

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Norbert Roewer

Die hCMEC/D3-Zelllinie als humanes *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke im
ischämischen Schlaganfall

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

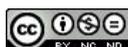
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Zaum

aus Würzburg

Würzburg, Juni 2017



Referent/Referentin: Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. Carola Förster

Koreferent/Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Mario Löhr

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2018

Der Promovend ist Arzt

Inhalt

| | | |
|---------|--|----|
| 1. | Einleitung..... | 1 |
| 1.1. | Bedeutung des Schlaganfalls | 1 |
| 1.2. | Funktionen der Blut-Hirn-Schranke..... | 2 |
| 1.3. | Rolle der Blut-Hirn-Schranke im Schlaganfall..... | 3 |
| 1.4. | In-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke | 4 |
| 1.5. | Glukokortikoidrezeptor | 5 |
| 1.6. | Einfluss von Glukokortikoiden auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke | 6 |
| 2. | Ziel der Arbeit | 8 |
| 3. | Material und Methoden | 9 |
| 3.1. | Material | 9 |
| 3.2. | Methoden der Zellkultur | 14 |
| 3.2.1. | Kultivierung der D3-Zelllinie | 15 |
| 3.2.2. | Kultivierung der C6-Zelllinie | 16 |
| 3.2.3. | Kryokonservierung der Zellen | 16 |
| 3.2.4. | Auftauen von konservierten Zellen | 17 |
| 3.3. | Vorgehen bei Versuchen | 17 |
| 3.3.1. | Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (OGD)..... | 17 |
| 3.3.2. | Versuche unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (OGD)..... | 17 |
| 3.3.3. | Versuche unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen und anschließender Reoxygenierung..... | 18 |
| 3.3.4. | Cokultur-Versuche mit D3- und C6-Zellen..... | 19 |
| 3.4. | Biochemische Methoden..... | 21 |
| 3.4.1. | Herstellung von Zelllysaten; Proteinpräparation | 21 |
| 3.4.2. | Proteinmengenbestimmung..... | 22 |
| 3.4.3. | Vorbereitung des Lysats für Western Blots..... | 23 |
| 3.4.4. | Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Standardgelen | 23 |
| 3.4.5. | Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Gradientengelen..... | 24 |
| 3.4.6. | Transfer mittels Semidry-Blot..... | 25 |
| 3.4.7. | Antikörperreaktion | 26 |
| 3.4.8. | Lösen von gebundenen Antikörpern | 27 |
| 3.4.9. | Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen | 27 |
| 3.4.10. | Untersuchung der Zytotoxizität..... | 27 |
| 3.4.11. | Untersuchung der Zellvitalität..... | 28 |
| 3.4.12. | Fluoreszenzfärbung von kultivierten Zellen | 28 |
| 3.5. | Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 3.5.1. | Herstellung von Zelllysaten für RNA-Gewinnung | 29 |
| 3.5.2. | Aufreinigung der RNA..... | 29 |
| 3.5.3. | Messung der RNA-Konzentration..... | 30 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.5.4. | Herstellung von cDNA..... | 30 |
| 3.5.5. | Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)..... | 30 |
| 3.5.6. | Densiometrische Auswertung von Western Blots..... | 31 |
| 3.6. | Statistische Auswertung..... | 31 |
| 4. | Ergebnisse..... | 32 |
| 4.1. | Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Vitalität von D3-Zellen..... | 32 |
| 4.2. | Einfluss von OGD-Bedingungen auf Entzündungsmarker | 34 |
| 4.2.1. | TNF-Alpha | 35 |
| 4.2.2. | VEGF | 35 |
| 4.2.3. | Interleukin 6 | 36 |
| 4.2.4. | Interleukin 8 | 37 |
| 4.3. | Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Synthese von RNA der Tight junction-Proteine..... | 37 |
| 4.3.1. | Claudin 5..... | 38 |
| 4.3.2. | Occludin..... | 38 |
| 4.4. | Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Expression von Proteinen in D3-Zellen in Cokultur | 39 |
| 4.4.1. | Expression von Claudin 1..... | 40 |
| 4.4.2. | Expression von ZO-1 | 41 |
| 4.4.3. | Expression von VCAM..... | 42 |
| 4.5. | Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors in D3-Zellen | 43 |
| 4.5.1. | Einfluss von OGD-Bedingungen auf die RNA-Synthese des Glukokortikoidrezeptors in D3-Zellen | 43 |
| 4.5.2. | OGD-Bedingungen für 4 Stunden und für 8 Stunden..... | 43 |
| 4.5.3. | OGD-Bedingungen für 4 Stunden mit anschließender Reoxygenierung..... | 45 |
| 4.5.4. | Expression des Glukokortikoidrezeptors in Cokultur-Versuchen..... | 46 |
| 4.6. | Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors in C6-Zellen | 47 |
| 4.7. | Fluoreszenzfärbungen von D3-Zellen..... | 48 |
| 5. | Diskussion..... | 51 |
| 6. | Zusammenfassung..... | 57 |
| 7. | Abkürzungsverzeichnis | 58 |
| 8. | Abbildungsverzeichnis | 60 |
| 9. | Tabellenverzeichnis | 63 |
| 10. | Literaturverzeichnis..... | 64 |

1. Einleitung

1.1. Bedeutung des Schlaganfalls

Der Schlaganfall ist weltweit die zweithäufigste Todesursache und der häufigste Grund für Invalidität und Pflegebedürftigkeit (Donnan, Fisher et al. 2008). In Deutschland liegt die Inzidenz bei 174 pro 100.000 Einwohner, jährlich treten etwa 140.000 Schlaganfälle auf (Kolominsky-Rabas, Sarti et al. 1998). Auch hierzulande ist der Schlaganfall der häufigste Grund für Pflegebedürftigkeit, außerdem die dritthäufigste Todesursache und mit den Kosten für Therapie, Rehabilitation und dem Produktionsausfall der Betroffenen die teuerste Erkrankung (Berlit 2014). Mehr als die Hälfte der Fälle tritt bei älteren Individuen über 75 Jahren auf (Kolominsky-Rabas, Sarti et al. 1998). Im Zuge der demografischen Veränderungen, mit dem Anstieg der Zahl von älteren Menschen, wird die Inzidenz von Schlaganfällen auch in Zukunft eher zu- als abnehmen (Donnan, Fisher et al. 2008). Risikofaktoren für das Auftreten eines Schlaganfalls sind, neben dem Alter, typische Zivilisationskrankheiten wie arterielle Hypertonie (Kearney, Whelton et al. 2005) und Diabetes mellitus (Khoury, Kleindorfer et al. 2013) oder Lebensstil-Faktoren wie Adipositas, Rauchen, Alkoholabusus, schlechte Ernährung und mangelnde körperliche Aktivität (Tikk, Sookthai et al. 2014). Durch die hohe Prävalenz dieser Risikofaktoren in der Bevölkerung ergibt sich, ebenso wie aus der demografischen Entwicklung, die hohe Inzidenz und Bedeutung des Schlaganfalls. Der Stellenwert der Erforschung von molekularen Mechanismen bei diesem Krankheitsbild zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten ist deshalb als hoch einzuschätzen.

Die Hauptursache des Schlaganfalls ist die Atherosklerose der hirnversorgenden Arterien, hierbei kommt es infolge einer Plaqueruptur zu einer Embolie und damit zum Verschluss eines oder mehrerer hirnversorgender Gefäße. Ebenso spielen lakunäre Infarkte bei Mikroangiopathien oder kardiale Thrombembolien bei Herzrhythmusstörungen eine Rolle, andere Auslöser sind seltener (Berlit 2014). Trotz der unterschiedlichen Genese und zugrundeliegenden Pathophysiologie, steht am Ende dieses Geschehens immer das Absterben von Neuronen durch Ischämie, verbunden mit einer irreversiblen Störung der neuronalen Funktion (Deb, Sharma et al. 2010). Die resultierenden Ausfallerscheinungen sind bei Patienten, die nicht versterben, sehr belastend und schränken sie meist in der Bewältigung ihres Alltags ein, selbst wenn sie keine höhergradigen Behinderungen erleiden. Da es sich bei

Neuronen um permanentes Gewebe handelt, welches nahezu keine Regenerationsfähigkeit besitzt, ist zum einen die Prävention eines Schlaganfalls durch Behandlung der Risikofaktoren äußerst wichtig. Zum anderen ist aber auch eine wirksame Akuttherapie zur Minimierung des Schadens als entscheidender Faktor in der Verhinderung von Behinderung und in der Erhaltung von Lebensqualität zu sehen.

1.2. Funktionen der Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn als zentrales Steuerungsorgan ist essentiell für die Funktion und das Fortbestehen des Organismus. Die besondere Stellung dieses Organs lässt sich auch daran erkennen, dass der Hirntod, der irreversible und vollständige Funktionsausfall des Gehirns, im medizinischen Bereich als der endgültige Tod eines Individuums gewertet wird (Bundesärztekammer 1997).

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine Barriere, welche für die Aufrechterhaltung des, für die korrekte Funktion des Hirns angepassten, Mikromilieus zuständig ist; sie verhindert das Eindringen von Neurotoxinen, Makromolekülen oder Neurotransmittern (Abbott, Patabendige et al. 2010). Zudem stellt sie durch Transportsysteme die Nährstoffversorgung des Gehirns sicher. Diese Aufgabe wird durch die spezifischen Eigenschaften der Zell-Zell-Kontakte der Endothelzellen in den Hirngefäßen umgesetzt. Die feste Verbindung der Endothelzellen miteinander wird durch Tight junctions und damit verbundene zytoplasmatische Proteine sichergestellt; u.a. Claudin 1 und 5, Occludin und ZO-1 (Ballabh, Braun et al. 2004). Diese Tight junctions sind Membranproteine, welche mit den Gegenstücken der Nachbarzellen verbunden sind und kommen ubiquitär im Körper vor. An der Blut-Hirn-Schranke sind sie jedoch besonders dicht, sogenannte sehr dichte Tight junctions (Abbott, Patabendige et al. 2010). Dadurch wird das Gehirn nicht nur vor dem Eindringen von Noxen wie z.B. Stoffwechselprodukten oder Mikroorganismen, sondern auch vor einer durch parazelluläre Diffusion verursachten Überwässerung oder Veränderung der Elektrolytkonzentration geschützt.

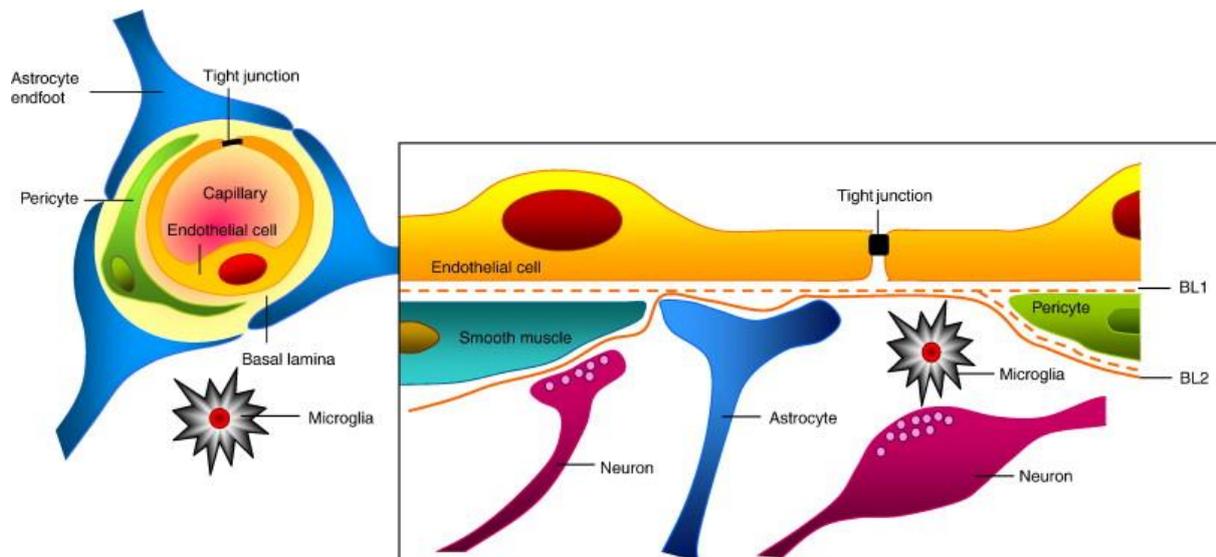


Abbildung 1: Schema der Blut-Hirn-Schranke mit beteiligten Zellen, Basallaminae und Verschlussmechanismus durch Tight junctions (Abbott, Patabendige et al. 2010)

Der Wegfall oder die Schwächung der Barrierefunktion ist an der Pathogenese vieler schwerwiegender Erkrankungen beteiligt, z.B. bei Meningitiden, Multipler Sklerose oder bei Hirntumoren. Die Barriestörung ist dabei häufig kein ursächlicher Faktor, kann das Krankheitsbild aber verschlimmern oder aufrechterhalten. Deshalb sind die Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke oder die Minimierung der Folgen der Instabilität wichtige Ziele in der Therapie dieser Krankheiten.

1.3. Rolle der Blut-Hirn-Schranke im Schlaganfall

In der Pathogenese des Schlaganfalls spielen ischämische Zellschäden durch Verminderung oder Ausfall der Perfusion, mit daraus resultierender Störung der Zellfunktion, eine wichtige Rolle. Es kommt dadurch zum Ausfall der Ionenpumpen, die normalerweise die Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum erhalten, und damit zu Elektrolytverschiebungen. Durch diese schwellen die Zellen osmotisch an, es entsteht ein zytotoxisches Ödem, welches die Funktionsfähigkeit der Zelle weiter herabsetzt und dazu führt, dass durch die Freisetzung von Radikalen und Proteasen ein irreversibler Zellschaden entsteht (Rosenberg 1998). Ebenso ist die Entwicklung eines vasogenen Ödems von Bedeutung. Durch den Verlust der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke tritt vermehrt Flüssigkeit aus dem Intravasalraum in das Gewebe, wodurch eine Verstärkung des Ödems und in der Folge davon Kolliquationsnekrosen verursacht werden (Berlit 2014). Das bereits vorgeschädigte Hirngewebe wird dadurch weiter belastet. Neben der Schädigung des Hirngewebes, das direkt vom Ödem

betroffen ist, stellt auch die intrakranielle Raumforderung durch die Volumenzunahme ein Problem dar. Diese kann in gewissem Maße durch die Verringerung des Liquorvolumens kompensiert werden. Steigt der Hirndruck jedoch über die Kompensationsgrenze an, wird die, beim Schlaganfall ohnehin eingeschränkte, Perfusion weiter erschwert oder gar vollständig zum Erliegen gebracht, was einem Hirntod entspricht (Wilhelm 2013). Zudem wird das Gehirn durch die Raumforderung in Richtung Tentorium cerebelli oder in Richtung Foramen magnum komprimiert, was in einer oberen oder unteren Einklemmung resultiert. Im Fall der oberen Einklemmung kommen weitere neurologische Ausfälle zur bereits bestehenden Symptomatik, im Fall der unteren Einklemmung kann es durch Kompression des Atemzentrums zu einer lebensbedrohlichen zentralen Atemlähmung kommen.

Bei durch Schlaganfall ausgelösten Hirnödemen wird häufig eine auf Osmose basierende Therapie, z.B. mit Mannitol angewandt. Diese stellt eine Belastung für das kardiovaskuläre System und die Niere dar und kann, insbesondere bei multimorbiden Patienten, zu Komplikationen wie einem akuten Nierenversagen führen (Lin, Tang et al. 2015). Durch das häufig bereits höhere Alter der Schlaganfall-Patienten ist in erheblichem Maße mit Multimorbidität zu rechnen, somit ist die Anwendbarkeit der Osmotherapie in einem Großteil der Fälle nicht ohne Folgeschäden möglich. Große Hirnödeme können neurochirurgisch durch eine dekompressive Kraniektomie behandelt werden und damit das Outcome verbessern oder den Tod verhindern (Simard, Sahuquillo et al. 2011), jedoch birgt ein solcher Eingriff die Gefahr weiterer Komplikationen (Chu and Sheth 2015). Eine gezielte medikamentöse Therapie des Hirnödems würde die Nebenwirkungen und Komplikationen der genannten Therapien umgehen und zur schnelleren Regeneration beitragen. Sie könnte außerdem durch eine bessere Anwendbarkeit in prophylaktischer Intention auch bei weniger ausgeprägten Ödemen eingesetzt werden und damit der Entstehung von weiteren Schäden vorbeugen.

1.4. *In-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke

Ein *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke ist u.a. notwendig, um die ZNS-Gängigkeit verschiedener Pharmaka beurteilen zu können, weshalb bereits aus vielen Untersuchungen diverse mehr oder weniger geeignete Modelle bekannt sind (Terasaki, Ohtsuki et al. 2003). Auch zur Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge bei einem Schlaganfall sowie dem Einfluss verschiedener Stoffe auf eine

durch Ischämie geschädigte Blut-Hirn-Schranke kann ein solches Modell verwendet werden.

Es existieren viel verschiedene Modelle für die Blut-Hirn-Schranke, die auf tierischen Zellen aufbauen. Es handelt sich dabei z.B. um die aus Mäusen gewonnene Linie bEND.3 (Li, Zhou et al. 2006) und cEND (Förster, Silwedel et al. 2005), die aus Ratten gewonnene RBE4- (Rabin, Piciotti et al. 1996, Regina, Romero et al. 1999) und GPNT-Linie (Regina, Romero et al. 1999) oder die bovine SV-BEC-Linie (Durieu-Trautmann, Foignant-Chaverot et al. 1991).

Als Modell für die menschliche Blut-Hirn-Schranke ist die Zelllinie hCMEC/D3 bekannt (Weksler, Subileau et al. 2005). Es handelt sich hierbei um eine aus humanen Endothelzellen gewonnene Linie, die sich als *in-vitro*-Modell für die Blut-Hirn-Schranke bewährt hat (Förster, Burek et al. 2008, Poller, Gutmann et al. 2008, Weksler, Romero et al. 2013). Zellen dieses Typs verhalten sich auch in Abwesenheit anderer Zellen weitgehend wie die Zellen der physiologischen Blut-Hirn-Schranke (Cucullo, Couraud et al. 2008). Sie wurden zudem bereits für Versuche unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (oxygen glucose deprivation, OGD) eingesetzt (Cowan and Easton 2010).

1.5. Glukokortikoidrezeptor

Der Glukokortikoidrezeptor (GR) kommt in nahezu allen Gewebetypen und Organsystemen in unterschiedlichen Modifikationen vor (Lu, Wardell et al. 2006). Er ist beteiligt an der Regulation von Immunprozessen und Entzündungsreaktionen, von Zellwachstum und -differenzierung sowie Apoptose und von endokrinen und metabolischen Prozessen (Buckingham 2006). Glukokortikoide werden deshalb in der Therapie verschiedenster Krankheiten, z.B. Autoimmunerkrankungen oder Entzündungsreaktionen, eingesetzt; die Wirkung variiert hier je nach Präparat und Zielgewebe.

Der Glukokortikoidrezeptor gehört zur Gruppe der nukleären Rezeptoren, welche sich strukturell sehr ähnlich sind. Er besitzt drei funktionelle Bereiche (siehe Abbildung 2); einen N-terminalen Bereich für die Transaktivierung der Transkription, den Bereich, der an die DNA bindet (DNA-binding domain, DBD) und einen C-terminalen Bereich, an dem der Ligand gebunden werden kann (ligand-binding domain, LBD) (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995).

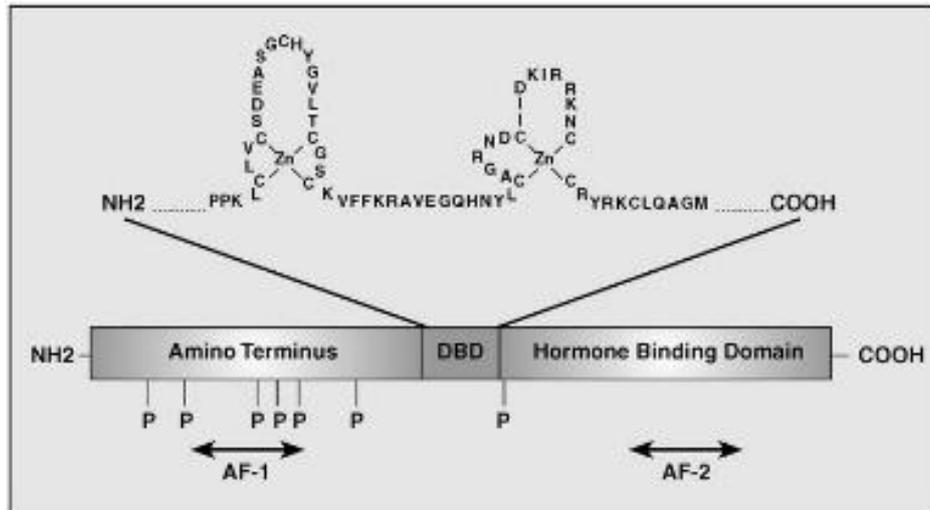


Abbildung 2: Schema des Glukokortikoidrezeptors mit drei funktionellen Bereichen: N-terminaler Transaktivierungsbereich (AF-1), DBD mit zwei zentralen Zink-Ionen, und C-terminaler Bereich LBD (AF-2) (Cosio, Torrego et al. 2005)

Endogene Liganden des Glukokortikoidrezeptors sind z.B. Kortisol oder Kortikosteron. Die Wirkung eines Liganden kann über verschiedene Signalwege vermittelt werden. Einer der wichtigsten ist über Bindung eines durch die Zellmembran diffundierten Kortikoids an den Glukokortikoidrezeptor. Dieser liegt zunächst gebunden an andere Proteine im Zytoplasma vor. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor wird er in den Zellkern transloziert, hier bindet er spezifisch an die DNA und reguliert die Transkription der Zielgene (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995). Zudem kann der Rezeptor mit weiteren Proteinen interagieren, welche wiederum als Transkriptionsfaktoren wirken oder diese beeinflussen können (Lu, Wardell et al. 2006).

1.6. Einfluss von Glukokortikoiden auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke

Die Applikation von Glukokortikoiden erhöht die Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke durch die Steigerung der Expression von Tight junction-Proteinen wie Occludin und Claudin 5 (Förster, Silwedel et al. 2005, Förster, Burek et al. 2008, Salvador, Shityakov et al. 2013) und Adhaerens-Proteinen wie VE-Cadherin (Blecharz, Drenckhahn et al. 2008) sowie über die Hemmung von Metalloproteinasen (Förster, Kahles et al. 2007). Zudem kann ein Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke nach Applikation proinflammatorischer Zytokine wie TNF-Alpha durch Glukokortikoide verhindert werden (Förster, Burek et al. 2008). Diese Effekte sind spezifisch für die Endothelzellen des Gehirns (Förster, Waschke et al. 2006). Glukokortikoide werden aufgrund ihrer antientzündlichen Wirkung in der Erstlinientherapie von entzündlichen

ZNS-Erkrankung wie z.B. Multiple Sklerose eingesetzt (Bevan and Gelfand 2015). Allerdings kommt ein Teil des therapeutischen Effekts auch durch die Steigerung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke zustande, welche bei der Multiplen Sklerose bereits in frühen Krankheitsstadien gestört ist (Ortiz, Pacheco-Moisés et al. 2014). Diese durch reduzierte Expression von Claudin 5 und Occludin verursachte Schrankenstörung kann durch Applikation von Glukokortikoiden verbessert werden (Blecharz, Haghikia et al. 2010). Bei Hirntumoren werden im klinischen Alltag Glukokortikoide verwendet, um eine Symptombesserung zu erreichen (Briegel, Möhnle et al. 2008). Dies führt zu einer deutlichen Reduktion des Ödems (Sinha, Bastin et al. 2004), welches durch die Schrankenstörung im peritumorösen Gebiet verursacht wird (Briegel, Möhnle et al. 2008).

Auch beim Schlaganfall wird der therapeutische Ansatz der Ödemreduktion durch Glukokortikoide verfolgt, die Evidenzlage ist jedoch nicht eindeutig (Qizilbash, Lewington et al. 2000, Gomes, Stevens et al. 2005, Sandercock and Soane 2011), weshalb die Therapie laut aktueller Leitlinie nicht empfohlen wird (DGN 2012). In *in-vitro*-Versuchen konnte eine Proteasom-vermittelte Degradation des Glukokortikoid-Rezeptors als Ursache der Glukokortikoid-Resistenz der hypoxischen Blut-Hirn-Schranke identifiziert werden (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011), was eine mögliche Erklärung für das Fehlen eines eindeutigen therapeutischen Effekts der Glukokortikoid-Therapie beim ischämischen Schlaganfall darstellt.

2. Ziel der Arbeit

Eine bessere Behandlung des beim Schlaganfall entstehenden Hirnödems könnte für viele Patienten eine bessere Prognose bedeuten.

Zur Verbesserung des Verständnisses der Pathophysiologie beim Schlaganfall soll das, auf der hCMEC/D3-Zelllinie basierte, *in-vitro*-Modell auf sein Verhalten unter ischämischen Stoffwechselbedingungen untersucht werden. Hierbei soll zunächst untersucht werden, inwieweit das Modell mit dem Absterben der Endothelzellen auf eine ischämische Stoffwechsellage reagiert. Anschließend soll das Modell auf eine zu erwartende Entzündungsreaktion und Barrierschwächung, welche durch die unter Ischämie verursachte Zellschädigung ausgelöst wird, untersucht werden. Zudem soll die Reaktion verschiedener integraler Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke, Tight junctions und assoziierter Proteine, im Sinne einer möglicherweise veränderten Expression beobachtet werden.

Da die Evidenzlage zur Glukokortikoidtherapie beim Schlaganfall nicht eindeutig ist, und um die bekannten Einflüsse von Glukokortikoiden auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke genauer zu verstehen, soll die Untersuchung des Glukokortikoidrezeptors einen wichtigen Teil der Arbeit ausmachen. Dabei soll analysiert werden, ob sich die Expression des Rezeptors unter ischämischen Stoffwechselbedingungen verändert. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die bekannte Glukokortikoid-Wirkung darstellen. Die Glukokortikoid-vermittelte Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke könnte dazu dienen, der Entwicklung eines vasogenen Hirnödems vorzubeugen oder dieses zu reduzieren und damit die Schlaganfall-Therapie verbessern.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Antikörper, primär

| Zielprotein | Verdünnung | Sekundär-Antikörper | Herstellerinformation |
|------------------------|------------|--------------------------|--|
| β-Aktin | 1:15000 | | Cat. No. A3854, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Claudin-1 | 1:200 | Anti-Rabbit IgG (NA934V) | Cat. No. 51-9000, Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Claudin-5 | 1:200 | Anti-Rabbit IgG | Cat. No. 34-1600, Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Glukokortikoidrezeptor | 1:200 | Anti-Rabbit IgG | GR(H-300): sc-8992, Santa Cruz, Dallas, USA |
| Occludin | 1:200 | Anti-Rabbit IgG | Cat. No. 71-1500, Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Occludin | 1:500 | Anti-Mouse IgG | Cat. No. 33-1500, Invitrogen, Carlsbad, USA |
| VCAM-1 | 1:800 | Anti-Rabbit IgG | Cat. No. CA0406, Cell Applications, San Diego, USA |
| VE-Cadherin | unverdünnt | | Hybridoma-Überstand gegen VE-Cadherin (Gotsch, Borges et al. 1997) |
| VEGF | 1:100 | Anti-Rabbit IgG | (147): sc-507, Santa Cruz, Dallas, USA |
| VEGF-Rezeptor | 1:100 | Anti-Rabbit IgG | (C-1158): sc-504, Santa Cruz, Dallas, USA |
| ZO-1 | 1:100 | Anti-Rabbit IgG | Cat. No. 40-2300, Invitrogen, Carlsbad, USA |

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Antikörper, sekundär

| Antikörper | Verdünnung | Herstellerinformation |
|-----------------|------------|--|
| Anti-Mouse IgG | 1:1000 | NA9310V, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK |
| Anti-Mouse IgG | 1:400 | Alexa Fluor 488, Cat. No. A11001, Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Anti-Rabbit IgG | 1:3000 | NA934V, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK |
| Anti-Rabbit IgG | 1:400 | Alexa Fluor 594, Cat. No. A-21207, Invitrogen, Carlsbad, USA |

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

Verbrauchsutensilien

| | Herstellerinformation |
|--------------------------------|---|
| 6-Well-inserts | Art.-Nr. BD 353090, Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| 6-Well-Platte | Art.-Nr. BD 353046, Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| 96-Well-Platte | Art.-Nr. 167008, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| 96-Well-Platte, PCR | Art.-Nr. AB-0900, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Eppendorf-Röhrchen | Sarstedt, Nürnberg |
| MicroAmp Optical Adhesive Film | Art.-Nr. 4311971, Applied Biosystems, Waltham, USA |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nürnberg |
| PVDF-Membran | Art.-Nr. 1620177, Bio-Rad, Hercules, USA |
| Röhrchen, 15 ml | Cellstar Tubes, Art.-Nr. 188271, Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Röhrchen, 50 ml | Cellstar Tubes, Art.-Nr. 227261, Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturflaschen 250 ml | Art.-Nr. 658170, Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturschälchen 35 x 10 mm | Art.-Nr. 153066, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

| | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| Zellspatel Cell Scraper 16 cm | Art.-Nr. 83.1832, Sarstedt, Nürnberg |
|----------------------------------|--------------------------------------|

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsutensilien

Geräte

| Gerät | Typ | Herstellerinformation |
|------------------------------|---|---|
| Absorptionsmessgerät | Sunrise | Tecan, Männedorf, Schweiz |
| Elektrophoresekammer | Mini-PROTEAN Tetra Cell | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Fluoreszenzmikroskop | BIOREVO BZ-9000 | Keyence, Osaka, Japan |
| Imager | FluorChem FC2 | CellBiosciences, San Leandro, USA |
| Inkubator | C60 | Labotect, Göttingen |
| Inkubator | HERACELL 150i CO2 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Inkubator | Steri-Cult 200 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Magnetrührer | Ikamag EO-S | Ika, Staufen |
| Mikroskop | Axiovert 25 | Zeiss, Oberkochen |
| Netzgerät, Elektrophorese | Pegpower 300 | VWR International, Erlangen |
| Netzgerät, Tankblot | E835 | Consort, Turnhout, Belgien |
| RT-PCR | 7300 Real Time PCR System | Applied Biosystems, Waltham, USA |
| Rüttelplatte | Duomax 1030 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Rüttelplatte | IKA-VIBRAX VXR | IKA-Werke, Staufen |
| Spektrophotometer | NanoDrop 2000 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Sterilbank | HERAsafe | Heraeus, Hanau |
| Tankblot | peqlab PerfectBlue Tank Electro Blotter Web S | VWR International, Erlangen |

| | | |
|---------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Thermoblock | Techne DRI-BLOCK DB 2A | Bibby Scientific Limited, Stone, UK |
| Thermocycler | 2720 Thermal Cycler | Applied Biosystems, Waltham, USA |
| Ultraschall-Homogenisator | Sonoplus UW 3080 | Bandelin, Berlin |
| Waage | Research R 180 D | Sartorius, Bohemia, USA |
| Zentrifuge | Centrifuge 5418 R | Eppendorf, Hamburg |

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Kits

| Kit | Herstellerinformation |
|---|--|
| cDNA Reverse Transcription Kit | Art.-Nr. 4368814, Applied Biosystems, Waltham, USA |
| CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay | Art.-Nr. G7570, Promega, Fitchburg, USA |
| Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | Art.-Nr. 04744926001, Roche, Basel, Schweiz |
| NuPAGE SDS-PAGE Gel System: - LDS Sample Buffer (4X) (Art.-Nr. NP0008) - Sample Reducing Agent (10X) (Art.-Nr. NP0009) - Antioxidant (Art.-Nr. NP0005) - MOPS SDS Running Buffer (20X) (Art.-Nr. NP0001) - Transfer Buffer (20X) (Art.-Nr. NP0006) - Bolt 4-12 % Bis-Tris Plus Gel, 12 Well (Art.-Nr. BG04122BOX) | Novex, Waltham, USA |
| Pierce BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| RNA purification NucleoSpin RNA II (Art.-Nr. 740955.250) | Macherey-Nagel, Düren |

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kulturmedien und -zusätze

| Medium | Herstellerinformation |
|-------------------|--|
| DMEM | Art.-Nr. D5796, Sigma- Aldrich, St. Louis, USA |
| DMEM ohne Glukose | Art.-Nr. 11966-025, Gibco, Waltham, USA |
| EBM-2 | Art.-Nr. CC-3152, Lonza, Basel, Schweiz |
| EGM-2 BulletKit | Art.-Nr. CC-3162, Lonza, Basel, Schweiz |

Tabelle 6: Verwendete Zellkulturmedien

RT-PCR-Sonden

| Target | ID |
|---------------|---------------|
| β-Aktin | Hs00357333_g1 |
| Claudin 5 | Hs00533949_s1 |
| GR | Hs0035340_m1 |
| Interleukin 6 | Hs00985639_m1 |
| Interleukin 8 | Hs00174103_m1 |
| Occludin | Hs00170162_m1 |
| TNF-Alpha | Hs01113624_g1 |
| VEGF | Hs0090055_m1 |

Tabelle 7: Verwendete RT-PCR-Sondern

Sonstige Substanzen

| Substanz | Herstellerinformation |
|--|---|
| Aceton | Applichem, Darmstadt |
| Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel) | Carl Roth, Karlsruhe |
| β-Mercapto-Ethanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| BSA | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| DAPI | |
| Dexamethason | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| DMSO | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Dulbecco's PBS | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Ethanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Gelatine | Merck, Kenilworth, USA Serva, Heidelberg |

| | |
|---|---|
| Glycerol | Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Glycin | Carl Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| FCS | Hycultec, Beutelsbach |
| Kollagen IV | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Magermilchpulver A0830,1000 | Applichem, Darmstadt |
| Methanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Natriumchlorid | Riedel de Häen, Seelze |
| Natriumdesoxycholat | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Normales Schweineserum | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| P/S | Biochrom, Terre Haute, USA |
| PBS | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Protease-Inhibitor cOmplete Ultra Tablets Mini | Roche, Basel |
| Proteinmarker peq-GOLD V | VWR International, Erlangen |
| Sodiumdodecylsulfat | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| TaqMan Gene Expression Assay | Applied Biosystems, Waltham, USA |
| TaqMan Universal PCR Master Mix | Applied Biosystems, Waltham, USA |
| TEMED | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Tris | Merck, Kenilworth, USA |
| Tissue-Tek O.C.T. Compound | Sakura Fintek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande |
| Trypsin | Biochrom, Terre Haute, USA |
| Tween | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Vectashield Mounting Medium H-1400 | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Wasser | B. Braun, Melsungen |

Tabelle 8: Verwendete Substanzen

3.2. Methoden der Zellkultur

Die Zellkultur erfolgte stets unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank (Heraeus, Hanau), welche zuvor mit Ethanol gereinigt und desinfiziert wurde.

3.2.1. Kultivierung der D3-Zelllinie

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Größe 250 ml bei 37 °C (95 % RH, 5 % CO₂) inkubiert. Diese Flaschen wurden zuvor mit ca. 15 ml 0,5 %-Gelatine-Lösung mit einer Inkubationszeit von mindestens 30 Minuten beschichtet.

Beim verwendeten EBM2-Medium (Lonza, Basel, Schweiz) handelt es sich um ein Wachstumsmedium für Endothelzellen, das mit den im EGM-2 Bulletkit (Lonza, Basel, Schweiz) enthaltenen Zusätzen angesetzt wurde, wobei das im Kit enthaltene Hydrocortison nicht zum Medium hinzugegeben wurde, um einen Einfluss auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors durch das Medium zu verhindern. Das Medium wurde an jedem zweiten bis dritten Tag erneuert, indem zunächst das vorhandene Medium abgesaugt und eine entsprechende Menge frisches, auf 37 °C erwärmtes, Medium hinzugegeben wurde.

Das Passagieren der Zellen, die Aufteilung einer vorhandenen Zellkultur zur weiteren Vermehrung, erfolgte nach ausreichendem Wachstum der Zellen nach fünf bis sieben Tagen. Die Zellen wurde im Verhältnis 1:2 oder 1:3 verdünnt und auf neue Zellkulturflaschen oder -schälchen aufgeteilt. Hierzu wurde zunächst das vorhandene Medium abgesaugt und die Flasche zweimal mit PBS gewaschen. Es wurden 2 ml Trypsin (Biochrom, Terre Haute, USA) pro Flasche zugegeben und bei 37 °C (95 % RH, 5 % CO₂) für zwei Minuten inkubiert. Anschließend wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Ablösung der Zellen erfolgreich war. Bei erfolgreicher Ablösung konnten die Zellen mit neuem Medium versetzt und zur weiteren Kultur 20 ml der Lösung in neue Kulturflaschen überführt oder Zellen für Versuche ausgesät werden.

Für Experimente wurden die Zellen auf mit ca. 3 ml 0,5 %-Gelatine-Lösung beschichtete Zellkulturschälchen der Größe 35 x 10 mm² überführt. Dafür wurde zunächst, analog zum Verfahren beim Passagieren, Medium abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin inkubiert, die Ablösung kontrolliert und in der entsprechenden Verdünnung neues Nährmedium hinzugegeben. Anschließend wurden ca. 2,6 ml der in Medium gelösten Zellen pro Zellkulturschälchen aufgetragen und weiter inkubiert.

Zur Untersuchung der Zytotoxizität der OGD-Behandlung wurden die Zellen analog zum obigen Verfahren kultiviert und passagiert und dann ebenfalls 2,6 ml der Zelllösung je Well einer 6-Well-Platte, welche mit 0,5 %-Gelatine-Lösung beschichtet wurde, ausgesät.

Für Immunfluoreszenz-Versuche wurden je 600 µl der gelösten Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Die Deckgläschen wurden zuvor mit Kollagen IV beschichtet. Dieses wurde für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, danach wurden die Deckgläschen dreimalig mit PBS gewaschen, anschließend konnten die Zellen darauf ausgesät werden.

3.2.2. Kultivierung der C6-Zelllinie

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C (95 % RH, 5 % CO₂) in Zellkulturflaschen der Größe 250 ml, welche zuvor mit einer Inkubationszeit von mindestens 30 Minuten mit ca. 15 ml 0,5 %-Gelatine-Lösung beschichtet wurden. Als Wachstumsmedium wurde DMEM (Gibco, Waltham, USA) verwendet, welches zuvor mit 10 % FCS (Hyclutec, Beutelsbach) und 1 % P/S (Biochrom, Terre Haute, USA) angesetzt worden war; dieses wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Das Passagieren der Zellen erfolgte, sofern die Zellen sich ausreichend vermehrt hatten, nach fünf Tagen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS, wurde 2 ml Trypsin hinzugefügt und zwei Minuten bei 37 °C (95 % RH, 5 % CO₂) inkubiert. Nachdem überprüft wurde, ob die Zellen gelöst wurden, wurde frisches, auf 37 °C erwärmtes, Kulturmedium hinzugegeben und die darin gelösten Zellen auf neue Zellkulturbehältnisse verteilt. Hierbei wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 verdünnt, bei der Aussaat in Zellkulturflaschen wurde 20 ml, bei der Aussaat auf 6-Well-Platten 2,6 ml der verdünnten Zelllösung verwendet.

3.2.3. Kryokonservierung der Zellen

Sofern es nötig war, Zellen für eine spätere Verwendung aufzubewahren, wurden diese eingefroren. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Kulturflasche zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 2 ml Trypsin zugegeben und bei 37 °C (95 % RH, 5 % CO₂) inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle des Erfolgs der Zellablösung wurde 5 ml des Nährmediums hinzugegeben. Danach wurden die Zellen bei 21 °C und 100 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach Entfernung des Mediums wurde zu abgelösten Zellen aus einer großen Zellkulturflasche 2 ml des Einfrierpuffers hinzugegeben und die Zellen in 1 ml fassenden Röhrchen zunächst bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Einfrierpuffer, 1ml

0,1 ml DMSO

0,1 ml FCS

0,8 ml Nährmedium

3.2.4. Auftauen von konservierten Zellen

Zur weiteren Verwendung vorher eingefrorener Zellen mussten diese aufgetaut und wieder in die Zellkultur überführt werden. Hierzu wurden sie zunächst auf 37 °C erwärmt und pro Röhrchen mit 19 ml ebenfalls auf 37 °C erwärmtem Medium vermischt. Anschließend wurden die Zellen auf mit 0,5 %-Gelatine-Lösung beschichteten Zellkulturflaschen ausgesät.

3.3. Vorgehen bei Versuchen

3.3.1. Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (OGD)

Durch die Inkubation der Zellen unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (oxygen glucose deprivation, OGD) wird *in-vitro* eine Ischämie, und damit die Bedingungen wie sie beim ischämischen Schlaganfall auftreten, simuliert.

Zur Umsetzung des Glukose- und Sauerstoffentzugs waren die Zellen, statt dem zur Kultur verwendeten EBM-2- bzw. DMEM-Medium, einem Glukose- und Wachstumsfaktor-freiem Medium ausgesetzt: DMEM ohne Glukose (Gibco, Waltham, USA). Der Sauerstoffentzug wurde durch einen auf 1 %-reduziertem O₂-Gehalt (95 % RH, 37 °C, 5 % CO₂) im Versuchs-Inkubator erreicht.

3.3.2. Versuche unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (OGD)

Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen kultiviert und nach ausreichender Vermehrung in Schälchen oder auf 6-Well-Platten ausgesät. Anschließend wurden sie in den Versuchsgefäßen eine Woche lang weiter kultiviert, um eine ausreichende Vermehrung der Zellen sicherzustellen, wobei alle 2-3 Tage ein Wechsel des Wachstumsmediums durchgeführt wurde. Dann konnte der Versuch begonnen werden. Bei den Versuchszellen wurde zeitgleich mit den Kontrollzellen ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei bei den Kontrollzellen das normale Wachstumsmedium, bei den Versuchszellen das Glukose-freie Medium verwendet wurde. Anschließend wurden die Kontrollzellen in den normalen Inkubator, die Versuchszellen in den Inkubator mit Sauerstoffentzug gestellt. In beiden Versuchsarmen wurden Zellen gleich lange inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde

der Versuch beendet, Versuchs- und Kontrollarm wurden zeitgleich weiterverarbeitet. Zellen für die Protein- oder RNA-Analyse wurden lysiert; für den LDH-Test wurde das Medium gesammelt und aufbewahrt; für die Immunfluoreszenz-Färbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für die Färbung vorbereitet.

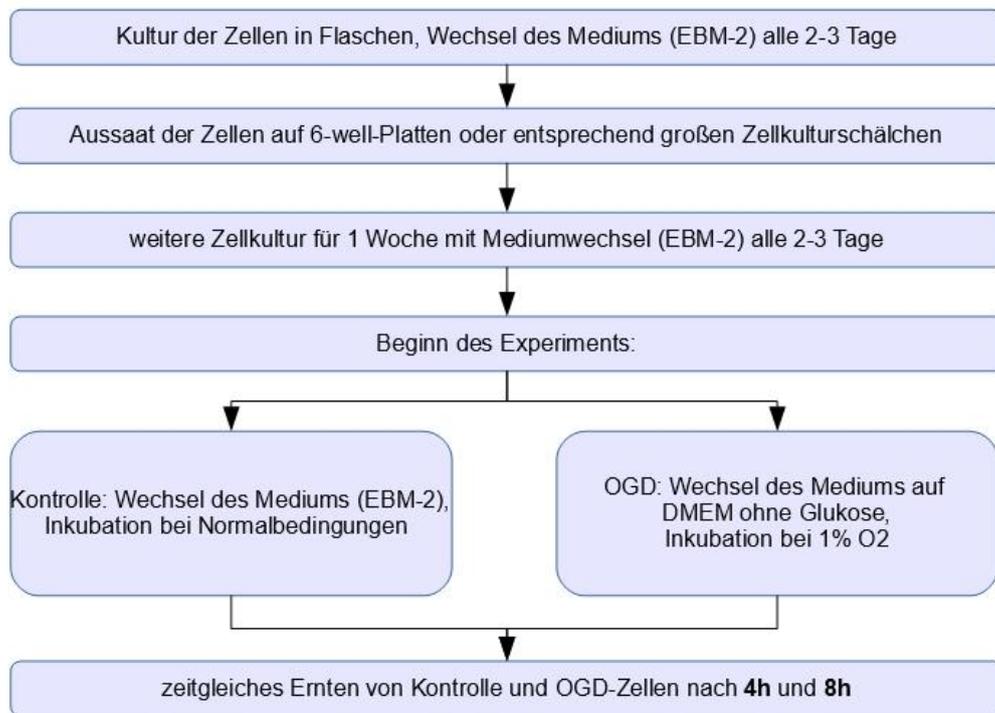


Abbildung 3: Vorgehen bei Versuchen unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (OGD)

3.3.3. Versuche unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen und anschließender Reoxygenierung

Das Vorgehen bei Versuchen unter OGD-Bedingungen und anschließender Reoxygenierung ähnelt dem bei OGD-Versuchen: die Zellen wurde zunächst kultiviert und beim Passagieren in Versuchsschälchen oder 6-Well-Platten ausgesät. Anschließend wurden die ausgesäten Zellen für eine Woche weiter kultiviert, bevor der Versuch begonnen wurde. Zu Versuchsbeginn wurde dann bei den Kontrollzellen das normale Kulturmedium gewechselt, bei den Versuchszellen wurde es durch Glukose- und Wachstumsfaktor-freies Medium ersetzt. Anschließend wurden die Kontrollzellen unter Normalbedingungen, die Versuchszellen unter Sauerstoffentzug inkubiert. Zur Reoxygenierung wurde dann nach 4 Stunden die OGD-Behandlung beendet. Hierzu

wurde bei den Kontrollzellen erneut das Standardmedium gewechselt, bei den Versuchszellen wurde das Medium ebenfalls mit Standardmedium ersetzt. Nach einer Reoxygenierungszeit von 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden (6 Stunden, 8 Stunden und 28 Stunden nach Versuchsbeginn) wurde der Versuch beendet. Die Versuchszellen wurden zeitgleich mit den Normalbedingungen ausgesetzten Kontrollzellen lysiert und für die weitere Analyse aufbewahrt.

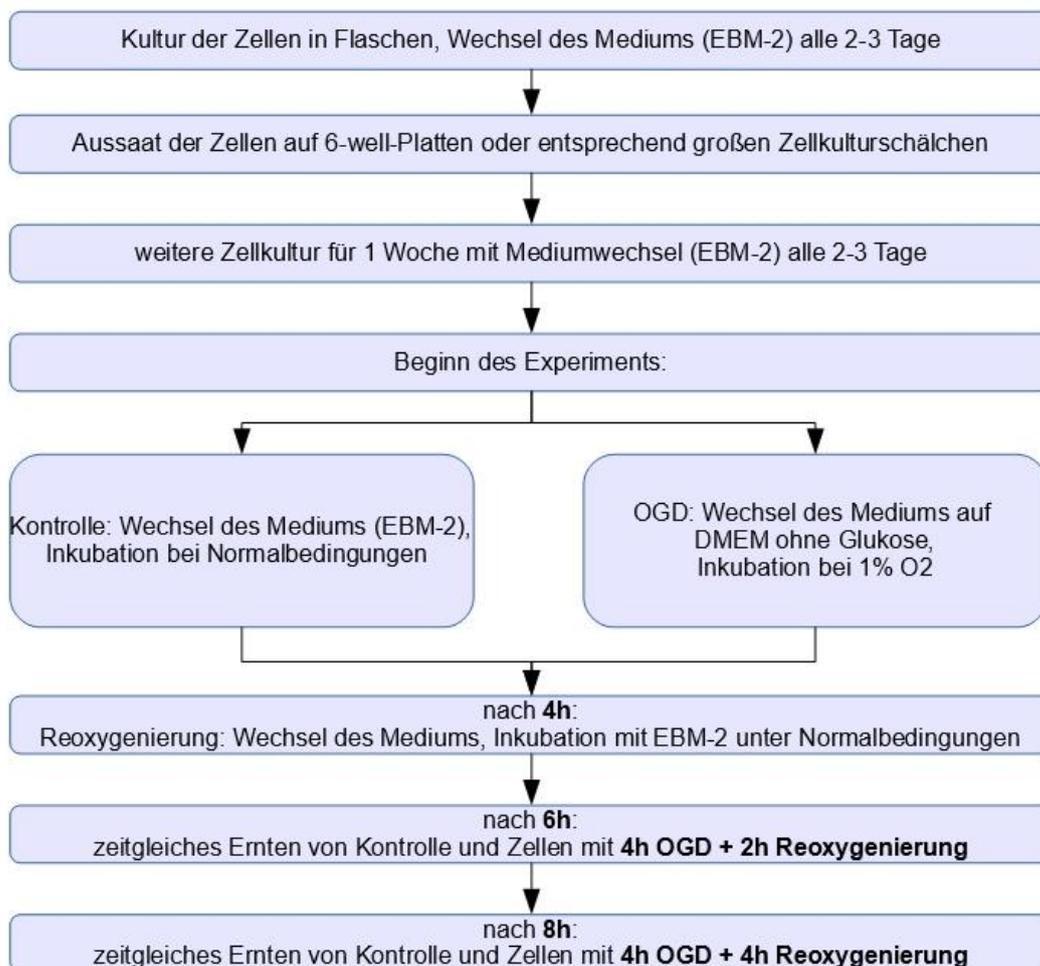


Abbildung 4: Vorgehen bei Versuchen unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (OGD) und anschließender Reoxygenierung

3.3.4. Cokultur-Versuche mit D3- und C6-Zellen

Beide Zellreihen wurden zunächst getrennt voneinander in Zellkulturflaschen kultiviert und vermehrt. Beim Passagieren wurden die C6-Zellen dann in die mit ca. 3 ml 0,5 %-Gelatine-Lösung beschichteten Wells einer 6-Well-Platte ausgesät. Die D3-Zellen wurden auf, zur 6-Well-Platte passenden, Inserts ausgesät. Diese Inserts wurden

zuvor in zweistündiger Inkubation bei 37 °C mit 400 µl Kollagen IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) beschichtet und zweimalig mit PBS gewaschen.

Beide Zelllinien wurden dann weiter getrennt voneinander kultiviert, bis eine ausreichende Zelldichte vorhanden war; aufgrund des schnelleren Wachstums der C6-Zellen war dies bereits nach 5 Tagen der Fall. In dieser Zeit wurde das Wachstumsmedium alle 2-3 Tage gewechselt.

In der Cokultur wurden sowohl Versuche nur unter OGD-Bedingungen sowie auch OGD-Versuche mit anschließender Reoxygenierung durchgeführt. Hierbei wurden die gleichen Zeiten, wie in den Versuchen in denen nur D3-Zellen eingesetzt wurden, eingehalten.

Zu Beginn eines Versuchs wurde zunächst bei allen Zellen das Medium abgesaugt. Dann wurden die Inserts, mit den darauf befindlichen D3-Zellen, in die Wells der 6-Well-Platte, in die die C6-Zellen ausgesät wurden, eingesetzt. Es wurde neues Medium hinzugegeben; bei den Kontrollzellen war dies das normale Wachstumsmedium, bei den Versuchszellen wurde dieses gegen Glukose-freies Medium ausgetauscht. Anschließend wurden die Kontrollzellen unter Standardbedingungen inkubiert, während die Inkubation der Versuchszellen unter Sauerstoffentzug stattfand.

Nach 4 Stunden wurden zum einen ein Teil der Kontroll- und Versuchszellen geerntet, zum anderen wurde bei den Zellen, die für die Reoxygenierungsversuche vorgesehen waren, das Medium gewechselt. Bei den Kontrollzellen wurde hier das Standardmedium gewechselt, bei den Versuchszellen wurde das Glukose-freie Medium durch das Standardmedium ersetzt. Anschließend wurden diese Zellen zusammen unter Standardbedingungen inkubiert. Nach weiteren 2 Stunden (6 Stunden nach Versuchsbeginn) wurden dann Kontroll- und Versuchszellen geerntet, welche nach 4 Stunden OGD-Behandlung reoxygeniert wurden. 2 Stunden später (8 Stunden nach Versuchsbeginn) wurden erneut Zellen mit den dazugehörigen Kontrollen geerntet, die 4 Stunden OGD-Behandlung mit anschließender Reoxygenierung ausgesetzt waren, sowie Zellen, welche 8 Stunden unter OGD-Bedingungen inkubiert wurden. Nach weiteren 20 h (28 Stunden nach Versuchsbeginn) wurden dann die Zellen geerntet, welche einer vierstündigen OGD-Behandlung mit anschließend 24 Stunden Reoxygenierung ausgesetzt waren.

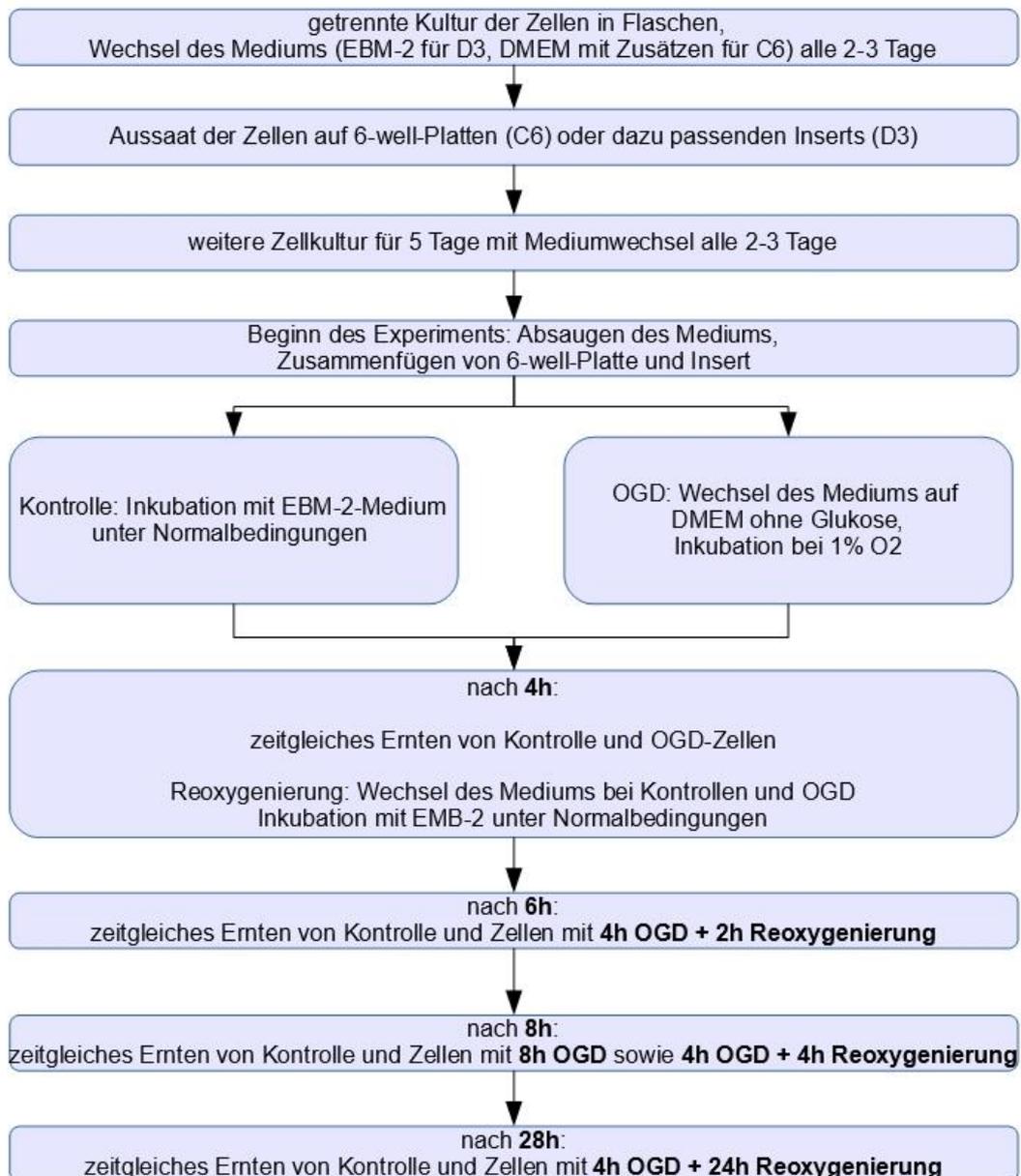


Abbildung 5: Vorgehen bei Cokultur-Versuchen

3.4. Biochemische Methoden

3.4.1. Herstellung von Zelllysaten; Proteinpräparation

Beim Ernten der Zellen zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellkulturschälchen von Versuchszellen und den dazugehörigen Kontrollen auf Eis gelegt und zunächst das vorhandene Medium abgesaugt. Anschließend wurde zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen. Nach der Zugabe von RIPA-Puffer, welcher vorher im Verhältnis 13:2

mit Proteaseinhibitor (Roche, Basel, Schweiz) gemischt worden war, wurden die Zellen mit einem sterilen Spatel abgeschabt und in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert.

Um das Zellgemisch zu homogenisieren, wurden es auf Eis gelagert und mit dem Ultraschall-Homogenisator zehnmal eine Folge von 0,5 s langen und 0,573 kJ starken Pulsen mit dazwischenliegender Pause von 3 s ausgesetzt. Daraufhin wurden die Proben für eine Minute bei 11.000 g und 4 °C zentrifugiert.

Daraufhin wurde entweder das Röhrchen bei -80 °C eingefroren oder die Proteine auf Eis gelagert direkt weiter analysiert und für den Western Blot vorbereitet.

RIPA-Puffer, 50 ml

50 mM Tris pH 8,0

150 mM NaCl

0,1 % SDS

0,5 % Natriumdesoxycholat

1 % NP 40

3.4.2. Proteinmengenbestimmung

Die Gesamtproteinmenge der im Western Blot auf das Gel aufgetragenen Proben muss identisch sein, wenn die Expression einzelner Proteine verglichen werden soll. Zur Herstellung von Proben mit identischer Konzentration aus den Zelllysaten war es somit zuerst notwendig, die Menge des in den Lysaten vorhandenen Proteins zu messen.

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit der BCA-Methode, es wurde der Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet.

Zur Proteinbestimmung wurden 3 µl der zu bestimmenden Proben mit 22 µl Wasser (B. Braun, Melsungen) verdünnt und auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Zudem wurde eine nach Angaben des Herstellers erstellte Verdünnungsreihe mit BSA in Konzentrationen von 2 mg/ml bis 25 µg/ml sowie eine Leerprobe mit Wasser aufgetragen. Anschließend wurden alle gefüllten Wells mit 200 µl der vorher hergestellten BCA-Reaktionslösung (BCA-A und BCA-B im Verhältnis 50:1) versetzt. Die Ansätze wurden dann für 30 Minuten bei 37 °C (95 % RH, 5 % CO₂) inkubiert. Nach dem Abkühlen konnte durch photometrische Messung der Absorption bei 540 nm der Proteingehalt der Proben bestimmt werden; zur Kalibrierung der Messung diente die zuvor hergestellte Verdünnungsreihe.

3.4.3. Vorbereitung des Lysats für Western Blots

Nach Entnahme von 3 µl für die Proteinmengenbestimmung wurde der Rest der Probe mit für die weitere Analyse notwendigen Lösungen versetzt. Bei Verwendung von Standardgelen war dies Lämmli und 6 % β-Mercaptoethanol, bei Gradientengelen handelte es sich um den passenden LDS Sample Buffer und Reducing Agent. Alle Proben wurden dann erneut mit dem Ultraschall-Homogenisator behandelt.

Der Teil des Zelllysats, der nicht zur Durchführung eines Western Blot verwendet wurde, wurde anschließend bei -20 °C für eine mögliche spätere Verwendung eingefroren.

Lämmli 4x, 50 ml

8 % SDS

40 % Glycerol

0,004 % Bromphenolblau

0,25 M Tris HCl pH 6,8

3.4.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Standardgelen

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine ihre Größe nach, um bei der nachfolgenden Antikörperreaktion das Bandenmuster analysieren zu können. Hierbei werden die Proteine in Taschen des polymerisierten Gels pipettiert und anschließend eine Spannung angelegt, wodurch die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und der daraus resultierenden unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit aufgetrennt werden.

Vor diesem Schritt mussten jedoch zunächst die Gele hergestellt werden. Der untere, größere Teil des Gels besteht aus dem Trenngel, der obere, schmale Teil aus dem Sammelgel. Der Ansatz für das Trenngel wurde zwischen zwei in einer Halterung befestigte Glasplatten gegossen, dann wurde eine dünne Wasserschicht aufgetragen, um einen glatten Rand des Gels zu schaffen. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen, anschließend wurde der Ansatz für das Sammelgel aufgetragen. In diesen wurde dann der Kamm zum Formen der Taschen für die Proteine geschoben, wobei darauf geachtet wurde, dass hierbei keine Luftblasen entstanden. Nachdem auch das Sammelgel vollständig polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt, die Glasplatten mit dem fertigen Gel aus der Halterung entfernt und in der Elektrophoresekammer (Bio-Rad, Hercules, USA) befestigt.

Anschließend wurde der Running Puffer hinzugegeben und die Geltaschen mit diesem gespült, um Rückstände des Gels zu entfernen.

Die zu analysierenden Proben wurden 10 Minuten bei 70 °C im Thermoblock erwärmt und nachfolgend in die Geltaschen übertragen. Zur späteren Größenbestimmung wurde an beiden Rändern jeweils eine Tasche des Gels mit 2 µl des Proteinmarkers (VWR International, Erlangen) befüllt.

Zur Auftrennung der Proteine wurde in der Elektrophoresekammer eine Spannung von 60 V mit einem Strom von 500 mA solange angelegt, bis die Proteine bis zum unteren Ende des Gels aufgetrennt waren.

Trenngel Western Blot; 7,5 %

4,85 ml H₂O

2,5 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)

2,5 ml 3M Tris pH 8,8

100 µl 10 % SDS

100 µl 10 % APS

6 µl TEMED

Sammelgel Western Blot

2,85 ml H₂O

850 µl Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)

1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8

50 µl 10 % SDS

50 µl 10 % APS

5 µl TEMED

Running-Puffer Western Blot, 2 l, 10x

60,4 g Tris

376 g Glycin

20 g SDS

3.4.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Gradientengelen

Bei Experimenten, in denen nur kleine Mengen von Protein zur Analyse gewonnen werden konnten, ergab sich das Problem, dass mit den Standardgelen immer nur ein

eingeschränkter Größenbereich gut darstellbar war; eine gleichzeitige Untersuchung von großen und kleinen Proteinen war nicht möglich. Aus diesem Grund wurde das NuPAGE® SDS-PAGE Gel System mit 4-12 % Gel (Novex, Waltham, USA) verwendet. Der Vorteil dieses Systems ist, dass durch Konzentrationsgradienten im Gel die Proteine in allen Bereichen gut aufgetrennt werden. Somit musste der Western Blot nur einmal durchgeführt werden und es wurden nur geringe Proteinmengen benötigt. Anschließend konnte der Blot für viele verschiedene Antikörperreaktion verwendet werden.

Nach dem Lysieren der Zellen wurden 25 µl LDS Sample Buffer und 10 µl Reducing Agent mit 65 µl der Probe vermischt. Es wurde die zum Kit gehörende Elektrophoresekammer mit dem fertig gelieferten Gel bestückt und der äußere Teil der Kammer mit Running Buffer, sowie der innere Teil mit Running Buffer unter Zugabe von Antioxidant, gefüllt.

Die Proteinproben wurden für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Dann wurden 120 V Spannung und 500 mA Strom solange angelegt, bis die Proteine vollständig aufgetrennt waren.

3.4.6. Transfer mittels Semidry-Blot

Um die im Gel aufgetrennten Proteine für den Nachweis mittels Antikörperreaktion zugänglich zu machen, mussten diese zunächst auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad, Hercules, USA) übertragen werden. Dafür wurde das Gel nach Ende der Elektrophorese aus der Fixierung zwischen den Glasplatten entfernt. Die PVDF-Membran wurde mindestens 2 Minuten vollständig mit Methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bedeckt, anschließend wurde sie zusammen mit dem Gel in Schichten aus Filterpapier und Pads im Tankblot (VWR International, Erlangen) fest fixiert; hierbei wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Gel und Membran keine Luftblasen sammeln konnten.

Danach wurde der auf 4 °C gekühlte Transferpuffer in die Kammer des Tankblots hinzugegeben. Zum Transfer wurde eine Spannung von 40 V mit einem Strom von 80 mA für mind. 12 Stunden angelegt, die Temperatur betrug während dieser Zeit maximal 4 °C. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Membran entnommen und durch Inspektion des Markers die vollständige Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran überprüft.

Transferpuffer für Tankblot mit Standardgelen, 2 l

25 mM Tris

192 mM Glycin

400 ml Methanol

7,5 ml 10 % SDS

Transferpuffer für Tankblot mit Gradientengelen, 1 l

50 ml Transfer Buffer (20x)

1 ml Antioxidant

200 ml Methanol

3.4.7. Antikörperreaktion

Die PVDF-Membran mit den darauf übertragenen Proteinen wurde in 5 % Milchpulver (Applichem, Darmstadt) in PBS-Lösung überführt und für 1 Stunde auf einer Rüttelplatte vermischt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran in passend zugeschnittene Kunststoffolie gelegt. Der entsprechende primäre Antikörper wurde verdünnt in 2 ml 1 % BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in PBS - Lösung auf die Membran gegeben und die Kunststoffolie dicht verschweißt und somit ein Auslaufen verhindert. Durch anschließendes Einspannen zwischen zwei Glasscheiben wurde gewährleistet, dass der Antikörper sich auf der gesamten Membran verteilt. Die so verpackte Membran wurde auf einer Rüttelplatte für mind. 12 Stunden bei maximal 4 °C gelagert, danach wurde die Folie wieder geöffnet und die Membran dreimal für 10 Minuten mit 0,1 % Tween (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in PBS-Lösung und einmal 15 Minuten mit 5 % Milchpulver in PBS - Lösung gewaschen. Daraufhin erfolgte die Applikation des sekundären Antikörpers, der verdünnt in 12 ml 1 % BSA in PBS - Lösung angesetzt wurde. Nach mindestens einer Stunde wurde erneut dreimal mit 0,1 % Tween in PBS gewaschen, um dann je 5 ml der ECL I- und ECL II- Lösung auf die Membranen aufzubringen und nach 2 Minuten am Imager (CellBiosciences, San Leandro, USA) ein Bild des Bandenmusters zu erstellen.

ECL-I, 50 ml
1 Cap Luminol
1 Cap PCA
5 mM Tris pH 8,8

ECL-II, 50 ml
5 mM Tris pH 8,8
32 μ l H₂O₂

3.4.8. Lösen von gebundenen Antikörpern

Zur Entfernung vorhandener Antikörper von der Membran wurde Natronlauge verwendet. Dafür wurden die Membranen zunächst für 5 Minuten mit Wasser gewaschen, anschließend wurde die Natronlauge ebenfalls für 5 Minuten hinzugegeben. Nach erneutem Waschen mit Wasser wurde zuletzt noch mit 0,1 % Tween in PBS gewaschen. Anschließend konnten die für eine Antikörperreaktion notwendigen Schritte erneut durchgeführt und ein neues Bild der Banden aufgenommen werden.

3.4.9. Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen

Zur Kontrolle, ob sich Unterschiede in der Intensität der Banden auf eine spezifisch veränderte Proteinsynthese und nicht auf eine abweichende Proteinmenge in der Membran zurückführen ließen, wurde ein gegen β -Aktin gerichteter Antikörper verwendet, da die Menge von β -Aktin auch unter wechselnden Bedingungen weitgehend konstant bleibt.

Dafür wurden zunächst eventuell vorhandene Antikörper gelöst und anschließend 45 Minuten mit 5 % Milchpulver-Lösung gewaschen. Der Antikörper wurde gelöst in 10 ml 1 % BSA in PBS-Lösung aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte dreimaliges Waschen mit 0,1 % Tween in PBS für je 10 Minuten. Auf die Zugabe von je 5 ml ECL I- und ECL II-Lösung folgte nach zweiminütiger Reaktionszeit die Erfassung der Banden.

3.4.10. Untersuchung der Zytotoxizität

Mithilfe des Cytotoxicity detection kits (Roche, Basel, Schweiz) wurde der Einfluss von OGD-Bedingungen auf das Absterben von Zellen untersucht. Der Versuchsaufbau war identisch zu OGD-Versuchen, bei denen Zelllysate zur Analyse gewonnen wurden.

Das Kulturmedium wurde nach Inkubation bei Zellen mit OGD-Behandlung sowie gleich lange inkubierten Kontrollzellen zur Untersuchung der darin enthaltene LDH-Menge gesammelt.

Um den Einfluss von möglicherweise im Nährmedium enthaltener LDH herausrechnen zu können, wurde Kulturmedium gesammelt, welches identisch lange wie die entsprechenden Proben unter Versuchsbedingungen, aber ohne mit Zellen in Kontakt zu sein, inkubiert wurde. Im gleichen Versuch wurde mit dem im Kit enthaltenen Lysepuffer ein Zellysate hergestellt, um die maximal mögliche LDH-Aktivität aller vorhandenen Zellen zu messen. Nachdem das Medium gesammelt wurde, wurden davon 100 µl pro Well auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Pro Well wurden 100 µl der Reaktionsmischung, welche aus Katalysator und Färbelösung im vorgegebenen Verhältnis angesetzt wurde, hinzugegeben. Es wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend die 50 µl Stopplösung pro Well hinzugefügt, um ein Ende der Reaktion zu erreichen. Dann erfolgte die Messung der Absorption bei 492 nm mit Referenz bei 620 nm.

Die Berechnung der Zytotoxizität erfolgte mit der im Kit angegebenen Formel:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{LDH in Versuchszellen} - \text{basales LDH}}{\text{LDH in Kontrolle} - \text{basales LDH}}$$

3.4.11. Untersuchung der Zellvitalität

Zur Untersuchung der Vitalität der Versuchszellen wurde der CellTiter-Glo-Kit (Promega, Fitchburg, USA) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen auf einer 96-Well-Platte ausgesät und kultiviert. Nach ausreichendem Anwachsen der Zellen wurden diese im Versuch OGD- und Kontrollbedingungen ausgesetzt. Nach Ablauf der entsprechenden Zeiten wurde das Kulturmedium entfernt und die Reaktionslösung auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurde die Platte 2 Minuten auf der Rüttelplatte belassen und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnte die Lumineszenz gemessen werden.

3.4.12. Fluoreszenzfärbung von kultivierten Zellen

Zur Fluoreszenzfärbung von auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden diese nach Absaugen des Kulturmediums zunächst für 30 Minuten mit je 1 ml 95 % Ethanol auf Eis gelagert. Anschließend wurden sie für 2 Minuten in auf -80 °C gekühltes Aceton gelegt und anschließend dreimal 5 Minuten mit 1 % BSA in PBS-Lösung gewaschen.

Danach wurde zum Blocken für eine Stunde 5 % NS/1 % BSA in PBS-Lösung aufgetragen. Daraufhin wurde der Primärantikörper in 5 % NS/1 % BSA in PBS-Lösung angesetzt, hinzugegeben und für mindestens 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem fünfminütigem Waschen mit BSA in PBS-Lösung wurde der Sekundärantikörper in 5 % NS/1 % BSA in PBS-Lösung hinzugegeben, gefolgt von einer einstündigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur. Danach wurde dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen, das Mounting Medium aufgetragen und das Deckgläschen auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Trocknung des Mounting Mediums konnte ein Fluoreszenz-Bild angefertigt werden.

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. Herstellung von Zelllysaten für RNA-Gewinnung

Zur Isolation von RNA wurde das Nucleospin RNA II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet.

Bei den behandelten Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend zweimalig mit eiskühlem PBS gewaschen. Anschließend wurden 350 µl der RA1-Lösung des Nucleospin RNA II-Kits mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt und auf die Zellen pipettiert. Die Zellen konnten nun abgeschabt, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80 °C eingefroren werden.

3.5.2. Aufreinigung der RNA

Zunächst wurden die Zellen zur Lyse mindestens zehnmal mit einer sterilen Spritze aufgezogen und wieder in das Röhrchen gegeben, um in einen violetten Nucleospin-Filter überführt und 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert zu werden. Anschließend wurde die gefilterte Lösung mit 350 µl 70 % Ethanol vermischt und in einem blauen Nucleospin-Filter 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. In einem neuen Röhrchen wurden das Lysat mit 350 µl MDB vermischt und erneut 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Jeder Probe wurde dann zum Abbau der im Lysat vorhandenen DNA 95 µl DNase Reaktionsmix, welcher aus 90 µl Reaction Buffer und 10 µl DNase angesetzt wurde, zugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend wurde 200 µl RA2 pro Probe hinzugefügt und für 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. In einem neuen Röhrchen wurde 600 µl RA3 hinzugegeben und erneut 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 250 µl RA3 wurde 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Zur Herstellung der Elution

wurden 40 µl RNase-freies Wasser pro Probe hinzugefügt, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und für 2 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die aufgereinigte RNA bei -80 °C gefroren gelagert.

3.5.3. Messung der RNA-Konzentration

Um die Vergleichbarkeit der Proben sicherzustellen, musste diese auf gleiche RNA-Konzentrationen verdünnt werden. Dafür war es zunächst notwendig, die RNA-Konzentration in den Proben zu bestimmen. Hierfür wurde ein Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet.

3.5.4. Herstellung von cDNA

Zur Durchführung der RT-PCR wurde von den RNA-Proben zunächst cDNA synthetisiert, es wurde das cDNA Reverse Transcription Kit cDNA (Applied Biosystems, Waltham, USA) verwendet. Von jeder Probe wurde 1 µg RNA verwendet, welche ihrer Konzentration entsprechend in einem Volumen von 13,2 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und mit 6,8 µl des Reaktionsmix' gemischt wurde. Anschließend erfolgte die Synthese von cDNA im Thermocycler (Applied Biosystems, Waltham, USA). In diesem wurden die Proben für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert, dann für 2 Stunden bei 37 °C die cDNA synthetisiert und am Ende bei 85 °C für 5 Minuten erhitzt.

cDNA-Reaktionsmix

2 µl 10x RT Buffer

2 µl 10x Random Primers

0,8 µl dNTP Mix

1 µl Reverse Transcriptase

1 µl RNase Inhibitor

3.5.5. Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Zur Untersuchung von Veränderungen der Expression auf RNA-Ebene wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden TaqMan-Sonden und -Reagenzien (Applied Biosystems, Waltham, USA) verwendet.

Die zuvor im Thermocycler hergestellte cDNA wurde zunächst im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt. Auf einer 96-Well-Platte wurden jeweils 9 µl der verdünnten cDNA mit 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix ohne UNG sowie 1 µl der entsprechenden Sonde (TaqMan Gene Expression Assay) vermischt. Die Platte wurde mit Folie

(Applied Biosystems, Waltham, USA) abgedichtet und zentrifugiert. Es wurde darauf geachtet, dass dabei eventuell vorhandene Luftblasen entfernt wurden.

Anschließend konnte der Lauf gestartet werden. Dabei wurde am Anfang für 10 Minuten eine Aktivierung der Enzyme bei 95 °C durchgeführt, es folgten 50 PCR-Zyklen. Am Ende wurden die Proben für 1 Minute auf 60 °C gebracht.

Das Ergebnis wurde mit einer endogenen Kontrolle zum Ausschluss möglicher Konzentrationsunterschiede ausgewertet. Hierzu dienten Proben, bei denen die Expression von β -Aktin mit einer entsprechenden Sonde untersucht wurde.

Reaktionsmix für RT-PCR

9 μ l verdünnte cDNA

1 μ l TaqMan Gene Expression Assay

10 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix no UNG

3.5.6. Densiometrische Auswertung von Western Blots

Die densiometrische Auswertung erfolgte mit dem frei verfügbaren Programm ImageJ. Die Farbintensitätswerte der zu untersuchenden Antikörper wurde durch das Programm gemessen, anschließend wurden diese mit den korrespondierenden Werten von β -Aktin verglichen, um fehlerhafte Ergebnisse durch ungleiche Proteinmengen im Western Blot zu verhindern.

3.6. Statistische Auswertung

Berechnungen wurden mit Microsoft Excel ausgeführt, ebenso die Bestimmung von Standardabweichungen sowie der Signifikanz mit zweiseitigen, unpaarigen T-Tests.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Vitalität von D3-Zellen

Um einschätzen zu können, wie die D3-Zellen auf OGD-Bedingungen reagieren, wurde die Vitalität der Zellen mittels des LDH-Gehaltes im Kulturmedium bestimmt. Es wurden die Zeitpunkte 2 Stunden, 4 Stunden, 8 Stunden, 16 Stunden und 24 Stunden nach Versuchsbeginn ausgewählt und die LDH-Konzentration nach einer Farbreaktion photometrisch gemessen, um den Prozentsatz der abgestorbenen Zellen berechnen zu können (siehe Abbildung 6).

Hierbei zeigte sich, dass die Zellen bereits nach 2 Stunden auf die OGD-Bedingungen reagierten und $14,0 \% \pm 5,9 \%$ der so behandelten Zellen nach dieser Zeit abgestorben waren ($P < 0,05$), während bei den unter Normalbedingungen inkubierten Zellen keine signifikante Änderung der Vitalität festgestellt werden konnte. Nach 4 Stunden waren $20,5 \% \pm 5,4 \%$ der Zellen mit OGD-Behandlung abgestorben ($P < 0,01$), von den Kontroll-Zellen nur $2,0 \% \pm 9,7 \%$ ($P < 0,02$). 8 Stunden nach Versuchsbeginn waren $39 \% \pm 4,5 \%$ der OGD-Zellen abgestorben ($P < 0,01$), während dies bei der Kontrolle nur bei $17,8 \% \pm 8,1 \%$ der Zellen der Fall war ($P < 0,02$). Zum Zeitpunkt 16 Stunden war mit $49,9 \% \pm 8,6 \%$ die Hälfte der OGD-Zellen nicht mehr vital ($P < 0,01$), bei 24 Stunden war mit $79,3 \% \pm 18,5 \%$ bereits ein Großteil der Zellen abgestorben ($P < 0,01$). In der Kontrollreihe lagen diese Werte bei $26,6 \% \pm 9,2 \%$ für 16 Stunden ($P < 0,01$) und $28,3 \% \pm 9,8 \%$ für 24 Stunden ($P < 0,01$).

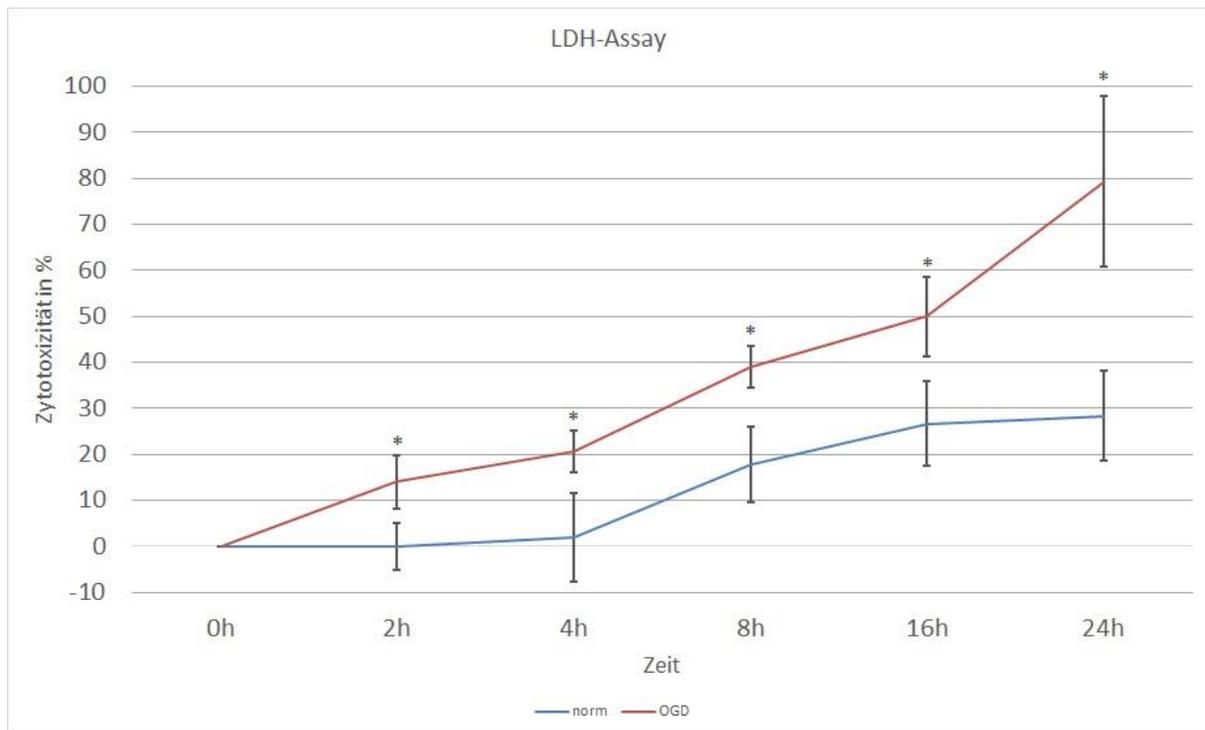


Abbildung 6: Verlauf der Zytotoxizität in OGD-(rot) und Kontrollreihe(blau) im LDH-Assay des OGD-Versuchs mit D3-Zellen

Der Befund des relativ starken Anstiegs der Zytotoxizität nach dem Passieren der 4 Stunden-Marke ließ sich gut mit der Beobachtung von zunehmendem Detritus und abnorm geformten oder offensichtlich nicht vitalen Zellen im mikroskopischen Bild der unter OGD-Bedingungen inkubierten Zellkultur vereinbaren. Dies war bereits nach 4 Stunden in Ansätzen zu sehen und nach 8 Stunden deutlich ausgeprägt. Nach 16 Stunden und 24 Stunden waren vitale Zellen im Mikroskop nur noch schwer bzw. gar nicht auszumachen.

Mit der, durch längere OGD-Zeit, zunehmenden Zytotoxizität konnte damit zunächst gezeigt werden, dass die Zellen in diesem *in-vitro*-Modell ebenso wie Zellen *in-vivo* mit Zellschädigung auf eine Ischämie reagieren.

Zur weiteren Beurteilung der Zellvitalität wurde der Versuch mit einem Viability-Assay überprüft (siehe Abbildung 7). Hierbei zeigte sich, dass die Vitalität während des Versuchszeitraumes in den Kontrollen beinahe konstant blieb. Unter OGD-Bedingungen sank sie mit zunehmender Dauer immer weiter ab; zunächst auf 90,4 % ± 1,6 % nach 2 Stunden, dann auf 80,3 % ± 1,1 % nach 4 Stunden, auf 71,7 % ± 0,9 % nach 6 Stunden, auf 24,7 % ± 0,3 % nach 18 Stunden und auf 22,3 % ± 0,3 % nach 24 Stunden (P<0,01).

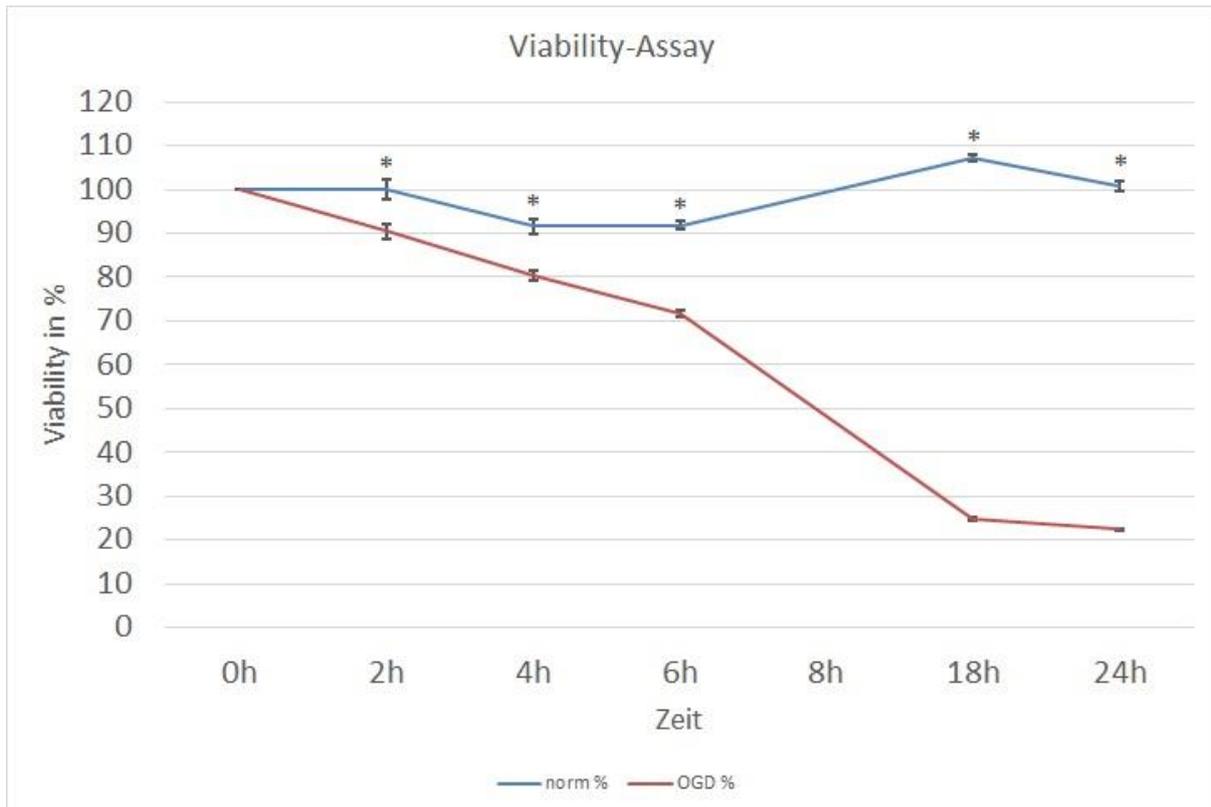


Abbildung 7: Verlauf der Cell viability in OGD-(rot) und Kontrollreihe(blau) im CellTiter Glo-Assay des OGD-Versuchs mit D3-Zellen

Zur Beobachtung von möglichen Auswirkungen der OGD-Behandlung auf die RNA- oder Proteinexpression erschien vor allem der Zeitpunkt 4 Stunden als geeignet, da hier bereits ein deutlicher Einfluss des Nähr- und Sauerstoffzugs auf die Zellen vorhanden war, diese jedoch noch nicht so stark dezimiert waren, dass die Proteinbiosynthese stark eingeschränkt oder nicht mehr möglich wäre. Ergänzend wurde in einigen Untersuchungen der Zeitpunkt nach 8 Stunden OGD-Behandlung untersucht.

4.2. Einfluss von OGD-Bedingungen auf Entzündungsmarker

Nachdem bereits die zytotoxische Wirkung der OGD-Behandlung auf die D3-Zellen gezeigt wurde, sollte durch die Untersuchung der RNA-Expression die direkten Auswirkungen dieser Behandlung auf den Metabolismus der Zellen untersucht werden. Da Zellen *in-vivo* in der Regel mit einer Entzündungsreaktion auf eine Ischämie reagieren, wurden die Zytokine TNF-Alpha, VEGF sowie Interleukin 6 und 8 für die RNA-Analyse ausgewählt.

Die D3-Zellen wurden einer vierstündigen OGD-Behandlung ausgesetzt, anschließend wurde ein Teil mit den dazugehörigen Kontrollen direkt lysiert, bei einem anderen Teil

wurde eine 24-stündige Reoxygenierung angeschlossen. Aus den Lysaten wurde die RNA isoliert, mit dieser wurde cDNA synthetisiert und damit anschließend eine RT-PCR durchgeführt.

4.2.1. TNF-Alpha

Die Expression von TNF-Alpha zeigte sich nach 4 Stunden OGD-Behandlung um $350 \% \pm 155 \%$ erhöht ($p < 0,05$). Nach der folgenden Reoxygenierung von 24 Stunden war weiterhin ein Unterschied zwischen OGD-behandelten Zellen und Kontrollen zu sehen, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant und im Verhältnis deutlich geringer. Dies deutet darauf hin, dass die Entzündungsreaktion nach der Reoxygenierung bereits rückläufig war (siehe Abbildung 8).

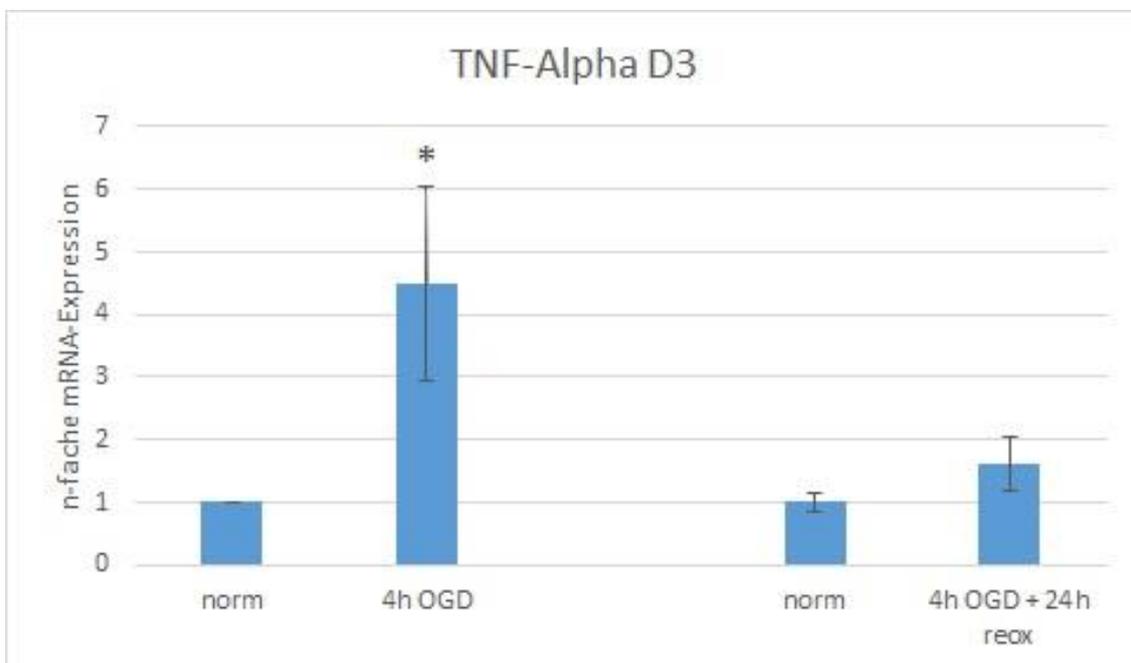


Abbildung 8: Relative Veränderung der Expression von TNF-Alpha in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR

4.2.2. VEGF

Die VEGF-Expression war nach einer vierstündigen OGD-Behandlung deutlich erhöht, um $236 \% \pm 98 \%$ ($p < 0,05$). Nach der Reoxygenierung von 24 Stunden war nur noch ein geringer Unterschied in der Expression vorhanden, was auf eine Erholung der Zellen durch die erneute Zugabe von Nährstoffen und Sauerstoff hinweist (siehe Abbildung 9).

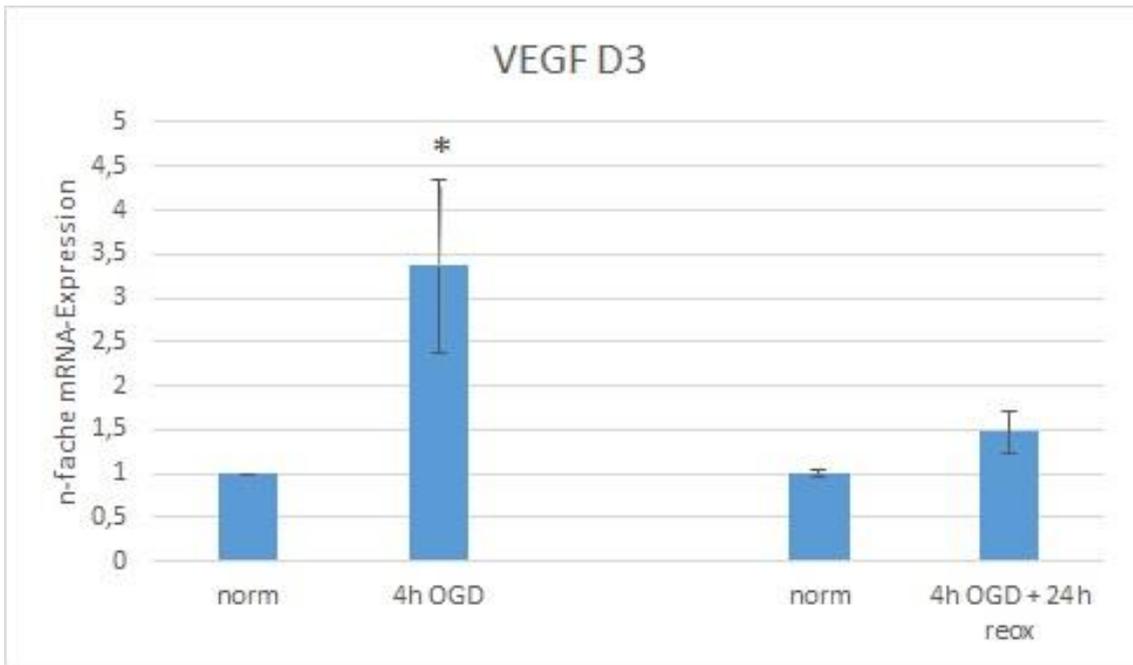


Abbildung 9: Relative Veränderung der Expression von VEGF in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR

4.2.3. Interleukin 6

Die Expression von Interleukin 6 war nach 4 Stunden OGD deutlich, aber statistisch nicht signifikant, erhöht ($p=0,09$). Eine unterschiedliche Expression war nach der Reoxygenierung über 24 Stunden nicht mehr nachweisbar, die Expression in OGD-Zellen und Kontrollen befand sich auf dem gleichem Niveau (siehe Abbildung 10).

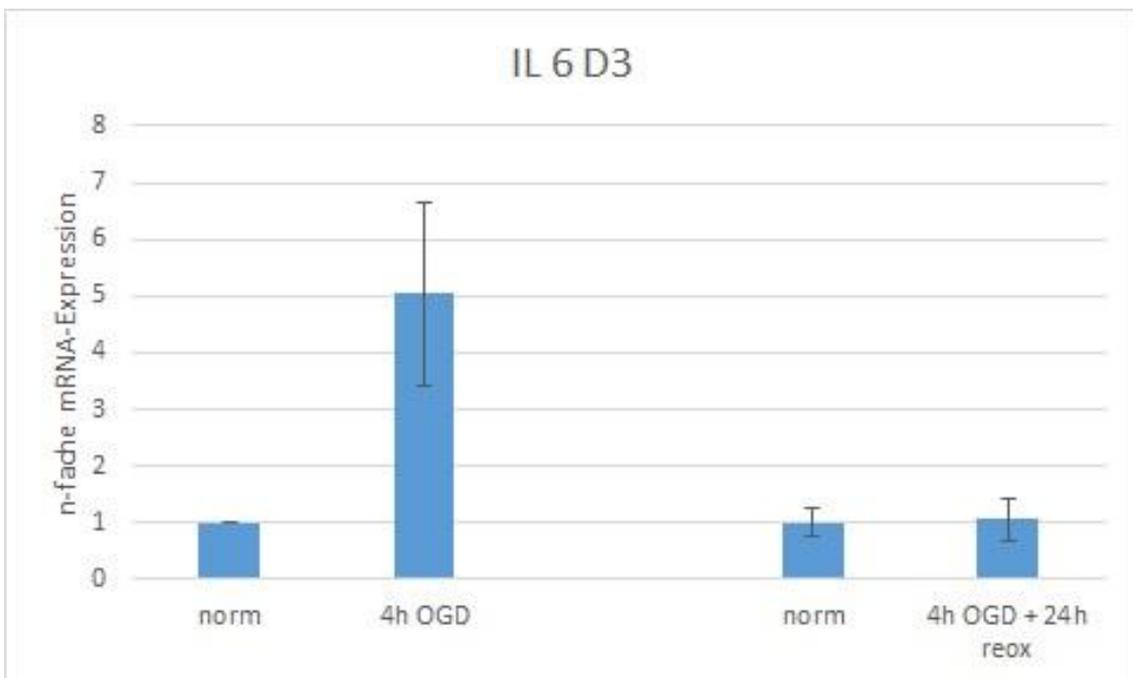


Abbildung 10: Relative Veränderung der Expression von Interleukin 6 in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR

4.2.4. Interleukin 8

Nach 4 Stunden OGD war die Synthese von Interleukin 8 deutlich, aber nicht signifikant, erhöht ($p=0,10$). Auch nach der 24-stündigen Reoxygenierung war dies noch der Fall, jedoch mit deutlich rückläufiger Tendenz. Diese Veränderung war statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 11).

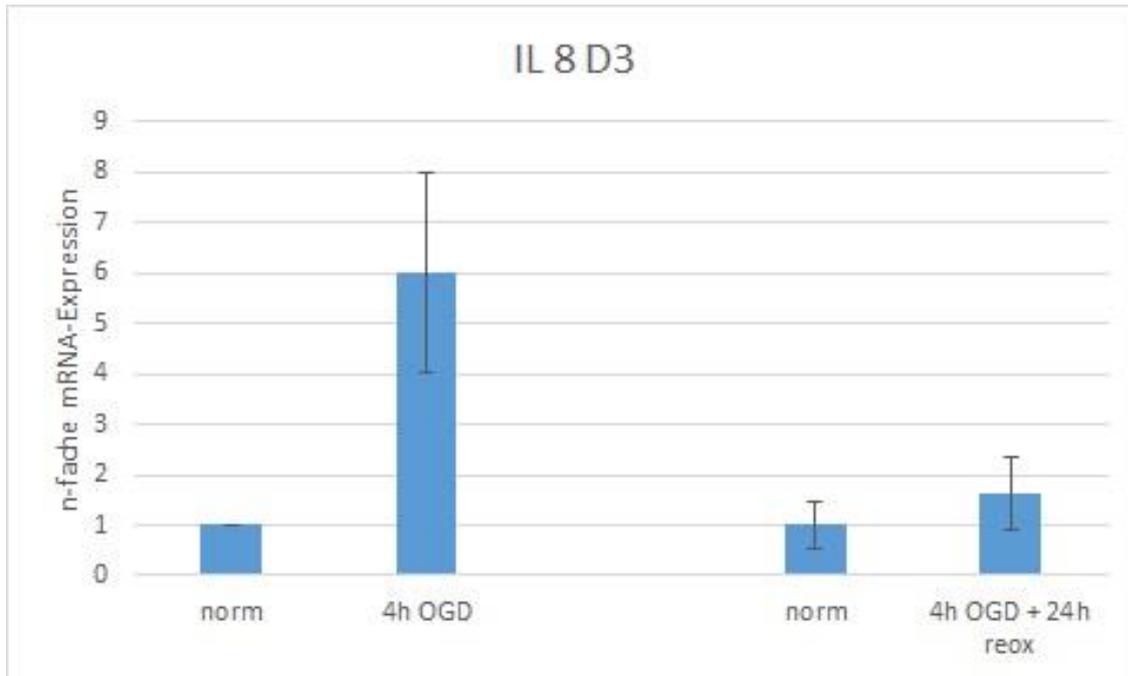


Abbildung 11: Relative Veränderung der Expression von Interleukin 8 in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR

Die angestiegene RNA-Synthese von verschiedenen Zytokinen kann als Korrelat für die Entzündungsreaktion gesehen werden, mit welcher die D3-Zellen auf die OGD-Bedingungen reagieren. Diese war bei allen untersuchten Markern nach 4 Stunden OGD-Behandlung deutlich ausgeprägt, zudem zeigte sich in allen Untersuchungen die potentielle Reversibilität der Veränderungen durch eine Reoxygenierung, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß.

4.3. Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Synthese von RNA der Tight junction-Proteine

Da die Integrität der Blut-Hirn-Schranke im Wesentlichen von den Tight junctions der Endothelzellen aufrechterhalten wird, geht eine Störung der Dichtigkeit in der Regel mit einer Veränderung dieser Proteine einher.

Eine durch OGD-Behandlung induzierte Veränderung der Expression dieser Tight junction-Proteine in D3-Zellen würde der *in-vivo* vorhandenen, Ischämie-induzierten Schrankenstörung von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke entsprechen. Zur

Klärung der Frage, ob sich die Expression dieser Proteine veränderte, wurde ebenfalls RNA analysiert. Es wurden exemplarisch die Proteine Claudin 5 und Occludin ausgewählt, da diese ein wichtiger Baustein der Integrität der Blut-Hirn-Schranke sind.

4.3.1. Claudin 5

Die Expression von Claudin 5 war nach 4 Stunden OGD-Behandlung um $15,3\% \pm 10,8\%$ ($p < 0,05$) reduziert.

Nach 4 Stunden OGD-Bedingungen mit 24 Stunden Reoxygenierung ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung (siehe Abbildung 12).

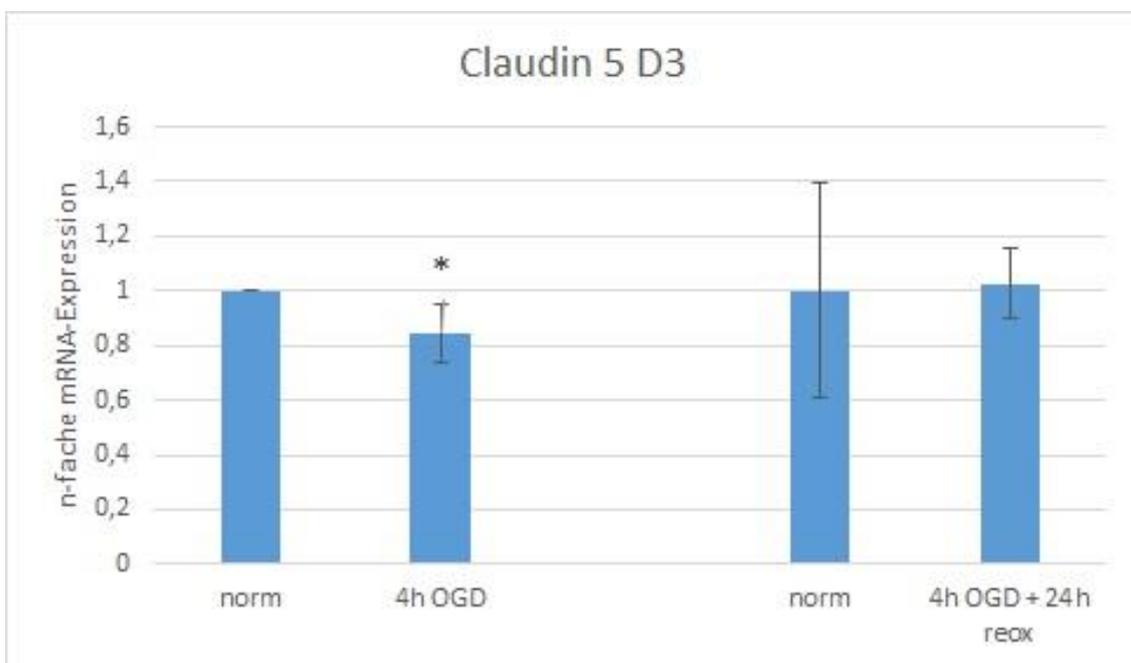


Abbildung 12: Relative Veränderung der Expression von Claudin 5 in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR

4.3.2. Occludin

Die Expression von Occludin zeigte keine statistisch relevante Abweichung nach 4 Stunden OGD-Behandlung sowie nach 4 Stunden OGD-Behandlung mit anschließender Reoxygenierung über 24 Stunden (siehe Abbildung 13).

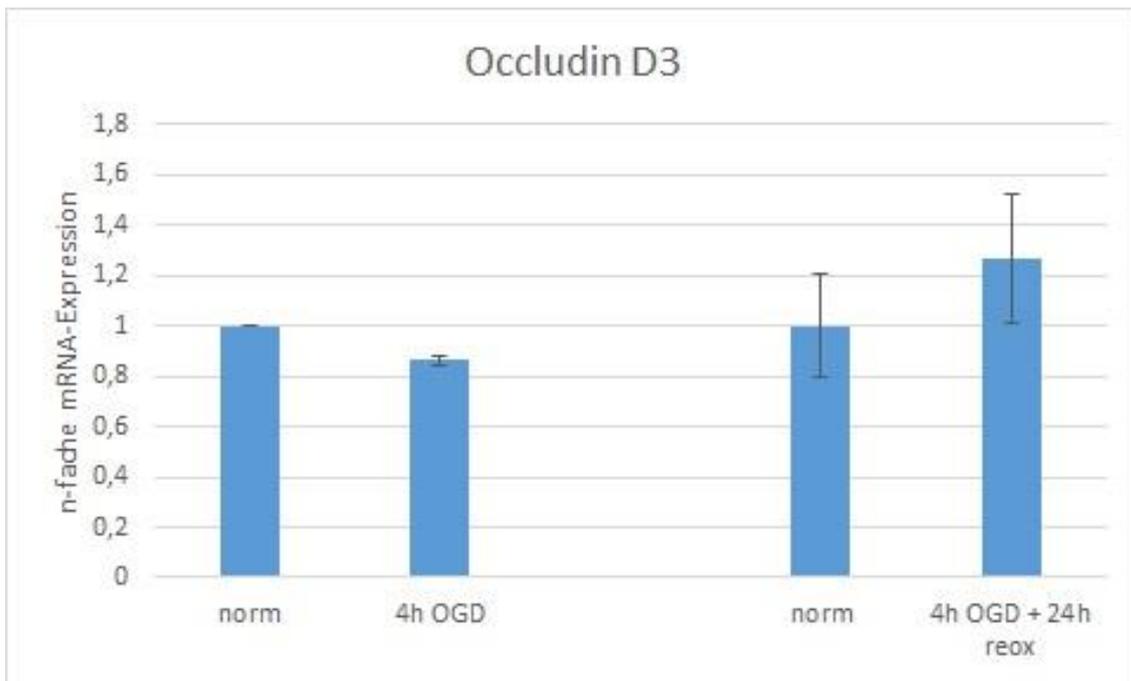


Abbildung 13: Relative Veränderung der Expression von Occludin in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR

4.4. Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Expression von Proteinen in D3-Zellen in Cokultur

Zur weiteren Untersuchung der Veränderungen der Tight junctions wurde eine Cokultur mit D3-Zellen als Modell für die Endothelzellen mit der Gliom-Zelllinie C6 durchgeführt, wie sie bereits mit murinen Endothelzelllinien durchgeführt wurde (Neuhaus, Gaiser et al. 2014). Dieser Versuchsaufbau wurde gewählt, um die physiologischen und pathophysiologischen Prozesse, welche *in-vivo* ablaufen, besser abbilden zu können. Das Mikromilieu im zentralen Nervensystem wird nicht nur durch die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke, sondern auch durch die vielfältigen Prozesse, welche von Astrozyten ausgeführt werden, aufrechterhalten. Sie sind damit für das Überleben der Neuronen essentiell. Aber auch für die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke ist der regulatorische Einfluss von Astrozyten auf die Endothelzellen der hirnersorgenden Gefäße bedeutsam. Im Schlaganfall spielen sie eine wichtige Rolle beim Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Neuhaus, Gaiser et al. 2014).

Mit den Zelllysaten, welche nach einer OGD-Behandlung gewonnen wurden, wurde ein Western Blot angefertigt und mit verschiedenen Antikörpern die Tight junction-Proteine überprüft.

4.4.1. Expression von Claudin 1

Zur Untersuchung der Expression von Claudin 1 wurden Western Blots durchgeführt (siehe Abbildung 14).

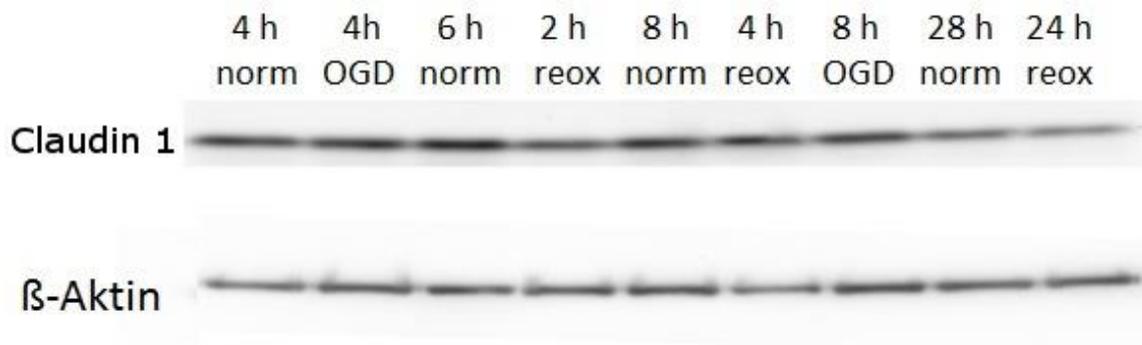


Abbildung 14: Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung Claudin 1-Antikörper (oben) und β-Aktin-Antikörper (unten)

Die Expression von Claudin 1 zeigte zu allen Zeitpunkten geringe Unterschiede in der Expression, welche jedoch statistisch nicht signifikant waren (siehe Abbildung 15).

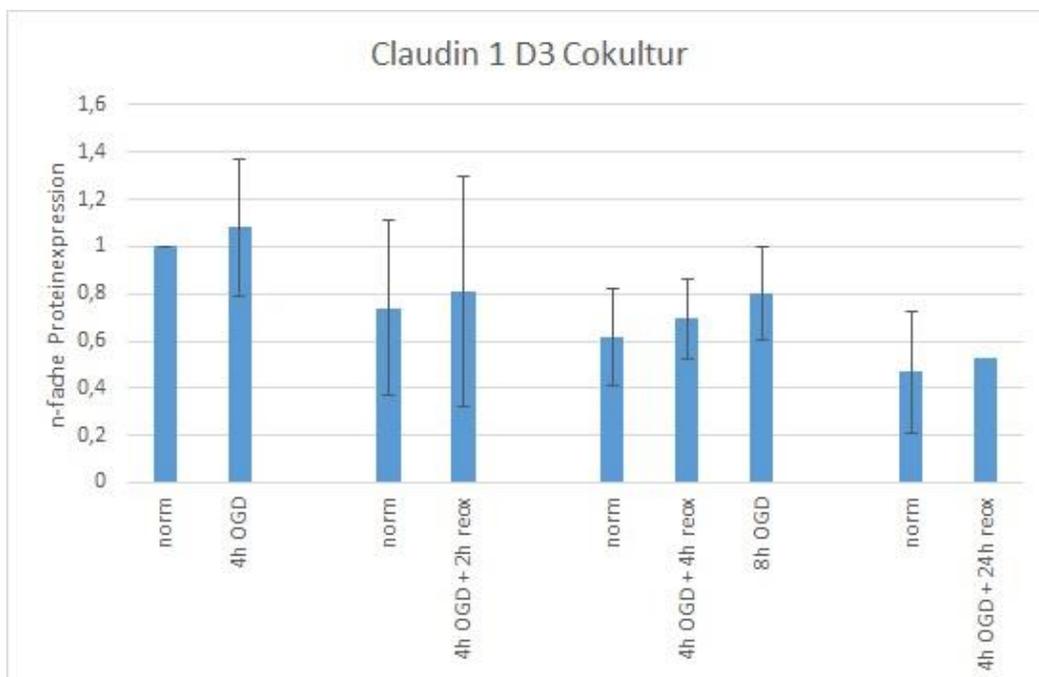


Abbildung 15: Relative Veränderung der Expression von Claudin 1 in Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung

4.4.2. Expression von ZO-1

Die Expression von ZO-1 wurde mittels Western Blot untersucht (siehe Abbildung 16).

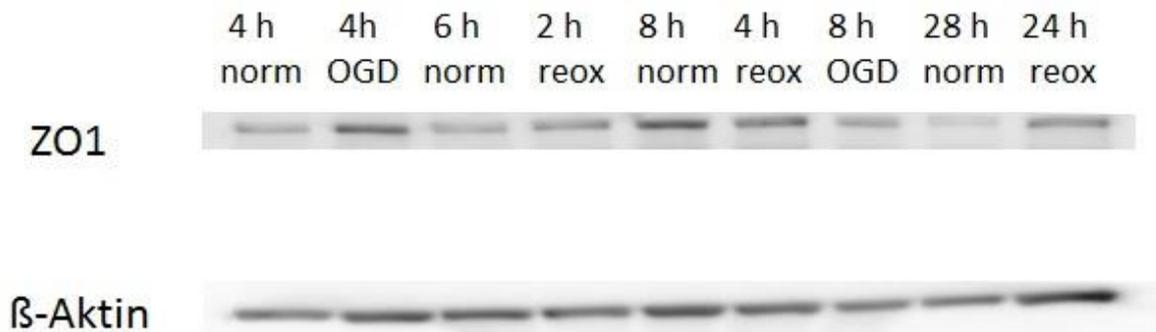


Abbildung 16: Western Blots mit D3-Zellen aus Kokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung ZO-1-Antikörper (oben) und β-Aktin-Antikörper (unten)

Die Expression von ZO-1 zeigte nach 4 Stunden OGD-Bedingungen einen Anstieg um $104,5 \% \pm 42,7 \%$, dieser Anstieg war statistisch nicht signifikant ($p=0,07$). Zu den anderen Zeitpunkten waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten (siehe Abbildung 17).

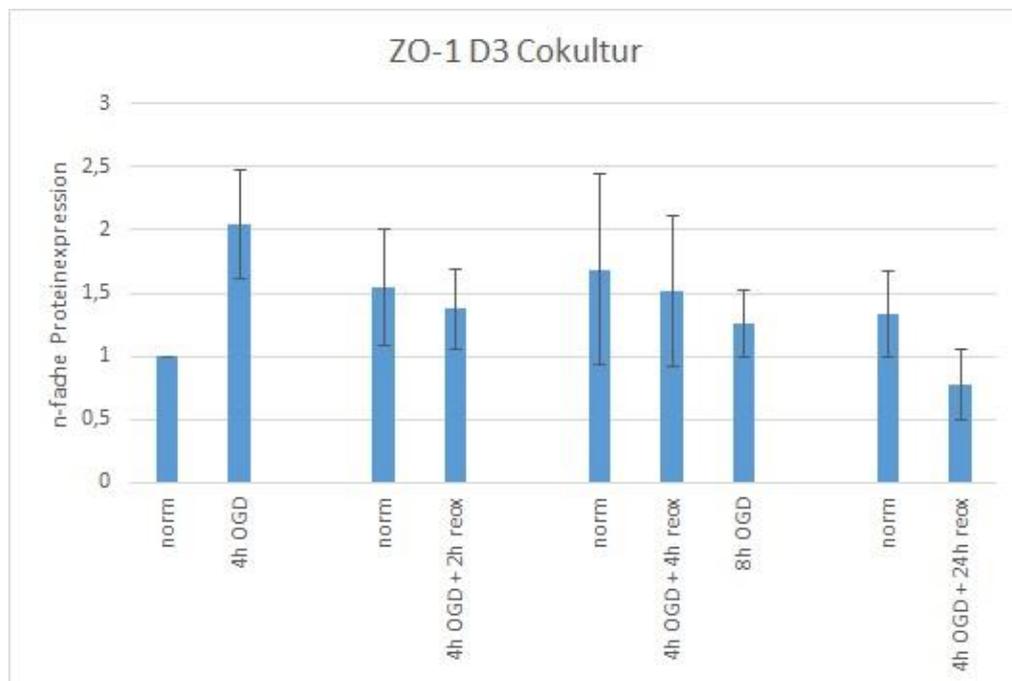


Abbildung 17: Relative Veränderung der Expression von ZO-1 in Western Blots mit D3-Zellen aus Kokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung

4.4.3. Expression von VCAM

Um die Expression von VCAM zu untersuchen, wurden Western Blots angefertigt. (siehe Abbildung 18).

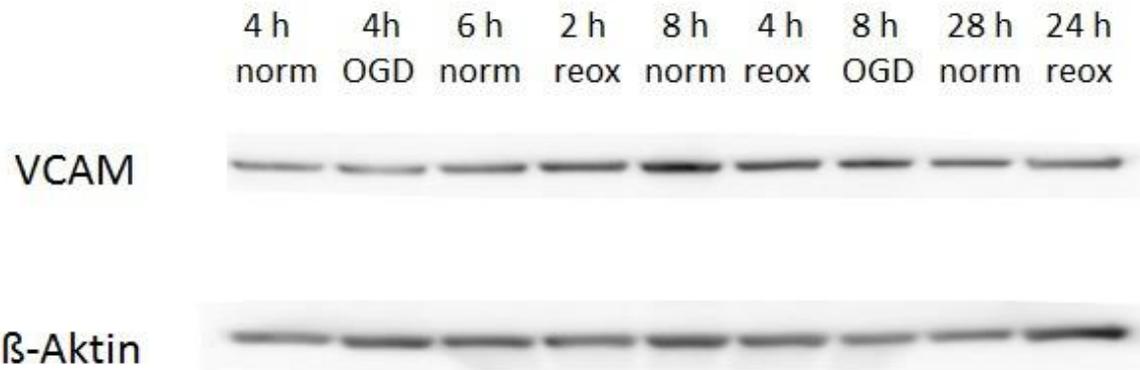


Abbildung 18: Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung VCAM-Antikörper (oben) und β-Aktin-Antikörper (unten)

Die Expression von VCAM zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 19).

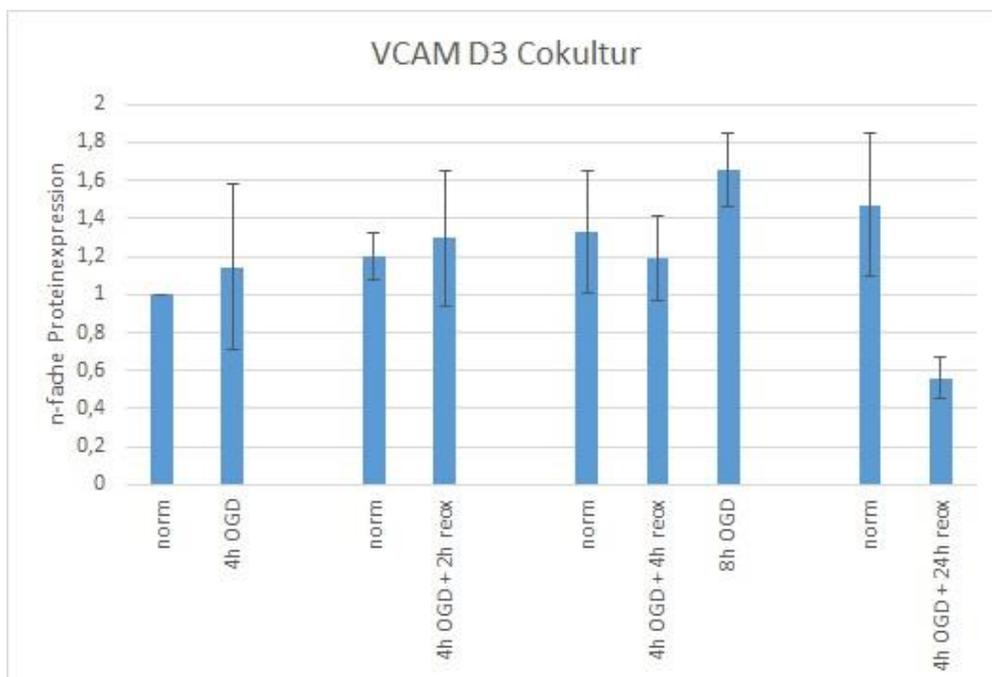


Abbildung 19: Relative Veränderung der Expression von VCAM in Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung

4.5. Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors in D3-Zellen

4.5.1. Einfluss von OGD-Bedingungen auf die RNA-Synthese des Glukokortikoidrezeptors in D3-Zellen

Zur Untersuchung der GR-Expression auf RNA-Ebene wurde eine RT-PCR analog zur Untersuchung der Inflammationsmarker und Tight junction-Proteine durchgeführt. Bei der Untersuchung der RNA-Expression zeigte sich ein leichter Anstieg, sowohl nach 4 Stunden OGD-Bedingungen, wie auch nach 4 Stunden OGD-Behandlung mit folgender Reoxygenierung für 24 Stunden. Diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 20).

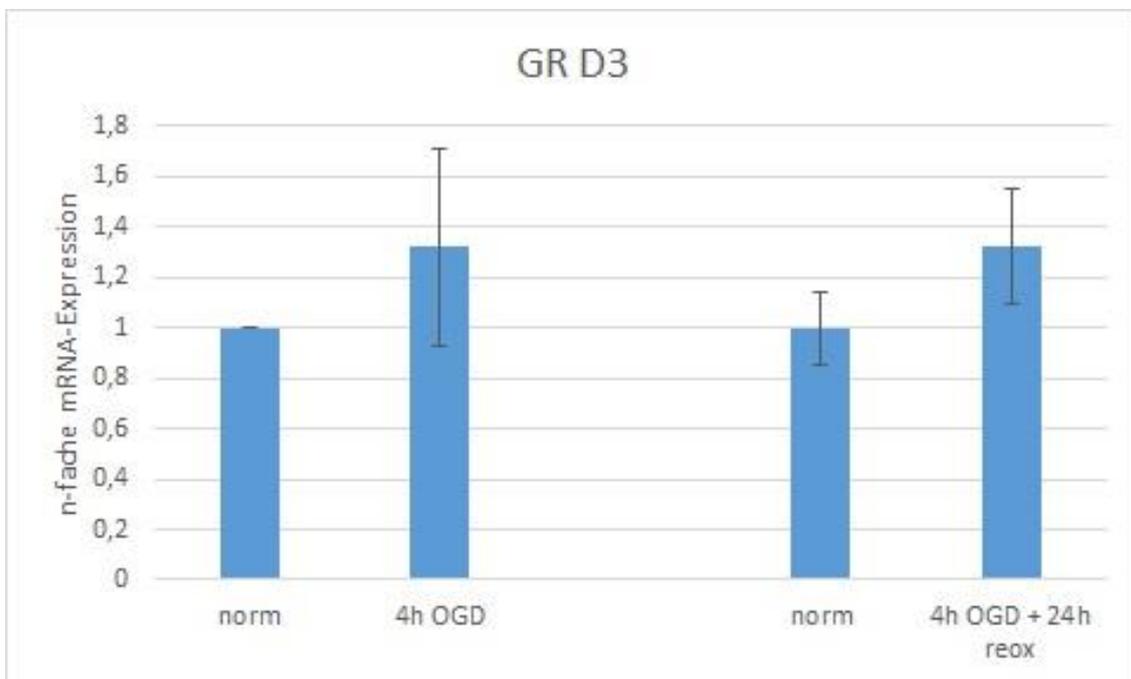


Abbildung 20: Relative Veränderung der Expression von GR in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR

4.5.2. OGD-Bedingungen für 4 Stunden und für 8 Stunden

Für einen ersten Hinweis auf eine veränderte Expression des GR auf Proteinebene wurden OGD-Versuche mit 4 Stunden und 8 Stunden OGD-Behandlung durchgeführt und die Proben anschließend im Western Blot untersucht (siehe Abbildung 21).

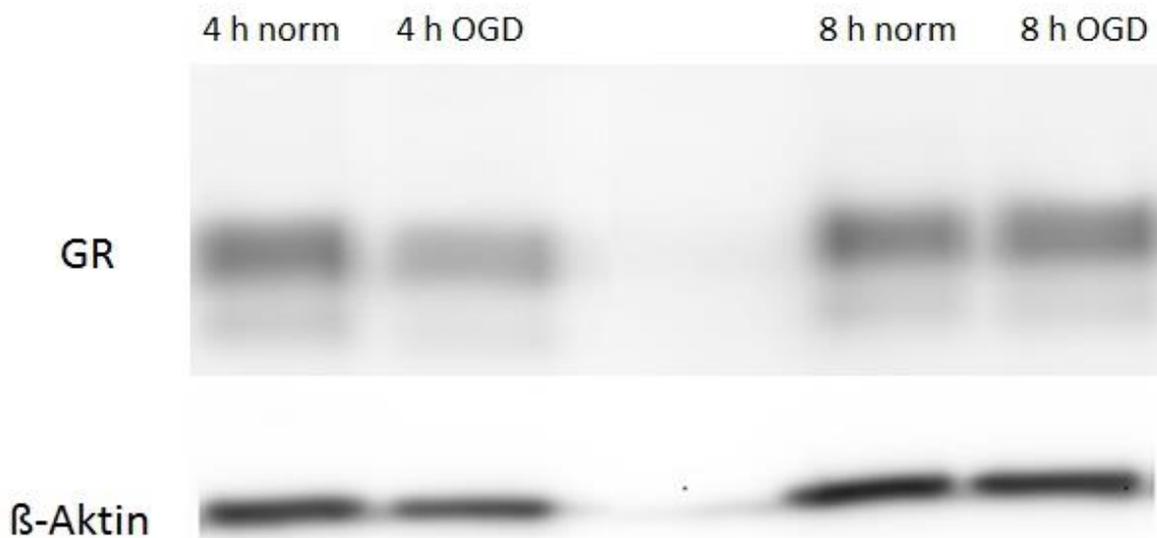


Abbildung 21: Western Blots mit D3-Zellen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 8 Stunden Normalbedingungen und 8 Stunden OGD; Banden nach Behandlung GR-Antikörper (oben) und β -Aktin-Antikörper (unten)

Es ließ sich eine Verringerung der Expression des Glukokortikoidrezeptors nach 4 Stunden auf $82 \% \pm 33 \%$ ($P < 0,05$) feststellen. Nach 8 Stunden OGD-Bedingungen zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung (siehe Abbildung 22).

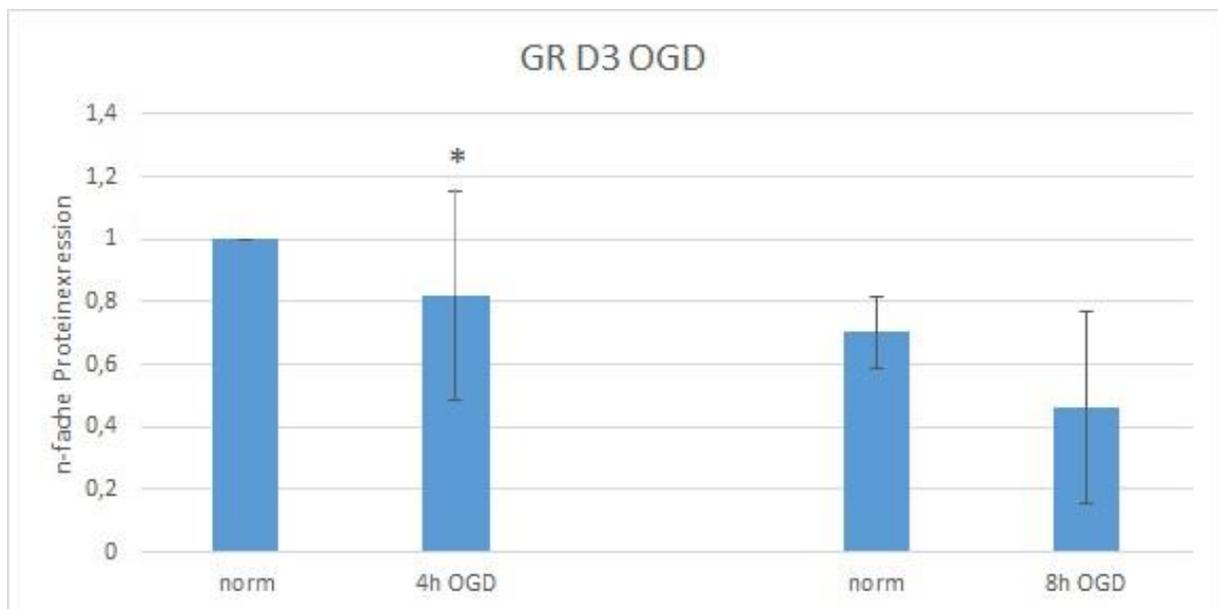


Abbildung 22: Relative Veränderung der Expression des Glukokortikoidrezeptors in Western Blots mit D3-Zellen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und; 8 Stunden Normalbedingungen und 8 Stunden OGD

4.5.3. OGD-Bedingungen für 4 Stunden mit anschließender Reoxygenierung

Um eine möglicherweise erst in der Erholungsphase nach einer Ischämie erfolgende Veränderung der GR-Expression zu untersuchen, wurde nach einer 4 Stunden OGD-Behandlung eine Reoxygenierung mit verschiedenen Zeiträumen durchgeführt (siehe Abbildung 23).

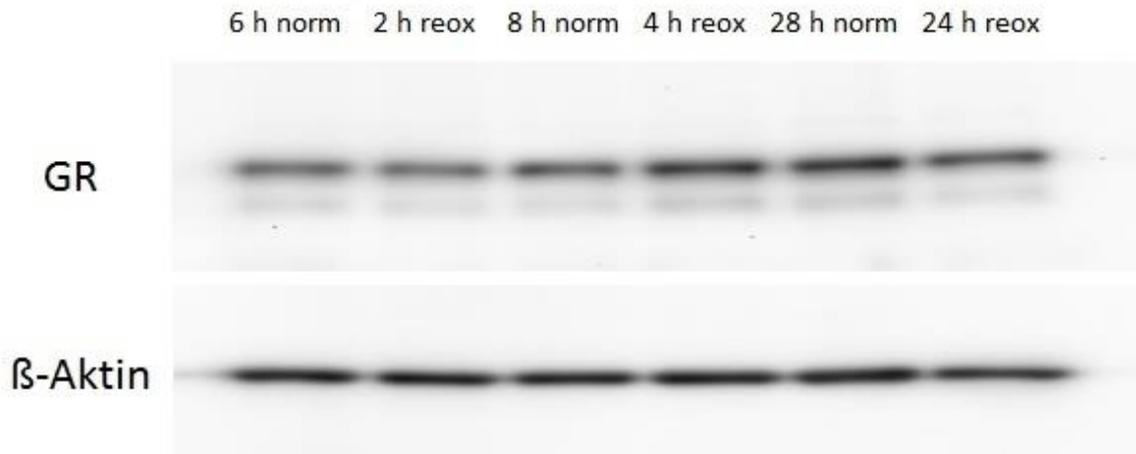


Abbildung 23: Western Blots mit D3-Zellen aus Reoxygenierungs-Versuchen nach: 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung GR-Antikörper (oben) und β-Aktin-Antikörper (unten)

Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der GR-Expression nach 4 Stunden OGD-Behandlung mit anschließender Reoxygenierung unterschiedlicher Zeiträume (siehe Abbildung 24).

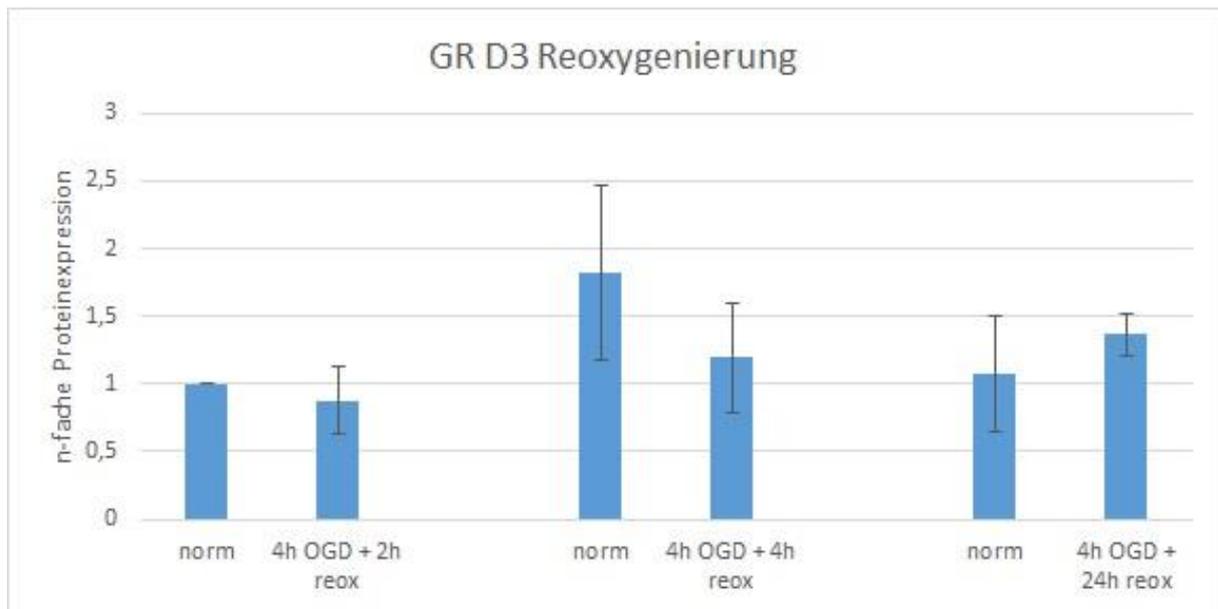


Abbildung 24: Relative Veränderung der GR-Expression in Western Blots mit D3-Zellen aus Reoxygenierungs-Versuchen nach: 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen und, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung

4.5.4. Expression des Glukokortikoidrezeptors in Cokultur-Versuchen

Zur Untersuchung der GR-Expression wurden die Proben aus der Cokultur von D3- und C6-Zellen verwendet (siehe Abbildung 25).

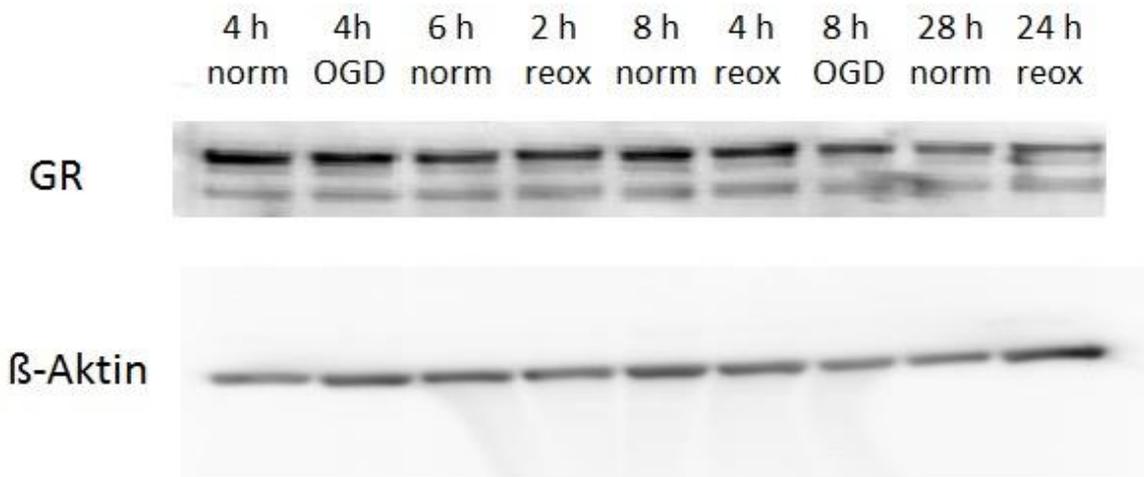


Abbildung 25: Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung GR-Antikörper (oben) und β-Aktin-Antikörper (unten)

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expression des Glukokortikoidrezeptors nach 4 Stunden OGD-Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle um 44,5 % ± 11,8 %

($P < 0,02$). Bei 2 Stunden Reoxygenierung nach 4 Stunden OGD-Behandlung zeigte sich eine reduzierte GR-Expression gegenüber der Kontrolle. Nach 8 Stunden OGD-Behandlung sowie 4 Stunden OGD-Bedingungen mit 4 Stunden Reoxygenierung zeigte sich gegenüber der Kontrolle, welche 8 Stunden unter Normbedingungen inkubiert wurde, keine Veränderung in der GR-Konzentration. Bei der Probe, welche nach vierstündiger OGD für 24 Stunden reoxygeniert wurde, zeigte sich eine Verringerung der Expression der GR gegenüber den Normalbedingungen. Diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 26).

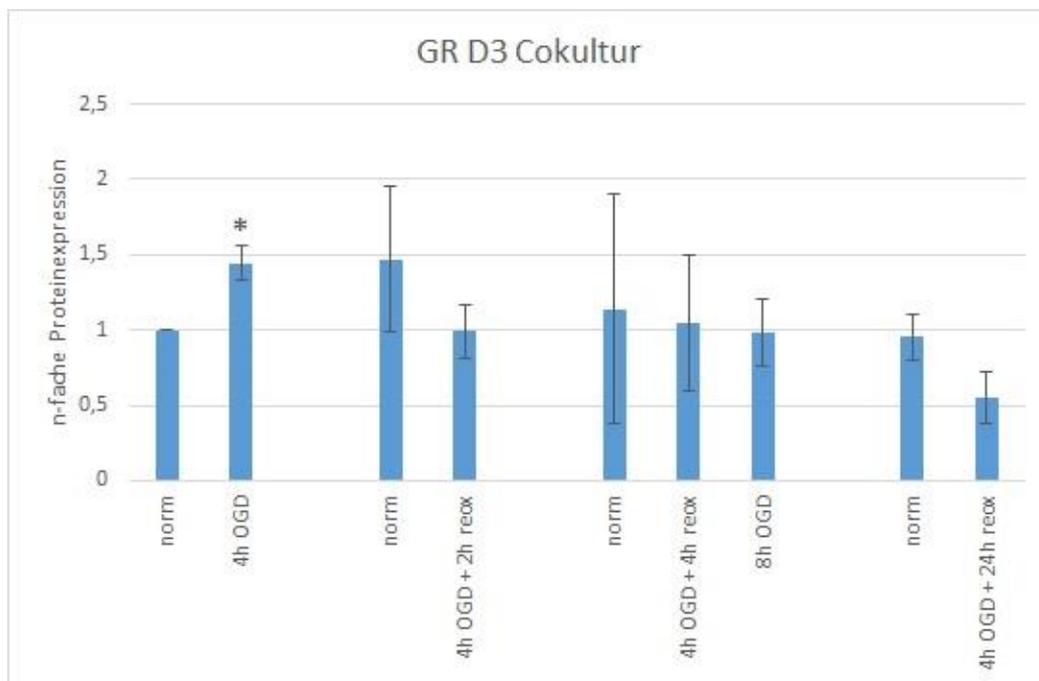


Abbildung 26: Relative Veränderung der GR-Expression in Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung

4.6. Einfluss von OGD-Bedingungen auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors in C6-Zellen

Ein weiterer möglicher Mechanismus der postischämischen Schrankenstörung ist eine Astrozyten-vermittelte Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke. Deshalb wurde der Versuch unternommen, den Glukokortikoidrezeptor in den C6-Zellen nachzuweisen, die in Cokultur verwendet wurden (siehe Abbildung 27).

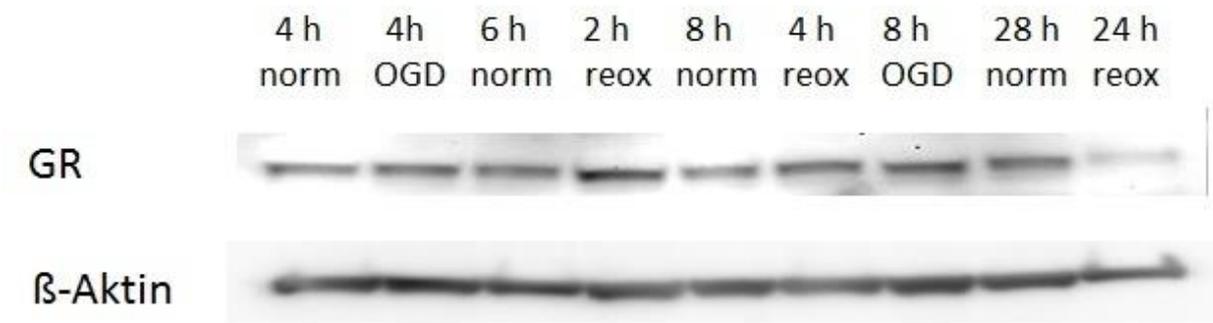


Abbildung 27: Western Blots mit C6-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung GR-Antikörper (oben) und β -Aktin-Antikörper (unten)

Die Existenz des Glukokortikoidrezeptors konnte im Western Blot nachgewiesen werden, hierbei fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von OGD-Behandlung und Kontrollen (siehe Abbildung 28).

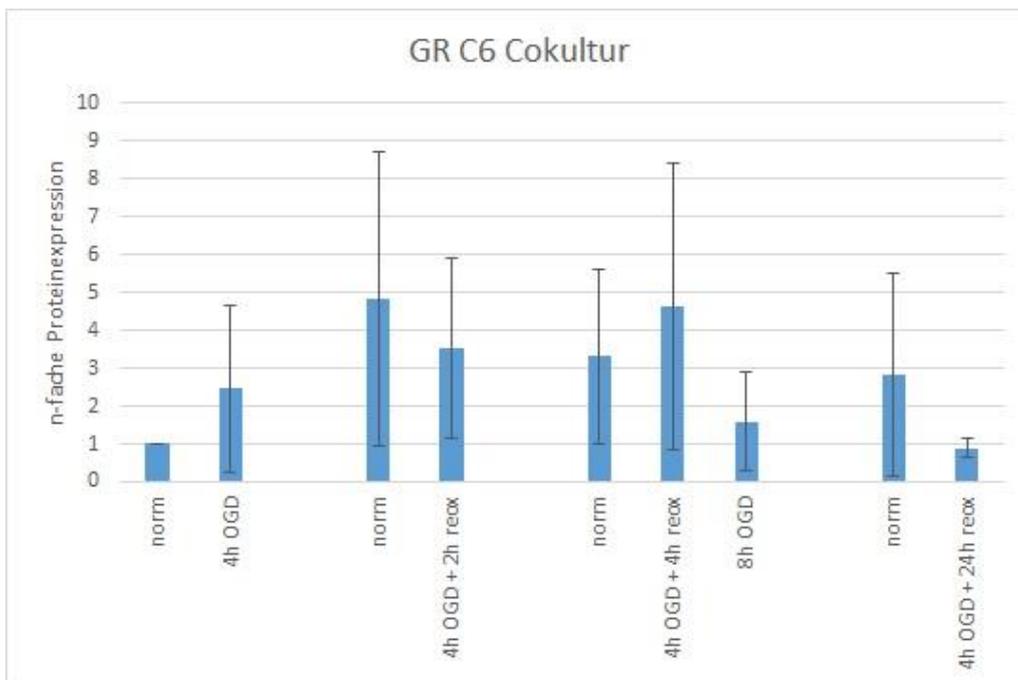


Abbildung 28: Relative Veränderung der Expression von GR in Western Blots mit C6-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung

4.7. Fluoreszenzfärbungen von D3-Zellen

Bei der Vermittlung der Glukokortikoidwirkung wird der Glukokortikoidrezeptor nach Bindung eines Liganden in den Zellkern verlagert, um an die DNA zu binden (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995). Dies könnte in Zellen der Blut-Hirn-Schranke zur Beeinflussung der Dichtigkeit führen, auch ohne dass die Gesamtkonzentration des

Glukokortikoidrezeptors starken Schwankungen unterliegt. Zur Überprüfung dieses möglichen Vorgangs in D3-Zellen wurden Fluoreszenzfärbungen der Zellen nach OGD-Behandlung angefertigt. Die Zellen wurden zunächst auf Deckgläschen ausgesät und kultiviert sowie anschließend den Versuchsbedingungen ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen unter Normalbedingungen, sowie Zellen, welche mit Dexamethason behandelt wurden. Es wurden zudem Kontrollfärbungen des Zellkerns mit DAPI angefertigt, sowie Kontrollen, bei denen nur die Sekundärantikörper aufgetragen wurden. Außerdem wurden die Zellen mit VE-Cadherin gefärbt.

In der Untersuchung der Verteilung des Glukokortikoidrezeptors nach 4 Stunden OGD-Behandlung zeigte sich keine Verlagerung des Rezeptors in den Zellkern; das Bild entsprach im Wesentlichen der Verteilung bei den als Kontrolle dienenden Zellen, welche unter Normalbedingungen inkubiert wurden (siehe Abbildung 29).

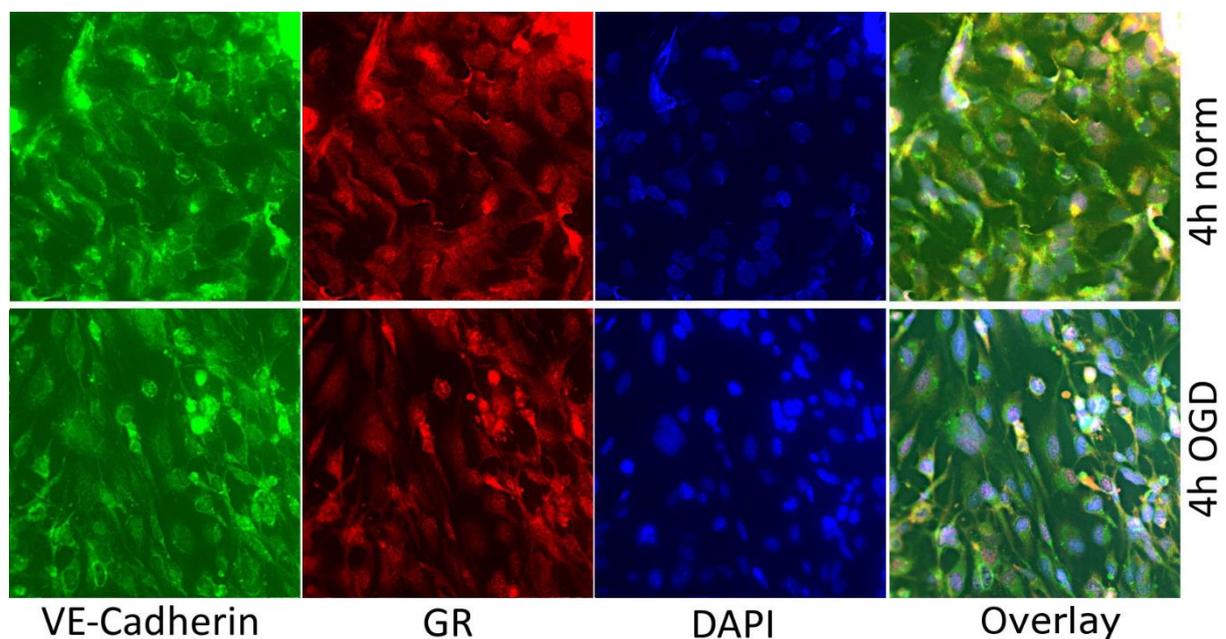


Abbildung 29: Fluoreszenzfärbung von D3-Zellen unter Normbedingungen (oben) und nach 4 Stunden OGD (unten); Färbung mit VE-Cadherin-Antikörper, GR-Antikörper und DAPI sowie Fusionsbild der Färbungen

Nach der Behandlung mit Dexamethason zeigte sich, dass der Glukokortikoidrezeptor durch diesen Stimulus in den Zellkern verlagert wurde. Im Zytosol war keine Präsenz des Rezeptors mehr zu erkennen. Diese Verlagerung war sowohl unter Normalbedingungen als auch nach der OGD-Behandlung zu beobachten (siehe Abbildung 30).

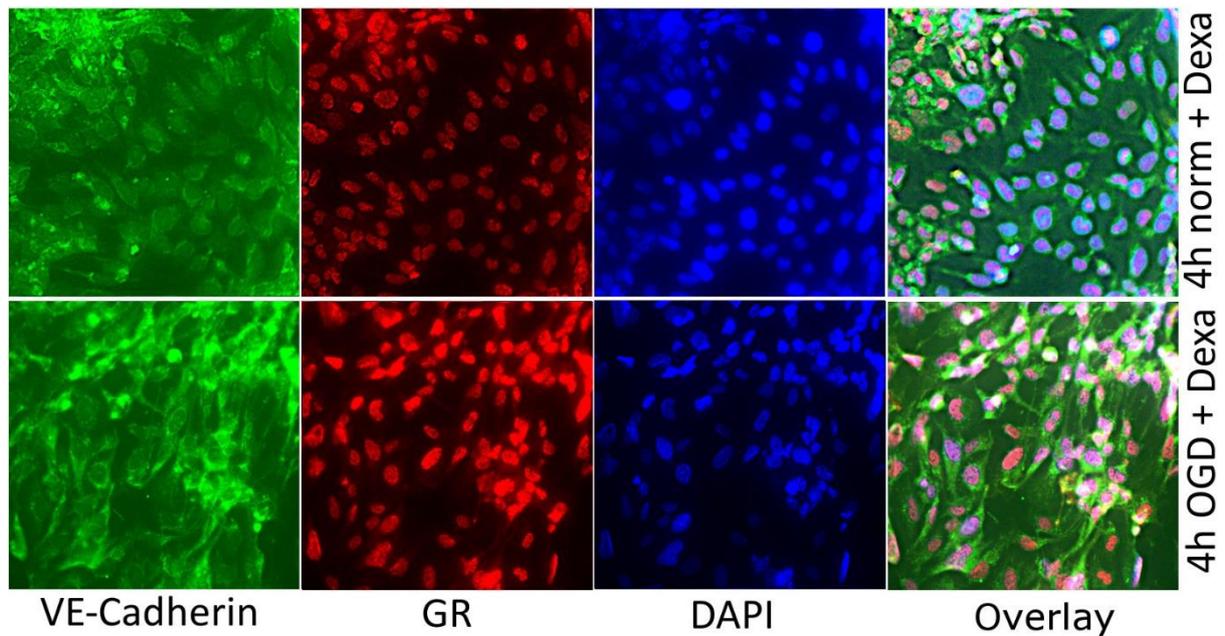


Abbildung 30: Fluoreszenzfärbung von mit Dexamethason behandelten D3-Zellen unter Normbedingungen (oben) und nach 4 Stunden OGD (unten); Färbung mit VE-Cadherin-Antikörper, GR-Antikörper und DAPI sowie Fusionsbild der Färbungen

Die Verteilung und Konzentration von VE-Cadherin veränderte sich gegenüber der Kontrolle weder unter OGD-Bedingungen noch unter der Behandlung mit Dexamethason.

In den Kontrollfärbungen zeigte sich keine relevante Reaktion der Sekundärantikörper mit dem Zellpräparat; eine Verfälschung durch eine Bindungsreaktion der Sekundärantikörper mit den zelleigenen Strukturen war somit ausgeschlossen.

5. Diskussion

In der Pathogenese der Zellschädigung des ischämischen Schlaganfalls spielt zum einen die Ischämie der Neuronen eine wesentliche Rolle. Zum anderen sind auch die Entstehung eines Ödems durch die Dysfunktion der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke sowie Entzündungsreaktionen, welche erst in der Folge nach dem akuten Schlaganfall-Ereignis auftreten, wichtige Faktoren. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines humanen *in-vitro*-Modells der Blut-Hirn-Schranke, der Zelllinie hCMEC/D3, auf Veränderungen unter ischämischen Stoffwechselbedingungen, zur Erlangung genauerer Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Blut-Hirn-Schranke im ischämischen Schlaganfall und zur Überprüfung der Eignung des Modells für weitere ähnliche Untersuchungen. Hierfür wurden Zellen dieser Linie unter OGD-Bedingungen inkubiert und anschließend mit verschiedenen Methoden analysiert.

Zur Untersuchung der Ischämie-Toleranz wurden ein LDH-Assay und ein Cell viability-Assay verwendet. Die Analyse der LDH-Konzentration im Kulturmedium zeigte einen deutlichen Anstieg mit der Zunahme der OGD-Dauer. Es konnte gezeigt werden, dass bereits nach 2 Stunden signifikant mehr LDH durch den Untergang von Zellen anfiel. Mit steigender OGD-Dauer stieg die Konzentration von LDH weiter stetig an, aus den Berechnungen konnte geschlossen werden, dass nach 16 Stunden nur noch die Hälfte und nach 24 Stunden OGD-Behandlung nur noch wenige Zellen am Leben waren. Bei der Untersuchung der Zellvitalität im Viability-Assay zeigte sich ein dazu passendes Bild, hier war die Vitalität ebenfalls bereits nach 2 Stunden signifikant reduziert. Ebenso wie im LDH-Assay zeigt sich hier ein Absinken des Anteils der vitalen Zellen, bis nach 24 Stunden OGD-Behandlung ähnlich wenige lebendige Zellen blieben. Somit konnte zunächst gezeigt werden, dass die Zellen der D3-Zelllinie eine gewisse Toleranz gegenüber ischämischen Stoffwechsellagen aufweisen, welche allerdings mit zunehmender Dauer überschritten wird, was dann zum Absterben der Zellen führt. Daraus konnten geeignete Zeitpunkte für die Untersuchung der RNA- und Proteinexpression abgeleitet werden. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass bereits ein Effekt der OGD-Behandlung auf die Zellen nachweisbar ist, wobei allerdings noch ein Großteil der Zellen vital ist. Dementsprechend wurde aus dem günstigen Zeitfenster von 2 Stunden bis 8 Stunden vor allem der Zeitpunkt nach 4 Stunden sowie teilweise auch 8 Stunden in den folgenden Untersuchungen bevorzugt verwendet. Die beiden durchgeführten Assays zeigen insgesamt ähnliche Ergebnisse wie bei

vergleichbaren Untersuchungen, welche mit Endothelzellen aus tierischen Zelllinien durchgeführt wurden (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011), wobei das Ausmaß der Zellschädigung im Vergleich zu cEND-Zellen bei geringer OGD-Zeit etwas stärker ausgeprägt und mit steigender OGD-Zeit weniger ausgeprägt war.

Um weitere Hinweise auf das Verhalten der Zellen in ischämischer Stoffwechsellage zu gewinnen, wurden verschiedene Zytokine analysiert.

In der Untersuchung der Expression von TNF-Alpha zeigte sich, dass diese nach 4 Stunden OGD-Behandlung deutlich erhöht waren. Diese Erhöhung weist auf eine ablaufende Entzündungsreaktion hin (Abdul-Muneer, Chandra et al. 2014), welche sich unter ischämischen Bedingungen bereits nach wenigen Stunden entwickelt (Liu, Clark et al. 1994, Berti, Williams et al. 2002). Die Applikation von TNF Alpha vergrößert den ischämischen Schaden (Barone, Arvin et al. 1997), dagegen konnte durch die Hemmung von TNF-Alpha nach einer OGD-Behandlung der negative Effekt der Ischämie auf die Barrierefunktion abgemildert werden (Yang, Gong et al. 1999), was TNF-Alpha zu einem möglichen Ziel zur Wiederherstellung der Barrierefunktion macht (Abdullah, Rakkar et al. 2015). Zudem wurde bereits gezeigt, dass die Applikation von TNF-Alpha in D3-Zellen zu einer Reduktion der Expression verschiedener Tight junctions-Proteine an der Blut-Hirn-Schranke führt (Förster, Burek et al. 2008).

Die VEGF-Expression war nach 4 Stunden OGD-Bedingungen deutlich erhöht. Eine Erhöhung der VEGF-Konzentration spielt in der Pathophysiologie der Störung der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Rolle, z.B. bei Multipler Sklerose (Argaw, Asp et al. 2012) oder nach Strahlenexposition (Wang, Li et al. 2015). Im Rahmen einer Entzündungsreaktion bei einer zerebralen Ischämie wird VEGF ebenfalls exprimiert und trägt damit zum Verlust der Integrität der Blut-Hirn-Schranke bei (Chi, Hunter et al. 2007). Insbesondere in Anwesenheit von Astrozyten kann unter OGD-Bedingungen ein Anstieg der VEGF-Ausschüttung und ein damit verbundener Barriereverlust an der Blut-Hirn-Schranke beobachtet werden (Li, Pan et al. 2014).

Die Expression von IL-6 war nach der OGD-Behandlung ebenso deutlich, aber statistisch nicht signifikant, erhöht, was auf eine Entzündungsreaktion hinweist. Erhöhte Spiegel von IL-6 können generell bei einer Störung der Blut-Hirn-Schranke beobachtet werden (D'Aversa, Eugenin et al. 2013) und sind zudem nach einer Ischämie nachweisbar (Berti, Williams et al. 2002). Die Neutralisierung von IL-6, mit spezifischen Antikörpern, führt zu einer Abschwächung des Verlust der Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke nach Ischämie (Zhang, Sadowska et al. 2015). Es besteht zudem

ein Zusammenhang zwischen der durch TNF-Alpha vermittelten Störung der Blut-Hirn-Schranke mit einer erhöhten IL-6-Expression (Rochfort, Collins et al. 2016).

Auch die Expression von IL-8, welches ebenfalls proinflammatorische Wirkung zeigt (del Zoppo, Ginis et al. 2000), war nach OGD-Bedingungen ohne statistische Signifikanz deutlich erhöht. Die Ausschüttung von IL-8 im Rahmen einer Entzündungsreaktion wurde im *in-vitro*-Tiermodell bereits mit einer Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke in Verbindung gebracht (Pieper, Pieloch et al. 2013, Sun, Li et al. 2016).

Die Erhöhung der Expression der untersuchten Zytokine deutet somit in allen Fällen auf eine Barrierestörung im Rahmen einer Entzündungsreaktion hin, welche durch die OGD-Behandlung ausgelöst wurde. Die Reversibilität dieser Erhöhung nach 24 Stunden Reoxygenierung zeigt die Fähigkeit der Zellen, sich nach einer Schädigung zu erholen. Dies ist die Voraussetzung dafür, auch Veränderungen untersuchen zu können, welche in der Phase nach der akuten Schädigung auftreten, wie z.B. Reperfusionsschäden oder Hirnödeme, welche erst in der Folge, nach zerebralem Infarkt, auftreten.

Die Expression von Claudin 5 zeigte in der RT-PCR eine reduzierte Expression nach 4 Stunden unter OGD-Bedingungen. Im Western Blot war jedoch kein Unterschied in der Proteinexpression sichtbar. Bei Claudin 5 handelt es sich um ein Tight junction-Molekül, welches in Endothelzellen wesentlich zur Steuerung der Permeabilität beiträgt (Morita, Sasaki et al. 1999), es ist ein wichtiger Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke (Jia, Lu et al. 2014) und bei Störungen der Barriere erniedrigt (Liu, Wang et al. 2015). Eine Erniedrigung der Claudin 5-Expression stellt somit eine der möglichen Mechanismen bei der schädigungsbedingt erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke dar.

In der RT-PCR von Occludin zeigte sich ebenso wie im Western Blot keine Veränderung der Expression. Da Occludin eine wichtige, auch regulatorische, Rolle im Aufbau der Blut-Hirn-Schranke hat (Haseloff, Dithmer et al. 2015), kann ein Verlust von Occludin zur Störung der Schrankenfunktion führen. Eine Erhöhung der Occludin-Expression, z.B. durch die Gabe von Glukokortikoiden, kann dagegen zur Stabilisierung beitragen (Förster, Silwedel et al. 2005).

ZO-1 ist durch die zytoplasmatische Verankerung von extrazellulären Tight junctions-Proteinen wie Claudinen oder Occludin sowie durch regulatorische Funktionen (Abbott, Patabendige et al. 2010) am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Bei

einem Verlust von ZO-1 stellt sich deshalb eine gestörte Funktion der Blut-Hirn-Schranke ein (Hue, Cao et al. 2013). Bei der Untersuchung der ZO-1-Expression zeigte sich im Western Blot nach 4 Stunden eine Tendenz zur Erhöhung. ZO-1 ist über das damit assoziierte ZONAB-Protein als wichtiger Regulator und Transkriptionsfaktor am Aufbau der Zell-Zell-Kontakte im Gehirn beteiligt (Penes, Li et al. 2005). Zudem wird über den ZO-1/ZONAB auch die Expression von HER2 und damit die parazelluläre Permeabilität sowie das Wachstum und die Differenzierung von Zellen beeinflusst (Balda and Matter 2000). Die nicht signifikante Erhöhung der ZO-1-Expression kann somit als weiterer Hinweis der Reaktion der Zellen auf die OGD-Behandlung interpretiert werden.

VCAM, welches in löslicher Form bei Entzündungsreaktionen von Hirnendothelzellen freigesetzt wird und dabei zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke führt (Haarmann, Nowak et al. 2015), ist ein mögliches Ziel für die Therapie von neuroinflammatorischen Krankheiten mit verschiedenen Pharmaka (Li, McBride et al. 2015, Nishihara, Shimizu et al. 2015). In der Untersuchung von VCAM mittels Western Blot zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen OGD-behandelten Zellen und Kontrollen.

In den untersuchten Proteinen der Blut-Hirn-Schranke ließen sich nur in der PCR von Claudin 5 eine Veränderung nachweisen, die die Permeabilitätserhöhung erklären könnte. Eine Permeabilitätserhöhung ist bei der beobachteten Freisetzung der untersuchten Zytokine jedoch anzunehmen. Da es weitere Proteine gibt, welche bei diesem Vorgang beeinträchtigt sein könnten, u.a. eine Vielzahl an Claudinen oder andere Zonula occludens-Proteine wie ZO-2 und ZO-3, ist die Frage über die Mechanismen der Schrankenstörung nicht endgültig beantwortet worden. Hier sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Applikation von verschiedenen Liganden des Glukokortikoidrezeptors führt zu einer Erhöhung der Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke (Förster, Silwedel et al. 2005, Förster, Waschke et al. 2006, Kang, Ahn et al. 2006, Förster, Burek et al. 2008, Kashiwamura, Sano et al. 2011, Salvador, Shityakov et al. 2013), was therapeutisch bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen wie Multipler Sklerose oder Tumoren ausgenutzt wird. Dieser Effekt ist unter ischämischen Bedingungen jedoch nicht zu beobachten, in OGD-Versuchen mit der murinen Hirnendothel-Linie cEND konnte dabei eine Degradation des GR beobachtet werden (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Falls diese durch Proteasom-Inhibitoren verhindert wird, kann dieser

stabilisierende Effekt jedoch wiederhergestellt werden, weshalb ein Proteasom-vermittelter Abbau des Glukokortikoidrezeptors unter Ischämie als Auslöser der Inresponsibilität gegenüber Glukokortikoiden beim Schlaganfall vermutet wird (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Da diese Zusammenhänge bis jetzt jedoch nicht in humanen *in-vitro*-Modellen nachgewiesen werden konnten, wurde die Expression des Glukokortikoidrezeptors der hCMEC/D3-Zelllinie in verschiedenen Konstellationen untersucht. In den Versuchen mit einer Monokultur von D3-Zellen zeigte sich nach 4 Stunden OGD-Behandlung in der PCR eine geringe, jedoch nicht signifikante, Erhöhung der Expression. Im Western Blot konnte nach 4 Stunden OGD-Bedingungen eine signifikante Reduktion der Expression beobachtet werden. Bei Cokultur-Versuchen der D3- mit C6-Zellen zeigte sich nach 4 Stunden ein signifikanter Anstieg der GR-Expression. In beiden Fällen war zu anderen Zeitpunkten jedoch keine Veränderung der Expression nachweisbar, ebenso war nach einer Reoxygenierung kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Aus den Untersuchungen der Zellvitalität wurde der Zeitpunkt nach 4 Stunden OGD-Behandlung bereits als geeignet für die Untersuchung der Expression identifiziert, zudem wurde hier auch eine Erhöhung der proentzündlichen und Barriere-schwächenden Zytokine nachgewiesen. Somit ist den Veränderungen der GR-Expression zu diesem Zeitpunkt eine hohe Bedeutung beizumessen. Ein fehlender Nachweis von Veränderungen der GR-Expression zu anderen Zeitpunkten, z.B. nach mehr als 8 Stunden OGD-Behandlung, ist vor dem Hintergrund des zu diesem Zeitpunkt bereits weiter erhöhten Anteils abgestorbener Zellen zu erklären. Im Versuchsaufbau mit einer D3-Monokultur wurde eine Erniedrigung der GR-Expression gemessen, was sich mit den Beobachtungen aus anderen Versuchen deckt (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011), wobei diese auch in einer Monokultur von Endothelzellen durchgeführt wurden. Dies steht im Gegensatz zur Erhöhung der GR-Expression, wie sie in den Cokultur-Versuchen beobachtet werden konnte. Da die Cokultur von verschiedenen Zelltypen die an der Blut-Hirn-Schranke ablaufenden Prozesse, welche ebenfalls durch ein Zusammenspiel mehrerer Zelltypen beeinflusst werden, besser darstellen kann, erscheint die Erhöhung der GR-Expression unter ischämischen Bedingungen möglich, wenn nicht gar wahrscheinlicher. Die in der Immunfluoreszenz beobachtete Verlagerung des GR in den Zellkern nach Applikation von Dexamethason unter OGD-Bedingungen zeigt zudem, dass in D3-Zellen auch unter OGD-Bedingungen zumindest noch ein gewisses Maß an Glukokortikoid-Responsivität besteht. Aufgrund der Komplexität der Blut-Hirn-

Schranke, welche auch durch die Cokultur von zwei Zelllinien kaum adäquat abgebildet werden kann, und der Gegensätzlichkeit der gewonnenen Ergebnisse in Mono- und Cokultur gestaltet es sich jedoch schwierig, eine eindeutige Aussage zu treffen. Da zudem in den untersuchten Tight junction-Proteinen nur eine Verringerung von Claudin 5 entdeckt werden konnte und hier somit das Ziel einer möglicherweise Glukokortikoid-vermittelten Barrierestörung nicht endgültig geklärt ist, sollten weitere Untersuchungen, möglicherweise in Kombination mit weiteren Zelllinien, durchgeführt werden. Dies scheint insbesondere deshalb nötig, weil sich viele der experimentellen Beobachtungen in klinischen Studien bisher nicht bestätigen ließen, weshalb die Evidenz bezüglich einer Anwendung von Glukokortikoiden beim ischämischen Schlaganfall nach wie vor nicht eindeutig ist.

Es kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass in den D3-Zellen unter OGD-Bedingungen ähnliche Vorgänge wie an der Blut-Hirn-Schranke bei Ischämie *in-vivo* ablaufen. Dies wird zum einen durch eine vergleichbare Ischämietoleranz des Modells indiziert. Des Weiteren zeigen die Zellen eine messbare Entzündungsreaktion, welche für die Barrierschwächung verantwortlich ist. Somit stellt die D3-Zelllinie mit OGD-Behandlung ein geeignetes *in-vitro*-Modell für eine Ischämie und anschließende Reperfusion der Blut-Hirn-Schranke dar und eignet sich für weitere Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Der Schlaganfall ist eine Krankheit mit großer Bedeutung, sowohl für die Betroffenen wie auch unter volkswirtschaftlichen Gesichtspunkten. In der Erforschung neuer und besserer Therapiemethoden für den ischämischen Schlaganfall ist ein gutes *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke unerlässlich, da ein Teil der Schädigung des ZNS durch einen Zusammenbruch dieser Barriere verursacht wird.

Die hCMEC/D3-Zelllinie stellt ein solches Modell dar; mit steigender Dauer der ischämischen Stoffwechsellage zeigt sich eine Erhöhung der LDH-Konzentration als Marker für das Absterben der Zellen sowie ein Rückgang der Zellvitalität. Zudem lässt sich eine Entzündungsreaktion mit Anstieg der Marker TNF-Alpha und VEGF, sowie tendenziell auch von Interleukin 6 und Interleukin 8 beobachten, welche auch auf eine Barrierschwächung hindeutet. Aus vorherigen Versuchen bekannte Tight junctions-Proteine wie Claudin 1 und Occludin waren in D3-Zellen unter ischämischen Bedingungen nicht verändert, Claudin 5 war in der PCR vermindert exprimiert. Die für die Barrierschwächung verantwortlichen Strukturproteine müssen durch weitere Versuche identifiziert werden. Eine mögliche Erhöhung der Expression des Transkriptionsfaktors ZO-1 könnte unter diesen Bedingungen einen Mechanismus der Barrierschwächung darstellen.

Die Expression des Glukokortikoidrezeptors war in Monokultur-Versuchen mit D3-Zellen nach Ischämie erniedrigt. Dies stellt eine Gemeinsamkeit mit Versuchen mit Zelllinien tierischen Ursprungs dar; in diesen zeigten die Zellen durch Degradation des Glukokortikoidrezeptors ein fehlendes Ansprechen auf eine Glukokortikoid-Behandlung. In der Cokultur der D3-Zellen mit Gliomzellen der C6-Zelllinie zeigte sich jedoch eine Erhöhung der GR-Expression. Eine Cokultur kann den komplexen Aufbau der Blut-Hirn-Schranke, mit Beteiligung mehrerer Zelltypen, besser darstellen als Versuche mit nur einer Zelllinie. Die Erhöhung der GR-Expression in diesem humanen *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke steht im Gegensatz zu den *in-vitro*-Versuchen mit anderen Zelllinien. Dies könnte eine mögliche Erklärung liefern, warum die Erkenntnisse aus diesen Versuchen bisher nicht zu einer Verbesserung der Evidenz der Glukokortikoid-Therapie beim ischämischen Schlaganfall beigetragen haben. Zudem zeigt die Fluoreszenzfärbung von D3-Zellen, dass diese auch unter Ischämie auf Glukokortikoide reagieren.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Art.-Nr. | Artikelnummer |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| ca. | circa |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EBM-2 | Endothelial Cell Basal Medium-2 |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| GC | Glukokortikoid |
| GR | Glukokortikoidrezeptor |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| IL-8 | Interleukin 8 |
| kDa | Kilodalton |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| NS | normales Schweineserum |
| P/S | Penicillin-Streptomycin |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCA | p-Coumaric-Acid |
| PR | Progesteron |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RH | relative Luftfeuchtigkeit |
| RT-PCR | real time polymerase chain reaction |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OGD | oxygen glucose deprivation |
| SDS | Sodiumdodecylsulfate |

| | |
|------------|---|
| SDS-PAGE | Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan |
| u.a. | unter anderem |
| VCAM | vascular cell adhesion molecule |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZO-1/-2/-3 | Zonula occludens-Protein 1/2/3 |

8. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schema der Blut-Hirn-Schranke mit beteiligten Zellen, Basallaminae und Verschlussmechanismus durch Tight junctions (Abbott, Patabendige et al. 2010)..... | 3 |
| Abbildung 2: Schema des Glukokortikoidrezeptors mit drei funktionellen Bereichen: N-terminaler Transaktivierungsbereich (AF-1), DBD mit zwei zentralen Zink-Ionen, und C-terminaler Bereich LBD (AF-2) (Cosío, Torrego et al. 2005) | 6 |
| Abbildung 3: Vorgehen bei Versuchen unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (OGD)..... | 18 |
| Abbildung 4: Vorgehen bei Versuchen unter Sauerstoff-Glukose-Mangelbedingungen (OGD) und anschließender Reoxygenierung | 19 |
| Abbildung 5: Vorgehen bei Cokultur-Versuchen..... | 21 |
| Abbildung 6: Verlauf der Zytotoxizität in OGD-(rot) und Kontrollreihe(blau) im LDH-Assay des OGD-Versuchs mit D3-Zellen..... | 33 |
| Abbildung 7: Verlauf der Cell viability in OGD-(rot) und Kontrollreihe(blau) im CellTiter Glo-Assay des OGD-Versuchs mit D3-Zellen..... | 34 |
| Abbildung 8: Relative Veränderung der Expression von TNF-Alpha in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR..... | 35 |
| Abbildung 9: Relative Veränderung der Expression von VEGF in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR..... | 36 |
| Abbildung 10: Relative Veränderung der Expression von Interleukin 6 in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR..... | 36 |
| Abbildung 11: Relative Veränderung der Expression von Interleukin 8 in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR..... | 37 |
| Abbildung 12: Relative Veränderung der Expression von Claudin 5 in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR..... | 38 |
| Abbildung 13: Relative Veränderung der Expression von Occludin in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR..... | 39 |
| Abbildung 14: Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung Claudin 1-Antikörper (oben) und β -Aktin-Antikörper (unten)..... | 40 |
| Abbildung 15: Relative Veränderung der Expression von Claudin 1 in Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung | 40 |
| Abbildung 16: Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung ZO-1-Antikörper (oben) und β -Aktin-Antikörper (unten) | 41 |
| Abbildung 17: Relative Veränderung der Expression von ZO-1 in Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen | |

| | |
|--|----|
| und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung | 41 |
| Abbildung 18: Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung VCAM-Antikörper (oben) und β -Aktin-Antikörper (unten) | 42 |
| Abbildung 19: Relative Veränderung der Expression von VCAM in Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung | 42 |
| Abbildung 20: Relative Veränderung der Expression von GR in D3-Zellen im Vergleich zwischen 4 Stunden OGD und Kontrolle (links) sowie zwischen 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung und Kontrolle (rechts) in der RT-PCR..... | 43 |
| Abbildung 21: Western Blots mit D3-Zellen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 8 Stunden Normalbedingungen und 8 Stunden OGD; Banden nach Behandlung GR-Antikörper (oben) und β -Aktin-Antikörper (unten)..... | 44 |
| Abbildung 22: Relative Veränderung der Expression des Glukokortikoidrezeptors in Western Blots mit D3-Zellen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und; 8 Stunden Normalbedingungen und 8 Stunden OGD | 44 |
| Abbildung 23: Western Blots mit D3-Zellen aus Reoxygenierungs-Versuchen nach: 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung GR-Antikörper (oben) und β -Aktin-Antikörper (unten)..... | 45 |
| Abbildung 24: Relative Veränderung der GR-Expression in Western Blots mit D3-Zellen aus Reoxygenierungs-Versuchen nach: 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen und, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung..... | 46 |
| Abbildung 25: Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung GR-Antikörper (oben) und β -Aktin-Antikörper (unten) .. | 46 |
| Abbildung 26: Relative Veränderung der GR-Expression in Western Blots mit D3-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung | 47 |
| Abbildung 27: Western Blots mit C6-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung; Banden nach Behandlung GR-Antikörper (oben) und β -Aktin-Antikörper (unten) .. | 48 |
| Abbildung 28: Relative Veränderung der Expression von GR in Western Blots mit C6-Zellen aus Cokultur-Versuchen nach: 4 Stunden Normalbedingungen und OGD; 6 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 2 Stunden Reoxygenierung; 8 Stunden Normalbedingungen, 4 Stunden OGD | |

| | |
|--|----|
| mit 4 Stunden Reoxygenierung sowie 8 Stunden OGD; 28 Stunden Normalbedingungen und 4 Stunden OGD mit 24 Stunden Reoxygenierung | 48 |
| Abbildung 29: Fluoreszenzfärbung von D3-Zellen unter Normbedingungen (oben) und nach 4 Stunden OGD (unten); Färbung mit VE-Cadherin-Antikörper, GR-Antikörper und DAPI sowie Fusionsbild der Färbungen | 49 |
| Abbildung 30: Fluoreszenzfärbung von mit Dexamethason behandelten D3-Zellen unter Normbedingungen (oben) und nach 4 Stunden OGD (unten); Färbung mit VE-Cadherin-Antikörper, GR-Antikörper und DAPI sowie Fusionsbild der Färbungen..... | 50 |

9. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper | 9 |
| Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper | 10 |
| Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsutensilien | 11 |
| Tabelle 4: Verwendete Geräte | 12 |
| Tabelle 5: Verwendete Kits..... | 12 |
| Tabelle 6: Verwendete Zellkulturmedien | 13 |
| Tabelle 7: Verwendete RT-PCR-Sonden..... | 13 |
| Tabelle 8: Verwendete Substanzen..... | 14 |

10. Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof and D. J. Begley (2010). "Structure and function of the blood–brain barrier." Neurobiology of Disease **37**(1): 13-25.
- Abdul-Muneer, P. M., N. Chandra and J. Haorah (2014). "Interactions of Oxidative Stress and Neurovascular Inflammation in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury." Molecular Neurobiology **51**(3): 966-979.
- Abdullah, Z., K. Rakkar, P. M. W. Bath and U. Bayraktutan (2015). "Inhibition of TNF- α protects in vitro brain barrier from ischaemic damage." Molecular and Cellular Neuroscience **69**: 65-79.
- Argaw, A. T., L. Asp, J. Zhang, K. Navrazhina, T. Pham, J. N. Mariani, S. Mahase, D. J. Dutta, J. Seto, E. G. Kramer, N. Ferrara, M. V. Sofroniew and G. R. John (2012). "Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease." J Clin Invest **122**(7): 2454-2468.
- Balda, M. S. and K. Matter (2000). "The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression." The EMBO Journal **19**(9): 2024-2033.
- Ballabh, P., A. Braun and M. Nedergaard (2004). "The blood–brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications." Neurobiology of Disease **16**(1): 1-13.
- Barone, F. C., B. Arvin, R. F. White, A. Miller, C. L. Webb, R. N. Willette, P. G. Lysko and G. Z. Feuerstein (1997). "Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury." Stroke **28**(6): 1233-1244.
- Berlit, P. (2014). "Basiswissen Neurologie." Springer Verlag.
- Berti, R., A. J. Williams, J. R. Moffett, S. L. Hale, L. C. Velarde, P. J. Elliott, C. Yao, J. R. Dave and F. C. Tortella (2002). "Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury." J Cereb Blood Flow Metab **22**(9): 1068-1079.
- Bevan, C. and J. M. Gelfand (2015). "Therapeutic management of severe relapses in multiple sclerosis." Curr Treat Options Neurol **17**(4): 345.
- Blecharz, K. G., D. Drenckhahn and C. Y. Förster (2008). "Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells." J Cereb Blood Flow Metab **28**(6): 1139-1149.

- Blecharz, K. G., A. Haghikia, M. Stasiolek, N. Kruse, D. Drenckhahn, R. Gold, N. Roewer, A. Chan and C. Y. Förster (2010). "Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis." Mult Scler **16**(3): 293-302.
- Briegel, J., P. Möhnle and E. Uhl (2008). "Glukokortikoide in der Neurointensivmedizin - welche Indikationen sind gesichert?" Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie **9**(2): 7-12.
- Buckingham, J. C. (2006). "Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking." British Journal of Pharmacology **147**(Suppl 1): S258-S268.
- Bundesärztekammer (1997). "Richtlinien zur Feststellung der Hirntodes." Deutsches Ärzteblatt **95**(Heft 30).
- Chi, O. Z., C. Hunter, X. Liu and H. R. Weiss (2007). "Effects of anti-VEGF antibody on blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia." Experimental Neurology **204**(1): 283-287.
- Chu, S. Y. and K. N. Sheth (2015). "Decompressive craniectomy in neurocritical care." Curr Treat Options Neurol **17**(2): 330.
- Cosío, B. G., A. Torrego and I. M. Adcock (2005). "Molecular Mechanisms of Glucocorticoids." Archivos de Bronconeumología (English Version) **41**(01): 34-41.
- Cowan, K. M. and A. S. Easton (2010). "Neutrophils block permeability increases induced by oxygen glucose deprivation in a culture model of the human blood-brain barrier." Brain Research **1332**: 20-31.
- Cucullo, L., P. O. Couraud, B. Weksler, I. A. Romero, M. Hossain, E. Rapp and D. Janigro (2008). "Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies." J Cereb Blood Flow Metab **28**(2): 312-328.
- D'Aversa, T. G., E. A. Eugenin, L. Lopez and J. W. Berman (2013). "Myelin basic protein induces inflammatory mediators from primary human endothelial cells and blood-brain barrier disruption: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis." Neuropathol Appl Neurobiol **39**(3): 270-283.
- Deb, P., S. Sharma and K. M. Hassan (2010). "Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis." Pathophysiology **17**(3): 197-218.
- del Zoppo, G., I. Ginis, J. M. Hallenbeck, C. Iadecola, X. Wang and G. Z. Feuerstein (2000). "Inflammation and Stroke: Putative Role for Cytokines, Adhesion

- Molecules and iNOS in Brain Response to Ischemia." Brain Pathology **10**(1): 95-112.
- DGN (2012). Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. **S1-Leitlinie**.
- Donnan, G. A., M. Fisher, M. Macleod and S. M. Davis (2008). "Stroke." The Lancet **371**(9624): 1612-1623.
- Durieu-Trautmann, O., N. Foignant-Chaverot, J. Perdomo, P. Gounon, A. D. Strosberg and P. O. Couraud (1991). "Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium." In Vitro Cell Dev Biol **27a**(10): 771-778.
- Förster, C., M. Burek, I. A. Romero, B. Weksler, P.-O. Couraud and D. Drenckhahn (2008). "Differential effects of hydrocortisone and TNF α on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood–brain barrier." The Journal of Physiology **586**(7): 1937-1949.
- Förster, C., T. Kahles, S. Kietz and D. Drenckhahn (2007). "Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND." J Physiol **580**(Pt.3): 937-949.
- Förster, C., C. Silwedel, N. Golenhofen, M. Burek, S. Kietz, J. Mankertz and D. Drenckhahn (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**(2): 475-486.
- Förster, C., J. Waschke, M. Burek, J. Leers and D. Drenckhahn (2006). "Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific." J Physiol **573**(Pt 2): 413-425.
- Förster, C., J. Waschke, M. Burek, J. Leers and D. Drenckhahn (2006). "Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific." The Journal of Physiology **573**(2): 413-425.
- Gomes, J. A., R. D. Stevens, J. J. Lewin, 3rd, M. A. Mirski and A. Bhardwaj (2005). "Glucocorticoid therapy in neurologic critical care." Crit Care Med **33**(6): 1214-1224.
- Gotsch, U., E. Borges, R. Bosse, E. Boggemeyer, M. Simon, H. Mossmann and D. Vestweber (1997). "VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo." J Cell Sci **110 (Pt 5)**: 583-588.
- Haarmann, A., E. Nowak, A. Deiss, S. van der Pol, C. M. Monoranu, G. Kooij, N. Muller, P. van der Valk, G. Stoll, H. E. de Vries, F. Berberich-Siebelt and M.

- Buttmann (2015). "Soluble VCAM-1 impairs human brain endothelial barrier integrity via integrin alpha-4-transduced outside-in signalling." Acta Neuropathol **129**(5): 639-652.
- Haseloff, R. F., S. Dithmer, L. Winkler, H. Wolburg and I. E. Blasig (2015). "Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood–brain barrier: Structural and functional aspects." Seminars in Cell & Developmental Biology **38**: 16-25.
- Hue, C. D., S. Cao, C. R. "Dale" Bass, D. F. Meaney and B. Morrison (2013). "Repeated Primary Blast Injury Causes Delayed Recovery, but not Additive Disruption, in an In Vitro Blood–Brain Barrier Model." Journal of Neurotrauma **31**(10): 951-960.
- Jia, W., R. Lu, T. A. Martin and W. G. Jiang (2014). "The role of claudin-5 in blood–brain barrier (BBB) and brain metastases (review)." Mol Med Rep **9**(3): 779-785.
- Kang, H. S., H. S. Ahn, H. J. Kang and M. C. Gye (2006). "Effect of estrogen on the expression of occludin in ovariectomized mouse brain." Neurosci Lett **402**(1-2): 30-34.
- Kashiwamura, Y., Y. Sano, M. Abe, F. Shimizu, H. Haruki, T. Maeda, M. Kawai and T. Kanda (2011). "Hydrocortisone Enhances the Function of the Blood-Nerve Barrier Through the Up-Regulation of Claudin-5." Neurochemical Research **36**(5): 849-855.
- Kearney, P. M., M. Whelton, K. Reynolds, P. Muntner, P. K. Whelton and J. He (2005). "Global burden of hypertension: analysis of worldwide data." The Lancet **365**(9455): 217-223.
- Khoury, J. C., D. Kleindorfer, K. Alwell, C. J. Moomaw, D. Woo, O. Adeoye, M. L. Flaherty, P. Khatri, S. Ferioli, J. P. Broderick and B. M. Kissela (2013). "Diabetes Mellitus: A Risk Factor for Ischemic Stroke in a Large Biracial Population." Stroke **44**(6): 1500-1504.
- Kleinschnitz, C., K. Blecharz, T. Kahles, T. Schwarz, P. Kraft, K. Gobel, S. G. Meuth, M. Burek, T. Thum, G. Stoll and C. Forster (2011). "Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome." Stroke **42**(4): 1081-1089.
- Kolominsky-Rabas, P. L., C. Sarti, P. U. Heuschmann, C. Graf, S. Siemonsen, B. Neundoerfer, A. Katalinic, E. Lang, K. G. Gassmann and T. R. von Stockert (1998). "A prospective community-based study of stroke in Germany--the

- Erlangen Stroke Project (ESPro): incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months." Stroke **29**(12): 2501-2506.
- Li, L., D. W. McBride, D. Doycheva, B. J. Dixon, P. R. Krafft, J. H. Zhang and J. Tang (2015). "G-CSF attenuates neuroinflammation and stabilizes the blood-brain barrier via the PI3K/Akt/GSK-3beta signaling pathway following neonatal hypoxia-ischemia in rats." Exp Neurol **272**: 135-144.
- Li, X., T. Zhou, X. Zhi, F. Zhao, L. Yin and P. Zhou (2006). "Effect of hypoxia/reoxygenation on CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in mouse microvessel endothelial cell lines." Microvasc Res **72**(1-2): 48-53.
- Li, Y. N., R. Pan, X. J. Qin, W. L. Yang, Z. Qi, W. Liu and K. J. Liu (2014). "Ischemic neurons activate astrocytes to disrupt endothelial barrier via increasing VEGF expression." J Neurochem **129**(1): 120-129.
- Lin, S.-Y., S.-C. Tang, L.-K. Tsai, S.-J. Yeh, L.-J. Shen, F.-L. L. Wu and J.-S. Jeng (2015). "Incidence and Risk Factors for Acute Kidney Injury Following Mannitol Infusion in Patients With Acute Stroke: A Retrospective Cohort Study." Medicine **94**(47): e2032.
- Liu, T., R. K. Clark, P. C. McDonnell, P. R. Young, R. F. White, F. C. Barone and G. Z. Feuerstein (1994). "Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons." Stroke **25**(7): 1481-1488.
- Liu, W. Y., Z. B. Wang, Y. Wang, L. C. Tong, Y. Li, X. Wei, P. Luan and L. Li (2015). "Increasing the Permeability of the Blood-brain Barrier in Three Different Models in vivo." CNS Neurosci Ther **21**(7): 568-574.
- Lu, N. Z., S. E. Wardell, K. L. Burnstein, D. Defranco, P. J. Fuller, V. Giguere, R. B. Hochberg, L. McKay, J.-M. Renoir, N. L. Weigel, E. M. Wilson, D. P. McDonnell and J. A. Cidlowski (2006). "International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors." Pharmacological Reviews **58**(4): 782-797.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon and R. M. Evans (1995). "The nuclear receptor superfamily: The second decade." Cell **83**(6): 835-839.
- Morita, K., H. Sasaki, M. Furuse and S. Tsukita (1999). "Endothelial Claudin: Claudin-5/Tm6cf Constitutes Tight Junction Strands in Endothelial Cells." The Journal of Cell Biology **147**(1): 185-194.

- Neuhaus, W., F. Gaiser, A. Mahringer, J. Franz, C. Riethmuller and C. Forster (2014). "The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier." Front Cell Neurosci **8**: 352.
- Nishihara, H., F. Shimizu, Y. Sano, Y. Takeshita, T. Maeda, M. Abe, M. Koga and T. Kanda (2015). "Fingolimod prevents blood-brain barrier disruption induced by the sera from patients with multiple sclerosis." PLoS One **10**(3): e0121488.
- Ortiz, G. G., F. P. Pacheco-Moisés, M. Á. Macías-Islas, L. J. Flores-Alvarado, M. A. Mireles-Ramírez, E. D. González-Renovato, V. E. Hernández-Navarro, A. L. Sánchez-López and M. A. Alatorre-Jiménez (2014). "Role of the Blood–Brain Barrier in Multiple Sclerosis." Archives of Medical Research **45**(8): 687-697.
- Penes, M. C., X. Li and J. I. Nagy (2005). "Expression of zonula occludens-1 (ZO-1) and the transcription factor ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB)–MsY3 in glial cells and colocalization at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions in mouse brain." European Journal of Neuroscience **22**(2): 404-418.
- Pieper, C., P. Pieloch and H. J. Galla (2013). "Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier." Brain Res **1524**: 1-11.
- Poller, B., H. Gutmann, S. Krahenbuhl, B. Weksler, I. Romero, P. O. Couraud, G. Tuffin, J. Drewe and J. Huwyler (2008). "The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies." J Neurochem **107**(5): 1358-1368.
- Qizilbash, N., S. L. Lewington and J. M. Lopez-Arrieta (2000). "Corticosteroids for acute ischaemic stroke." Cochrane Database Syst Rev(2): CD000064.
- Rabin, O., M. Piciotti, K. Drieu, J. M. Bourre and F. Roux (1996). "Effect of anoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities in immortalized brain endothelial cells." In Vitro Cell Dev Biol Anim **32**(4): 221-224.
- Regina, A., I. A. Romero, J. Greenwood, P. Adamson, J.-M. Bourre, P.-O. Couraud and F. Roux (1999). "Dexamethasone Regulation of P-Glycoprotein Activity in an Immortalized Rat Brain Endothelial Cell Line, GPNT." Journal of Neurochemistry **73**(5): 1954-1963.
- Rochfort, K. D., L. E. Collins, A. McLoughlin and P. M. Cummins (2016). "Tumour necrosis factor-alpha-mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6." J Neurochem **136**(3): 564-572.

- Rosenberg, G. A. (1998). "Ischemic brain edema." Progress in Cardiovascular Diseases **42**(3): 209-216.
- Salvador, E., S. Shityakov and C. Forster (2013). "Glucocorticoids and endothelial cell barrier function." Cell Tissue Res.
- Sandercock, P. A. and T. Soane (2011). "Corticosteroids for acute ischaemic stroke." Cochrane Database Syst Rev(9): Cd000064.
- Simard, J. M., J. Sahuquillo, K. N. Sheth, K. T. Kahle and B. P. Walcott (2011). "Managing Malignant Cerebral Infarction." Current treatment options in neurology **13**(2): 217-229.
- Sinha, S., M. E. Bastin, J. M. Wardlaw, P. A. Armitage and I. R. Whittle (2004). "Effects of dexamethasone on peritumoural oedematous brain: a DT-MRI study." J Neurol Neurosurg Psychiatry **75**(11): 1632-1635.
- Sun, Y., N. Li, J. Zhang, H. Liu, J. Liu, X. Xia, C. Sun, X. Feng, J. Gu, C. Du, W. Han and L. Lei (2016). "Enolase of *Streptococcus Suis* Serotype 2 Enhances Blood-Brain Barrier Permeability by Inducing IL-8 Release." Inflammation **39**(2): 718-726.
- Terasaki, T., S. Ohtsuki, S. Hori, H. Takanaga, E. Nakashima and K.-i. Hosoya (2003). "New approaches to in vitro models of blood–brain barrier drug transport." Drug Discovery Today **8**(20): 944-954.
- Tikk, K., D. Sookthai, S. Monni, M.-L. Gross, C. Lichy, M. Kloss and R. Kaaks (2014). "Primary Preventive Potential for Stroke by Avoidance of Major Lifestyle Risk Factors: The European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition-Heidelberg Cohort." Stroke **45**(7): 2041-2046.
- Wang, L. F., X. Li, Y. B. Gao, S. M. Wang, L. Zhao, J. Dong, B. W. Yao, X. P. Xu, G. M. Chang, H. M. Zhou, X. J. Hu and R. Y. Peng (2015). "Activation of VEGF/Flk-1-ERK Pathway Induced Blood-Brain Barrier Injury After Microwave Exposure." Mol Neurobiol **52**(1): 478-491.
- Weksler, B., I. A. Romero and P. O. Couraud (2013). "The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier." Fluids Barriers CNS **10**(1): 16.
- Weksler, B. B., E. A. Subileau, N. Perriere, P. Charneau, K. Holloway, M. Leveque, H. Tricoire-Leignel, A. Nicotra, S. Bourdoulous, P. Turowski, D. K. Male, F. Roux, J. Greenwood, I. A. Romero and P. O. Couraud (2005). "Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line." Faseb j **19**(13): 1872-1874.

- Wilhelm, W. (2013). "Praxis der Intensivmedizin." Springer Verlag **2**: 613.
- Yang, G. Y., C. Gong, Z. Qin, X. H. Liu and A. Lorriss Betz (1999). "Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice." Brain Res Mol Brain Res **69**(1): 135-143.
- Zhang, J., G. B. Sadowska, X. Chen, S. Y. Park, J.-E. Kim, C. A. Bodge, E. Cummings, Y.-P. Lim, O. Makeyev, W. G. Besio, J. Gaitanis, W. A. Banks and B. S. Stonestreet (2015). "Anti-IL-6 neutralizing antibody modulates blood-brain barrier function in the ovine fetus." The FASEB Journal **29**(5): 1739-1753.

Danksagung

Für die Unterstützung bei der Verfassung dieser Doktorarbeit bin ich vielen Menschen zu Dankbarkeit verpflichtet.

Ich danke Prof. Dr. Dr. Carola Förster für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit dieses selbstständig zu bearbeiten und für die konstruktive Kritik, zu der sie jederzeit bereit war.

Meine Dankbarkeit gebührt auch meiner Betreuerin, PD Dr. Malgorzata Burek, welche mir nicht nur die theoretischen Grundlagen und wichtiges Hintergrundwissen vermittelt hat, sondern auch stets bei Problemen ein offenes Ohr hatte und durch ihre optimistische Art einen großen Teil dazu beigetragen, meine Motivation aufrecht zu erhalten.

Ein großer Dank geht auch an das gesamte Team im Labor. Die praktische Unterstützung durch Elisabeth Wilken war insbesondere, aber nicht nur, zu Beginn der Arbeit eine große Hilfe. Die Zusammenarbeit im Labor, auch mit Anja Neuhoff und Katharina Pech, werde ich als sehr harmonisch in Erinnerung behalten. Zudem danke ich PD Dr. Winfried Neuhaus für seine Einschätzungen und Erläuterungen. Alle Genannten, ihre Hilfestellungen oder Verbesserungsvorschläge und das eine oder andere aufmunternde Wort von ihnen waren essenziell für das Zustandekommen dieser Arbeit.

Für die Rolle als Zweitgutachter möchte ich meinen Dank an PD Dr. Mario Löhr aussprechen. Ebenso danke ich Prof. Dr. Thomas Haaf für das Drittgutachten.

Zudem möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danken, die mich während des gesamten Studiums immer unterstützt haben. Selbstverständlich gilt mein Dank auch und insbesondere Ann-Kathrin, die mich nicht nur jederzeit psychisch unterstützt hat, sondern auch sehr viel Zeit und Mühe für das Korrekturlesen der Arbeit investiert hat.