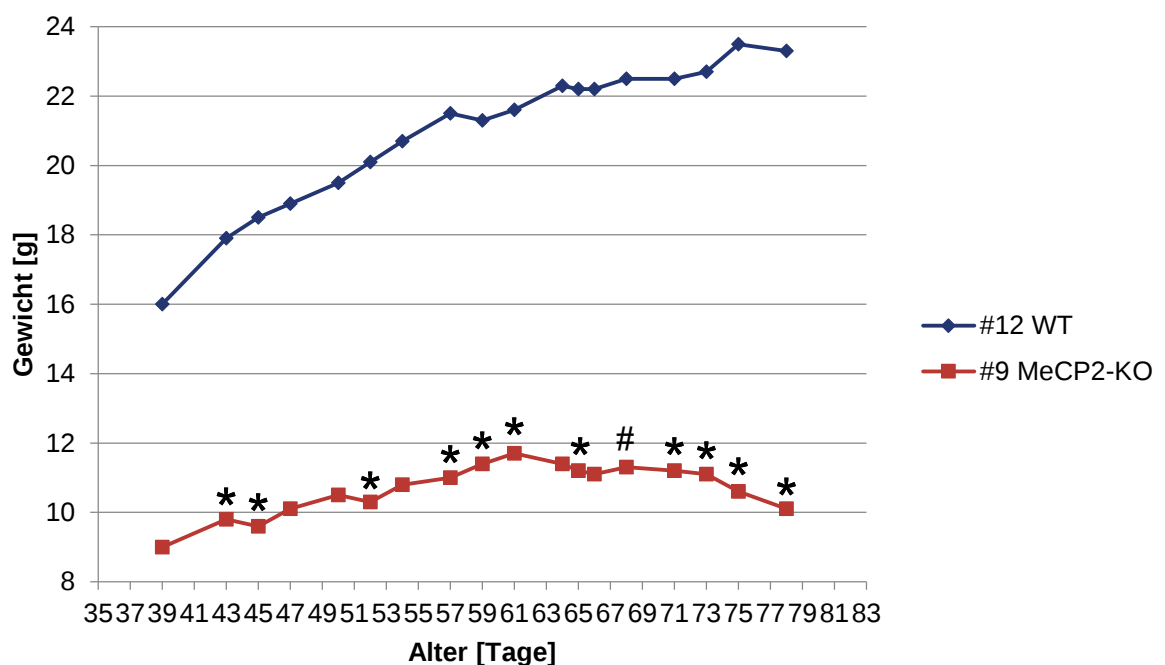


Abbildung 26: Gewichtsverlauf des dritten Mäusepaars (3. Paar, Tabelle 11). Das Alter der Mäuse bei der Tötung betrug 78 Tage, * = eindeutiges Aufweisen von Clasping, # = Zeitpunkt, ab dem die Gewichtsänderung für Abbildung 34 berechnet wurde.

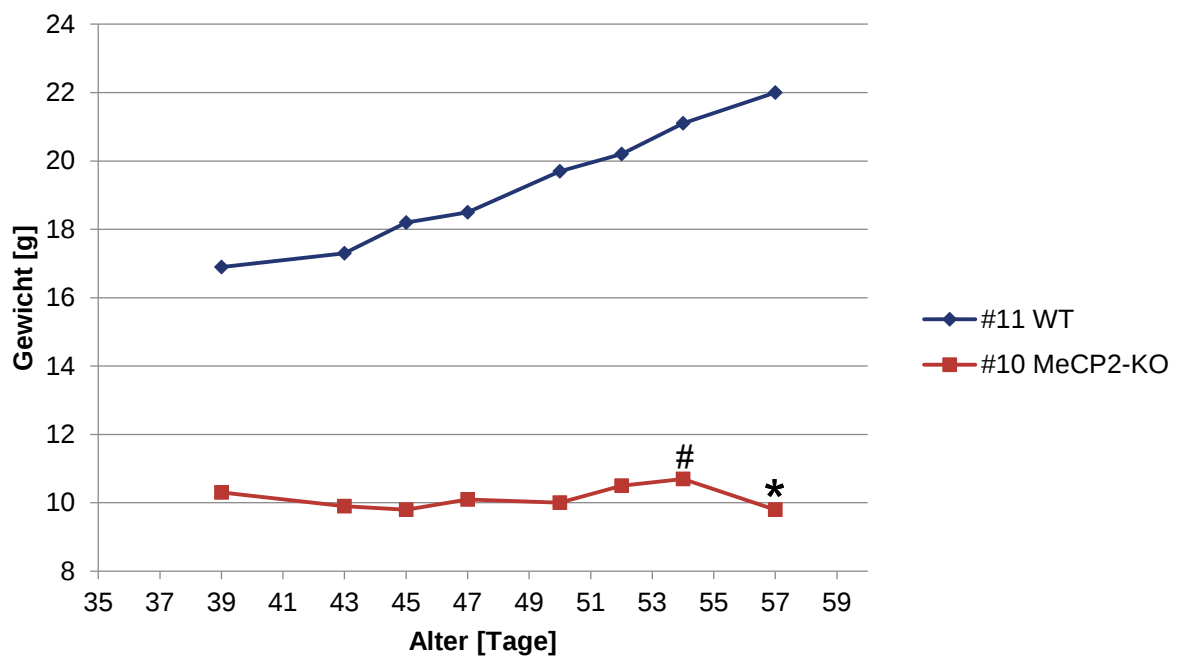


Abbildung 27: Gewichtsverlauf des vierten Mäusepaars (4.Paar, Tabelle 11). Das Alter der Mäuse bei der Tötung betrug 57 Tage, * =eindeutiges Aufweisen von Claspings, # =Zeitpunkt, ab dem die Gewichtsänderung für Abbildung 34 berechnet wurde.

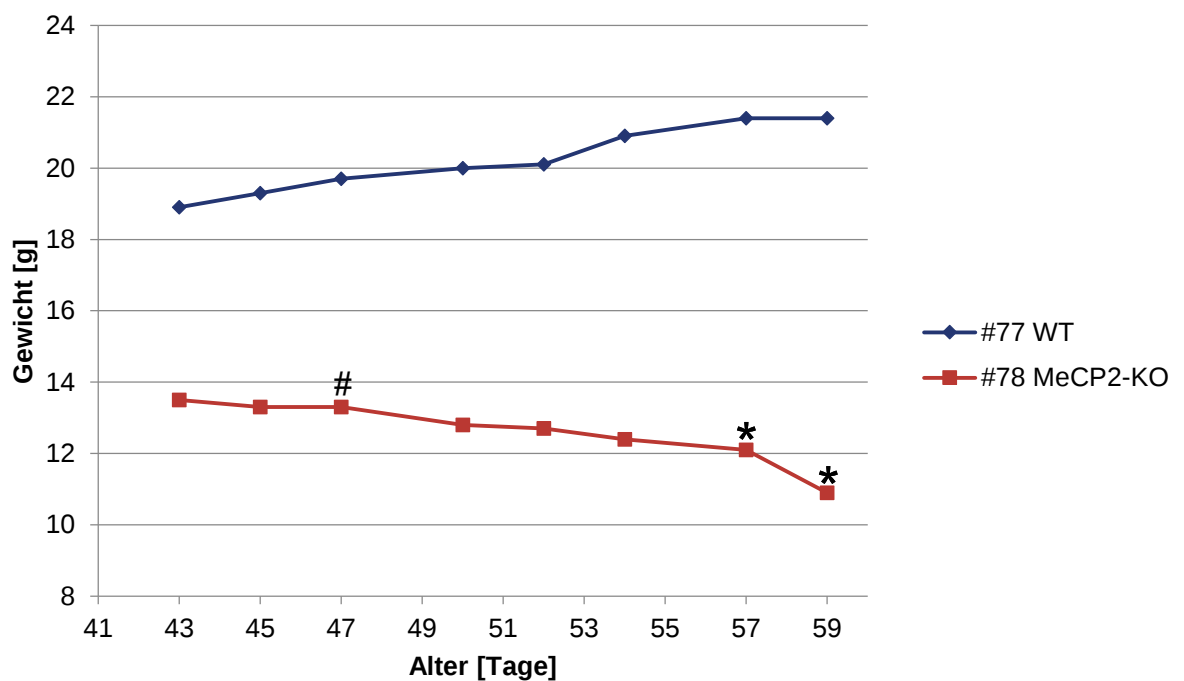


Abbildung 28: Gewichtsverlauf des fünften Mäusepaars (5.Paar, Tabelle 11). Das Alter der Mäuse bei der Tötung betrug 59 Tage, * =eindeutiges Aufweisen von Claspings, # =Zeitpunkt, ab dem die Gewichtsänderung für Abbildung 34 berechnet wurde.

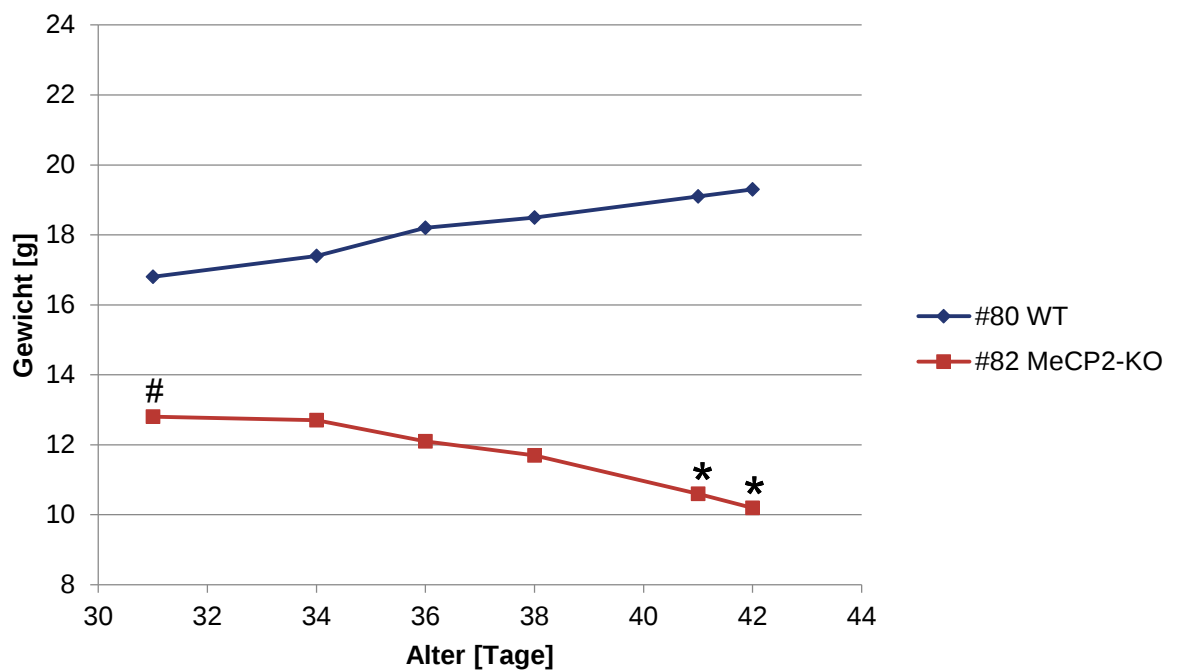


Abbildung 29: Gewichtsverlauf des sechsten Mäusepaars (6.Paar, Tabelle 11). Das Alter der Mäuse bei der Tötung betrug 42 Tage, * =eindeutiges Aufweisen von Claspings, # =Zeitpunkt, ab dem die Gewichtsänderung für Abbildung 34 berechnet wurde.

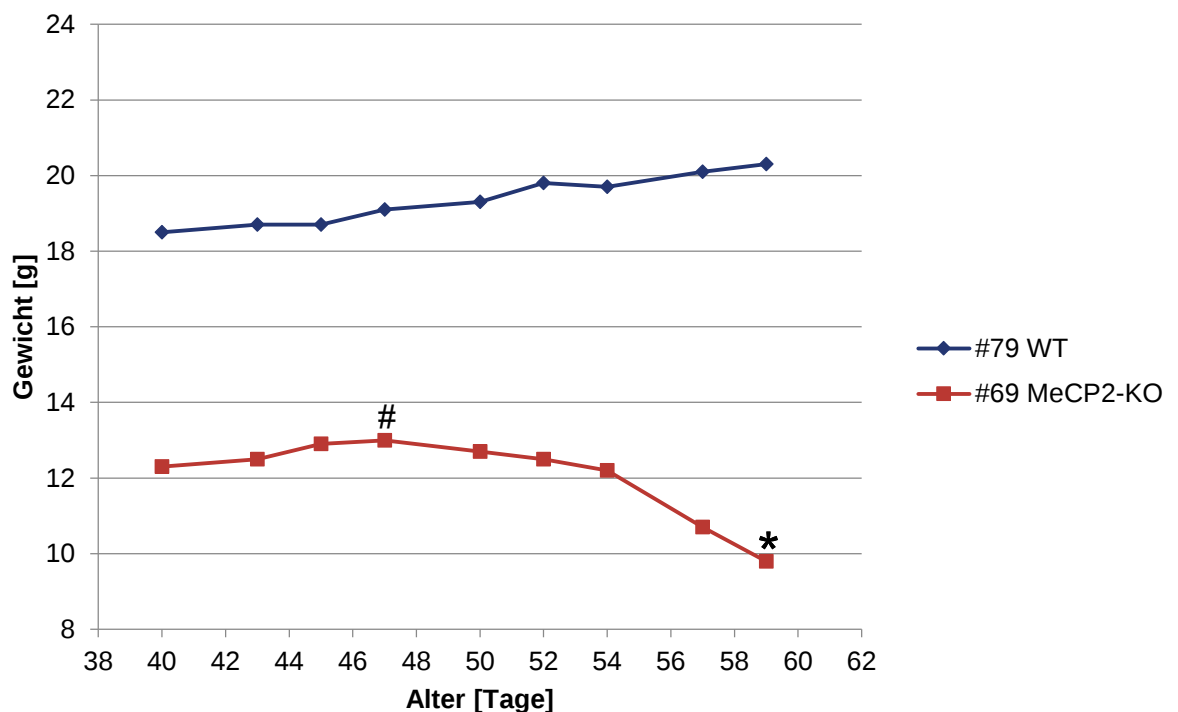


Abbildung 30: Gewichtsverlauf des siebten Mäusepaars (7.Paar, Tabelle 11). Das Alter der Mäuse bei der Tötung betrug 59 Tage, * =eindeutiges Aufweisen von Claspings, # =Zeitpunkt, ab dem die Gewichtsänderung für Abbildung 34 berechnet wurde.

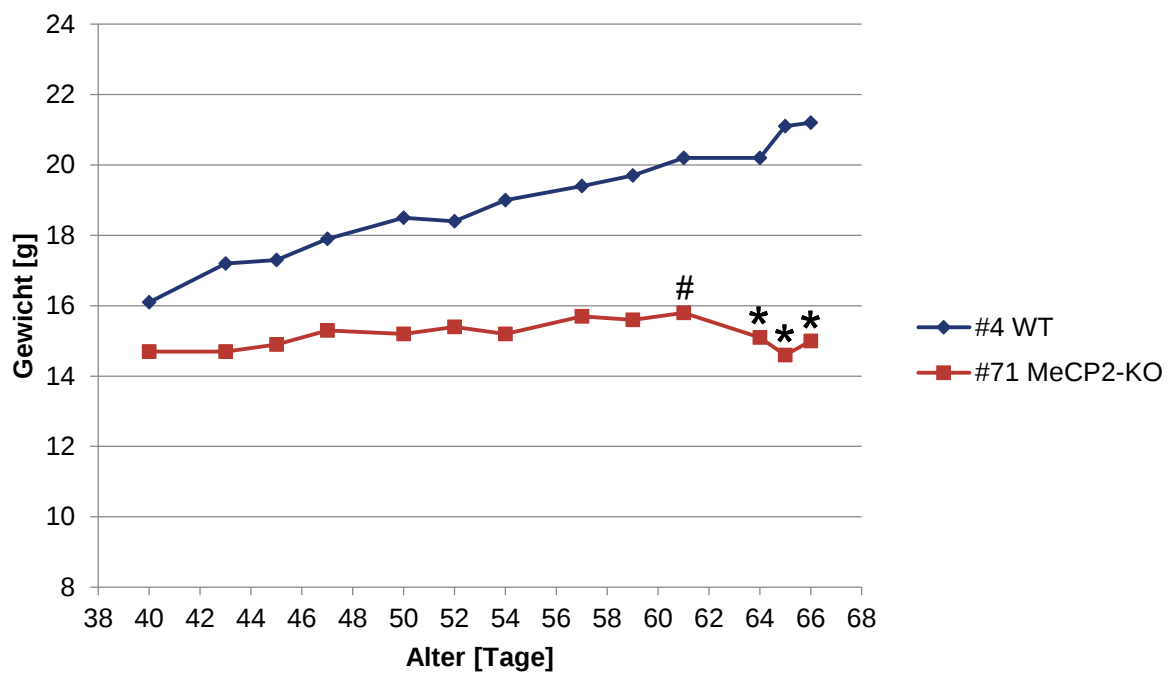


Abbildung 31: Gewichtverlauf des achten Mäusepaars (8.Paar, Tabelle 11). Das Alter der Mäuse bei der Tötung betrug 66 Tage, * =eindeutiges Aufweisen von Clasping, # =Zeitpunkt, ab dem die Gewichtsänderung für Abbildung 34 berechnet wurde.

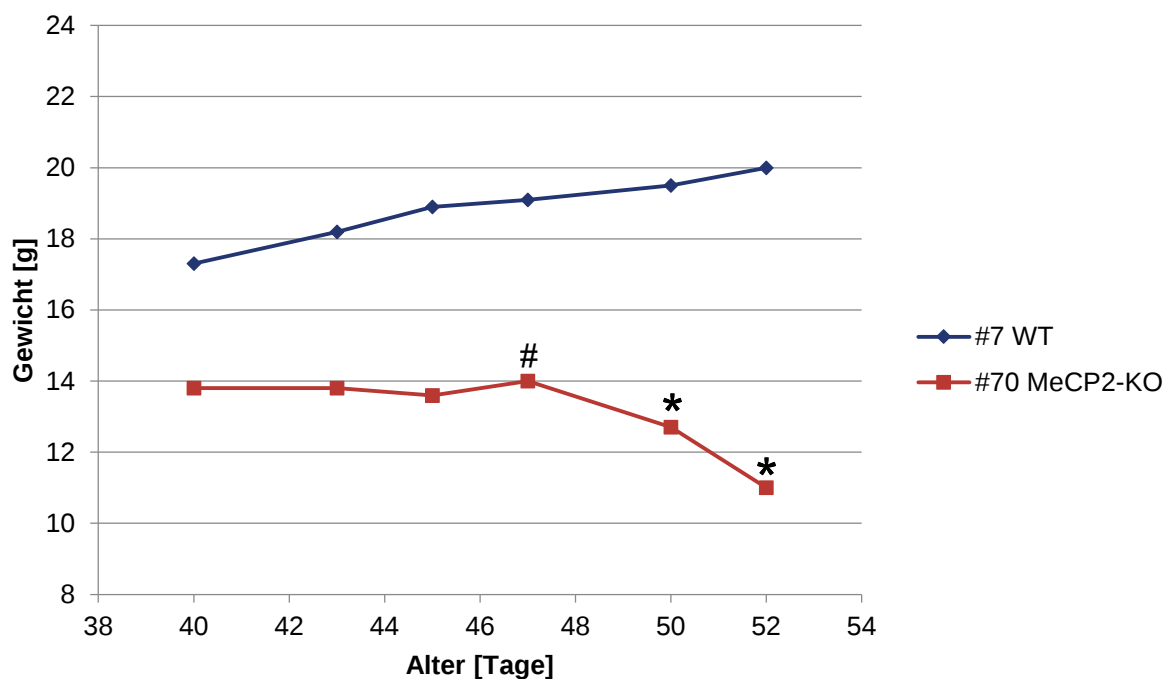


Abbildung 32: Gewichtverlauf des neunten Mäusepaars (9.Paar, Tabelle 11). Das Alter der Mäuse bei der Tötung betrug 52 Tage, * =eindeutiges Aufweisen von Clasping, # =Zeitpunkt, ab dem die Gewichtsänderung für Abbildung 34 berechnet wurde.

Bereits zu Beginn der Betreuung wiesen die MeCP2-KO Mäuse durch ihr phänotypisches Krankheitsbild ein geringeres Gewicht auf und unterschieden sich stark von der Größe der Wild-Typ Mäuse. Mit zunehmendem Alter stieg auch der Gewichtsverlust der MeCP2-KO Mäuse im Gegensatz zu den Wild-Typ Mäusen, welche stetig an Gewicht zunahmen (siehe Abbildung 33).

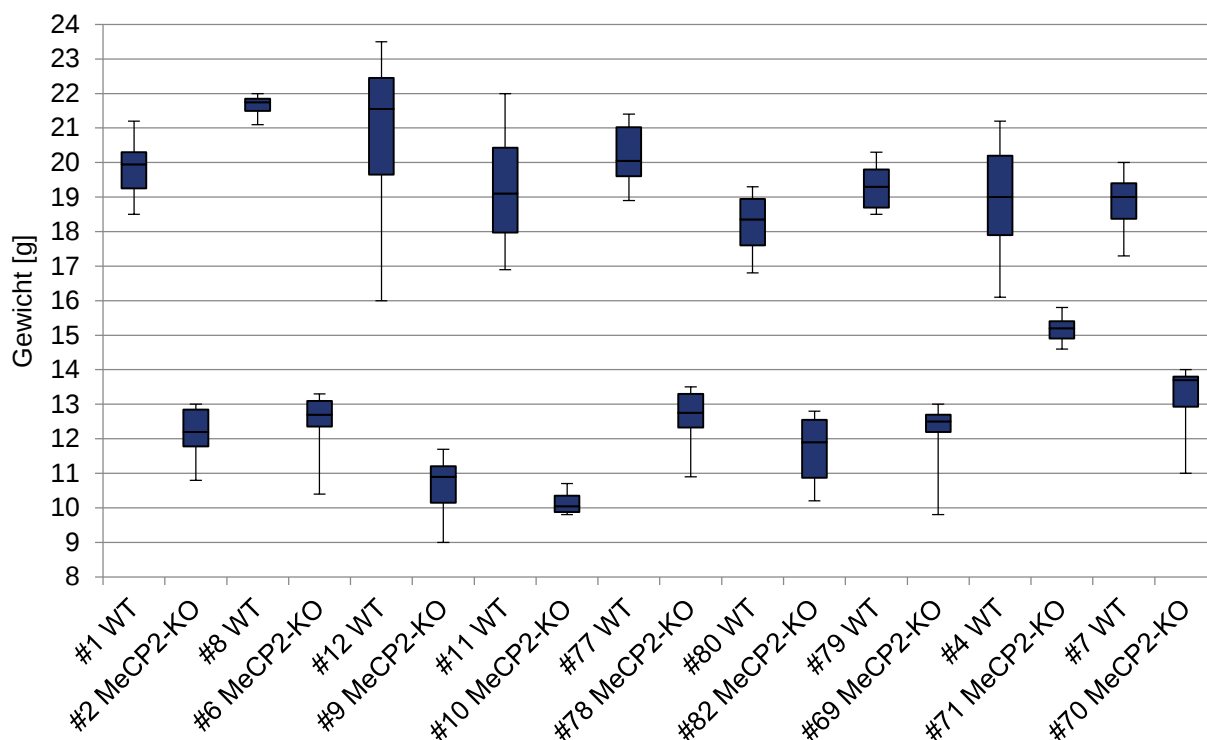


Abbildung 33: Zusammenfassende Grafik des Gewichtsbereiches während des Beobachtungszeitraumes aller betreuten Wild-Typ und MeCP2-KO Mäusen.

Auch bei der Betrachtung einer bestimmten Zeitspanne der Betreuung der Mäuse konnte man erkennen, dass alle MeCP2-KO stark an Gewicht verloren, wohingegen fast alle Wild-Typ Mäuse in derselben Zeitspanne an Gewicht zunahmen beziehungsweise nur wenig an Gewicht verloren (siehe Abbildung 34).

In der Abbildung 34 wurde der signifikante Gewichtsverlust der MeCP2-KO Mäuse zu den jeweiligen Zeitpunkten des höchsten Gewichtes vor Beginn der kontinuierlichen Gewichtsabnahme dargestellt. Im Vergleich dazu wurden die Gewichtsänderungen der Wild-Typ Mäuse im selben Zeitraum gegenübergestellt.

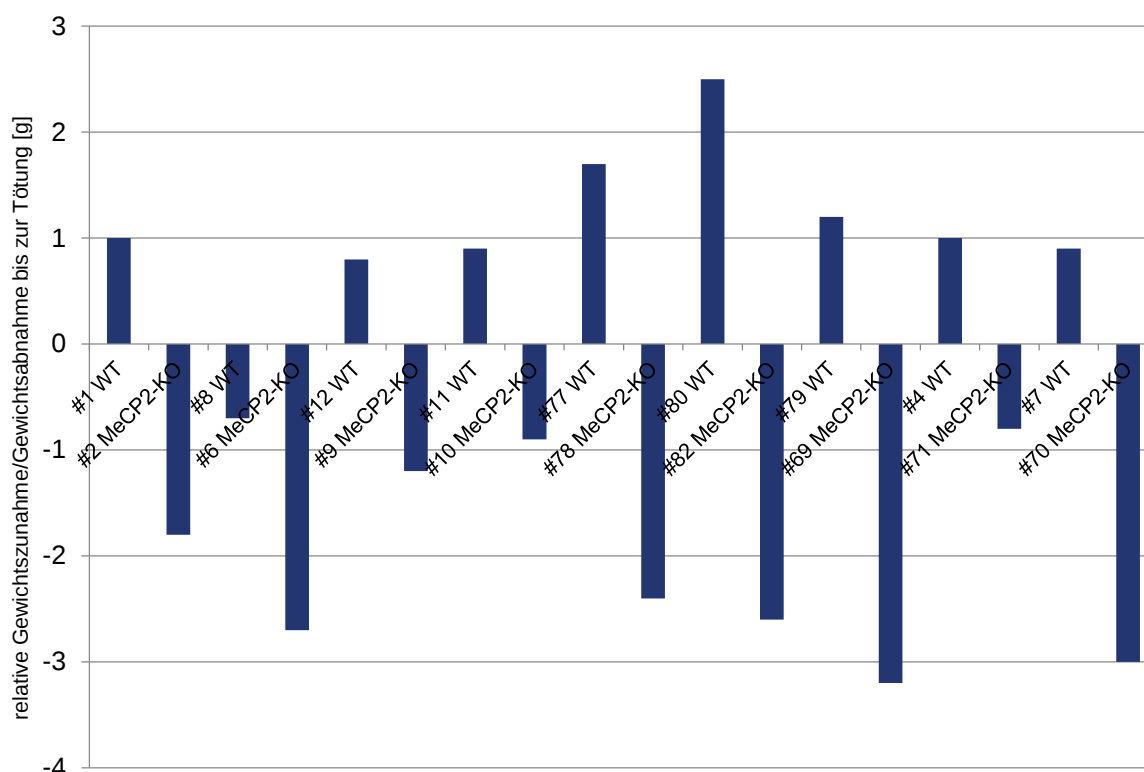


Abbildung 34: Überblick über den signifikanten Gewichtsverlust der MeCP2-KO Mäuse. Berechnung ab jeweiligem Zeitpunkt mit höchstem Gewicht der MeCP2-KO Mäuse vor Beginn der kontinuierlichen Gewichtsabnahme. Zum Vergleich die Gewichtsänderung der WT-Mäuse im selben Zeitraum. Zeitraum innerhalb der Gewichtsänderung der WT und MeCP2-KO Mäuse: 1.Paar (Tabelle 11): 7 Tage; 2.Paar (Tabelle 11): 10 Tage; 3.Paar (Tabelle 11): 10 Tage; 4.Paar (Tabelle 11): 3 Tage; 5.Paar (Tabelle 11): 12 Tage; 6.Paar (Tabelle 11): 11 Tage; 7.Paar (Tabelle 11): 11 Tage; 8.Paar (Tabelle 11): 5 Tage, 9.Paar (Tabelle 11): 5 Tage.

4.1.3 Der Einfluss des MeCP2-KO auf die Expression der Proteine ZO-1, Occludin, Claudin-5, S100 β , MAP2 und GFAP

Die Expression der tight junction Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 als Marker der Barrierefunktion der Gehirndothelzellen, die Expression des Proteins MAP2 als Marker für reife Neuronen, sowie die Expression der Proteine S100 β und GFAP als Marker von Astrozyten wurde mittels Western Blot der Gehirnprouben analysiert. MeCP2 wurde bei jedem Western Blot als Kontrolle zur richtigen Probenzuordnung mitanalysiert. Hierbei wurde immer eine gleichaltrige Wild-Typ Maus und MeCP2-KO Maus gegenübergestellt. Für die Quantifizierung wurden drei verschiedene endogene Kontrollen (GAPDH, β -Actin und Tubulin) herangezogen (siehe Abbildung 35-38).

4.1.3.1 Western Blots

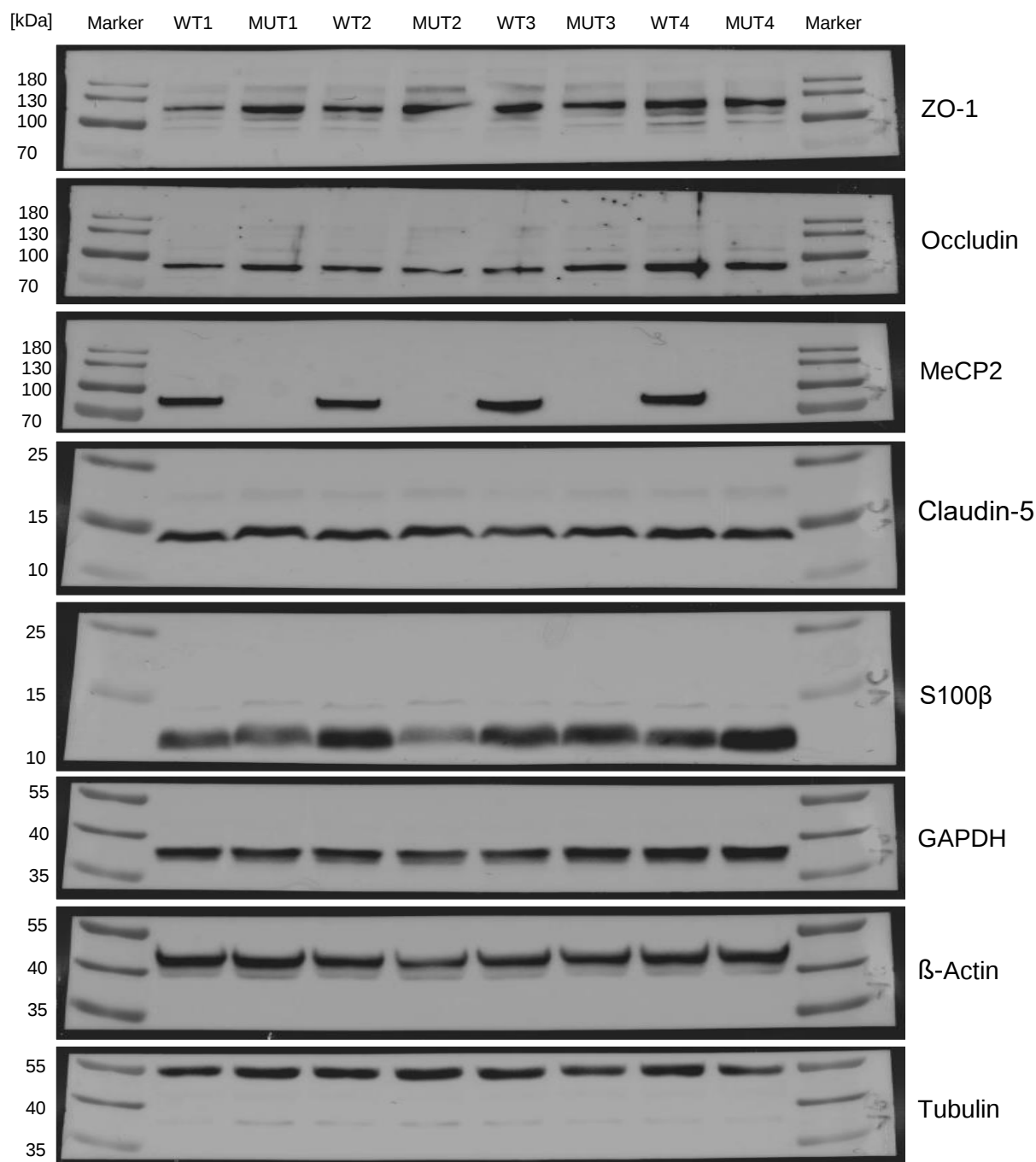


Abbildung 35: Western Blot 1 der Mausgehirnlysate: Expression der Proteine ZO-1, Occludin, MeCP2, Claudin-5 und S100β nach absteigender Größe und den endogenen Kontrollen GAPDH, β-Actin und Tubulin; WT1=Probe #1WT, MUT1=Probe #2MeCP2-KO, WT2=Probe #8WT, MUT2=Probe #6MeCP2-KO, WT3=Probe #12WT, MUT3=Probe #9MeCP2-KO, WT4=Probe #11WT, MUT4=Probe #10MeCP2-KO; Exposure Time für ZO-1: 3,5 Sekunden, Exposure Time für Occludin: 3 Minuten, Exposure Time für MeCP2: 40 Sekunden, Exposure Time für Claudin-5: 7 Sekunden, Exposure Time für S100β: 16 Sekunden, Exposure Time für GAPDH: 4 Sekunden, Exposure Time für β-Actin: 4 Sekunden, Exposure Time für Tubulin: 10 Sekunden, Marker: PageRuler, kDa=Kilodalton, MUT=Mutiert, WT=Wild-Typ.

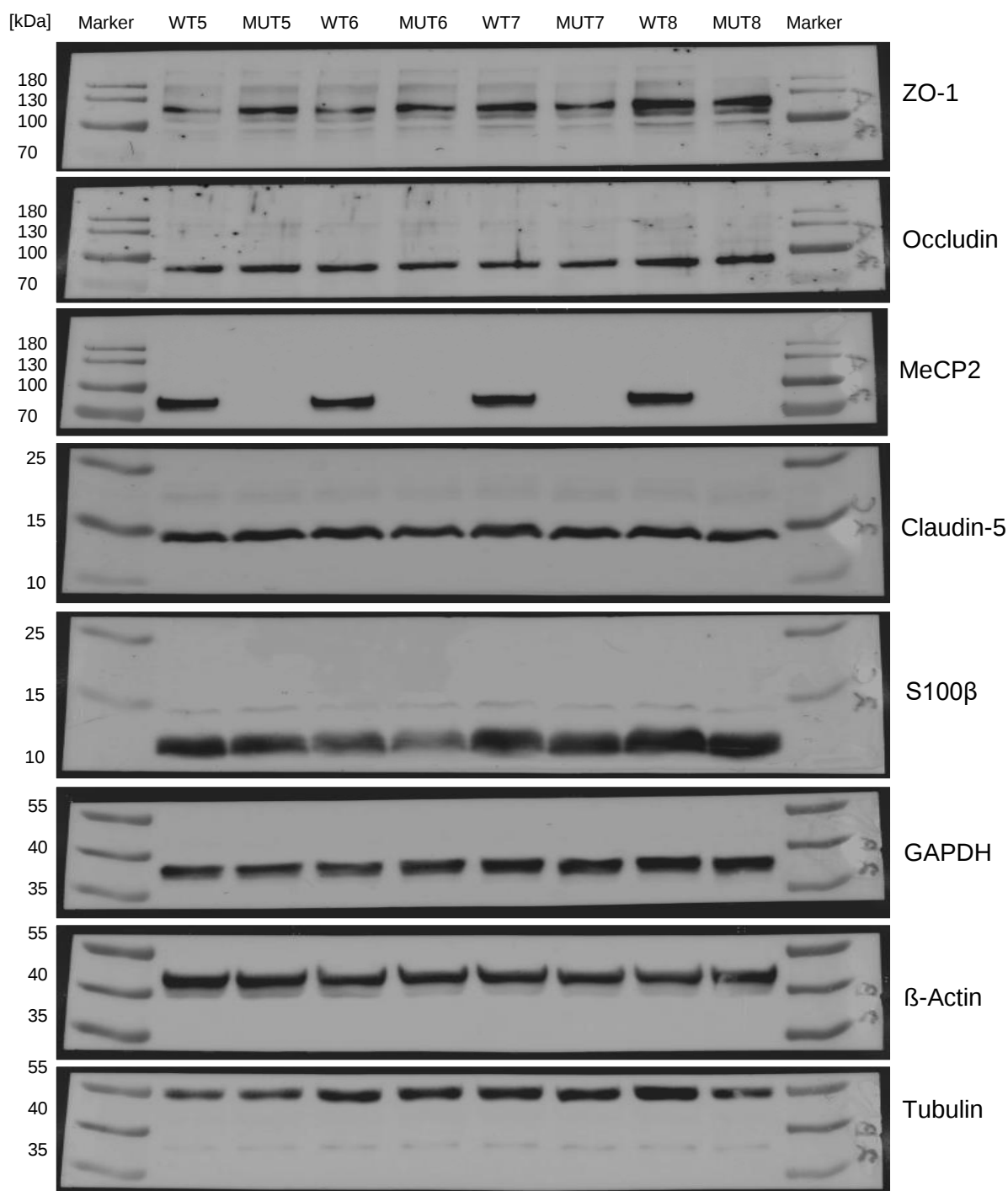


Abbildung 36: Western Blot 2 der Mausgehirnlysate: Expression der Proteine ZO-1, Occludin, MeCP2, Claudin-5 und S100β nach absteigender Größe und der endogenen Kontrollen GAPDH, β-Actin und Tubulin; WT5=Probe #77WT, MUT5=Probe #78MeCP2-KO, WT6=Probe #80WT, MUT6=Probe #82MeCP2-KO, WT7=Probe #79WT, MUT7=Probe #69MeCP2-KO, WT8=Probe #4WT, MUT8=Probe #71MeCP2-KO; Exposure Time für ZO-1: 6 Sekunden, Exposure Time für Occludin: 3 Minuten, Exposure Time für MeCP2: 34 Sekunden, Exposure Time für Claudin-5: 6 Sekunden, Exposure Time für S100β: 30 Sekunden, Exposure Time für GAPDH: 5 Sekunden, Exposure Time für β-Actin: 4 Sekunden, Exposure Time für Tubulin: 8 Sekunden, Marker: PageRuler, kDa=Kilodalton, MUT=Mutiert, WT=Wild-Typ.

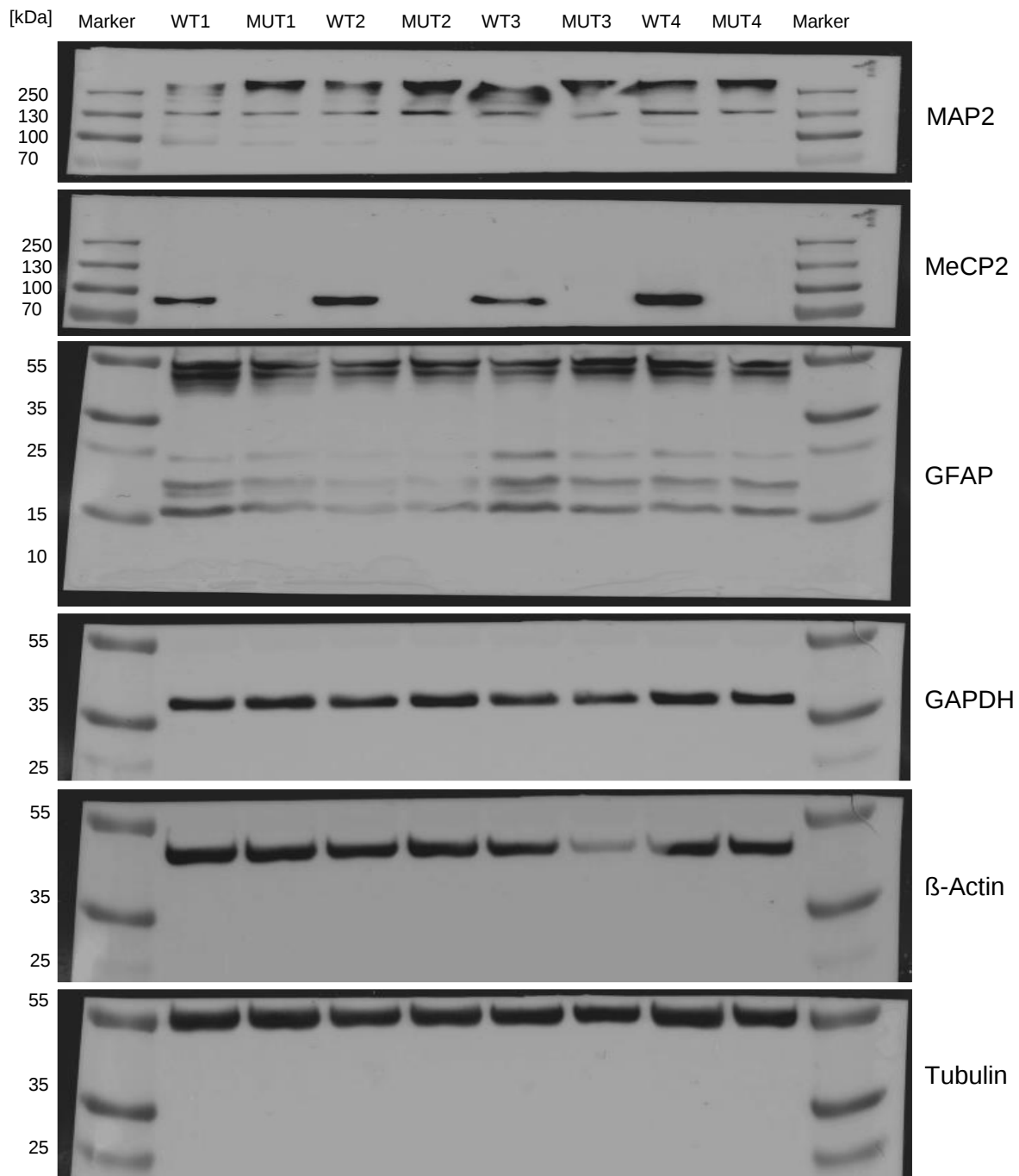


Abbildung 37: Western Blot 1 der Mausgehirnlysate: Expression der Proteine MAP2, MeCP2 und GFAP nach absteigender Größe und den endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin; WT1=Probe #1WT, MUT1=Probe #2MeCP2-KO, WT2=Probe #8WT, MUT2=Probe #6MeCP2-KO, WT3=Probe #12WT, MUT3=Probe #9MeCP2-KO, WT4=Probe #11WT, MUT4=Probe #10MeCP2-KO; Exposure Time für MAP2: 10 Sekunden, Exposure Time für MeCP2: 56 Sekunden, Exposure Time für GFAP: 8 Sekunden, Exposure Time für GAPDH: 4 Sekunden, Exposure Time für β -Actin: 5 Sekunden, Exposure Time für Tubulin: 4 Sekunden; Marker: peqGOLD Protein Marker V, kDa=Kilodalton, MUT=Mutiert, WT=Wild-Typ.

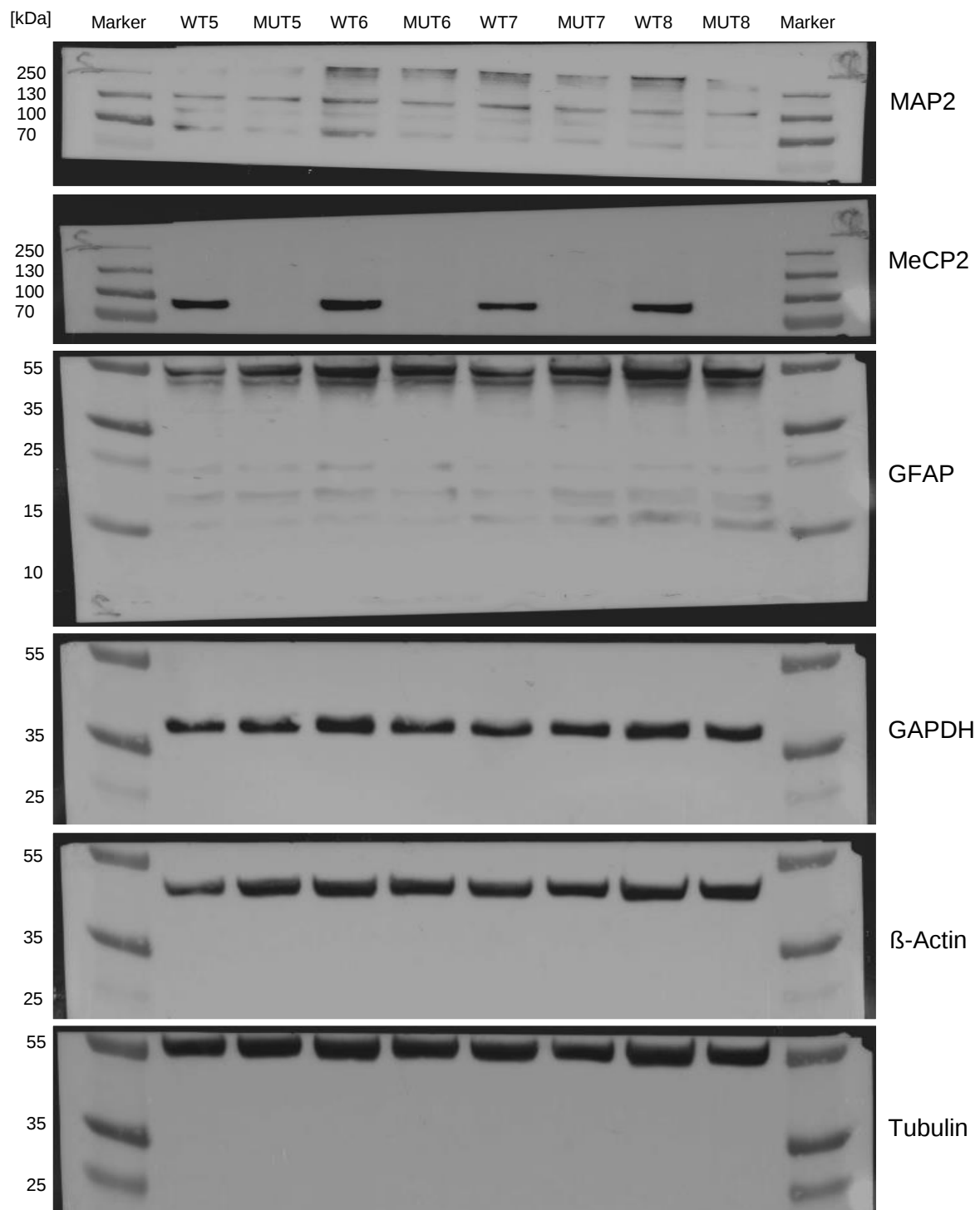


Abbildung 38: Western Blot 2 der Mausgehirnlysate: Expression der Proteine MAP2, MeCP2 und GFAP nach absteigender Größe und den endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin; WT5=Probe #77WT, MUT5=Probe #78MeCP2-KO, WT6=Probe #80WT, MUT6=Probe #82MeCP2-KO, WT7=Probe #79WT, MUT7=Probe #69MeCP2-KO, WT8=Probe #4WT, MUT8=Probe #71MeCP2-KO; Exposure Time für MAP2: 16 Sekunden, Exposure Time für MeCP2: 2,3 Minuten, Exposure Time für GFAP: 7 Sekunden, Exposure Time für GAPDH: 4 Sekunden, Exposure Time für β -Actin: 5 Sekunden, Exposure Time für Tubulin: 4 Sekunden; Marker: pEqGOLD Protein Marker V, kDa=Kilodalton, MUT=Mutiert, WT=Wild-Typ.

4.1.3.2 Densitometrische Auswertung

Bei der densitometrischen Auswertung der Blots der Tierversuche wurde jeweils bei den Mäusepaaren die Expression der Wild-Typ Maus als 1 angenommen. Die Expression der dazugehörigen, gleichaltrigen MeCP2-KO-Maus wurde dementsprechend in Korrelation zu der Wild-Typ Maus gebracht. Die Normalisierung der Proteinquantifizierung erfolgte mit drei verschiedenen endogenen Kontrollen (GAPDH, β -Actin und Tubulin).

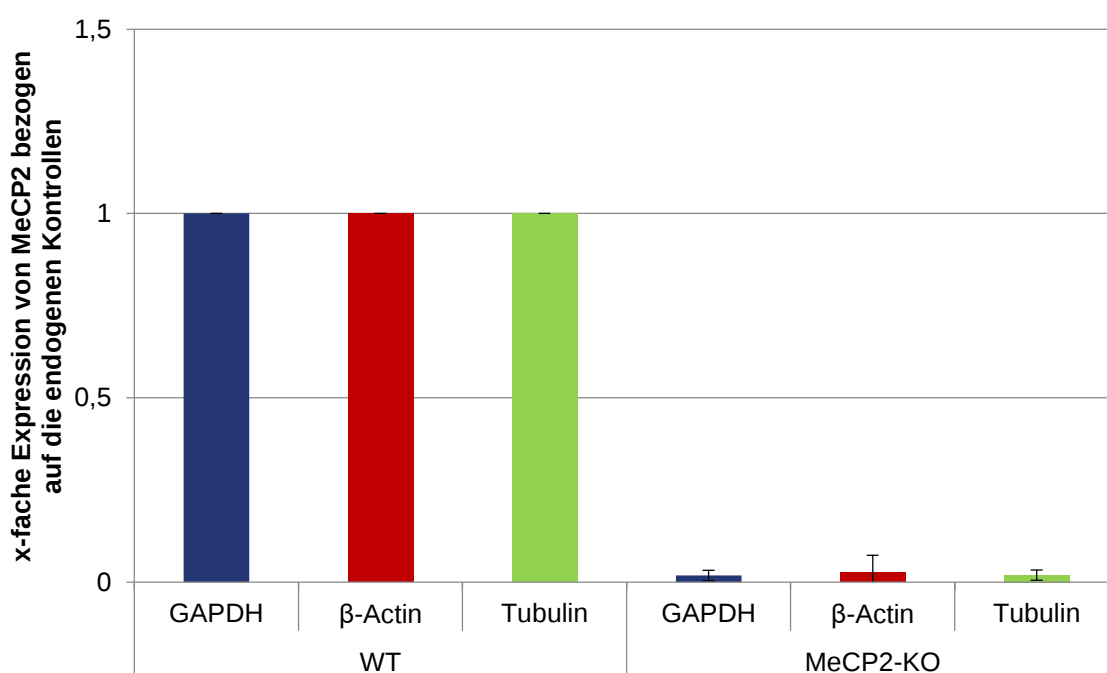


Abbildung 39: Expression von MeCP2 bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin; Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben, $n=16$ von je 8 Proben zweimal geblottet.

Die Auswertung für MeCP2 bestätigte den Knock-out in den MeCP2-KO Tieren. Die minimalen Signale für die MeCP2-KO Proben entsprechen dem Hintergrund bei der densitometrischen Auswertung. Die statistische Analyse ergab dementsprechend hochsignifikante Unterschiede (siehe Abbildung 39).

Weder die Gehirndothelzellmarker Claudin-5, Occludin und ZO-1, noch die Astrozytenmarker S100 β und GFAP und der neuronale Marker MAP2 wurden auf der Proteinebene durch den MeCP2-KO statistisch signifikant reguliert (siehe Abbildungen 40-45).

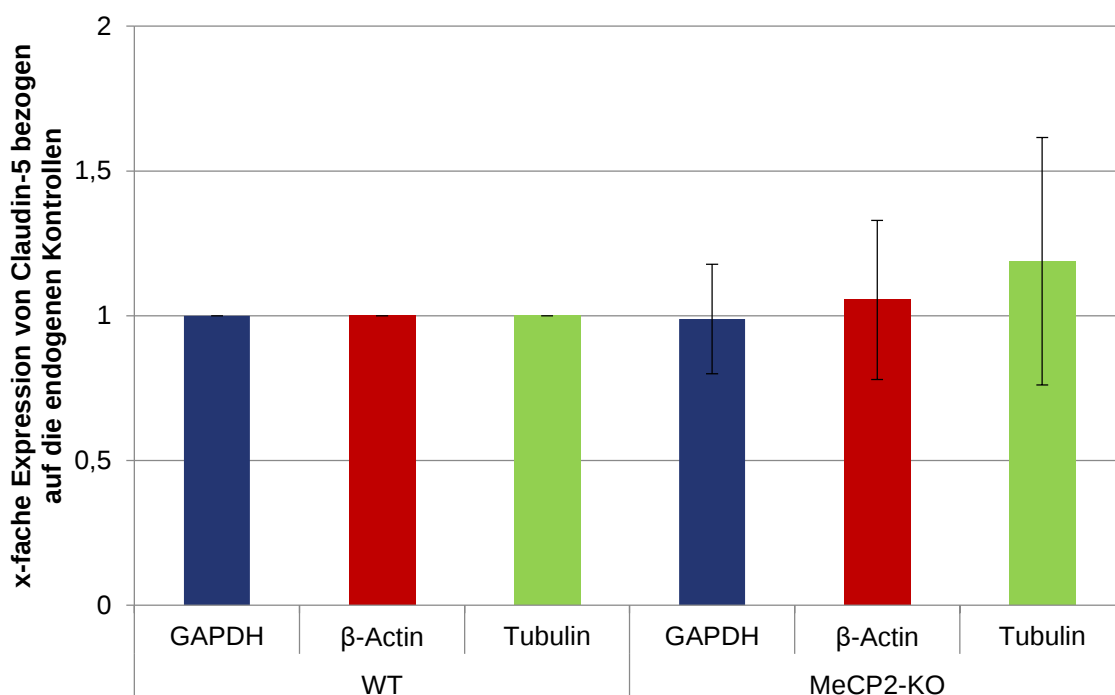


Abbildung 40: Expression von Claudin-5 bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin; Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben, $n=8$ von je 8 Proben einmal geblottet.

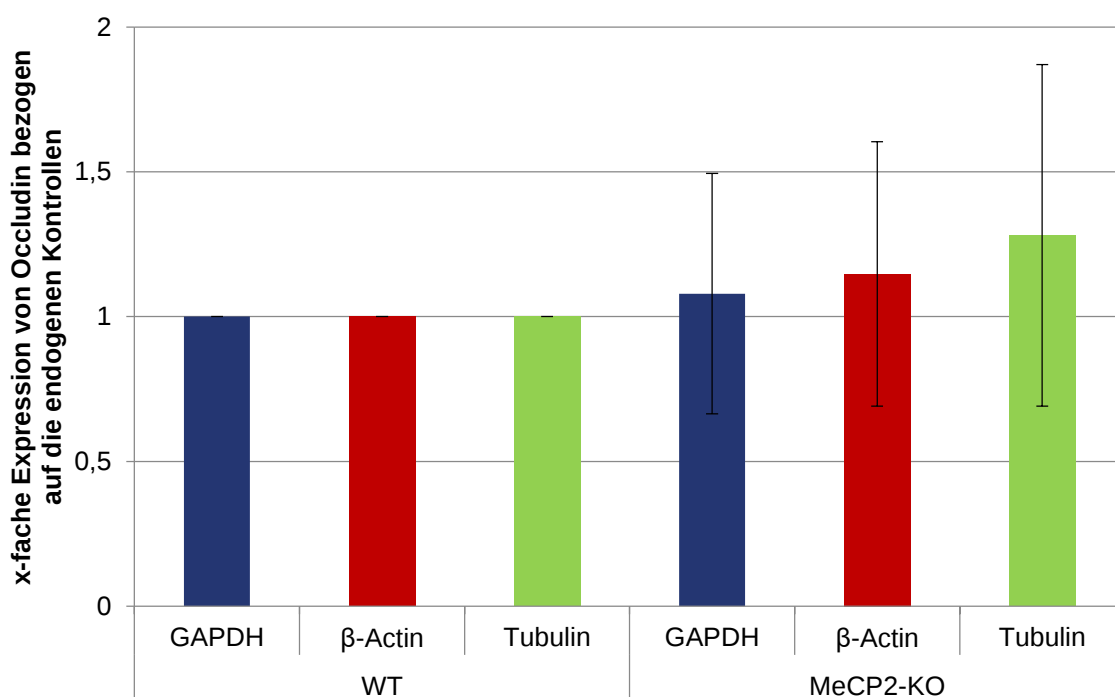


Abbildung 41: Expression von Occludin bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin; Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben, $n=8$ von je 8 Proben einmal geblottet.

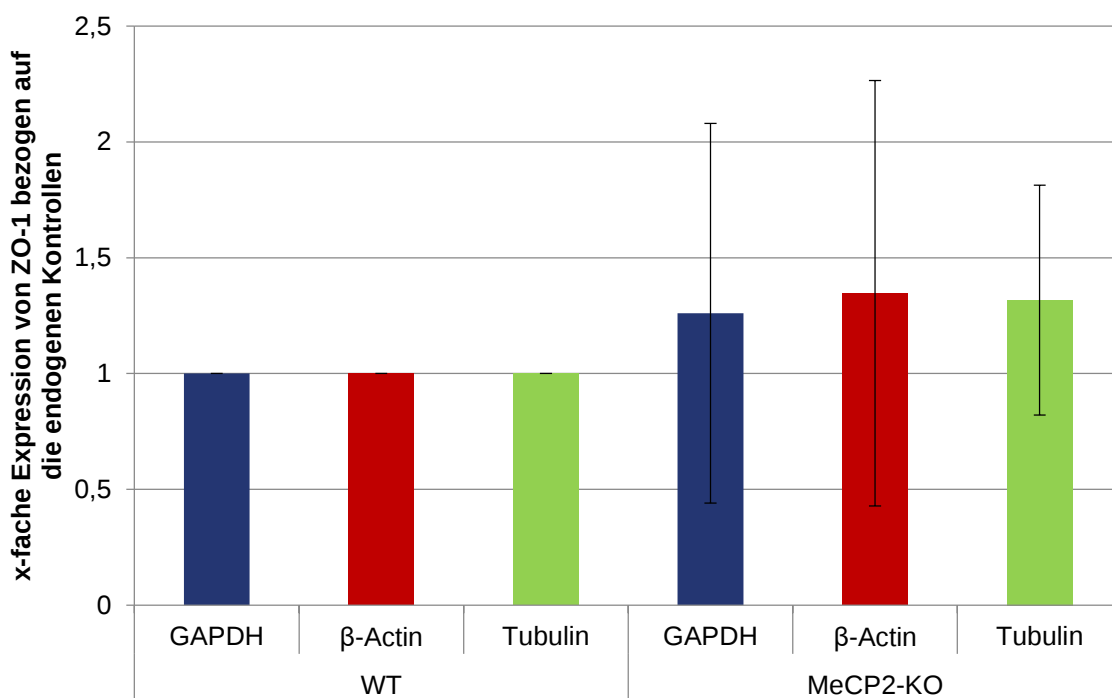


Abbildung 42: Expression von ZO-1 bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin; Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben, $n=8$ von je 8 Proben einmal geblottet.

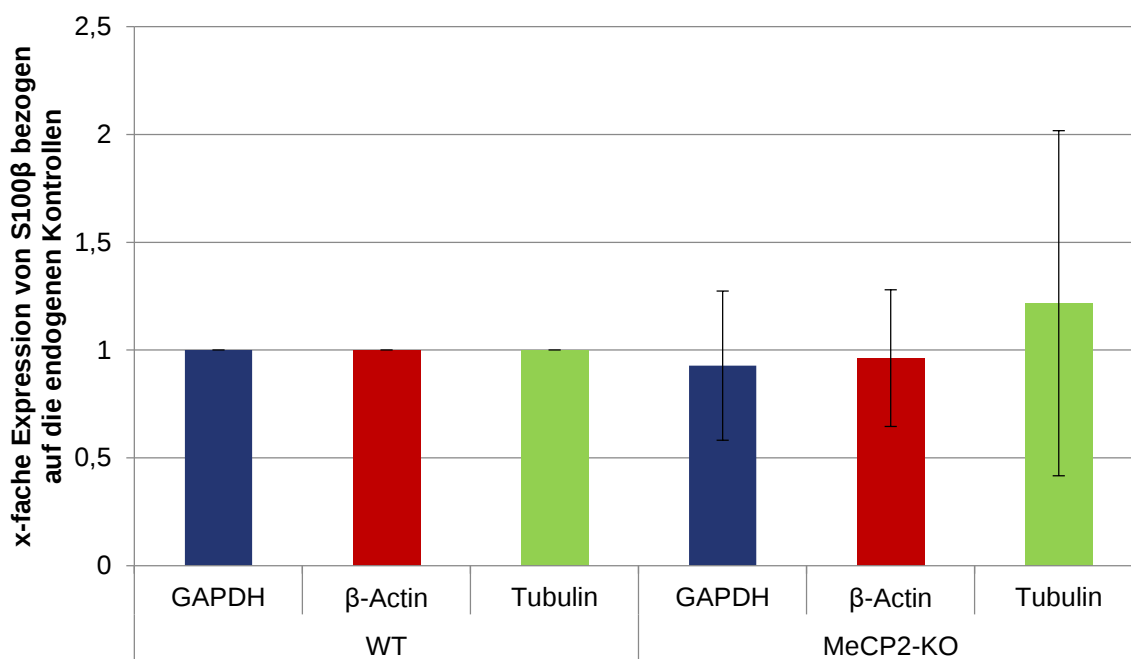


Abbildung 43: Expression von S100 β bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin; Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben, $n=8$ von je 8 Proben einmal geblottet.

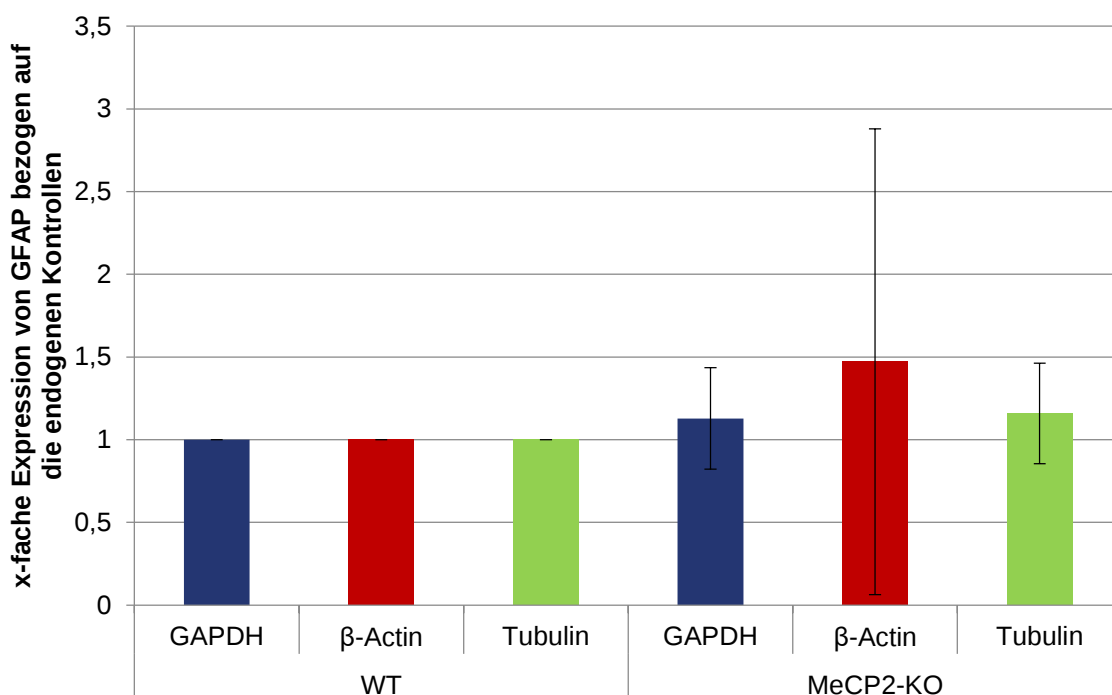


Abbildung 44: Expression von GFAP bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin; Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben, $n=8$ von je 8 Proben einmal geblottet.

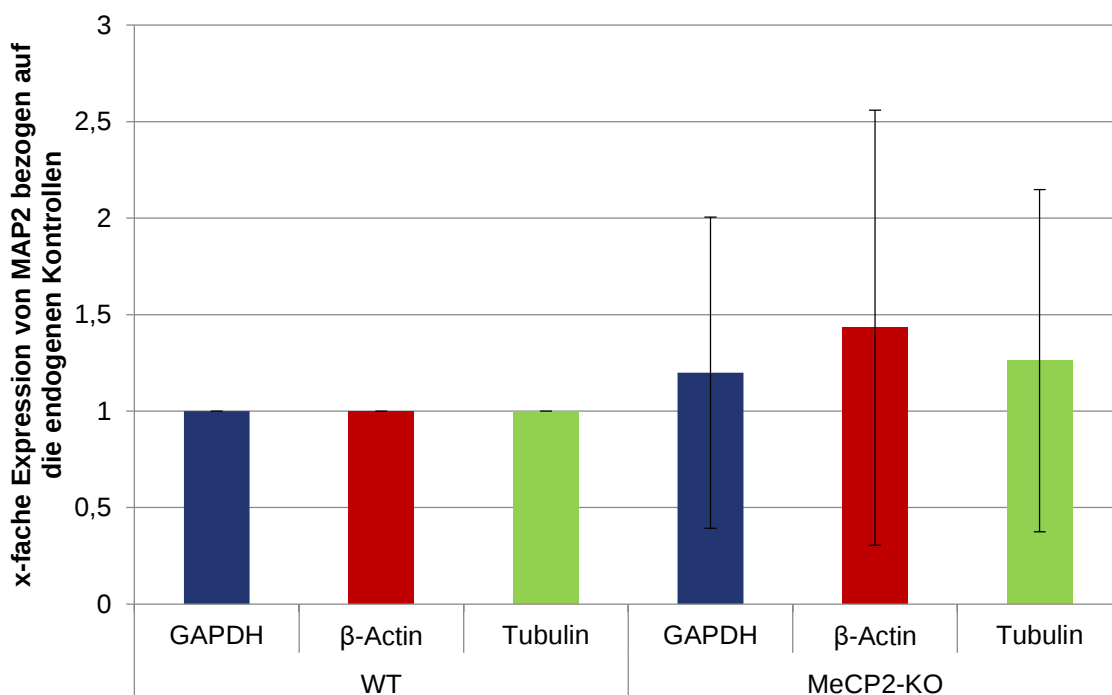


Abbildung 45: Expression von MAP2 bezogen auf die endogenen Kontrollen GAPDH, β -Actin und Tubulin; Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben, $n=8$ von je 8 Proben einmal geblottet.

4.2 Etablierung eines siRNA MeCP2 knock-down Protokolls für Mausgehirnendothelzellen

Ziel war die Entwicklung eines siRNA knock-down Protokolls von MeCP2 in cerebEND Mausgehirnendothelzellen. Während der Entwicklung des Protokolls mussten einige Parameter bei den Transfektionen und bei den Western Blots optimiert werden, da ein Standardprotokoll für eine Einfachtransfektion nicht ausreichte, um einen reproduzierbaren stabilen knock-down von MeCP2 in cerebEND Zellen zu erreichen. In Tabelle 12 wurden die unterschiedlichen Versuchsp Parameter während der Protokollentwicklung zusammengefasst.

Parameter	Veränderung/Variation	Begründung für die Änderung der Parameter	Datum der Änderung/ Versuchsnummer
Protein-konzentration beim Auftragen am Gel	40µg Protein	Die Banden wiesen bei der Detektion zu starke Intensitäten auf. Es gab ungleichmäßige Intensitäten der Banden der endogenen Kontrolle.	Datum der Änderung: 7.11.2016 Versuchsnummer: 2
	20µg Protein	Gleichmäßige Intensitäten der Banden der endogenen Kontrolle.	
Konzentration der siRNA bei der Transfektion	10nM und 30nM siRNA	siRNA Konzentration wurde anfangs hoch gewählt, keine bis leichte Regulation von MeCP2 sichtbar.	Datum der Änderung: 14.11.2016 Versuchsnummer: 3
	1nM und 10nM siRNA	Niedrigere siRNA Konzentrationen konnten stärkere Regulation von MeCP2 bewirken.	
Position der behandelten Wells	Kontroll-Wells auf Position 1 und 6	Die Banden der beiden Kontroll-Wells wiesen immer wieder stark schwankende und ungleichmäßige Intensitäten auf. Grund dafür konnte das unterschiedliche Wachstum der Zellen, abhängig von der Position in der 6-Well-Platte sein.	Datum der Änderung: 14.11.2016 Versuchsnummer: 3, 4
	Kontroll-Wells auf Position 1 und 2	Die beiden Kontroll-Wells wurden auf der 6-Well-Platte nebeneinander angeordnet, um zu sehen, ob das Wachstum der Zellen eine Auswirkung auf die Expression von MeCP2 hat.	

Mischen und Auftragen der Zellsuspension auf die Wells	Das Mischen, Resuspendieren und Auftragen der Zellsuspension erfolgte mit einer serologischen Pipette.	Beim Auftragen der Zellsuspension wurde das gesamte Volumen (3mL) für ein Well mit einer serologischen Pipette aufgetragen. Dadurch konnten die Zellen beim Auftragen schneller absinken, was eventuell zu einer nicht ganz genauen Zellzahl pro Well führen konnte.	Datum der Änderung: 05.12.2016 Versuchsnummer: 5
	Das Mischen, Resuspendieren und Auftragen der Zellsuspension erfolgte mit einer Kolbenhubpipette.	Beim Auftragen wurden je 3x1mL der Zellsuspension pro Well mit einer Kolbenhubpipette aufgetragen. Die Zellsuspension wurde dabei öfter gemischt, resuspendiert und aufgetragen. Die genauere Zellzahl pro Well sollte mit diesem Verfahren optimiert werden.	
Konzentration des Interferins	8µl Interferin bei allen siRNA Konzentrationen.	Anfangs wurde die gleiche Interferin Konzentration für alle siRNA-Konzentrationen verwendet.	Datum der Änderung: 23.01.2017 Versuchsnummer: 9
	8µl Interferin bei 1nM siRNA 12µl Interferin bei 10nM siRNA	Bei höheren siRNA-Konzentrationen ab 10nM wird laut dem Interferin Protokoll eine Interferin-Konzentration von 12±4µl empfohlen.	
Zeit der Inkubation mit den Transfektionsreagentien	24h	Leichte Regulation von MeCP2 sichtbar.	Versuchsnummern 24h: 1,3,4,5,6,7,8 Versuchsnummern 48h: 1,2,3,4,5,6,7,9,10 Versuchsnummern 72h: 2,10
	48h	Beste Ergebnisse hinsichtlich der Regulation von MeCP2.	
	72h	Keine Steigerung hinsichtlich der Regulation von MeCP2 zu der 48h-Inkubation.	
Anzahl der Transfektion bei einem Versuch	1x (24h, 48h oder 72h)	Leichte Regulation von MeCP2, jedoch keine einheitlichen Ergebnisse.	Datum der Änderung: 26.01.2017 Versuchsnummer: 10
	3x (72h-48h-48h)	Starke Regulation von MeCP2 und einheitliche Ergebnisse.	

Tabelle 12: Übersicht über die Veränderung der Parameter bei der Entwicklung eines siRNA knock-down Protokolls von MeCP2 in cerebEND Zellen.

Die Versuche 6-8 wurden mit verschiedenen Kombinationen der geänderten Parameter durchgeführt. Nach in Summe elf Versuchen, konnte ein Protokoll entwickelt werden, dass zu einem reproduzierbaren, stabilen knock down von MeCP2 in cerebEND Zellen führte.

4.2.1 Vergleich der Expression von MeCP2 im Western Blot nach einfacher Transfektion in Abhängigkeit der Zeit

Bei der Etablierung des siRNA MeCP2 knock-down Protokolls für cerebEND Zellen wurde anfänglich eine einmalige Behandlung mit den Transfektionsreagentien gewählt. Die Zellen wurden dabei in Abhängigkeit der Zeit 24h, 48h oder 72h nach der Transfektion lysiert und untersucht.

Um dies zu veranschaulichen, wurde die Expression von MeCP2 im Western Blot nach Behandlung mit den Transfektionsreagentien nach 24h, 48h und 72h gegenübergestellt (siehe Abbildung 46).

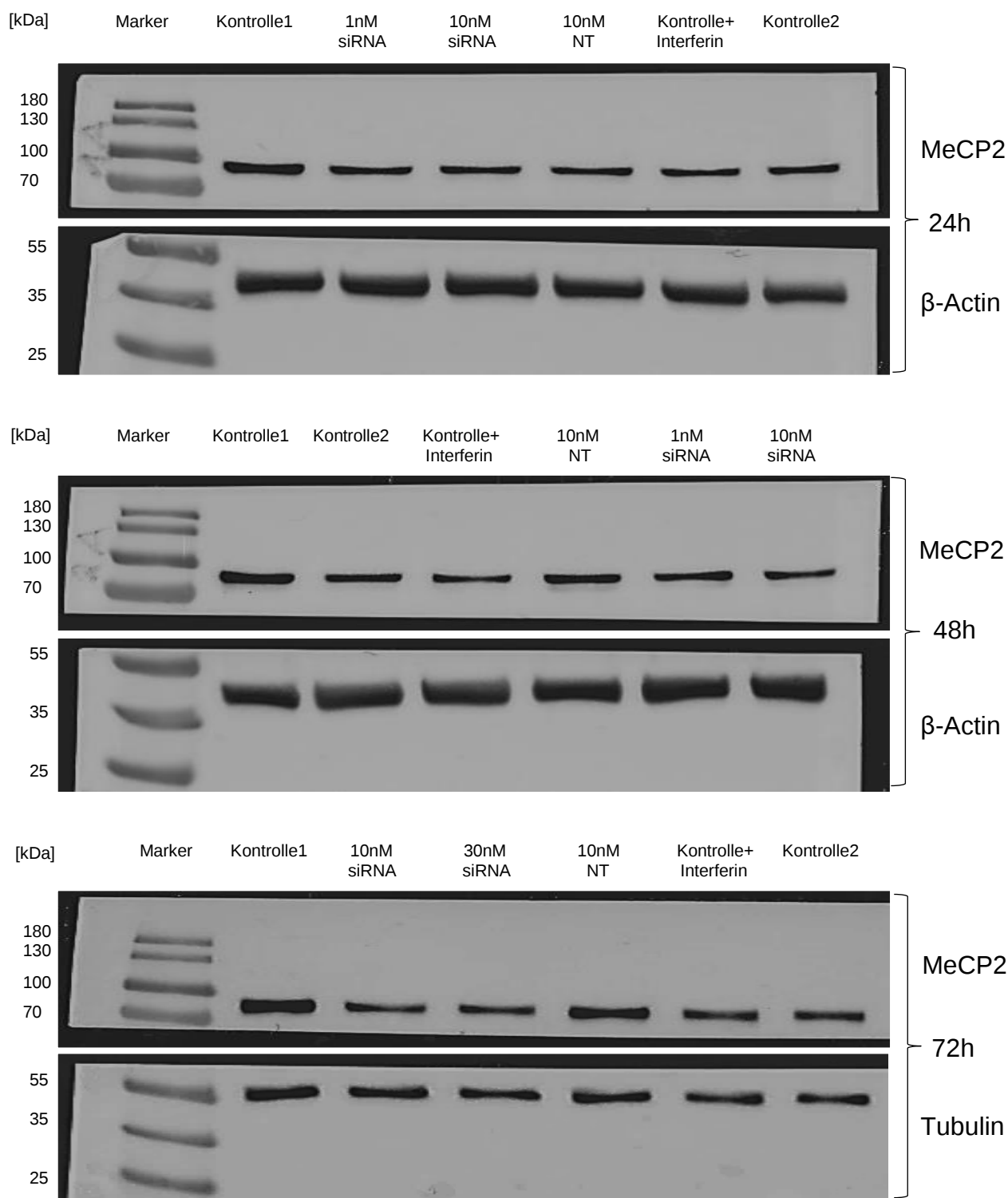


Abbildung 46: Gegenüberstellung der Western Blots mit der Expression von MeCP2 nach Behandlung der Wells mit den Transfektionsreagentien in Abhängigkeit der Zeit nach 24h (Versuchsnummer: 5, Endogene Kontrolle: β -Actin), 48h (Versuchsnummer: 5, Endogene Kontrolle: β -Actin) und 72h (Versuchsnummer: 2, Endogene Kontrolle: Tubulin), NT= Non-Targeting siRNA, Exposure Time MeCP2 24h: 1,8 Minuten, Exposure Time β -Actin 24h: 1,7 Sekunden, Exposure Time MeCP2 48h: 1,9 Minuten, Exposure Time β -Actin 48h: 1,2 Sekunden, Exposure Time MeCP2 72h: 58 Sekunden, Exposure Time Tubulin 72h: 1,2 Minuten, kDa=Kilodalton.

In der densitometrischen Auswertung kann bei allen drei Einmaltransfektionen nach Behandlung mit den Transfektionsreagentien nach 24h, 48h und 72h eine Regulation von MeCP2 beobachtet werden. Die stärkste Regulation von MeCP2 ist bei der Behandlung mit den Transfektionreagentien nach 48h ersichtlich. Jedoch ist bei allen drei Versuchen eine starke Schwankung zwischen den Kontroll-Wells und eine Regulation bei den Wells, welche mit der Non-Targeting siRNA behandelt wurden, zu beobachten (siehe Abbildungen 47-49).

Somit war eine Weiterentwicklung des Protokolls mit der Einmaltransfektion notwendig, um stabilere und einheitlichere Ergebnisse zu erlangen.

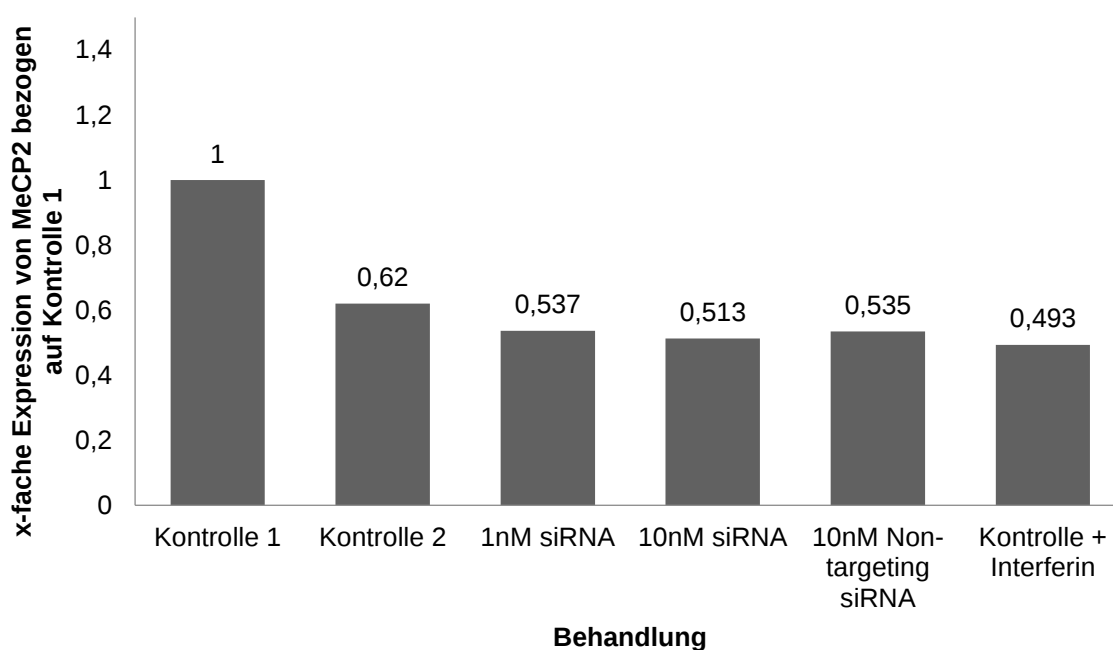


Abbildung 47: Expression von MeCP2 nach Einmaltransfektion nach 24h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 5).

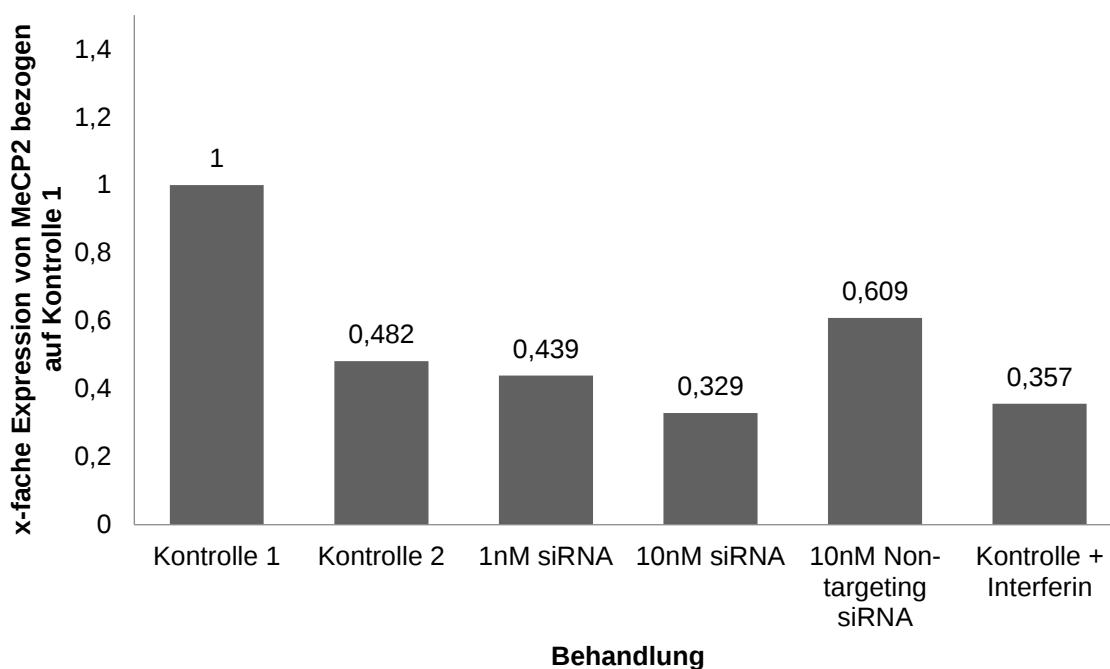


Abbildung 48: Expression von MeCP2 nach Einmaltransfektion nach 48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 5).

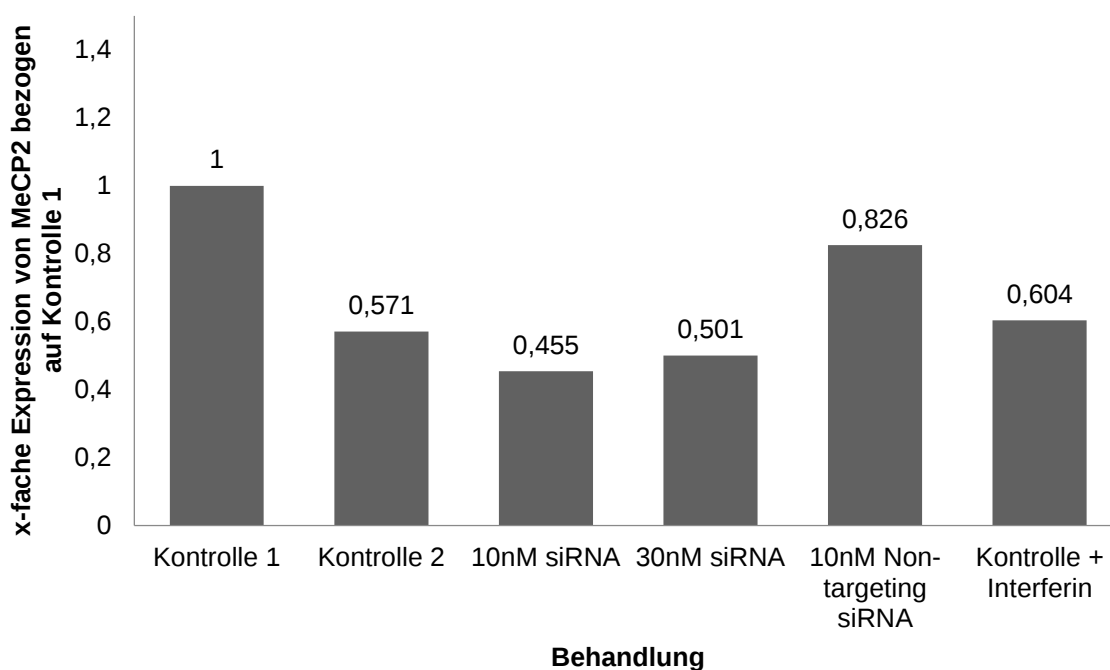


Abbildung 49: Expression von MeCP2 nach Einmaltransfektion nach 72h, normalisiert auf die endogene Kontrolle Tubulin (Versuchsnummer: 2).

4.2.2 Vergleich der Expression von MeCP2 im Western Blot in Abhängigkeit der Anzahl der durchgeführten Transfektionen

Um eine stärkere Regulation von MeCP2 und stabilere Werte zu erlangen, wurde bei Versuchsnummer 10 eine Dreifachtransfektion (Behandlungsintervall mit den Transfektionreagentien: 72h-48h-48h) gewählt. Der Unterschied wurde durch Gegenüberstellung der Expression von MeCP2 im Western Blot nach einer Einmaltransfektion und nach einer Dreifachtransfektion dargestellt (siehe Abbildung 50).

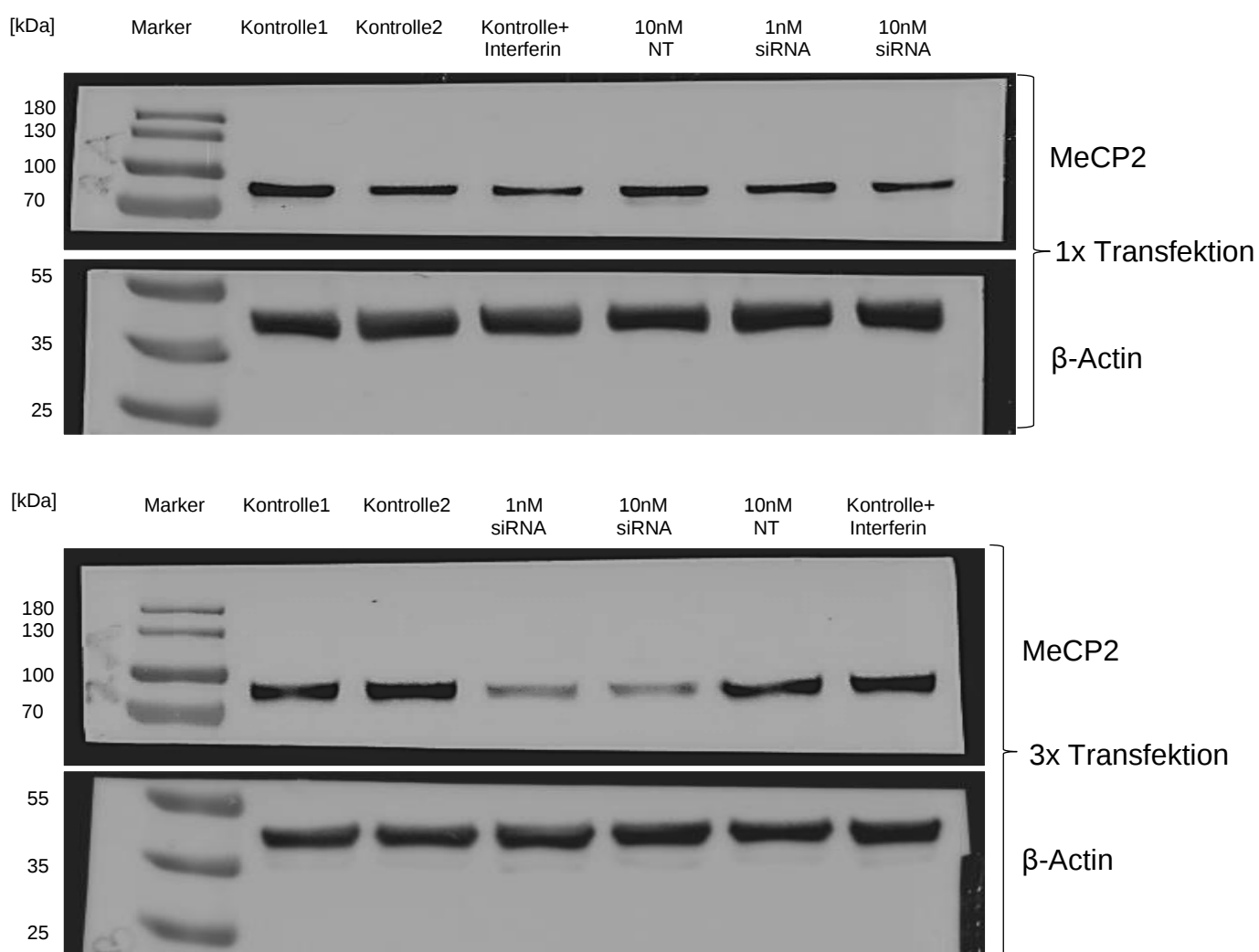


Abbildung 50: Gegenüberstellung der Western Blots mit der Expression von MeCP2 in Abhängigkeit der Anzahl der durchgeführten Transfektionen: Vergleich der Expression von MeCP2 nach der Einmaltransfektion (Versuchsnummer: 5, Endogene Kontrolle: β -Actin, Zeit der Behandlung mit den Transfektionsreagentien: 48h) und nach der Dreifachtransfektion (Versuchsnummer: 10, Endogene Kontrolle: β -Actin, Zeit der Behandlung mit den Transfektionsreagentien: 72h-48h-48h); NT= Non-Targeting siRNA; Exposure Time MeCP2 1xTransfektion: 1,9 Minuten, Exposure Time β -Actin 1xTransfektion: 1,2 Sekunden, Exposure Time MeCP2 3xTransfektion: 25 Sekunden, Exposure Time β -Actin: 6 Sekunden, kDa=Kilodalton.

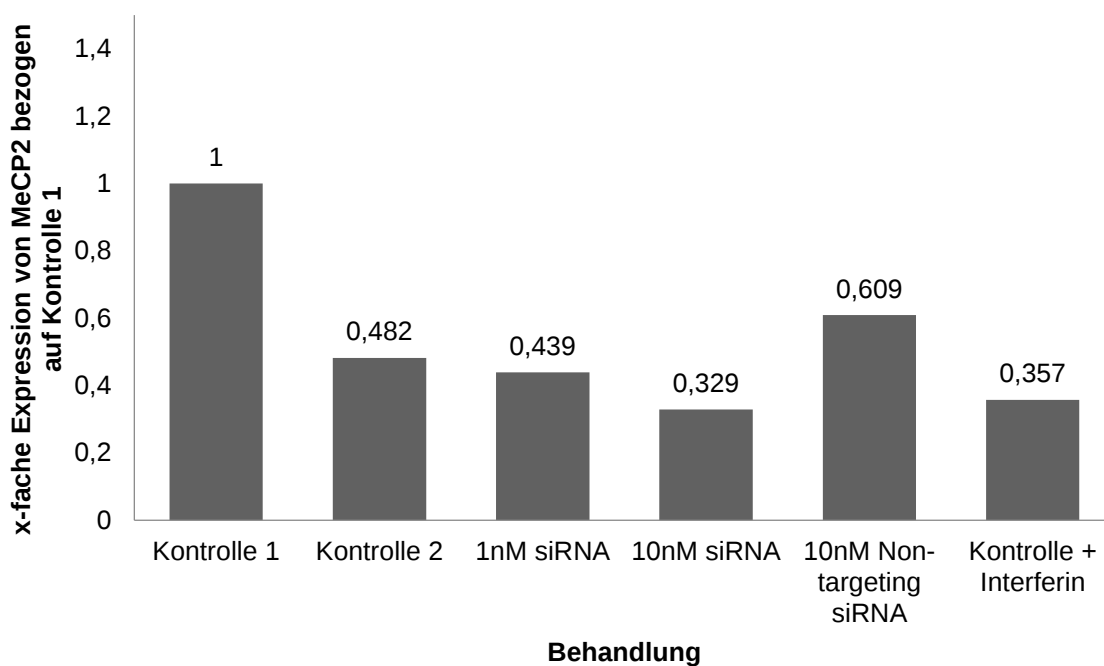


Abbildung 51: Expression von MeCP2 nach Einmaltransfektion nach 48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 5).

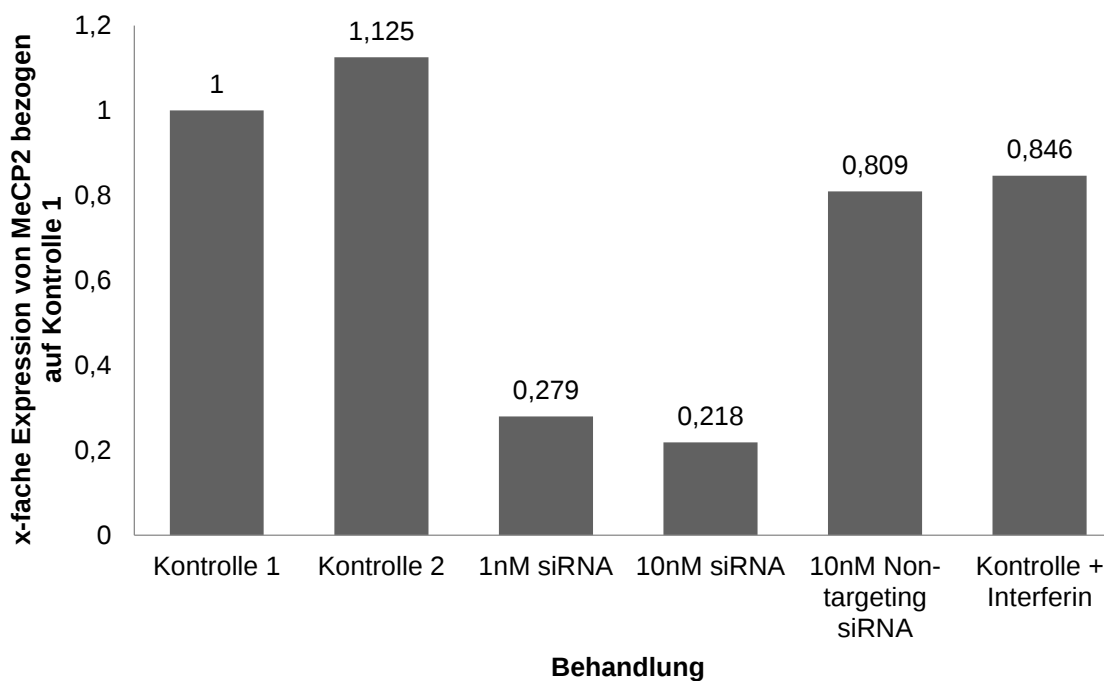


Abbildung 52: Expression von MeCP2 nach Dreifachtransfektion nach 72h-48h-48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 10).

Die densitometrische Auswertung zeigt, dass die Expression von MeCP2 beim Versuch der Dreimaltransfektion weit stärker gesenkt wurde und zudem stabilere Werte hinsichtlich der Kontrollproben und der Non-Targeting siRNA Behandlungen lieferte (siehe Abbildungen 51 und 52).

4.2.3 Expression von Claudin-5 nach dreifacher Transfektion

Um zu überprüfen, ob der knock-down von MeCP2 in cerebEND Zellen eine Auswirkung auf Tight Junction Proteine hat, wurde die Expression des Tight Junction Proteins Claudin-5 als Marker der Barrierefunktion von Mausgehirnendothelzellen mittels Western Blot beim Versuch der Dreifachtransfektion analysiert (siehe Abbildung 53).

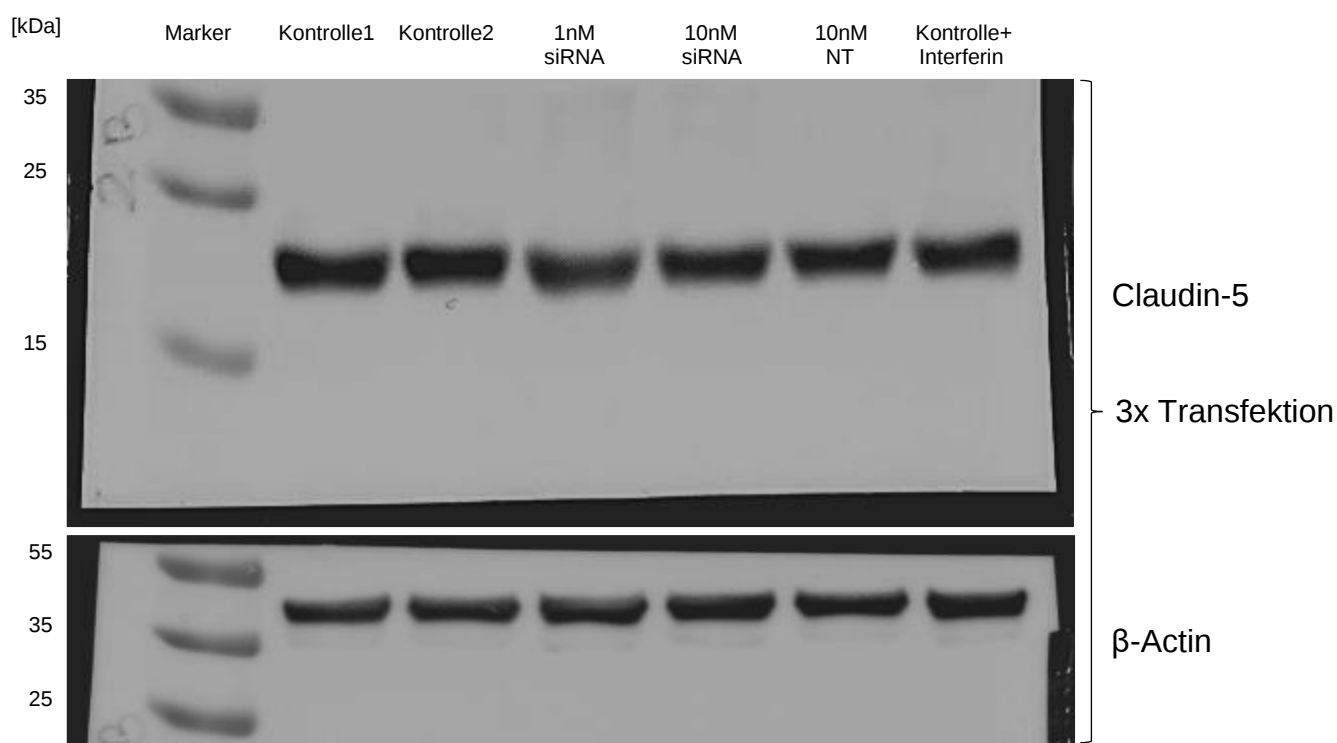


Abbildung 53: Expression von Claudin-5 im Western Blot nach Dreifachtransfektion nach 72h-48h-48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 10); NT= Non-Targeting siRNA, Exposure Time Claudin-5: 16 Sekunden, Exposure Time β -Actin: 6 Sekunden, kDa=Kilodalton.

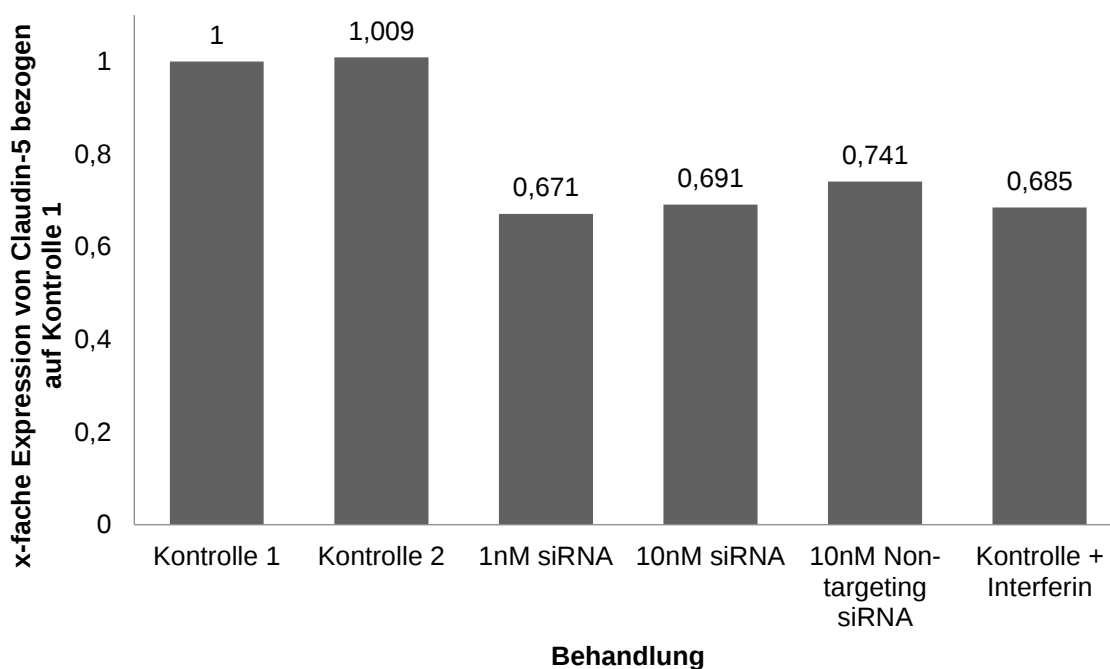


Abbildung 54: Expression von Claudin-5 nach Dreifachtransfektion nach 72h-48h-48h, normalisiert auf die endogene Kontrolle β -Actin (Versuchsnummer: 10)

Die densitometrische Auswertung ergab eine leichte Senkung der Expression von Claudin-5. Jedoch wurden auch die Proben, welche mit Non-Targeting siRNA und Interferin behandelt wurden, reguliert. Somit wären in diesem Bereich noch zusätzliche Experimente notwendig, um zu sehen, ob es sich hier wirklich um eine stabile und signifikante Senkung von Claudin-5 handelt (siehe Abbildung 54).

5 Diskussion

Seit Ende der neunziger Jahre ist durch Amir und seiner Forschungsgruppe bekannt, dass eine Mutation des MECP2-Gens maßgeblich an der Entstehung des Rett-Syndroms beteiligt ist (Amir, Van Den Veyver, Wan, Tran, Francke, & Zonghbi, 1999).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Zucht und Betreuung von MECP2-KO Mäusen und die anschließende Untersuchung, ob wichtige Blut-Hirn Schranken Parameter durch den MeCP2-KO auf Proteinebene beeinflusst werden. Das zweite Ziel der Arbeit war die Etablierung eines siRNA knock-down Protokolls von MeCP2 in cerebEND Mausgehirnendothelzellen.

5.1 Mausmodelle für das Rett-Syndrom

Zur besseren Veranschaulichung welche Auswirkung MeCP2 auf den Organismus hat und um den molekularen Mechanismus besser zu verstehen, dem das Rett-Syndrom zugrunde liegt, werden in diesem Punkt drei verschiedene MeCP2-Mutationen im Mausmodell beschrieben.

5.1.1 MeCP2-/- Mäuse (MeCP2 knock-out)

Häufig werden MeCP2-KO Mäuse als Forschungsmodell für das Rett-Syndrom verwendet. In MeCP2-KO Mäusen wird entweder das Exon 3 oder das Exon 3 und Exon 4 des MECP2-Gens deletiert. Bei den MeCP2-KO Mäusen kommt es vorerst zu einer normalen Entwicklungsphase, gefolgt von einer Phase schwer neurologischer Störungen. Bei den männlichen Mäusen führt der MeCP2-KO innerhalb von 8-10 Wochen zum Tod. Weibliche MeCP2-KO Mäuse durchlaufen dasselbe Verhaltensmuster, jedoch beginnt die Phase der neurologischen Dysfunktion erst mit zunehmenden Alter. Männliche MeCP2-KO Mäuse weisen anfangs bis zu einem Alter von drei bis sechs Wochen keine typischen Krankheitssymptome auf – danach ist jedoch ein steifer, unkoordinierter Gang, verminderte Aktivität (Hypoaktivität), Zittern (Tremor) und das Auftreten von Clasping an den Hinterbeinen und eine unregelmäßige Atmung zu beobachten (Stettner, Huppke, Brendel, Richter, Gartner, & Dutschmann, 2007).

Weibliche Mäuse entwickeln Clasping an den hinteren Extremitäten erst mit einem Alter von etwa drei Monaten. Interessant ist, dass nur eine Deletion von MeCP2 in Neuronen auch zu einem ähnlichen phänotypischen Krankheitsverlauf in den Mäusen führt. Dies bedeutet, dass eine MeCP2-Dysfunktion im Gehirn ausreichend ist, um das Krankheitsbild auszulösen (Guy, Hendrich, Holmes, Martin, & Bird, 2001).

5.1.2 MeCP2^{308/y} Mäuse

Dieses Rett-Syndrom Mausmodell wird generiert, um eine längere Überlebensdauer bei männlichen Mäusen zu schaffen und erzeugt dabei mildere Folgen als das MeCP2-KO Mausmodell. Bei MeCP2^{308/y} Mäusen wird eine knock-out Mutation erzeugt, in dem hinter dem Codon 308 in Exon 4 des MECP2-Gens ein Stoppcodon eingefügt wird. Dies führt am MECP2-Gen zur Eliminierung der C-terminalen Domäne, ohne jedoch die MBD und TRD Domäne und die NLS Sequenz zu beschädigen. Solche Deletionen der C-terminalen Domäne können auch in Rett-Patienten beobachtet werden. Männliche MeCP2^{308/y} Mäuse zeigen bis zur sechsten Woche keine phänotypischen Krankheitsmerkmale. Danach folgen jedoch eine Verschlechterung der neurologischen Funktion und typische Symptome und Verhaltensmuster, wie motorische Dysfunktion und verminderte Aktivität (Hypoaktivität). Ab dem achten Monat können bei männlichen MeCP2^{308/y} Mäusen Krampfanfälle beobachtet werden. Weibliche MeCP2^{308/y} Mäuse weisen schnelle, ruckartige Bewegungen der Vorderpfoten auf und können Anzeichen von Tremor entwickeln. Die Lebenserwartung von männlichen MeCP2^{308/y} Mäusen beträgt in etwa zehn bis fünfzehn Monate, weit länger als diese von MeCP2-KO Mäusen (Shahbazian, et al., 2002).

5.1.3 MeCP2^{Tg} Mäuse

Das MeCP2^{Tg} Mausmodell beschreibt eine zweifache Überexpression von MECP2, was zu progressiven neurologischen Dysfunktionen und dem Auftreten von phänotypischen Krankheitssymptomen im Alter von zirka zehn Wochen in der Maus führt. Anfangs zeigen die MeCP2^{Tg} Mäuse eine Verbesserung der motorischen und geistigen Entwicklung. Ab einem Alter von etwa 20 Wochen entwickeln die Mäuse jedoch eine verminderte Aktivität, eine Aggressivität, Krampfanfälle und motorische Defizite. Spezifisch ist auch das Auftreten von Clasping an den Hinter- und Vorderpfoten. Die Lebenserwartung von MeCP2^{Tg} Mäusen beträgt in etwa sieben bis zwölf Monate. Interessant ist, dass die Einführung ei-

ner Kopie des MECP2-Gens in MeCP2-KO Mäusen den normalen Proteinspiegel wiederherstellen kann und es zu einer signifikanten Verbesserung der neurologischen und motorischen Dysfunktion kommt. Studien, wie in diesen drei Mausmodellen beschrieben, zeigen, dass der Spiegel von MeCP2 auch nach der Geburt streng reguliert ist und dass eine Abweichung dieses Spiegels zu schweren neurologischen Schäden führen kann (Collins, et al., 2004).

In dieser Arbeit wurden männliche MeCP2^{-/-} Mäuse (MeCP2 knock-out) als Forschungsmodell für das Rett-Syndrom verwendet. Ein großer Vorteil von männlichen MeCP2-KO Mäusen ist, dass sie vorerst nach der Geburt lebensfähig und normal wirken, jedoch nach kurzer Zeit phänotypische Krankheitsmerkmale aufweisen. Bereits drei Wochen nach der Geburt zeigen männliche MeCP2-KO Mäuse einen starken Gewichtsverlust, Hypoaktivität, motorische Dysfunktionen und unregelmäßige Atmung. Diese Symptome nehmen mit zunehmendem Alter zu. Im Alter von drei bis acht Wochen entwickeln sie zusätzlich Claspings der Hinterpfoten. Männliche MeCP2-KO Mäuse haben in etwa eine Lebenserwartung von 50-60 Tage (Guy, Hendrich, Holmes, Martin, & Bird, 2001). Aus diesem Grund konnten die männlichen MeCP2-KO Mäuse nach kürzerer Zeit als in den anderen Modellen für weitere Forschungsexperimente verwendet werden.

Das männliche MeCP2-KO Mausmodell wird jedoch als „Extremmodell“ kritisiert, da der MeCP2 knock-out in der Maus starke Effekte in sehr kurzer Zeit erzeugt. Eine Alternative wäre weibliche MeCP2-KO Mäuse im Forschungsmodell zu verwenden, da diese eine längere Lebenserwartung haben und dadurch nicht so starke Effekte in kurzer Zeit auslösen.

5.2 Limitierung der Gesamtproteinexpression in der Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse ist eine wichtige zell- und molekularbiologische Methode, bei der man spezifische Proteine aus einer komplexen Mischung von Proteinen, welche aus Zellen extrahiert wurden, identifizieren und quantifizieren kann (Mahmood & Yang, 2012).

In dieser Arbeit wurde auf Proteinebene im Western Blot untersucht, ob der MeCP2-KO einen Einfluss auf die tight junction Proteine Claudin-5, ZO-1 und Occludin, auf die Astrozytenmarker S100 β und GFAP und auf den reifen Neuronenmarker MAP2 hat. Bei keinem

der aufgezählten Proteine konnte in dieser Arbeit eine statistisch signifikante Regulation beobachtet werden.

Bei der Western Blot Analyse können die zu untersuchenden Proteine durch Konjugation mit primären und sekundären Antikörpern und Anfärben mit Hilfe chemolumineszierender Reagenzien sichtbar gemacht werden und mittels densitometrischer Auswertung die Proteinexpression bestimmt werden. Jedoch kann die Western Blot Analyse nur die Gesamtexpression der Proteine angeben, die beispielsweise durch Lyse des Gesamtgehirns von Mäusen gewonnen wird (Taylor & Posch, 2014).

Die Gesamtexpression der Proteine sagt jedoch nichts über die Lokalisation der Proteine im Gehirn beziehungsweise über deren Funktion aus. Somit könnte zum Beispiel keine Veränderung wichtiger Blut-Hirn Schranke Parameter hinsichtlich der Proteingestexpression im Western Blot sichtbar sein, jedoch kann sich die Lokalisation oder die Funktion der Parameter ändern.

Die Lokalisation der Proteine könnte in zukünftigen Studien mit Hilfe der Immunofluoreszenz Mikroskopie untersucht werden. Durch Inkubation der Proben mit Antikörpern und Konjugation mit einem Fluorophor könnte die Lokalisation spezieller Blut-Hirn Schranken Parameter sichtbar gemacht werden (Donaldson, 2015). In einem kürzlich veröffentlichten Abstract wurde gezeigt, dass bei der Immunofluoreszenz Mikroskopie von Teilen des Gehirns von MeCP2-KO Mäusen eine reduzierte Expression von Tight Junction Proteinen, wie Claudin-5, ZO-1 und Occludin auftrat. Diese reduzierte Expression der Tight Junction Proteine war vorerst nicht bei den Gesamtgehirnproben der MeCP2-KO Mäuse im Western Blot sichtbar (Rose, et al., 2018).

5.3 Erhöhtes Gesamteiweiß im Liquor und der Einfluss auf die Blut-Hirn Schranke

Im Liquor (Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit) ist in der Regel die Konzentration an Proteinen nur sehr gering. Kann jedoch ein erhöhter Gehalt an Eiweiß im Liquor gefunden werden, deutet dies auf eine Störung hin und kann verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit kann der Austritt von Proteinen aus dem Blut in den Liquor sein. Die Blut-Liquor Schranke stellt eine direkte Verbindung zwischen dem Blutkreislauf und dem Liquorraum her und ist für die meisten Proteinarten undurchlässig. Um eventuelle Störungen der Blut-Liquor Schranke zu erkennen, wird oft der Albumingehalt im Liquor gemessen. Albumin

wird ausschließlich in der Leber produziert – ein erhöhter Gehalt an Albumin im Liquor würde daher darauf hindeuten, dass es aus dem Blut stammt. Somit weist ein erhöhter Albumingehalt im Liquor auch auf eine durchlässige Blut-Hirn Schranke hin. Eine weitere Möglichkeit kann die pathologische Produktion von Proteinen im Liquorraum darstellen. Vor allem die Produktion von Immunglobulinen vom IgG-Typ kann auf eine Infektion, Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose oder verschiedene Krebs-Arten hindeuten. Jedoch können die Immunglobuline auch aus dem Blut stammen, was wieder auf eine Schrankenstörung hindeuten würde. Somit ist es wichtig, sowohl den Albumin-, als auch den Immunglobulingehalt im Blut und im Liquor zu überprüfen. Es kann ein sogenannter Albumin-Quotient und Immunglobulin-Quotient errechnet werden, mit denen es möglich ist, eine Schrankenstörung zu erkennen. Dies ist wichtig, da eine Schrankenstörung bei sehr vielen Zentralnervensystemerkrankungen vorliegt (Hübl, 2009).

Eine Veränderung des Liquor/Serumalbumin-Verhältnisses (Albumin-Quotient) ist derzeit einer der wichtigsten Marker, um eine Beeinträchtigung der Durchlässigkeit der Blut-Hirn Schranke oder der Blut-Liquor Schranke zu erkennen. Beispielsweise konnte ein erhöhter Albumin-Quotient bei Patienten mit Demenz mit Lewy bodies und mit Parkinson-Demenz diagnostiziert werden (Llorens, et al., 2015).

Um zu sehen, ob der MeCP2-KO im Mausmodell eine Auswirkung auf die Barrierefunktion der Blut-Hirn Schranke hat, könnte die Albumin- und Immunglobulinkonzentration im Plasma und im Liquor bestimmt werden. Mittels dem Albumin- und Immunglobulin-Quotient könnte auf eine mögliche Barriestörung der Blut-Hirn Schranke aufmerksam gemacht werden.

Zusätzlich könnte Albumin und IgG bei der Western Blot-Analyse von den Gesamtgehirnproben der MeCP2-KO Mäuse analysiert werden. Kürzlich konnte allerdings gezeigt werden, dass es zu keiner Veränderung der Expression von Albumin in Gesamtgehirnproben von MeCP2-KO Mäusen kam. Dies würde auf eine intakte parazelluläre Barriere in MeCP2-KO Mäusen hinweisen (Rose, et al., 2018).

5.4 Veränderung von ABC-Transportern in neurodegenerativen Erkrankungen

ABC-Transporter verdanken ihren Namen mindestens einer ATP-bindenden Kasette (ABC). Strukturell sind sie Transmembrantransporter und bestehen normalerweise aus

zwei ATP-bindenden Kassetten und zwei Transmembrandomänen. Hinsichtlich der genetischen Struktur und der Anordnung der Aminosäuren, werden die ABC-Transporter in sieben Unterfamilien eingeteilt (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG). Die Hauptfunktion von ABC-Transportern ist der ATP-abhängige Transport von verschiedenen Substraten, wie Gifte und Wirkstoffe vom Zellinneren nach außen. Dadurch stellen sie eine der wichtigsten Funktionen der Blut-Hirn Schranke zum Schutz zerebralen Neuronen dar. Zu den am häufigsten untersuchten Transmembranproteinen zählen das P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1), die multidrug resistance-associated proteins (MRP1-5, ABCC1-5) und das breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). Diese Transmembranproteine sind vor allem mit multipler Arzneistoffresistenz assoziiert (Xiong, Mao, & Liu, 2015).

Das P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1) ist ein Effluxtransporter und vor allem in Organen vorhanden welche mit Absorption, Metabolismus und Exkretion in Verbindung gebracht werden, wie Leber, Niere und Verdauungstrakt. Das P-gp wird jedoch auch in der Blut-Hirn Schranke exprimiert. In der menschlichen Blut-Hirn Schranke befindet sich P-gp auf der apikalen Seite der Gehirnkapillaren und in Astrozyten (Lee, Dallas, Hong, & Bendayan, 2001). Als Hauptfunktion stellt das P-gp eine physiologische Barriere dar, in dem es den Eintritt von verschiedenen Substanzen, Fremdstoffen und Toxinen aus der extrazellulären Flüssigkeit verhindert. Somit schützt das P-gp Gewebe und vor allem das Gehirn vor dem Eintritt schädlicher Substanzen, wie beispielweise Drogen und Gifte (Xiong, Mao, & Liu, 2015). P-gp kann auch zahlreiche Substrate, wie beispielweise Arzneistoffe binden und zurück in den Blutkreislauf transportieren und dadurch ihre Wirkung auf den Organismus verändern (Amin, 2013).

Das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2) ist ähnlich wie das P-gp ein ATP-abhängiger Effluxtransporter. Jedoch weist BCRP strukturell nur eine ATP-bindende Kasette und eine Transmembrandomäne auf, wird daher gerne als halber ABC-Transporter bezeichnet, und muss dimerisieren, um funktionell aktiv zu sein. BCRP wird vor allem stark in Magen-Darm-Trakt, Leber, Niere und Gehirn exprimiert und kann wie P-gp eine große Auswahl an Arzneistoffen als Substrat erkennen (Cusatis & Sparreboom, 2008).

Wie bereits herausgefunden wurde, besteht ein Zusammenhang zwischen Epilepsie und ABC-Transportern. Epilepsie ist eine neurologische Erkrankung mit immer wiederkehrenden Anfällen, die durch enorme elektrische Entladung gekennzeichnet sind und betrifft in etwa 1-2% der Weltbevölkerung (Ahmed, 2005). Den ersten Beweis für die Rolle der ABC-Transporter bei Epilepsie erbrachte Tishler et al. (1995), in dem eine Überexpression von P-gp in isolierten Gehirnkapillarendothelzellen von Epilepsiepatienten nachgewiesen

werden konnte (Tishler, Weinberg, Hinton, Barbaro, Annett, & Raffel, 1995). Ab diesem Zeitpunkt wurde die Überexpression von P-gp und anderen ABC-Transportern, wie BCRP und MRP's im Zusammenhang mit Epilepsie immer wieder in Studien bestätigt (Aronica, Sisodiya, & Gorter, 2012).

Weiters konnte in der neurodegenerativen Erkrankung Alzheimer, welche eine der häufigsten Ursachen für Demenz bei älteren Patienten darstellt, die Wichtigkeit von ABC-Transportern in der Pathologie aufgezeigt werden (Cirrito, et al., 2005). Aber auch in anderen Erkrankungen, wie beispielweise Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Gehirntumoren, Creutzfeld Jakob Krankheit, Humanes Immundefizienz-Virus (HIV), Depression, Schizophrenie, Multiple Sklerose (MS), Parkinson und bei Schlaganfällen konnte eine Veränderung von ABC-Transportern beobachtet werden (Qosa, Miller, Pasinelli, & Trotti, 2015).

Da auch Epilepsie eine der wichtigsten Komorbiditäten bei Patienten mit Rett-Syndrom darstellt (Leonard, Cobb, & Downs, 2017), könnte eine Regulation von ABC-Transporter naheliegend sein. Somit wäre die weiterführende Untersuchung der Expression von wichtigen ABC-Transportern im MeCP2-KO Mausmodell ein nächster, naheliegender Schritt. In einem kürzlich veröffentlichten Abstract konnte eine signifikante Überexpression der ABC-Transporter P-gp (ABCB1) und BCRP (ABCG2) im Gehirn von MeCP2-KO Mäusen gezeigt werden. Somit konnte zwar keine Regulation von wichtigen Tight Junction Proteinen hinsichtlich der Barriereeigenschaft der Blut-Hirn Schranke beobachtet werden, jedoch war eine Regulation im Transportsystem bei MeCP2-KO Mäusen vorhanden. Diese Veränderung der Blut-Hirn Schranke könnte zum Fortschreiten der Krankheit beitragen und signifikante Auswirkungen auf die Arzneimitteltherapie für die Behandlung des Rett-Syndroms haben (Rose, et al., 2018).

5.4.1 Auswirkungen der Überexpression von ABC-Transportern auf die Pharmakotherapie

Eine Hauptaufgabe der Blut-Hirn Schranke ist der Schutz des Zentralnervensystems vor schädlichen Substanzen. Dies geschieht einerseits durch „Tight Junctions“ zwischen den Endothelzellen und andererseits durch eine Vielzahl an Transporterproteinen, welche den Austausch von Substanzen zwischen ZNS und Blut regulieren. Zu den wichtigsten Transportproteinen zählen ABC-Transporter, wie P-gp, MRP's und BCRP, welche die Durchlässigkeit von vielen Toxinen sowie Therapeutika einschränkt. Diese ABC-Transporter

wirken neuroprotektiv und schränken den Eintritt von Neurotoxinen in das Gehirn ein. Sie können jedoch auch den Eintritt vieler pharmakologischer Wirkstoffe reduzieren, was zu einer Pharmakoresistenz im ZNS führen kann. Da es in vielen neurologischen Erkrankungen zu einer Veränderung der Expression von ABC-Transportern kommt, hat dies eine maßgebliche Auswirkung auf die Pharmakotherapie und Pharmakoresistenz (Qosa, Miller, Pasinelli, & Trotti, 2015).

Eines der wichtigsten Merkmale von ABC-Effluxtransportern ist ihr breites Substratspektrum (Miller, 2015): Neben endogenen Molekülen gelten auch viele therapeutisch eingesetzte Arzneistoffe als Substrate von ABC-Transportern. Darunter zählen kleine Wirkstoffmoleküle, wie beispielsweise das Morphin bis hin zu großen Arzneistoffen, wie das Cyclosporin A. Folgende klinisch relevante Arzneimittelklassen können von P-gp, MRP und BCRP als Substrat gebunden werden:

- ALS-Therapeutika
- Analgetika
- Antibiotika
- Zytostatika
- Antidepressiva
- Antiemetika
- Antiepileptika
- Antihelminthika
- Antihistaminika
- Kardiovaskuläre Therapeutika
- Kortikosteroide
- HIV-Therapeutika

Hervorzuheben ist, dass die meisten dieser Arzneimittelklassen von P-gp als Substrat gebunden werden können, jedoch kann es auch zu Überlappung mit MRP und BCRP Substraten kommen (Sharom, 2008).

Ein Beispiel für die Auswirkung der Überexpression von ABC-Transportern stellt die Pharmakoresistenz bei der Therapie von Epilepsie dar. Obwohl heutzutage schon viele Antiepileptika entwickelt wurden und klinisch eingesetzt werden, reagieren etwa 40% der Patienten nicht auf die antiepileptische Therapie. Ein Hauptgrund für diese Pharmakoresistenz könnte der erhöhte Efflux von Antiepileptika an der Blut-Hirn Schranke aufgrund der Überexpression von ABC-Transportern darstellen (Löscher & Potschka, 2005).

Bei Patienten mit Rett-Syndrom wird Epilepsie immer wieder als eine der häufigsten Komorbiditäten beschrieben (Leonard, Cobb, & Downs, 2017). In einer schwedischen Studie wurde bei 95% der Rett-Patienten (n=53) Epilepsie diagnostiziert, obwohl die Häu-

figkeit der Anfälle mit zunehmenden Alter abnehmen (Steffenburg, Hagberg, & Hagberg, 2001). Somit bekommen auch viele der Rett-Patienten eine antiepileptische Therapie. Vor allem P-gp bindet einige gängige Antiepileptika, wie beispielsweise Felbamat, Topiramat, Phenytoin und Gabapentin als Substratpartner. Von denen in der Tabelle 1 angeführten Wirkstoffen, die zur pharmakologischen Therapie des Rett-Syndroms eingesetzt werden, ist Lovastatin ein P-gp Substrat (Qosa, Miller, Pasinelli, & Trotti, 2015). Da auch in MeCP2-KO Mäusen eine signifikante Überexpression von den ABC-Transportern P-gp und BCRP gezeigt wurde, ist es vorstellbar, dass es auch bei Patienten mit Rett-Syndrom, durch den erhöhten Efflux von Antiepileptika an der Blut-Hirn Schranke, zu einer Pharmakoresistenz kommen kann (Rose, et al., 2018).

5.5 Limitierung des MeCP2 siRNA knock-down im Zellmodell

Wie bereits bekannt ist, ist MeCP2 essentiell für eine normale Gehirnfunktion. Ein Großteil der Arbeiten die über MeCP2 und das Rett-Syndrom handeln, beruhen auf Zellen von Rett-Patienten (Marchetto, et al., 2010), genetisch modifizierte MeCP2 knock-out Mäuse (Guy, Hendrich, Holmes, Martin, & Bird, 2001), sowie MeCP2 knock-out Zelllinien, in denen das Gen spezifisch deletiert wurde (Chen, Akbarian, Tudor, & Jaenisch, 2001).

Auch in dieser Arbeit wurde einerseits im Tierversuch mit MeCP2-KO Mäusen gearbeitet. Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines siRNA MeCP2 knock-down Protokolls für Mausgehirnendothelzellen der Zelllinie cerebEND.

In einem 2012 veröffentlichten Artikel, konnte ein erfolgreicher siRNA knock-down von MeCP2 in NIH-3 T3 Zellen erzielt werden. Um dies zu erreichen, wurden insgesamt drei Transfektionen an Tag 1, Tag 4 und Tag 6 nach der Aussaat der Zellen durchgeführt (Babbio, et al., 2012). Da auch in dieser Arbeit ein Standardprotokoll für eine Einmaltransfektion nicht ausreichte, um einen stabilen knock-down in cerebEND Zellen durchzuführen, wurde nach Vorbild dieses Artikels ein erfolgreiches siRNA knock-down Protokoll von MeCP2 in cerebEND Zellen entwickelt. Die Transfektionen wurden gleich wie in dem Artikel an Tag 1, Tag 4 und Tag 6 (72h-48h-48h) nach der Aussaat der Zellen durchgeführt. Somit konnte insgesamt ein MeCP2 knock-down auf 20-30% erreicht werden (siehe Abbildungen 50 und 52).

Bei den meisten Patienten mit Rett-Syndrom ist eine gestörte Missense-, Frameshift- oder Nonsense-Mutation in der codierenden Region des MECP2-Gens die Ursache der Er-

krankung (Amir, Van Den Veyver, Wan, Tran, Francke, & Zoghbi, 1999). Es kommt somit zu einem Funktionsverlust des MeCP2-Proteins, welches die typischen Symptome des Rett-Syndroms auslöst. Es ist jedoch wichtig hinzuzufügen, dass sowohl ein MeCP2-Funktionsverlust, als auch eine Erhöhung der Proteinmenge schädlich auf das Nervensystem wirken und die neurologische Entwicklung stark beeinträchtigen (Chahrour & Zoghbi, 2007).

Somit lässt sich ableiten, dass die MeCP2-Konzentration eine ausschlaggebende Rolle in der Funktion der Zelle darstellt. Da in den cerebEND Zellen nur ein MeCP2 knock-down auf 20-30% erreicht wurde, lässt sich nicht ausschließen, dass die Restmenge an MeCP2 in den Zellen für die normale Funktion ausreichend ist.

Mit Hilfe der CRISPR/Cas-Methode (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated) könnte weiterführend ein knock-out von MeCP2 in cerebEND Zellen versucht werden. Ursprünglich ist CRISPR/Cas ein adaptiver Mechanismus des Immunsystems von Bakterien und Archaea, um sich vor Virusinfektionen zu schützen (Rath, Amlinger, Rath, & Lundgren, 2015). Durch diese biochemische Methode ist es möglich, gezielte Veränderungen in den DNA-Sequenzen hervorzurufen. Spezifische Gene können mit der CRISPR/Cas-Methode eingefügt oder deletiert werden (Lino, Harper, Carney, & Timlin, 2018). Die MeCP2-KO cerebEND Zellen wären dann auch mit dem MeCP2-KO Mausmodell vergleichbar.

5.6 Auswirkung von MeCP2-Defiziten im Zellmodell

MeCP2 kommt vor allem in postmitotischen Neuronen vor (Shahbazian, Antalffy, Armstrong, & Zoghbi, 2002), wird jedoch aber auch in moderater Menge in nicht-neuronalen Zellen in Gehirn (Lioy, et al., 2011) und in anderen Gewebe im gesamten Körper gebildet (Ross, et al., 2016).

In Astrozyten, welche die zelluläre Verbindung zu den Neuronen herstellen, führt eine Deletion von MeCP2 zur Ausbildung klassischer phänotypischer Krankheitssymptome bei Mäusen. Wenn man aber den MeCP2 Spiegel in Astrozyten, in einem ansonsten MeCP2-defiziten Nervensystem wiederherstellt, kommt es zur Verbesserung der Atmung, der motorischen Dysfunktionen und den Angstzuständen (Lioy, et al., 2011). Wie man auch bereits in Zellkulturversuchen gezeigt hat, kann MeCP2 in Gliazellen wichtig für nicht-zellautonome Funktionen sein. MeCP2 unterstützt in Gliazellen die normale morphologi-

sche Ausbildung von Dendriten durch Freisetzung von Neurotrophinen im Nervensystem (Ballas, Lioy, Grunseich, & Mandel, 2009). Das Fehlen von MeCP2 in Neuronen wird jedoch als zelluläre Ursache für das Rett-Syndrom angesehen (Luikenhuis, Giacometti, Beard, & Jaenisch, 2004).

In einem 2012 veröffentlichten Artikel wurde ein siRNA knock-down von MeCP2 in embryonalen Mausfibroblasten (NIH-3 T3) und in transformierten humanen Prostatazellen (PC-3 und LNCaP) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine starke Abnahme der Zellproliferation und einen Defekt im Zellzyklus in den MeCP2-defizienten NIH-3 T3, PC-3 und LNCaP Zellen (Babbio, et al., 2012). In dieser Arbeit wurde ein siRNA knock-down von MeCP2 in Mausgehirnendothelzellen (cerebEND) durchgeführt. Insgesamt wurden drei siRNA Transfektionen an Tag 1, an Tag 4 und Tag 6 (72h-48h-48h) nach der Aussaat der Zellen durchgeführt. Nach jeder Transfektion wurde die Zellproliferation mittels eines Lichtmikroskops optisch kontrolliert. Es konnte keine Reduktion der Zellproliferation von den MeCP2-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen beobachtet werden (siehe Abbildungen 10-12). Jedoch könnte weiterführend eine genaue Zellzahlbestimmung einen repräsentativeren Vergleich hinsichtlich der Zellproliferation zwischen cerebEND MeCP2 knock-down Zellen und Kontroll-Zellen schaffen.

Ein weiterer Punkt der in diesem Artikel behandelt wurde ist, dass der MeCP2 knock-down und die damit verbundene Abnahme der Zellproliferation im Zusammenhang mit einer morphologischen Änderung der Zellen stand. Es kam zu zellulären Veränderungen, wie einer erhöhten zytoplasmatischen Granularität und Einschlüssen und zu einer unregelmäßigen Kernform. Diese morphologischen Veränderungen der Zellen wurden mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie festgestellt (Babbio, et al., 2012). In dieser Arbeit konnte unter Betrachtung in einem Lichtmikroskop keine morphologische Veränderung durch den MeCP2 knock-down in cerebEND Zellen beobachtet werden. Die cerebEND MeCP2 knock-down Zellen zeigten bei zunehmender Zellzahl die gleichen morphologischen Merkmale wie die Kontroll-Zellen – sie bildeten konzentrische Kreise und nahmen eine schmale, längliche Gestalt an (siehe Abbildungen 10-12). Jedoch könnte weiterführend mit verschiedenen Mikroskopiemethoden genauer die morphologische Veränderung von cerebEND Zellen durch den MeCP2 knock-down beobachtet werden.

Weiters wurde in dem Artikel gezeigt, dass das MeCP2-Defizit in Zellen die Stabilität und Form der Kernhülle beeinflussen kann, indem es zu einer veränderten Expression von Schlüsselproteinen (Lamin A, Lamin C, Lamin B1 und LBR) kam. Der MeCP2 knock-down führte in PC-3 Zellen zu einer starken Abnahme der Proteinkonzentration von Lamin A, Lamin C, Lamin B1 und LBR. In LNCaP und NIH3-T3 Zellen konnte auch eine Reduktion

des Proteinspiegels von Lamin B1 gemessen werden (Babbio, et al., 2012). Zukünftige Forschungen könnten untersuchen, ob es auch in cerebEND Zellen zu einer Veränderung der Kernhülle und zu einer Veränderung der Expression von Schlüsselproteinen, wie Lamin A, Lamin C, Lamin B1 und LBR durch den MeCP2 knock-down kommt.

Literaturverzeichnis

- Abbott, J. N. (2004). Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochemistry International*, 45(4), 545-552.
- Abbott, J. N. (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cellular Molecular Neurobiology*, 25(1), 5-23.
- Abbott, J. N., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Neuroscience*, 7(1), 41-53.
- Abbott, J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the Blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 15.
- Ahmed, S. N. (2005). Epileptic seizure and epilepsy. *Epilepsia*, 46(10), 1700-1701.
- Amin, M. L. (2013). P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights*, 7, 27-34.
- Amir, R. E., Van Den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., & Zonghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. 23(2), 185-188.
- Aronica, E., Sisodiya, S. M., & Gorter, J. A. (2012). Cerebral expression of drug transporters in epilepsy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(10), 919-929.
- Babbio, F., Castiglioni, I., Cassina, C., Gariboldi, M. B., Pistore, C., Magnani, E., et al. (2012). Knock-down of methyl CpG-binding protein 2 (MeCP2) causes alterations in cell proliferation and nuclear lamins expression in mammalian cells. *BMC Cell Biology*, 13(1), 19.
- Ballas, N., Liroy, D. T., Grunseich, C., & Mandel, G. (2009). Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nature Neuroscience*, 12(3), 311-317.
- Begley, D. J., & Brightman, M. W. (2003). Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. In L. Prokai, & K. Prokai-Tatrai, *Peptide Transport and Delivery into the Central Nervous System* (Bd. 61, S. 39-78). Basel: Birkhäuser.
- Begley, D. J., Pontikis, C. C., & Scarpa, M. (2008). Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 14(16), 1566-1580.
- Bhatnagar, S., Zhu, X., Ou, J., Lin, L., Chamberlain, L., Zhu, L. J., et al. (2014). Genetic and pharmacological reactivation of the mammalian inactive x chromosome. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 111(35), 12591-12598.
- Brendel, C., Belakhov, V., Werner, H., Wegener, E., Gärtner, J., Nudelman, I., et al. (2011). Readthrough of nonsense mutations in Rett syndrome: Evaluation of novel aminoglycosides and generation of a new mouse model. *Journal of Molecular Medicine*, 89(4), 389-398.
- Bronger, H., König, J., Kopplow, K., Steiner, H. H., Ahmadi, R., Herold-Mende, C., et al. (2005). ABC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Research*, 65(24), 11419-11428.

- Chahrour, M., & Zoghbi, H. Y. (2007). The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology. *Neuron*, 56(3), 422-437.
- Chen, R. Z., Akbarian, S., Tudor, M., & Jaenisch, R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nature Genetics*, 27(3), 327-331.
- Cirrito, J. R., Deane, R., Fagan, A. M., Spinner, M. L., Parsadanian, M., Finn, M. B., et al. (2005). P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3285-3290.
- Collins, A. L., Levenson, J. M., Vilaythong, A. P., Richman, R., Armstrong, D. L., Noebels, J. L., et al. (2004). Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice. *Human Molecular Genetics*, 13(21), 2679-2689.
- Correale, J., & Villa, A. (2007). The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity*, 40(2), 148-160.
- Cuddapah, V. A., Pillai, R. B., Shekar, K. V., Lane, J. B., Motil, K. J., Skinner, S. A., et al. (2014). Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) mutation type is associated with disease severity in Rett syndrome. *Journal of medical Genetics*, 51(3), 152-158.
- Cusatis, G., & Sparreboom, A. (2008). Pharmacogenomic importance of ABCG2. *Pharmacogenomics*, 9(8), 1005-1009.
- Della Ragione, F., Vacca, M., Fioriniello, S., Pepe, G., & D'Esposito, M. (2016). MECP2, a multi-talented modulator of chromatin architecture. *Briefings in Functional Genomics*, 15(6), 420-431.
- Derecki, N. C., Cronk, J. C., Lu, Z., Xu, E., Abbott, S. B., Guyenet, P. G., et al. (2012). Wild type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature*, 484(7392), 105-109.
- Desai, B. S., Monahan, A. J., Carvey, P. M., & Hendey, B. (2007). Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplantation*, 16(3), 285-299.
- Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence staining. *Current protocols in cell biology*, 69(1), 4.3.1-4.3.7.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A. M., et al. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular Therapy*, 17(7), 1187-1196.
- Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(1), 55-70.
- Förster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J., et al. (2005). Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *The Journal of Physiology*, 565(Pt 2), 475-486.
- Freilinger, M. (31. August 2017). *Öffentliches Gesundheitsportal Österreichs*. Abgerufen am 12. 04 2018 von <https://www.gesundheit.gv.at/krankheiten/seltene-krankheiten/rett-syndrom>
- Gadalla, K. K., Bailey, M. E., Spike, R. C., Ross, P. D., Woodard, K. T., Kalburgi, S. N., et al. (2013). Improved survival and reduced phenotypic severity following AAV9/MECP2 gene

- transfer to neonatal and juvenile male MECP2 knockout mice. *Molecular Therapy*, 21(1), 18-30.
- Grieshaber, M. C., & Flammer, J. (2007). Does the blood-brain barrier play a role in glaucoma? *Survey of Ophthalmology*, 52(6), 115-121.
- Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J. E., & Bird, A. (2001). A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nature Genetics*, 27(3), 322-326.
- Hagberg, B., Aicardi, J., Dias, K., & Ramos, O. (1983). A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: Report 35 cases. *Annals of Neurology*, 14(4), 471-479.
- Hübl, W. (1. 7. 2009). *med4you*. Abgerufen am 22. 8. 2018 von https://www.med4you.at/laborbefunde/lbef_eiweiss_liquor.htm
- Hunter, K. (2007). *The Rett Syndrome Handbook*. Clinton: International Rett Syndrome Association.
- Jung, B. P., Jugloff, D. G., Zhang, G., Logan, R., Brown, S., & Eubanks, J. H. (2003). The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *Journal of Neurobiology*, 55(1), 86-96.
- Katz, D. M., Bird, A., Coenraads, M., Gray, S. J., Menon, D. U., Philpot, B. D., et al. (2016). Rett Syndrome: Crossing the Threshold to Clinical Translation. *Trends in Neuroscience*, 39(2), 100-113.
- Kaur, C., & Ling, E. A. (2008). Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Current Neurovascular Research*, 5(1), 71-81.
- Lee, G., Dallas, S., Hong, M., & Bendayan, R. (2001). Drug transporters in the central nervous system; brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 569-596.
- Leonard, H., Cobb, S., & Downs, J. (2017). Clinical and biological progress over 50 years in Rett syndrome. *Nature Reviews Neurology*, 13(1), 37-51.
- Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., et al. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, 69(6), 905-914.
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, 25(1), 1234-1257.
- Lioy, D. T., Garg, S. K., Monaghan, C. E., Raber, J., Foust, K. D., Kaspar, B. K., et al. (2011). A role for glia in the progression of Rett's syndrome. *Nature*, 475(7357), 497-500.
- Liyanage, V. R., & Rastegar, M. (2014). Rett Syndrome and MeCP2. *Neuromolecular Medicine*, 16(2), 231-264.
- Llorens, F., Schmitz, M., Gloeckner, S. F., Kaerst, L., Hermann, P., Schmidt, C., et al. (2015). Increased albumin CSF/serum ratio in dementia with Lewy bodies. *Journal of neurological Science*, 358(1), 398-403.
- Löscher, W., & Potschka, H. (2005). Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(8), 591-602.

- Luikenhuis, S., Giacometti, E., Beard, C. F., & Jaenisch, R. (2004). Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 6033-6038.
- Maezawa, I., Swanberg, S., Harvey, D., LaSalle, J. M., & Jin, L. W. (2009). Rett syndrome astrocytes are abnormal and spread MeCP2 deficiency through gap junctions. *Journal of Neuroscience*, 29(16), 5051-5061.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western Blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Science*, 4(9), 429-434.
- Marchetto, M. C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., et al. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, 143(4), 527-539.
- Miller, D. S. (2015). Regulation of ABC transporters at the blood-brain barrier. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 97(4), 395-403.
- Nadal, A., Fuentes, E., Pastor, J., & McNaughton, P. A. (1995). Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1426-1430.
- Neul, J. L., Kaufmann, W. E., Glaze, D. G., Christodoulou, J., Clarke, A. J., Bahi-Buisson, N., et al. (2010). Rett Syndrome: Revised Diagnostic Criteria and Nomenclature. *Annals of Neurology*, 68(6), 944-950.
- Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 19(12), 1584-1596.
- Österreichische Rett-Syndrom Gesellschaft. (Juni 2012). *Was ist das Rett-Syndrom?* (Österreichische Rett-Syndrom Gesellschaft, Hrsg.) Selzthal.
- Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J., & Kanmogne, G. D. (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(3), 223-236.
- Qosa, H., Miller, D. S., Pasinelli, P., & Trotti, D. (2015). Regulation of ABC Efflux Transporters at Blood-Brain Barrier in Health and Neurological Disorders. *Brain Research*, 1628(Part B), 298-316.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.
- Remy, S., & Beck, H. (2006). Molecular und cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*, 129(1), 18-35.
- Rett, A. (1966). On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood. *Wiener medizinische Wochenschrift*, 116(37), 723-726.
- Rose, K., Gerhartl, A., Bounzina, N., Huber, A., Reitner, A., Steinkellner, H., et al. (2018). *Alterations of the blood-brain barrier in RETT syndrome*. Wien: Medical University of Vienna.
- Rosenberg, G. A., & Yang, Y. (2007). Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurgical Focus*, 22(5), 1-9.

- Ross, P. D., Guy, J., Selfridge, J., Kamal, B., Bahey, N., Tanner, E. K., et al. (2016). Exclusive expression of MeCP2 in the nervous system distinguishes between brain and peripheral Rett syndrome-like phenotypes. *Human Molecular Genetics*, 25(20), 4389-4404.
- Savic, N., & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/CAS9 Genom Editing. *Translational Research*, 168, 15-21.
- Shahbazian, M. D., Antalffy, B., Armstrong, D. L., & Zoghbi, H. Y. (2002). Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Human Molecular Genetics*, 11(2), 115-124.
- Shahbazian, M., Young, J., Yuva-Paylor, L., Spencer, C., Antalffy, B., Noebels, J., et al. (2002). Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron*, 35(2), 243-254.
- Sharom, F. J. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, 9(1), 105-127.
- Sirianni, N., Naidu, S., Pereira, J., Pillotto, R. F., & Hoffman, E. P. (1998). Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. *American Journal of Human Genetics*, 63(5), 1552-1558.
- Steffenburg, U., Hagberg, G., & Hagberg, B. (2001). Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatrica*, 90(1), 34-39.
- Stettner, G. M., Huppke, P., Brendel, C., Richter, D. W., Gartner, J., & Dutschmann, M. (2007). Breathing dysfunctions associated with impaired control of postinspiratory activity in Mecp2-ly knockout mice. *Journal of Physiology*, 579(3), 863-876.
- Taylor, S. C., & Posch, A. (2014). The design of a quantitative western blot experiment. *BioMed Research International*, 2014, 1-8.
- Tishler, D. M., Weinberg, K. I., Hinton, D. R., Barbaro, N., Annett, G. M., & Raffel, C. (1995). MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, 36(1), 1-6.
- Weaving, L. S., Ellaway, C. J., Gecz, J., & Christodoulou, J. (2005). Rett syndrome: clinical review and genetic update. *Journal of Medical Genetics*, 42(1), 1-7.
- Xiong, J., Mao, D., & Liu, L. (2015). Research progress on the role of ABC transporters in the drug resistance mechanism of intractable epilepsy. *BioMed Research International*, 2015, 1-10.
- Zachariah, R. M., & Rastegar, M. (2012). Linking Epigenetics to Human Disease and Rett Syndrome: The Emerging Novel and Challenging Concepts in MeCP2 Research. *Neural Plasticity*, 2012(415825), 1-10.