

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. N. Roewer

**Die Wirkung von microRNA-132 und microRNA-212 auf Zielgene
an der Blut-Hirn-Schranke bei Glucose- und Sauerstoffentzug**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anna König
aus Mudau

Würzburg, Dezember 2016



Referentin: Prof. Dr. Carola Förster

Korreferent: Prof. Dr. Christoph Otto

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2017

Die Promovendin ist Ärztin.

Diese Arbeit ist
meinen lieben Eltern
Alexander und Anna König
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Blut-Hirn-Schranke	1
1.2 Ischämischer Schlaganfall	3
1.3 MicroRNA	5
1.3.1 Biogenese von microRNA	6
1.3.2 Interaktion zwischen microRNA und mRNA	7
1.3.3 Mimics (Imitatoren) und Inhibitoren von miRNAs zur Analyse der Regulation des Zielgens	9
1.3.4 microRNA-212 und microRNA-132	12
1.4 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Zellkultur	14
2.1.2 Endothelzellpräparation	15
2.1.3 Molekularbiologische Methoden	15
2.1.3.1 RNA-Isolation	15
2.1.3.2 cDNA-Synthese	16
2.1.3.3 qPCR	16
2.1.4 Biochemische Methoden	17
2.1.4.1 Zelllysat für Western Blot	17
2.1.4.2 Proteinbestimmung	17
2.1.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot	18
2.1.4.4 Transfektion	21
2.1.4.5 TEER	22
2.1.4.6 Permeabilitätsmessung (FAM)	22

2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellkultur	23
2.2.1.1 Präparation und Kultivierung der verschiedenen Zelllinien.....	23
2.2.1.2 Kulturmedien.....	25
2.2.1.3 Versuchsaufbau	26
2.2.2 Biochemische Methode	30
2.2.2.1 Proteinpräparation	30
2.2.2.2 Proteinbestimmung Bicinchoninsäure (BCA)-Methode.....	30
2.2.2.3 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.2.4 Western Blot.....	33
2.2.3 Molekularbiologische Methode	35
2.2.3.1 Ribonukleinsäure-Isolation.....	35
2.2.3.2 Reverse Transkription – cDNA-Synthese.....	36
2.2.3.3 Quantitative Real Time Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR).....	37
2.2.4 Transfektion	38
2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung für optimale Transfektionsbedingungen..	39
2.2.4.2 Beobachtung Transfektionseffizienz mittels Mikroskopie	40
2.2.5 Bioelektrische und Permeabilitäts-Messung	41
2.2.6 Statistische Auswertung.....	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Etablierung der OGD-Bedingungen: Einfluss von Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium auf die Expression von diversen Blut-Hirn-Schranke-assoziierten Genen... 43	
3.2 MicroRNA-132/212 induzierte Regulation der Zielgene in murinen cEND-2-Zellen	49
3.2.1 Etablierung der Transfektionsbedingungen: Bestimmung der Konzentration des Transfektionsreagenzes und der miRNA-Imitatoren und -Inhibitoren	49
3.2.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz in den cEND-2-Zellen.....	51

3.2.3 Einfluss von miRNA-132 und miRNA-212 auf ausgewählte Zielgene in cEND-2	52
3.2.3.1 Regulation des Zielgens Claudin1 durch miRNA-132/212.....	53
3.2.3.2 Regulation des Zielgens Tjap1 durch miRNA-132/212.....	56
3.2.3.3 Regulation des Zielgens Jam3 durch miRNA-132/212	58
3.2.3.4 Regulation des Zielgens MMP9 durch miRNA-132/212.....	61
3.2.4 Einfluss von miRNA-132/212 auf den Widerstand und die Permeabilität bei cEND-2-Zellen.....	62
4 Diskussion	63
4.1 OGD induzierte Veränderungen der Genexpression verschiedener BHS assoziiierter Proteine in cEND-2	64
4.2 Effekt von Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium auf die Expression der BHS- assoziierten Proteine nach der OGD-induzierten Funktionsstörung der BHS.....	65
4.3 Effekt von miRNA-132/212 auf die Genexpression von BHS-Komponenten in murinen Hirnendothelzellen.....	67
4.4 Einfluss von miRNA-132/212 auf die Dichtigkeit der cEND-2-Zellen.....	69
5 Zusammenfassung	70
6 Abbildungsverzeichnis	72
7 Tabellenverzeichnis	74
8 Literaturverzeichnis	75
9 Danksagung.....	81
10 Lebenslauf.....	82

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Gradcelsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
a.d.	aqua ad iniectabilia
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Actb	Actin-beta
AGO2	Argonaute2
AJ	Adherens Junction
ANGPT1	Angiopoietin-1
ANGPT2	Angiopoietin-2
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
anti-miR	microRNA-Inhibitor
APS	Ammoniumpersulfat
AQP1	Aquaporin-1
BBB	blood-brain barrier
BCA	Bicinchoninsäure
BCEC	brain capillary endothelial cells
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C6	Astrozyten
ca.	circa

Abkürzung	Bedeutung
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cEND-2	murine mikrovaskuläre Hirnendothelzellen
Cldn1	Claudin1
Cldn5	Claudin5
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
dsBNA	double-stranded RNA
dsRBD	double-stranded RNA-binding domain
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAM	Fluorescein amidite
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FI	Family Inhibitor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer Peptide
g	Gramm
G	Gravitationsbeschleunigungen
Glut1	Glucosetransporter1
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
hEGF	Human Epidermal Growth Factor

Abkürzung	Bedeutung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hsa	Homo sapiens
JAM	Junctional adhesion molecule/ junktionale Adhäsionsmoleküle
Jam1	Junctional adhesion molecule 1
Jam2	Junctional adhesion molecule 2
Jam3	Junctional adhesion molecule 3
kDA	Kilodalton
L	Liter
Luminol	3-Aminophthalhydrazide
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere
MDB	Mebrane Desalting Buffer
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute
miR	miRNA = microRNA
miR-132	microRNA-132
miR-212	microRNA-212
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP3	Matrix metalloproteinase3
MMP9	Matrix metalloproteinase9
mmu	Mus musculus (Hausmaus)
MRE	miRNA recognition element
mRNA	messenger RNA
NEA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
nM	Nanomolar

Abkürzung	Bedeutung
normox	Normoxie
nt	Nukleotid
O ₂	Sauerstoff
OGD	Oxygen-glucose deprivation
P/S	Penicillin/Streptomycin
PACT	protein activator of the interferon-induced protein kinase
Pasha	Partner of Drosha
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	p-Coumaric-Acid, 4-Hydroycinnamic Acid
pre-miR	precursor microRNA
pri-	primär
pri-miR	primäre microRNA
Prof.	Professor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
R3-IGF-1	Vascular Endothelial Growth Factor
rDNase	rekombinante Desoxyribonuklease
RH	Room Humidity
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RISC	RNA-inducing silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNA Pol II	RNA-Polymerase II
RNAi	Ribonukleinsäure Interferenz
RT	Raumtemperatur
rtPA	recombinant tissue Plasminogen Activator
rt-PCR	real-time Polymerase Kettenreaktion
s.	siehe
Scr	Scrambled (Kontrolle)

Abkürzung	Bedeutung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
stem loop	Haarnadelstruktur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinases-3
TJ	Tight Junction
Tjap1	tight junction associated protein 1
Tjp1	ZO1; Tight junction protein 1
TRBP	TAR RNA binding protein
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UTR	untranslated region
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
x	Mal
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO1	zona occludens 1
ZO2	zona occludens 2
ZO2	zona occludens 3
β-ME	β-Mercaptoethanol
Ω	Ohm

1 Einleitung

1.1 Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS, eng. Blood-Brain Barrier; BBB) ist eine hoch spezialisierte Hirnendothelstruktur des ausdifferenzierten neurovaskulären Systems. Sie bildet eine Diffusionsbarriere, die essentiell für die normale Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) ist (Ballabh *et al.*, 2004a). Bestehend aus Endothelzellen, Astrozyten-Endfüßchen, Perizyten, Tight Junctions (TJs) und Basalmembran ist sie verantwortlich für den Schutz und die Homöostase des Hirnparenchyms (Burek *et al.*, 2012, Abbott *et al.*, 2010).

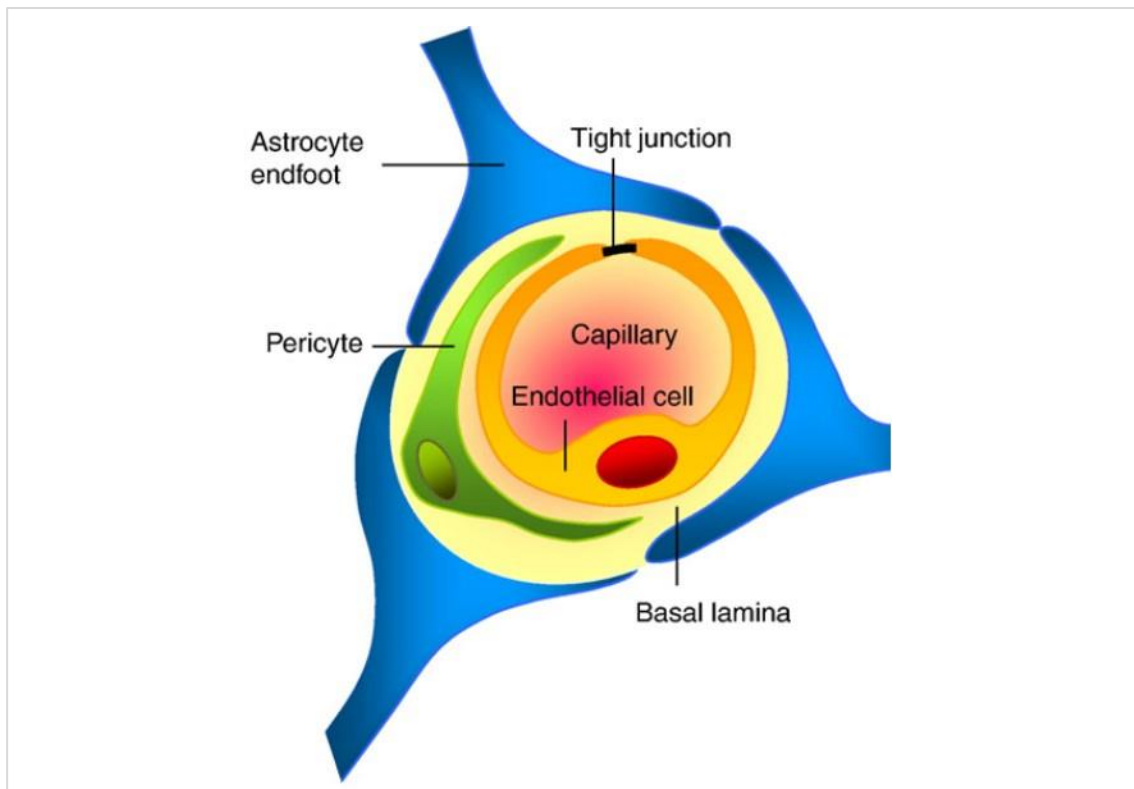


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur der Blut-Hirn-Schranke unter physiologischen Bedingungen (Abbott *et al.*, 2010)

Die BHS-Endothelzellen unterscheiden sich von den Endothelzellen des restlichen Körpers durch das Fehlen von Fenestrations, umfangreichere TJs und durch geringeren Vesikeltransport bei Pinozytose (Ballabh *et al.*, 2004a). Die BHS ist relativ undurchlässig

für Ionen, viele Aminosäuren, kleine Peptide und Proteine (Rubin *et al.*, 1991). Außerdem beinhaltet die BHS die chemische Zusammensetzung des neuronalen Milieus, welche für eine angemessene Funktion des neuronalen Stromkreises, synaptische Transmission, synaptisches Remodeling, Angiogenese und Neurogenese im ausgereiften Gehirn erforderlich ist (Zlokovic, 2008). Endothelzellen der Gehirnkapillaren (Brain capillary endothelial cells, BCECs) bilden eine parazelluläre und transzelluläre Barriere für viele im Blut gelöste Substanzen (Knowland *et al.*, 2014). Die Integrität der BHS ist in vielen Erkrankungen des humanen ZNS geschwächt (Forster *et al.*, 2005). Ein Zusammenbruch der BHS wird beschrieben als ein ausschlaggebender Schritt in der Entstehung eines neuroinflammatorischen Zustandes. Dazu zählen Erkrankungen wie Hirntumore, zerebrale Ischämie, Meningitis, Enzephalitis oder Multiple Sklerose (Forster *et al.*, 2008). Der junctionale Komplex in der BHS umfasst TJs und Adherens Junctions (AJs). AJs bestehen aus einem Cadherin-Catenin-Komplex und den dazugehörigen Proteinen. Zwischen den Endothelzellen der Hirnkapillaren sind die TJs die wichtigsten strukturelle Elemente der BHS. TJs sind die am weitesten apikal gelegenen Komponenten des junctionalen Komplexes in Endothelzellen und begrenzen jede Zelle wie eine gürtelförmige Struktur (Furuse *et al.*, 1999). Claudine sind die wichtigsten Komponenten der TJs mit einer Größe von ungefähr 23 Kilodalton (kDa). Claudine binden an Claudine benachbarter Endothelzellen, um eine primäre Abdichtung der TJs zu ermöglichen. Der Carboxy-Terminus der Claudine bindet an zytoplasmatische Proteine, dazu gehören ZO1, ZO2 und ZO3 (Furuse *et al.*, 1999). Im Gehirn kommen vor allem Claudin1, -3, -5 und Claudin12 zusammen mit Occludin vor (Abbott *et al.*, 2010). TJ-assoziierte Membranproteine, nämlich junctionale Adhäsionsmoleküle (JAM) mit einer Größe von ungefähr 40 kDa, gehören zur Immunglobulin-Überfamilie. Sie bestehen aus einer Einzeltransmembrandomäne. Der extrazelluläre Abschnitt hat zwei immunglobulin-ähnliche Schleifen, die durch Disulfidbrücken gebildet werden (Ballabh *et al.*, 2004a). Drei JAM-verwandte Proteine, JAM1, JAM2 und JAM3, wurden in Gehirnen von Nagetieren entdeckt. Es wurde beobachtet, dass JAM1 und JAM3 (aber nicht JAM2) in Blutgefäßen des Gehirns exprimiert werden (Aurrand-Lions *et al.*, 2001a). JAMs sind beteiligt an der Zell-Zell-Adhäsion und an der Transmigration von Leukozyten

durch die BHS (Bazzoni *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass bei Schädigung der BHS die kultivierten Hirnendothelzellen ihre TJs-abhängigen Eigenschaften verlieren, wie zum Beispiel die makromolekulare Impermeabilität und den hohen elektrischen Widerstand (Wolburg *et al.*, 1994). Um das ZNS mit Substanzen wie Glucose und Aminosäuren, die für den Stoffwechsel essentiell sind, zu versorgen, besitzt das BHS-Endothel außerdem auch noch eine Reihe von spezifischen Transportern (Carrier) für gelöste Stoffe (Abbott *et al.*, 2010).

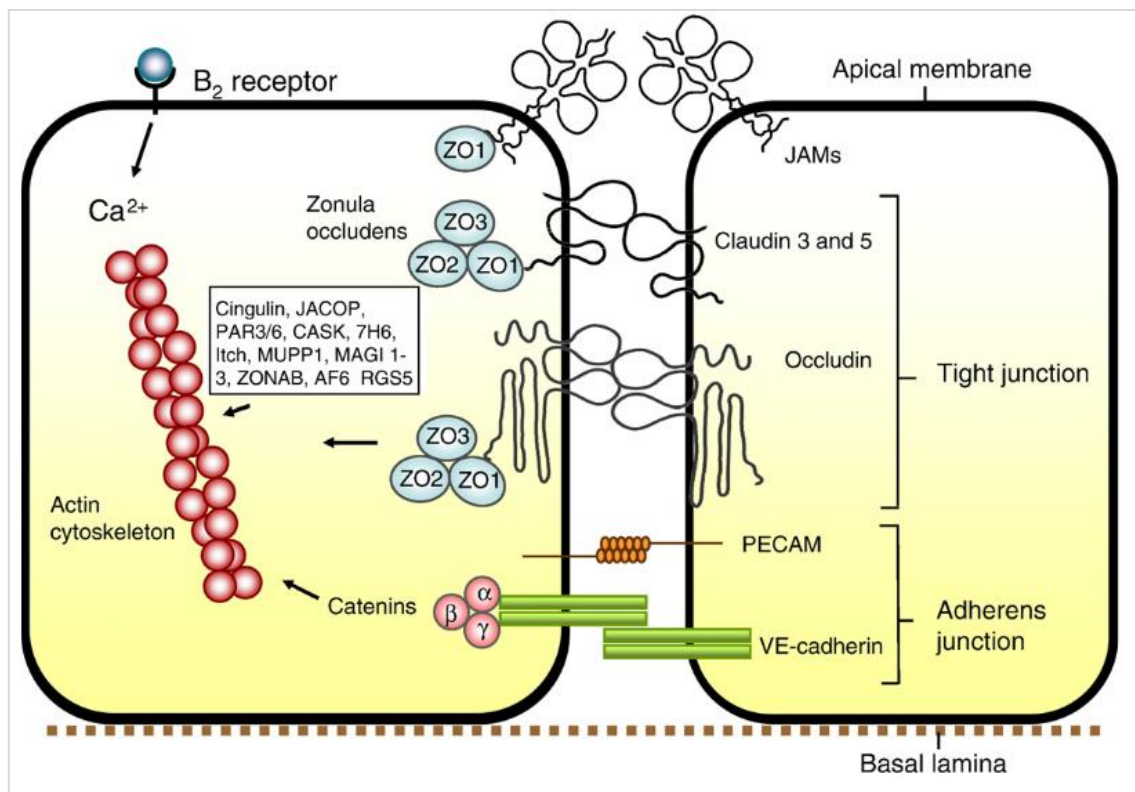


Abbildung 2: Schematische Darstellung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte (Abbott *et al.*, 2010)

1.2 Ischämischer Schlaganfall

Schlaganfall ist einer der Hauptgründe von Mortalität und Behinderung weltweit. In modernen Industriestaaten ist diese schwere Erkrankung die dritthäufigste Todesursache nach Herzleiden und Krebs. Fokale Ischämien im Gehirn, typischerweise verursacht durch arterielle Thromben oder Embolien, machen 85 % aller Schlaganfälle aus (Sørensen *et al.*, 2014). Da die Lebenserwartung der Menschen stetig steigt, wird die absolute Zahl der Einzelpersonen mit Schlaganfall in Zukunft noch zunehmen. Der

plötzliche Verschluss eines Blutgefäßes durch einen Thrombus oder Embolus führt unmittelbar zu einem Mangel an Sauerstoff und Glucose im Hirngewebe. Partielle Lähmung, Gedächtnis-, Sprach-, Denk- und Bewegungsstörungen können daraus resultieren (Lakhan et al., 2009).

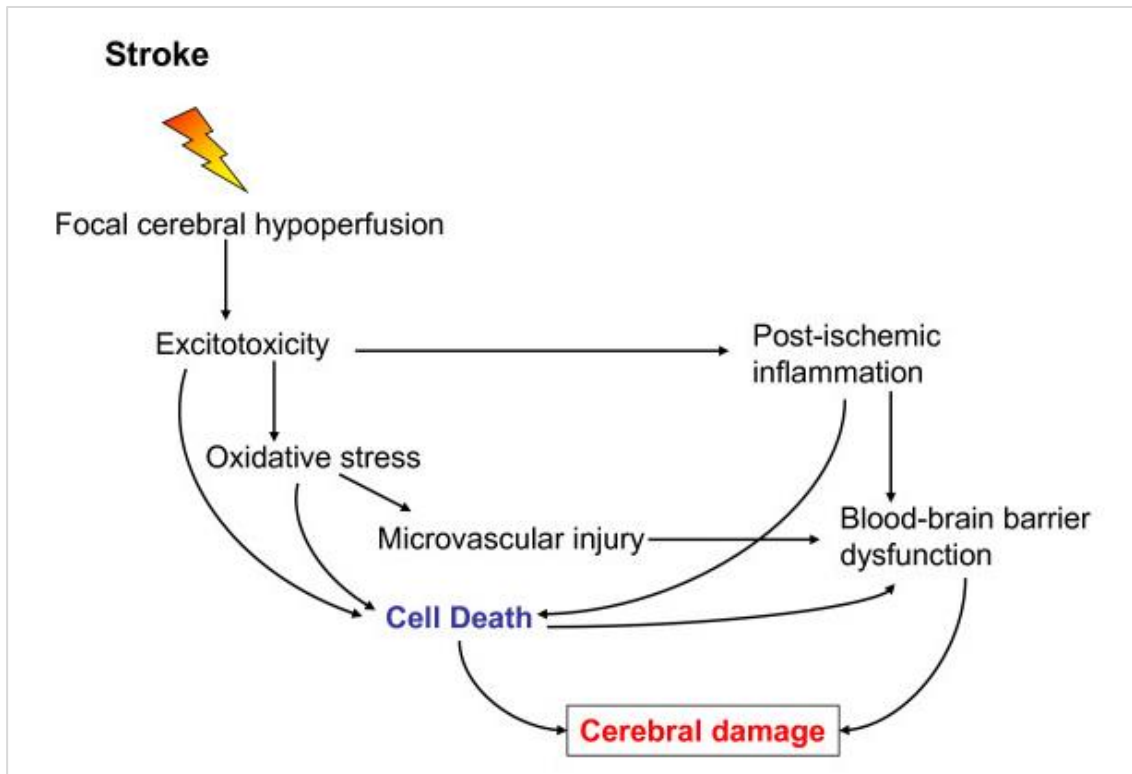


Abbildung 3: Die ischämische Kaskade führt zum zerebralen Schaden (Lakhan et al., 2009)

Der ischämische Schlaganfall verursacht eine Hypoperfusion eines Hirnareals, was eine komplexe Serie von Ereignissen einleitet. Exzitotoxizität, oxidativer Stress, mikrovaskuläre Schädigung, Dysfunktion der BHS und postischämische Inflammation führen unmittelbar zum Zelltod von Neuronen, Glia- und Endothelzellen (s. Abb. 3). Die Schwere und die Dauer der Ischämie sind entscheidend für das Ausmaß der zerebralen Schädigung (Lakhan et al., 2009).

Es ist bewiesen, dass die Lyse-Therapie mit rtPA (recombinant tissue Plasminogen Activator) innerhalb von 4,5 Stunden nach Beginn des akuten ischämischen Schlaganfalls einen Nutzen aufweist. Eine rtPA-Behandlung jenseits dieses Zeitfensters ist eher ungeeignet und hat gewöhnlich eine hämorrhagische Transformation zur Folge. Der

Schlaganfall ist eine multifaktorielle Erkrankung, die ein mögliches Endstadium der Mehrheit von Patienten darstellt, die unter verschiedenen Risikofaktoren leiden, wie zum Beispiel Diabetes, Arteriosklerose oder Hypertonie. Obwohl die Biochemie des Schlaganfalles und verwandter Erkrankungen ziemlich gut verstanden ist, ist das Wissen über den molekularen Mechanismus immer noch in der Anfangsphase. MicroRNAs bilden eine Klasse von Regulatoren der Genfunktion und bieten ein enormes Potential, um den Mechanismus der Schlaganfall-Pathogenese aufzudecken. Verschiedene microRNAs und ihre Zielgene, die dafür bekannt sind, dass sie in der Entstehung von endothelialer Dysfunktion, Dysregulation der neurovaskulären Integrität, Ödembildung, Pro-Apoptose, Inflammation und Remodeling der extrazellulären Matrix involviert sind, tragen zum entscheidenden Prozess in der Pathogenese des Schlaganfalles bei (R Tan *et al.*, 2011).

1.3 MicroRNA

MicroRNAs (miRNAs, miRs) sind kurze, nicht kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle bestehend aus ca. 21-23 Nukleotiden (nt), die eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Genregulation spielen (Nilsen, 2007). In tierischen Zellen regulieren die miRNAs ihre Zielgene, indem sie diese in der Translation inhibieren und die mRNA (messenger RNA) destabilisieren (Bushati & Cohen, 2007). Die ersten miRNAs, die entdeckt wurden, waren lin-4 und let-7 miRNAs, welche Bestandteile eines genregulatorischen Netzwerkes sind, die den Zeitpunkt der Larvenentwicklung von *Caenorhabditis elegans* kontrollieren (Lee *et al.*, 1993). Seither haben verschiedene Studien die verschiedenen Schlüsselrollen von miRNAs in diversen regulatorischen Wegen, unter anderem die zeitliche Kontrolle von verschiedenen Entwicklungen, hämatopoetische Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellproliferation und Organentwicklung, gezeigt (Bartel, 2004). MiRNAs und ihre Zielgene scheinen ein komplexes regulatorisches Netzwerk zu sein, bis eine einzige miRNA an viele verschiedene mRNA-Targets bindet und diese regulieren kann. Genauso können mehrere verschiedene miRNA mit einem einzigen mRNA-Target kooperieren (Lewis *et al.*, 2003).

1.3.1 Biogenese von microRNA

Die meisten miRNA-Gene werden durch die RNA-Polymerase II (RNA Pol II) transkribiert. Es wird eine Haarnadelstruktur generiert, welche die primäre miRNA (pri-miRNA) beinhaltet, die eine Größe von bis zu mehr als 1000 nt aufweisen kann (Cai *et al.*, 2004). Ähnlich wie mRNAs hat die Pol-II-transkribierte pri-miRNA ein 5'-Ende und ist polyadenyliert (Bracht *et al.*, 2004). Das lange Primärtranskript (pri-miRNAs) wird durch die nukleäre RNase III Drosha in eine haarnadelförmige precursor miRNA (pre-miRNA) zugeschnitten mit einer Größe von ungefähr 70 nt (Lee *et al.*, 2003). Drosha existiert in einem Multiproteinkomplex, dem Mikroprozessor. Neben Drosha enthält der Mikroprozessor unter anderem auch Pasha (Partner of Drosha)/DGCR8 (DiGeorge syndrome chromosomal region 8), eine Doppelstrang-RNA bindende Domäne (dsRBD; double-stranded RNA binding domain) als Co-Faktor (Denli *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2004). Exportin-5, ein pre-miRNA-spezifischer Carrier, erkennt die pre-miRNA und transportiert diese aus dem Nucleus in das Zytoplasma, wo es weiterverarbeitet wird zu einer Größe von ungefähr 22 nt in Form von dsRNAs (double-stranded RNAs) (Bohnsack *et al.*, 2004). Als nächstes wird die pre-miRNA durch ein weiteres Enzym RNase III, auch Dicer genannt, das mit dsRBD-Proteinen TRBP/Loquacious und in humanen Zellen mit PACT interagiert, gespalten, um einen nun reifen, ungefähr 22 nt großen miRNA:miRNA-Duplex zu produzieren (Bushati & Cohen, 2007). Ein einzelner Strang des miRNA-Duplexes wird in RISC (RNA-induced silencing complex) eingefügt (Hammond *et al.*, 2000). Eine Kernkomponente des RISC ist Argonaute 2 (Ago2) (Martinez *et al.*, 2002, Hammond *et al.*, 2001).

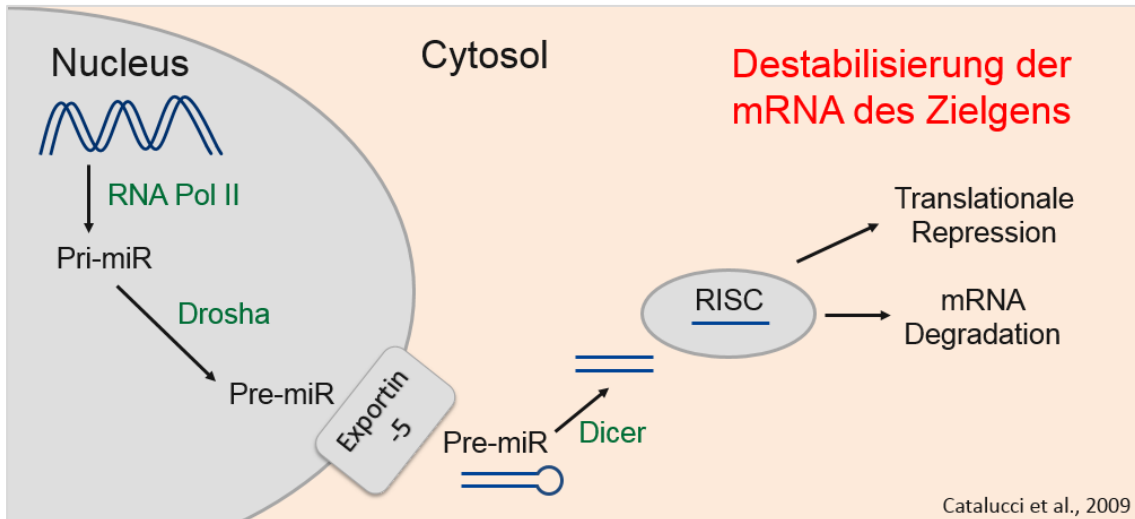


Abbildung 4: Schematische Darstellung der miR-Biogenese (Catalucci *et al.*, 2009) (modifiziert)

1.3.2 Interaktion zwischen microRNA und mRNA

Einmal im RISC eingefügt, lenkt die miRNA den Komplex zu seiner Ziel-mRNA durch Interaktionen zwischen Basenpaaren. Im Falle einer perfekten oder fast perfekten Komplementarität zur miRNA kann die Ziel-mRNA gespalten (inaktiviert) und abgebaut werden, ansonsten wird ihre Translation unterdrückt (Hutvágner & Zamore, 2002, Martinez & Tuschl, 2004, Bushati & Cohen, 2007). Damit die Geninaktivierung stattfinden kann, muss das RISC ein Argonaute-Protein beinhalten, das fähig ist endonukleolytisch zu spalten. Ago2 ist das einzige Enzym mit dieser Eigenschaft bei Säugetieren (Meister *et al.*, 2004). Die endonucleolytische Spaltung der mRNA benötigt eine nahezu perfekte Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA (Humphreys *et al.*, 2005). Die meisten miRNAs in Säugetieren passen mit den Basenpaaren eher unzureichend zu ihren Zielgenen und fördern daher eher eine Translationsunterdrückung als eine Spaltung oder einen Abbau (Pillai *et al.*, 2005). Bei dieser Repressionsweise wird die Ziel-mRNA nicht aktiv abgebaut, sondern destabilisiert (Jackson & Standart, 2007). Eine miRNA-vermittelte Genregulation wird erreicht, wenn die miRNA an einem MRE (miRNA recognition element) am 3'-UTR (untranslated region) der Ziel-mRNA bindet.

Durch partielle Komplementarität zwischen MRE und nur wenigen zum Beispiel sechs oder sieben Nucleotiden am 5'-Ende der miRNA, die sogenannte „Seed-Region“ (s. Abb. 5 A), kann das Zielgen miRNA-vermittelt reguliert werden (Lewis et al., 2003, Lewis et al., 2005). Dadurch, dass die Länge der Seed-Region von 2-7 Nucleotiden so kurz ist, können diese viele potentielle mRNA-Zielgene aufweisen. Genauso kann ein Zielgen von vielen verschiedenen miRNAs reguliert werden (s. Abb. 5 B).

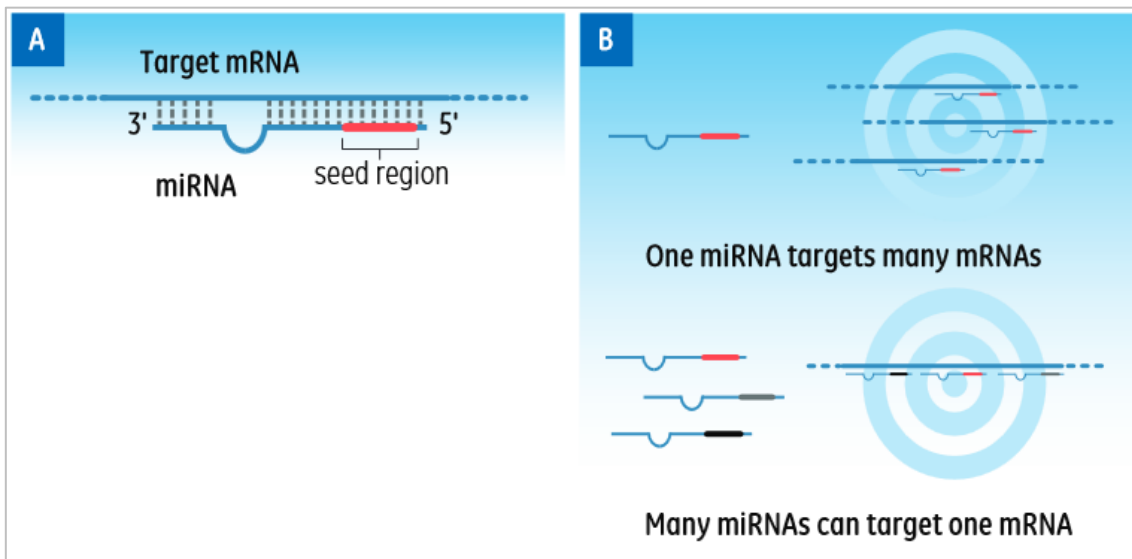


Abbildung 5: Seed-Region (Dharmacon, 2014)

This figure is property of General Electric Company and is used with permission of its subsidiary, GE Healthcare Dharmacon, Inc. This figure cannot be reproduced and/or used for commercial purposes.

Nichtsdestotrotz bleibt die translationale Unterdrückung der miRNAs unklar. Der Schritt, bei dem miRNAs die Translation blockieren, ist umstritten. Es gibt Hinweise dafür, dass miRNAs die Translation in der Initiation blocken, während andere Studien darauf hindeuten, dass der Block in der Elongation stattfindet (Pillai et al., 2005, Humphreys et al., 2005, Nottrott et al., 2006, Lewis et al., 2005).

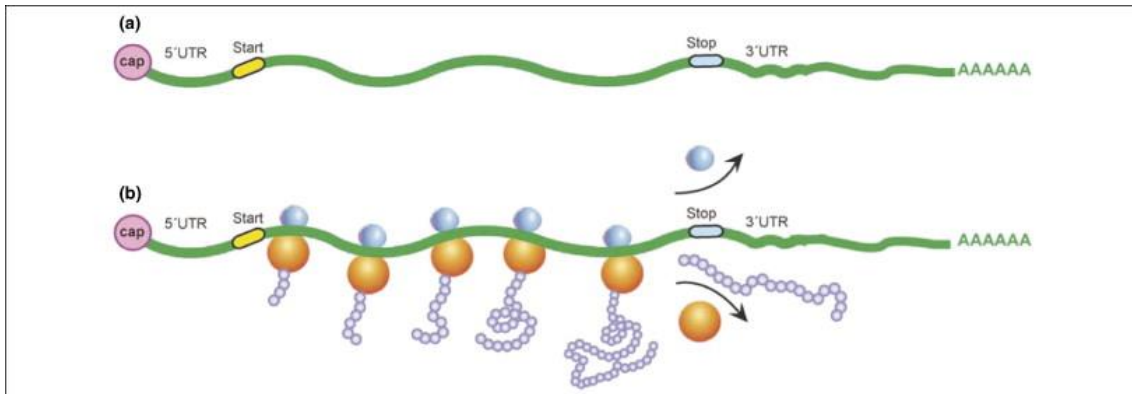


Abbildung 6: Prozess der Translation

6 a) Es ist eine typische eukaryotische mRNA zu sehen mit Start (Initiation) und Stop (Termination). Die Proteinsynthese besteht aus drei Schritten: Initiation, Elongation und Termination. Die Initiation umfasst das Erkennen des 5'-Ende, das bei Proteinen Initiationsfaktor genannt wird, welches die kleine ribosomale Untereinheit rekrutiert. Nachdem diese Untereinheit das Startcodon identifiziert hat, schließt sich die große Untereinheit dieser an und die Translation kann beginnen.

6 b) Es wird eine mRNA, die von mehreren aktiv elongierten Ribosomen besetzt, ist gezeigt (was zusammen ein Polysom ergibt). Während die Translation weiterläuft, kommen die neu synthetisierten Proteine (Polypeptide) aus der großen Untereinheit hervor. Die Termination beginnt, wenn ein elongiertes Ribosom auf das Stopcodon trifft. Das Ribosom löst sich von der mRNA und das nun fertige Protein entsteht (Nilsen, 2007).

1.3.3 Mimics (Imitatoren) und Inhibitoren von miRNAs zur Analyse der Regulation des Zielgens

Seit miRNAs das erste Mal in *Caenorhabditis elegans* im Jahre 1993 beschrieben wurden, ist der Entdeckungsbereich nahezu explodiert (Lee et al., 1993). Die Anzahl der veröffentlichten microRNA-Sequenzen in miRBase steigt rapide an (Kozomara & Griffiths-Jones, 2013). Bis zum Jahr 2002 konnten 218 miRNAs erfasst werden. Stand Juni, 2014 waren es bereits 28 645 miRNAs (Griffiths-Jones-Lab). Für jede einzelne Genanalyse müssen die möglichen miRNAs für das entsprechende Zielgen computertechnisch erfasst werden. Nachdem diese ermittelt wurden, kann die Authentizität der miRNA/Zielgen-Paare durch gain-of-function- und loss-of-function-Experimente mit Hilfe von miRNA-Mimics und miRNA-Inhibitoren bestätigt werden. Es gibt verschiedene online Hilfsmittel, um eine computertechnische Prognose über miRNA-Zielgene zu machen (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Online Hilfsmittel für eine computertechnische Prognose von miRNA-Zielgenen

Online Hilfsmittel für eine computertechnische Prognose von miRNA-Zielgenen
microrna.org
targetscan.org
ebi.ac.uk

Online Hilfsmittel werden für eine computertechnische Prognose von miRNA-Zielgenen angewandt (s. Tab. 1). Man gibt die gewünschte miRNA in die jeweilige Suchleiste ein und lässt sich die dazugehörigen Zielgene, die bereits beschrieben wurden, anzeigen. Anschließend kann man noch Literaturrecherche durchführen und diese auch experimentell bestätigen lassen.

Abbildung 7 zeigt, wie miRNA-Mimics (Imitatoren) und Inhibitoren die mRNA-Expression und damit die Genexpression beeinflussen.

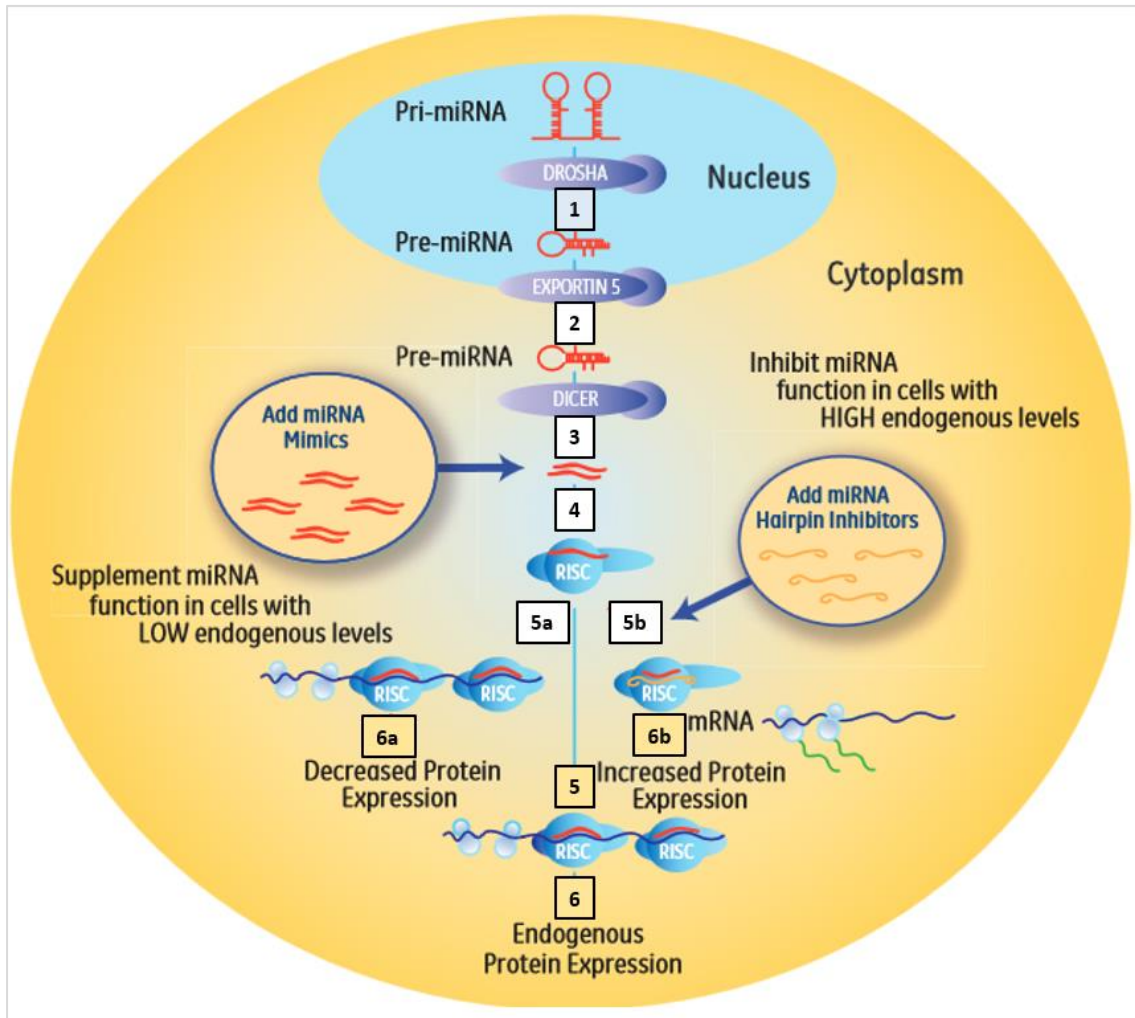


Abbildung 7: miRNA-Imitatoren und –Inhibitoren (Dharmacon, 2014)

This figure is property of General Electric Company and is used with permission of its subsidiary, GE Healthcare Dharmacon, Inc. This figure cannot be reproduced and/or used for commercial purposes.

MiRNA-Imitatoren und –Inhibitoren simulieren bzw. schwächen den Effekt von endogenen miRNAs auf die Zielgenexpression. Schritt 1-3 in Abbildung 7 beschreiben die Biogenese von endogener miRNA. Wenn der reife miRNA-Duplex in das RISC geladen wird, resultiert die Bildung des programmierten RISC durch die Spaltung des inaktivierten Stranges der miRNA (Schritt 4). Das programmierte RISC bindet am 3'-UTR der Ziel-mRNA (Schritt 5). MiRNA-Imitatoren (Mimics) unterstützen die miRNA-Funktion (Schritt 5a) und erniedrigen das Proteinlevel (Schritt 6a). MiRNA-Inhibitoren konkurrieren mit der Ziel-mRNA um das programmierte RISC (Schritt 5b) und erhöhen das Proteinlevel (Schritt 6b) (Dharmacon, 2014).

1.3.4 microRNA-212 und microRNA-132

MicroRNA-212 (miRNA-212, miR-212) ist lokalisiert auf dem Chromosom 17p13.3, ungefähr 260 bp von der nah verwandten microRNA-132 (miRNA-132, miR-132) entfernt. Beide teilen die identische 5'-Seed-Region, daher ist zu erwarten, dass beide identische Zielgene regulieren (Park *et al.*, 2011). Viele Studien haben gezeigt, dass beide miRNAs eine wichtige Rolle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen spielen, wie zum Beispiel bei Tumoren oder Entzündungen (Wanet *et al.*, 2012, Lagos *et al.*, 2010, Park *et al.*, 2011). Unter die validierten Zielgene dieser miRNA-Familie gehören Gene, die unter anderem in der BHS-Integrität involviert sind. Dazu zählen ZO1 (Tang *et al.*, 2008), MMP9 (Ucar *et al.*, 2010) und Tjap1 (Cambronne *et al.*, 2012). Claudin1, Jam3 und Tjap1 wurden zusätzlich als potentielle Zielgene der miR-132/212-Familie identifiziert und in dieser Arbeit im Labor von Frau Professor Förster (Würzburg) untersucht. Hsa-miR-212 ist ein humanes Mimic und hat die gleiche Sequenz für Maus (mmu) und Mensch (hsa). Das gleiche gilt für hsa-miR-132 (s. Abb. 8).

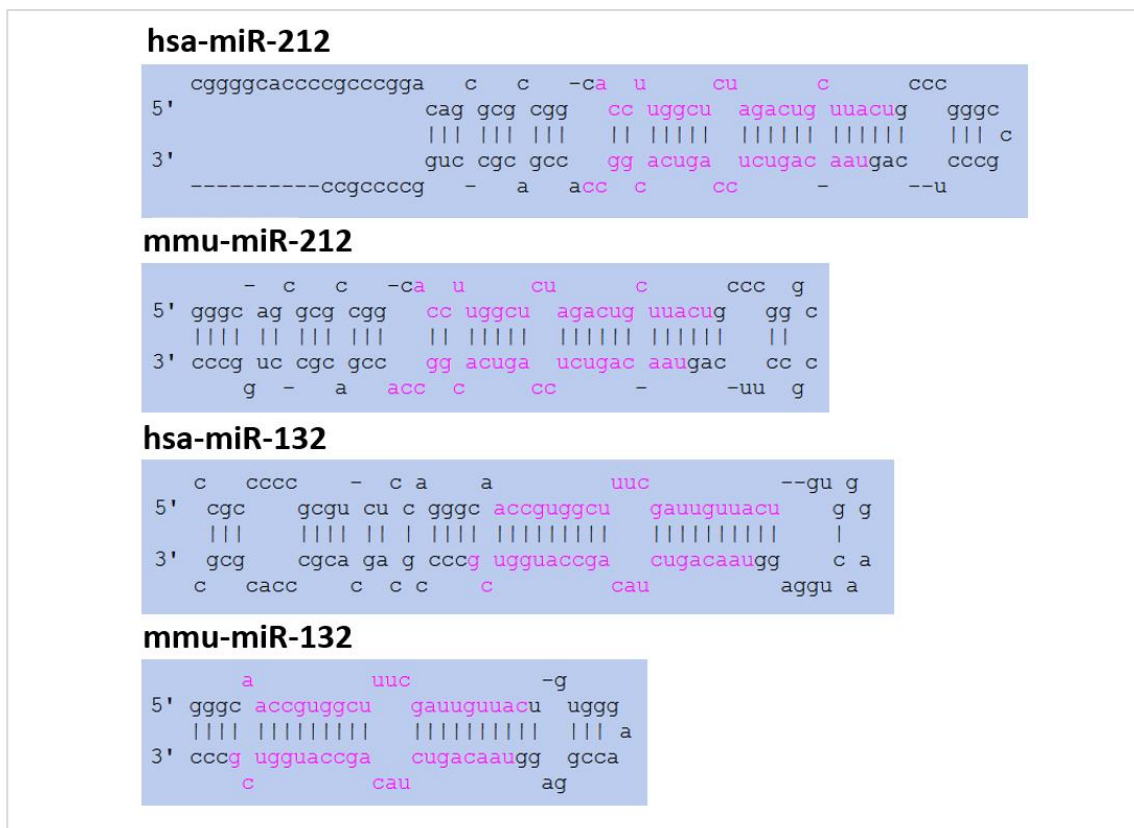


Abbildung 8: Haarnadelstruktur (Stem-loop) von miR-132 und miR-212 (Griffiths-Jones-Lab)
 hsa = homo sapiens (Mensch); mmu = mus musculus (Hausmaus)

1.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es zunächst in einem in-vitro-Modell die Wirkung von Astrozyten-konditioniertem Medium unter hypoxischen Bedingungen auf diverse Proteine an der Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen, um die Bedingungen für anschließende Versuche zu optimieren und anzupassen.

Des Weiteren haben miRNAs in der Vergangenheit immer mehr an Bedeutung gewonnen, insbesondere in der Entstehung von verschiedenen Krankheitsprozessen, sodass sich die Fragen stellten, welche Rolle miRNAs in der Hypoxie an der Blut-Hirn-Schranke spielen, wie können diese miRNAs beeinflusst bzw. reguliert werden und wie wirken sich diese auf die Stabilität der Barriere aus.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Kulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Sigma Aldrich

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Thermo Scientific

➤ Modifiziert:

Mit L-Glutamine und Phenol-rot

Ohne Glucose, Sodium Pyruvat, HEPES

Kulturutensilien

Gewebekulturflaschen

CELLSTAR® Greiner

24-Well-Platte (steril)

Thermo SCIENTIFIC

12-Well-Platte (steril)

Thermo SCIENTIFIC

6-Well-Platte (steril)

Thermo SCIENTIFIC

Filter Minisart 0,20 µm

Sartorius Stedim Biotech

Weitere Reagenzien

Trypsin/EDTA

Biochrom

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)

Sigma Life Science

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma Life Science

Sicherheitswerkbank

HERAsafe®

Heraeus®

Gerätenamen

Centrifuge 5418R	Eppendorf
Centrifuge Megafuge 16R Heraeus	Thermo Scientific
Lichtmikroskop Axiovert25	Zeiss

Inkubatoren

Steri-Cult 200	Forma Scientific
CO ₂ Incubator C60	Labotect
Heracell 150i Incubator	Thermo Scientific

2.1.2 Endothelzellpräparation

Beschichtung

0,5 % Gelatin	Serva (22151)
---------------	---------------

2.1.3 Molekularbiologische Methoden

2.1.3.1 RNA-Isolation

Kit

Total RNA isolation NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel
--	----------------

Reagenzien

Ethanol	Sigma-Aldrich
Aqua ad iniectabilia (a.d.)	B. Braun
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich

RNA-Konzentrationsmessung

Programm NanoDrop	Thermo Scientific
-------------------	-------------------

2.1.3.2 cDNA-Synthese

Kit

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Thermo Scientific

Gerätename

2720 Thermal Cycler Applied Biosystem

2.1.3.3 qPCR

Kit:

Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix Agilent Technologies

TaqMan® Universal Master Mix II Applied Biosystem

Murine TagMan Sonden

Actb FAM	Mm01205647_g1	Applied Biosystems
JAM3	Mm00499214_m1	Applied Biosystems
Tjap1	Mm00503864_m1	Applied Biosystems
Cldn1	Mm00516701_m1	Applied Biosystems
Mmp9 FAM	Mm00442991_m1	Applied Biosystems
AQP1	Mm00431834_m1	Applied Biosystems
Cldn5	Mm00727012_s1	Applied Biosystems
Glut1	Mm01192270_m1	Applied Biosystems
ANGPT2	Mm00545822_m1	Applied Biosystems
ANGPT1	Mm00456503_m1	Applied Biosystems
TIMP3	Mm00441826_m1	Applied Biosystems
JAM2	Mm00470197_m1	Applied Biosystems
ANGPTL4	Mm00480431_m1	Applied Biosystems
Tjp1(ZO-1)	Mm00493699_m1	Applied Biosystems
MMP3	Mm00440295_m1	Applied Biosystems

Gerätename

7300 Real time PCR System

Applied Biosystems

Software

7300 System Software

Applied Biosystems

2.1.4 Biochemische Methoden

2.1.4.1 Zelllysate für Western Blot

Zusammensetzung von RIPA-Buffer

- 50 mM Tris pH 8.0
- 150 mM NaCl
- 0,1 % SDS
- 0,5 % Na.Deoxycholate
- 1 % NP40

Protease Inhibitor

complete ULTRS Tablets, Mini, EASYpack

Roche

Dublecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)

Sigma Life Science

Mix

130 µl RIPA-Buffer und 20 µl Protease Inhibitor

2.1.4.2 Proteinbestimmung

96-Well-Platte (Mikrotestplatte)

A. Hartenstein

Kit

Pierce™ BCA Protein Assay Kit

Thermo Scientific

Gerätename

Sunrise™ Tecan

Software

Magellan5 Tecan

Lämmli 4 x

- 8 % SDS
- 40 % Glycerol
- 0,004 % Bromophenol blue
- 0,250 M Tris HCl
- pH 6,8
- 6 % β-Mercaptoethanol

Sonikator

Sonopuls Bandelin

2.1.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

Trenngel und Sammelgel

- H₂O
- Acrylamid/Bis (30:2) Rotiphorese® Gel 310 Carl Roth
- 3 M Tris pH 8,8
- 0,5 M Tris pH 6,8
- 10 % SDS
- 10 % APS
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) Sigma, Life Science

2 Material und Methoden

Gradientengel

NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel (1.0 mm X 12)	Invitrogen Novex
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20 x)	Invitrogen NovexNuPAGE®
Transfer Buffer (20 x)	Invitrogen Novex
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen Novex
XCell SureLock™ Mini-Cell	Thermo Scinetific Invitrogen

Zusammensetzung von ECL I

- 1 Cap 3-Aminophthalhydrazide (Luminol),
 - Luminol-Stock: 250 nM in DMSO
 - 1 Cap PCA
 - PCA: 90 mM in DMSO
 - 5 ml Tris 1M pH8,8
 - Auf 50 ml H₂O auffüllen
- Sigma Aldrich
- Sigma Aldrich

Zusammensetzung von ECL II

- 5 ml Tris 1 M pH 8,8
- 32 µl H₂O₂
- Auf 50 ml H₂O auffüllen

Elektrophoresepuffer 10x Stock

- (25 mM) 60,4 g Tris Pufferan®
 - (250 mM) 376 g Glycine p.A.
 - (0,1 %) 20 g SDS
 - Auf 2 L H₂O
- Carl Roth
- AppliChem Panreac

Elektrophorese (1x)

- 200 ml des Elektrophoresepuffer 10 x Stock
- 1800 ml Wasser (B.Braun)

Zusammensetzung von Transferpuffer (Towbin)

- (25 mM) 6,06 g Tris
- (192 mM) 28,83 g Glycine
- 400 ml Methanol
- 7,5 ml 10 % SDS
- Auf 2 L H₂O

PVDF-Membran

Bio-Rad

Antikörper

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung	Sekundärer Antikörper
Anti-JAM C	rabbit polyclonal	Millipore®	1:1000	GE Healthcare UK Limited
Anti-Claudin1	Rabbit	Thermo Scientific	1:200	Roche®
Anti-Tjap1	rabbit polyclonal	abcam®	1:1000	GE Healthcare UK Limited

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Kit	Anti-Rabbit IgG-POD	Roche® Diagnostics GmbH	1:1000
ECL™	Anti-Rabbit	GE Healthcare UK Limited	1:3000

Kontrollantikörper

Actin- β	Sigma Aldrich
Magermilchpulver	AppliChem Panreac ITW Companies
TWEEN® 20 (Polysorbate 20)	Sigma-Aldrich

Marker

peqGOLD Protein Marker V	PeqLab
--------------------------	--------

Imager

FluorChem® FC2	Alpha Innotech
----------------	----------------

Software

Alpha Innotech (Alpha View)

2.1.4.4 Transfektion

RNAiFect Transfection Reagent	Qiagen
-------------------------------	--------

Tabelle 4: miRNA-Sequenz

Name	Species	Mature miRNA Sequence	Product-ID	Hersteller
mmu-miR-212-3p	Mus musculus	UAACAGUCUCCAGUCACGGCCA	MC12534	Ambion® Applied Biosystems
hsa-miR-132-3p	Homo sapiens	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	MC10166	Ambion® Applied Biosystems

Tabelle 5: Sequenz der Negative Control A und des Family Inhibitors

Name	Product Group	Product Sequence 5'-3'	Product-ID	Hersteller
Negative Control A	miRCURY LNA Inhibitor Control	GTGTAACACGTCTATACGCCCA7/36- FAM/	199004- 08	Exiqon
hsa-miR-132 FI	miRCURY LNA family inhibitor	CTGKAGACTGTT K= G,T	450023-1	Exiqon

2.1.4.5 TEER

Widerstandsmessgerät

World Precision Instruments

2.1.4.6 Permeabilitätsmessung (FAM)

Fluorescein isothiocyanate–dextran (4 kDA)

Sigma

Wallac Victor2 Fluoreszenz-Spektrophotometer

Perkin-Elmer

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Präparation und Kultivierung der verschiedenen Zelllinien

cEND-2 – murine mikrovaskuläre Hirnendothelzellen

Die Zellen wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Förster isoliert, immortalisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Förster 2005; Burek 2012). Kurz dargestellt, acht Mäuse im Alter von fünf Tagen wurden dekapitiert. Die Gehirne wurden herauspräpariert und das Cerebrum vom restlichen Gehirn getrennt. Das herauspräparierte Gewebe wurde im kalten Puffer A aufgenommen und die Meningen entfernt. Nach dem Verdau mit 1 ml Kollagenase wurden die Zellen ausgesät und mit polyoma-mittlerem T-Antigen immortalisiert.

Die Kultivierung von cEND-2-Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Im Abstand von 7 Tagen wurden die Zellen nach Ablösen mit Trypsin-Lösung im Verhältnis 1:3 auf eine neue Kulturflasche überführt. Die Kulturflasche wurde vorher mit 0,5 % Gelatine beschichtet. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Astrozyten –(C6–) Ratten Astroglioma Zellen

Ratten Astrozyten wurden von der Firma ATCC (USA) gekauft. Die Astrozyten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten. Das Splitten im Verhältnis 1:6 erfolgte im Abstand von 2-3 Tagen mit Trypsin. Die Zellen wurden in einer mit 0,5 % Gelatine beschichteten Kulturflasche weitergezogen und alle 2-3 Tage mit frischem Medium versorgt.

Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Unter Kryokonservierung versteht man das Einfrieren und Aufbewahren von Zellen in flüssigem Stickstoff. Als Gefrierschutzmittel wurde DMSO verwendet. Nach dem Lösen der Zellen mit Trypsin wurden die Zellen in einem Röhrchen zentrifugiert

(G = 200; t = 5 min; Temp. = 21 °C). Das Sediment wurde mit 10 % DMSO, 10 % FCS und Medium versetzt und in ein Kryoröhrchen (1 ml) gefüllt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei -80 °C gelagert, bevor sie endgültig in den flüssigen Stickstoff überführt werden konnten.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit 37 °C warmem Medium aufgetaut und in den entsprechenden Kulturflaschen unter den Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium nach Anwachsen der Zellen gewechselt, um das DMSO zu entfernen, da es für die Zellen toxisch ist.

Beschichtung mit 0,5 % Gelatine

Zum Weiterziehen der Zellen in einer neuen Zellkulturflasche wurde die Fläche mit 0,5 % Gelatine für mindestens 15 Minuten beschichtet.

Splitten und Aussäen von Zellen

Die herangewachsenen Zellen wurden nach ungefähr 6-7 Tagen gesplittet. Diese Arbeit wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Das Medium wurde zunächst aus der Zellkulturflasche komplett entfernt. Zweimal wurde mit 14 ml PBS nachgespült. Anschließend wurde 2 ml Trypsin auf die Zellen gegeben. Danach wurde die Zellkulturflasche mit dem Trypsin bei 37 °C für 2-5 Minuten in den Inkubator gestellt. Im Anschluss konnte man unter dem Mikroskop das Lösen der Zellen beobachten und durch behutsames Klopfen komplett vom Untergrund lösen. Als nächstes wurde unverzüglich Medium auf die Zellen gegeben, um das restliche Trypsin zu inaktivieren. Je nach Versuch wurden die Zellen auf die verschiedenen Platten, die zuvor mit Gelatine beschichtet wurden, verteilt. Die Astrozyten-Zellen wurden im Verhältnis 1:15, die cEND-2-Zellen 1:3 gesplittet.

Differenzierung der Zellen

Am Tag des Versuchs sollten die Zellen ausdifferenziert sein, damit sie ihre Endothelzell-Eigenschaften aufweisen konnten. Das ist wichtig für die vollständige Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte. Ein Tag vor dem OGD-/Normoxie-Versuch wurde das normale Medium zum Weiterziehen der Zellkultur gegen ein reduziertes Medium (cEND-2: 1 % FCS) getauscht. Das reduzierte Medium mit 1 % FCS wurde bereits in der Arbeitsgruppe Förster etabliert.

2.2.1.2 Kulturmedien

Kulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen zusammengestellt und mussten vor jedem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt werden.

cEND-2-Wachstums Medium

- 500 ml DMEM
- 10 ml L-Glutamin
- 5 ml P/S
- 10 ml NEA
- 10 ml Natriumpyruvat
- 10 ml MEM
- 50 ml FCS

Astrozyten –(C6-)Kulturmedium

- 500 ml DMEM
- 50 ml FCS
- 5 ml P/S

Reduziertes Medium für cEND-2-/Astrozyten-(C6-)Zellen

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- 1 % FCS
- 5 ml P/S

Medium ohne Glucose

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Modifiziert:

- Mit L-Glutamine und Phenol-rot
- Ohne Glucose, Sodium Pyruvat, HEPES

2.2.1.3 Versuchsaufbau

Herstellung von Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium für die OGD der cEND-2

Nach 4-stündiger Hypoxie der Astrozyten-(C6-)Zellen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Glucose wurde das Medium aus der Zellkulturflasche unter sterilen Bedingungen gesammelt und durch einen sterilen 0,2 µm Filter laufen gelassen (s. Tab. 6). Anschließend konnte das Medium für den 4-stündigen OGD-Versuch der cEND-2-Zellen als Astrozyten-(C6-)konditioniertes Medium verwendet werden.

Herstellung von Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium für die Normoxie der cEND-2

Nach dem Normoxie-Versuch bei den Astrozyten-(C6-)Zellen mit 1 % FCS + DMEM wurde nach 4 h das Medium aus der Zellkulturflasche unter sterilen Bedingungen gesammelt und durch einen sterilen 0,2 µm Filter laufen gelassen (s. Tab. 6). Anschließend konnte das Medium für den Normoxie-Versuch und für die 24-stündige Reoxygenierung der OGD-Versuche an den cEND-2-Zellen verwendet werden.

Tabelle 6: Versuchsaufbau Herstellung C6-konditioniertes Medium

Normoxie		OGD	
Dauer	4 h	Dauer	4 h
Medium	1 % FCS + DMEM	Medium	DMEM ohne Glucose

Oxygen-glucose-deprivation-Versuch (OGD) mit Astrozyten-(C6-) konditioniertem Medium

Für die Simulation einer Hypoxie diente der Inkubator HERAcell150i (Thermo Scientific). Der OGD-Versuch wurde bei 37 °C, 1,0 % O₂-Gehalt und 5,0 % CO₂-Gehalt durchgeführt. Bei den OGD-Versuchen der cEND-2-Zellen wurde das Astrozyten-(C6-)konditionierte Medium verwendet (s. Tab. 7). Die Zellen wurden für eine Dauer von 4 h diesen OGD-Bedingungen ausgesetzt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen lysiert und ein anderer Teil für die Reoxygenierung (unter normalen Wachstumsbedingungen) weiterverwendet. Der Versuchsaufbau mit 4 h OGD und 24 h Reoxygenierung wurde bereits in einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe Förster etabliert und publiziert (Neuhaus *et al.*, 2015, Kleinschnitz *et al.*, 2011).

Reoxygenierung der OGD-Proben bei cEND-2 mit Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium

Die Dauer der Reoxygenierung betrug 24 h und schloss sich direkt an den 4-stündigen OGD-Versuch an. Unter der Sterilbank wurde das Medium in den Wells für die Reoxygenierung gewechselt. Verwendet wurde Astrozyten-(C6-)konditioniertes Medium, das nach 4-stündiger Normoxie der Astrozyten gesammelt wurde (s. Tab. 7). Anschließend wurde die Platte im 37 °C-Inkubator (Steri-Cult 200; Thermo Scientific) bei einem Sauerstoffgehalt der Raumluft inkubiert.

24 h später konnten die Zellen lysiert und für die Auswertung weiterverarbeitet werden.

Tabelle 7: Versuchsaufbau OGD + Reoxygenierung mit C6-konditioniertem Medium

OGD cEND-2 mit C6-Medium		Reoxygenierung cEND-2 mit C6-Medium	
Dauer	4 h	Dauer	4 h + 24 h
Medium	C6-konditioniertes Medium nach OGD	Medium	C6-konditioniertes Medium nach Normoxie

Normoxie-Versuch der cEND-2-Zellen mit Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium

Die Zellen wurden bei normalem Sauerstoffgehalt und in einem Medium mit Glucose für 4 h inkubiert. Nach 4 h wurde ein Teil der Zellen lysiert und ein weiterer Teil für weitere 24 h inkubiert. Astrozyten-(C6-)konditioniertes Medium wurde sowohl bei den 4 h Proben als auch bei den Proben, die nach 4 Stunden einen Mediumwechsel hatten und für 24 h weitergezogen wurden, verwendet (s. Tab. 8).

Inkubiert wurden die Zellen im Steri-Cult 200 (Forma Scientific; 37 °C; 5,0 % CO₂; Sauerstoffgehalt der Raumluft).

Tabelle 8: Versuchsaufbau Normoxie cEND-2 mit C6-konditioniertem Medium

Normoxie cEND-2 mit C6-konditioniertem Medium	
Dauer	Medium
4 h	C6-konditioniertes Medium nach Normoxie
4 h + 24 h	

OGD-Versuch der cEND-2-Zellen ohne konditioniertem Medium

Der Versuchsaufbau ist hier ähnlich wie der OGD-Versuch mit Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium. Allerdings wurde hier Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Glucose als Medium für 4 h gegeben (s. Tab. 9). Ein Teil der Zellen wurde lysiert. Die anderen Proben wurden für die Reoxygenierung weiterverwendet.

Reoxygenierung der cEND-2-Zellen ohne konditioniertem Medium

Auch hier ist der Versuchsaufbau ähnlich wie bei der Reoxygenierung mit Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium. Nach 4 h OGD ohne Astrozyten-(C6-)konditioniertes Medium wurde ein Mediumwechsel durchgeführt (s. Tab. 9). Es wurde nun für die weiteren 24 h Reoxygenierung DMEM mit 1 % FCS verwendet.

Tabelle 9: Versuchsaufbau OGD + Reoxygenierung ohne C6-konditioniertes Medium

OGD cEND-2 ohne C6-Medium		Reoxygenierung cEND-2 ohne C6-Medium	
Dauer	4 h	Dauer	4 h + 24 h
Medium	DMEM ohne Glucose	Medium	1 % FCS + DMEM

Normoxie-Versuch der cEND-2-Zellen ohne konditioniertes Medium

Der Normoxie-Versuch bei den cEND-2-Zellen ohne Astrozyten-(C6-)konditioniertes Medium diente als Kontrolle. Dieser Versuch dauerte zunächst 4 h. Verwendet wurde 1 % FCS + DMEM für die cEND-2-Zellen. Bei den Proben, die nach 4 h für weitere 24 h inkubiert wurden, wurde das Medium gewechselt und erneut 1 % FCS + DMEM gegeben (s. Tab. 10).

Inkubiert wurden die Zellen im Steri-Cult 200 (Forma Scientific; 37 °C; 5,0 % CO₂; Sauerstoffgehalt der Raumluft).

Tabelle 10: Versuchsaufbau Normoxie cEND-2 ohne C6-konditioniertes Medium

Normoxie cEND-2 ohne C6-konditioniertes Medium	
Dauer	Medium
4 h	1 % FCS + DMEM
4 h + 24 h	

2.2.2 Biochemische Methode

2.2.2.1 Proteinpräparation

Zum Sammeln der Proben wurde ein Gemisch aus RIPA-Puffer und Protease Inhibitor zusammengestellt. Dieser Mix bestand aus 130 μ l RIPA-Puffer und 20 μ l Protease Inhibitor.

Das Medium wurde aus dem Töpfchen mit der Probe abgesaugt und die Zellen wurden auf Eis zweimal mit PBS gewaschen. Pro Well wurde 100 μ l des Gemisches aus RIPA-Puffer und Protease Inhibitor auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen zusammengeschaubt und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen hinein pipettiert.

Die gewonnenen Proben wurden durch den Ultraschall-Homogenisator (Bandelin Sonopuls) auf Eis fünfmal für 0,5 Sekunden mit dreisekündigen Pausen homogenisiert und anschließend für eine Minute bei 11.000 Gravitationsbeschleunigungen (g) bei 4 °C zentrifugiert.

Vom Überstand der Probe wurden 3 μ l zur Proteinbestimmung verwendet und 75 μ l in ein neues Gefäß überführt und mit 25 μ l 4 x Lämmli-Puffer und 6 % β -Mercaptoethanol versetzt. Anschließend wurden diese Proben wieder durch Ultraschall homogenisiert und bei -20 °C für die spätere Verwendung weggefroren.

2.2.2.2 Proteinbestimmung Bicinchoninsäure (BCA)-Methode

Die BCA-Reaktion wird zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Proteinen verwendet. Die Proteine wurden nach Anleitung des Pierce™ BCA Protein Assay Kit bestimmt. Als Mikroplattenleser wurde der Sunrise™ von Tecan® verwendet. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit dem Programm Magellan 5 von Tecan®.

Hierfür wurde eine Standardreihe bestehend aus Albumin (BSA) und Wasser (Aqua, B.Braun) in verschiedenen Konzentrationen erstellt. Anschließend wurde 25 μ l dieser Verdünnungsreihe auf eine 96-Well-Platte (A. Hartenstein) pipettiert. Für die Proben wurden die Töpfchen jeweils mit 22 μ l Wasser (Aqua, B.Braun) + 3 μ l der Probe gefüllt.

Als nächstes wurde zu den gefüllten Töpfchen 200 µl des BCA-Reagenzes bestehend aus BCA-Reagenz A und BCA-Reagenz B im Verhältnis 50:1 (50:1, Reagenz A:B) gegeben.

Die Platte wurde dann für 30 Minuten in den Inkubator bei 37 °C (89 % RH; 4,9 % CO₂) gestellt. Zweiwertige Kupferionen reagieren quantitativ mit dem Protein zu einwertigen Kupferionen, die mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff bilden.

Die Absorption des violetten Farbstoffes kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden (Sunrise® von Tecan).

Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben konnte anschließend durch den Vergleich der Absorption der Standardreihe und der Proben berechnet werden.

2.2.2.3 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach Molekülgröße in einem elektrischen Feld, da diese je nach Größe eine unterschiedliche Laufgeschwindigkeit haben. SDS ist ein Detergens (anionisches Tensid), das die Eigenschaft besitzt die Eigenladung von Proteinen zu überdecken. Die Proteine weisen dadurch eine konstante negative Ladungsverteilung auf. Vor der Verwendung wurde das Lämmli 4 x mit dem enthaltenen SDS in 37 °C warmen Wasser erwärmt, damit das SDS sich lösen konnte. Durch das Aufkochen bei 70 °C (t = 10 min) denaturieren die Proteine, was zu einer Auflösung der Quartär-, Tertiär-, und Sekundärstrukturen und Linearisierung der Proteine führt. Dies ermöglicht die Auftrennung nach der Kettenlänge proportional zur Molekülmasse. Die kürzeren Ketten laufen schneller durch das Gel als die Größeren, welche stärker zurückgehalten werden.

Zunächst wurde ein Gel gegossen, bestehend aus einem unteren Teil (Trenngel) mit der passenden Dichte für das zu bestimmende Protein und einem oberen Teil (Sammelgel), in dem sich die Taschen für die Proben befinden. Die Polymerisation des Gels wurde mit Ammoniumpersulfat (APS) initiiert und mit Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Es wurde ein Gel-Elektrophorese-System von Bio-Rad verwendet. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten (Abstand von 1,5 mm) bis ca. 1,5 cm unter der Oberkante und der Rest vorsichtig und langsam mit Wasser (Aqua, B.Braun) bis zur Oberkante befüllt, um eine glatte, gerade Kante zu bekommen. Nach 10 min wurde das

Wasser vollständig ausgekippt und durch das Sammelgel ersetzt. In das Sammelgel wurde ein 15-er Kamm gesteckt, der die Taschen formen sollte. Dabei war zu beachten, dass die Taschen luftblasenfrei waren. In dieser Konstruktion verblieb das Gel für mindestens 1 h.

Anschließend konnte der Kamm vorsichtig herausgezogen werden. Das Gel mit den Platten konnte nun in die vertikale Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories) eingesetzt werden und mit Elektrophoresepuffer (1 x) gefüllt werden. Dabei war zu beachten, dass die Taschen ebenfalls mit Puffer gefüllt waren und noch einmal mit der Pipette vorsichtig gespült wurden, um Reste des Gels zu entfernen. Die Proben wurden im Heizblock (DRI-BLOCK DB 2A, Techne) für 10 min bei 70 °C erhitzt. Danach wurden diese direkt in die jeweilige Tasche pipettiert. Eine Tasche konnte mit maximal 25 µl Probe gefüllt werden.

Zur Überwachung der Proteinauftrennung, Kontrolle der Transfereffizienz und Größenbestimmung wurde der Marker peqGOLD Protein Marker V von Peq-Lab Biotechnologie verwendet. Für die richtige Seitenzuordnung wurde der Marker in unterschiedlicher Menge in die Tasche gefüllt (0,4 µl links neben der ersten Probe und 4 µl rechts neben der letzten Probe).

Nachdem alle Taschen gefüllt waren, wurde der Deckel geschlossen und die Kammer an eine Stromquelle (Power 300, Peq-Lab Biotechnologie) angeschlossen. Zunächst wurde die Stromquelle auf eine elektrische Spannung von 60 V für 30 min eingestellt, bis die Proben durch das Sammelgel gelaufen waren. Anschließend konnte die Spannung für das Durchlaufen des Trenngels auf 150 V erhöht werden.

Die Proben durchliefen das gesamte Gel bei Raumtemperatur (RT).

Als weitere Methode der Elektrophorese wurden auch Gradientengele (Thermo Scientific) verwendet. Damit war die Auftrennung der Proteine in 4 – 12 % Gele auf einem Gel möglich. Dieses wurde in eine dazugehörige Kammer eingebaut und mit Elektrophoresepuffer (MOPS SDS Running Buffer; Thermo Scinetific) in der Innenkammer komplett und in der Außenkammer zur Hälfte befüllt.

Dem Elektrophoresepuffer wurde kurz vor der Verwendung ein Antioxidanz (Thermo Scinetific) bei 4 °C beigemischt.

2.2.2.4 Western Blot

Um die Proteine im SDS-PAGE für weitere hochmolekulare Nachweissubstrate, wie zum Beispiel Antikörper, zugänglich zu machen, wird ein weiteres Verfahren benötigt.

Beim Tank-Blot werden die Proteine von dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran PVDF (Bio-Rad Laboratories) übertragen.

Für den Transfer musste der Transferpuffer (Towbin) eisgekühlt sein. Das Gel wurde in Towbin gelegt, die Filter (A. Hartenstein) und die Polster/Schwämme wurden mit Towbin durchtränkt. Die PVDF-Membran wurde zuerst in Methanol für 1 min gelegt und anschließend ebenfalls in den Transferpuffer gelegt. Im nächsten Schritt mussten die Schwämme, die Filter, die PVDF-Membran und das mit proteinbeladene Gel in der richtigen Reihenfolge aufeinandergelegt werden und zwischen zwei Graphitplatten geklemmt werden (s. Abb. 9).

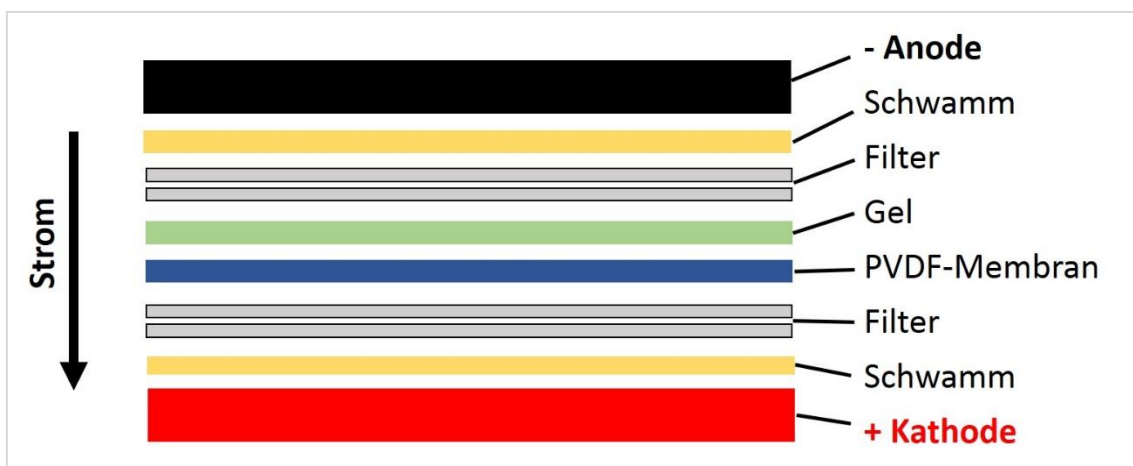


Abbildung 9: Aufbau Tank-Blot-Transfer (eigene Darstellung)

Der Tank-Blot (Peq-Lab Biotechnologies) wurde nun mit Transferpuffer gefüllt, sodass die Membran und das Gel vollständig darin lagen. Anschließend wurde der Tank-Blot mit dem Deckel geschlossen und bei 4 °C an die Stromquelle (E 835, Consort) angeschlossen. Über die Elektroden wurden ein Stromfluss von 80 mA und eine Spannung von 40 V über Nacht angelegt, um die Proteine auf die Membran zu übertragen.

Im Transfer wird ein elektrisches Feld erzeugt, das senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtet ist.

Das negativ geladene Protein auf dem Gel läuft Richtung Kathode auf die proteinbindende PVDF-Membran zu und verlässt die Gelmatrix. Am Folgetag wurde alles auseinander gebaut. Beim Tank-Blot-Transfer mit dem Transferpuffer von Thermo Scientific wurden eine Spannung von 100 V und eine Stromstärke von 200 mA eingestellt. Die Dauer betrug in diesem Fall nur 1 h bis 1 h 20 min.

Das Gel konnte nach erfolgreichem Transfer verworfen werden. Die freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran wurden mit 5 % Milch (pro Membran 1,25 g Milchpulver + 25 ml PBS), ein für den Antikörper nicht erkennbares Protein, über 45 Minuten auf einer Schwenkplatte bei RT blockiert. Als nächstes wurde eine Primärantikörper-Lösung zusammengestellt und über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Dieser Primärantikörper wurde in 5 % Milch gelöst. Die Verdünnung wurde nach Anleitung des jeweiligen Antikörpers gewählt.

Am nächsten Tag konnte die Membran mit der Waschlösung PBS + TWEEN (3 x 10 Minuten) von überflüssigem Antikörper entfernt werden. Anschließend wurde wieder für 20 min mit 5 % Milchpulver geblockt.

Der nächste Schritt war die Zugabe des sekundären Antikörpers (s. Abschn. 2.1.4.3 Tab. 3). Je nach Primärantikörper (s. Abschn. 2.1.4.3 Tab. 2) wurde der passende Sekundärantikörper mit der richtigen Verdünnung gewählt. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls mit 5 % Milchpulver verdünnt und für 1 h auf die Membran gegeben. Schließlich wurde noch einmal dreimal 10 min mit PBS und TWEEN die PVDF-Membran gewaschen.

Als nächstes wurde die Elektrochemilumineszenz (ECL)-Lösung bestehend aus 5 ml ECL I und 5 ml ECL II auf die PVDF-Membran gegeben und für zwei min bei Dunkelheit inkubiert. Die Entwicklung und Auswertung wurde mit dem Imager (FluorChem® FC2, Alpha Innotech) durchgeführt.

2.2.3 Molekularbiologische Methode

2.2.3.1 Ribonukleinsäure-Isolation

Die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) erfolgte nach den Angaben des Herstellers Nucleo-Spin RNA II Kit von Macherey-Nagel. Die Zellen wurden auf Eis mit dem 350 µl Lysepuffer RA 1 (Macherey-Nagel) und 3,5 µl β-ME (Sigma-Aldrich) lysiert und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Das Isolieren von RNA erfolgte bei Raumtemperatur. Der nächste Schritt war das Filtrieren (11.000 x G, 1 min., RT) (Centrifuge 5418R, Eppendorf) des Zelllysates durch den Nucleo-Spin Filter (violetter Ring), um die Viskosität zu reduzieren und das Lysat aufzureinigen. Der violette Filter wurde anschließend verworfen und der Durchfluss mit 350 µl 70 %-igem Ethanol (70 % Ethanol, Sigma-Aldrich + 30 % Aqua, B. Braun) zum Homogenisieren gefüllt. Das Gemisch wurde 5 x auf und ab pipettiert. Anschließend musste die RNA gebunden werden. Dazu wurde die blaue Säule (Nucleo-Spin RNA II Column, Macherey-Nagel) verwendet. Diese wurde auf ein neues Röhrchen gesteckt und mit dem Gemisch aus Lysat und Ethanol gefüllt. Das Gemisch wurde zentrifugiert (11.000 x G, 30 sec, RT). Um die Membran zu trocknen und das Salz zu entfernen, wurde 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer, Macherey-Nagel) hinzugefügt und zentrifugiert (11.000 x G, 1 min, RT). Das Entfernen des Salzes erhöhte die Effektivität der im nächsten Schritt notwendigen rDNase (Macherey-Nagel). 95 µl rDNase-Reaktionsgemisch (10 µl rDNase + 95 µl Reaction Buffer for rDNase, Macherey-Nagel) wurde in das Zentrum der Membran in der blauen Säule pipettiert und für 15 Minuten inkubiert. Als nächstes wurde die Membran mit 200 µl RA 2 Puffer (Macherey-Nagel) (11.000 x G, 30 sec, RT), 600 µl RA 3 Puffer (Macherey-Nagel) (11.000 x G, 30 sec, RT) und 200 µl RA 3 Puffer (Macherey-Nagel) (11.000 x G, 2 min, RT) gewaschen und getrocknet. Zuletzt wurde die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser (Aqua, B. Braun) bei 11.000 x G für 1 min bei RT durch Zentrifugieren eluiert und in einem 1,5 ml Röhrchen (Eppendorf) aufgefangen.

Die RNA-Konzentrationsmessung erfolgte mit Hilfe eines Spektrometers (Nano-Drop, Thermo Scientific). Die RNA konnte anschließend bei -80 °C eingefroren werden.

2.2.3.2 Reverse Transkription – cDNA-Synthese

Aus der aufgereinigten RNA (total RNA) war es möglich, durch reverse Transkriptase komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) zu synthetisieren. Dazu wurde der High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet.

Inhalt

- 10 x RT Buffer
- 10 x RT Random Primers
- 25 x dNTP Mix (100 mM)
- MultiScribe™ Reverse Transcriptase
- RNase Inhibitor

Während des gesamten Vorganges wurde auf Eis und unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Zunächst wurde der Master Mix zusammenpipettiert.

Master Mix pro Reaktion

- 2 µl 10 x RT Buffer
- 2 µl 10 x RT Random Primers
- 0,8 µl dNTP Mix
- 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase
- 1 µl RNase Inhibitor

Da die RNA der verschiedenen Proben nach der Konzentrationsbestimmung unterschiedliche Konzentrationen aufwies, mussten diese mit unterschiedlicher Menge Wasser (Aqua, B.Braun) verdünnt werden, um die gleiche Menge an RNA (1 µg) im Reaktionsgemisch zu haben. Die Proben wurden so verdünnt, dass jedes Cap 1 µg RNA hatte. Die Menge der verdünnten Proben betrug 13,2 µl. Zu jeder verdünnten Probe wurde 6,8 µl Master Mix hinzugefügt. Das Gesamtvolumen betrug 20 µl.

Der Thermocycler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystem) wurde nach folgendem Programm (s. Tab. 11) eingestellt:

Tabelle 11: Einstellung des Thermocyclers für die cDNA-Synthese

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

Im Anschluss wurden die Proben bei -20 °C gelagert und konnten im nächsten Schritt mittels qPCR ausgewertet werden.

2.2.3.3 Quantitative Real Time Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

Die Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist eine quantitative Echtzeit-PCR mit der man durch Polymerase-Kettenreaktion Nukleinsäuren vervielfältigen und die gewonnene DNA quantifizieren kann.

Für dieses Verfahren wurde der Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies) verwendet. Bei diesem Arbeitsschritt wurde ausschließlich auf Eis und steril gearbeitet. Es wurden ausschließlich TaqMan-Sonden benutzt. Die cDNA der Proben wurde je nach TaqMan-Sonde zwischen 1:3 und 1:50 mit Aqua (B.Braun) verdünnt. Je Ansatz wurden 3,7 µl Aqua (B.Braun), 0,3 µl verdünnter Referenzfarbstoff (ROX reference dye; Verdünnung mit Aqua (B.Braun) 1:50), 10 µl 2 x QPCR und 1 µl TaqMan-Sonde in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen zu einem Mix zusammenpipettiert. In jedes Well (Thermo Scientific; AB-0900) wurden 15 µl Mix und 5 µl verdünnte cDNA hineingegeben.

Anschließend wurde die 96-Well-Platte mit einer Folie (Micro-Amp; Applied Biosystems) gut verschlossen. Ganz wichtig war das Durchmischen und Abzentrifugieren.

Als nächstes wurde die luftblasenfreie 96-Well-Platte in den Thermal-Cycler (7300 Real time PCR System, Applied Biosystems) gefahren und mit der dazugehörigen Software (7300 System Software, Applied Biosystems) mit folgender Einstellung gestartet (s. Tab. 12):

- Wiederholungen: 50
- Sample Volumen: 20 µl

Tabelle 12: Einstellung des Thermocyclers für die qPCR-Messung

Temperatur (°C)	95	95	60
Zeit (min:sec)	03:00	00:05	00:30

2.2.4 Transfektion

Die Transfektion beschreibt ein Verfahren, DNA oder RNA in eine eukaryotische Zelle einzufügen. Dies ermöglicht die Expression von ausgewählten Genen zu kontrollieren und auf ihre Funktion zu prüfen.

24 h vor dem OGD-/Normoxie-Versuch der cEND-2-Zellen mit Astrozyten-konditioniertem Medium wurde die Transfektion durchgeführt. Es wurde das RNAiFect Transfection Reagent Kit (Qiagen) verwendet. Small-interfering RNA (siRNA; mmu-miR-212-3p / hsa-miR-132-3p; Ambion Applied Biosystems), ein Inhibitor (hsa-miR-132 FI; Exiqon) und eine Negativ Kontrolle (Negative Control A; Exiqon) wurden verwendet. Die Transfektion wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Zunächst wurden der EC-Buffer (RNAiFect; Qiagen), siRNA/Negativ-Kontrolle/Family Inhibitor und das RNAiFect Transfections-Reagenz (RNAiFect; Qiagen) in dieser Reihenfolge in ein 1,5 µl – Röhrchen (Eppendorf) zusammenpipettiert. Das Gemisch wurde 10 sec durchmischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium auf den zu transfizierenden Zellen wurde abgesaugt und reduziertes Medium dazugegeben. Nach 15 min Verweildauer des Gemisches wurde dieses tröpfchenweise und unter leichtem Schwenken der Platte in das Medium gegeben. Anschließend wurde die Platte für 24 h in den Inkubator (37 °C; 5 % CO₂) gestellt.

Am Folgetag konnten unter dem Mikroskop die Effizienz der Transfektion und die Morphologie der Zellen beobachtet werden. Da die Negativ-Kontrolle einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, ist mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops die stattgefundene Transfektion nachweisbar.

2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung für optimale Transfektionsbedingungen

Für eine optimale Transfektion muss die Menge an microRNA und die Menge an Transfektionsreagenz an die jeweils verschiedenen Zellen angepasst werden. Dafür musste zunächst eine Konzentrationsreihe (s. Tab. 13) aufgestellt werden mit jeweils unterschiedlicher Menge der FAM-markierten Negativ Kontrolle A (s. Abschn. 2.1.4.4 Tab. 5) und unterschiedlicher Menge Transfektionsreagenz. 6-FAM ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer Absorptionswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 518 nm. 24 h nach der Transfektion wurde unter dem Mikroskop sowohl die Transfektionseffizienz anhand der Anzahl der fluoreszenzgefärbten Zellen im Verhältnis zu den nicht-gefärbten Zellen ermittelt als auch die Morphologie der Zellen, da eine zu hohe Konzentration toxisch auf die Zellen wirken kann.

Tabelle 13: Pipettierschema einer 24-Well-Platte bei cEND-2-Zellen

24-Well-Platte					
1:6		50 [nM]	100 [nM]	200 [nM]	300 [nM]
1) EC-Buffer	[μl]	99,2	98,4	96,8	95,2
2) Negative Control A (Exiqon)		0,8	1,6	3,2	4,8
3) RNAiFect Transfektions Reagent		1,5	3	6	9
1:12		50 [nM]	100 [nM]	200 [nM]	300 [nM]
1) EC-Buffer	[μl]	99,2	98,4	96,8	995,2
2) Negative Control A (Exiqon)		0,8	1,6	3,2	4,8
3) RNAiFect Transfektions Reagent		3	6	12	18
1:24		50 [nM]	100 [nM]	200 [nM]	300 [nM]
1) EC-Buffer	[μl]	99,2	98,4	96,8	95,2
2) Negative Control A (Exiqon)		0,8	1,6	3,2	4,8
3) RNAiFect Transfektions Reagent		6	12	24	36

2.2.4.2 Beobachtung Transfektionseffizienz mittels Mikroskopie

24 h nach Transfektion konnte unter dem Mikroskop (Olympus IX51) bei erfolgreicher Transfektion ein grünes Leuchten der fluoreszenz-markierten Zellen mittels FITC beobachtet und dokumentiert werden, da die Negativ Kontrolle A (miRCURY LNA family inhibitor; Exiqon) einen Fluoreszenzfarbstoff FITC enthält. Bei erfolgter Transfektion der gewünschten miRNAs konnte anschließend der OGD-/Normoxie-Versuch gestartet werden. Für die Transfektion der cEND-2-Zellen wurde das Schema in Tabelle 14 verwendet.

Tabelle 14: Pipettierschema der endgültigen Transfektion bei cEND-2

1:24		100 [nM]	
		24-Well (qPCR)	6-Well (Western Blot)
1) EC-Buffer	[μl]	98,4	472,3
2) siRNA		Insgesamt 1,6	Insgesamt 7,7
3) RNAiFect Transfektions Reagent		12	57,6
4) reduziertes Medium		700	3360

2.2.5 Bioelektrische und Permeabilitäts-Messung

Die cEND-2-Zellen wurden auf Gelatin-bedeckten Transwells für 24-Well-Platten (Falcon, Heidelberg, Germany) ausgesät. Diese erreichten die Konfluenz am 5. Tag. Ein Teil der Zellen wurde mit pre-miR-132/212 transfiziert, der andere Teil diente als Kontrolle (Scr). Es wurde der Normoxie-Versuch durchgeführt mit 4 h + 24 h. Anschließend wurden der Widerstand (TEER) und danach die Permeabilität mit FITC-Dextran gemessen.

TEER (Bioelektrische Messung)

TEER steht für den transepithelialen elektrischen Widerstand von Zellen und wird in $\Omega \times \text{cm}^2$ angegeben. Ein hoher elektrischer Widerstand steht für eine niedrige Permeabilität und damit für eine hohe Dichte der Zell-Zell-Kontakte und für eine intakte Barrierefunktion der BHS. Mit einem Instrument von World Precision Instruments (New Haven, CT, USA) wurde der Widerstand gemessen. Der Widerstand von blanken Filtern wurde von den Filtern mit Zellen abgezogen bevor der endgültige Widerstand (Ωcm^2) kalkuliert werden konnte.

Permeabilitätsmessung (FITC-Dextran)

Zur Messung der Dichte der Zell-Zell-Kontakte der Hirnendothelzellen cEND-2 nach Transfektion mit pre-miRNA-132/212 wurde die Zellpermeabilität mittels FITC-Dextran durchgeführt. FITC-Dextran ist ein 4 kDa großes Molekül, das bei Schäden des Zellrasens und der damit verbundenen schlechteren Dichte vermehrt durch die Zellen hindurch wandern kann. Gemessen wird letztendlich, wie viel FITC-Dextran nach der Transfektion durch die cEND-2-Zellen durchgelassen wurde. Die Fluoreszenz wurde mit Wallac Victor2 Fluoreszenz-Spektrophotometer (Perkin-Elmer, Überlingen, Deutschland) gemessen.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Excel von Microsoft Office. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde T-Test angewandt. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 angenommen. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der OGD-Bedingungen: Einfluss von Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium auf die Expression von diversen Blut-Hirn-Schranke-assoziierten Genen

Zur Analyse der Proteinexpression von diversen BHS-assoziierten Proteinen in den cEND-2-Zellen in der OGD wurde die qPCR angewandt. Verschiedene BHS-Proteine wurden ausgetestet für die Etablierung des OGD-Versuchs. Des Weiteren wurde zur Etablierung des Versuches gezeigt, welchen Effekt Astrozyten-(C6-)konditioniertes Medium auf die BHS-Proteine haben. Zur Kontrolle diente die Normoxie-Probe, die bei der Auswertung auf 1 gesetzt wurde.

Untersucht wurden 14 verschiedene Proteine. Dazu zählten Aquaporin1 (AQP1), Claudin1 (Cldn1), Claudin5 (Cldn5), Glucosetransporter1 (Glut1), Angiopietin2 (ANGPT2), Angiopietin1 (ANGPT1), TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinases-3), Tjap1 (tight junction associated protein), Jam2 (Junctional adhesion molecule 2), Jam3 (Junctional adhesion molecule 3), ANGPTL4 (Angiopietin-like 4), Tjp1 (ZO1; Tight junction protein 1), MMP3 (Matrix metalloproteinase3) und MMP9 (Matrix metalloproteinase9). In den meisten Fällen konnte eine reduzierte Proteinexpression bereits nach 4 h OGD an den cEND-2-Zellen festgestellt werden. In Anwesenheit von Astrozyten- (C6-)konditioniertem Medium konnte zum Teil ein deutlicherer Effekt in der OGD dokumentiert werden.

Tight Junctions

Bei den TJs konnte überwiegend eine stärkere Herabregulation der Genexpression nach OGD mit Reoxygenierung festgestellt werden (s. Abb. 10). So zeigte Jam2 mit Zusatz von Astrozyten-Medium nach 4 h OGD eine Reduktion um 35 % ($0,65 \pm 0,05$) und nach Reoxygenierung sogar um 48 % ($0,52 \pm 0,16$). Ähnlich zeigte sich Jam3 in der OGD mit Astrozyten-Medium. Nach 4 h OGD wurde die Genexpression um 19 % ($0,81 \pm 0,06$) und nach Reoxygenierung um 35 % ($0,65 \pm 0,12$) gesenkt. Tjap1 zeigte ebenfalls eine Genexpressions-suppression in OGD bei Zugabe von Astrozyten-Medium. Diese betrug nach 4 h OGD 18 % ($0,82 \pm 0,29$) und nach Reoxygenierung nur 8 % ($0,92 \pm 0,17$). Cldn1 und Cldn5 zeigten in den OGD-Versuchen ohne Astrozyten-Medium eine stärkere Herabregulation der Genexpression nach Reoxygenierung. Bei Cldn1 nach 24 h Reoxygenierung eine Reduktion um 55 % ($0,45 \pm 0,01$) und bei Cldn5 um 26 % ($0,74 \pm 0,23$). Tjp1 (ZO1) zeigte erst in der OGD mit 24 h Reoxygenierung und mit Astrozyten-Medium eine Runterregulation der mRNA auf $0,63 (\pm 0,02)$.

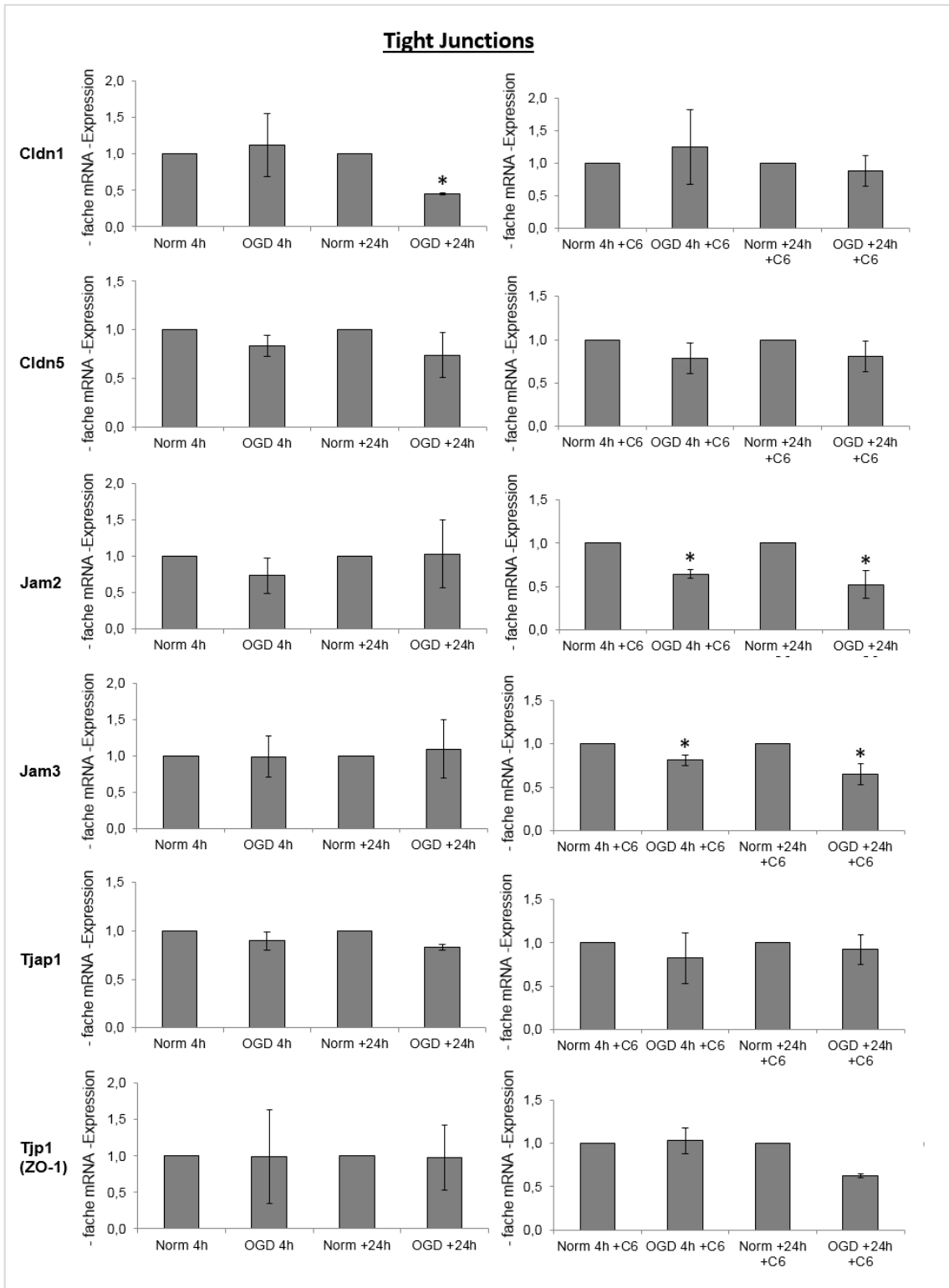


Abbildung 10: Etablierung der OGD-Bedingungen - Einfluss von Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium auf die mRNA-Expression von Tight Junctions

4 h Normoxie und 4 h OGD im Vergleich. 4 h Normoxie/+24 h und 4 h OGD/+24 h Reoxygenierung im Vergleich. Zusätzlich Effekt von konditioniertem C6-Medium in der Normoxie und OGD. T-Test * $p < 0,05$

Matrixmetalloproteinasen und Metalloproteinaseninhibitor

Die Matrixmetalloproteinasen MMP3 und MMP9 sowie TIMP3 als Metalloproteinaseninhibitor wiesen eine Reduktion der mRNA-Expression sowohl nach 4 h OGD als auch nach 24 h Reoxygenierung auf (s. Abb. 11). Nach 4 h OGD war diese Reduktion mit Astrozyten-Medium deutlicher. Bei 24 h Reoxygenierung spielte es keine Rolle, ob Astrozyten-Medium dazugegeben wurde oder nicht. TIMP3-mRNA-Expression konnte eine Reduktion um 9 % ($0,91 \pm 0,29$) nach 4 h mit Astrozyten-Medium und um 27-25 % nach 24 h Reoxygenierung mit ($0,75 + 0,09$) oder ohne ($0,73 + 0,34$) Astrozyten-Medium gemessen werden. MMP3 zeigte die stärkste Suppression der mRNA-Expression bei 24 h Reoxygenierung nach 4 h OGD ohne Astrozyten-Medium ($0,57 \pm 0,08$). Mit Astrozyten-Medium ergab die mRNA-Expression nur eine Reduktion nach 24 h Reoxygenierung um 11 % ($0,89 \pm 0,58$). Bei MMP9 wurde die stärkste Reduktion der mRNA um 44 % ($0,56 \pm 0,19$) nach 24 h Reoxygenierung ohne Astrozyten-Medium gemessen.

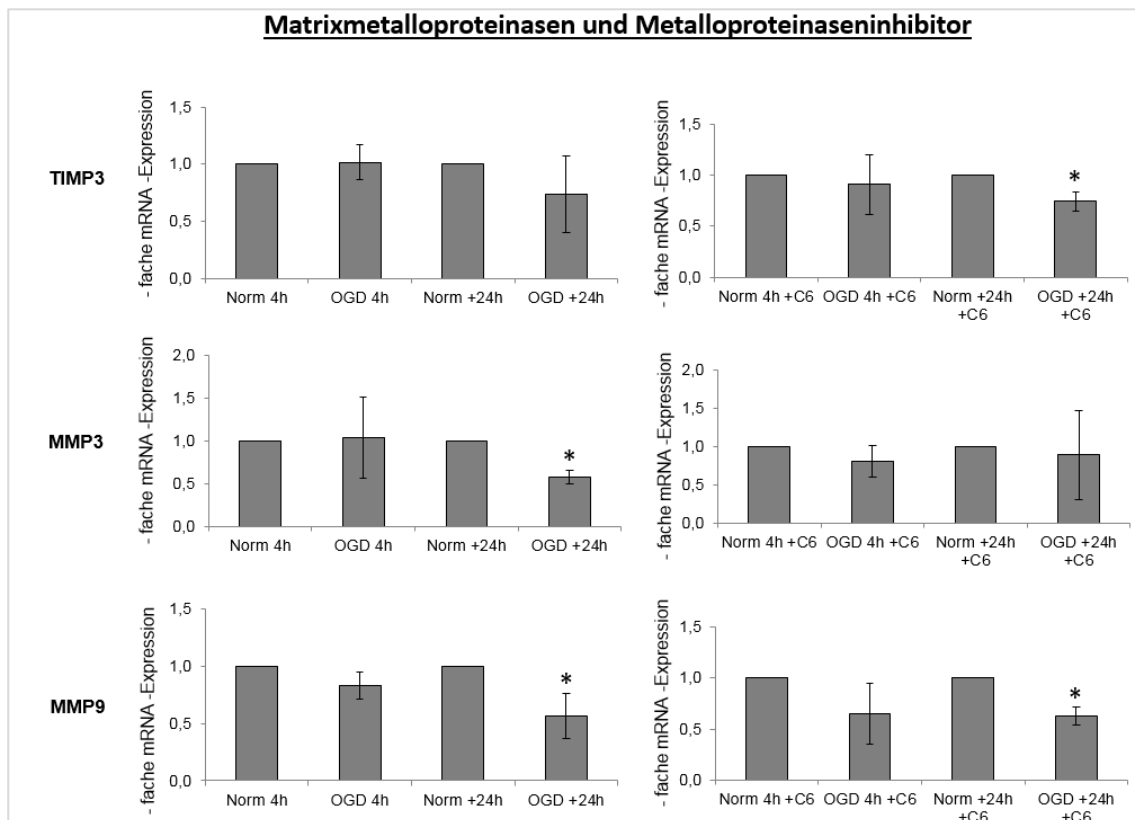


Abbildung 11: Etablierung der OGD-Bedingungen - Einfluss von C6-konditioniertem Medium auf die mRNA-Expression von Matrixmetalloproteinasen und Metalloproteinaseninhibitor

4 h Normoxie und 4 h OGD im Vergleich. 4 h Normoxie/+24 h und 4 h OGD/+24 h Reoxygenierung im Vergleich. Zusätzlich Effekt von konditioniertem C6-Medium in der Normoxie und OGD. T-Test * $p < 0,05$

Transportproteine

Glucosetransporter (Glut1) und Aquaporin1 (AQP1) wurden als Transportproteine untersucht (s. Abb. 13). Glut1-mRNA war nach 4 h OGD ohne Astrozyten-Medium am stärksten hochreguliert, nämlich um das 8,36-fache ($8,36 \pm 0,53$), mit Astrozyten-Medium nur um das 5,8-fache ($5,8 \pm 2,0$). Nach 24 h Reoxygenierung zeigte sich mit Astrozyten-Medium nur ein Anstieg um das 1,19-fache ($1,19 \pm 0,46$). AQP1 war in allen Zeiten der OGD und sowohl mit als auch ohne Astrozyten-Medium herabreguliert. Am stärksten war der Abfall der mRNA-Expression bei Gabe von Astrozyten-Medium. Nach 4 h OGD mit Astrozyten-Medium konnte eine Runterregulierung um bis zu 43 % ($0,57 \pm 0,24$) und nach OGD mit Astrozyten-Medium und mit 24 h Reoxygenierung um bis zu 50 % ($0,5 \pm 0,21$) gemessen werden.

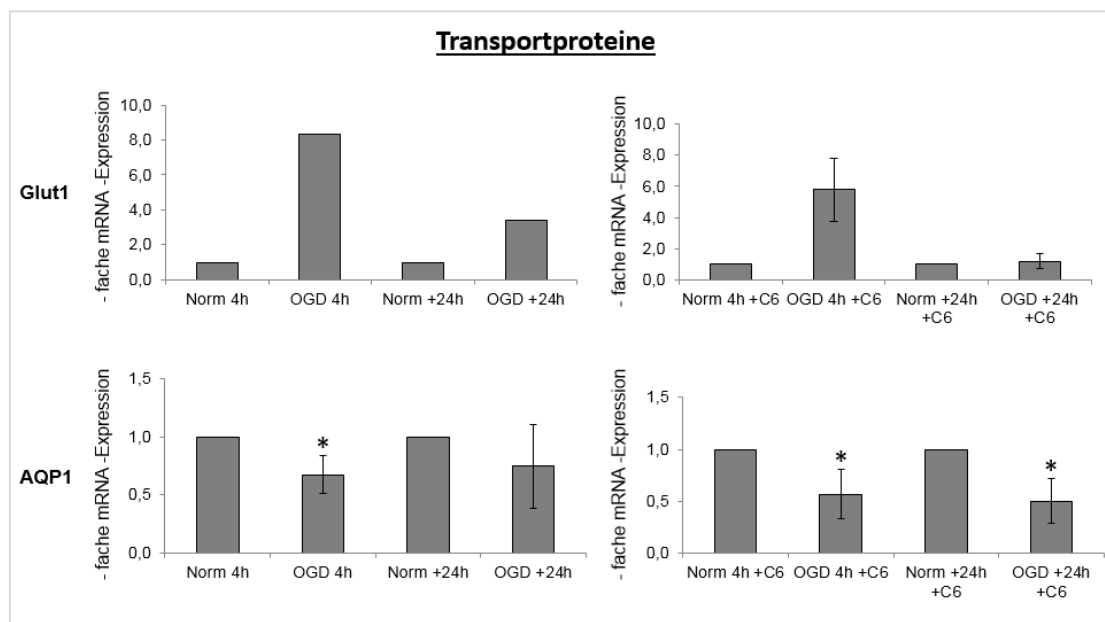


Abbildung 13: Etablierung der OGD-Bedingungen - Einfluss von C6-konditioniertem Medium auf die mRNA-Expression von Transportproteinen

4 h Normoxie und 4 h OGD im Vergleich. 4 h Normoxie/+24 h und 4 h OGD/+24 h Reoxygenierung im Vergleich. Zusätzlich Effekt von konditioniertem C6-Medium in der Normoxie und OGD

T-Test * $p < 0,05$

3.2 MicroRNA-132/212 induzierte Regulation der Zielgene in murinen cEND-2-Zellen

3.2.1 Etablierung der Transfektionsbedingungen: Bestimmung der Konzentration des Transfektionsreagenzes und der miRNA-Imitatoren und -Inhibitoren

Für eine optimale Transfektion müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen ist die Menge des Transfektionsreagenzes und die Menge an miRNA von entscheidender Bedeutung, da eine zu hohe Menge Transfektionsreagenz zytotoxisch auf die murinen Hirnendothelzellen wirken und eine zu geringe Menge unter Umständen ein Einbau in die Zelle unmöglich macht. Bei zu wenig Transfektionsreagenz wird nur ein geringer Teil der Zellen mit miRNA transfiziert (s. Abb. 14 A + C). Bei einer hohen Konzentration an Transfektionsreagenz und miRNA leuchten zwar sehr viele fluoreszenz-markierte Zellen hellgrün auf (s. Abb. 14 G + I), in der einfachen Mikroskopie (s. Abb. 14 H + I) jedoch ist ein Zelluntergang vieler Zellen zu beobachten.

Das beste Ergebnis lieferte das Verhältnis Transfektionsreagenz zu miRNA 1:24 und eine miRNA-Menge von 100 nM (s. Abb. 14 E + F). Bei dieser Konstellation ist die Morphologie der Zellen nicht verändert und ein Großteil der Zellen ist transfiziert.

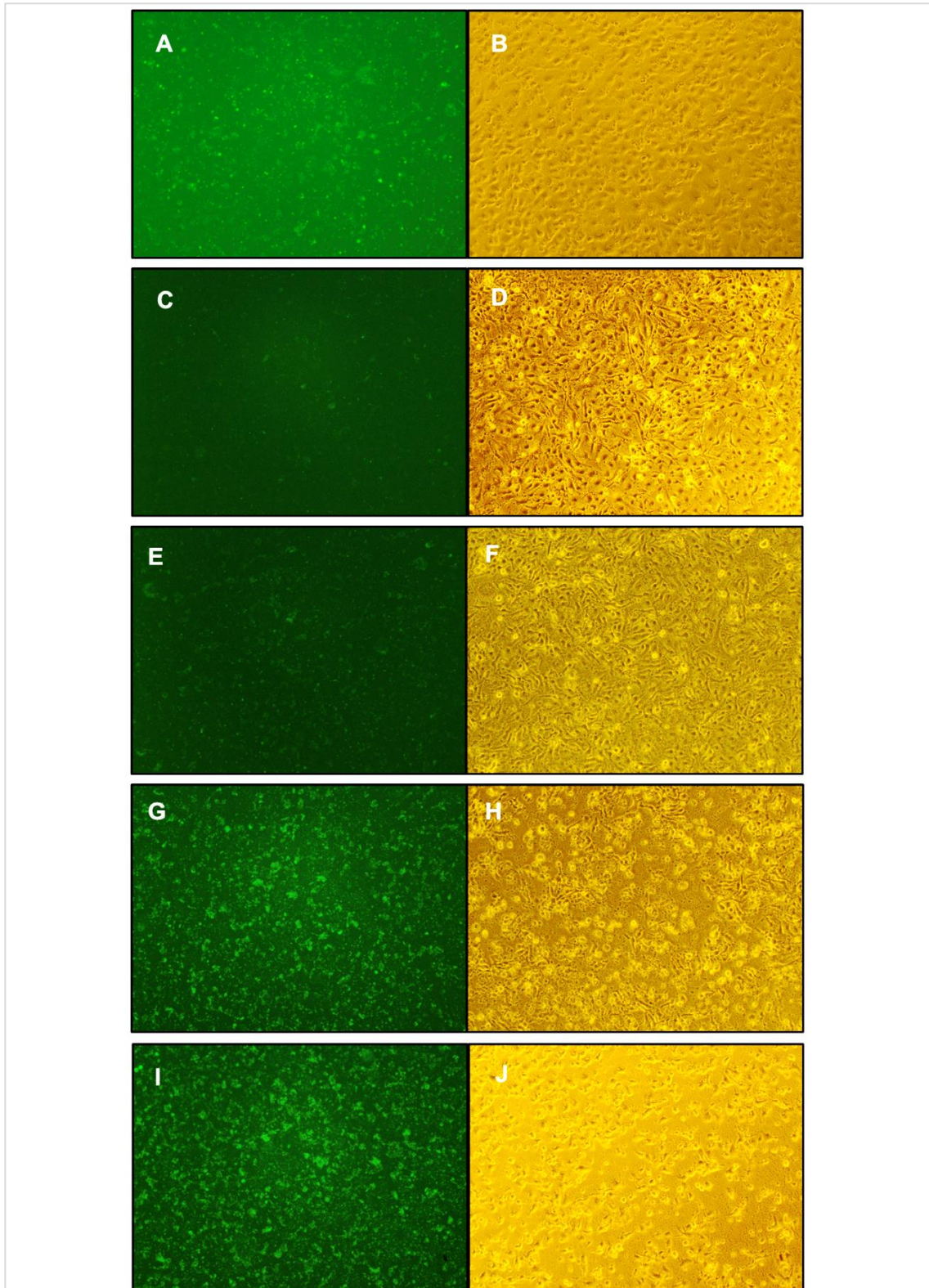


Abbildung 14: Konzentrationsbestimmung an cEND-2

Mikroskopie 24 h nach Transfektion (10-fache Vergrößerung) **A)** Verhältnis Transfektionsreagenz zu miRNA 1:12; miRNA 300 nM; FAM-Fluoreszenz 488 nm/518 nm **B)** 1:12; 300 nM **C)** 1:24; 50 nM; FAM **D)** 1:24; 50 nM **E)** 1:24; 100 nM; FAM **F)** 1:24; 100 nM **G)** 1:24; 200 nM; FAM **H)** 1:24; 200 nM **I)** 1:24; 300 nM; FAM **J)** 1:24; 300 nM

3.2.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz in den cEND-2-Zellen

Die FAM-Detektion im Fluoreszenz-Mikroskop diente der Feststellung einer erfolgreichen Transfektion von FAM-markierten miRNA in cEND-2-Zellen (s. Abb. 15). Diese wurde 24 h nach Transfektion durchgeführt. Das hellgrüne Aufleuchten der Zelle war das Signal für die Aufnahme der miRNA in die Zelle. Die cEND-2-Zellen wiesen eine Transfektionseffizienz von mehr als 50 % auf. Die Morphologie der Zellen ist intakt und es ist keine zytotoxische Wirkung des Transfektionsreagenz an den Zellen zu erkennen.

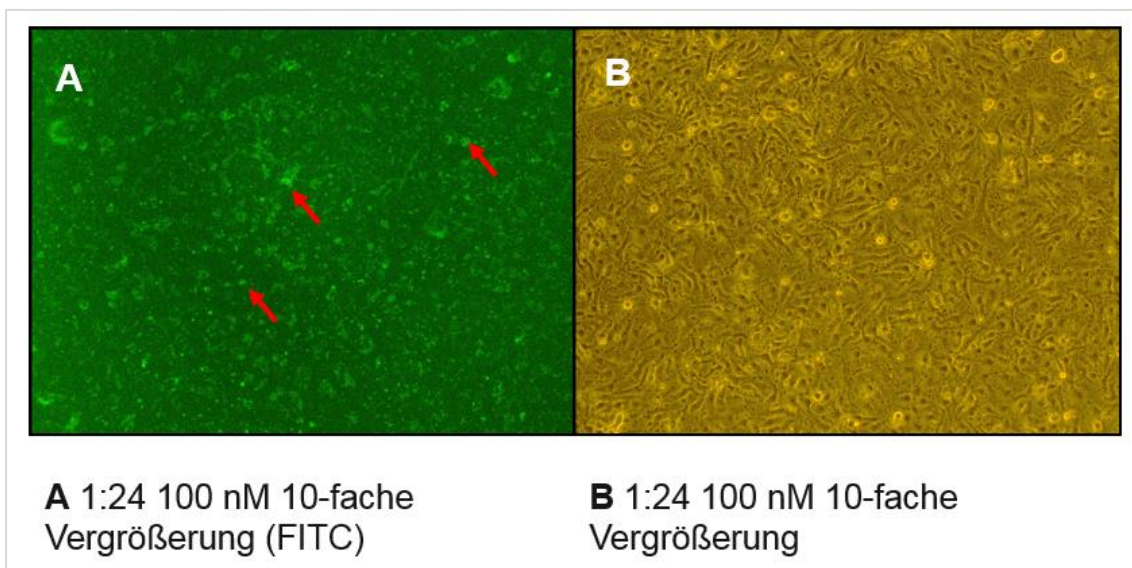


Abbildung 15: cEND-2 24 h nach Transfektion (Negativ Kontrolle A)

1:24 Verhältnis Transfektionsreagenz zu miRNA (100 nM); **A**) FAM-Fluoreszenz 488 nm/518 nm; transfizierte Zellen – hellgrün; rote Pfeile – Beispiele für transfizierte Zellen **B**) durchsichtig; intakte cEND-2-Zellen

3.2.3 Einfluss von miRNA-132 und miRNA-212 auf ausgewählte Zielgene in cEND-2

Cldn1, Tjap1, Jam3 und MMP9 wurden mittels Computeranalysen und Luciferaseassays als direkte miRNA-132/212 Zielgene in der Arbeitsgruppe Förster bestätigt. Untersucht wurde die Rolle der pre-miRNA-132/212 (Precursor microRNA) auf deren Zielgene in der BHS Cldn1, Tjap1, MMP9 und Jam3. Dabei schaute man sich die Expression der Gene nach 4 h OGD bzw. 4 h OGD + 24 h Reoxygenierung und 4 h Normoxie bzw. 4 h + 24 h Normoxie in cEND-2-Zellen an. Veranschaulicht wurden die Resultate auf mRNA-Ebene mittels qPCR und auf Proteinebene mittels Western Blot.

Pre-miRNA-132/212 regulieren die Expression der Zielgene herunter. Anti-miRNA-132/212 inhibieren die miRNA-132/212, die vermehrt in der OGD gebildet werden, und führen somit zum Anstieg der Expression der Zielgene (s. Abb. 16). In einem Teil der cEND-2-Zellen wurde pre-miRNA-132/212 transfiziert und 24 h später der Normoxie-Versuch durchgeführt.

Für den OGD-Versuch wurden 24 h zuvor anti-miRNA-132/212 in die cEND-2-Zellen transfiziert. Anschließend folgte ein Sauerstoff-Glucose-Entzug über 4 h mit bzw. ohne Reoxygenierung. Alle Transfektionsversuche wurden mit Astrozyten-konditioniertem Medium durchgeführt. Als Kontrolle diente die Negativ-Kontrolle-A.

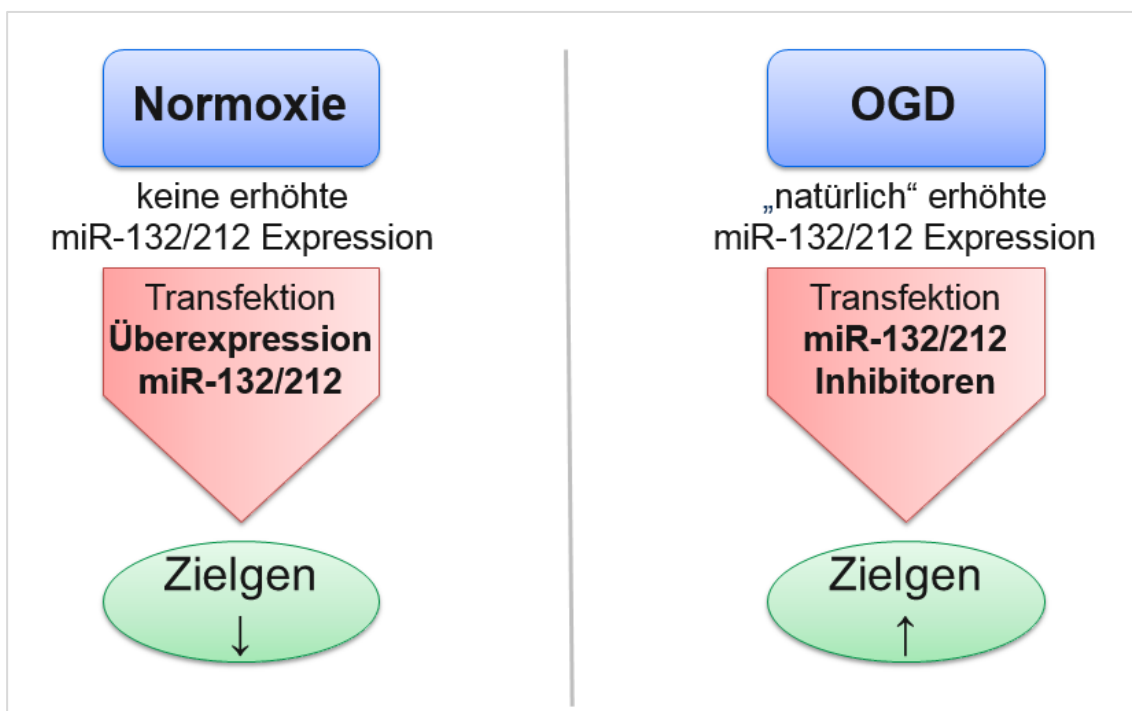


Abbildung 16: Versuchsaufbau der Transfektion von miR-132/212 (eigene Darstellung)

3.2.3.1 Regulation des Zielgens Claudin1 durch miRNA-132/212

Cldn1 wurde als eine integrale Komponente der Zell-Zell-Kontakte in der BHS im Jahre 1998 identifiziert (Furuse *et al.*, 1998). Ein Verlust von Cldn1 wird in vielen Krankheitsprozessen beobachtet, wie zum Beispiel bei Tumoren, beim Schlaganfall oder bei Entzündung (Liebner *et al.*, 2000a, Liebner *et al.*, 2000c, Lippoldt *et al.*, 2000).

Regulation von Claudin1 auf mRNA-Ebene

Sowohl direkt nach 4 h Normoxie als auch in den Versuchen mit anschließender 24-stündiger Normoxie konnte in den murinen cEND-2-Zellen eine Herabregulation von Claudin1 auf mRNA-Ebene durch vermehrtes Angebot an miRNA-132/212 erreicht werden (s. Abb. 17). Hierbei war die mRNA-Menge 4 h und weiteren 24 h nach Transfektion um 23 % ($0,77 \pm 0,21$) gesunken, während nach 4 h die mRNA-Menge um 24 % ($0,76 \pm 0,14$) herabreguliert war.

In den Versuchen mit 4-stündigem Sauerstoffentzug konnte sowohl direkt nach 4 h OGD als auch nach zusätzlicher 24 h-Reoxygenierung bei Zugabe von anti-miR-132/212, die miRNA-132/212 abfangen sollen bzw. mit dem Zielgen um die gebildeten miRNAs konkurrieren, ein Anstieg der mRNA-Expression von Cldn1 ermittelt werden. Direkt nach 4 h OGD konnte ein Anstieg von mRNA-Cldn1 um 19 % ($1,19 \pm 0,46$) und nach anschließender 24 h Reoxygenierung um 39 % ($1,39 \pm 0,30$) erreicht werden.

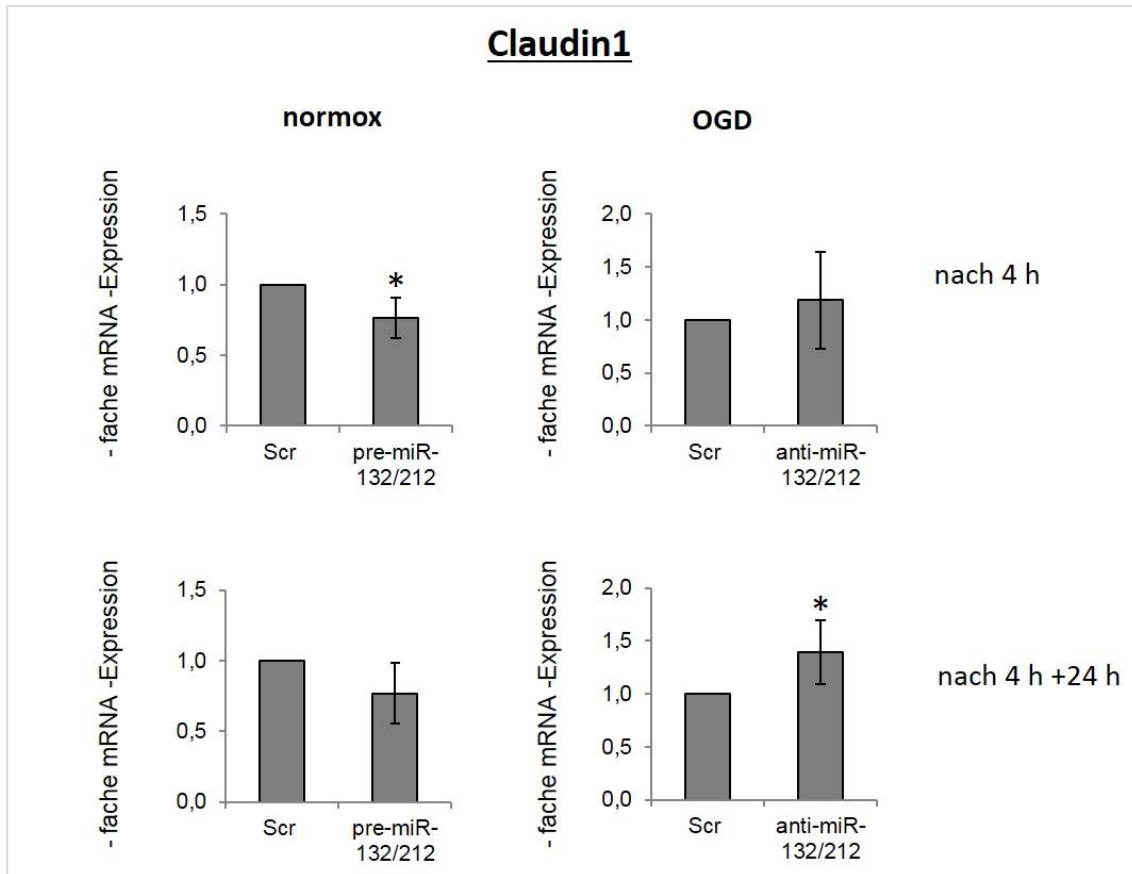


Abbildung 17: Claudin1-mRNA-Expression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

cEND-2-Zellen wurden mit pre- oder anti-miR-132/212 transfiziert. Die anti-miR-132/212 transfizierten Zellen wurden für 4 h unter OGD-Bedingungen mit oder ohne 24 h Reoxygenierung kultiviert, gefolgt durch Claudin1 mRNA-Expressionsanalyse.

Scr – Scrambled, Kontrolle; pre-miR-132/212 – precursor miR-132/212; anti-miR-132/212 – Inhibitor
T-Test * $p < 0,05$

Regulation von Claudin1 auf Proteinebene

Die Effekte von miR-132/212 und anti-miR-132/212 auf mRNA-Ebene konnten auch auf Proteinebene weitestgehend bestätigt werden. Bei den Versuchen mit Normoxie konnte ebenfalls sowohl nach 4 h ($0,72 \pm 0,24$) als auch nach 4 h + 24 h ($0,61 \pm 0,04$) ein Abfall von Cldn1 bei vermehrtem Angebot von miR-132/212 detektiert werden (s. Abb. 18). Anders als auf mRNA-Ebene konnte die Inhibition der in der OGD entstandenen miRNA-132/212 durch anti-miR-132/212 nur nach 4 h Sauerstoffentzug bestätigt werden und dies auch nur mit einem kleinen Anstieg des Proteins ($1,09 \pm 0,41$).

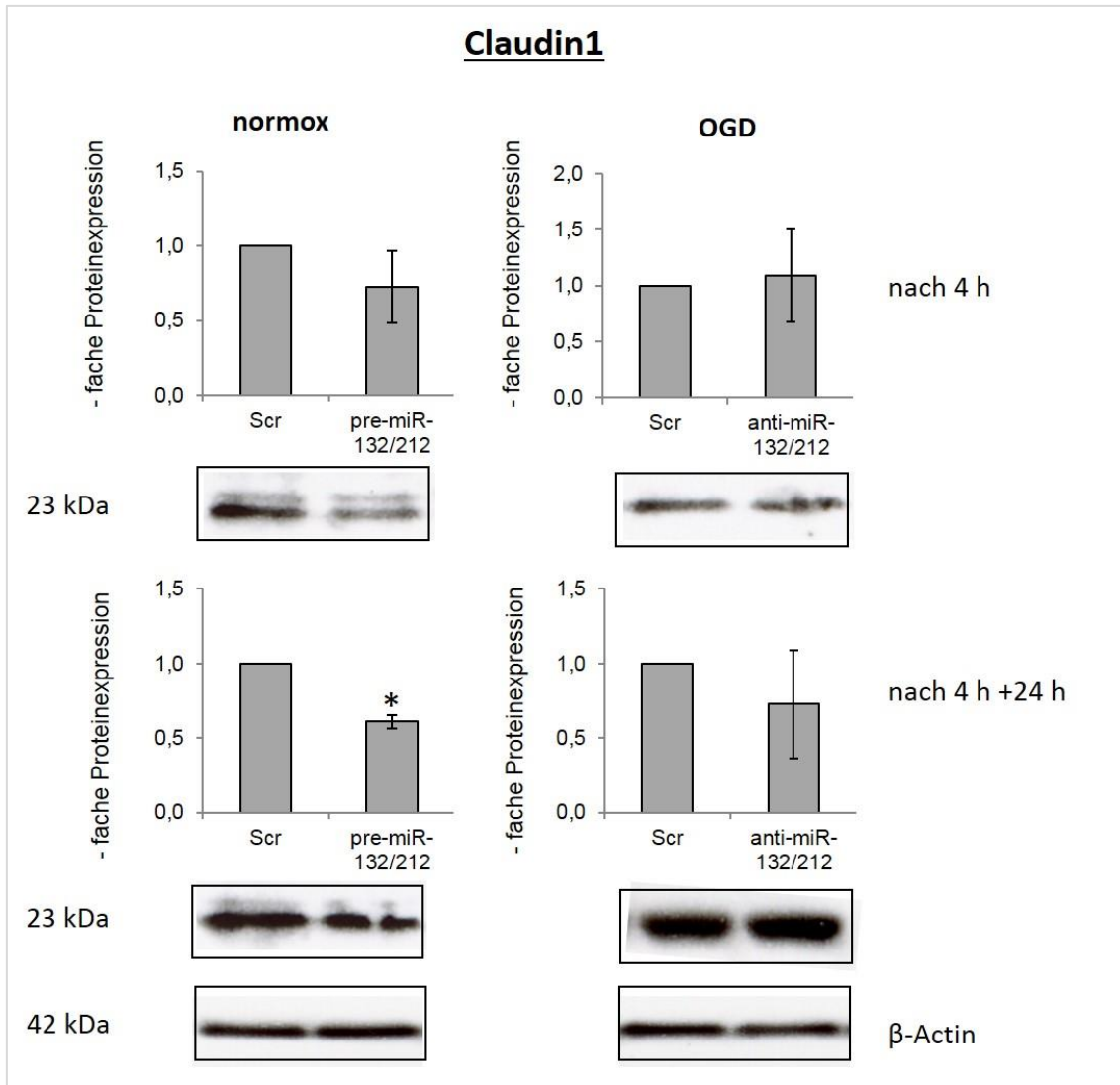


Abbildung 18: Claudin1-Proteinexpression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen

cEND-2-Zellen wurden mit pre- oder anti-miR-132/212 transfiziert. Die anti-miR-132/212 transfizierten Zellen wurden für 4 h unter OGD-Bedingungen mit oder ohne 24 h Reoxygenierung kultiviert, gefolgt durch Claudin1 Proteinexpressionsanalyse.

Scr – Scrambled, Kontrolle; pre-miR-132/212 – precursor miR-132/212; anti-miR-132/212 – Inhibitor

Actb - Actin-β, Ladekontrolle; T-Test * p < 0,05

3.2.3.2 Regulation des Zielgens *Tjap1* durch miRNA-132/212Regulation von *Tjap1* auf mRNA-Ebene

Tjap1 konnte die stärkste Suppression durch zusätzliche Transfektion von pre-miR-132/212 auf mRNA-Ebene aufweisen (s. Abb. 19). Unter normoxischen Bedingungen konnte nach 4 h ein Abfall um bis zu 30 % ($0,7 \pm 0,16$) und nach weiteren 24 h sogar um 50 % ($0,5 \pm 0,10$) beobachtet werden. In den Zellen, die mit anti-miR-132/212 transfiziert und unter hypoxischen Bedingungen kultiviert waren, konnte der starke Abfall des *Tjap1* Proteins verhindert werden. Die Effekte waren eindeutiger nach 4 h als nach 4 h+ 24 h. Somit konnte eine Stabilisierung der Barriere erreicht werden.

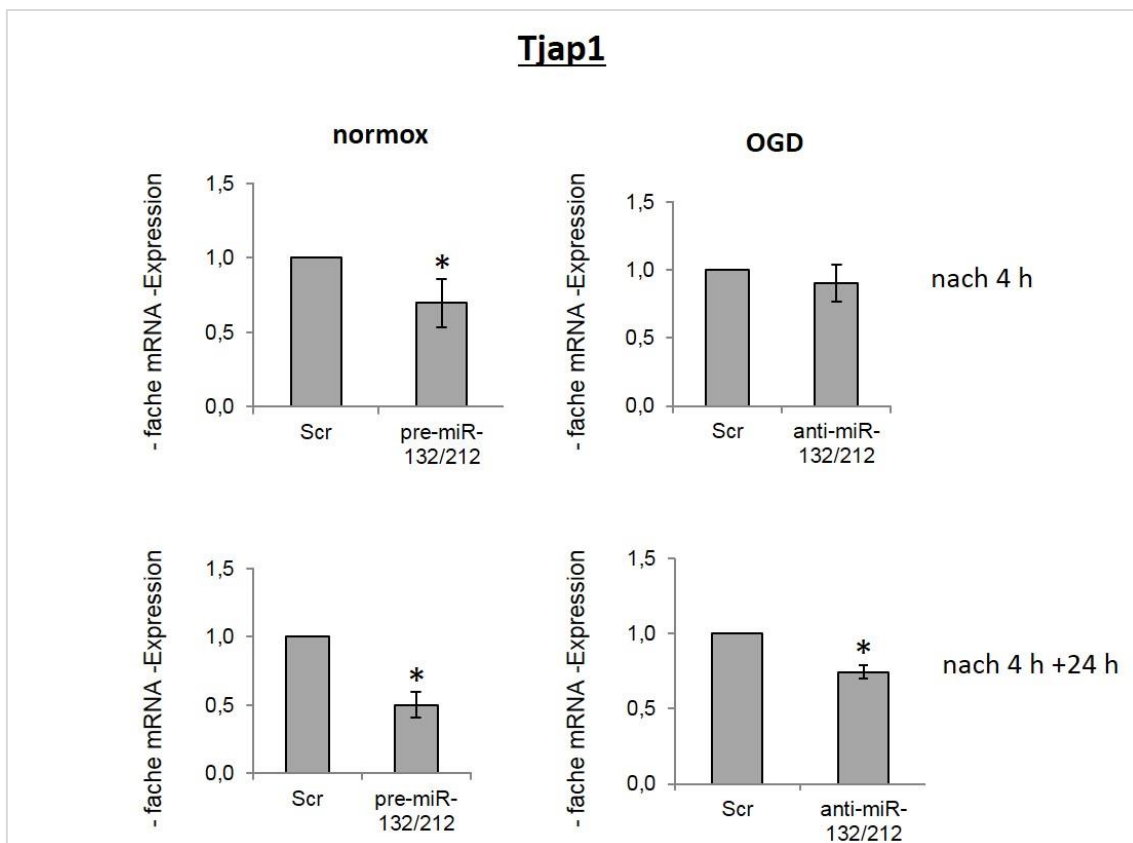


Abbildung 19: *Tjap1*-mRNA-Expression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen

cEND-2-Zellen wurden mit pre- oder anti-miR-132/212 transfiziert. Die anti-miR-132/212 transfizierten Zellen wurden für 4 h unter OGD-Bedingungen mit oder ohne 24 h Reoxygenierung kultiviert, gefolgt durch *Tjap1* mRNA- Expressionsanalyse.

Scr – Scrambled, Kontrolle; pre-miR-132/212 – precursor miR-132/212; anti-miR-132/212 – Inhibitor
T-Test * $p < 0,05$

Regulation von Tjap1 auf Proteinebene

Auch bei den Versuchen mit Western Blot konnte eine relativ starke Suppression von Tjap1 unter normoxischen Bedingungen bei Überexpression von miR-132/212 erreicht werden und damit die hemmende Wirkung der miRNA auf die Tjap1-mRNA bestätigen (s. Abb. 20). Nach 4 h konnte bei den Versuchen mit transfizierten pre-miR-132/212 eine Abnahme des Proteins Tjap1 um 36 % ($0,64 \pm 0,05$) gemessen werden und in den Zellen nach weiteren 24 h um 52 % ($0,48 \pm 0,09$). Bei OGD konnte ebenfalls wie in den qPCR-Auswertungen kein Anstieg der Proteinexpression ermittelt werden. Die Proteinmenge von Tjap1 blieb überwiegend auf dem Ausgangsniveau, somit konnte der inhibitorische Effekt von miR-132/212, die durch hypoxische Bedingungen induziert werden, durch transfizierte anti-miR-132/212 geblockt werden und damit ebenfalls eine Stabilisierung der Barriere erreicht werden. Bei Transfektion von anti-miR-132/212 nach 4h OGD nahm die Genexpression um 11 % ($0,89 \pm 0,18$) und nach anschließender Reoxygenierung um 2 % ab ($0,98 \pm 0,45$).

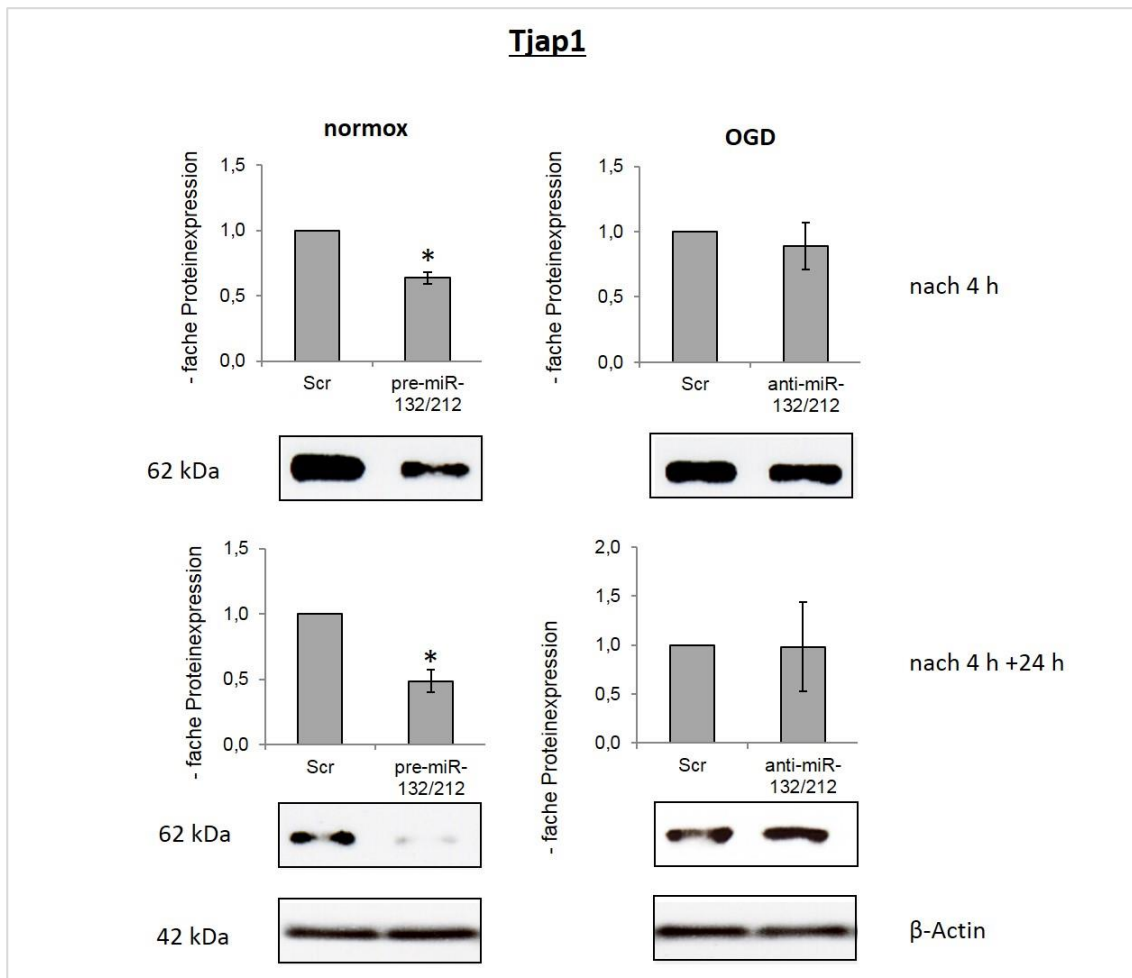


Abbildung 20: Tjap1-Proteinexpression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen

cEND-2-Zellen wurden mit pre- oder anti-miR-132/212 transfiziert. Die anti-miR-132/212 transfizierten Zellen wurden für 4 h unter OGD-Bedingungen mit oder ohne 24h Reoxygenierung kultiviert, gefolgt durch Tjap-1 Proteinexpressionsanalyse.

Scr – Scrambled, Kontrolle; pre-miR-132/212 – precursor miR-132/212; anti-miR-132/212 – Inhibitor Actb - Actin- β , Ladekontrolle; T-Test * $p < 0,05$

3.2.3.3 Regulation des Zielgens Jam3 durch miRNA-132/212

Jam3 wird vor allem in den Gefäßen und in der BHS exprimiert und ist involviert in die Zell-Zell-Adhäsion und Monozytentransmigration durch die BHS (Aurrand-Lions *et al.*, 2001b).

Regulation von Jam3 auf mRNA-Ebene

Die mRNA-Expression von Jam3 konnte bei Transfektion von pre-miR-132/212 und damit bei einem Anstieg des miR-132/212-Angebots deutlich gesenkt werden

(s. Abb. 21). Nach 4 h unter Raumluftbedingungen zeigte sich eine Abnahme um 17 % ($0,83 \pm 0,04$) und nach 24 h sogar um 25 % ($0,75 \pm 0,23$). Bei 4 h OGD wurde ein leichter Anstieg der mRNA-Genexpression von Jam3 um das 1,01-fache ($1,01 \pm 0,03$) bei Transfektion von anti-miR-132/212 gemessen. Nach anschließender 24-stündiger Reoxygenierung stieg dieser Wert sogar um das 1,3-fache ($1,3 \pm 0,18$).

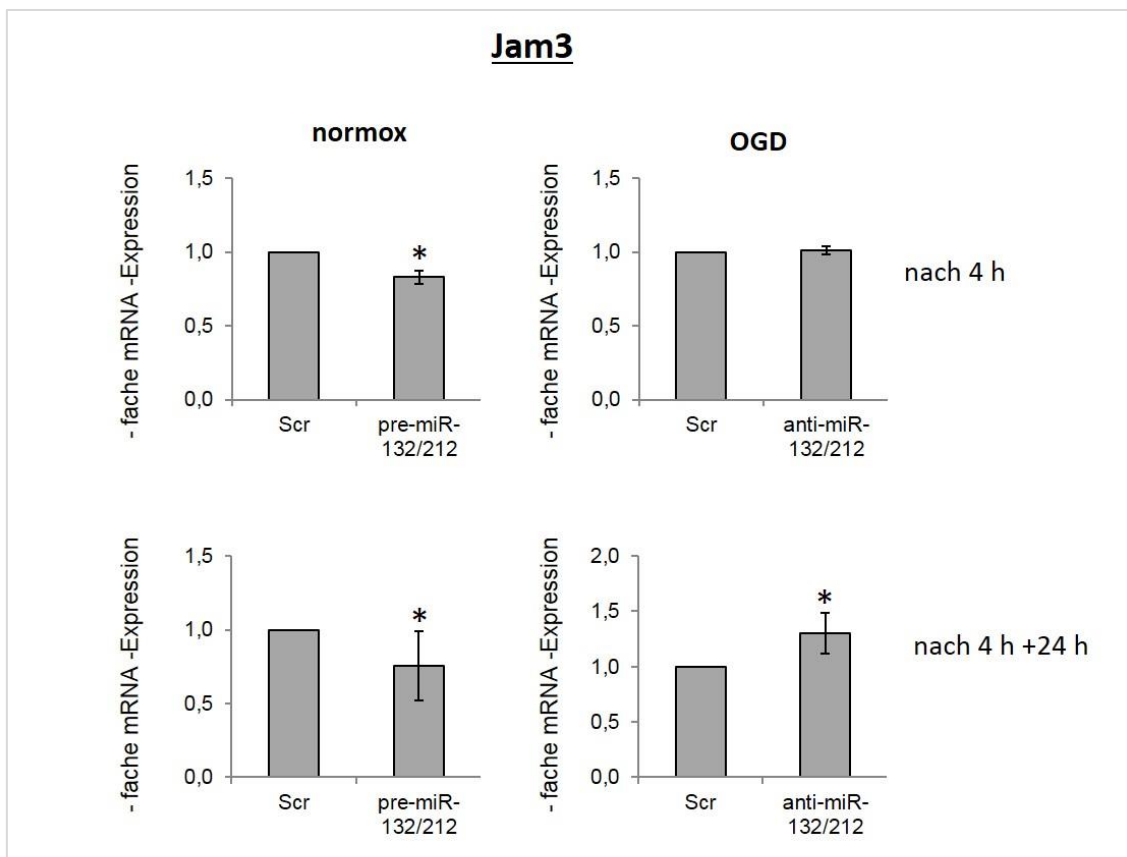


Abbildung 21: Jam3-mRNA-Expression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen

cEND-2-Zellen wurden mit pre- oder anti-miR-132/212 transfiziert. Die anti-miR-132/212 transfizierten Zellen wurden für 4 h unter OGD-Bedingungen mit oder ohne 24 h Reoxygenierung kultiviert, gefolgt durch Jam3 mRNA- Expressionsanalyse.

Scr – Scrambled, Kontrolle; pre-miR-132/212 – precursor miR-132/212; anti-miR-132/212 – Inhibitor T-Test * $p < 0,05$

Regulation von Jam3 auf Proteinebene

Auf Proteinebene konnte in der Normoxie der stärkste Effekt 4 h + 24 h nach Transfektion gemessen werden (s. Abb. 22). Nach 4 h bei Normoxie und Zugabe von pre-miR-132/212 ging die Jam3-Expression um 21 % ($0,79 \pm 0,22$) und bei weiteren 24 h sogar um 39 % ($0,61 \pm 0,09$) herunter. Dieses Ergebnis bestätigt, dass durch vermehrtes

Angebot von miRNA die mRNA-Genexpression reduziert wird. Nach 4 h OGD nach Transfektion mit anti-miR-132/212 fiel die Proteinexpression zwar um 3 % ($0,97 \pm 0,08$), doch nach anschließender 24-stündiger Reoxygenierung stieg diese im Durchschnitt um das 1,86-fache ($1,86 \pm 2,00$).

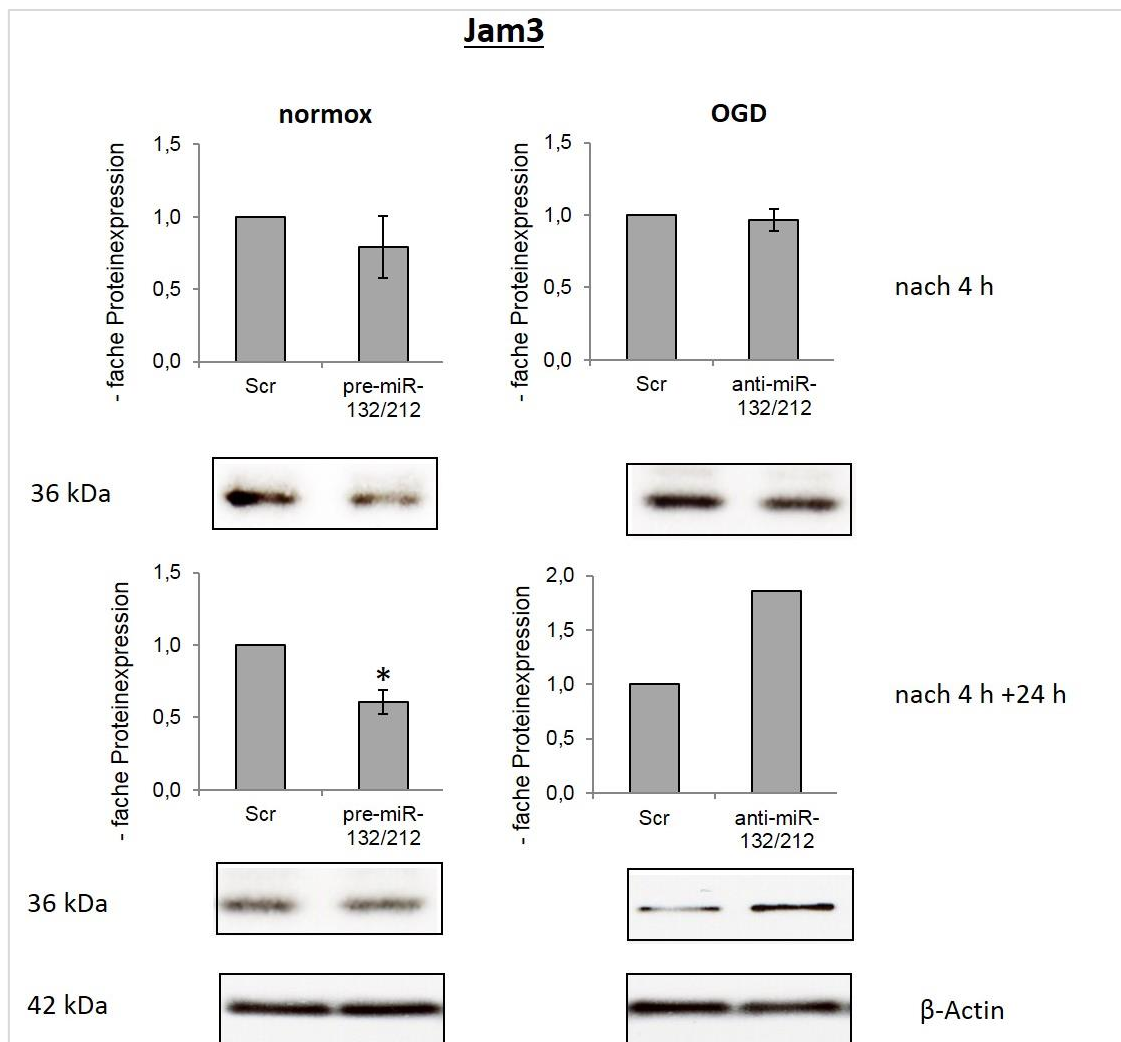


Abbildung 22: Jam3-Proteinexpression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen

cEND-2-Zellen wurden mit pre- oder anti-miR-132/212 transfiziert. Die anti-miR-132/212 transfizierten Zellen wurden für 4 h unter OGD-Bedingungen mit oder ohne 24 h Reoxygenierung kultiviert, gefolgt durch Jam3 Proteinexpressionsanalyse.

Scr – Scrambled, Kontrolle; pre-miR-132/212 – precursor miR-132/212; anti-miR-132/212 – Inhibitor Actb - Actin-β, Ladekontrolle; T-Test * $p < 0,05$

3.2.3.4 Regulation des Zielgens MMP9 durch miRNA-132/212

MMPs sind hochreguliert bei Ischämien (Rosenberg *et al.*, 1996), Hämorrhagien (Rosenberg & Navratil, 1997) und Trauma (Morita-Fujimura *et al.*, 2000) und tragen zur Degradierung der extrazellulären Matrix bei.

Regulation von MMP9 auf mRNA-Ebene

MMP9 konnte nur auf mRNA-Ebene dargestellt werden. Ohne Sauerstoffentzug konnte eine leichte Suppression der MMP9-mRNA bei Zugabe von pre-miR-132/212 nach 4 h Normoxie gemessen werden (s. Abb. 23). Nach weiteren 24 h konnte die mRNA-Expression sogar auf das 0,76-fache ($0,76 \pm 0,28$) herunterreguliert werden. Nach 4 h OGD und Hemmung der miR-132/212 stieg die MMP9-mRNA-Expression um 4 % ($1,04 \pm 0,12$) an, nach OGD und 24 h Reoxygenierung sogar um 43 % ($1,43 \pm 0,2$).

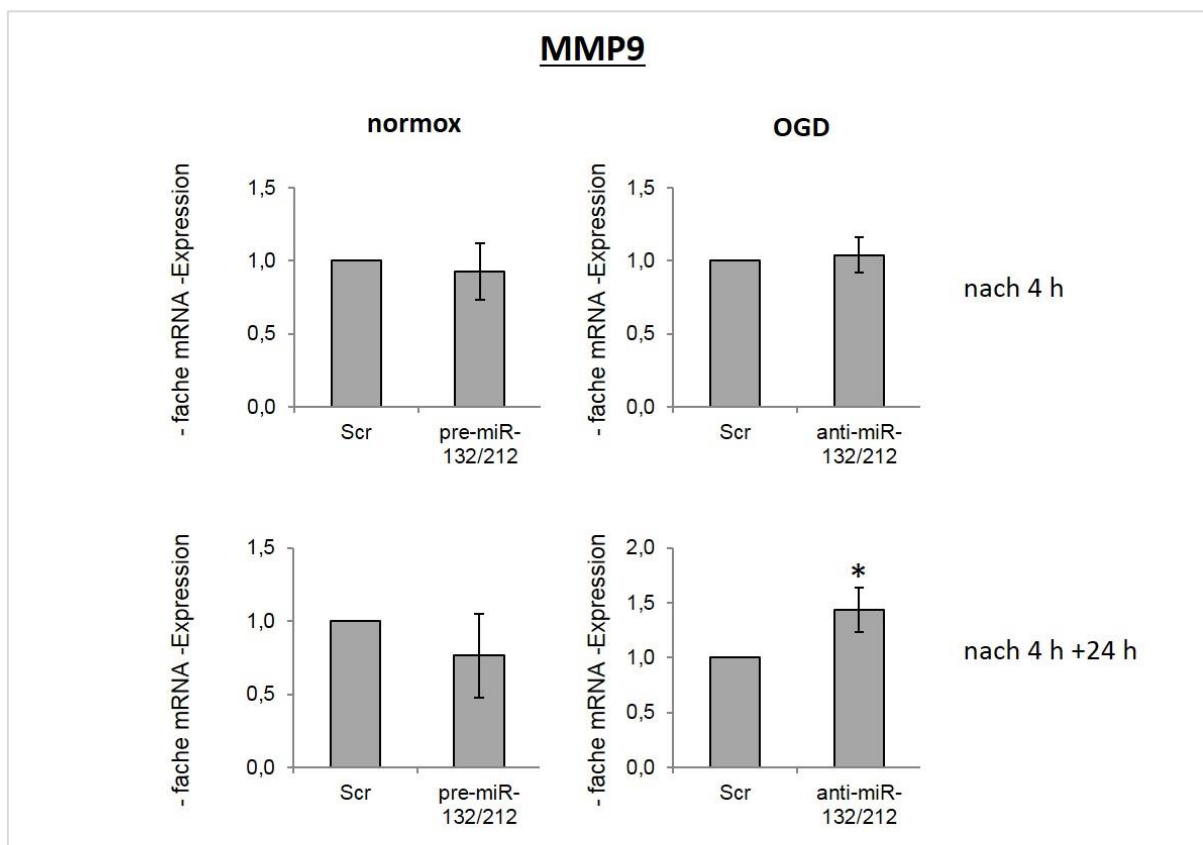


Abbildung 23: MMP9-mRNA-Expression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen

cEND-2-Zellen wurden mit pre- oder anti-miR-132/212 transfiziert. Die anti-miR-132/212 transfizierten Zellen wurden für 4 h unter OGD-Bedingungen mit oder ohne 24 h Reoxygenierung kultiviert, gefolgt durch MMP9 mRNA- Expressionsanalyse.

Scr – Scrambled, Kontrolle; pre-miR-132/212 – precursor miR-132/212; anti-miR-132/212 – Inhibitor
T-Test * $p < 0,05$

3.2.4 Einfluss von miRNA-132/212 auf den Widerstand und die Permeabilität bei cEND-2-Zellen

Widerstandsmessung (TEER)

Die Widerstandsmessung ergab einen Abfall bei den mit pre-miR-132/212 transfizierten cEND-2-Zellen nach 4 h +24 h Normoxie (s. Abb. 24).

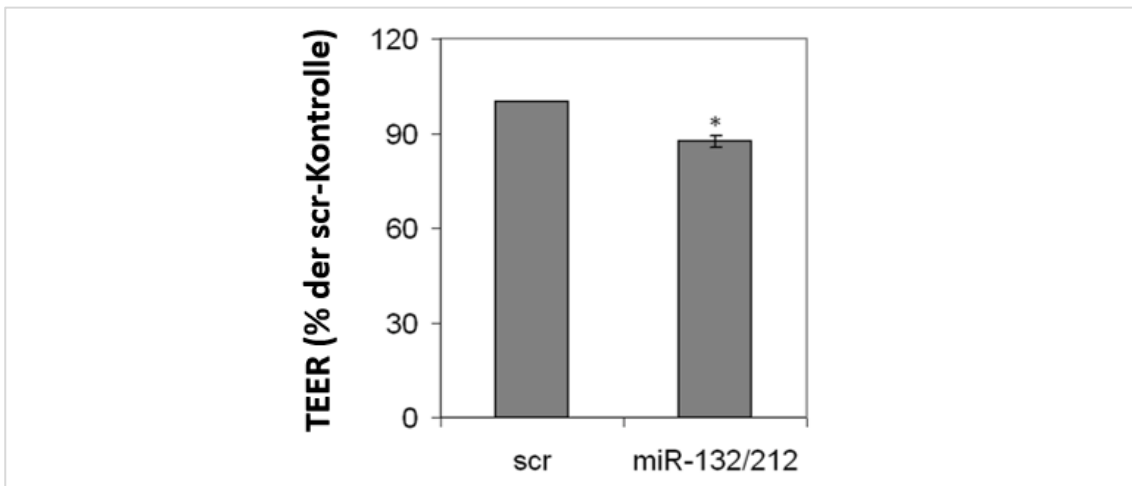


Abbildung 24: Widerstandsmessung (TEER)
bei Normoxie nach 4 h +24 h nach Transfektion mit pre-miR-132/212 (cEND-2); scr – Kontrolle

Permeabilitätsmessung

Die Permeabilität stieg bei pre-miR-132/212 transfizierten cEND-2-Zellen nach 4 h +24 h Normoxie (s. Abb. 25) an.

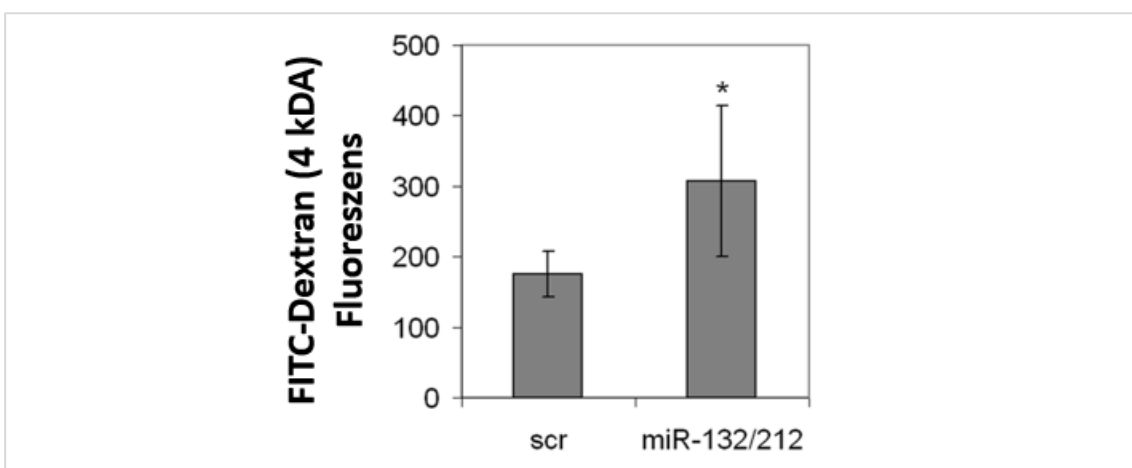


Abbildung 25: Permeabilitätsmessung
mit FITC-Dextran (4 kDa) bei Normoxie nach 4 h +24 h nach Transfektion von pre-miR-132/212 (cEND-2); scr - Kontrolle

4 Diskussion

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine Diffusionsbarriere, die aus einem voneinander abhängigem Netzwerk von Zellen besteht mit der Aufgabe das zentrale Nervensystem (ZNS) vom systemischen Kreislauf zu trennen. Eine der primären Aufgaben ist die strenge Regulation der parazellulären Permeabilität. Endotheliale Zell-Zell-Kontakte (Tight Junction – TJ und Adherens Junction - AJ) der Kapillaren sind die wichtigsten Mediatoren beim Limitieren der parazellulären Bewegung von löslichen Substanzen, Ionen und Wasser (Sandoval & Witt, 2008). In vielen Krankheitsprozessen, die das Gehirn betreffen, wie zum Beispiel beim Schlaganfall, Alzheimer'sche Erkrankung, Multiple Sklerose oder Entzündung, kann die Integrität der BHS durch Störung der Zell-Zell-Kontakte destabilisiert werden (DeLeo & Yezierski, 2001). Diese Arbeit hat sich insbesondere mit der Frage beschäftigt, was beim Schlaganfall an der BHS passiert und welche Rolle miRNAs dabei spielen.

Beim ischämischen Schlaganfall und nachfolgender Reperfusion werden die Zell-Zell-Kontakte in der BHS gestört. Das Ergebnis ist ein vermehrter vaskulär bedingter Zustrom von Substanzen ins Gehirn (Sandoval & Witt, 2008).

Es wurde ein *in-vitro*-Modell der BHS erstellt aus murinen immortalisierten cEND-2-Zellen, die typische Eigenschaften der BHS aufweisen. Diese Zelllinie wurde gewählt, da sie von der Morphologie im Vergleich zu Primärzellen sehr gleichmäßig wachsen und von Passage zu Passage keine großen Unterschiede zeigen. Allerdings wurden auch diese ungefähr ab Passage 30 zunehmend anfälliger nicht anzuwachsen bzw. sich morphologisch zu verändern, daher wurden die Zellen im Passagenbereich bis 25 eingesetzt. Diese Zelllinie wies bereits nach 4-stündigem Sauerstoffentzug eine veränderte Expression von bestimmten BHS-Proteinen auf (Kleinschnitz et al., 2011). Außerdem konnte man durch 3-maliges Wiederholen der Versuche hintereinander eine gute Reproduzierbarkeit in den Ergebnissen erreichen.

4.1 OGD induzierte Veränderungen der Genexpression verschiedener BHS assoziierter Proteine in cEND-2

Die BHS bildet eine wichtige Barriere für die Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS. Hirnendothelzellen an der Gefäßwand bilden TJ-Komplexe aus, welche den parazelluläre Durchgang der BHS einschränken und damit eine entscheidende Rolle in der Sicherstellung der Hirnfunktion einnehmen (Engelhardt *et al.*, 2014a). Das Expressionsniveau der TJ-assozierten Proteine ist beteiligt an der Aufrechterhaltung der Integrität der BHS (Wen *et al.*, 2014). In der quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion konnte eine Herunterregulation zahlreicher TJ-assoziierter Gene nach der Hypoxie und nach der post-hypoxischen Reoxygenierung festgestellt werden. Dazu gehören Proteine wie Cldn1, Cldn5, Tjap1, Tjp1 (ZO1), Jam2 und Jam3. Ein Verlust von Cldn1 in den zerebralen Gefäßen wurde unter pathologischen Konditionen zum Beispiel bei Tumoren, Schlaganfall und Entzündung bewiesen (Liebner *et al.*, 2000b). Glut1 ist ein Glucosetransportprotein in den mikrovaskulären Endothelzellen und den Gliazellen in der BHS. Bei einem Schlaganfall kommt es zu einer unzureichenden Blutversorgung mit einem Mangel an Glucose und Sauerstoff. Dieser Mangel triggert eine entscheidende Anzahl von Mechanismen (z.B. Exzitotoxizität, oxidativer Stress und Entzündung), die zu irreversiblen neuronalen Schädigungen führen. Eine Ischämie erhöht somit den Bedarf an Nährstoffen und ist assoziiert mit einer Veränderung des Energiemetabolismus im Gehirn. Die Glucosetransportaktivität passt sich dem Gebrauch an, um die Belieferung von Glucose zum Erhalt der normalen Zellfunktion sicherzustellen. Der genaue intrazelluläre Signalweg zur Glut-Regulation in der zerebralen Hypoxie ist noch unklar. Jedoch steht fest, dass eine Ischämie eine Veränderung in der Glut-Expression induziert (Espinoza-Rojo *et al.*, 2010). Die OGD verursacht eine Hochregulation der Glucose-Aufnahme der Hirnendothelzellen. Dies spiegelt sich in der mRNA-Expression mit einem sehr starken Anstieg wider. Glut1 hat außerdem die Eigenschaft Wassermoleküle gegen den osmotischen Gradienten zu transportieren. In der Literatur wird angegeben, dass mit jedem Glucose-Molekül 40 Wassermoleküle co-transportiert werden (MacAulay & Zeuthen, 2010). Seit bekannt ist, dass der Glucose-Transporter Wasser zusammen mit Glucose transportiert, um den

osmotischen Druck zu kompensieren, wird die Hypothese aufgestellt, dass dieser Co-Transport von Wasser möglicherweise zur Ödembildung während des Schlaganfalls beiträgt (Neuhaus *et al.*, 2012). Der Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-3-Faktor (TIMP3) zeigte in der OGD mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierung einen Abfall der mRNA-Expression. TIMP3 ist ein Matrix-gebundenes Protein, das modulatorische Effekte auf Remodeling, Inflammation und Angiogenese der extrazellulären Matrix hat (Menge *et al.*, 2012).

Die Expression von MMP3 und MMP9 fiel in den Versuchen ab. In der Literatur wird allerdings von einem Anstieg der Aktivität der Metalloproteasen in der OGD ausgegangen. Dort wird beschrieben, dass es durch die Hypoxie-induzierte Störung in der BHS zur Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) kommt (Bauer *et al.*, 2010). Diese Aktivierung der MMPs wird für die posthypoxie-bedingte Ödembildung verantwortlich gemacht. Allerdings könnte 24 h *in vitro* die Spätphase im Lebewesen sein und bereits ein Remodeling andeuten. Aktivität der MMP3 und MMP9 wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. MMP9 wurde als ein Zielgen der miR-132/212 beschrieben (Ucar *et al.*, 2010) und die Abnahme der mRNA-Expression nach der Hypoxie stimmt mit der Induktion der beiden miRs überein.

Nach OGD ereignet sich eine Reihe von Veränderungen in der mRNA-Expression von diversen Genen, die im späteren Verlauf für den Funktionsverlust der BHS beziehungsweise für ein Remodeling verantwortlich gemacht werden.

4.2 Effekt von Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium auf die Expression der BHS-assozierten Proteine nach der OGD-induzierten Funktionsstörung der BHS

Für die Erstellung der optimalen Versuchsbedingungen wurde der Effekt von konditioniertem Astrozyten-Medium auf die cEND-2-Zellen in der OGD und Normoxie untersucht. Astrozyten sind involviert in der Kontrolle der neuronalen Funktion durch die Regulation der Hirnhomöostase, in der Versorgung der Neurone mit Energie und Substraten für die Neurotransmission und in dem Recycling von Neurotransmittern. Des Weiteren repräsentieren sie die Verbindung zwischen den Neuronen und den Hirngefäßen, die sie mit ihren Endfüßchen bedecken (Engelhardt *et al.*, 2014b).

Bei den Versuchen wurden durchaus positive Effekte des Astrozyten-(C6-) konditionierten Mediums festgestellt. Zum einen waren die Standardabweichungen in den Proben, die mit C6-Medium behandelt wurden, kleiner als in den Proben ohne C6-Medium, was folglich eine Stabilität in den Versuchen gewährleisten konnte. Zum anderen konnte man einen protektiven Effekt des konditionierten Mediums auf die Genexpression einiger Gene feststellen. Bei *Cldn1* und *Cldn5* konnte die Reduktion der Genexpression mit C6-Medium nach 4 h OGD und 24 h Reoxygenierung deutlich gesenkt werden, was zur Folge hat, dass die Integrität der BHS weniger stark geschwächt wird, da mehr Tight-Junction-Proteine exprimiert werden. Ebenso zeigt die Expression von *Glut1* den Glucose-Bedarf in der OGD an, der bei Schäden deutlich ansteigt. In den Proben mit C6-Medium war diese Hochregulation deutlich geringer ausgefallen als in den Proben, die ohne C6-Medium behandelt wurden. Dies zeigt ebenfalls den protektiven Charakter des konditionierten C6-Mediums in der OGD. Allerdings zeigten einige Proteine auch eine starke Abnahme nach OGD mit konditioniertem Astrozyten-Medium. So zum Beispiel *Jam3* und *AQP3*. Dieses Phänomen wurde in früheren Arbeiten bereits beschrieben. So wird beschrieben, dass Astrozyten eine Hauptrolle bei der Pathogenese des Schlaganfalls spielen. Diese sind von großer Bedeutung im nicht-pathologischen Zustand für die Aufrechterhaltung der BHS-Eigenschaften (Neuhaus et al., 2015). Sie sollen vor allem die BHS-Permeabilität und den Wasser- und Ionenaustausch regulieren (Ballabh *et al.*, 2004b, Abbott *et al.*, 2006). Im Falle eines ischämischen Schlaganfalls kann die Antwort der Astrozyten vielfältig sein. Die Astrozyten-Endfüßchen bedecken 95 % Hirnkapillaroberfläche auf der Hirnseite. Die Verletzung der Astrozyten führt zu einem lokalen Fehlen und zu einer Lockerung des TJ-Netzwerkes und zu einer Runterregulation von TJ-Proteinen wie zum Beispiel *Cldn5* und *ZO1* (Neuhaus et al., 2015).

4.3 Effekt von miRNA-132/212 auf die Genexpression von BHS-Komponenten in murinen Hirnendothelzellen

Es wurde in der AG Förster zunächst eine microRNA-Expressionsanalyse bei cEND-2 Zellen nach 4 h OGD und nach 4 h OGD mit anschließender Reoxygenierung durchgeführt. Unter diesen Bedingungen waren miRNA-132 und miRNA-212 höher als in der Kontrolle exprimiert. Die Analyse wurde mittels eines microRNA-Arrays der Firma Affymetrix durchgeführt. Als Zielgene der miRNA-132/212 sind dann Tjap1, Cldn1, Jam3 und MMP9 als wichtige Bestandteile der BHS ermittelt worden. Tjap1 (Cambronne et al., 2012) und MMP9 (Ucar et al., 2010) wurden bereits als Zielgene von miRNA-132/212 beschrieben.

Bevor miRNA-132/212 in die cEND-2-Zellen transfiziert werden konnte, musste die angemessene Konzentration des Transfektionsreagenzes und der miRNA-Menge ermittelt werden. Das Problem bestand darin, dass eine zu große Menge an Transfektionsreagenz toxisch auf die Zellen wirkt. Außerdem musste gewährleistet sein, dass genügend miRNAs in die Zellen transfiziert wurden. Dies wurde mittels einer fluoreszenz-markierten Negativ-Kontrolle überprüft, die bei erfolgreicher miRNA-Transfektion in die Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgeleuchtet ist. Es wurde eine Konzentrationsreihe erstellt. Man entschied sich für die Konzentration, die die Morphologie der Zellen auch maximal nach 48 h nicht veränderte und bei der mindestens die Hälfte der Zellen transfiziert waren. 24 h wurden die miRNAs transfiziert. Anschließend konnten die OGD-Versuche durchgeführt werden. In den in-vitro-Modellen konnte die Hypothese eindrücklich bestätigt werden, dass miRNA-212 in Kombination mit miRNA-132 bei vermehrter Expression bzw. Angebot die zugehörige Zielgenexpression herabregulieren, was folglich die BHS destabilisiert. Andersherum konnte auch gezeigt werden, dass durch das Abfangen der in der OGD entstandenen miRNA-212 und miRNA-132 die Genexpression gesteigert ist bzw. nicht herabreguliert wird und damit die Integrität der BHS aufrechterhalten bleibt.

Claudin1 zeigte sowohl im Western Blot als auch in der qPCR bei Transfektion von miRNA-132/212 eine Suppression der Genexpression in der Normoxie. In der OGD, in der vermehrt miRNA-132/212 exprimiert wird, konnte durch die Inhibition dieser

miRNAs eine vermehrte Expression gezeigt werden. Nur im Western Blot bei OGD mit zusätzlicher Reoxygenierung blieb dieser Effekt aus. Es ist umstritten, ob murine Hirnendothelzellen überhaupt *Cldn1* enthalten. Diese Meinung konnte widerlegt werden, was auch in vorbeschriebenen Arbeiten zu lesen ist (Pfeiffer *et al.*, 2011). Bei *Jam3* konnte erst nach 24-stündiger Reoxygenierung ein Anstieg der Genexpression nach Inhibition der miRNA-132/212 in der OGD gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass die Zellen eine gewisse Erholungsphase brauchen, um einen positiven Effekt der Inhibition auf Genexpressionsebenen zu zeigen. *Tjp1* konnte bei Zugabe von miRNA-132/212 eine deutliche Senkung in der Genexpression unter normoxischen Bedingungen aufweisen, jedoch konnte in der OGD kein signifikanter Anstieg durch Inhibition sowohl im Western Blot also auch in der qPCR gezeigt werden. Allerdings konnte eine Stabilität der Barriere durch Inhibition der miRNA-132/212 in der OGD erreicht werden. *MMP9* konnte nur auf mRNA-Ebene dargestellt werden. Da es ein Enzym ist, das in das Medium freigesetzt wird, musste das Medium gesammelt und eine Aceton-Fällung durchgeführt werden. Das Problem beim Western Blot war, diese Fällung zu lösen. Beim Versuch der Elektrophorese blieben Feststoffe in den Taschen hängen und konnten somit nicht ausgewertet werden. Ein möglicher Verbesserungsvorschlag wäre eine bessere Löslichkeit des Proteins zu erreichen, damit dieses nicht in den Taschen zurückbleibt. In der Arbeitsgruppe BHS der Uniklinik Würzburg mit Frau Prof. Förster als Leiterin wurden in nachfolgenden Arbeiten weitere Versuche etabliert, unter anderem der Versuch, diese Ergebnisse in einem in-vivo-Modell zu bestätigen. Außerdem wurden Modelle entwickelt, die ermöglichen, dass durch die kontinuierliche Produktion der miRNA-132/212 durch Plasmide das Angebot erhöht werden konnte und dadurch stärkere Effekte womöglich erreicht werden kann.

4.4 Einfluss von miRNA-132/212 auf die Dichtigkeit der cEND-2-Zellen

Die Dichtigkeit der cEND-2-Zellen wurde mittels Widerstands- (TEER) und Permeabilitätsmessung überprüft. Dabei zeigte sich in den mit miRNA-132/212 transfizierten Zellen eine Abnahme des Widerstandes. Dies ist als Folge der Abnahme der Expression der TJs und AJs in der BHS zu erklären, was mit den Ergebnissen auf molekularer Ebenen übereinstimmt. Ebenfalls konnte ein Anstieg der Permeabilität für Moleküle mit der Größe von 4 kDA (FITC-Dextran) bei vermehrtem miRNA-132/212 Angebot gemessen werden. Dies bedeutet ein vermehrter Durchstrom von größeren Substanzen, was auch schon für miRNA-212 bestätigt wurde (Tang et al., 2008). Außerdem wurde auch gezeigt, dass bei fehlender Expression von Jam3 in Knock-out-Mäusen ein Hydrocephalus entsteht (Wyss et al., 2012), was eine erhöhte Permeabilität bei Verlust von TJs ebenfalls bestätigt.

5 Zusammenfassung

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bildet eine Barriere, die das ZNS vor dem Einfluss der Substanzen aus der Peripherie schützt. Die Aufrechterhaltung dieser wichtigen Struktur ist für die Homöostase und Vermeidung von Schäden im ZNS von besonderer Bedeutung. Eine häufige Ursache für die Schädigung der BHS ist der ischämische Schlaganfall. In der Hypoxie werden zahlreiche Proteine degradiert oder von den Zellkontakten delokalisiert, die für die Integrität der Zell-Zell-Kontakte eine wichtige Rolle spielen. Als Folge resultiert eine Destabilisierung der BHS mit vermehrtem Durchstrom von ZNS-schädigenden Substanzen.

Seit der Entdeckung von miRNAs (Lee et al., 1993) konnte deren Rolle vor allem in der Entstehung von Tumoren und Entzündungen nachgewiesen werden. In der Arbeitsgruppe Förster wurde eine vermehrte Expression von miRNA-132 und miRNA-212 nach OGD festgestellt. Als Zielgene von miRNA-132/212 konnten Cldn1, Tjap1, MMP9 und Jam3 detektiert werden. Die Validierungsversuche wurden an einem etablierten In-vitro-Modell der BHS bestehend aus murinen cerebralen Hirnendothelzellen (cEND-2) durchgeführt.

Zu Beginn wurden die Bedingungen zur Kultivierung der Zellen unter Hypoxie und ohne Glucose (eng. oxygen glucose deprivation, OGD) mit und ohne Astrozyten-konditioniertem Medium etabliert. Expression von diversen Genen, die bekannt sind eine Rolle in der OGD zu spielen, wurden mittels qPCR ermittelt. Dabei kam es zu signifikanten Veränderungen der Genexpression von wichtigen Genen in der BHS, die besonders in Kombination mit Astrozyten-konditioniertem Medium noch verstärkt werden konnten. So wurde die Kultivierung der Zellen für die weiteren OGD-Versuche in Astrozyten-konditioniertem Medium gewählt.

Des Weiteren wurde die Regulation von miRNA-132/212 auf die Zielgene an der BHS untersucht. Die hemmende Wirkung der miRNAs auf die Genexpression der Zielgene konnte durch Transfektion von pre-miR-132/212 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden. In der OGD konnte durch Hemmung der vermehrt exprimierten miRNA-132/212 ein Anstieg der Zielgene beobachtet werden. Damit konnten sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebenen Cldn1, Tjap1, Jam3 und MMP9 als Zielgene bestätigt werden. Zusätzlich wurden als funktionelle Tests eine TEER-Messung für den Widerstand und eine Permeabilitätsmessung durchgeführt. Beide Tests bestätigten die Destabilisierung der BHS nach Transfektion von miRNA-132/212. Als therapeutische Implikation könnte durch Inhibition von miRNA-132/212 bei einer Minderperfusion des Gehirns die Barriere stabilisiert werden, was eine neue Möglichkeit in der Therapie des akuten Schlaganfalls bietet.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur der Blut-Hirn-Schranke unter physiologischen Bedingungen (Abbott et al., 2010)	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte (Abbott et al., 2010).....	3
Abbildung 3: Die ischämische Kaskade führt zum zerebralen Schaden (Lakhan et al., 2009).....	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung der miR-Biogenese (Catalucci et al., 2009) (modifiziert)	7
Abbildung 5: Seed-Region (Dharmacon, 2014)	8
Abbildung 6: Prozess der Translation	9
Abbildung 7: miRNA-Imitatoren und –Inhibitoren (Dharmacon, 2014).....	11
Abbildung 8: Haarnadelstruktur (Stem-loop) von miR-132 und miR-212 (Griffiths-Jones-Lab)	12
Abbildung 9: Aufbau Tank-Blot-Transfer (eigene Darstellung)	33
Abbildung 10: Etablierung der OGD-Bedingungen - Einfluss von Astrozyten-(C6-)konditioniertem Medium auf die mRNA-Expression von Tight Junctions.....	45
Abbildung 11: Etablierung der OGD-Bedingungen - Einfluss von C6-konditioniertem Medium auf die mRNA-Expression von Matrixmetalloproteinasen und Metalloproteinaseninhibitor	46
Abbildung 12: Etablierung der OGD-Bedingungen - Einfluss von C6-konditioniertem Medium auf die mRNA-Expression von vaskulären Wachstumsfaktoren	47
Abbildung 13: Etablierung der OGD-Bedingungen - Einfluss von C6-konditioniertem Medium auf die mRNA-Expression von Transportproteinen.....	48
Abbildung 14: Konzentrationsbestimmung an cEND-2.....	50
Abbildung 15: cEND-2 24 h nach Transfektion (Negativ Kontrolle A).....	51
Abbildung 16: Versuchsaufbau der Transfektion von miR-132/212 (eigene Darstellung)	52

Abbildung 17: Claudin1-mRNA-Expression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	54
Abbildung 18: Claudin1-Proteinexpression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen	55
Abbildung 19: Tjap1-mRNA-Expression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen	56
Abbildung 20: Tjap1-Proteinexpression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen	58
Abbildung 21: Jam3-mRNA-Expression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen	59
Abbildung 22: Jam3-Proteinexpression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen	60
Abbildung 23: MMP9-mRNA-Expression in den mit miRNA transfizierten cEND-2-Zellen unter normoxischen und OGD-Bedingungen	61
Abbildung 24: Widerstandsmessung (TEER)	62
Abbildung 25: Permeabilitätsmessung.....	62

Die Verwendung bzw. der Abdruck der Abbildungen in der Einleitung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlags bzw. des Urhebers.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Online Hilfsmittel für eine computertechnische Prognose von miRNA-Zielgenen	10
Tabelle 2: Primäre Antikörper	20
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper	20
Tabelle 4: miRNA-Sequenz	21
Tabelle 5: Sequenz der Negative Control A und des Family Inhibitors	22
Tabelle 6: Versuchsaufbau Herstellung C6-konditioniertes Medium	26
Tabelle 7: Versuchsaufbau OGD + Reoxygenierung mit C6-konditioniertem Medium .	27
Tabelle 8: Versuchsaufbau Normoxie cEND-2 mit C6-konditioniertem Medium	28
Tabelle 9: Versuchsaufbau OGD + Reoxygenierung ohne C6-konditioniertes Medium	28
Tabelle 10: Versuchsaufbau Normoxie cEND-2 ohne C6-konditioniertes Medium	29
Tabelle 11: Einstellung des Thermocyclers für die cDNA-Synthese	37
Tabelle 12: Einstellung des Thermocyclers für die qPCR-Messung	38
Tabelle 13: Pipettierschema einer 24-Well-Platte bei cEND-2-Zellen	40
Tabelle 14: Pipettierschema der endgültigen Transfektion bei cEND-2	40

8 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. 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**:13-25.
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L. & Hansson, E. 2006. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* **7**:41-53.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L. & Imhof, B. A. 2001a. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* **98**:3699-707.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L. & Imhof, B. A. 2001b. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* **98**:3699-707.
- Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. 2004a. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease* **16**:1-13.
- Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. 2004b. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease* **16**:1-13.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell* **116**:281-97.
- Bauer, A. T., Burgers, H. F., Rabie, T. & Marti, H. H. 2010. Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **30**:837-48.
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O. M., Mueller, F., Nelboeck, P., Schmid, G., Bartfai, T., Dejana, E. & Brockhaus, M. 2000. Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *The Journal of biological chemistry* **275**:30970-6.
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & GÖRLICH, D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* **10**:185-91.
- Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P. & Pasquinelli, A. E. 2004. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *Rna* **10**:1586-94.
- Burek, M., Salvador, E. & Forster, C. Y. 2012. Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model. *Journal of visualized experiments : JoVE*:e4022.
- Bushati, N. & Cohen, S. M. 2007. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**:175-205.
- Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* **10**:1957-66.

- Cambronne, X. A., Shen, R., Auer, P. L. & Goodman, R. H. 2012. Capturing microRNA targets using an RNA-induced silencing complex (RISC)-trap approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:20473-78.
- Catalucci, D., Gallo, P. & Condorelli, G. 2009. MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics* **2**:402-08.
- DeLeo, J. A. & Yeziarski, R. P. 2001. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* **90**:1-6.
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**:231-35.
- Dharmacon, G. H., "Using Mimics and Inhibitors for microRNA Functional Analysis", '[Online]' <http://dharmacon.gelifesciences.com/uploadedFiles/Resources/mimics-inhibitors-microrna-function-analysis-technote.pdf>. (Zugriff am 15.12.2016)
- Engelhardt, S., Al-Ahmad, A. J., Gassmann, M. & Ogunshola, O. O. 2014a. Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. *Journal of cellular physiology* **229**:1096-105.
- Engelhardt, S., Patkar, S. & Ogunshola, O. O. 2014b. Cell-specific blood-brain barrier regulation in health and disease: a focus on hypoxia. *British journal of pharmacology* **171**:1210-30.
- Espinoza-Rojo, M., Iturralde-Rodriguez, K. I., Chanez-Cardenas, M. E., Ruiz-Tachiquin, M. E. & Aguilera, P. 2010. Glucose transporters regulation on ischemic brain: possible role as therapeutic target. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* **10**:317-25.
- Forster, C., Burek, M., Romero, I. A., Weksler, B., Couraud, P. O. & Drenckhahn, D. 2008. Differential effects of hydrocortisone and TNFalpha on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *The Journal of physiology* **586**:1937-49.
- Forster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J. & Drenckhahn, D. 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**:475-86.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. & Tsukita, S. 1998. Claudin-1 and-2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of cell biology* **141**:1539-50.
- Furuse, M., Sasaki, H. & Tsukita, S. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *The Journal of cell biology* **147**:891-903.
- Griffiths-Jones-Lab, "miRBase ", '[Online]' <http://www.mirbase.org>. (Zugriff am 12.12.2016)
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *nature* **404**:293-96.

- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. & Hannon, G. J. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**:1146-50.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H. & Kim, V. N. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* **18**:3016-27.
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. & Preiss, T. 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly (A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:16961-66.
- Hutvagner, G. & Zamore, P. D. 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**:2056-60.
- Jackson, R. J. & Standart, N. 2007. How do microRNAs regulate gene expression. *Sci Stke* **367**.
- Kleinschnitz, C., Blecharz, K., Kahles, T., Schwarz, T., Kraft, P., Göbel, K., Meuth, S. G., Burek, M., Thum, T. & Stoll, G. 2011. Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood–brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome. *Stroke* **42**:1081-89.
- Knowland, D., Arac, A., Sekiguchi, K. J., Hsu, M., Lutz, S. E., Perrino, J., Steinberg, G. K., Barres, B. A., Nimmerjahn, A. & Agalliu, D. 2014. Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. *Neuron* **82**:603-17.
- Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. 2013. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research:gkt1181*.
- Lagos, D., Pollara, G., Henderson, S., Gratrix, F., Fabani, M., Milne, R. S., Gotch, F. & Boshoff, C. 2010. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nature cell biology* **12**:513-19.
- Lakhan, S. E., Kirchgessner, A. & Hofer, M. 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* **7**:97.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell* **75**:843-54.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O. & Kim, S. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *nature* **425**:415-19.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *cell* **120**:15-20.
- Lewis, B. P., Shih, I.-h., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**:787-98.

- Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E.-H., Kalbacher, H. & Wolburg, H. 2000a. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica* **100**:323-31.
- Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E. H., Kalbacher, H. & Wolburg, H. 2000b. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica* **100**:323-31.
- Liebner, S., Kniesel, U., Kalbacher, H. & Wolburg, H. 2000c. Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells. *European journal of cell biology* **79**:707-17.
- Lippoldt, A., Kniesel, U., Liebner, S., Kalbacher, H., Kirsch, T., Wolburg, H. & Haller, H. 2000. Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. *Brain research* **885**:251-61.
- MacAulay, N. & Zeuthen, T. 2010. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience* **168**:941-56.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R. & Tuschl, T. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**:563-74.
- Martinez, J. & Tuschl, T. 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes & development* **18**:975-80.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. & Tuschl, T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* **15**:185-97.
- Menge, T., Zhao, Y., Zhao, J., Wataha, K., Gerber, M., Zhang, J., Letourneau, P., Redell, J., Shen, L., Wang, J., Peng, Z., Xue, H., Kozar, R., Cox, C. S., Jr., Khakoo, A. Y., Holcomb, J. B., Dash, P. K. & Pati, S. 2012. Mesenchymal stem cells regulate blood-brain barrier integrity through TIMP3 release after traumatic brain injury. *Science translational medicine* **4**:161ra50.
- Morita-Fujimura, Y., Fujimura, M., Gasche, Y., Copin, J.-C. & Chan, P. H. 2000. Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **20**:130-38.
- Neuhaus, W., Burek, M., Djuzenova, C. S., Thal, S. C., Koepsell, H., Roewer, N. & Forster, C. Y. 2012. Addition of NMDA-receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the upregulation of glucose uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells. *Neuroscience letters* **506**:44-9.
- Neuhaus, W., Gaiser, F., Mahringer, A., Franz, J., Riethmüller, C. & Förster, C. 2015. The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier. *Cerebral endothelial and glial cells are more than bricks in the Great Wall of the brain: insights*

into the way the blood-brain barrier actually works (Celebrating the centenary of Goldman's experiments).

- Nilsen, T. W. 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *TRENDS in Genetics* **23**:243-49.
- Nottrott, S., Simard, M. J. & Richter, J. D. 2006. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature structural & molecular biology* **13**:1108-14.
- Park, J.-K., Henry, J. C., Jiang, J., Esau, C., Gusev, Y., Lerner, M. R., Postier, R. G., Brackett, D. J. & Schmittgen, T. D. 2011. miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor. *Biochemical and biophysical research communications* **406**:518-23.
- Pfeiffer, F., Schäfer, J., Lyck, R., Makrides, V., Brunner, S., Schaeren-Wiemers, N., Deutsch, U. & Engelhardt, B. 2011. Claudin-1 induced sealing of blood–brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta neuropathologica* **122**:601-14.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. & Filipowicz, W. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**:1573-76.
- R Tan, J., X Koo, Y., Kaur, P., Liu, F., Armugam, A., T-H Wong, P. & Jeyaseelan, K. 2011. microRNAs in stroke pathogenesis. *Current molecular medicine* **11**:76-92.
- Rosenberg, G. A. & Navratil, M. 1997. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology* **48**:921-626.
- Rosenberg, G. A., Navratil, M., Barone, F. & Feuerstein, G. 1996. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **16**:360-66.
- Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., Morales, J. & et al. 1991. A cell culture model of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology* **115**:1725-35.
- Sandoval, K. E. & Witt, K. A. 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of disease* **32**:200-19.
- Sørensen, S. S., Nygaard, A.-B., Nielsen, M.-Y., Jensen, K. & Christensen, T. 2014. miRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with acute ischemic stroke. *Translational stroke research* **5**:711-18.
- Tang, Y., Banan, A., Forsyth, C. B., Fields, J. Z., Lau, C. K., Zhang, L. J. & Keshavarzian, A. 2008. Effect of Alcohol on miR-212 Expression in Intestinal Epithelial Cells and Its Potential Role in Alcoholic Liver Disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **32**:355-64.

- Ucar, A., Vafaizadeh, V., Jarry, H., Fiedler, J., Klemmt, P. A., Thum, T., Groner, B. & Chowdhury, K. 2010. miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development. *Nature genetics* **42**:1101-08.
- Wanet, A., Tacheny, A., Arnould, T. & Renard, P. 2012. miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic acids research*:gks151.
- Wen, J., Qian, S., Yang, Q., Deng, L., Mo, Y. & Yu, Y. 2014. Overexpression of netrin-1 increases the expression of tight junction-associated proteins, claudin-5, occludin, and ZO-1, following traumatic brain injury in rats. *Experimental and therapeutic medicine* **8**:881-86.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E. M., Ocalan, M., Farrell, C. & Risau, W. 1994. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *Journal of cell science* **107 (Pt 5)**:1347-57.
- Wyss, L., Schäfer, J., Liebner, S., Mittelbronn, M., Deutsch, U., Enzmann, G., Adams, R. H., Aurrand-Lions, M., Plate, K. H. & Imhof, B. A. 2012. Junctional adhesion molecule (JAM)-C deficient C57BL/6 mice develop a severe hydrocephalus.
- Zlokovic, B. V. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**:178-201.

9 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Prof. Dr. Carola Förster danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe Blut-Hirn-Schranke in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg und für die hervorragende Betreuung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Małgorzata Burek, die mir jederzeit bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung gewährte. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Elisabeth Wilken danke ich für die hervorragende Unterstützung im Labor, für das Einführen in das Arbeiten mit Zellkulturen, die aufbauenden Worte und Motivation.

Ein Dank an Prof. Dr. Norbert Roewer für die Möglichkeit die Arbeit in der Klinik und Poliklinik der Anästhesiologie der Universität Würzburg durchführen zu können.

Ein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern der AG Blut-Hirn-Schranke, die alle mit Rat und Tat immer zur Seite standen und mit denen das Arbeiten im Labor nie langweilig war.

Ein herzliches Dankeschön an meine Eltern, die mich bei meinem Studium und meiner Promotion immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.