

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

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

**Der Einfluss von NMDA-Rezeptor-Modulatoren auf die Blut-Hirn Schranke unter
ischämischen Bedingungen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Fabian Gaiser

aus Mutlangen

Würzburg, Juni 2018

Referentin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. Carola Förster

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2020

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	<i>Die Blut-Hirn Schranke</i>	- 1 -
1.1.1	Aufbau und Struktur	- 1 -
1.1.2	Funktion	- 4 -
1.2	<i>Krankheiten mit Beteiligung der Blut-Hirn Schranke</i>	- 5 -
1.2.1	Übersicht ausgewählter Krankheiten mit Alteration der BHS	- 5 -
1.2.2	Schlaganfall	- 5 -
1.2.3	Schädel-Hirn Trauma	- 8 -
1.3	<i>NMDA-Rezeptor</i>	- 9 -
1.3.1	Vorkommen	- 9 -
1.3.2	Aufbau und Funktion	- 10 -
1.3.3	NMDA-Rezeptor in Endothelzellen	- 11 -
1.3.4	NMDA-Rezeptor an der Blut-Hirn Schranke	- 11 -
1.3.5	Modulatoren	- 12 -
1.4	<i>Zielsetzung</i>	- 14 -
2	Material und Methoden	- 15 -
2.1	<i>Material</i>	- 15 -
2.1.1	Laborgeräte	- 15 -
2.1.2	Medien	- 17 -
2.1.3	Chemikalien	- 17 -
2.1.4	Verbrauchsmaterial	- 19 -
2.1.5	Kommerzielle Kits	- 20 -
2.1.6	TaqMan®-Sonden	- 21 -
2.1.7	Antikörper	- 22 -
2.1.8	Lösungen	- 22 -
2.1.9	Software	- 23 -
2.2	<i>Methoden</i>	- 23 -
2.2.1	Zellkultur	- 23 -
2.2.2	Viabilitätstest	- 29 -
2.2.3	LDH-Toxizitätstest	- 29 -
2.2.4	Proliferationstest	- 30 -
2.2.5	Quantitative Polymerasekettenreaktion	- 31 -
2.2.6	Western Blot	- 34 -

2.2.7	Matrix-Metalloproteinasen-Aktivitäts-Test (MMP-Test).....	- 38 -
2.2.8	Statistische Auswertung	- 39 -
3	Ergebnisse	- 40 -
3.1	<i>Optimierung der Versuchsbedingungen.....</i>	<i>- 40 -</i>
3.1.1	Proliferationstests mit NMDAR-Inhibitoren	- 40 -
3.1.2	Serumabhängigkeit der Motilität	- 42 -
3.2	<i>Toxizitäts- und Viabilitätstest mit NMDAR-Blockern.....</i>	<i>- 43 -</i>
3.2.1	Unter Normoxie-Bedingungen	- 43 -
3.2.2	Unter OGD+C6-Bedingungen	- 45 -
3.3	<i>Motilitätsversuche</i>	<i>- 47 -</i>
3.3.1	Modulierung der Umgebungsbedingungen.....	- 47 -
3.3.2	NMDA-Rezeptor-Blockade während Normoxie	- 51 -
3.3.3	NMDA-Rezeptor-Blockade während OGD	- 56 -
3.3.4	NMDA-Rezeptor-Blockade nach OGD als Therapieansatz	- 59 -
3.4	<i>Einfluss von Ischämie und NMDA-Rezeptor-Inhibitoren auf die mRNA-Expression ischämierrelevanter Zielstrukturen</i>	<i>- 62 -</i>
3.4.1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α	- 63 -
3.4.2	Vascular endothelial growth factor α	- 64 -
3.4.3	Vascular endothelial growth factor receptor 2	- 65 -
3.4.4	Tie2	- 66 -
3.4.5	Matrix-Metalloproteinase 2	- 67 -
3.4.6	Matrix-Metalloproteinase 3	- 68 -
3.4.7	Matrix-Metalloproteinase 9	- 70 -
3.4.8	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	- 71 -
3.4.9	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	- 72 -
3.5	<i>Einfluss von Ischämie und NMDA-Rezeptor-Inhibitoren auf barriererelevante Proteine</i>	<i>- 73 -</i>
3.5.1	Western Blot pERK/ERK	- 74 -
3.5.2	Western Blot pAkt/Akt	- 79 -
3.5.3	Western Blot Occludin	- 84 -
3.5.4	Western Blot Claudin-5	- 87 -
3.6	<i>Einfluss von Ischämie und NMDA-Rezeptor-Inhibitoren auf die Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität.....</i>	<i>- 91 -</i>
3.6.1	Matrix-Metalloproteinasen-Aktivitätstest nach 4h	- 91 -
3.6.2	Matrix-Metalloproteinasen-Aktivitätstest nach 24h	- 93 -
4	Diskussion	- 95 -

5	Zusammenfassung.....	- 110 -
6	Literaturverzeichnis	- 111 -
7	Abkürzungsverzeichnis	- 118 -
8	Abbildungsverzeichnis	- 121 -
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Die Blut-Hirn Schranke

1.1.1 Aufbau und Struktur

Die Idee, dass das Gehirn eine Besonderheit in der Nährstoffversorgung besitzt, hatte Paul Ehrlich schon im 19. Jahrhundert, als er zufällig bei Versuchen über intravasale Farbstoffverteilung eine Färbung aller Organe bis auf das Gehirn sah (Ehrlich, 1885). Seine Schüler Lewandowski und Goldmann führten weitere Experimente zur Aufklärung der Strukturen durch und bestätigten das Vorhandensein einer Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Gehirn (Lewandowsky, 1900, Goldmann, 1913).

Die Barrieren zwischen dem zentralen Nervensystem und der Peripherie des Körpers sind die Blut-Hirn Schranke, die Blut-Liquor Schranke an den choroidalen Plexus sowie das Arachnoidea-Mater-Epithel, wobei die Zugehörigkeit der Letzteren zu dem Schrankensystem kontrovers diskutiert wird (Kandel, 2013, Abbott et al., 2010). Den wichtigsten Teil der Barriere zwischen Hirn und dem restlichen Körper stellt die Blut-Hirn Schranke dar (Abbott et al., 2006). Die Blut-Hirn Schranke aus den Endothelzellen der Hirnkapillaren differenziert unter Einfluss der umgebenden Perizyten sowie Astrozyten, den Neuronen und der Extrazellulärmatrix. Auf Grund dieser Komplexität der beteiligten Strukturen wurde in den letzten Jahren der Begriff der neurovaskulären Einheit (NVU) geschaffen (Hawkins & Davis, 2005).

Die Blut-Hirn Schranke wirkt als physikalische sowie metabolische Barriere und nimmt so auch Einfluss auf etliche Transportvorgänge.

Die Dichtigkeit der Barriere zeigt sich in einem hohen transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) im Durchschnitt von 1500-1900 Ohm*cm² (Butt et al., 1990), welcher über eine Gesamtoberfläche von 20 m² aufrechterhalten wird (Begley & Brightman, 2003). Der Abstand der Kapillaren von 40µm ermöglicht die ausreichende Energieversorgung des Gehirns trotz des hohen Energieumsatzes (Duvernoy et al., 1983).

Schon früh wurde erkannt, dass die Occludenskontakte (engl. Tight-Junctions, TJ), welche die Endothelzellen verbinden, ein integraler Bestandteil der Blut-Hirn

Schranke sind (Brightman & Reese, 1969, Muir & Peters, 1962). Occludenskontakte bestehen aus einem transmembranösen und einem intrazellulären Anteil, sowie aus extrazellulären Schleifenstrukturen. Der transmembranöse Teil wird durch Occludine, verschiedene Claudine (1-24) (Mitic et al., 2000, Van Itallie & Anderson, 2004) und junktionalen Adhäsionsmolekülen (JAM) gebildet. Am Aufbau des intrazellulären Anteils sind im Besonderen Mitglieder der Familie der Membran-assoziierten-Guanylat-Kinasen (MAGUK) und weitere akzessorische Proteine beteiligt. Diese intrazellulären Anteile verbinden die Occludenskontakte mit dem Actin-Myosin-Zytoskelett der Epithel- beziehungsweise Endothelzelle. Der strukturelle Aufbau der Occludenskontakte unterscheidet sich wesentlich von dem vorhandenen Gewebe und dessen Lokalisation, woraus eine unterschiedliche Dichtigkeit der Barriere resultiert. So konnte an den Occludenskontakten der Blut-Hirn Schranke unterschiedlicher Spezies bisher unter anderem das Marker-Protein Occludin, die Claudine 1, 2, 3, 5, 11, 12, die Zonula-Occludens-Proteine ZO-1 und ZO-2, Tricellulin, Cingulin, AF6, 7H6 sowie JAM-1 nachgewiesen werden (Wolburg & Lippoldt, 2002, Wolburg et al., 2003, Nitta et al., 2003, Haseloff et al., 2014, Mariano et al., 2013, Stevenson et al., 1986, Jesaitis & Goodenough, 1994, Haskins et al., 1998).

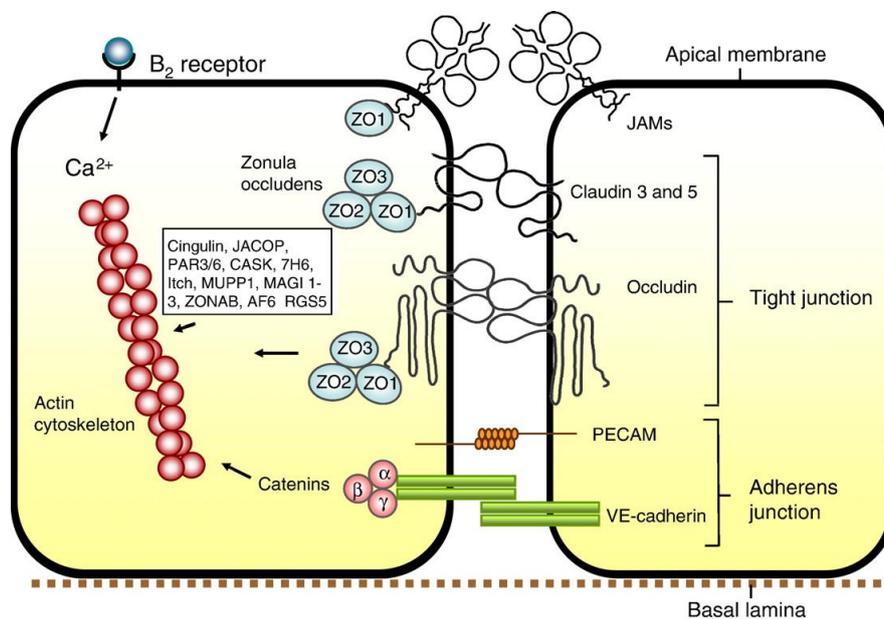


Abbildung 1-1 Aufbau der Occludenskontakte der BHS-Endothelzelle (N.J. Abbott et al. / Neurobiology of Disease 37 (2010) Seite 17)

Die Endothelzelle hat über die Produktion von Vasodilatoren wie unter anderem Stickstoffmonoxid und Prostazyklin oder auch Vasokonstriktoren wie Endothelin eine Reihe von Möglichkeiten, die Gefäßweite zu beeinflussen (Faraci & Heistad, 1998).

Aber auch das umgebende Gewebe, wie beispielsweise die Astrozyten, beeinflussen die Dichtigkeit der Blut-Hirn Schranke unter physiologischen wie auch pathophysiologischen Bedingungen, wie Cabezas et al. beim Morbus Parkinson zeigen konnte. (Cabezas et al., 2014). Dies geschieht unter anderem über transforming growth factor β (TGF β), glial derived neurotrophic-factor (GDNF) und Angiopoetin 1 (Ang1) (Lee et al., 2003, Igarashi et al., 1999). Weitere Zelltypen, wie beispielsweise Perizyten, spielen bei der Regulierung der Permeabilität der Blut-Hirn Schranke ebenfalls eine entscheidende Rolle, was unter anderem am Knock-Out-Modell von Mäusen gezeigt werden konnte, bei dem es zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn Schranke bei Fehlen von Perizyten kam (Armulik et al., 2010).

Mittlerweile hat sich daher der Terminus der neurovaskulären Einheit etabliert: Hierunter versteht man die funktionelle Einheit aus Neuronen, den Endothelzellen der Hirnblutkapillaren und deren Basallamina, sowie perivaskuläre Perizyten und Gliagewebe. Der Ausdruck entwickelte sich aus der Erkenntnis, dass der kortikale Blutfluss wesentlich von dem Nährstoffangebot der Neuronen sowie der Gliazellen abhängig ist, die Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke also durch Einflussnahme der sie umgebenden Zellen modulierbar sind, sie aber auch die Funktion von Astrozyten und Neuronen regulieren können (Iadecola, 2010, Woolsey et al., 1996, Abbott et al., 2006).

In diesem Zusammenspiel der Mikroumgebung hat eine Reihe von Faktoren die Funktion der Informationsübermittlung. So konnte in der Kommunikation von Neuronen und Astrozyten eine wichtige Rolle der Zyklooxygenase mit ihrer Produktion von Prostaglandinen sowie der Einfluss von Glutamat auf die intrazelluläre Kalzium-Homöostase zugeschrieben werden (Zonta et al., 2003).

Daher gibt es inzwischen eine Vielzahl an Untersuchungen, welche die Interaktion der verschiedenen Bausteine der neurovaskulären Einheit untereinander untersucht haben (Woolsey et al., 1996, Wolburg et al., 2009).

Aber nicht nur die Interaktion der Zellen untereinander, sondern auch die Auswirkungen mechanischer Einflüsse, wie die Scherungsbelastung der Endothelzellen durch den Blutfluss, haben bedeutende Auswirkungen auf beispielsweise die intrazellulären Signalwege, die Proteinsynthese und auch den Zellzyklus. So konnte *in-vitro* an einer humanen BHS-Endothelzelllinie (HBMEC) gezeigt werden, dass es bei Versuchen, in welchen der Blutfluss nachgeahmt wurde, zu einer Steigerung des aeroben Stoffwechsels, zu einer Zunahme von Transportproteinen wie den Glukosetransportern GLUT1,2,3,5 und den ABC-Transportern und zu einer erhöhten Aktivität von Cytochrom-Oxidasen kommt. Des Weiteren wird die Proteinproduktion zu Gunsten von Strukturproteinen verschoben und dadurch unter anderem weniger Enzyme, welche am Zellzyklus beteiligt sind, hergestellt, was letztendlich in einer Hemmung des Zellzyklus mündet. (Cucullo et al., 2011).

1.1.2 Funktion

Die Blut-Hirn Schranke dient bei höheren Wirbeltieren der Abschirmung des Gehirns vor Konzentrationsschwankungen von Elektrolyten, Neurotransmittern und Makromolekülen, wie sie im Blut regelhaft nach Nahrungszufuhr oder anderen Einflussfaktoren vorzufinden sind. Da jedoch die Neurone des Gehirns sehr sensibel auf jene Konzentrationsänderungen reagieren, ist eine Trennung der Kompartimente durch die Blut-Hirn Schranke unabdingbar.

Der wichtigste Baustein dieser Barriere sind, wie unter dem Punkt „Aufbau und Struktur“ beschrieben, die Occludenskontakte, welche den parazellulären Transport unterbinden. Dadurch ist nur noch ein Transport transzellulär möglich, welcher bis auf die Diffusion von Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und kleinen fettlöslichen Stoffen spezielle Transporter benötigt (Begley & Brightman, 2003).

Diese spezifischen Transporter an den Endothelzellen stellen eine adäquate Nährstoffversorgung des Gehirns sicher. So findet man eine Reihe an SLC (solute carrier) -Transportern, wie den insulinunabhängigen Glukosetransporter GLUT1 an der luminalen sowie der basolateralen Membran der Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke (Pardridge et al., 1990). Es gibt noch weitere Glukosetransporter, wie den sekundär-aktiven SGLT-ähnlichen Transporter an der luminalen Seite (Nishizaki et al., 1995). Aber auch für Aminosäuren gibt es, nach Ladung selektierende, spezielle

Transporter, wie beispielsweise für große neutrale (LAT) oder positiv geladene Aminosäuren (CAT) (Abbott et al., 2010).

Auf Grund der Dichtigkeit der Blut-Hirn Schranke bedarf es aber auch an geeigneten Transportern, um toxische Substanzen und auch Zellabbauprodukte aus dem Hirn ausschleusen zu können oder ihren Eintritt zu verhindern. So sollen hier als Beispiele das P-Glykoprotein (P-GP; ABC-Transporter ABCB1) und BCRP (Breast Cancer Resistance Protein; ABCG2) als Efflux-Transporter erwähnt sein (Virgintino et al., 2002, Loscher & Potschka, 2005).

1.2 Krankheiten mit Beteiligung der Blut-Hirn Schranke

1.2.1 Übersicht ausgewählter Krankheiten mit Alteration der BHS

Krankheit	Pathophysiologie
Schlaganfall	Ischämie
Schädel-Hirn Trauma	Ischämie physikalische Kräfte
Multiple Sklerose	chronisch inflammatorisch, demyelinisierend
Epilepsie	inflammatorisch strukturell
Morbus Alzheimer	neurodegenerativ, Ablagerungen von A β -Amyloid

Tabelle 1.1 Übersicht über ausgewählte Krankheiten mit Alteration der Blut-Hirn Schranke; (Daneman & Prat, 2015), (Weiss et al., 2009), (Zenaro et al., 2017)

1.2.2 Schlaganfall

Unter dem Sammelbegriff Schlaganfall versteht man die Minderperfusion von Hirngewebe entweder durch einen Gefäßverschluss oder eine Gefäßruptur im Bereich des Gehirns (Gehlen & Delank, 2010).

Der Schlaganfall ist mit einer Inzidenz von 182/100.000 Einwohner in Deutschland eine häufige Erkrankung, welche auch nachhaltig die Lebensqualität des Patienten beeinflusst (DEGAM, 2012). Der häufigste Pathomechanismus ist eine Okklusion

einer oder mehrerer Hirnarterien durch Thrombose oder Embolie. Dies führt zu einem zytotoxischen und folgenden vasogenen Ödem und im weiteren Verlauf dann zum Aufbrechen der BHS. Die Minderperfusion des Hirngewebes sorgt für einen Versorgungsstopp mit Nährstoffen wie zunächst Sauerstoff und im Verlauf Glucose. Daraus resultiert ein ATP (Adenosintriphosphat)-Mangel. In Folge der Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel kommt es zu einer Zunahme von Stoffwechselprodukten wie Laktat, einem Abfall des pH-Wertes und schlussendlich zu einem Funktionsverlust von beispielsweise aktiven Transportern. Somit kann unter anderem der Konzentrationsgradient der Elektrolyte nicht mehr aufrechterhalten werden, die Membran der Neurone depolarisiert, es werden spannungsabhängige Kalzium-Kanäle geöffnet und dadurch exzitatorische Transmitter ausgeschüttet, welche im synaptischen Spalt verbleiben, da die aktive Wiederaufnahme durch den Energiemangel gestört ist. Das so freigesetzte Glutamat stimuliert unter anderem NMDA-Rezeptoren, was in einem weiteren Anstieg von Kalzium mündet. Weiter kommt es zum Einstrom von Na^+ und Cl^- -Ionen in die Zelle, welchen passiv Wasser folgt und das zytotoxische Hirnödeme resultiert (Dirnagl et al., 1999).

Während das zytotoxische Hirnödeme innerhalb von Minuten bis Stunden nach dem Ereignis auftritt, entsteht das im Folgenden erläuterte vasogene Hirnödeme erst im Laufe von Stunden bis Tagen. Die Entstehung des vasogenen Hirnödems ist noch nicht einheitlich geklärt, jedoch endet dieses immer in einer gestörten Blut-Hirn Schranke.

Heo et al. zeigen in ihrer Übersichtsarbeit die multifaktorielle Genese eines vasogenen Hirnödems auf: So sind Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Signalmoleküle wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), Stoffwechselprodukte wie Stickstoffmonoxid (NO) und weitere Mediatoren beteiligt (Heo et al., 2005).

Nag et al. sehen die Rolle von Caveolae, also von Transportvesikeln, als einen entscheidenden Mechanismus an. Diese Caveolae transportieren Proteine mit Flüssigkeit aus dem Blut ins Hirngewebe. Das an der Struktur der Caveolae beteiligte Caveolin1 wird bei Zellstress und Scherungsbelastung verstärkt phosphoryliert, weshalb eine höhere Anzahl an transportierenden Vesikeln zur Verfügung steht und dadurch mehr Plasma-Proteine die Blut-Hirn Schranke passieren können (Nag et al.,

2009). Dies führt zu einem osmotischen Gradienten und somit zur extrazellulären Ödementwicklung.

Eine Beziehung zwischen zytotoxischem und vasogenen Hirnödemen könnte der intrazelluläre Kalzium-Anstieg sein, welcher auch die NO-Synthese stimuliert. Das daraus resultierende NO wirkt wegen seiner vasodilatatorischen und thrombozytenaggregationshemmenden Wirkung einerseits protektiv, auf der anderen Seite reagiert es mit reaktiven Sauerstoffspezies zu Peroxynitrit, welches DNA-schädigend wirkt und allein darüber, aber auch über einen erhöhten Energieverbrauch und weiteren Mechanismen, zum Zelltod führt (Iadecola, 1997).

Ergänzend sei erwähnt, dass Simard et al. zeitlich zwischen dem zytotoxischen und dem vasogenen Ödem ein ionisches Ödem beschreiben. Das ionische Ödem entsteht bei einer vollständig erhaltenen Blut-Hirn-Schranke. Es sind vielmehr osmotische Gradienten, entstanden während des zytotoxischen Ödems aus dem Strom von Na^+ nach intrazellulär, welche Na^+ nun über die BHS diffundieren lassen und diesem dann Cl^- und Wasser folgen. Erst dann folgt ein Integritätsverlust der BHS durch Destabilisierung der Occludenskontakte, woraufhin Albumin und weitere Proteine des Blutes ins Hirngewebe diffundieren (Simard et al., 2007).

Durch diese Ödem-Entwicklung und der eingeschränkten Blut-Hirn-Schranken-Funktion wird die Nährstoffversorgung weiter kompromittiert und es kann zur hämorrhagischen Infarzierung des Areals kommen. Ist das Ödem stark ausgeprägt, kann dies zu einer deutlichen intrakraniellen Druckzunahme führen, was letztendlich in der Hernierung von Hirngewebe beispielsweise im Foramen magnum führt und letal endet, sofern nicht frühzeitig eine Kraniektomie vorgenommen wird. (Rosenberg, 1999, Schoknecht et al., 2014).

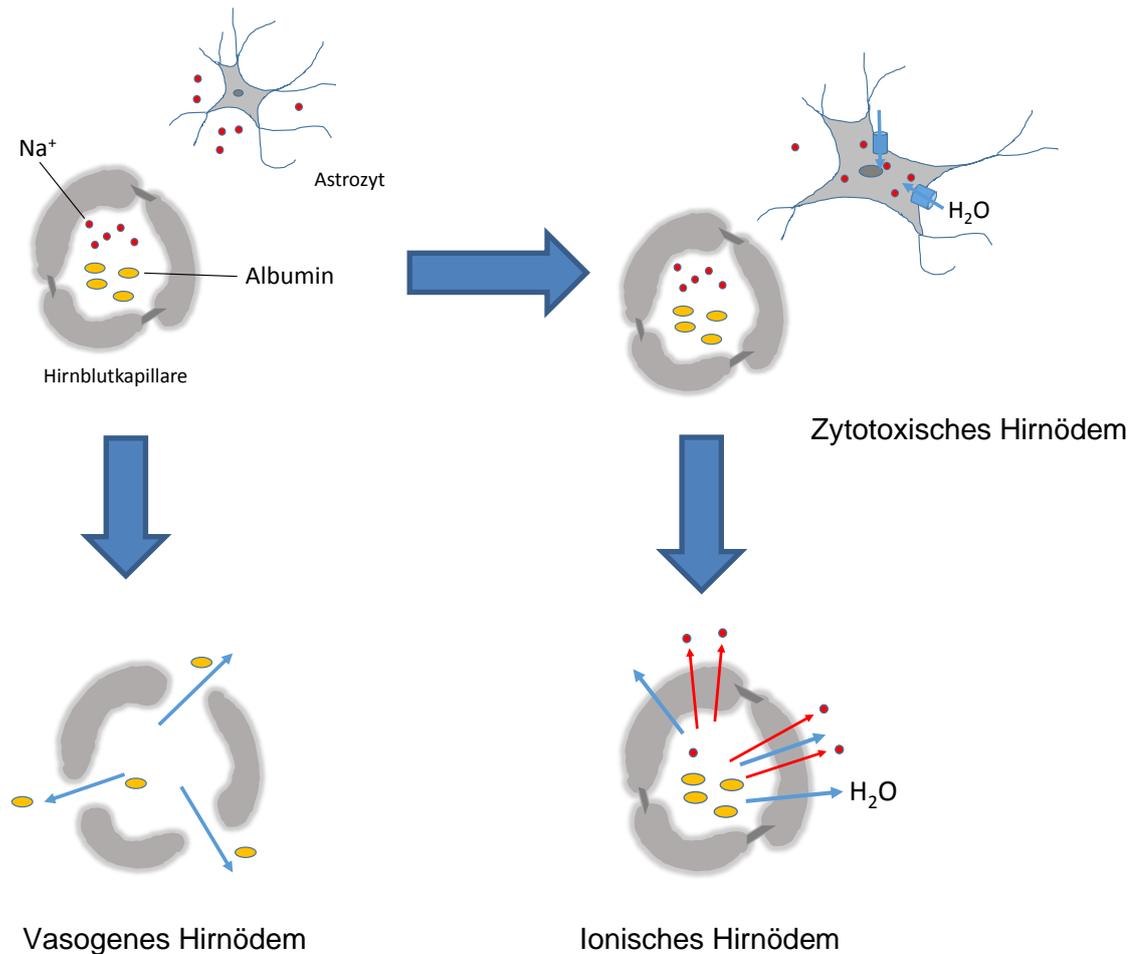


Abbildung 1-2 Die verschiedenen Arten des Hirnödems, übernommen aus (Michinaga & Koyama, 2015); Punkte: Na⁺, Ellipsen: Albumin, Hirnblutkapillare im Querschnitt.

1.2.3 Schädel-Hirn Trauma

Das Schädel-Hirn Trauma (SHT) ist mit einer Inzidenz von 332/100.000 Einwohnern in Deutschland fast doppelt so häufig wie der Schlaganfall (Rickels et al., 2010). Als Ursache kommen vor allem Verkehrsunfälle, sowie Sturzereignisse in der Freizeit wie auch im häuslichen Umfeld zu tragen (Bühning, 2006). Das SHT wird an Hand der Glasgow-Coma-Scale in drei Schweregrade eingeteilt (Ziegenfuss, 2017).

Durch die Scherkräfte, welche während das Traumas wirken, kommt es zu makroskopischen wie auch mikroskopischen Einrissen der Blut-Hirn Kapillaren und damit zur Schädigung der Blut-Hirn Schranke. Die Einrisse führen zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems, wodurch es durch Thrombenbildung zum Gefäßverschluss kommen kann. Dies führt zu Ischämien in den zu versorgenden

Hirngebieten (Schwarzmaier et al., 2010). Die physikalische Kraft des Traumas schädigt aber auch Neurone, was unter anderem in der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mündet. Diese ROS führen zu einer inflammatorischen Reaktion des betroffenen Gewebes. Hierdurch kann es ebenfalls zur Gefäßkonstriktion und zur Mangelversorgung des nachfolgenden Gewebes kommen. Durch die Einrisse an den Gefäßen kann es aber auch zur Hirnblutung kommen (Logsdon et al., 2015). Im Verlauf verlagert sich die Ursache der weiteren Hirnschädigung von den zunächst einwirkenden physikalischen Kräften zu einer neuroinflammatorischen Reaktion und Exzitotoxizität, welche vor allem durch die ROS und das parazelluläre Leck getriggert wird (Alves, 2014).

Die Folgen der Ischämie, der Hirnödembildung und des erhöhten Hirndrucks wurden im Kapitel 1.2.1 „Schlaganfall“ ausführlich erläutert.

1.3 NMDA-Rezeptor

1.3.1 Vorkommen

N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) ist eine synthetische, nicht endogene Verbindung, welche zur Entdeckung des NMDA-Rezeptors geführt hat. Im menschlichen Organismus ist es Glutamat, welches eine Aktivierung des Rezeptors bewirkt. So gehört der NMDA-Rezeptor neben dem α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure (AMPA-) und dem Kainat-Rezeptor zu der Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren.

Der NMDA-Rezeptor wurde zunächst in Neuronen des Zentralnervensystems (ZNS) beschrieben. Mittlerweile gibt es im ZNS eine Unterscheidung der NMDA-Rezeptoren der Neurone in synaptische und extrasynaptische. Weitere Untersuchungen konnten den NMDA-Rezeptor an Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke, an Astrozyten, an neuroepithelialen Zellen sowie in peripheren Geweben, wie Osteoklasten und Osteoblasten, nachweisen (Singh & Kaur, 2009, Krizbai et al., 1998, Tovar & Westbrook, 1999, Sharp et al., 2003, Patton et al., 1998).

1.3.2 Aufbau und Funktion

Der NMDA-Rezeptor ist ein transmembranöser, aus vier Untereinheiten bestehender Rezeptor. Die Untereinheiten werden als NR1-3 bezeichnet, wobei zwei NR1-Untereinheiten ubiquitär vorhanden sind. Von der Untereinheit NR1 gibt es durch alternatives Spleißen acht Isoformen, NR2 besitzt vier Varianten, welche als A-D bezeichnet werden, von der Untereinheit NR3 gibt es zwei Varianten A und B. Je nach Assemblierung der Untereinheiten kann der NMDA-Rezeptor als heterodimer oder als heterotrimer auftreten (Monyer et al., 1992, Paoletti et al., 2013).

Im Ruhezustand wird der Rezeptor durch ein Mg^{2+} -Ion in der Pore geblockt. Für die Aktivierung des Rezeptors müssen zum einen beide Bindungsstellen, eine für Glutamat und die zweite für D-Serin oder Glycin, besetzt sein, zum anderen muss es zu einer Depolarisation an der Zellmembran kommen. Dies führt zu einer Dislokation des Mg^{2+} -Ions und somit zur Öffnung des Rezeptorkanals für Ca^{2+} -, Na^{+} -Ionen und K^{+} -Ionen (Kemp & McKernan, 2002, Cull-Candy et al., 2001).

Dieser Influx von Ca^{2+} beeinflusst eine Reihe von Signalkaskaden, wie beispielsweise Calmodulin (Leonard et al., 1999) oder die Ras/Raf-Kaskade mit den MAP-Kinasen wie beispielsweise ERK1/2 (Rosen et al., 1994, Thomas & Huganir, 2004).

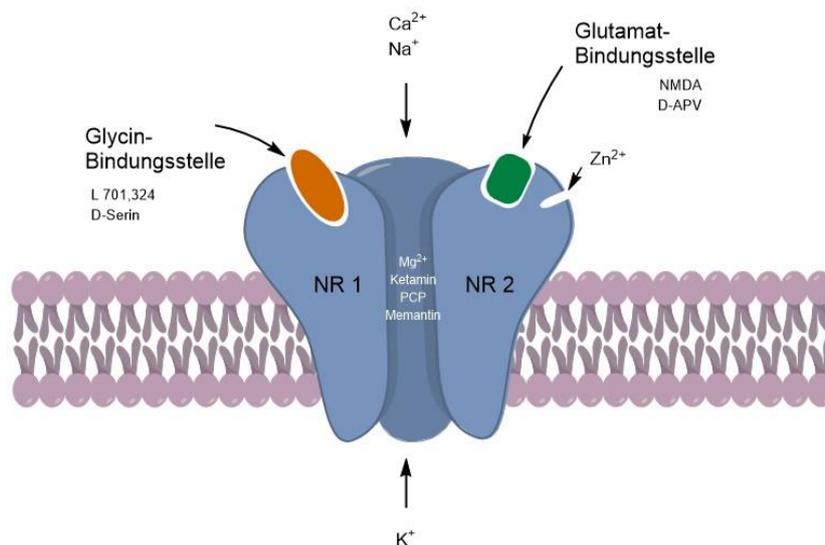


Abbildung 1-3 Aufbau des NMDA-Rezeptors mit Bindungsstellen und Modulatoren

1.3.3 NMDA-Rezeptor in Endothelzellen

Das Bild vom Vorkommen des NMDA-Rezeptors hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich gewandelt. So haben schon einige Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien unterschiedlicher Spezies wie Rindern (Kuhlmann et al., 2008), Mäusen (Legros et al., 2009) und auch beim Menschen (Reijerkerk et al., 2010) zeigen können, dass der NMDA-Rezeptor in Endothelzellen des Gehirns exprimiert und reguliert wird. Aber auch im Endothel der Arteria carotis und der Aorta bei Hyperhomocysteinämie (Chen et al., 2005) oder an glatten Muskelzellen von Pulmonalarterien im Rahmen von Thrombose und Lungenversagen (Nassar et al., 2011) konnte eine Regulierung des NMDA-Rezeptors beobachtet werden.

1.3.4 NMDA-Rezeptor an der Blut-Hirn Schranke

1.3.4.1 *Intrazelluläre Mechanismen*

Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors mit NMDA oder Glutamat erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Dieser Anstieg führt über die NAD(P)H-Oxidase zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese ROS-Bildung mündet in einer verminderten Schrankenfunktion, welche anhand einer Erniedrigung des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) sowie an der verstärkten Adhäsion von Leukozyten gesehen werden kann (Kuhlmann et al., 2008, Sharp et al., 2003, Kuhlmann et al., 2009). Des Weiteren konnten Kuhlmann et al. auch eine Zunahme der Phosphorylierung von Myosin-Leicht-Ketten (MLC) beobachten, was eine Kontraktion des Actin-Myosin-Zytoskeletts und somit des Zellkörpers bewirkt.

Eine weitere Folge des intrazellulären Kalziumanstiegs ist die Aktivierung der Zykllooxygenase 2 (COX2), welche wiederum Prostaglandine freisetzt und letztendlich die Aktivität des ABC-Transporters ABCB1 (P-Glykoprotein) erhöht (Bauer et al., 2008).

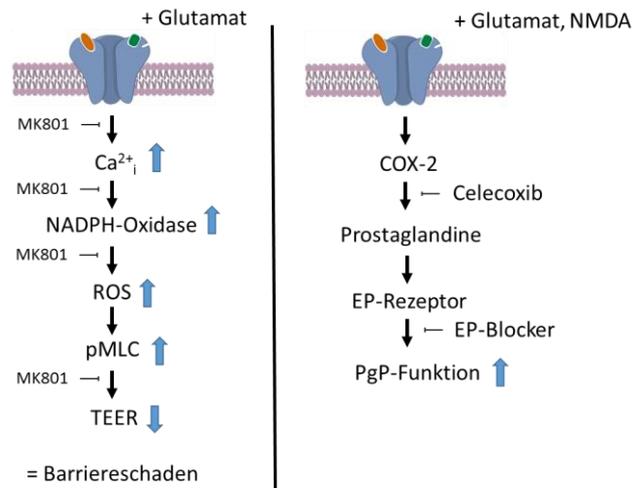


Abbildung 1-4 Der NMDA-Rezeptor an BHS-Endothelzellen und intrazelluläre Mechanismen, nach: Neuhaus et al. (2012b); MK801 = NMDA-R-Antagonist, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, pMLC = phosphorylierte Myosin-Leichtketten, COX-2= Zyklooxygenase 2, EP receptor = Prostaglandin Rezeptor, P-gP = P- Glykoprotein, EP-Blocker= Prostaglandin E Rezeptor-Blocker

1.3.5 Modulatoren

Neben den Agonisten des NMDA-Rezeptors NMDA, Glutamat sowie den Ko-Agonisten Glycin und D-Serin, welche unter dem Punkt „Struktur und Aufbau“ angesprochen wurden, gibt es auch eine Reihe von NMDA-Rezeptor Antagonisten, wobei hier das MK 801 (Dizocilpine) sowie das D-APV (D-2-Amino-5-phosphonopentansäure) als Blockersubstanzen, eingesetzt für *in-vitro*-Modelle, erwähnt sein sollen (Neuhaus et al., 2011). Klinisch wird der NMDA-Rezeptor Antagonist Memantin in der Therapie des Morbus Alzheimer und Ketamin zur Analgesie und Sedierung in der Anästhesie und Notfallmedizin angewandt (Lüllmann et al., 2010).

Wie bei Antagonisten üblich, gibt es auch hier eine Einteilung in Substanzen mit niedrigerer Bindungsstärke und Substanzen mit hoher Bindungsstärke sowie, da der NMDA-Rezeptor aus verschiedenen Untereinheiten besteht, in einer Selektivität für diese, beispielsweise Traxoprodil (CP101606) für die NR2B-Untereinheit (Kemp & McKernan, 2002, Cull-Candy et al., 2001, Ogden & Traynelis, 2011, Laird et al., 1996, Lipton, 2005, Kalia et al., 2008). Eine Übersicht über die bekanntesten Substanzen gibt die untenstehende Tabelle.

NMDAR-Antagonist	Rezeptorzustand bei Blockade	Bindungsstärke	Selektivität	klinische Anwendung
MK 801	offen	hoch	-	-
L701,324	keine Angabe	hoch	Glycin-B	-
D-APV	keine Angabe	hoch	-	-
Ifenprodil	dauerhaft offen	hoch	NR2B	-
Phenylcyclohexylpiperidin	offen	hoch	-	Drogenszene
Ketamin	offen	niedrig	-	Analgesie, Anästhesie
Amantadin	offen	niedrig	-	M. Parkinson, Influenza A, Intensivmedizin
Memantin	offen	niedrig	-	M. Alzheimer

Tabelle 2 NMDA-Rezeptor-Modulatoren und ausgewählte pharmakologische Eigenschaften

1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Motilität und der beteiligten Regulationsvorgänge an Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke unter ischämischen Bedingungen und damit verbunden, die Auswirkungen einer Behandlung mit NMDA-Rezeptor-Modulatoren.

Zunächst stand die Etablierung eines Tests und dessen Bedingungen an, um die Motilität von Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke (cerebEnd) untersuchen zu können. Im weiteren Verlauf erfolgte dann die Erweiterung des Modells um die Umgebungsbedingungen wie Ischämie sowie die Verwendung von konditioniertem Astrozyten-Medium, sodass ein Bestandteil der neurovaskularen Einheit ebenfalls berücksichtigt werden konnte.

Die Behandlung der Auswirkungen der Ischämie ist nach wie vor Stand aktueller wissenschaftlicher Diskussion. Auf Grund von Ergebnissen vorheriger Untersuchungen wurde in dieser Arbeit die Auswirkungen der Modulation des NMDA-Rezeptors an Hand der NMDAR-Antagonisten MK801 und L701,324 untersucht. Desweiteren erfolgte die Untersuchung der Expression von Proteasen, Botenstoffen und weiteren an der Motilität beteiligten Faktoren und deren Regulation durch die Behandlungsbedingungen und NMDA-Rezeptor-Modulation.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Adapter Kamera-Mikroskop	Adaptor Tube for Canon G7/G9 52mm	Carl Zeiss, Jena
Adapter Kamera-Mikroskop	Universal Digital Camera Adapter d30 M37/52x0.75	Carl Zeiss, Jena
Brutschrank	Steri-Cult 200 Incubator	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Brutschrank Hypoxie	HERACell 150i CO2	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Digitale Fotokamera	Powershot G7	Canon, Öta, Japan
Elektrophorese-Kammer	Mini PROTEAN TetraCell	BIO RAD, München
Elisa Reader	GeniosPro	Tecan
Feinwaage 1	440-47 N	Kern&Sohn GmbH, Balingen
Feinwaage 2	R180D	Sartorius GmbH, Göttingen
Heizblock	Dri-Block DB 2A	Techne AG, Jahnsdorf
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Magnetrührer	M21	GLW
Mehrkanal-Pipette	300 µl	Eppendorf, Hamburg

Mikropipette	10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge	Microspin FV2400	Lab4you, Berling
Netzgerät	Consort E835	Sigma
Niederspannungsnetzteil	Power Pack 25	Biometra, Göttingen
Pipett-Boy	accujet	Brand, Wertheim
Plattformschüttler	Duomax1030	Heidolph, Schwabach
Plattformschüttler Labor 1	L46	GLW
RT-PCR-Gerät	7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttelwasserbad	Typ 1083	GFL, Burgwedel
Spannungswandler für Elektrophorese	Peqpower 300	PeqLab, Erlangen
Spektrophotometer	Nanodrop 2000	PeqLab, Erlangen
Sterilbank	Hera Safe	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Tank-Blotter	PerfectBlue Tank-Elektroblotter WebS	BioRad
Thermocycler	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD 3080	Bandelin, Berlin
Vortexer	L46	GLW
WB-Bildwandler	FluorChem FC2	Alpha Innotech, SanLeandro, CA, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5418 R	Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge für PCR-Platten	Perfect Spin P	PeqLab, Erlangen
Zentrifuge für RNA-Extraktion	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für Zellkultur	Megafuge 16R	Thermo Scientific, Wilmington, USA

2.1.2 Medien

DMEM ohne Phenolrot, ohne Pyruvat	D1145 Sigma
DMEM ohne Phenolrot, ohne Pyruvat, ohne Glucose	A14430 Life Technologies
DMEM, high glucose	D5796 Sigma
DMEM, no glucose	11966-025 Gibco

2.1.3 Chemikalien

520 MMP FRET Substrate XIV	AS-60581-01, anaspec
Acrylamid (Rotiophorese)	3029.2 Roth
Albumin	A7906 Sigma
APS (Ammonium-Persulfate)	Sigma
Aqua dest.	0123 BBraun
BSA	A7906 Sigma
Coomassie	27816 Fluka
p-Coumarinsäure (90mM)	C-9008, Sigma
DMSO	D4540, Sigma
FCS	PAA, Cölbe

Hormonbereinigtes FCS	Aktivkohle filtriertes FCS, Vorgehen in Dissertation Blecharz Kap 3.4.4 beschrieben (Blecharz, 2009)
Gelatine	22151 Serva
Glucose	1.08342.1000 Merck
Glutaraldehyd	G 5882, Sigma
Glycin	A1377,1000 Applichem
H ₂ O nuclease-frei	AM9937 Ambion
H ₂ O ₂	216763, Sigma
H ₂ O ₂ (30%)	31642, Sigma
HCl	K025.1 Roth
Hepes (1M)	L1613 Biochem
L701,324	0907, Tocris Bioscience
Luminol 97%	123072, Biochrom
β-Mercaptoethanol	M6250 Sigma
Methanol	32213 Sigma
Milchpulver	A0830,1000 AppliChem
MK801	M107, Sigma
NaOH	UN1824 Merck
PBS	D8537 Sigma
Penicillin/Streptomycin	A2212 Biochrom
PhosStop	04906837001 Roche

Protease-Inhibitor-Cocktail	cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, 05 892 970 001, Roche
SDS	A1112,0500 AppliChem
ServaBlue G Powder	35050, Serva
TEMED (Starter)	T9281 Sigma
Tris	5429.3 Roth
Trypanblau 0,4%	T8154 Sigma
Trypsin	L2143 Biochrom
Tween 20%	P7949 Sigma

2.1.4 Verbrauchsmaterial

6-Well-Platten	Nunc, 140675
6-Well-Platten	Falcon, 353046
96-Well-Platten	Nunc, 167008
96-Well-Platten, schwarz (MMP)	GreinerBioOne, Kremsmünster
Bandenmarker peqGOLD prestained Protein	27-2210 Peqlab
Blotting-Papier	GB40 Hartenstein
Microtubes 1,5ml	Sarstedt, 72706
Pasteurpipetten	Brand, 747720
PCR soft tubes 0,2ml	Biozym, 711080
Pipettenspitzen 1000µl	Sarstedt, 70.762
Pipettenspitzen 1000µl, PCR	Sarstedt, 70.762.211

Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt, 70.760.002
Pipettenspitzen 200µl, PCR	Sarstedt, 70.760.211
Pipettenspitzen 100µl, PCR	Sarstedt, 70.760.212
Pipettenspitzen 20µl, PCR	Sarstedt, 70.1116.210
Pipettenspitzen 10µl, PCR	Nerbe plus, 07-613-8300
PVDF	BioRad, 162-0177
Serologische Pipette 1ml	Nunc, 170353
Serologische Pipette 5ml	Greiner bio-one, 606180
Serologische Pipette 10ml	Greiner bio-one, 607180
Serologische Pipette 25ml	Greiner bio-one, 760180
Sterile Filter Minisart® 0,20µM	Sartorius stedim, 17597
Sterile Filter Minisart® 0,45µM	Sartorius stedim, 17598
T75-Zellkulturflaschen Cellstar	Bio-One, Frickenhausen, 658175
Zentrifugenröhrchen 15ml	Greiner bio-one, 188271
Zentrifugenröhrchen 50ml	Greiner bio-one, 227261
Zentrifugenröhrchen Filtereinheiten	UFC901024, Millipore, Germany

2.1.5 Kommerzielle Kits

Absolute qPCR ROX Mix	Thermo Scientific, AB-1138B
Cytotoxicity Detection KitPlus (LDH)	Roche, 04744926001
EZ4u®-Proliferations- und Zytotoxizitäts-Test	Biomedica, B1-5000

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, 4374966
Nucleo Spin® RNA II	Thermo Scientific, 740955.10
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, 23225

2.1.6 TaqMan®-Sonden

beta-actin	Applied Biosystems, Mm00607939_s1
HIF1 α	Applied Biosystems, Mm00468869_m1
MMP2	Applied Biosystems, Mm00439498_m1
MMP3	Applied Biosystems, Mm00440295_m1
MMP9	Applied Biosystems, Mm00442991_m1
PAI1	Applied Biosystems, Mm00435860_m1
Ptch1	Applied Biosystems, Mm00436026_m1
Sox18	Applied Biosystems, Mm00656049_gH
Tie2	Applied Biosystems, Mm00443243_m1
TIMP1	Applied Biosystems, Mm00441818_m1
TIMP3	Applied Biosystems, Mm00441826_m1
VEGF α	Applied Biosystems, Mm01281449_m1
VEGFR2	Applied Biosystems, Mm00440099_m1

2.1.7 Antikörper

Akt	1:200	SC-8312 Santa Cruz
Anti-mouse (ECL IgG HRP-linked F(ab') ₂ fragment)	1:5000	LNA931V/AG, GE Healthcare UK Ltd.
Anti-rabbit (ECL IgG HRP-linked whole antibody)	1:5000	LNA934V/AG, GE Healthcare UK Ltd
Claudin-5	1:400 (50% Glycerol)	34-1600, Zymed®, Invitrogen, rabbit
Erk1/2 (p44/42)	1:1000	#9102 Cell Signaling
Occludin	1:400 (50% Glycerol)	71-5000, rabbit
Phospho-Akt	1:200	#4060 Cell Signaling
Phospho-Erk1/2 (Phospho-p44/42)	1:200	#4370 Cell Signaling
β-Actin	1:5000	A3853, SigmaAldrich, mouse

2.1.8 Lösungen

ECL I	2 ml Luminol 250mM; 0,88 ml p-Coumarinsäure 90mM; 10 ml 1M Tris/HCl pH 8,5; ad 100ml Aqua dest.
ECL II	64 µl 30% H ₂ O ₂ ; 10 ml 1M Tris/HCl pH 8,5; ad 100ml Aqua dest.
RIPA-Puffer	2,5 ml 1M Tris (pH 8,0); 7,5 ml 1M NaCl; 50mg SDS; 250mg Natriumdesoxycholat; 500 µl NP40 (1%)
Elektrophoresepuffer	60,4g Tris/ 288g Glycin/ 20g SDS 10%/ ad 2l H ₂ O

Coomassie-Lösung	1,25g ServaBlue G Powder; 227ml Isopropanol; 227ml Aqua dest.; 46ml Eisessig
Entfärberlösung	10% Eisessig; 30% Methanol; 60% Aqua dest.
Transferpuffer	6,06g Tris/ 28,83g Glycin/ 400ml Methanol/ 7,5ml SDS 10%/ ad 2l H ₂ O
Lämmli-Lösung (4x)	4g SDS; 20ml Glycerol; 0,002g Bromphenolblau; 12,5 ml 0,25 M TrisHCl (pH 6,8); bis 50 ml mit Aqua dest. auffüllen

2.1.9 Software

Photoshop Elements 7+8	Adobe
Excel	Microsoft
magellan	Tecan
SigmaPlot	Systat Software Inc

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 *cerebEND-Zelllinie*

2.2.1.1.1 Eigenschaften

CerebEND Zellen wurden durch die Arbeitsgruppe Förster im Jahre 2006 aus zerebellaren murinen Endothelzellen extrahiert und immortalisiert. Sie dienen als *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke für Simulationen verschiedener Krankheiten wie beispielsweise Multipler Sklerose (Silwedel & Förster, 2006). Eine Identifizierung von Rezeptoren und Regelgrößen erfolgte bereits in unserer Arbeitsgruppe. So konnten die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Untereinheiten NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR3A und NR3B nachgewiesen werden und auch teilweise deren Modulation

unter bestimmten Bedingungen. Aber auch andere Transporter wie GLUT1 und sglt1 konnten identifiziert werden. (Neuhaus et al., 2012a)

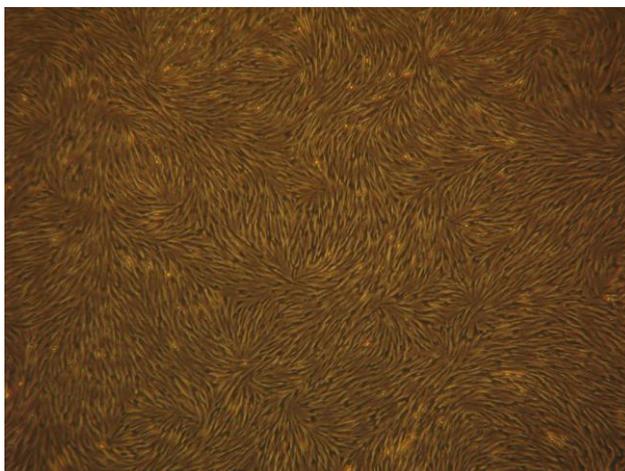


Abbildung 2-1 lichtmikroskopische Aufnahme (10-fach): konfluenter Zellrasen mit cerebEND

2.2.1.1.2 Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), welchem 10% fetales Kälberserum (FCS) sowie 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml) (P/S) zugesetzt wurde, in 75cm² Kulturflaschen. Die Kultur wurde im Inkubator bei 37°C, 21% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid, 74% Stickstoff und 95% Luftfeuchte durchgeführt. Alle Medien und Substanzen wurden unter sterilen Bedingungen geöffnet, angesetzt und verwendet.

An Tag 2 und 5 erfolgte ein Mediumwechsel: Zunächst wurde die Zellkultur im Mikroskop betrachtet, um mögliche Kontaminationen auszuschließen. Dann wurde das verbrauchte Medium mit einer zuvor abgeflamten Pasteur-Pipette abgesaugt und jeweils 15ml frisches DME-Medium mit 10% FCS und 1% P/S hinzugefügt.

Die Kulturflaschen wurden alle 7 Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet: Alle Arbeiten erfolgten unter der Sterilbank. Zunächst wurden die Zellen (an Tag 0 bzw. 7) zweimal mit jeweils 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit 3ml 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA von der Oberfläche gelöst. Der Grad der Ablösung wurde mehrmals unter dem Mikroskop kontrolliert um eine Zellschädigung auszuschließen. Danach wurden in die Zellkulturflasche 54ml DME-Medium mit 10%FCS und 1%P/S (DME+/+) zugefügt um die Trypsinwirkung zu blocken. Diese Suspension wurde dann auf drei gelatinebeschichtete T75-Flaschen

ausgesät. Die Gelatine-Beschichtung erfolgte zuvor mit 15ml Gelatine und einer Einwirkzeit von 30-90 Minuten bei Raumtemperatur (RT).

2.2.1.2 C6-Glioma-Zelllinie

2.2.1.2.1 Eigenschaften

C6-Glioma-Zellen sind eine Zelllinie, welche aus Hirntumoren (Gliome) von Ratten gewonnen wurde. Diese Tumoren bestehen aus Stütz- und Versorgungszellen des Hirngewebes wie beispielsweise Oligodendrozyten, Mikroglia oder auch Astrozyten. In der vorliegenden Arbeit interessierte vor allem der Einfluss des Umgebungsgewebes auf die Endothelzellen unter gewissen Bedingungen. Da eine Ko-Kultur bei dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht möglich war, wurden die Versuche mit konditioniertem C6-Medium durchgeführt. Dies bedeutet, dass nicht die Zellen direkt ko-kultiviert wurden, sondern das Medium, mit welchem die C6-Zellen zuvor bestimmten Bedingungen ausgesetzt wurden, für die Versuche mit den cerebENDs eingesetzt wurde. Dieses Medium nennt man konditioniertes Medium. In diesem findet man nun Hormone, Chemokine, Zytokine und andere Stoffe, welche von den C6-Zellen während der Konditionierung abgegeben wurden.

2.2.1.2.2 Kultivierung

Die C6-Zellen wurden an Tag 0 auf neue gelatinebeschichtete T75-Flaschen ausgesät (15 ml Gelatine/ Flasche, Einwirkzeit 30 – 60 Minuten). Das Teilungsverhältnis war 1:20 alle 7 Tage: Es erfolgten zunächst zwei Waschschriffe mit jeweils 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und anschließend der Ablösevorgang mit 3ml 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA. Der Grad der Ablösung wurde mehrmals unter dem Mikroskop kontrolliert um eine Zellschädigung auszuschließen. Die Reaktion wurde mit 57ml DME+/-Medium blockiert. Da es nicht erforderlich war, 20 neue Flaschen auszusäen, erfolgte die Aussaat nur mit einem Teil der Zell-Mediumsuspension. Diese wurde dann auf ein Volumen aufgefüllt, sodass pro Flasche 20ml Zell-Mediumsuspension zur Verfügung stand. Der Zellrasen war am Tag 5 konfluent. Ein Mediumwechsel wurde immer an Tag 2 und 5 durchgeführt (Vorgehen s. cerebEnds).

2.2.1.2.3 Gewinnung von konditioniertem Medium

Für die Gewinnung von konditioniertem Medium wurden die Zellen an Tag 0 mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen/ cm² auf 6-Well-Platten ausgesät (3ml/ Well). Ein Mediumwechsel fand an Tag 2 und 5 mit DME+/-Medium statt. An Tag 7 erfolgte dann erneut ein Mediumwechsel, nach vorherigem zweimaligem Waschen mit 3ml PBS, mit dem entsprechenden Medium (meist DMEM + 1% P/S +/- Glukose), Glukose-freies Medium wurde bei den OGD-Versuchen benutzt. Darauf folgte die 4h-Konditionierung des Mediums im jeweiligen Brutschrank (Normoxie bzw. Hypoxie/Ischämie).

2.2.1.3 Zellzählung

Vor der Zellzählung wurden die Zellen, wie oben beschrieben, mittels 3ml Trypsin/EDTA abgelöst und dann mit 22ml DMEM + 10%FCS + 1%P/S in ein 50ml Zentrifugenröhrchen übergeführt. Dann wurden die Zellen bei 300g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen in 1ml Kulturmedium resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 10µl entnommen und mit 90µl Trypanblau (1:10 mit PBS verdünnt) versetzt, um abgestorbene Zellen zu detektieren. Aus dieser Trypanblau-Zellsuspension wurden 10µl in die Neubauer-Zählkammer aufgetragen und vier große Quadrate gezählt, wobei dann der Mittelwert des Ergebnisses für die Berechnung der Aussaatdichte verwendet wurde.

2.2.1.4 Wound-Healing-Assay (IBIDI®)

Der Wound-Healing-Assay der Firma IBIDI® ist einem Scratch-Assay sehr ähnlich. Er besteht aus zwei Kammern, in welchen Zellen angezüchtet werden können. Die Kammerhülle wird am Tag der Behandlung beziehungsweise des Versuchsstarts entfernt, wodurch nun der freiwerdende Steg durch die Zellen von beiden Seiten her bewachsen werden kann. Die Wachstumsgeschwindigkeit, also die Zeit, wie schnell oder langsam der Steg von den Zellen bewachsen wird, ist als Marker für die Motilitätsfähigkeit und –stärke der Zellen angesehen.

Die Firma IBIDI® vertreibt Wound-Healing-Assays mit zwei unterschiedlichen Oberflächen: uncoated und treated. Die Oberfläche uncoated ist unbehandelt, die

Oberfläche treated von IBIDI® mit einer speziellen Beschichtung ausgelegt, sodass ein besseres Zellwachstum möglich ist.

Die Zellen wurden am Tag 0 mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät. Dabei wurden in jede Kammer 70µl einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 62.900 Zellen/ml pipettiert. Danach wurde um die Kammern herum circa 1,5ml Kulturmedium aufgetragen um eine Austrocknung der Kammern während der Anzucht zu verhindern. Der Mediumwechsel erfolgte an Tag 2 mit 70µl Kulturmedium, an Tag 5 zeigte der Zellrasen komplette Konfluenz und so wurde eine Mediumreduktion auf DME-Medium mit 1% FCS und 1% P/S durchgeführt, um eine Differenzierung der Zellen zu erreichen. Dabei wurde zunächst mit einer Pasteur-Pipette das Medium um die Kammern herum abgesaugt und dann mit einer Mikropipette das Medium aus den Kammern. Danach wurden 70µl des reduzierten Mediums appliziert und wiederum circa 1,5ml des reduzierten Mediums um die Kammern herum. Am Versuchstag (Tag 7) wurde die Zellkammer mittels einer zuvor abgeflamten Pinzette vorsichtig abgenommen, das Medium abgesaugt, zwei Mal mit 2ml PBS gewaschen und dann die Mediumlösungen appliziert. Am Versuchstag wurde Medium nur mit Zusatz von Penicillin/Streptomycin verwendet, außer es ist anders angegeben.

Danach wurden die Bilder mittels einer Digitalkamera (Canon 7), welche an ein Mikroskop (Zeiss Axiovert 25) durch einen Adapter (Zeiss) befestigt war, für den Zeitpunkt null erstellt.

Zu Beginn dieser Promotionsarbeit wurde auch die Oberfläche „uncoated“ getestet. Dabei wurde die Zellkammer mit je 50µl Gelatine beschichtet (Mindesteinwirkzeit: 30 Minuten). Diese Oberfläche zeigte sich aber als nicht praktikabel.

2.2.1.4.1 Auswertung des Wound-Healing-Assays (IBIDI®)

Die Auswertung der Bilder des Migrationsassays erfolgte mit der Software Adobe Photoshop®. Dabei wurden zunächst die Einzelbilder aneinandergesetzt, um dann ein neues Gesamtbild (.jpg) zu erstellen. Die Auswertung erfolgte folgendermaßen: Es wurde eine Linie mithilfe des Linienzeichengeräts mit einer Länge von 80,00 cm +/- 0,05 cm am Übergang zwischen der bewachsenen Oberfläche und dem Spalt erstellt. Danach wurde auf 33% gezoomt, eine neue Ebene erstellt und bei dieser die Deckkraft auf 25% reduziert. Danach wurde das Buntstiftwerkzeug mit einer

Liniendicke von 27 Pixeln, sowie der Zeichenfarbe RGB-Rot ausgewählt. Mit diesem Buntstiftwerkzeug wurden dann die seitlichen Begrenzungen der zuvor gezeichneten Linie orthogonal zum Spalt abgefahren. Nun wurde die Linie wieder gelöscht, mit dem Buntstiftwerkzeug der Übergang zwischen Spalt und bewachsener Oberfläche abgefahren und schließlich mit Hilfe des Füllwerkzeuges, welches auf die Farbe RGB-Rot eingestellt wurde, das gezeichnete Viereck ausgefüllt. Zuletzt kann man im Kasten „Histogramm“ nach Auswahl der Quelle „aktuelle Ebene“ und des Kanals „RGB“ unter dem Punkt Pixel die eingefärbte Fläche ablesen. Nun wurde die Pixelanzahl der 48h-Bilder von der Pixelanzahl der 0h-Bilder subtrahiert. Der Mittelwert wurde gebildet. Das Ergebnis der Kontrolle wurde dann auf 100% gesetzt. Die weiteren Behandlungen wurden dann mit ihrer Rohpixelanzahl ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt:

$$\text{zugewachsene Fläche [\%]} = \frac{0h \text{ Pixel Behandlung} - 48h \text{ Pixel Behandlung}}{0h \text{ Pixel Kontrolle} - 48h \text{ Pixel Kontrolle}}$$

2.2.1.5 Sauerstoff- und Glukosemangel Behandlung

2.2.1.5.1 Prinzip

Sauerstoff- und Glukosemangel wird im Englischen mit „oxxygen and glukose deprivation“ übersetzt, woher die Abkürzung OGD stammt. Die OGD-Therapie von Zellen ist ein international angesehenes Prinzip, Zellen ischämischen Bedingungen auszusetzen um dadurch Krankheiten wie beispielsweise Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma zu simulieren.

2.2.1.5.2 Vorgehen

Die OGD-Behandlung erfolgt in einem separaten Inkubator, welcher mit 1% Sauerstoff, 5% CO₂ und 94% N₂ betrieben wird. Zunächst wurden die Zellen in den IBIDI®-Kulturgefäßen beziehungsweise den 6-Well-Platten zweifach mit 2ml PBS gewaschen, um das glukosehaltige Kulturmedium restlos zu entfernen. Danach wurden die Zellen für vier Stunden in glukose-freiem DME-Medium in den sauerstoffarmen Inkubator gestellt. Die Reoxygenierung erfolgte dann im Inkubator bei 21% O₂ nach einem Mediumwechsel auf glukosehaltiges Medium beziehungsweise Glukosezugabe. Bei den IBIDI-Kulturgefäßen® sowie den 6-Well-

Platten wurden die Deckel im sauerstoffarmen Inkubator abgenommen, um einen schnellen Gasausgleich und Gasaustausch zu erreichen.

2.2.2 Viabilitätstest

2.2.2.1 Prinzip

Der Viabilitätstest soll den Einfluss der Umweltfaktoren auf die Vitalität der Zellen messen, um eine Stoffwechselveränderung darstellen zu können. Die Testung erfolgt zum Beispiel mittels 3H-Thymidin oder auch kommerziell verfügbarer Tests, wie beispielsweise dem EZ4u®-Test. Dieser beruht auf einer Substratreaktion eines Chromophors, welche durch einen Farbumschlag bei Reduktion in vitalen Mitochondrien sichtbar gemacht werden kann und mittels ELISA-Reader gemessen wird.

Dabei ist darauf zu achten, dass der Zellrasen konfluent ist und man so die Stoffwechselaktivität misst, welche wiederum über den Farbumschlag objektiviert wird. So kann man feststellen, ob die Einflussgrößen Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen haben. Ergänzend führten wir dann auch einen Toxizitätstest durch.

2.2.2.2 Durchführung

Zunächst wurden 96-Well-Platten mit 50µl/Well Gelatine beschichtet (Mindesteinwirkzeit: 30 Minuten). Dann erfolgte die Aussaat der cerebEND-Zellen am Tag 0 mit einer unterschiedlichen Zelldichte, jedoch mit einem konstanten Volumen von 200µl. Die Vorversuche ergaben eine sinnvolle Zelldichte von 20.000 Zellen/cm². Die Kultivierung erfolgte mit DME-Medium+10%FCS+1%Penicillin/Streptomycin. Am Tag 2 und 5 wurde das Medium mittels Multikanal-Pipette gewechselt ehe dann am Tag 7 mit den Substanzen, beziehungsweise den Bedingungen, die Zellen behandelt wurden. Danach folgte die Anwendung des EZ4u-Kits. Dabei wurde strikt nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet. Die Messung im Photometer fand bei 450 nm statt, mit der Referenzlänge von 620 nm.

2.2.3 LDH-Toxizitätstest

2.2.3.1 Prinzip

Der Laktat-Dehydrogenase(LDH)-Test wird als Toxizitätstest verwendet und mittels eines Kits durchgeführt. Hintergrund dieses Tests ist, dass bei dem Untergang von

Zellen unter anderem die Zellmembran geschädigt wird und dadurch intrazelluläre Proteine aus der Zelle in das Medium gelangen. Die Laktatdehydrogenase ist ein solches Protein. Wenn also eine hohe LDH-Konzentration im Serum beziehungsweise im Medium vorherrscht, kann auf einen Zelluntergang geschlossen werden. Im Falle dieser Arbeit soll eine mögliche toxische Wirkung der verwendeten Substanzen und Bedingungen ausgeschlossen werden.

2.2.3.2 Durchführung

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät, welche zuvor mit 50µl Gelatine pro Well beschichtet wurden. An Tag 2 und 5 wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Am Tag 6, dem Versuchstag, wurden zunächst die Zellen zwei Mal mit je 200µl PBS pro Well gewaschen. Für die Versuche wurde phenolrot-freies Medium verwendet, da die Detektor-Lösung ebenfalls im Rot-Bereich sichtbar wird. Die weiteren Schritte erfolgten nach Protokoll des Kits. Dabei wird ein Teil der unbehandelten Zellen mittels eines Lysis-Puffer inkubiert, um eine Maximal-Probe zu erhalten. Diese Inkubation dauert 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank, danach wird eine Detektor-Lösung auf alle Proben pipettiert und wiederum 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach diesen Schritten wird die Reaktion mittels Stopp-Lösung angehalten. Nun wird die Extinktion mittels Photometer bei 492 nm und der Referenzlänge 620 nm gemessen.

2.2.4 Proliferationstest

2.2.4.1 Prinzip

Mittels Proliferationstest kann man den Einfluss von Umweltfaktoren wie Zytokinen, Chemokinen oder chemischen Substanzen auf die Proliferation von Zellen messen. Der Proliferationstest wurde bei den vorliegenden Versuchen mit demselben Kit durchgeführt wie der Viabilitätstest. Solange der Zellrasen nicht dicht ist, kann mithilfe dieser Farbreaktion die Proliferation erfasst werden, da abhängig von der Proliferationsstärke auch die Mitochondrienzahl abhängt.

2.2.4.2 Durchführung

Das Vorgehen ist dasselbe wie beim Viabilitätstest, außer dass die Anzucht über 4 Tage geschieht, das heißt Aussaat an Tag 0, Mediumwechsel an Tag 2, Versuche an Tag 3, an welchem der Zellrasen erst ungefähr zu 70 Prozent konfluent war. Dabei

wurde strikt nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet. Es erfolgte die Messung im Photometer bei 450 nm und einer Referenzlänge von 620 nm.

2.2.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion

2.2.5.1 Prinzip der quantitativen Polymerasekettenreaktion

In der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) wird mittels der PCR-Technik, welche die Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation beinhaltet, genetisches Material amplifiziert. Die qPCR ist eine Erweiterung, welche die quantitative Analyse der Proben mittels Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. Jeden Zyklus entsteht exponentiell mehr komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA), an welche sich die fluoreszenzmarkierten Sonden anlagern können. Diese Sonden können nur im gebundenen Zustand Fluoreszenzsignale senden. Es wird nach jedem Zyklus die Stärke der Fluoreszenz gemessen und so eine absolute Zahl generiert, anhand welcher man auf die Menge an vorhandener Ribonukleinsäure (RNA) schließen kann. Umso später also ein Fluoreszenzsignal kommt, desto weniger spezifische RNA ist in den Proben vorhanden.

2.2.5.2 RNA-Gewinnung, Isolierung und Konzentrationsmessung

2.2.5.2.1 Prinzip

Um zunächst Probenmaterial zu gewinnen, werden die Zellen lysiert. Daraufhin muss eine Aufreinigung der Proben stattfinden, um eine Separierung des Zelldetritus von der mRNA zu erreichen. Dies geschieht mithilfe eines industriellen Kits, welcher über Säulen die RNA bindet und über Waschschriffe den Detritus weitestgehend entfernt. Danach wird mit destilliertem Wasser (H₂O) die RNA von der Säule entfernt und steht dann der weiteren Analyse zur Verfügung. Es folgt eine Konzentrationsbestimmung der RNA durch Spektralphotometrie, um das verwendete Volumen der RNA für die cDNA-Synthese anzupassen und so die cDNA-Konzentration der Proben auf denselben Wert einzustellen. Dadurch erst kann eine qPCR zum quantitativen Vergleich sinnvoll durchgeführt werden.

2.2.5.2.2 Durchführung

Die cerebEND-Zellen wurden in 6-Well-Platten am Tag 0 mit einer Aussaatdichte von 40.000 Zellen/cm² ausgesät. Für die Herstellung des C6-konditionierten Mediums wurden C6-Zellen an Tag 0 mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät. Ein

Mediumwechsel wurde an Tag 2 und 5 durchgeführt. An Tag 7 wurden die CerebEND-Zellen mit dem (konditionierten) Medium sowie den Substanzen versetzt und OGD- oder Normoxie-Bedingungen ausgesetzt. Nach 4 Stunden Inkubationszeit wurde der Mediumüberstand mittels Pipette abgenommen und für Matrix-Metalloproteinase(MMP)-Tests bei -80°C asserviert. Die Zellen wurden dann zweimal mit 3ml eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurde 350µl RA1-Lysis-Puffer aus dem Nucleo-Spin® RNA-Kit + 3,5µl β-Mercaptoethanol auf die Zellen appliziert. Mittels Zellschaber wurden die Zellen von der Oberfläche abgekratzt und mittels Pipette in ein steriles Mikroreaktionsgefäß übergeführt und sofort auf Eis gestellt. Die Proben wurden im -80°C-Gefrierschrank aufbewahrt.

Bei der Aufbereitung der RNA erfolgte zunächst die Homogenisierung der Probe mittels Feindosierungsspritze. Die weitere Extraktion der RNA erfolgte mit Hilfe des Nucleo-Spin®-RNA-II-Kits. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen und die Schritte Lysat-Filtration, Korrigieren der RNA-Bindungsverhältnisse, RNA-Bindung, Entsalzung der Silicium-Membran, DNA-Verdau, diverse Waschschrte und Elution der RNA durchgeführt.

Die RNA-Menge in der Probe wurde mittels Spektralphotometer (Nano-Drop 2000®, Thermo Scientific) gemessen um bei der cDNA-Herstellung die Volumina so anpassen zu können, dass eine Konzentration von 1µg/µl bei jeder Probe entsteht. Dabei wurden 1,2µl der jeweiligen RNA in das Gerät pipettiert und mittels Spektralphotometrie analysiert.

Die aufgereinigte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.5.3 *cDNA-Synthese*

2.2.5.3.1 Prinzip

Da die RNA-Menge pro Probe viel zu gering ist um mit der quantitativen Polymerasekettenreaktion sinnvolle Ergebnisse zu bekommen, werden die RNA-Proben nach der Aufreinigung amplifiziert. Dies geschieht mithilfe einer reversen Transkriptase, welche aus RNA DNA während einer Polymerasekettenreaktion herstellt.

2.2.5.3.2 Durchführung

Die cDNA-Synthese wurde mittels cDNA-Kit durchgeführt. Dabei wurden zunächst die Kit-Komponenten sowie die aufgereinigte mRNA auf Eis aufgetaut und in einem Mikroreaktionsgefäße ein PCR-Mastermix vorbereitet.

2 μ L	10x RT Buffer
0,8 μ L	25x dNTP Mix (100 mM)
2 μ L	10x RT Random Primers
1 μ L	Multiscribe Rev. Transcriptase
1 μ L	RNAse Inhibitor
6,80 μ L	Summe Mastermix (für 20 μ l cDNA)

Tabelle 2.1 Zusammensetzung PCR-Mastermix

Dieser Mix wurde dann auf weitere Mikroreaktionsgefäße verteilt, welche auf Eis gelagert wurden. Danach wurden die unterschiedlichen RNA-Proben in der jeweiligen Menge, welche sich nach der Analyse mittels Spektrophotometer ergeben hat, hinzugefügt, um letztendlich eine RNA-Konzentration von 1 μ g/ μ l zu erhalten. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 μ l Gesamtprobenmenge aufgefüllt und mittels reverser Transkription vervielfältigt. Folgendes Programm wurde dabei nach Anleitung durchlaufen:

Stufe 1: 10 Minuten bei 25°C

Stufe 2: 120 Minuten bei 37°C

Stufe 3: 5 Minuten bei 85°C

Stufe 4: 4°C.

2.2.5.4 Durchführung der qPCR

Die cDNA-Proben sowie die Einzelsubstanzen des Reaktionsmixes wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Der Reaktionsmix wurde aus 10/16 Absolute qPCR ROX-Mix (Thermo Scientific®), 5/16 nuklease-freiem Wasser sowie 1/16 der jeweiligen Sonde hergestellt. 20 μ l/Well dieses Reaktionsgemisches wurden in die 96-Well-Platte vordispensiert, ehe 5 μ l der cDNA-Probe hinzu pipettiert wurde. Dann wurde die 96-Well-Platte mittels Klebefolie verschlossen, drei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und in die RT(real-time)-PCR-Maschine gegeben. Dabei durchlief das Reaktionsgemisch folgende Behandlung:

1.Stufe: 15 Minuten bei 95°C

2.Stufe: 15 Sekunden bei 95°C

3.Stufe: 60 Sekunden bei 60°C

Die Stufen 2 und 3 wurden 50mal wiederholt.

2.2.5.5 Auswertung der qPCR

Es wurde der Schwellenwert (Ct-Wert) ermittelt, welcher angibt, ab wann sich die Reaktion in der exponentiellen Phase befindet. Jede Probe wurde auf die Expression von β -actin normalisiert, welches als endogene Kontrolle mitlief. Die Auswertung der Genexpression erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode.

2.2.6 Western Blot

2.2.6.1 Prinzip des Western-Blots

Der Western-Blot dient als semi-quantitativer Protein-Nachweis. Dabei wird die Probe zunächst mit Hilfe eines Polyacrylamid-Gels durch Elektrophorese nach der Größe ihrer Proteine aufgetrennt, wobei die schwereren Proteine langsamer wandern als die leichten. Danach findet der eigentliche Blot-Vorgang statt, um die Proteine auf eine Membran zu transferieren, auf welcher sie später detektiert werden können. Dieser Nachweis wird mittels Antikörper durchgeführt. Dabei bindet der primäre Antikörper, welcher meist einer anderen Tier-Spezies angehört als die Probe, an das gesuchte Protein und der sekundäre Antikörper bindet dann durch die Spezies-Spezifität an den primären Antikörper. Der sekundäre Antikörper hat ein Enzym gebunden, welches mittels photochemischer Entwicklerlösung detektiert wird. Dadurch wird ein qualitativer Vergleich von Proben möglich um eine Aussage zu Protein-Regulationen treffen zu können.

2.2.6.2 Durchführung des Western-Blots

Zunächst wurden die Zellen in 6-Well-Platten angezchtet. Hierbei wurden die cerebEnd-Zellen am Tag 0 mit einer Dichte von 40.000 Zellen/cm² und die C6-Zellen mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät. Ein Mediumwechsel fand an Tag 2 und 5 statt. An Tag 7 erfolgte dann die entsprechende Behandlung. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und für MMP-Testungen weggefroren. Dann wurden die

Wells zwei Mal mit je 3 ml eiskaltem PBS gewaschen. 10 ml RIPA-Puffer wurden zuvor mit 1 Tablette Phospho-Stopp (PS) und 1 Tablette Proteinase-Inhibitor (PIC) versetzt. Mit diesem RIPA/PS/PIC(RIPA++)-Gemisch wurden dann die Zellen lysiert. Hierzu wurden 50µl dieses RIPA++-Puffer-Gemisches pro Well verwendet. Die Einwirkzeit betrug 15 Minuten. Danach wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Oberfläche gelöst, in ein steriles Probengefäß übergeführt und auf Eis gestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben im -80°-Gefrierschrank gelagert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben mit der BSA-Methode nach Pierce. Nachdem die Proben auf Eis aufgetaut worden sind, fand eine Zentrifugation bei 4°C für 10 Minuten bei 10.000g statt. 2µl aus der flüssigen Fraktion wurden dann 23 µl reiner RIPA-Puffer zugegeben. Als Farblösung wurde der Pierce® BCA Protein Assay Kit benutzt. Die Extinktion wurde mit dem ELISA-Reader bei 540 nm gemessen.

Dieses Gemisch wurde nun mit 10 Impulsen 36 Sekunden lang sonifiziert, jeder Impuls dauerte 0,3 Sekunden.

Nach dem Sonifizieren wurden die Proben mit 4x Lämmli-Puffer und 6% β-Mercaptoethanol versetzt (940µl Lämmli + 60µl β-Mercaptoethanol) und bis zur weiteren Western-Blot-Analyse bei -80°C aufbewahrt. Der Lämmli-Puffer wurde bei 37°C aufgewärmt, um das Glycerol zu verflüssigen.

Zum Western-Blotting wurden zunächst Elektrophorese-Gele gegossen. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 2.2 und 2.3 zu erkennen.

	Trenngel		
	7,5 %	12 %	
H2O	4,85	3,35	[mL]
Acrylamid /Bis (30%)	2,5	4	[mL]
3M Tris pH 8,8	2,5	2,5	[mL]
10% SDS	100	100	[µL]
10% APS	100	100	[µL]
TEMED = Starter	6	6	[µL]

Tabelle 2.2 Zusammensetzung Trenngel

Sammelgel

H ₂ O	2,85	[mL]
Acrylamid /Bis (30%)	0,85	[mL]
0,5M Tris pH 6,8	1,25	[mL]
10% SDS	50	[μL]
10% APS	50	[μL]
TEMED = Starter	5	[μL]

Tabelle 2.3 Zusammensetzung Sammelgel

Das Gießen der Gele wurde in BioRad-Kammern durchgeführt, dabei wurden die Einzelteile zunächst gesäubert, mit destilliertem Wasser abgespült und nach Anleitung zusammengebaut. Die Gele wurden 1,5 mm dick gegossen. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Um eine exakte horizontale Fläche zu bekommen, wurde während der 30-minütigen Aushärtungsphase destilliertes Wasser als Trennmittel auf die Gele pipettiert. Dieses wurde nach der Aushärtung abgegossen und das Sammelgel oberhalb des Trenngels gegossen und darin die Kämme platziert, welche die Taschen für die Probenplatzierung bildeten. Nach einer Aushärtungsphase von einer Stunde wurden die Gelkammern in die Elektrophorese-Box gestellt, mit Elektrophorese-Puffer übergossen, die Kämme entnommen und nun, nach gründlicher Spülung der Taschen mit Pufferlösung, die Proben pipettiert. Diese wurden in unterschiedlichen Volumina, jedoch immer mit derselben Proteinmenge pipettiert. Vor der Probenpositionierung mussten diese jedoch zunächst für fünf Minuten bei 70°C im Heizblock aufgeheizt werden. Es wurden auch Bandenmarker pipettiert, um später die Molekulargröße der detektierten Proteine bestimmen zu können. Nachdem die Innenkammern der Elektrophorese-Zelle mit Puffer restlos aufgefüllt worden sind, wurde die Elektrophorese gestartet, zunächst mit 60mV, bis die Banden aus dem Sammelgel in das Trenngel gewandert sind, um dann die Spannung auf 130 mV zu erhöhen. Die Gesamtlaufzeit der Gele lag bei ungefähr 90 Minuten. Danach wurden die Gelkammern aus der Elektrophorese-Box herausgenommen und für das Tank-Blotting vorbereitet.

Für das Tank-Blotting wurde zunächst die Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran für eine Minute in Methanol aktiviert. Dann wurde mittels des Gels, der aktivierten PVDF-Membran, Blotting-Papier und Vlies-Stoff sozusagen ein „Sandwich“ gebaut. Dieser wurde dann in der Tank-Blot-Box eingespannt und mit Transferpuffer übergossen.

Das Tank-Blotting wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt, pro Gel wurde eine Stromstärke von 40 mA angelegt.

Am nächsten Tag wurde die Membran für eine Stunde in 5%Milchpulver, gelöst in PBS, geblockt. Danach wurde die Membran in Folie eingeschweißt und der primäre Antikörper, je nach Verdünnung in PBS mit 1% BSA, zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einem Rüttler bei 4°C.

Die Gele wurden für 10 Minuten mit Coomassie-Lösung inkubiert um dann für 30 Minuten mit einer Entfärberlösung entfärbt zu werden. Über Nacht wurden sie dann nochmals mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur gewaschen. Diese Färbung sollte fälschlicherweise nicht geblottete Banden sichtbar machen.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen drei Mal mit 0,1%Tween20, gelöst in PBS, für 10 Minuten gewaschen. Danach erfolgte eine Blockierung mit 5%Milchpulver in PBS. Nun wurde für eine Stunde der sekundäre Antikörper den Membranen zugegeben. Die Auswahl erfolgte je nach primärem Antikörper: Anti-Hase oder Anti-Maus 1:5000 in 1%BSA/PBS verdünnt. Nach der Antikörper-Inkubation wurden die Blots drei Mal mit 0,1%Tween20, gelöst in PBS, für 10 Minuten gewaschen.

Nun waren die Blots bereit zur Entwicklung. Dafür wurden je 5 ml von der Entwicklerlösung 1 und 2 gemischt um dann die Blots in der Lösung für zwei Minuten zu inkubieren.

Die Belichtungszeiten waren je nach Zielprotein individuell.

Um Probenmenge einzusparen wurden die Blots nach der Entwicklung gestrippt. Dafür wurden sie für 5 Minuten mit destilliertem Wasser, dann für 5 Minuten mit 0,2 molarer NaOH (um die Antikörper-Protein-Bindungen zu lösen), danach wiederum für 5 Minuten mit destilliertem Wasser und zuletzt mit 0,1%Tween20, gelöst in PBS, für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie für eine Stunde in 5% Milchpulver, gelöst in PBS, geblockt und bei der Abfolge ab Zugabe des primären Antikörpers wieder gestartet.

2.2.7 Matrix-Metalloproteinasen-Aktivitäts-Test (MMP-Test)

2.2.7.1 Prinzip

Mit Hilfe des MMP-Tests lässt sich die Enzym-Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen nachweisen. Diese spielen eine wichtige Rolle im Bereich des Extrazellularraumes, nicht nur um Extrazellulärmatrix abzubauen, sondern sie haben auch weitere wichtige Funktionen, wie das Freisetzen von verschiedensten Faktoren, welche die Zellfunktion und -kommunikation beeinflussen. Mit Hilfe des verwendeten Test-Kits lassen sich die MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12, und -13 –aktivität nachweisen. Die Technik des Kits beruht auf FRET (Förster-Resonanzenergietransfer), wobei das ELISA-Lesegerät den Fluoreszenz-Grad der Lösungen bei einer bestimmten Wellenlänge misst.

2.2.7.2 Durchführung

Es wurden Mediumüberstände gesammelt, welche bei der Kultivierung der Zellen für die qPCR-Proben beziehungsweise Western Blot-Proben zur Verfügung standen. Dabei wurden zunächst an den Versuchstagen die Mediumüberstände aus zwei Wells mit derselben Behandlung in einem Zentrifugenröhrchen zusammengeführt, was eine Gesamtmenge von 6ml Mediumüberstand entspricht. Die Lösungen wurden bis zur Testung bei -80°C gelagert. Zur MMP-Aktivitätsmessung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und in Zentrifugenröhrchen, bei welchen sich im Lumen eine Filtereinheit mit der Porengröße 10 kDa befindet, überführt. Es schloss sich eine Zentrifugation mit 4000g bei 4°C für 40 Minuten an. Dabei wurden die Überstände auf etwa 200µl konzentriert. Von diesen konzentrierten Lösungen wurden 80 µl mit 50 µl des MMP-Substrats, wobei die Stocklösung zuvor 1:10 mit DMSO verdünnt wurde, in einer schwarzen 96-Well-Platte vermischt. Die steigende Fluoreszenz wurde über 120 Minuten bei 37°C und 485/535 nm mit Hilfe eines Elisa-Lesegeräts gemessen. Als Kontrolle dienten Wells, welche mit reinem DME-Medium befüllt waren. Die Berechnung der Endwerte erfolgte mit den nach 120 Minuten gemessenen Werten, nachdem bei diesen eine Regressionsanalyse durchgeführt wurde. Von diesen Werten wurden die Kontrollwerte abgezogen. Weiter wurde ein Korrekturfaktor angewandt, da sich das konzentrierte Volumen der Versuchsansätze etwas unterschied.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit SigmaPlot (Version 14.0). Es erfolgte zunächst eine Prüfung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) sowie auf Varianzhomogenität (Brown-Forsythe-Test). Wenn beide Voraussetzungen erfüllt waren erfolgte eine Varianzanalyse (ANOVA) und folgendem Mehrfach-Vergleich mit dem Holm-Sidak-Test. Falls die Normalverteilung bzw. Varianzhomogenität nicht gegeben war, erfolgte als nicht-parametrischer Test die Durchführung des Kruskal Wallis H-Test (ANOVA on ranks) gefolgt von einer post-hoc-Analyse (Tukey- oder bei ungleicher n-Anzahl Dunn's Test). Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

Die Darstellung der Ergebnisse im Diagramm (Microsoft Excel) erfolgte, wenn nicht anderweitig angegeben, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Versuchsbedingungen

3.1.1 Proliferationstests mit NMDAR-Inhibitoren

Zunächst wurden Proliferationstests mittels kommerziellem EZ4U®-Test durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Zellkonzentrationen von 20 000 Zellen/cm², 40 000 Zellen/cm² und 80 000 Zellen/cm², unterschiedliche Seren, wie das fetale Kälberserum (FCS) und das hormonbereinigte FCS (FCS-SS), sowie unterschiedliche FCS-Konzentrationen (0%, 1%, 3% und 10%) und Konzentrationen der NMDAR-Blocker MK801 (1/10/100 µM) und L701,324 (0,01/0,1/1/10 µM) untersucht.

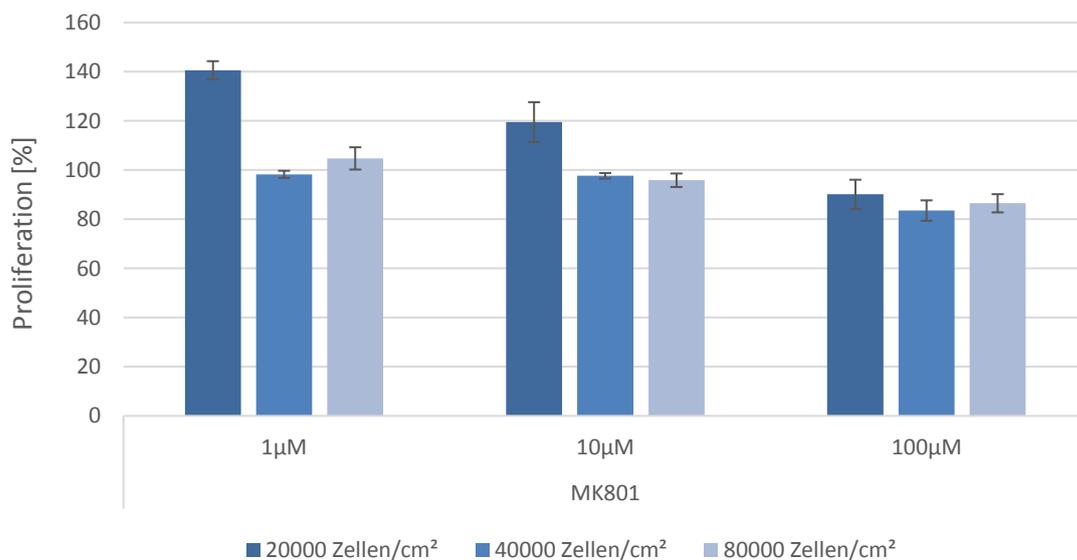


Diagramm 3-1 EZ4U®, Auswahl der Aussaatdichte; n=16; 20=20 000 Zellen/cm², 40=40 000 Zellen/cm², 80=80 000 Zellen/cm², dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM, 60 Minuten Inkubation mit EZ4U-Reagens, 100% = Kontrolle mit Aqua, Lösung in 1%FCS, Behandlung der Zellen für 24h mit MK801

Dabei konnten mit einer Zellkonzentration von 40 000 Zellen/cm² sowie einer 1%-igen FCS Konzentration die erwarteten Effekte der Blocker am deutlichsten herausgearbeitet werden. Das Diagramm 3.1 zeigt eine lineare Abstufung der Proliferation, je nach Konzentration des Blockers. Da die Effekte bei 100µM MK801 und 40 000 Zellen/cm² am größten waren, die Proliferation nämlich auf 83,52% ± 4,16% verlangsamt wurde, wurde diese Zellkonzentration für die weiteren

Proliferationsversuche ausgewählt. Die gesteigerte Proliferation unter niedrigen MK801-Konzentrationen konnte auch später bei den Motilitätstests unter bestimmten Bedingungen gesehen werden.

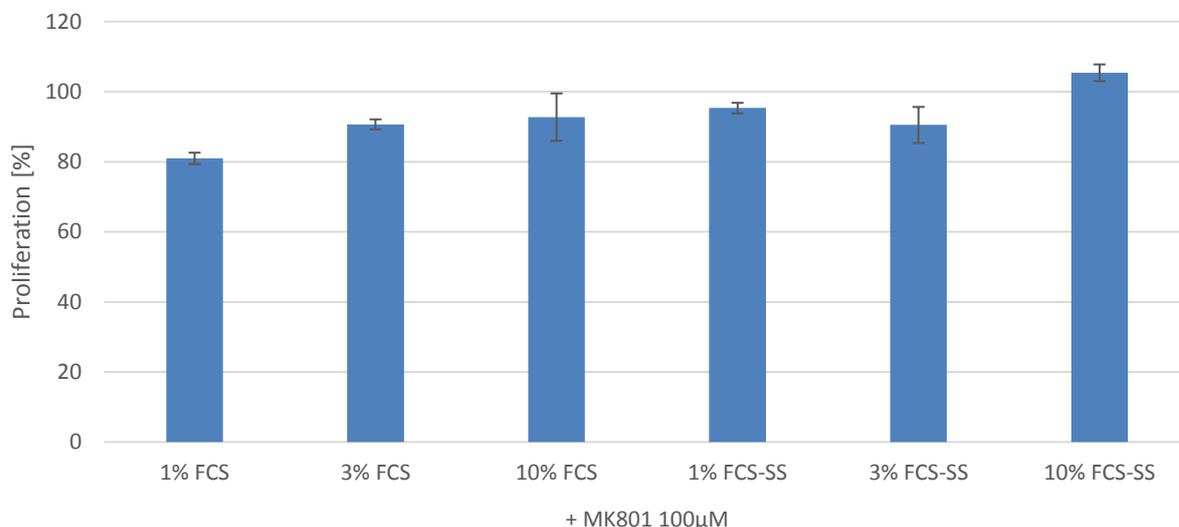


Diagramm 3-2 EZ4U®, Serumabhängigkeit; n=16, Behandlung der cerebEND-Zellen mit MK801 100µM für 24h; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM, 100% = Kontrolle mit jeweiliger FCS-Konzentration und Aqua, 30 Minuten Inkubationszeit mit EZ4U-Reagens; 40000 Zellen/cm²

Im Diagramm 3.2 sieht man kaum serumabhängige Unterschiede.

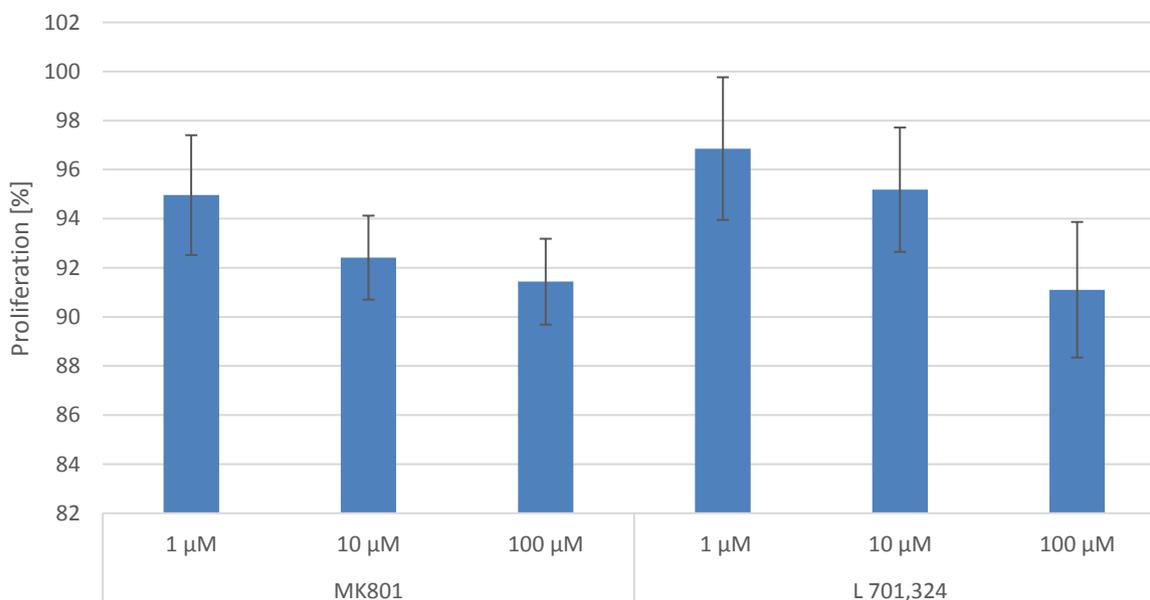


Diagramm 3-3 EZ4U®, Einfluss der NMDA-Rezeptor-Blocker, n=16; Behandlung der cerebEND-Zellen für 24h mit den Blocker-Substanzen; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; 100% = Kontrolle mit 1% FCS und Aqua bei MK801 und DMSO bei L701,324; 60 Minuten Inkubationszeit mit EZ4U-Reagens; 40000 Zellen/cm²

Das Diagramm 3.3 präsentiert nun ein lineares Verhalten der Proliferation der cerebENDs auf eine steigende Konzentration der NMDAR-Blocker. Je höher die Blocker-Substanz gewählt wurde, desto stärker war die Hemmung der Proliferation.

3.1.2 Serumabhängigkeit der Motilität

Zu Beginn der Motilitätsversuche wurden unterschiedliche Serumkonzentrationen im Wachstumsmedium untersucht. Die Ergebnisse der erwarteten Serumabhängigkeit auf die Zellmotilität werden im Diagramm 3.4 präsentiert. Nach 72 Stunden zeigte sich nach Behandlung mit HBSS-Lösung eine teilweise Ablösung der Zellen von der IBIDI-Oberfläche, was wir auf den starken Nährstoffmangel zurückführten.

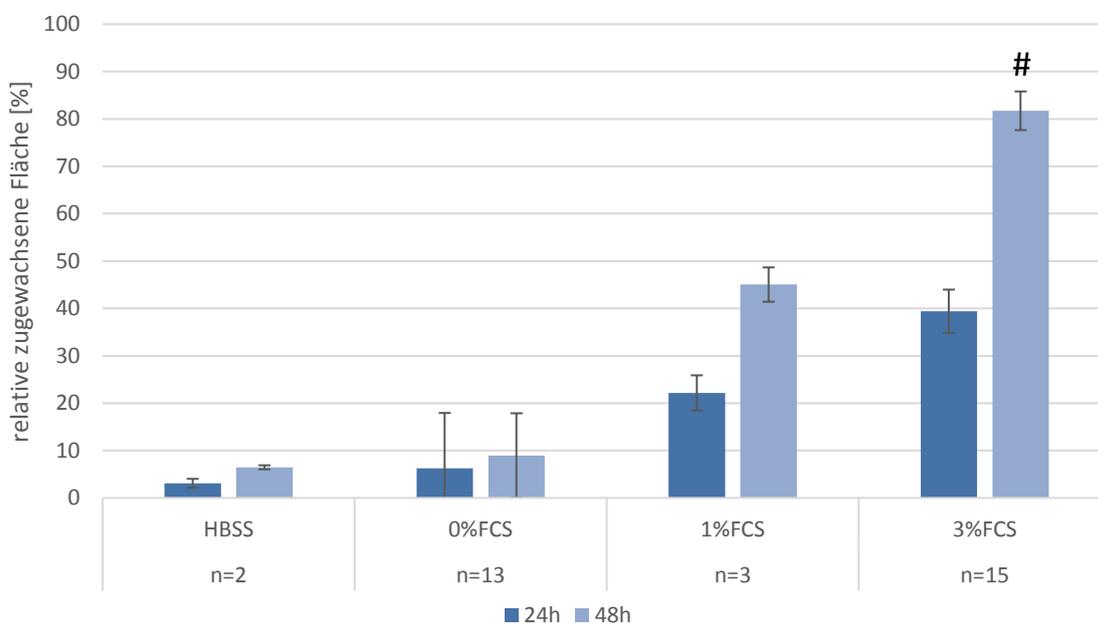


Diagramm 3-4 IBIDI® Motilitätsassay, Serumabhängigkeit der Motilität, Behandlung der cerebEND-Zellen für 24h oder 48h; n=2-15; 20000 – 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc Dunn's Test) dargestellt mit # im Vergleich zur 0% FCS 48h-Probe.

Im HBSS-Medium konnten die deutlichsten Effekte des Blockers MK801 mit 100µM erfasst werden (nicht dargestellt), jedoch war die Behandlung für die Zellen, egal ob mit Blocksubstanz oder ohne, nach spätestens 72 Stunden letal, da zu diesem Zeitpunkt nahezu in allen Kulturplatten die Zellen vom Boden abgelöst waren. Am Ende der Versuche wurde eine FCS-Konzentration von 0% und eine Versuchsdauer von 48 Stunden ausgewählt, da bei diesen Bedingungen störende Einflüsse wie Serumbindungen und Interaktionen durch Wachstumsfaktoren ausgeschlossen werden konnten. Zudem zeigte sich in Folgeversuchen mit konditioniertem Medium

von C6-Zellen, dass die Wachstumsfläche nach 72 Stunden sogar bei 0% FCS vollständig bedeckt war. Da bei den Vorversuchen mit den IBIDIs® bei einer Zelldichte von 40.000 Zellen/cm² die Zellen nach 5 Tagen teilweise übereinander gewachsen sind, wurde eine Zelldichte von 20.000 Zellen/ cm² für die Versuche ausgewählt. Hier zeigte sich diese Tendenz nicht.

3.2 Toxizitäts- und Viabilitätstest mit NMDAR-Blockern

Eine Einwirkdauer des NMDA-Rezeptor-Blockers MK801 von 4 Stunden zeigte keinerlei Reduktion von Viabilität und Toxizität (Neuhaus et al., 2012a)

Bei geplanten Motilitätsversuchen über 48 Stunden, wurde dementsprechend zuvor die Viabilität und Toxizität der cerebEND-Zellen über 48 Stunden Behandlung mit den NMDA-Rezeptor-Inhibitoren MK801 und L701,324 getestet. Die LDH-Tests wurden durchgeführt, um toxische Effekte auszuschließen und zeigen zu können, dass die Substanzen direkt an den Endothelzellen die Rezeptoren modulieren. Die Toxizitätseffekte sollten so gering wie möglich gehalten werden, da ein Rückschluss auf motilitätsspezifische Vorgänge nur dadurch erfolgen kann.

3.2.1 Unter Normoxie-Bedingungen

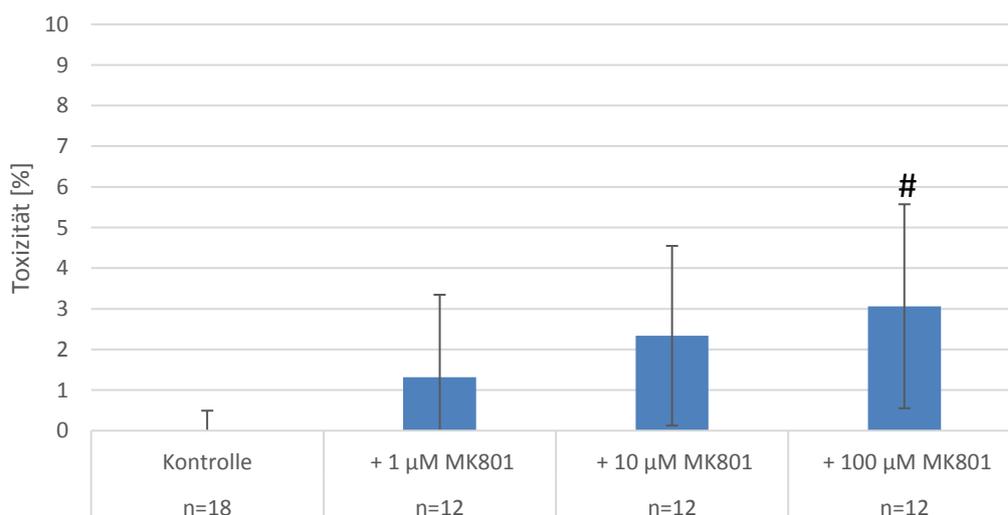


Diagramm 3-5 LDH Toxizitätstest, Auswirkungen von MK801 unter Normoxie-Bedingungen auf die Toxizität; Behandlung der cerebEND-Zellen mit MK801 für 48h; n=12-18; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ± stabw; statistische Signifikanz (p<0,05, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle, 100% entspricht Absterben aller Zellen der Kultur.

Bei der Anwendung von MK801 während der gesamten Normoxie-Behandlung zeigte sich eine statistische Signifikanz bei der höchsten Konzentration. Jedoch war die LDH-Ausschüttung gerade einmal 3% größer als bei der Normoxie-Kontrolle.

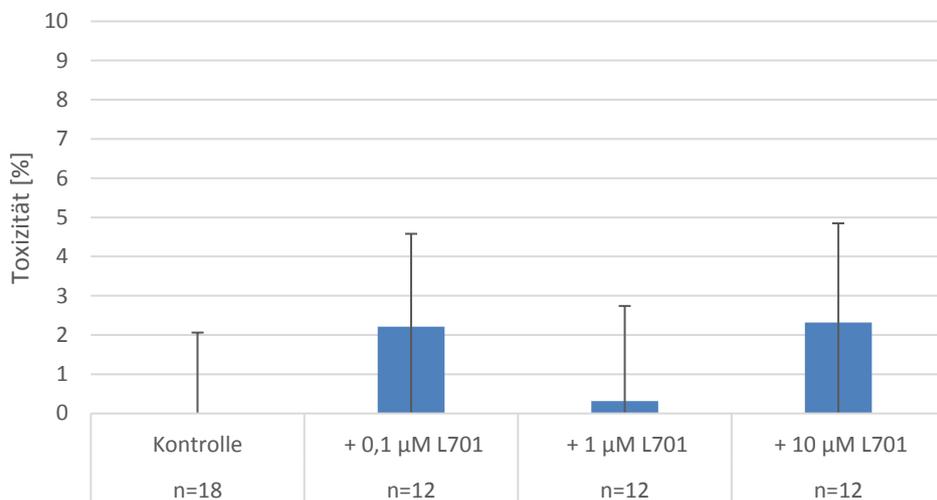


Diagramm 3-6 LDH Toxizitätstest, Auswirkungen von L701,324 unter Normoxie-Bedingungen auf die Toxizität; Behandlung der cerebEND-Zellen mit L701,324 für 48h; n=12-18; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±stabw, 100% entspricht Absterben aller Zellen der Kultur.

Die Anwendung von L701,324 während der Normoxie ergab keine signifikanten toxischen Auswirkungen.

3.2.2 Unter OGD+C6-Bedingungen

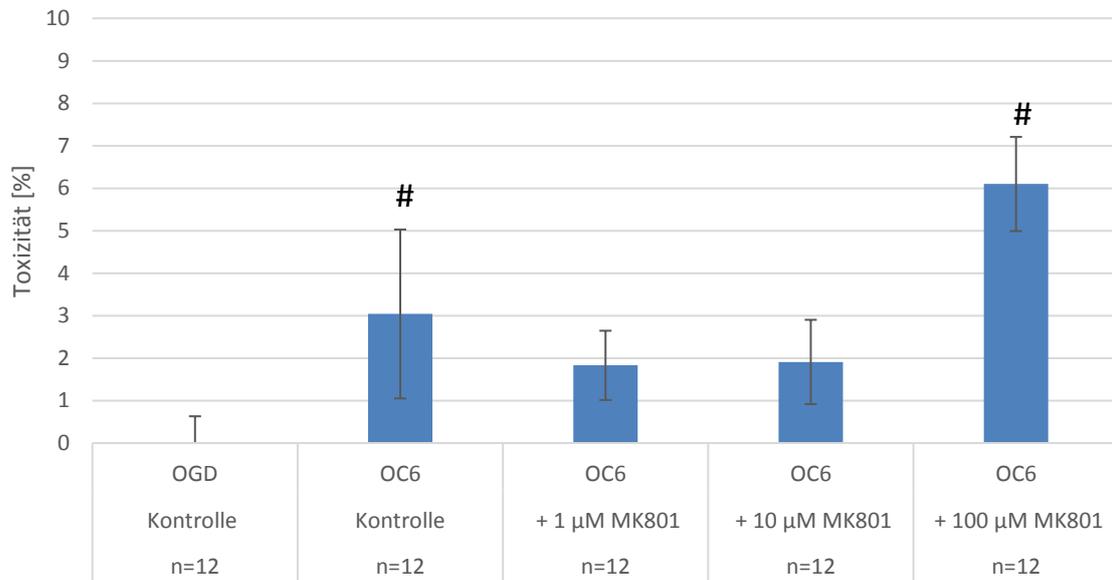


Diagramm 3-7 LDH Toxizitätstest, Auswirkungen von MK801 unter OGD-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium auf die Toxizität; Behandlung der cerebEND-Zellen mit 4h-OGD-Phase mit MK801, danach eine 44h Reoxygenierungsphase mit MK801, Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=12; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte \pm stabwe; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Tukey Test) dargestellt mit # im Vergleich zur OGD-Kontrolle.

Die Verwendung von C6-konditioniertem Medium zeigte eine Erhöhung der extrazellulären LDH. Dies konnte durch 1µM und 10µM MK801 verringert werden (nicht signifikant). MK801 100µM erhöhte die extrazelluläre LDH jedoch wiederum auf ca. 6%.

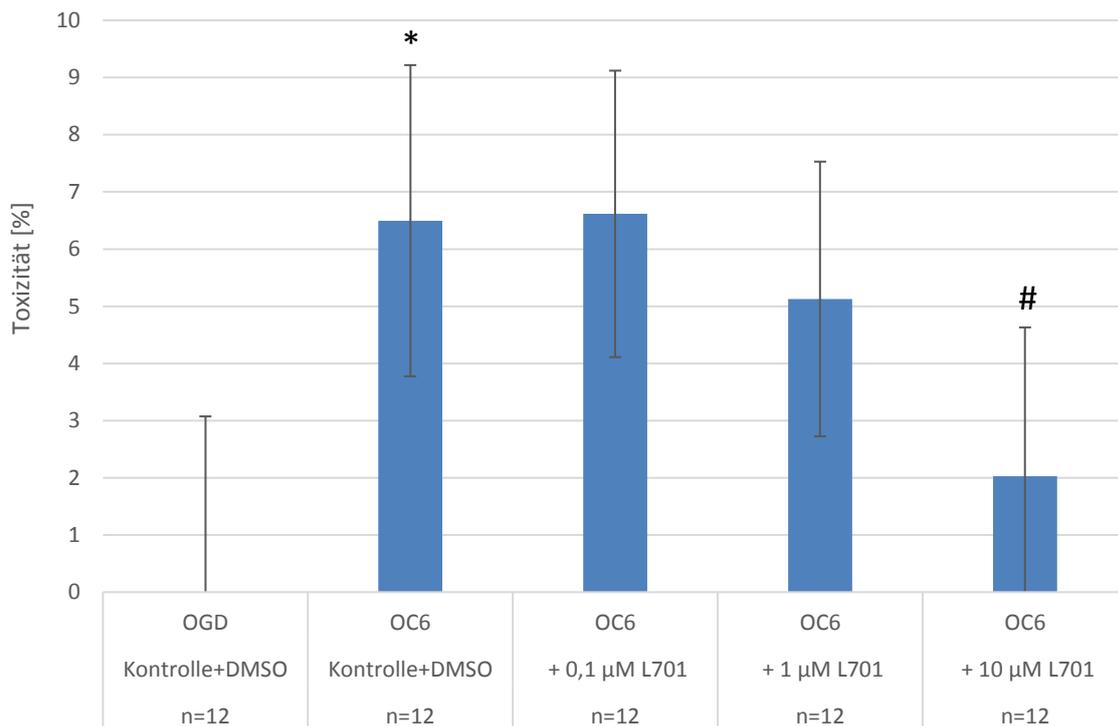


Diagramm 3-8 LDH Toxizitätstest, Auswirkungen von L701,324 unter OGD-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium auf die Toxizität; Behandlung der cerebEND-Zellen mit 4h-OGD-Phase mit L701,324, danach eine 44h Reoxygenierungsphase mit L701,324, Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=12; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte \pm stabw; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Tukey Test) dargestellt mit # im Vergleich zur OC6-Kontrolle + DMSO und mit * im Vergleich zur OGD-Kontrolle + DMSO, 100% entspricht Absterben aller Zellen der Kultur.

Auch bei der Behandlung mit L701,324 zeigte sich eine gewisse Toxizität des C6-konditionierten Mediums. Die Anwendung von 10µM L701,324 verringerte diese jedoch.

3.3 Motilitätsversuche

3.3.1 Modulierung der Umgebungsbedingungen

3.3.1.1 Hypoxie

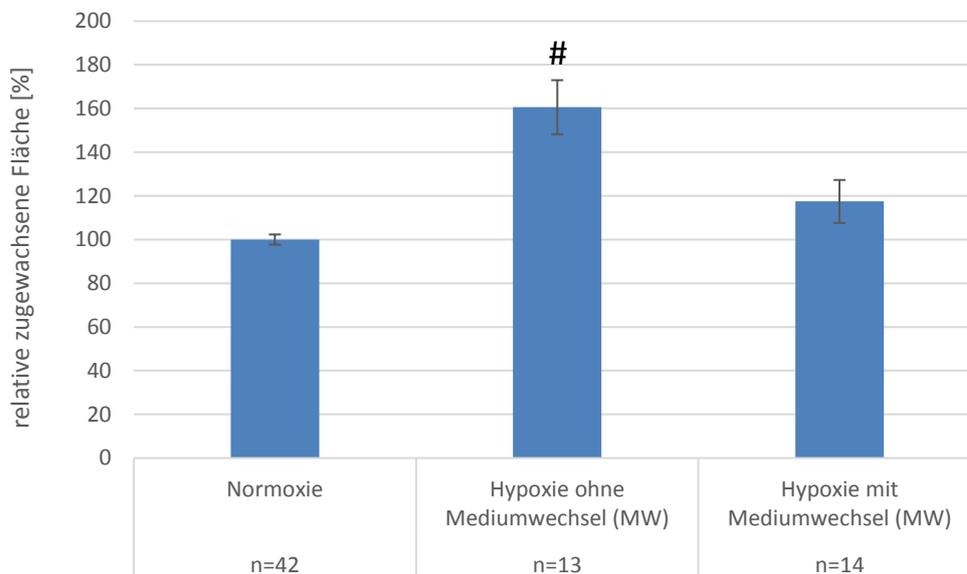


Diagramm 3-9 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen Hypoxie mit oder ohne Mediumwechsel nach der Hypoxiephase; Behandlung der cerebEND-Zellen für 4h mit Hypoxie und anschließende Reoxygenierungsphase von 44h; n=13-42; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Dunn's Test) dargestellt mit # im Vergleich zur Normoxie Kontrolle (N).

Die Motilitätsversuche unter hypoxischen Bedingungen wurden zeitgleich mit den Ischämie-Versuchen begonnen. Da die Ischämie klinisch jedoch wichtiger ist, wurde im Verlauf der Arbeit der Fokus auf die Ischämie gelegt. Nichts desto trotz ergaben sich auch unter hypoxischen Bedingungen interessante Ergebnisse. So konnte die Hypoxie generell die Motilität beschleunigen. Unter der Bedingung, dass nach vier Stunden Hypoxie kein Mediumwechsel durchgeführt wurde, resultierte eine statistische Signifikanz mit einer Beschleunigung der Migration auf 160,61%± 12,38%.

3.3.1.2 Ischämie

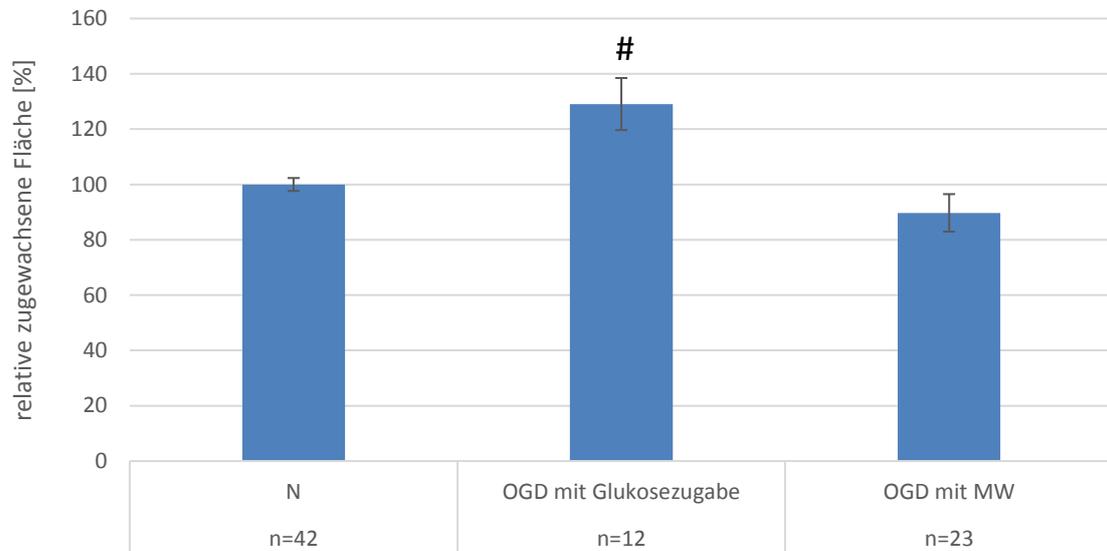


Diagramm 3-10 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen OGD mit Glukosezugabe oder Mediumwechsel nach der OGD-Phase; Behandlung der cerebEND-Zellen für 4h mit OGD und anschließende Reoxygenierungsphase von 44h; n=12-42; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Dunn's Test) dargestellt mit # im Vergleich zur Normoxie Kontrolle (N).

Wie schon unter der Hypoxie-Behandlung beobachtet, zeigte sich auch bei der OGD-Behandlung und dem Belassen des Mediums, mit Ausgleich des Glukosemangels durch Glukosezugabe, nach der Behandlung eine Motilitätsverstärkung auf 129,10% ± 9,41%. Der Mediumwechsel nach Beendigung der Ischämie bewirkte jedoch eine Motilitätsverlangsamung auf 89,74% ± 6,79%.

3.3.1.3 Einfluss astrozytischer Faktoren zusätzlich zur Hypoxie und Ischämie

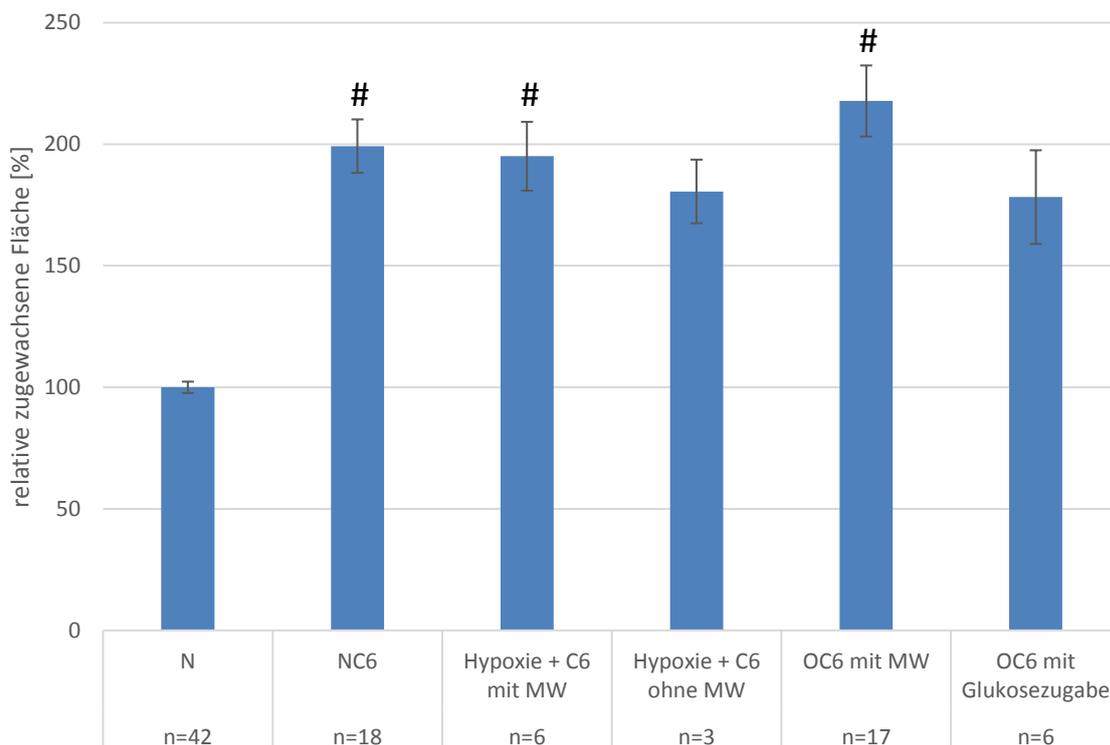


Diagramm 3-11 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von C6-konditioniertem Medium auf Normoxie, Hypoxie und OGD; Behandlung der cerebEND-Zellen für 4h mit Hypoxie oder OGD und anschließende Reoxygenierungsphase von 44h; n=3-42; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Dunn's Test) dargestellt mit # im Vergleich zur Normoxie Kontrolle (N).

Unter der Anwendung des aus C6-Zell-Kultivierung gewonnenen Mediums nahm die Motilität der cerebEND-Zellen auf fast das Zweifache (199,24% ± 11,00%) der Normoxie-Kultur zu. Die zuvor bei der Verwendung von unkonditionierten Medium gesehenen Motilitätsdifferenzen der unterschiedlichen Bedingungen Normoxie, Hypoxie und OGD konnten bei der Benutzung von konditioniertem Medium nicht mehr beobachtet werden. Es zeigen sich im Vergleich tendenziell eher umgekehrte Effekte: Das Belassen des Mediums nach der vierstündigen Hypoxie zeigte eine Motilitätsabnahme auf 180,58% ± 13,08% genauso wie die Glukosezugabe nach vierstündiger OGD-Phase auf 178,25% ± 19,27% im Vergleich zur Motilitätszunahme bei der Verwendung von unkonditionierten Medium. Daher wurde für die folgenden Versuche die Variante ohne Glukosezugabe, aber mit Mediumwechsel, ausgewählt, da maximale Effekte erwünscht waren.

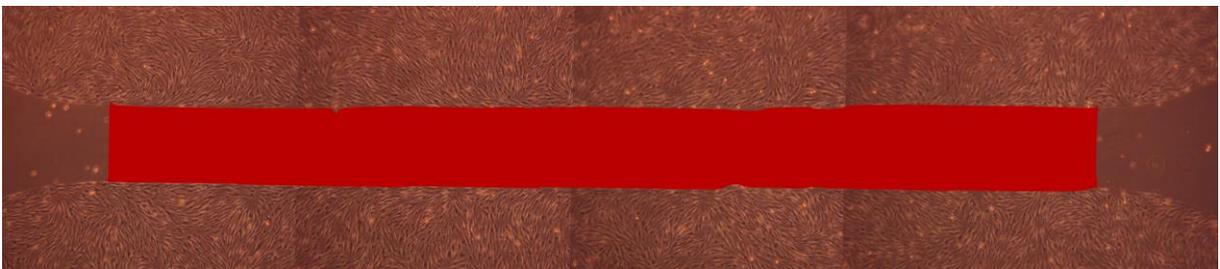
Bildaufnahmen der IBIDIs® mit dem Mikroskop (10-fache Vergrößerung)



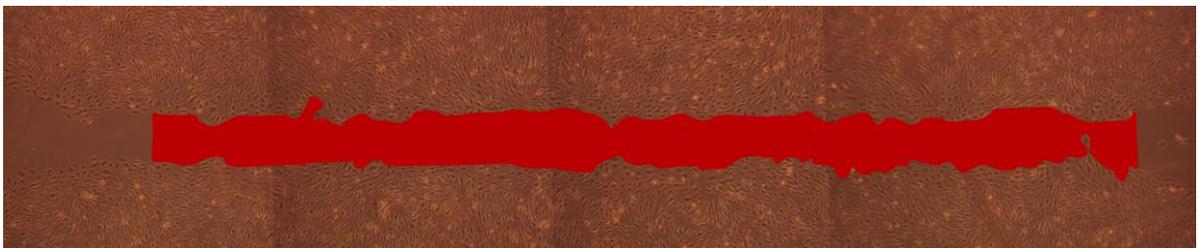
Normoxie 0h



Normoxie 48h



Normoxie + C6-konditioniertes Medium 0h



Normoxie + C6-konditioniertes Medium 48h

Abbildung 3-1 Aufnahmen von cerebEnd (10-fach) während Normoxie bei Motilitätsversuchen mit ibidi®

3.3.2 NMDA-Rezeptor-Blockade während Normoxie

3.3.2.1 Blockade mit MK801

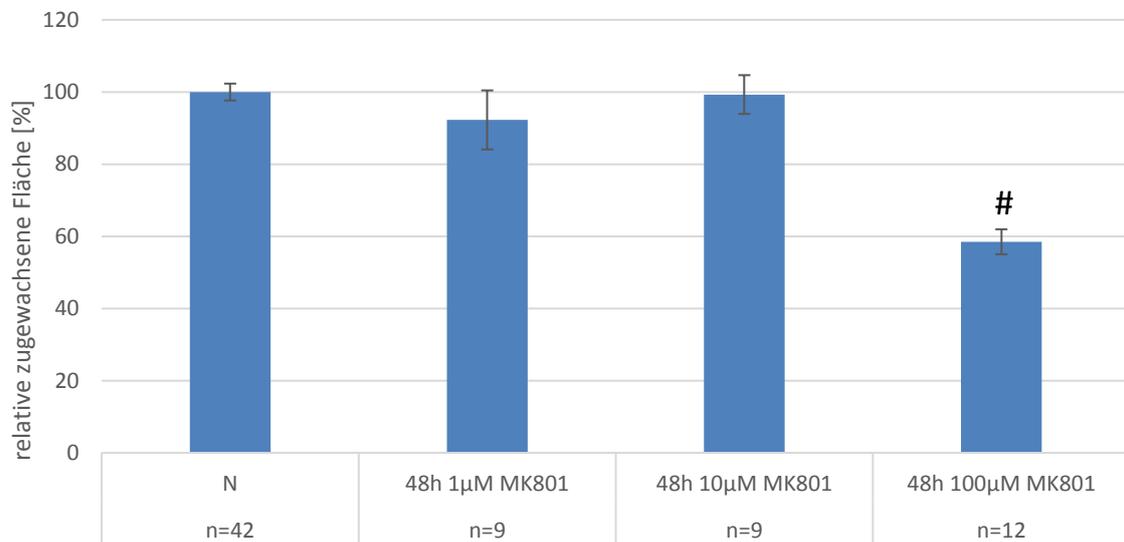


Diagramm 3-12 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von MK801 unter Normoxie-Bedingungen; Behandlung der cerebEND-Zellen für 48h mit MK801; n=9-42; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zur Normoxie Kontrolle (N).

Die Applikation des NMDA-Rezeptor-Blockers MK801 mit einer Konzentration von 100µM über 48 Stunden verlangsamte die Motilität auf 58,51% ± 3,46%, was im Diagramm 3.12 dargestellt ist. Die niedrigeren Konzentrationen von MK801 zeigten nahezu keinen Effekt.

Daraufhin wurde der Einfluss des C6-konditionierten Mediums getestet. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass im Verlauf Versuche geplant waren, bei denen die Substanzen nur während der OGD-Phase oder danach appliziert werden sollten. Darum wurden schon bei der Normoxie-Testung ähnliche Bedingungen gewählt.

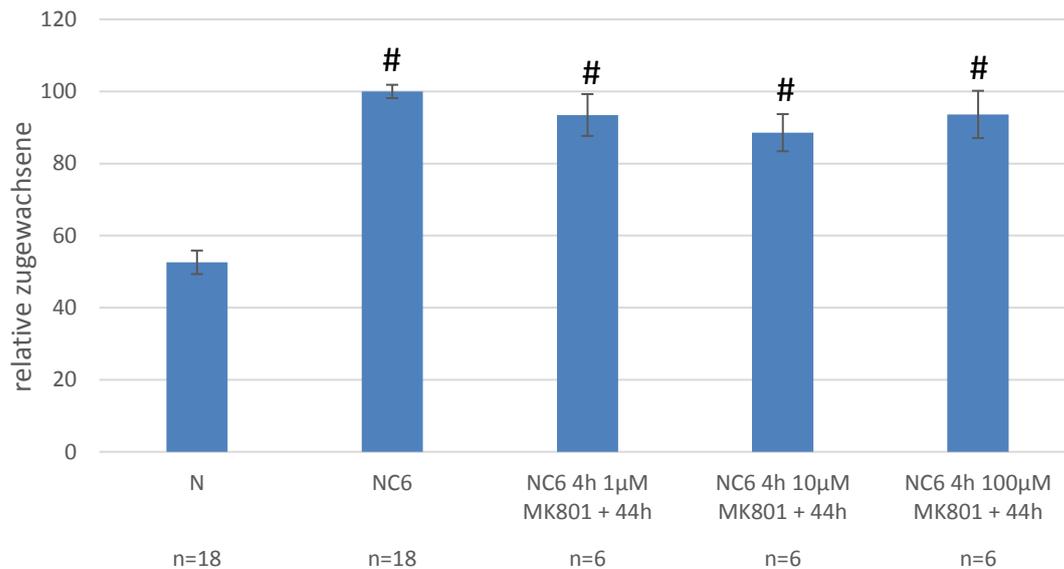


Diagramm 3-13 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von MK801 unter Normoxie-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium; Behandlung der cerebEND-Zellen für 4h mit MK801 und anschließende Weiterbehandlung mit C6-konditioniertem Medium für 44h ohne MK801; n=6-18; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zur Normoxie Kontrolle (N).

Wenn die Blockersubstanz MK801 nur für die ersten vier Stunden des Versuchs appliziert wurde, zeigte sich keine statistisch signifikante Verminderung der Motilität im Vergleich zur Kontrolle mit C6-konditioniertem Medium. Die stärkste Abnahme war bei der Konzentration von 10µM MK801 auf 88,56% ± 5,15% zu sehen.

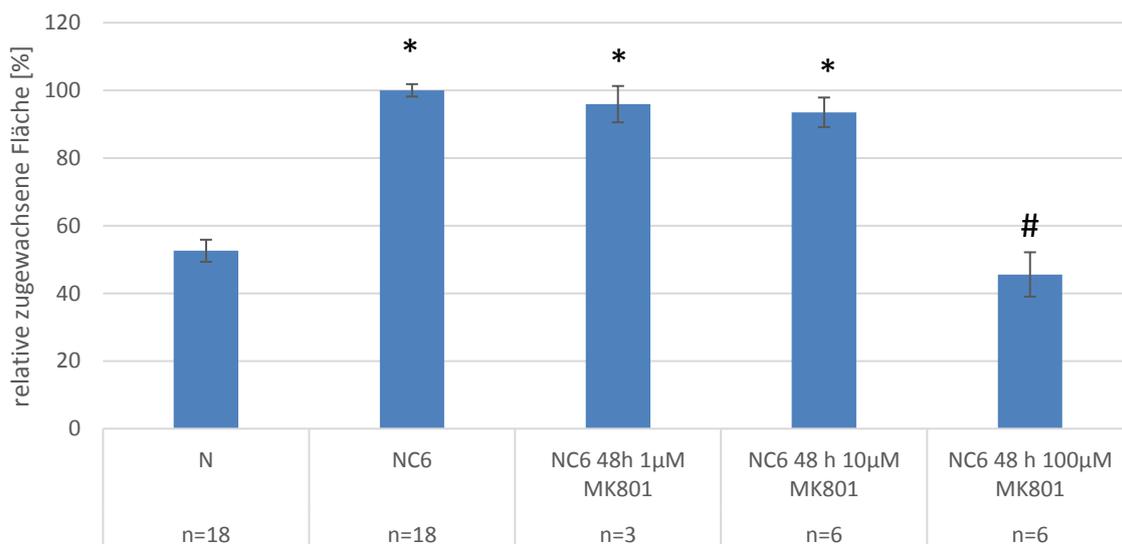


Diagramm 3-14 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von MK801 unter Normoxie-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium; Behandlung der cerebEND-Zellen für 48h mit MK801; n=3-18; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zur NormoxieC6 Kontrolle (NC6) und mit * im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle (N).

Bei der Applikation von MK801 über 48 Stunden blockierte die Konzentration von 100µM die Motilität auf weniger als die Hälfte der Kontrolle und zwar auf 45,58% ± 6,56%. So verschwanden die motilitätsfördernden Einflüsse des C6-konditionierten Mediums und die Probe wurde mit der Kontrolle der unkonditionierten Mediumreihe (52,59% ± 3,27%) vergleichbar.

3.3.2.2 Blockade mit L701,324

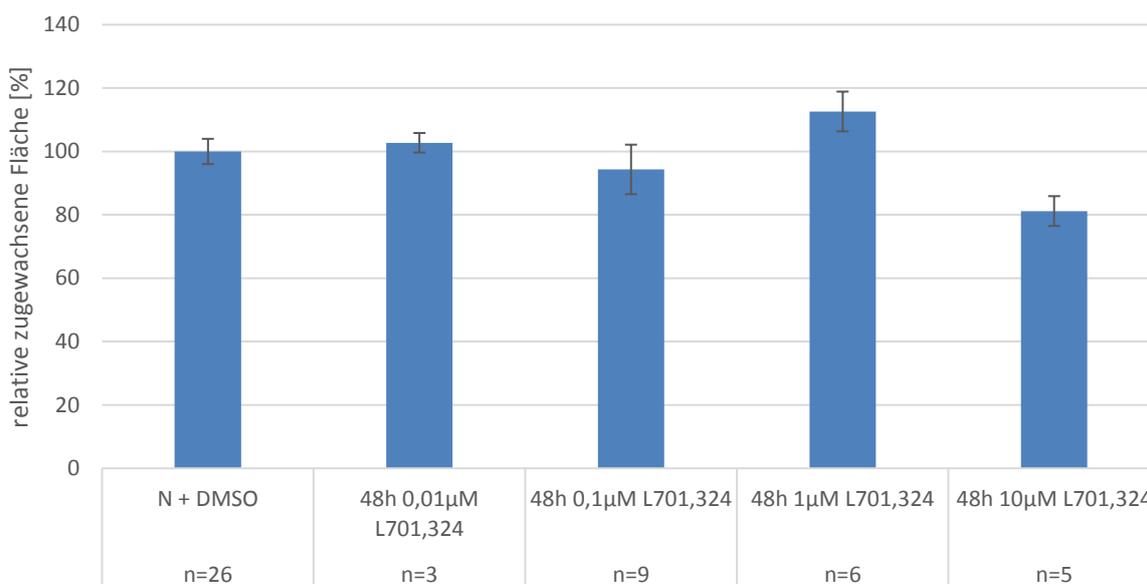


Diagramm 3-15 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von L701,324 unter Normoxie-Bedingungen; Behandlung der cerebEND-Zellen für 48h mit L701,324; n=3-26; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM

Bei der Zugabe des NMDAR-Blockers L701,324 konnte unter Verwendung des unkonditionierten Mediums keine signifikante Auswirkung auf die Motilität beobachtet werden.

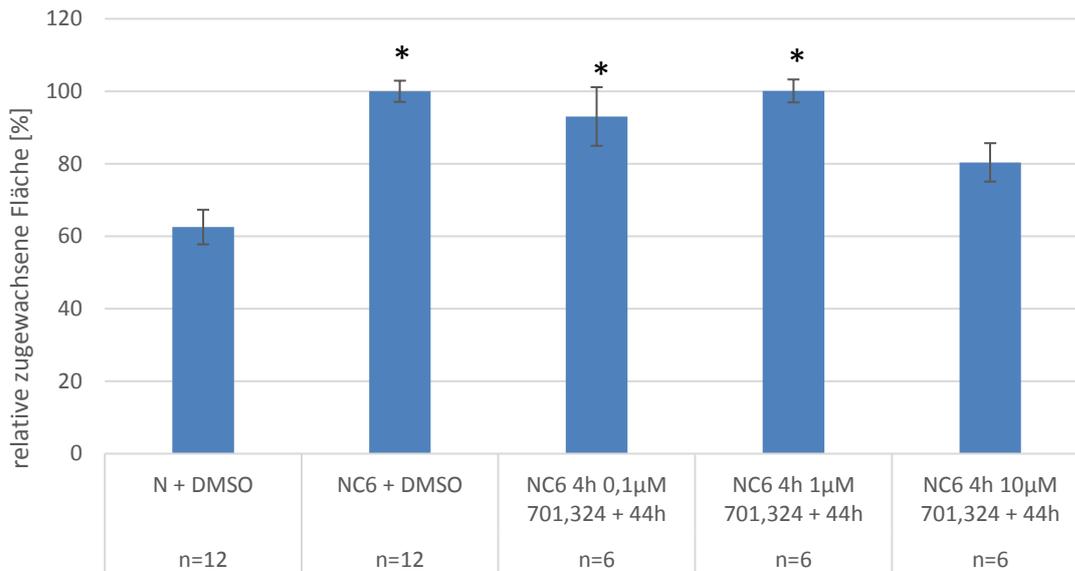


Diagramm 3-16 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von L701,324 für 4h unter Normoxie-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium; Behandlung der cerebEND-Zellen für 4h mit L701,324 und anschließende Weiterbehandlung mit C6-konditioniertem Medium für 44h ohne L701,324; n=6-12; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit * im Vergleich zu Normoxie-Kontrolle (N).

Bei zusätzlicher Verwendung von C6-konditioniertem Medium senkte 10µM L701,324 die Motilität auf 80,37% ± 5,30%, obwohl die Endothelzellen nur während der ersten 4h der Behandlung dem Blocker ausgesetzt waren (knapp verfehlte Signifikanz, p=0,055). Bei den Proben mit L701,324 wurde das Lösungsmittel DMSO benutzt und daher die Kontrollen ebenfalls mit diesem behandelt. Auffällig war dabei die verminderte Zunahme der Motilität durch das C6-konditionierte Medium bei DMSO-Anwendung.

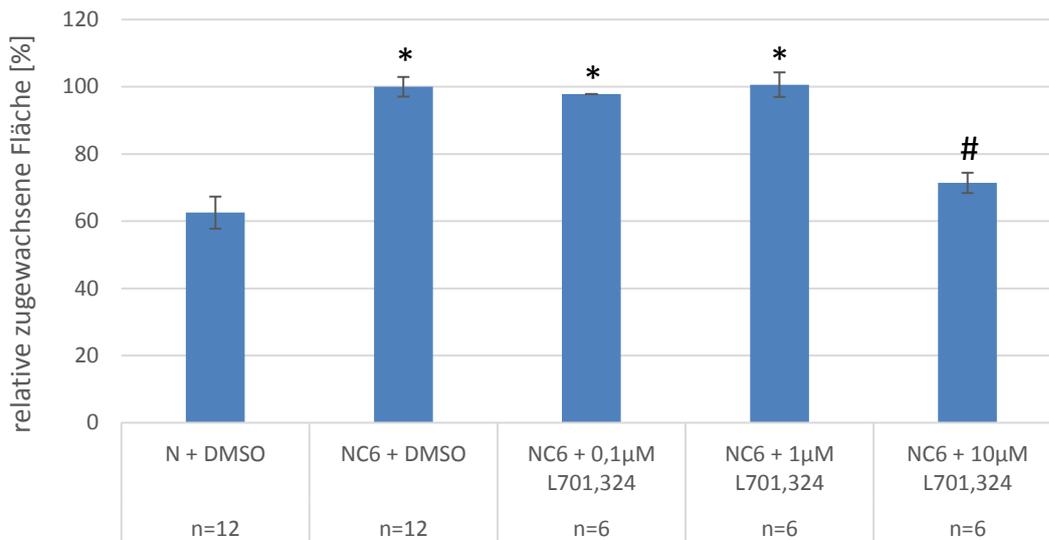


Diagramm 3-17 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von L701,324 unter Normoxie-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium; Behandlung der cerebEND-Zellen mit L701,324 für 48h, Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über ; n=6-12; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zur Normoxie-C6-Kontrolle mit DMSO (NC6 + DMSO), mit * im Vergleich zu Normoxie-DMSO-Kontrolle (N+DMSO).

Die Zugabe des NMDAR-Blockers L701,324 während des gesamten Versuchs zeigte eine stärkere Motilitätsverminderung als die Applikation der Substanz während der ersten vier Stunden. Jedoch war trotz des 12-fach längeren Zeitintervalls der Applikationsdauer die weitere Motilitätsverlangsamung von 80,38% ± 5,30% bei der vierstündigen Applikation auf 71,39% ± 3,02% bei der 44-stündigen Applikation nur zirka zehn Prozent, nun jedoch statistisch signifikant.

3.3.3 NMDA-Rezeptor-Blockade während OGD

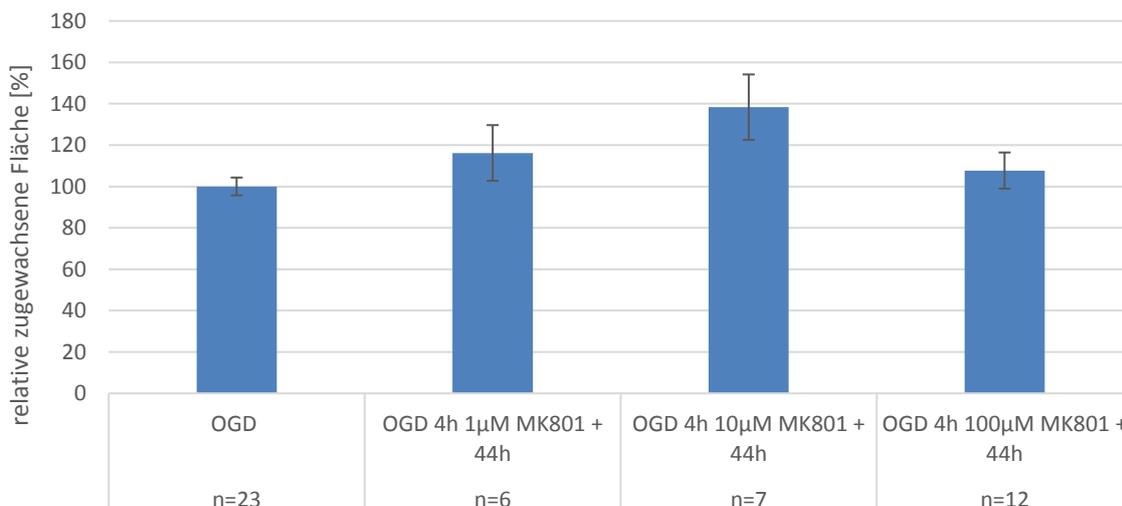


Diagramm 3-18 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von 4h MK801 unter OGD-Bedingungen; Behandlung der cerebEND-Zellen für 4h mit MK801, danach eine 44h Reoxygenierungsphase ohne MK801; n=6-23; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Die Anwendung der Blockersubstanz MK801 während der vierstündigen OGD-Phase zeigte interessante Tendenzen. Die erhöhte Motilität von 138,34% ± 15,82% unter der 10µM MK801-Konzentration wurde so nicht erwartet. Auch die höhere Konzentration von 100µM MK801 zeigte noch eine Zunahme der Motilität auf 107,69% ± 8,73%. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz erlangt werden.

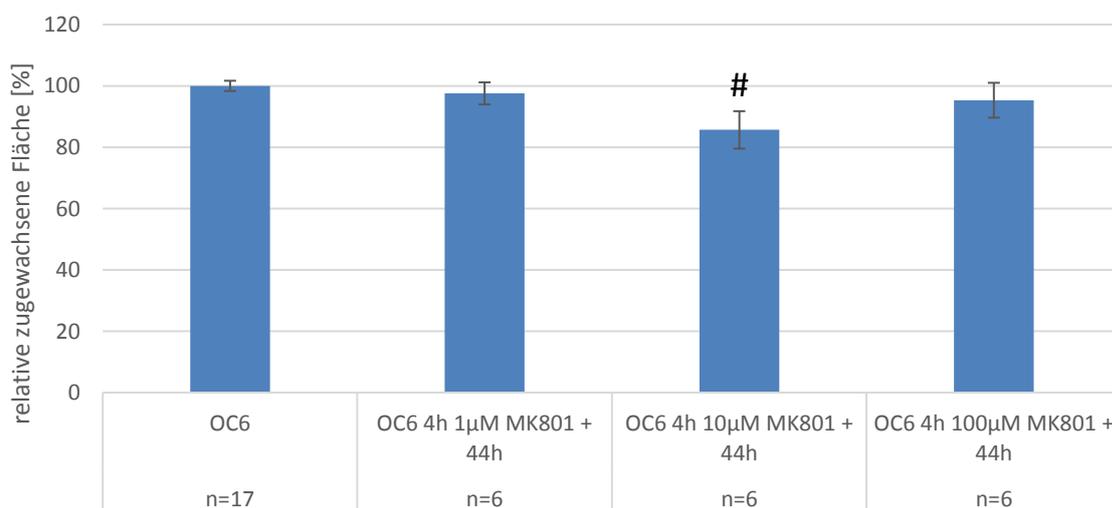


Diagramm 3-19 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von 4h MK801 unter OGD-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium; Behandlung der cerebEND-Zellen für 4h mit MK801, danach eine 44h Reoxygenierungsphase, Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=6-23; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zur OC6-Kontrolle (OC6); bei OC6-Bedingungen wurde die Konditionierung des Mediums unter OGD-Bedingungen durchgeführt.

Wenn nun C6-konditioniertes Medium verwendet wurde, zeigte sich eine Umkehr der zuvor beobachteten Reaktion. Die vierstündige Anwendung der 10µM MK801-Lösung hemmte die Motilität auf 85,66% ± 6,11% signifikant. Die höheren und niedriger konzentrierten Lösungen hatten wiederum keine signifikanten Effekte, jedoch ließen sich Tendenzen erkennen.

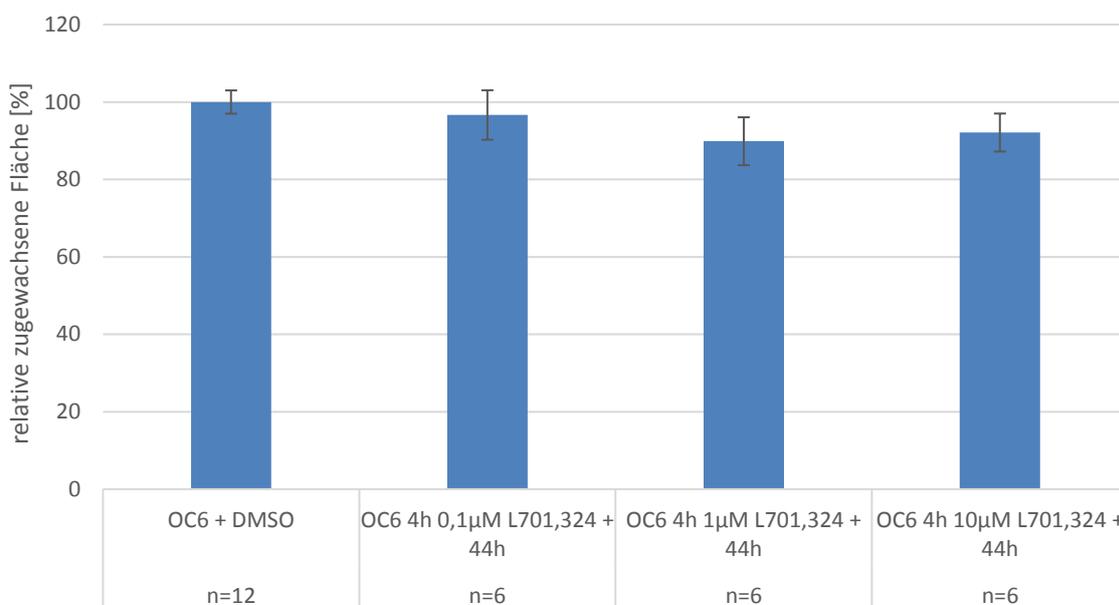
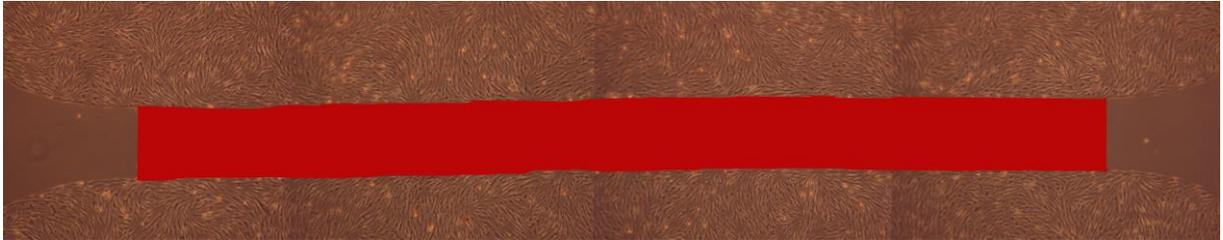


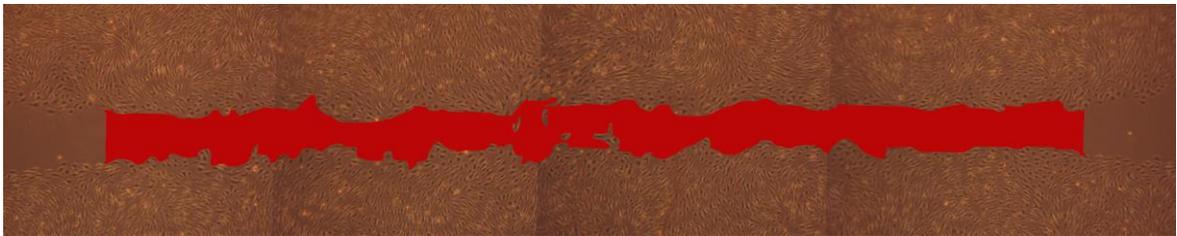
Diagramm 3-20 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von 4h-L701,324 unter OGD-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium; Behandlung der cerebEND-Zellen für 4h mit L701,324, danach eine 44h Reoxygenierungsphase, Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=6-12; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; bei OC6-Bedingungen wurde die Konditionierung des Mediums unter OGD-Bedingungen durchgeführt.

Die Zugabe von L701,324 nur während der OGD-Phase zeigte keine signifikante Veränderung des Motilitätsverhalten, egal ob mit oder ohne (nicht dargestellt) Zugabe von C6-konditioniertem Medium.

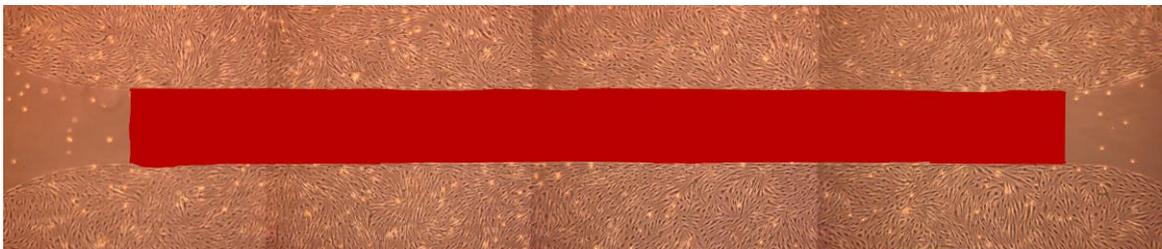
Bildaufnahmen der IBIDIs® mit dem Mikroskop (10-fache Vergrößerung)



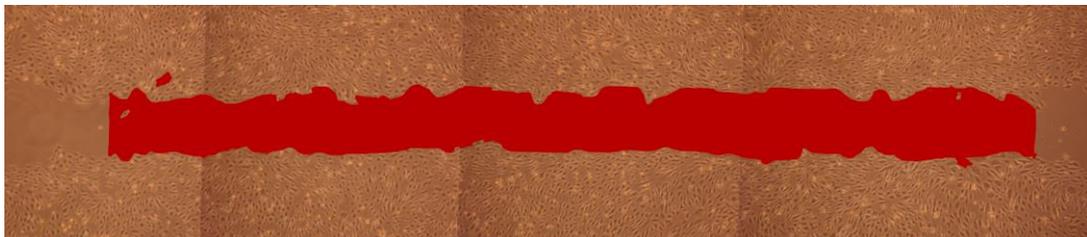
OGD + C6 konditioniertes Medium 0h



OGD + C6 konditioniertes Medium 48h



OGD + C6 konditioniertes Medium + MK801 100µM während 44h Reoxygenierungsphase 0h



OGD + C6 konditioniertes Medium + MK801 100µM während 44h Reoxygenierungsphase 48h

Abbildung 3-2 Aufnahmen von cerebEnd (10-fach) während Ischämie bei Motilitätsversuchen mit ibidi®

3.3.4 NMDA-Rezeptor-Blockade nach OGD als Therapieansatz

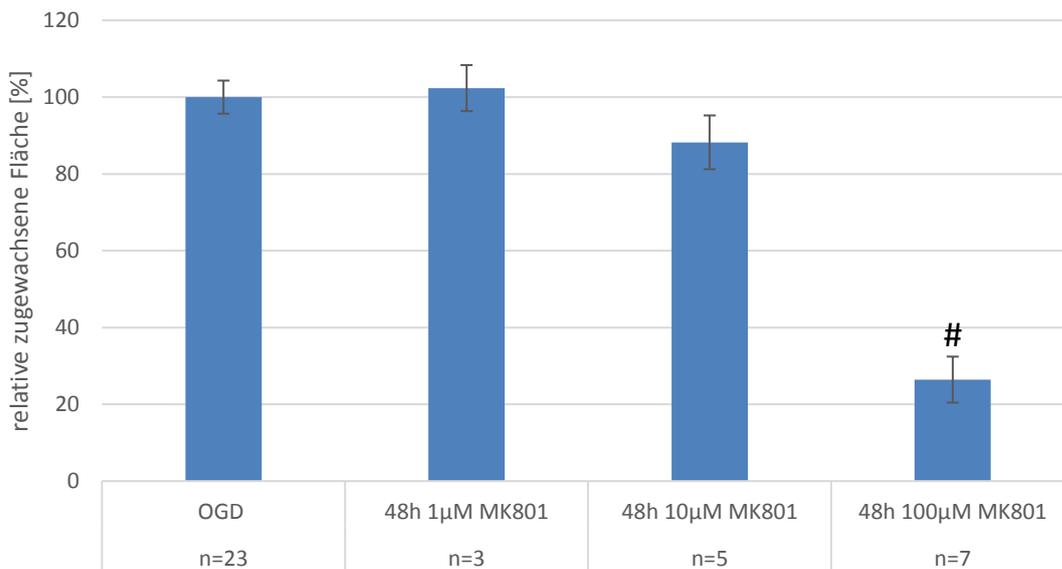


Diagramm 3-21 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von MK801 unter OGD-Bedingungen; Behandlung der cerebEND-Zellen während des ganzen Versuchs mit MK801, 4h OGD, danach eine 44h Reoxygenierungsphase; n=3-23; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zur OGD-Kontrolle (OGD).

Bei den Motilitätsversuchen unter ischämischen Bedingungen und Zugabe von dem NMDA-Rezeptor-Blocker MK801 während des ganzen Versuchs zeigte sich eine deutliche Motilitätsverlangsamung unter höheren MK801-Konzentrationen. Die Motilität wurde bei 100µM MK801 signifikant auf ein Viertel (26,43% ± 5,99%) der Kontrolle gedrosselt. Dies war nochmals eine Zunahme zu der Wirkung von 100µM MK801 unter Normoxie, welche dort die Motilität auf ungefähr die Hälfte (58,51% ± 3,46%) im Vergleich zur Kontrolle reduzierte.

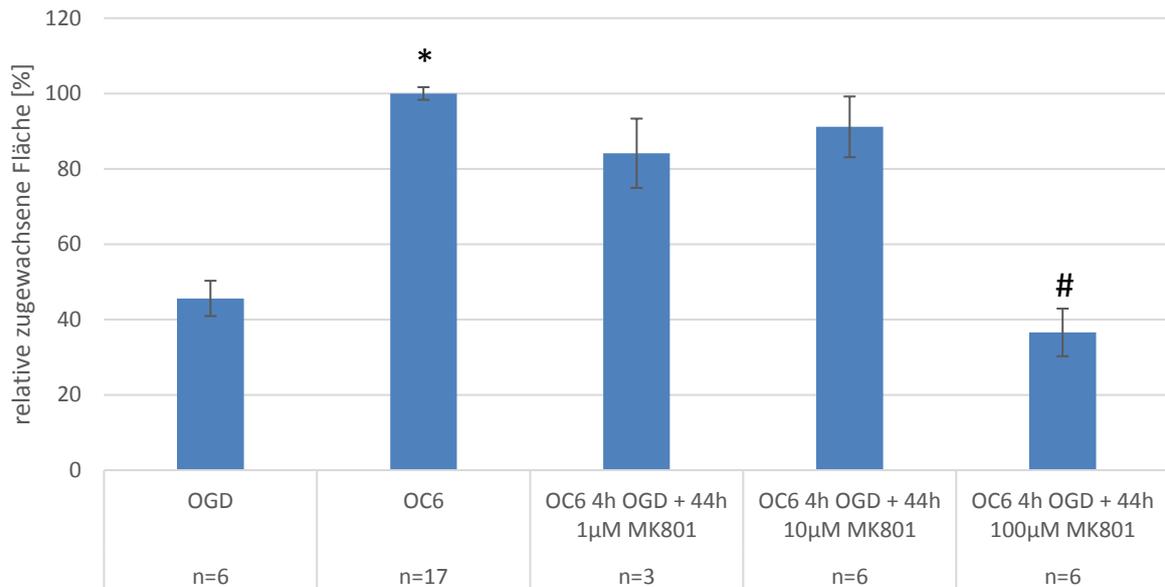


Diagramm 3-22 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von MK801 in der Reoxygenierungsphase unter OGD-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium; Behandlung der cerebEND-Zellen mit 4h-OGD-Phase, danach eine 44h Reoxygenierungsphase mit MK801, Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=3-23; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Dunn's Test) dargestellt mit # im Vergleich zur OC6-Kontrolle (OC6), mit * im Vergleich zur OGD-Kontrolle (OGD); bei OC6-Bedingungen wurde die Konditionierung des Mediums unter OGD-Bedingungen durchgeführt.

Der Versuchsaufbau mit der Anwendung von MK801 nach der OGD-Phase mit C6-konditioniertem Medium war das Experiment mit größter klinischer Relevanz. Das C6-konditionierte Medium sollte das die Endothelzellen umgebende Astrozytenmilieu repräsentieren und die Anwendung von MK801 nach der OGD-Phase die Möglichkeit, nach Diagnose der Ischämie, beispielsweise bei einem Schlaganfall, therapeutisch zu intervenieren. Bei der Auswertung sah man nun, dass die höchste Konzentration von MK801 mit 100µM die C6-Effekte völlig blockiert hat (36,57% ± 6,32%) und die Motilität sogar noch stärker als die OGD-Kontrolle (45,59% ± 4,69%) mit unkonditionierten Medium hemmte.

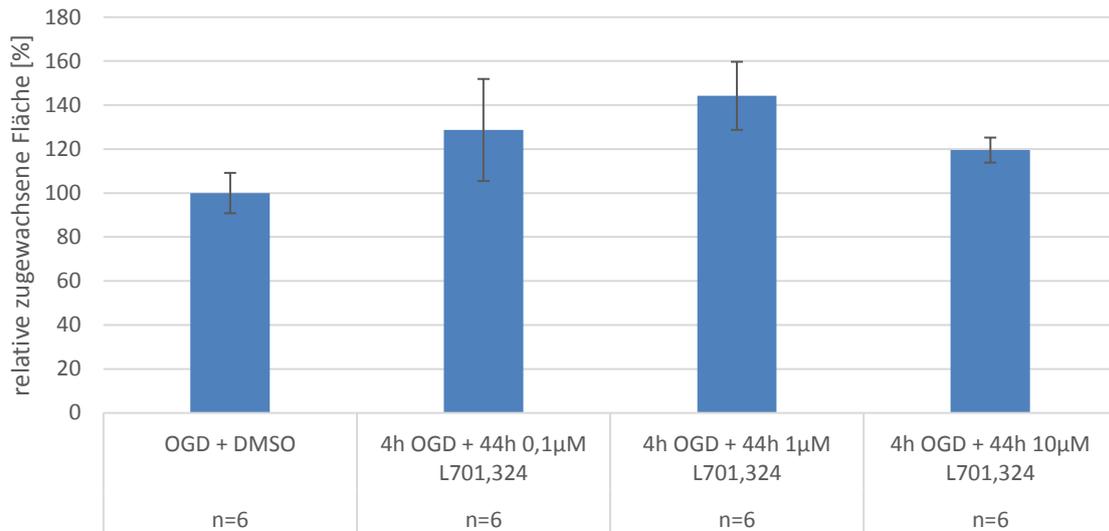


Diagramm 3-23 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von L701,324 unter OGD-Bedingungen; Behandlung der cerebEND-Zellen mit 4h-OGD-Phase, danach eine 44h Reoxygenierungsphase mit L701,324; n=6; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM;

Bei der Zugabe des Glycin-Antagonisten L701,324 während der Reoxygenierungsphase konnte tendenziell eine Beschleunigung der Motilität beobachtet werden. Die Anwendung höherer Konzentrationen von L701,324 als 10µM war nicht möglich, da diese avital für die Zellen waren.

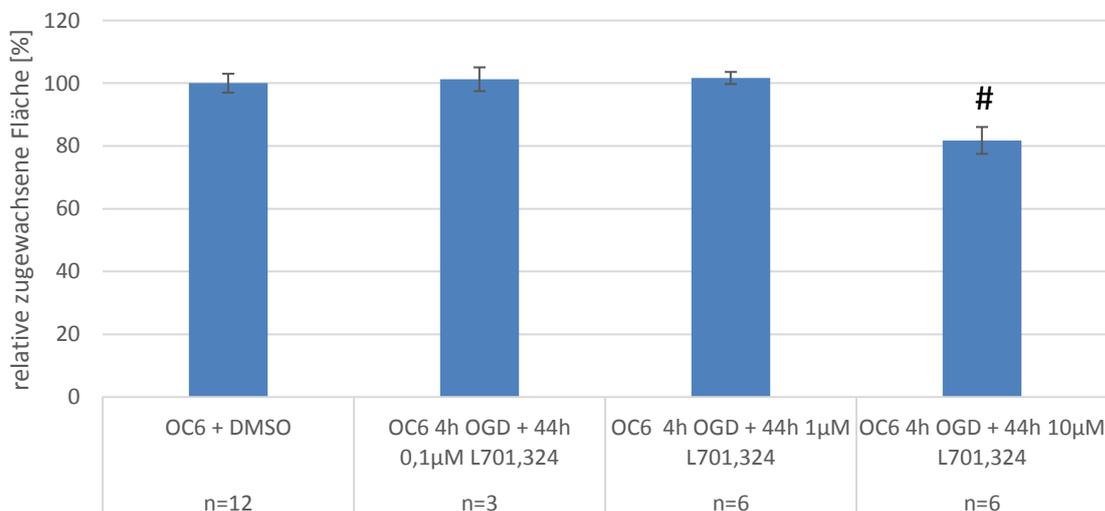


Diagramm 3-24 IBIDI® Motilitätsassay, Auswirkungen von L701,324 in der Reoxygenierungsphase unter OGD-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium; Behandlung der cerebEND-Zellen mit 4h-OGD-Phase, danach eine 44h Reoxygenierungsphase mit L701,324, Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=3-12; 20000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zur OGD-C6-Kontrolle mit DMSO (OC6 + DMSO); bei OC6-Bedingungen wurde die Konditionierung des Mediums unter OGD-Bedingungen durchgeführt.

Das C6-konditionierte Medium zeigte eine deutliche Veränderung des Motilitätsverhaltens der cerebENDs bei L701,324-Behandlung im Vergleich zur

Verwendung von unkonditioniertem Medium. Die Konzentration von $10\mu\text{M}$ L701,324 verringerte die Motilität signifikant auf $81,76\% \pm 4,29\%$.

Insgesamt betrachtet war die motilitätshemmende Wirkung von $100\mu\text{M}$ MK801 bei OGD+MK801 während des ganzen Versuchs ($25,78\% \pm 6,26\%$) am stärksten, während es über die Konditionen OGD+C6+MK801 nach 4h ($36,57\% \pm 6,32\%$) und Normoxie+C6+MK801 ($45,58\% \pm 6,56\%$) schwächer wurde und dann bei Normoxie+MK801 ($58,51\% \pm 3,46\%$) mit 41% weniger zugewachsener Fläche im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen die schwächsten Effekte zeigte. Bei der nur vierstündigen Applikation während der OGD-Phase zeigte sich nur eine Signifikanz bei der Konzentration von $10\mu\text{M}$ mit C6-konditioniertem Medium ($85,66\% \pm 6,11\%$).

Es konnte also weiterhin von oben genannter These ausgegangen werden, dass die Endothelzellen unter ischämischen Bedingungen anfälliger für externe Stimuli sind. Eine entscheidende Rolle muss auch dem C6-konditioniertem Medium zukommen, da erst durch dessen Verwendung die eigentlich erwarteten Effekte der NMDA-Rezeptor-Inhibitoren eintraten. Aus diesem Grunde, um ein möglichst wirklichkeitsgetreues Modell der Blut-Hirn-Schranke bieten zu können, wurden bei der Kultivierung der Zellen für die folgenden mRNA- und Proteinanalysen C6-konditioniertes Medium verwendet.

3.4 Einfluss von Ischämie und NMDA-Rezeptor-Inhibitoren auf die mRNA-Expression ischämie-relevanter Zielstrukturen

Ob den gewonnenen Erkenntnissen und Ergebnissen aus den Motilitätsversuchen RNA-Regulationsvorgänge zu Grunde liegen, wurde an Hand von qPCR-Analysen untersucht.

Es wurden dabei der Hypoxie-induzierbare Faktor 1α (HIF1- α), der die Angiogenese stimulierende Wachstumsfaktor VEGF und dessen Rezeptor sowie Tie2, eine Tyrosinkinase welche ein Rezeptor für Angiopoetin1 ist, untersucht. Des Weiteren wurden die mRNA der Matrix Metalloproteinasen 2,3 und 9 und deren Gegenspieler Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) und -3 auf Regulationen untersucht. Zunächst wurden die C6-Glioma-Zellen für vier Stunden entweder Normoxie- oder OGD-Bedingungen ausgesetzt, um das konditionierte Medium für den folgenden

Versuch zu gewinnen. Dann wurden die cerebEND-Zellen einer vierstündigen Behandlung ausgesetzt, um dann mit der Probengewinnung beginnen zu können.

3.4.1 Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α

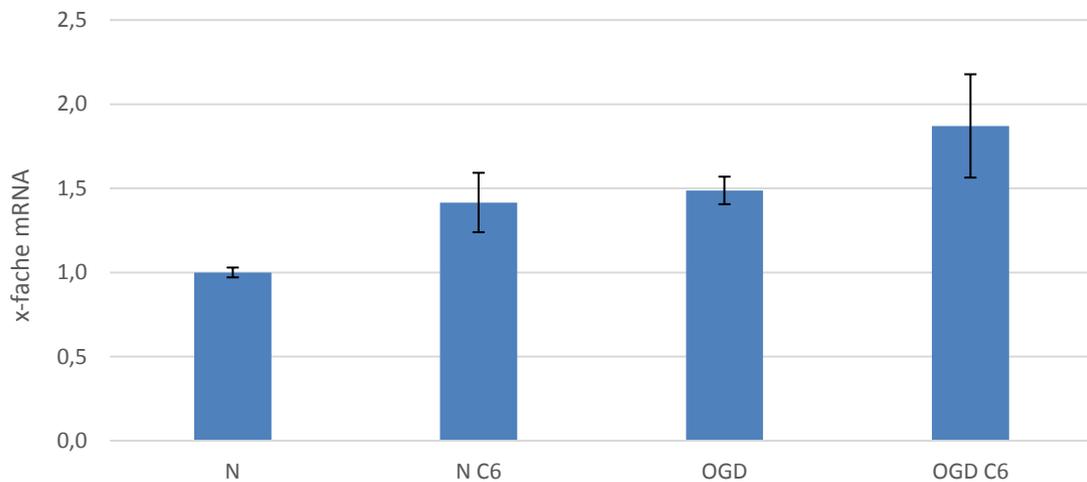


Diagramm 3-25 qPCR HIF1- α : 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium, n=4; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM.

Allein das C6-konditionierte Medium erhöhte die mRNA-Menge von HIF1- α von $1,00 \pm 0,03$ während der Normoxie auf $1,42 \pm 0,18$. Es ließ sich auch eine Zunahme von HIF-1 α durch die OGD-Behandlung sehen, so nahm die mRNA-Menge auf $1,49 \pm 0,08$ während der OGD bei Verwendung von unkonditionierten Medium zu. Synergistisch wurde auch bei den Versuchen mit C6-konditionierten Medium die HIF-1 α mRNA-Menge bei OC6 auf $1,87 \pm 0,31$ angehoben. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz erreicht werden.

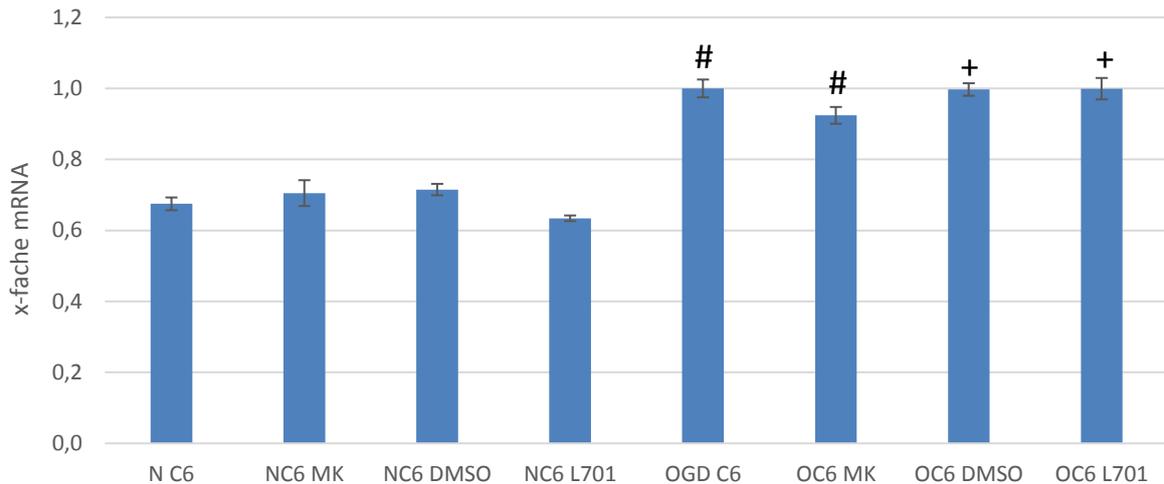


Diagramm 3-26 qPCR HIF1- α : 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium; Blocksubstanzen MK801 100 μ M und L701,324 10 μ M während 4h; n=6; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zu NC6, + im Vergleich zu NC6+DMSO.

Bei den Proben, welche für die Testung der Blockersubstanzen akquiriert wurden, zeigte sich nun ein statistisch signifikanter Einfluss der OGD auf die mRNA-Synthese von HIF1- α . So stieg die Menge beispielsweise von $0,67 \pm 0,02$ bei NC6 auf $1,00 \pm 0,03$ bei OC6 an.

3.4.2 Vascular endothelial growth factor α

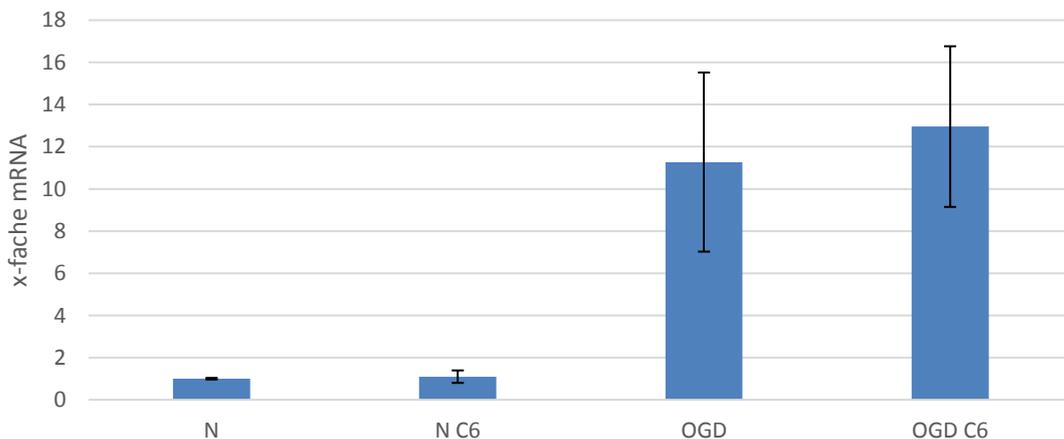


Diagramm 3-27 qPCR VEGF α : 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditionierten Medium, n=4; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM.

Die mRNA-Analyse der Regulierung von VEGF α zeigte eine deutliche Zunahme an mRNA bei der Behandlung mit OGD. Die statistische Signifikanz wurde bei dem Vergleich bei Verwendung von konditioniertem Medium zwischen NC6 mit $1,10 \pm 0,30$ und OC6 mit $12,96 \pm 7,62$ knapp verfehlt (p=0,056).

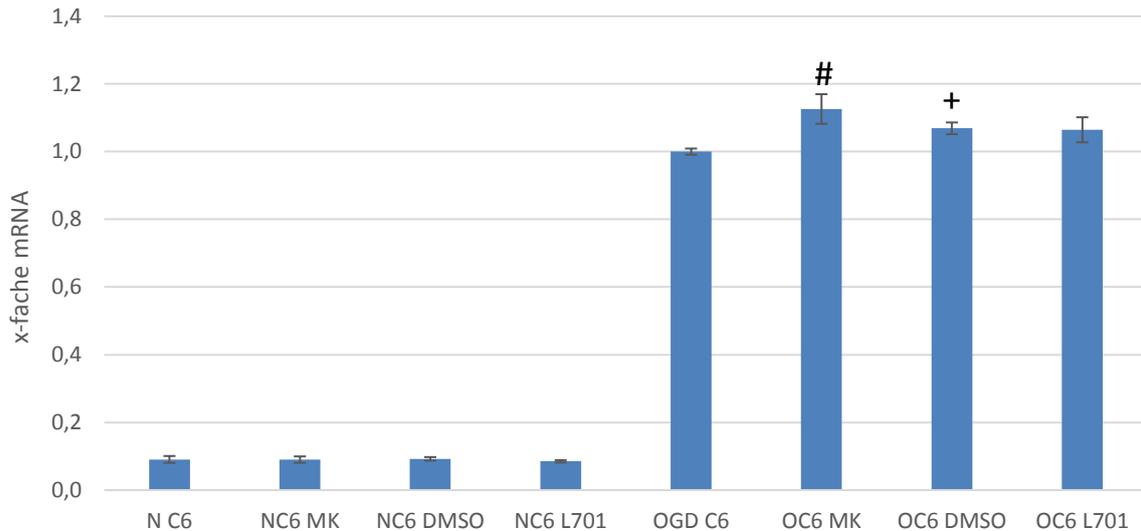


Diagramm 3-28 qPCR VEGF α : 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium; Blocksubstanzen MK801 100 μ M und L701,324 10 μ M während 4h; n=6; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Tukey-Test) dargestellt mit # im Vergleich zu NC6 und mit + im Vergleich zu NC6+DMSO.

Die vierstündige Therapie mit 100 μ M MK801 zeigte bei der Verwendung von C6-konditioniertem Medium und OGD eine statistisch signifikante Zunahme an VEGF α auf mRNA-Ebene von $1,00 \pm 0,01$ bei OC6 auf $1,13 \pm 0,04$ bei der Therapie mit 100 μ M MK 801.

3.4.3 Vascular endothelial growth factor receptor 2

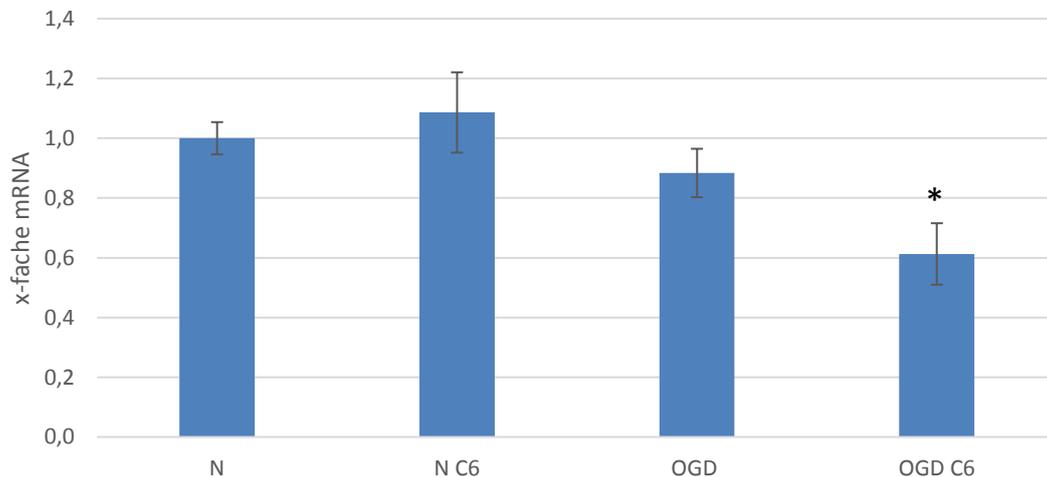


Diagramm 3-29 qPCR VEGFR-2: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium, n=4; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit * im Vergleich zu NC6.

Die mRNA des VEGFR-2 wurde unter OGD-Bedingungen und der Verwendung von C6-konditioniertem Medium im Vergleich zur Normoxie-C6-Probe von $1,09 \pm 0,13$ auf $0,61 \pm 0,10$ signifikant herunterreguliert.

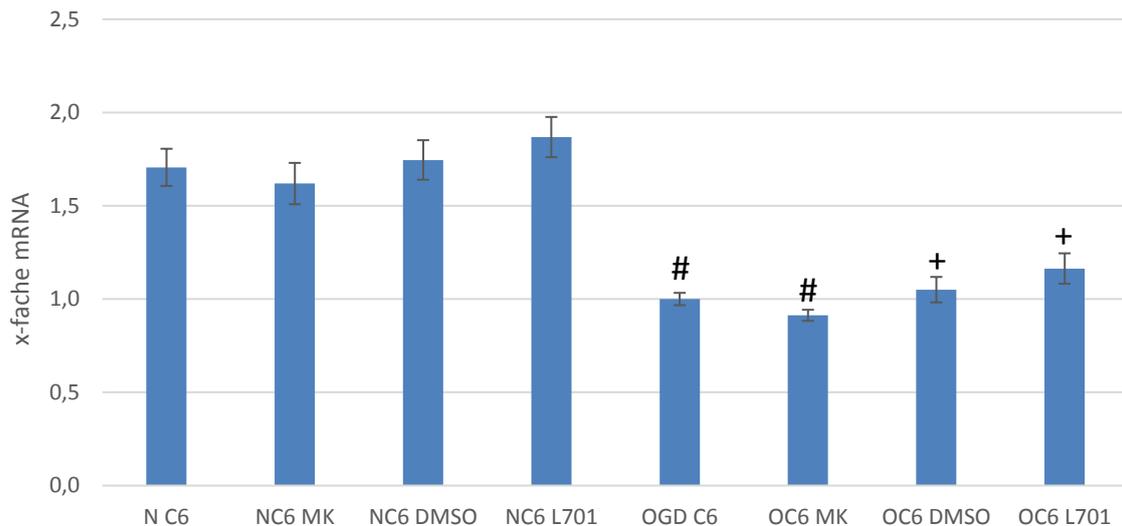


Diagramm 3-30 qPCR VEGFR-2: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium; Blocksubstanzen MK801 100 μ M und L701,324 10 μ M während 4h; n=6; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zu NC6 und mit + im Vergleich zu NC6+DMSO.

Aus der Verwendung von Blockersubstanzen resultierte keine statistisch signifikante Regulierung der mRNA des VEGF-Rezeptors-2. Die OGD bewirkte jedoch eine signifikante Abnahme der mRNA des VEGFR-2, wie im Vordiagramm beschrieben, von $1,71 \pm 0,10$ unter NC6-Bedingungen auf $1,00 \pm 0,03$ unter OC6-Bedingungen.

3.4.4 Tie2

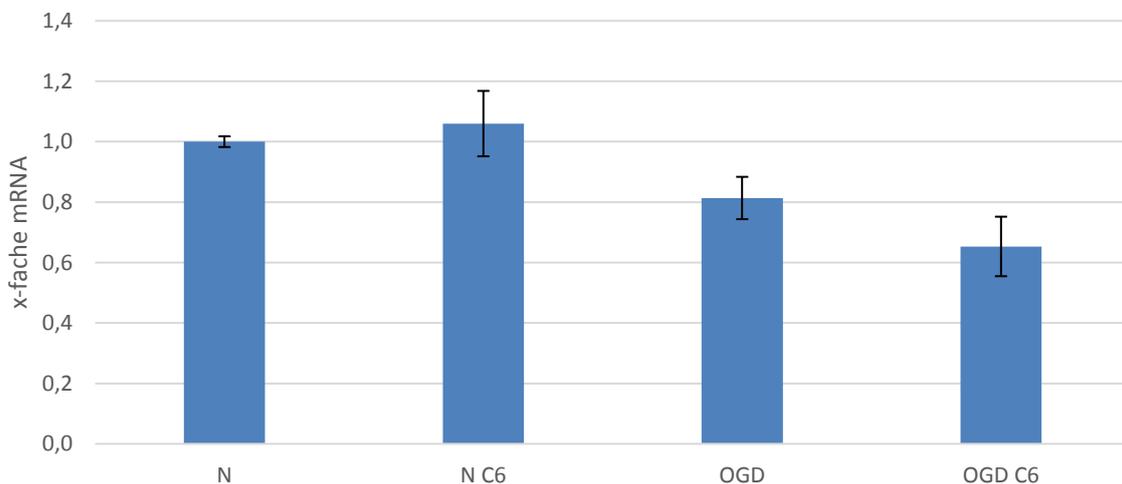


Diagramm 3-31 qPCR Tie2: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium, n=4; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM.

Tie2 zeigte eine Regulierung unter OGD-Bedingungen. So nahm die mRNA bei Verwendung von unkonditioniertem Medium von $1,00 \pm 0,02$ unter Normoxie auf $0,81 \pm 0,07$ unter OGD ab. Bei Verwendung von C6-konditioniertem Medium war die

Abnahme von $1,06 \pm 0,11$ unter NC6 auf $0,65 \pm 0,10$ unter OC6-Bedingungen noch stärker. Eine statistische Signifikanz konnte leider nicht erreicht werden.

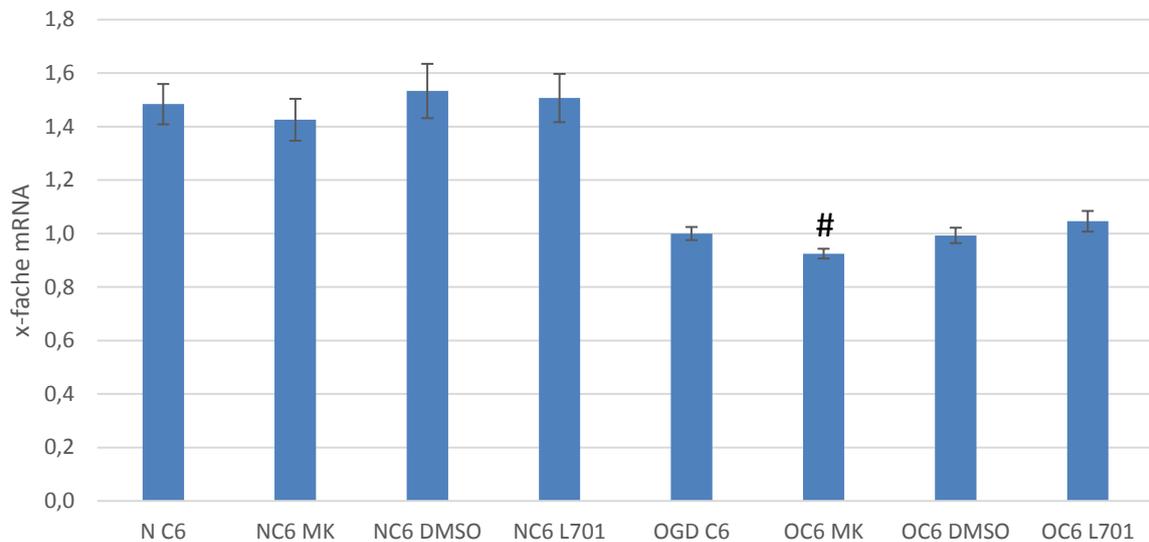


Diagramm 3-32 qPCR Tie2: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium; Blocksubstanzen MK801 100 μ M und L701,324 10 μ M während 4h; n=6; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Tukey Test) dargestellt mit # im Vergleich zu NC6.

Die zuvor beschriebene Regulierung unter OGD-Bedingungen ließ sich auch bei den Versuchen mit NMDAR-Blockern feststellen. So nahm die mRNA unter NC6 von $1,48 \pm 0,08$ auf $1,00 \pm 0,02$ unter OC6 ab. Bei der Anwendung von 100 μ M MK 801 unter OC6-Bedingungen zeigte sich nun eine signifikante Abnahme der mRNA auf $0,92 \pm 0,02$ im Vergleich zu NC6.

3.4.5 Matrix-Metalloproteinase 2

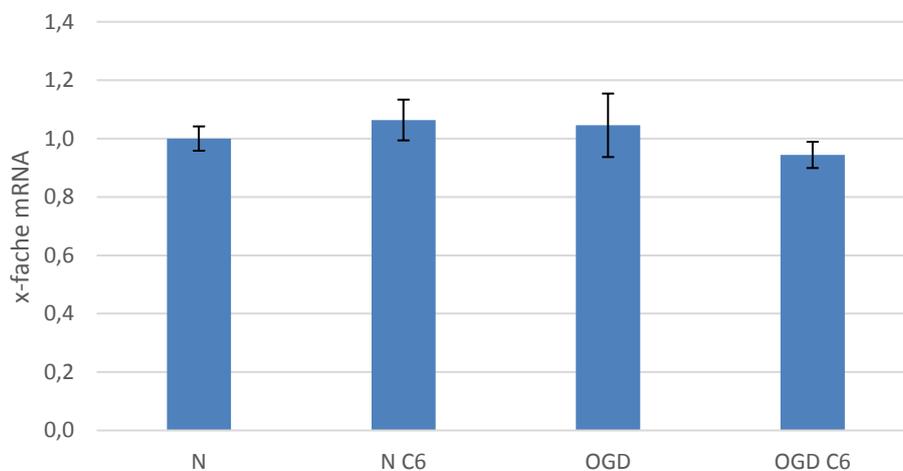


Diagramm 3-33 qPCR MMP2: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium, n=4; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM;

Bei der Gegenüberstellung Normoxie und OGD mit konditioniertem Medium ließen sich Tendenzen erahnen, jedoch war keine statistische Signifikanz zu berichten. So nahm die Menge an MMP2 mRNA zwischen NC6 $1,06 \pm 0,07$ und OC6 auf $0,94 \pm 0,04$ ab.

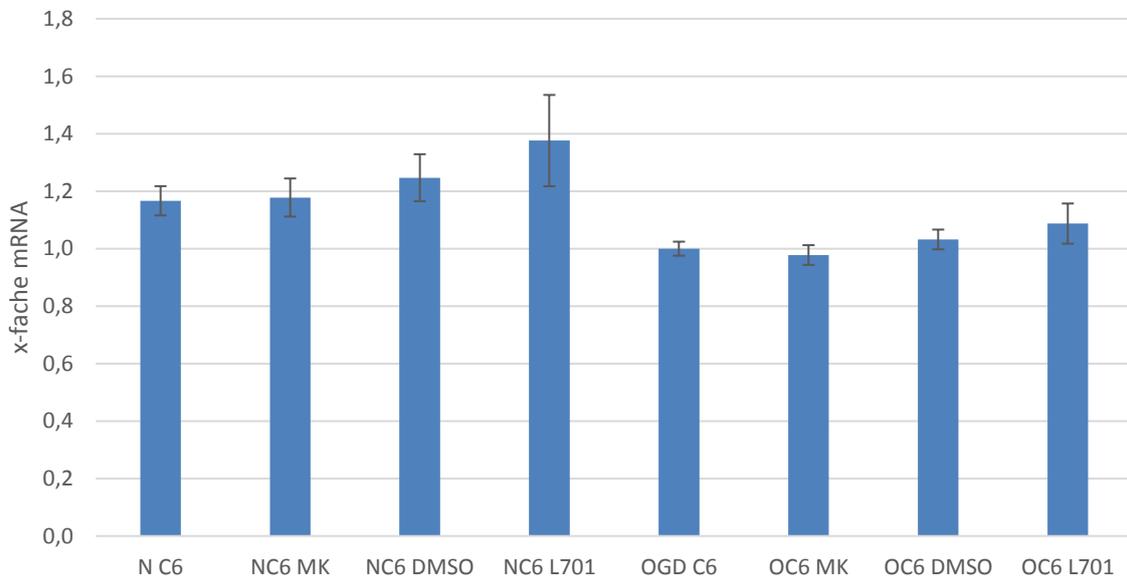


Diagramm 3-34 qPCR MMP2: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium; Blocksubstanzen MK801 100 μ M und L701,324 10 μ M während 4h; n=6; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM.

Die oben genannten Tendenzen konnten auch bei der Verwendung von NMDAR-Blockersubstanzen gesehen werden, allerdings waren keine signifikanten Auswirkungen beobachtbar.

3.4.6 Matrix-Metalloproteinase 3

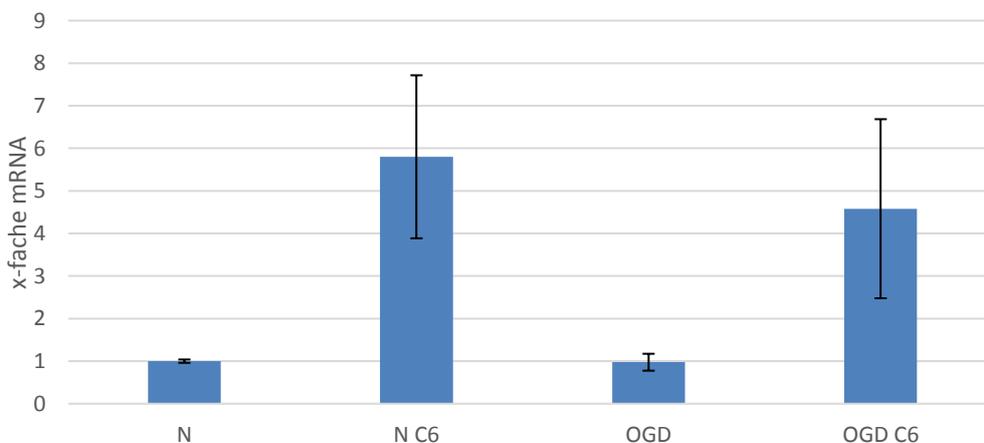


Diagramm 3-35 qPCR MMP3: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditionierten Medium, n=4; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM.

Das C6-konditionierte Medium bewirkte eine Zunahme der mRNA (nicht signifikant) in der Normoxie von $1,0 \pm 0,04$ auf $5,80 \pm 1,92$ und in der OGD von $0,97 \pm 0,20$ auf $4,58 \pm 2,10$.

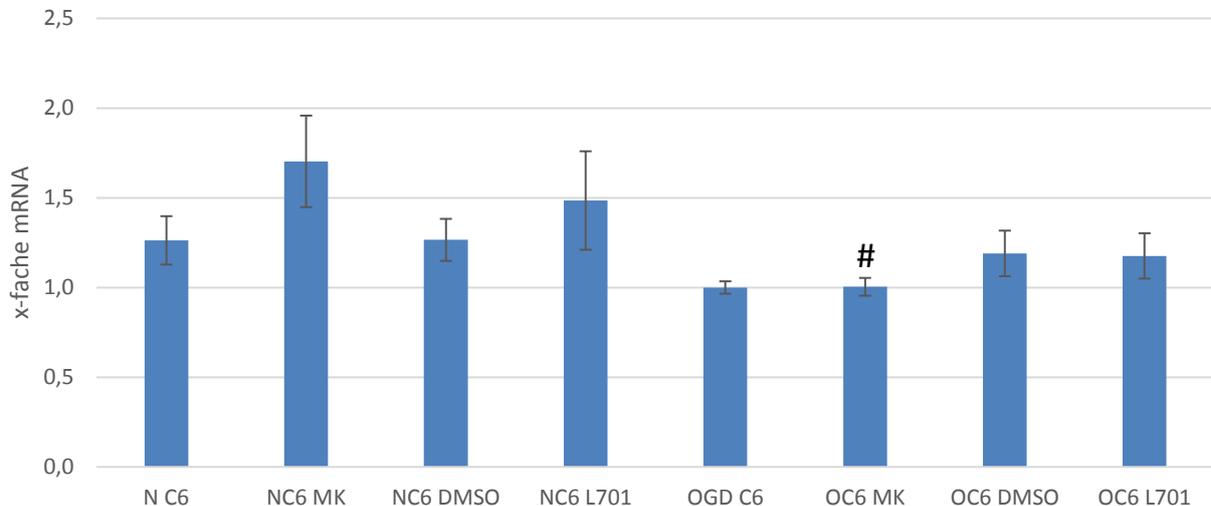


Diagramm 3-36 qPCR MMP3: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium; Blocksubstanzen MK801 100 μ M und L701,324 10 μ M während 4h; n=6; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Tukey Test) dargestellt mit # im Vergleich zu NC6+MK801 100 μ M.

Bei der Betrachtung der MMP3-mRNA Regulierung zeigten sich tendenziell eine Zunahme durch die Blockersubstanzen unter Normoxie-Bedingungen, im Falle von 100 μ M MK 801 von $1,26 \pm 0,13$ bei den NC6-Kontroll-Bedingungen auf $1,70 \pm 0,26$ mit MK 801. Bei der Behandlung mit 10 μ M L701,324 war ebenfalls eine Tendenz zu erkennen, welche jedoch mit einem Anstieg bei der Kontrolllösung NC6+DMSO von $1,27 \pm 0,12$ auf $1,48 \pm 0,27$ mit L701,324 schwächer war als bei MK801. Es konnte jedoch in keinem der beiden Fälle das Signifikanz-Niveau erreicht werden. Die tendenziellen Effekte waren während den zusätzlichen OGD-Bedingungen nicht mehr vorhanden. Die einzige Signifikanz zeigte der Vergleich der 100 μ M MK801-Proben. Dabei war eine Abnahme der mRNA-Menge, was beim Vergleich der Kontrolllösungen ohne Blocker nur zu vermuten war, von $1,70 \pm 0,26$ unter NC6-Bedingungen + 100 μ M MK801 auf $1,00 \pm 0,05$ bei OC6-Bedingungen + 100 μ M MK801 zu beobachten.

3.4.7 Matrix-Metalloproteinase 9

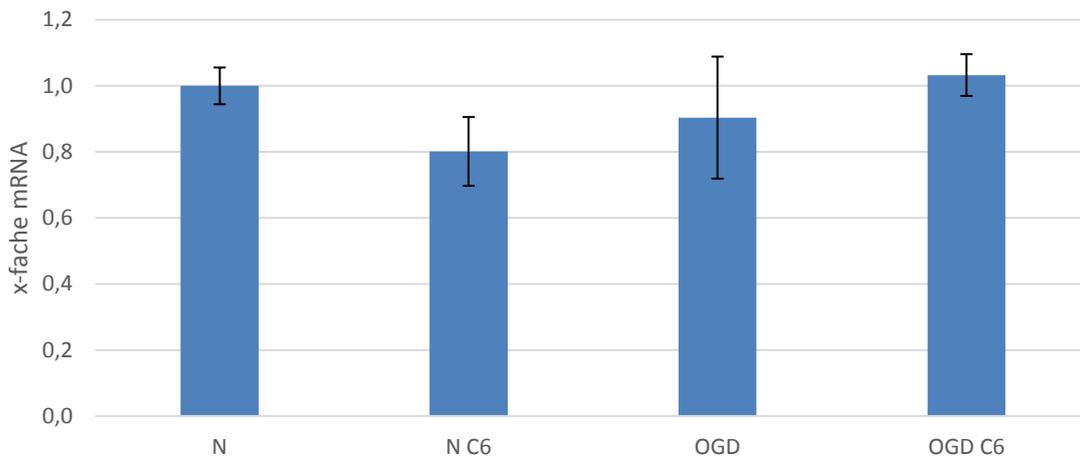


Diagramm 3-37 qPCR MMP9: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium, n=4; 40000 Zellen/cm²; ± SEM.

Bei der Auswertung der mRNA von MMP9 zeigten sich bei der Verwendung von C6-konditioniertem Medium unter den unterschiedlichen Bedingungen Normoxie und OGD unterschiedliche Tendenzen. So nahm die mRNA-Menge bei den Proben der Normoxie von $1,00 \pm 0,06$ auf $0,80 \pm 0,10$ bei Verwendung von C6-konditioniertem Medium ab. Im Gegensatz dazu stieg die mRNA-Menge von $0,90 \pm 0,18$ unter OGD-Bedingungen auf $1,03 \pm 0,06$ mit konditioniertem Medium. Aber dies waren nur Tendenzen, eine Signifikanz konnte nicht gefunden werden.

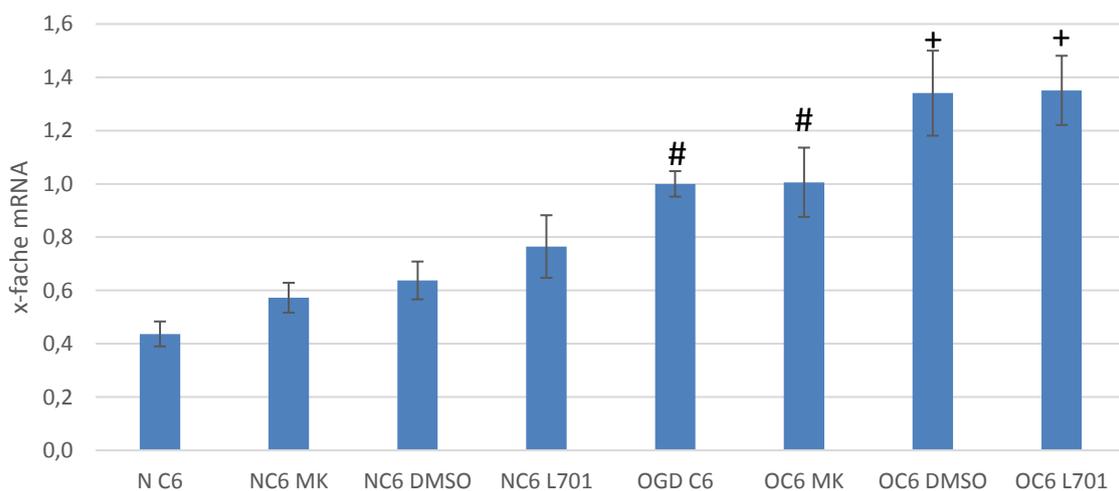


Diagramm 3-38 qPCR MMP9: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium; Blocksubstanzen MK801 100 µM und L701,324 10µM während 4h; n=6; 40000 Zellen/cm²; ± SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zu NC6, mit + im Vergleich zu NC6 + DMSO.

Die OGD verdreifachte fast die MMP9 mRNA von $0,44 \pm 0,05$ unter NC6-Bedingungen auf $1,00 \pm 0,05$ unter zusätzlicher OGD signifikant. Für die Blockersubstanzen konnten zwar MMP9 mRNA-steigernde Tendenzen unter Normoxie erahnt werden ($0,57 \pm 0,06$ bei NC6 MK801 100µM), aber in der statistischen Analyse wurde das Signifikanz-Niveau verfehlt.

3.4.8 Tissue inhibitor of metalloproteinase 1

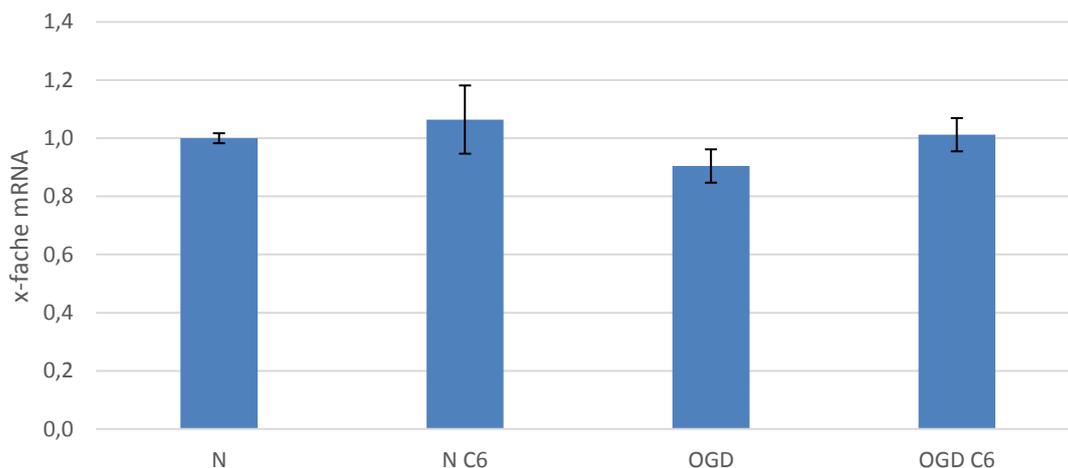


Diagramm 3-39 qPCR TIMP-1: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium, n=4; 40000 Zellen/cm²; ± SEM.

Bei den Daten der mRNA-Analyse von TIMP-1 ließ sich festhalten, dass das C6-konditionierte Medium keinen Einfluss auf die Regulierung hatte.

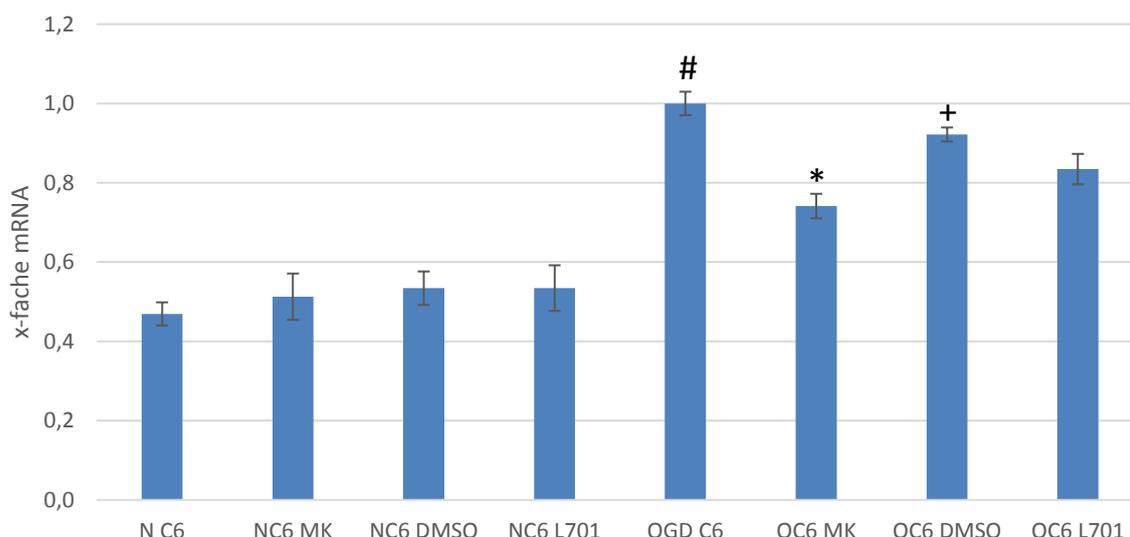


Diagramm 3-40 qPCR TIMP-1: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditionierten Medium; Blocksubstanzen MK801 100 µM und L701,324 10µM während 4h; n=6; 40000 Zellen/cm²; ± SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zu NC6, mit * im Vergleich zu OC6, mit + im Vergleich zu NC6+DMSO.

Bei den Versuchen mit den Blockersubstanzen konnte man unter OGD eine Reihe an Regulierungen sehen. So war zunächst die OGD bei der Verwendung von C6-konditioniertem Medium anzuführen, welche die mRNA von TIMP-1 signifikant von $0,47 \pm 0,03$ bei NC6-Bedingungen auf $1,00 \pm 0,03$ mehr als verdoppelte. Unter OC6-Bedingungen wurde durch $100\mu\text{M}$ MK801 diese Zunahme der mRNA signifikant auf $0,74 \pm 0,03$ gedrosselt.

3.4.9 Tissue inhibitor of metalloproteinase 3

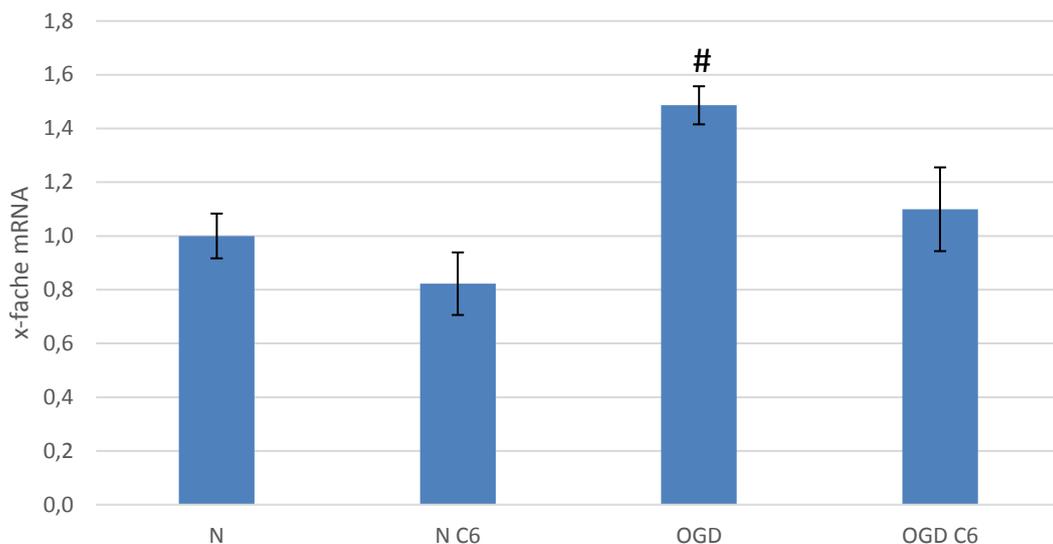


Diagramm 3-41 qPCR TIMP-3: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditioniertem Medium, n=4; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Tukey Test) dargestellt mit # im Vergleich zu NC6.

Die OGD-Bedingungen zeigten eine Zunahme der TIMP-3 mRNA, wobei eine Signifikanz nur beim Vergleich der beiden Extremwerte erreicht werden konnte (NC6: $0,82 \pm 0,12$ vs. OGD $1,49 \pm 0,07$).

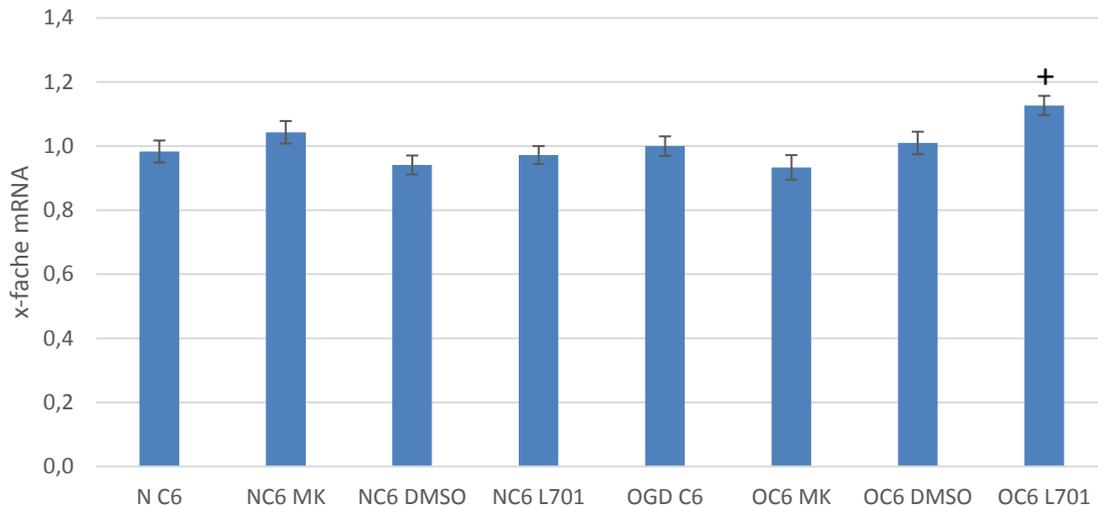


Diagramm 3-42 qPCR TIMP-3: 4h Normoxie bzw. OGD; mit oder ohne konditionierten Medium; Blocksubstanzen MK801 100 μ M und L701,324 10 μ M während 4h; n=6; 40000 Zellen/cm²; \pm SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit + im Vergleich zu NC6+DMSO.

Die zuvor gesehene Tendenz unter C6-konditioniertem Medium ließ sich nicht mehr nachvollziehen. Jedoch zeigte die Therapie mit 10 μ M L701,324 unter OC6-Bedingungen einen signifikanten Anstieg der TIMP-3 mRNA von $0,94 \pm 0,03$ bei der Kontrolllösung NC6+DMSO auf $1,13 \pm 0,03$.

3.5 Einfluss von Ischämie und NMDA-Rezeptor-Inhibitoren auf barriererelevante Proteine

Die Analyse der cerebEND Endothelzellen mittels Western Blot sollte mechanistische Aufschlüsse geben. Es wurde die Regulation der Kinasen ERK und akt, welche an Signalwegen der Barriereintegrität beteiligt sind, an Hand ihres Phosphorylierungsgrads analysiert. Des Weiteren wurden Strukturproteine der Blut-Hirn Schranke wie Occludin und Claudin-5 untersucht.

Die Probengewinnung erfolgte entweder nach Behandlung mit 4h OGD + NMDAR-Blockern oder nach 4h OGD mit anschließender 20h Reoxygenierung + NMDAR-Blockern.

3.5.1 Western Blot pERK/ERK

Die MAP-Kinase ERK wird durch Phosphorylierung aktiviert. So kann durch den Vergleich der phosphorylierten Form mit der nicht-phosphorylierten Form auf Aktivierungsvorgänge zurück geschlossen werden.

3.5.1.1 Western Blot pERK/ERK nach 4h

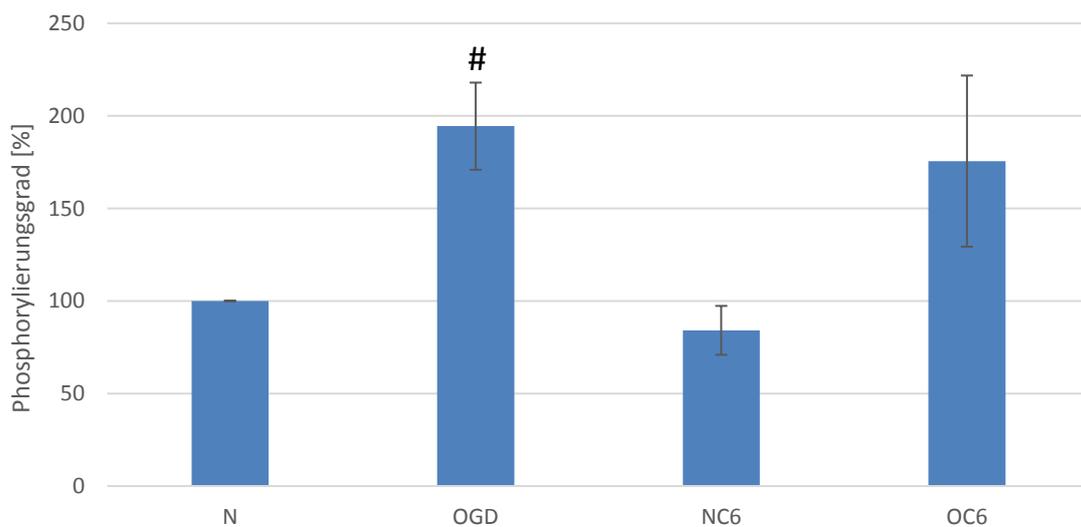


Diagramm 3-43 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von ERK nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=6; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Tukey Test) dargestellt mit # im Vergleich zu Normoxie (N).

Die vierstündige Behandlung der Zellen während der OGD-Phase bewirkte eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung des ERK-Proteins auf 194,45% ± 23,56%. Die Verwendung von C6-konditioniertem Medium verminderte den Phosphorylierungsgrad bei der Normoxie-C6-Behandlung auf 84,14% ± 13,21%. Bei

der zusätzlichen Ischämie steigerte sich der Phosphorylierungsgrad, vergleichbar der OGD-Behandlung unter Normoxie, auf $175,57\% \pm 46,25\%$ bei OC6.

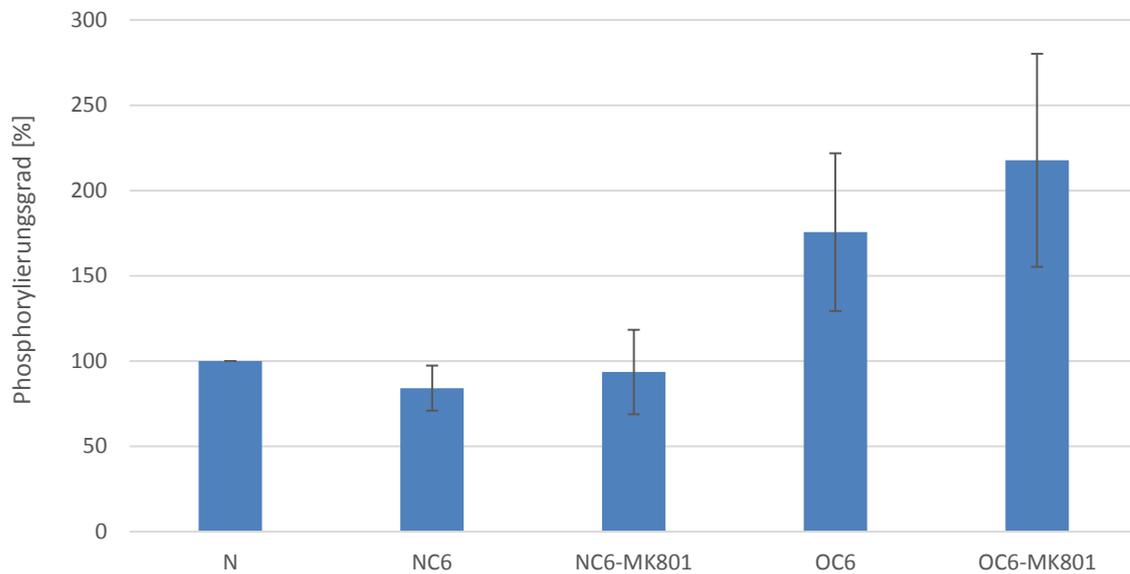


Diagramm 3-44 Western Blot, Auswirkungen von MK801 $100\mu\text{M}$ während OGD und C6-konditionierten Medium auf den Phosphorylierungsgrad von ERK nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; $n=6$; $40000\text{ Zellen}/\text{cm}^2$; dargestellt sind die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$.

Die Blockersubstanz MK801 bewirkte mit einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ keine signifikante Variation des Phosphorylierungsgrades. Bei der Behandlung mit OGD sowie C6-konditioniertem Medium ließ sich aber eine Tendenz zu einem erhöhten Phosphorylierungsgrad erkennen.

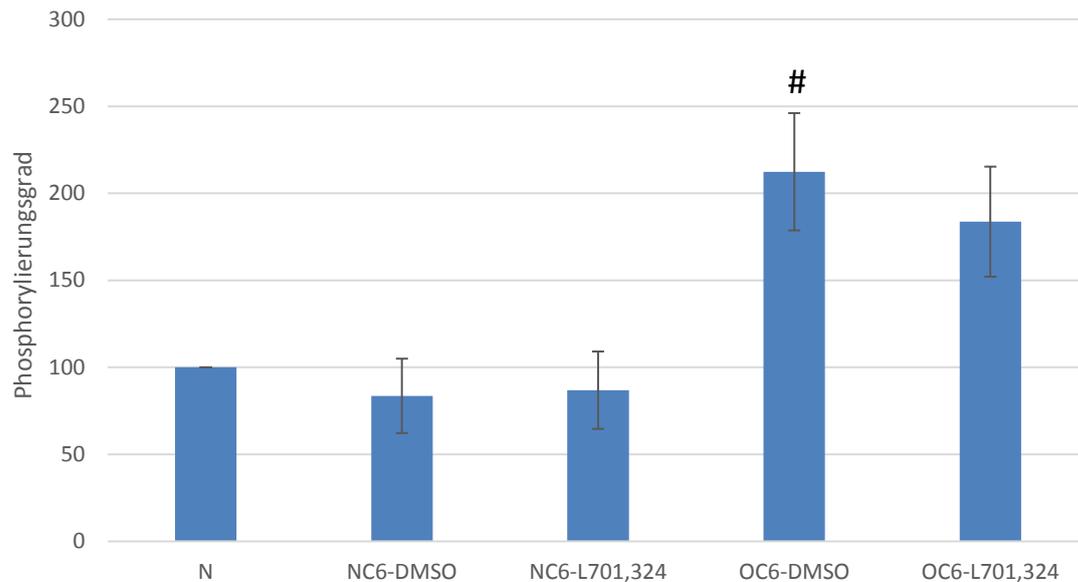


Diagramm 3-45 Western Blot, Auswirkungen von L701,324 10µM während OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von ERK nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=6; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Tukey Test) dargestellt mit # im Vergleich zu NC6 DMSO.

Bei der Verwendung von L701,324 mit einer Konzentration von 10µM konnte, wie schon oben bei 100µM MK801, kein Unterschied im Phosphorylierungsgrad von ERK bei Normoxie festgestellt werden. Eine Tendenz war bei der OC6-Bedingung jedoch ebenfalls zu sehen, jedoch gerade entgegengesetzt als bei MK801. Es zeigte sich eine Abnahme der Phosphorylierung von 212,42% ± 33,69% bei der OC6-Kontrolle mit DMSO auf 183,72% ± 31,64% bei der Zugabe von 10µM L701,324-Lösung.

3.5.1.2 Western Blot pERK/ERK nach 24h

Den Versuchen über 24h folgte nach der vierstündigen OGD-Phase eine 20-stündige Reoxygenierungsphase unter Normoxie-Bedingungen mit den Blockersubstanzen, was einem klinischen Therapieansatz entsprechen soll.

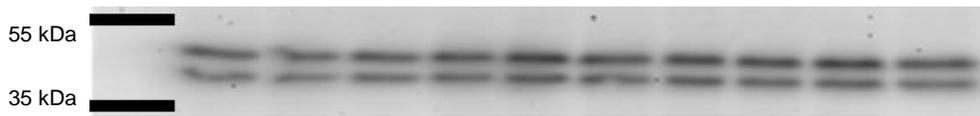


Abbildung 3-5 Western Blot: pERK nach 24h Behandlung

N OGD NC6 OC6 OC6 + MK801 NC6 + MK801 NC6 + DMSO OC6 + DMSO OC6 + L701,324 NC6 + L701,324

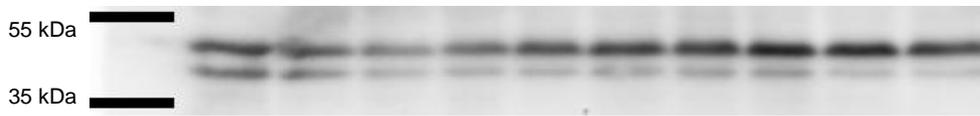


Abbildung 3-6 Western Blot: ERK nach 24h Behandlung

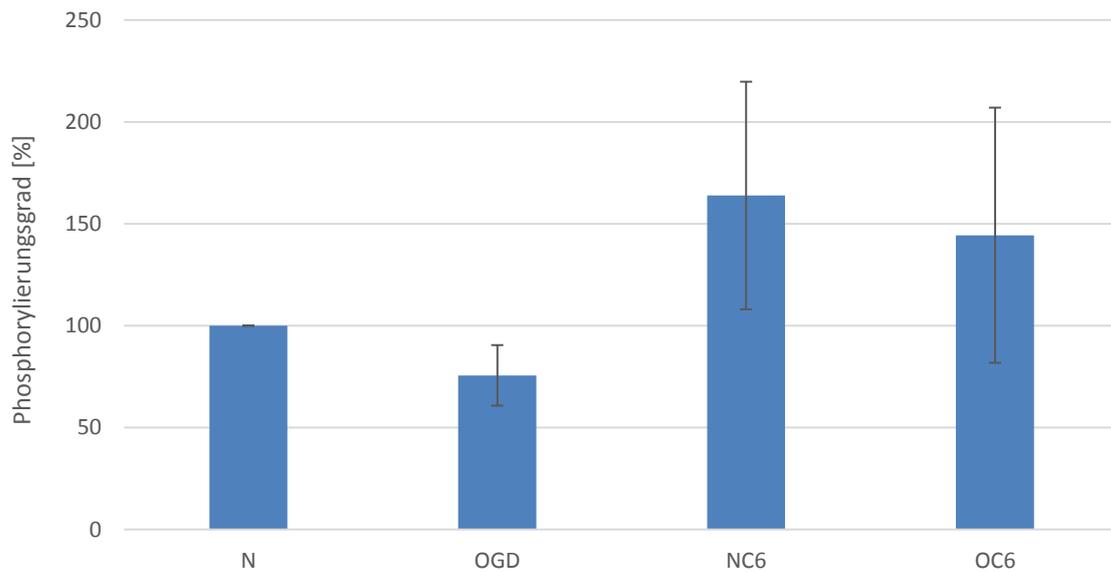


Diagramm 3-46 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von ERK nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Die Analyse der Proben nach 24 Stunden zeigte einen spiegelbildähnlichen Verlauf im Vergleich zu den vierstündigen Proben. Wiederum konnte keine Signifikanz berichtet werden. Jedoch waren die Tendenzen auch hier zu sehen. So bewirkte die OGD und das C6-konditionierte Medium genau das Gegenteil als bei den vierstündigen Proben. Die Verwendung von C6-konditioniertem Medium bewirkte einen höheren Phosphorylierungsgrad auf $163,89\% \pm 55,84\%$ bei der Normoxie-C6-Behandlung und die OGD-Therapie eine Abnahme der Phosphorylierung auf $75,62\% \pm 14,86\%$.

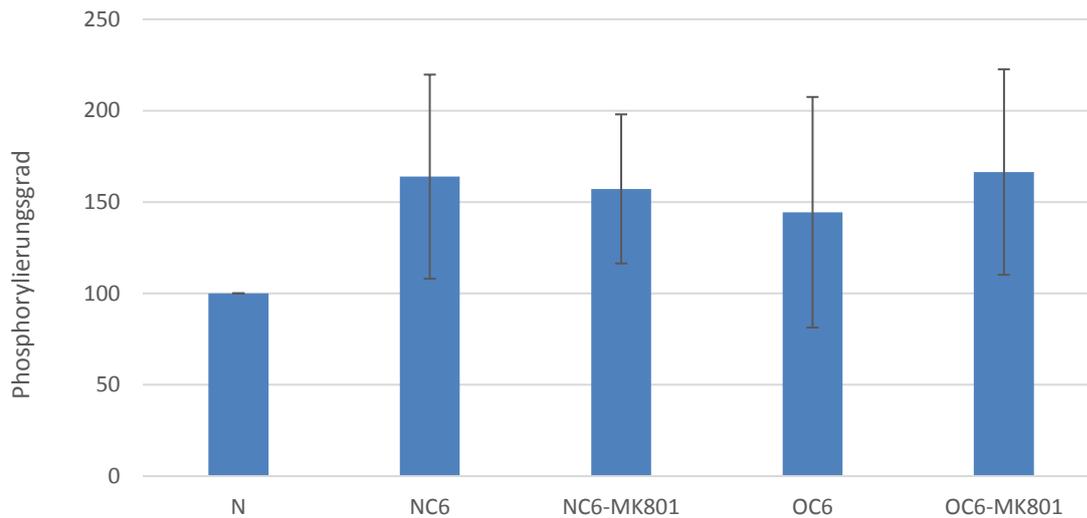


Diagramm 3-47 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von ERK nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit 100µM MK801; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Die Therapie mit 100µM MK801 während der Reoxygenierungsphase zeigte quasi keine Effekte.

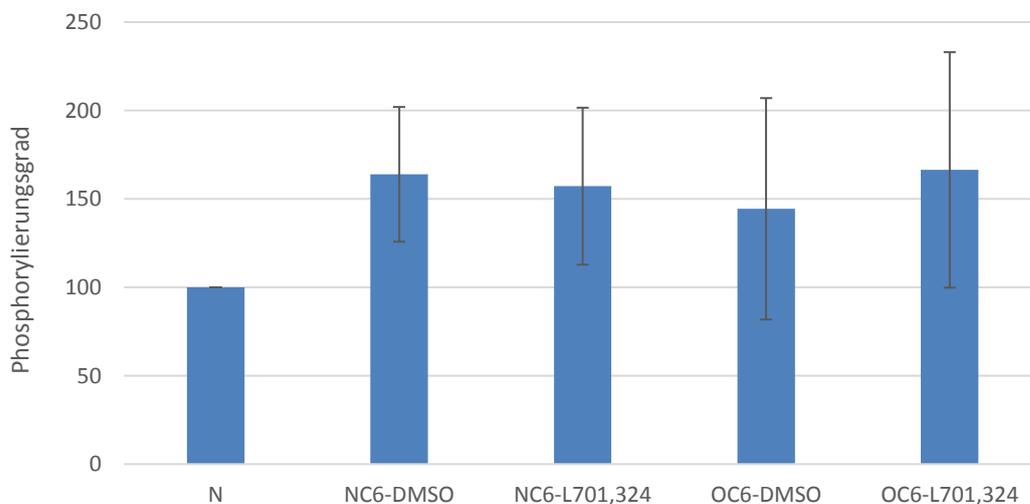


Diagramm 3-48 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von ERK nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit 10µM L701,324; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Auch die Therapie mit 10µM L701,324 hatte weder während der Normoxie noch während der OGD bei der Verwendung von C6-konitioniertem Medium Auswirkungen auf den Phosphorylierungsgrad von ERK.

3.5.2 Western Blot pAkt/Akt

Die Serin/ Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) besteht aus drei Isoformen Akt1/2/3 und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Sie ist an der Regulation von Apoptose, weiteren Zellzyklusvorgängen und auch der Steuerung von Migration beteiligt.

3.5.2.1 Western Blot pAkt/Akt nach 4h



Abbildung 3-7 Western Blot: pAkt nach 4h Behandlung

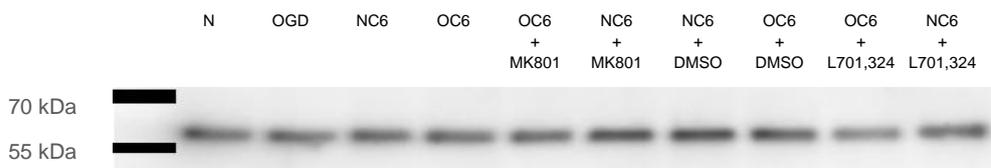


Abbildung 3-8 Western Blot: Akt nach 4h Behandlung

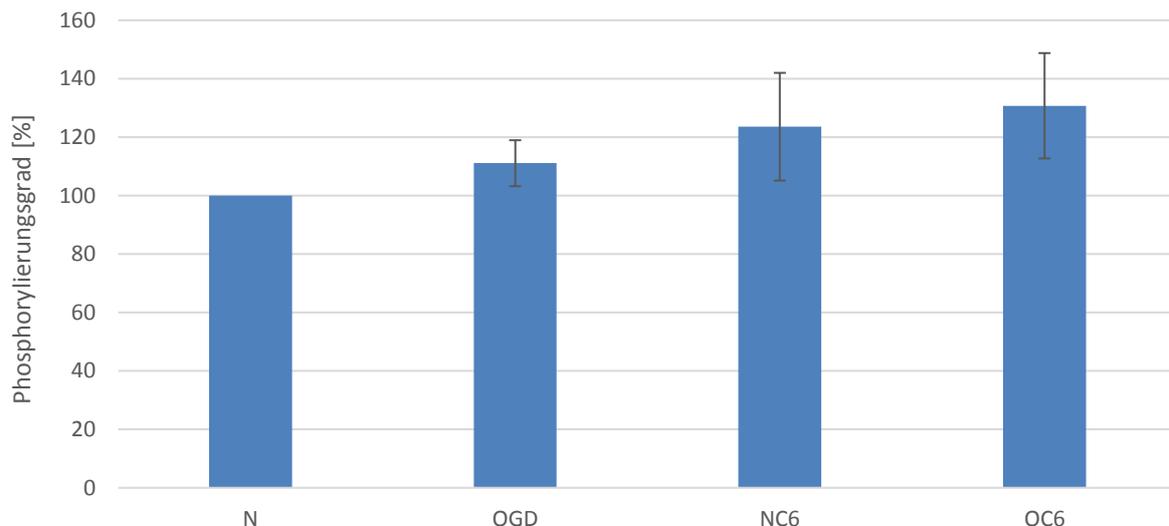


Diagramm 3-49 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von Akt nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Bei den 4-h-Proben mit dem Zielprotein Akt beziehungsweise dessen Phosphorylierungsgrad konnten nur leichte Tendenzen gesehen werden. So steigerte die OGD, wie die Verwendung von C6-konditioniertem Medium, die Phosphorylierung des Proteins. So konnte bei Vorliegen beider Bedingungen, also bei den OC6-Proben, der Phosphorylierungsgrad von Akt bis auf 130,76% ± 18,03% steigen.

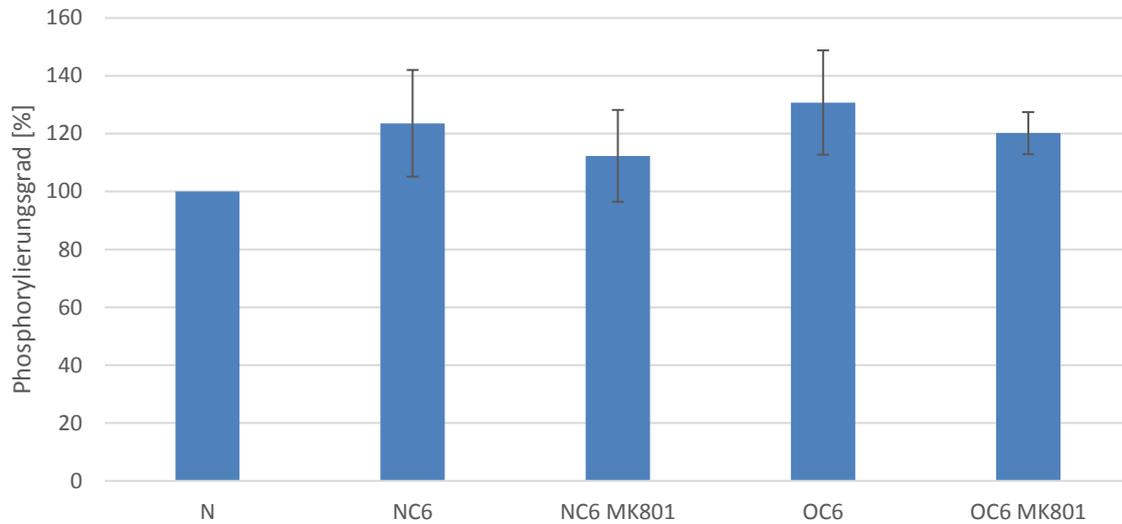


Diagramm 3-50 Western Blot, Auswirkungen von MK 801 100µM während OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von Akt nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Die Blockersubstanz MK801 hatte mit der Konzentration 100µM einen senkenden Effekt auf den Phosphorylierungsgrad von Akt. Während beiden Bedingungen wurde eine Senkung von etwa 10% erreicht. So wurde unter Normoxie und C6-konditioniertem Medium mit 100 µM MK 801 eine Senkung von 123,59% ± 18,43% ohne Blocker auf 112,33% ± 15,87% mit Blocker erreicht. Unter OGD Bedingungen fand eine Absenkung des Grades an Phosphorylierung von 130,76% ± 18,03% ohne Blocker auf 120,18% ± 7,19% mit Blocker statt.

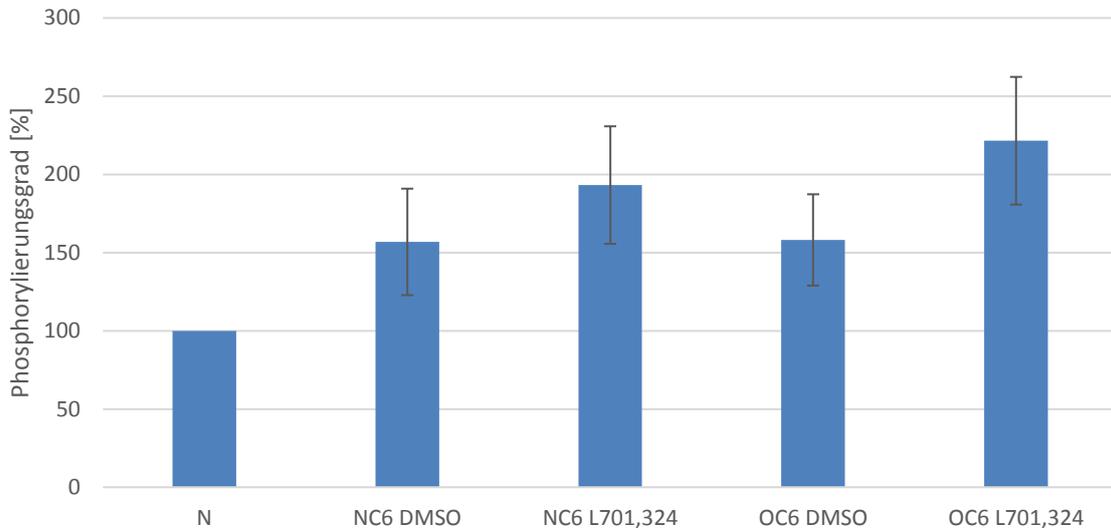


Diagramm 3-51 Western Blot, Auswirkungen von L701,324 während OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von Akt nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Der Glycin-Antagonist L701,324 mit der Konzentration 10µM förderte unter Normoxie-Bedingungen wie unter OGD die Phosphorylierung von Akt. Die Steigerung mit C6 konditioniertem Medium unter Normoxie von 156,82% ± 34,04% ohne Blocker auf 193,16% ± 37,57% mit Blocker fiel schwächer aus, als unter OGD-Bedingungen, während derer eine Steigerung der Phosphorylierung von 158,10% ± 29,17% ohne Blocker auf 221,49% ± 40,82% mit Blocker zu verzeichnen war.

3.5.2.2 Western Blot pAkt/Akt nach 24h



Abbildung 3-9 Western Blot: pAkt nach 24h Behandlung

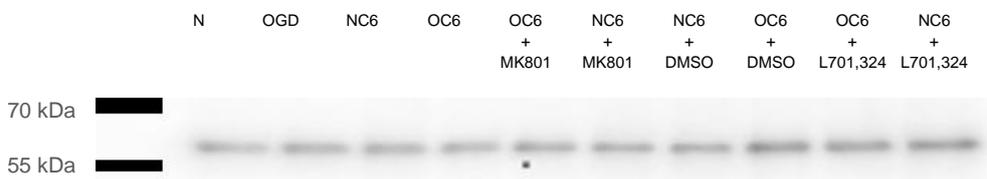


Abbildung 3-10 Western Blot: Akt nach 24h Behandlung

Für die Kinase Akt wurden ebenfalls Proben, welchen nach der vierstündigen OGD-Behandlung eine 20-stündige Reoxygenierungsphase folgte, analysiert.

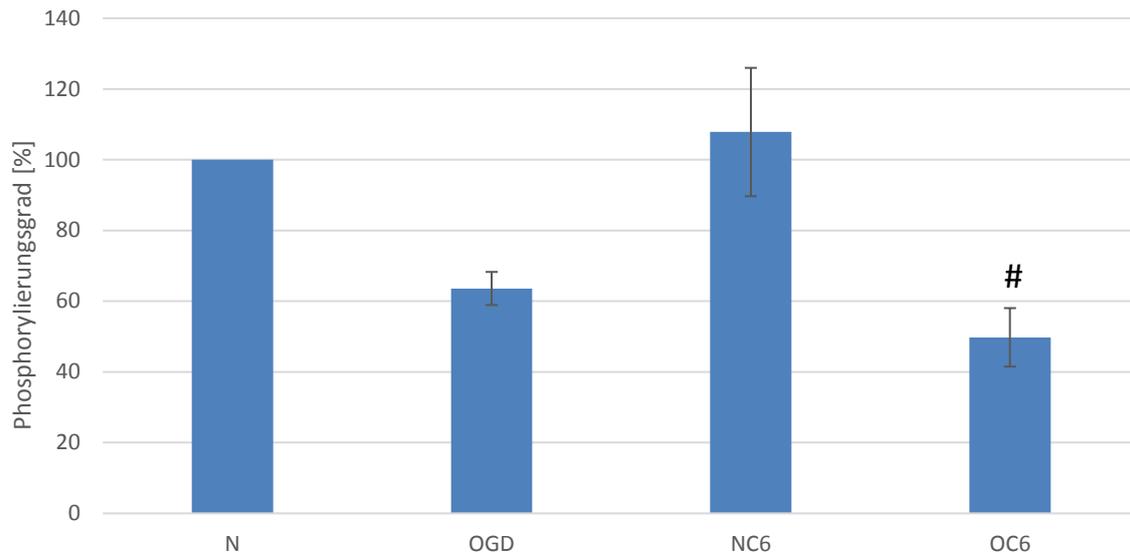


Diagramm 3-52 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von Akt nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz ($p < 0,05$, one-way ANOVA, mehrfacher Vergleichstest: Holm-Sidak) dargestellt mit # im Vergleich zur Normoxie-C6-Kontrolle (NC6).

Die 24h-Proben zeigten deutlichere Ergebnisse als die 4h Proben. So verminderte die OGD-Therapie den Phosphorylierungsgrad um knapp 40% von 100% bei der Normoxie-Kontrolle auf $63,59\% \pm 4,68\%$ (nicht signifikant). Bei gleichzeitiger Verwendung von C6-konditioniertem Medium war der Effekt der Blockierung der Phosphorylierung von $107,83\% \pm 18,14\%$ bei den NC6-Proben auf $49,78\% \pm 8,27\%$ bei den OC6-Proben mit über 50% noch stärker und nun statistisch signifikant.

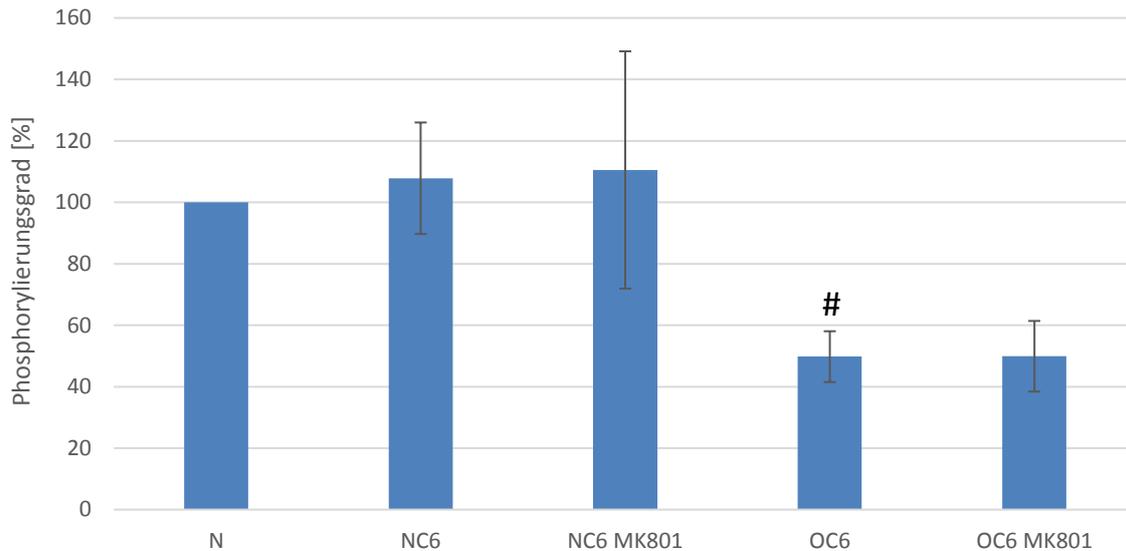


Diagramm 3-53 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von Akt nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit 100µM MK801; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM; statistische Signifikanz (p<0,05, Kruskal Wallis ANOVA on ranks, post-hoc: Tukey Test) dargestellt mit # im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle (N).

Die Blockersubstanz MK801 hatte keinerlei Effekte auf den Phosphorylierungsgrad von Akt bei der Anwendung in der 20-stündigen Reoxygenierungsphase. Die Effekte der OGD wurden bei Diagramm 3-52 erläutert.

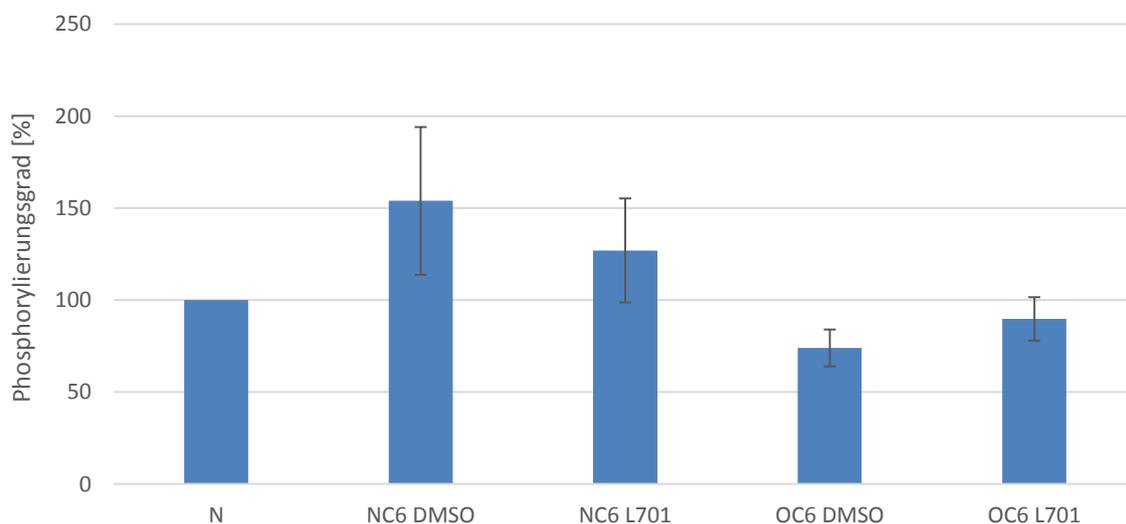


Diagramm 3-54 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf den Phosphorylierungsgrad von Akt nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit 10µM L701,324; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Der Effekt des C6-konditionierten Mediums wurde bei der Verwendung des Lösungsmittels DMSO verstärkt auf 153,91% ± 40,16%. L701,324 konnte die

Phosphorylierung von Akt auf $126,95\% \pm 28,30\%$ blockieren. Die OGD-Behandlung inhibierte ebenfalls die Phosphorylierung auf $73,93\% \pm 10,04\%$ unter OC6+DMSO-Bedingungen. Unter diesen OC6-Bedingungen förderte nun aber L701,324 die Phosphorylierung von Akt auf $89,72\% \pm 11,84\%$.

3.5.3 Western Blot Occludin

Occludin ist ein Markerprotein für Occludenskontakte. Daher wurde es auch in dieser Arbeit untersucht, da die Occludenskontakte, wie eingangs erwähnt, die Dichtigkeit der Blut-Hirn Schranke bestimmen. Die Schaubilder zeigen den Quotienten aus Occludin und β -Actin.

3.5.3.1 Western Blot Occludin nach 4h

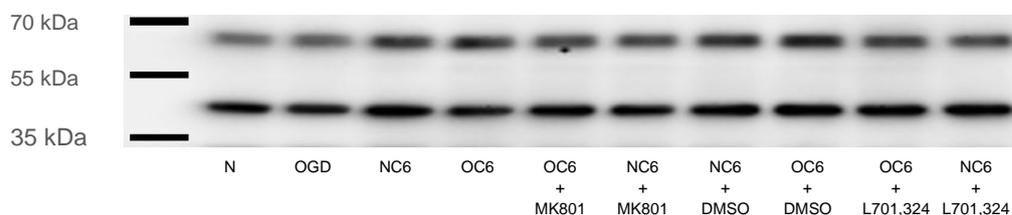


Abbildung 3-11 Western Blot: Occludin (65kDa) und β -actin (42kDa) nach 4h Behandlung

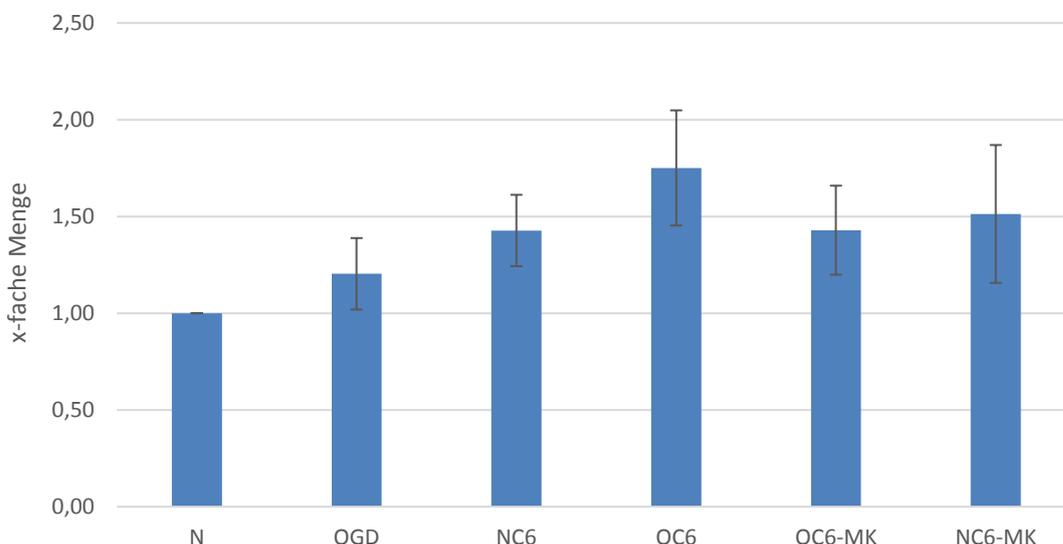


Diagramm 3-55 Western Blot, Auswirkungen von MK 801 $100\mu\text{M}$ während OGD und C6-konditioniertem Medium auf Occludin nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/ cm^2 ; dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Sowohl die OGD-Bedingung als auch das C6-konditionierte Medium bewirkten einen Anstieg der Proteinmenge an Occludin. So zeigte sich unter der OC6-Bedingung ein Anstieg der Occludinmenge im Vergleich zur Normoxie auf bis zu $1,75\text{-fach} \pm 0,30$

(nicht signifikant). Der Blocker MK801 bewirkte unter OC6-Bedingungen eine Abnahme auf das Niveau der NC6-Proben von 1,43-fach im Vergleich zur Normoxie. Unter NC6-Bedingungen zeigte MK801 keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Occludin.

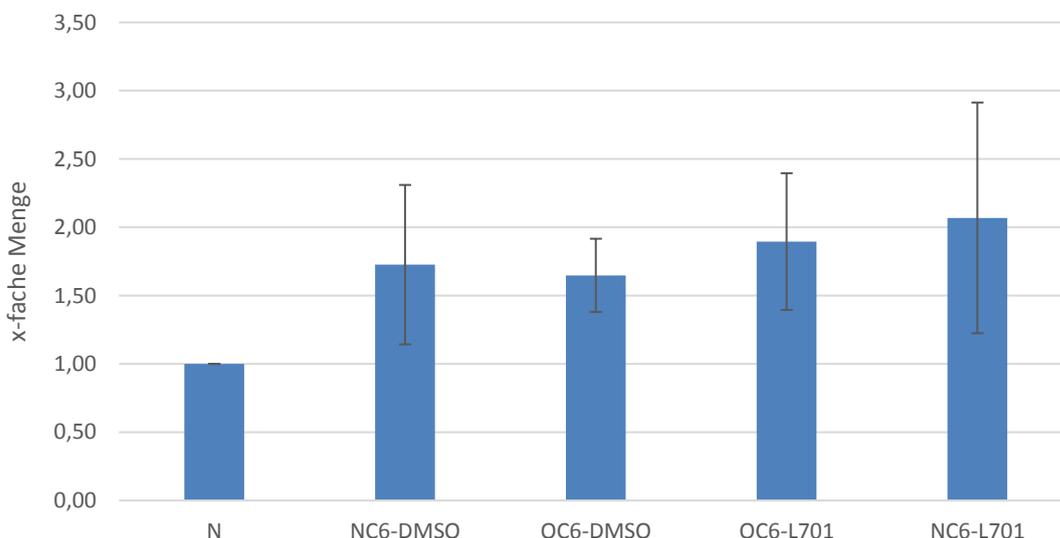


Diagramm 3-56 Western Blot, Auswirkungen von L701,324 10µM während OGD und C6-konditioniertem Medium auf Occludin nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Bei der Verwendung von DMSO und dem Blocker L701,324 zeigten sich, bis auf die Zunahme der Occludin Proteinmenge um das 1,73 fache ± 0,58 bei der Verwendung von C6-konditioniertem Medium, keine Effekte.

3.5.3.2 Western Blot Occludin nach 24h

Für Occludin wurden ebenfalls Analysen nach einer 20-stündigen Reoxygenierungsphase durchgeführt, nachdem die Zellen zuvor vier Stunden der OGD ausgesetzt waren.

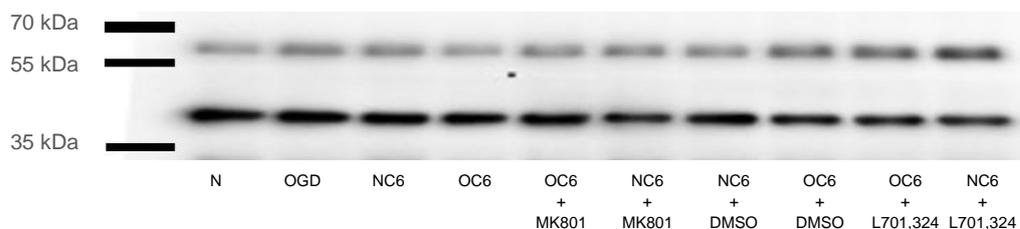


Abbildung 3-12 Western Blot: Occludin (65kDa) und β-actin (42kDa) nach 4h OGD und 20h Reoxygenierung mit Blocker

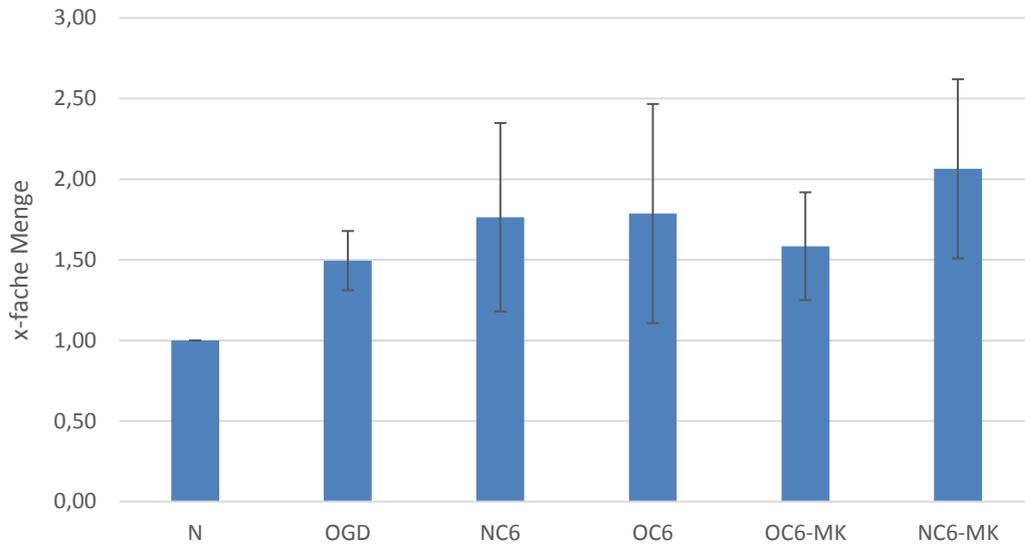


Diagramm 3-57 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf Occludin nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit MK 801 100µM; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Wie bei den 4h-Proben wurde auch bei den 24h Proben durch die OGD-Bedingung und das C6-konditionierte eine Zunahme der Occludinproteinmenge beobachtet (nicht signifikant). Ein Effekt des Blockers MK801 konnte vermutet werden. So bewirkte dieser eine Zunahme der Occludinproteinmenge unter Normoxie-Bedingungen von 1,76-fach ± 0,58 auf 2,06-fach ± 0,56.

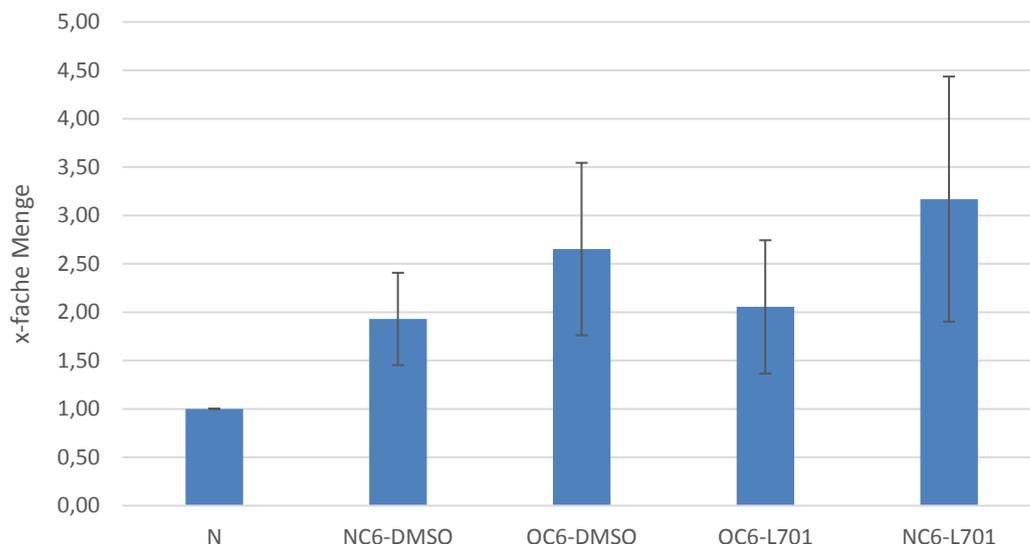


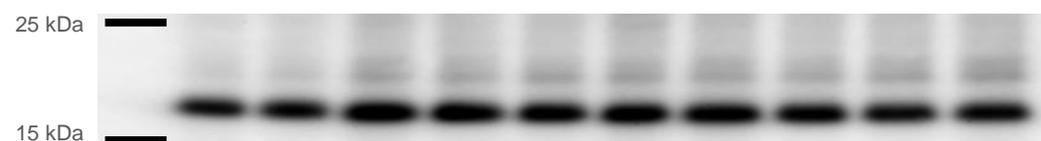
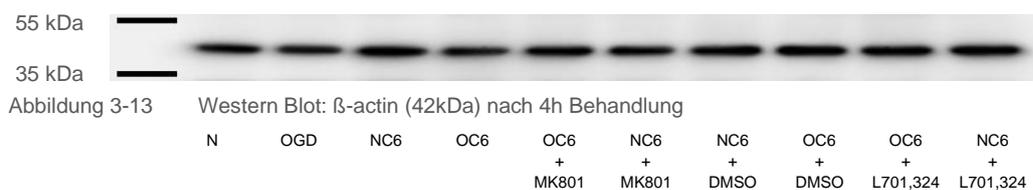
Diagramm 3-58 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf Occludin nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit L701,324 10µM; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Bei der Anwendung des Lösungsmittels DMSO zeigte sich eine Steigerung der Proteinmenge durch das C6-konditionierte Medium auf 1,93-fach \pm 0,48 und eine weitere Steigerung durch die OGD-Bedingung auf 2,65-fach \pm 0,89. Der Blocker L701,324 hatte während den unterschiedlichen Bedingungen spiegelbildähnliche Effekte. So bewirkte dieser unter OC6-Bedingungen eine Abnahme der Occludinproteinmenge auf 2,05-fach \pm 0,69 und eine Steigerung der Proteinmenge unter NC6-Bedingungen auf 3,17-fach \pm 1,27.

3.5.4 Western Blot Claudin-5

Die Familie der Claudine ist ebenfalls Bestandteil der Struktur der Blut-Hirn Schranke. Daher wurde auch in dieser Arbeit ein Teil dieser Familie, das Claudin-5, nachgewiesen und eine Beeinflussung dieses untersucht. Zunächst werden, wie bei den anderen Zielproteinen, die 4h Proben dargestellt, welchen dann die Auswertung der 24h-Proben folgt.

3.5.4.1 Western Blot Claudin-5 nach 4h



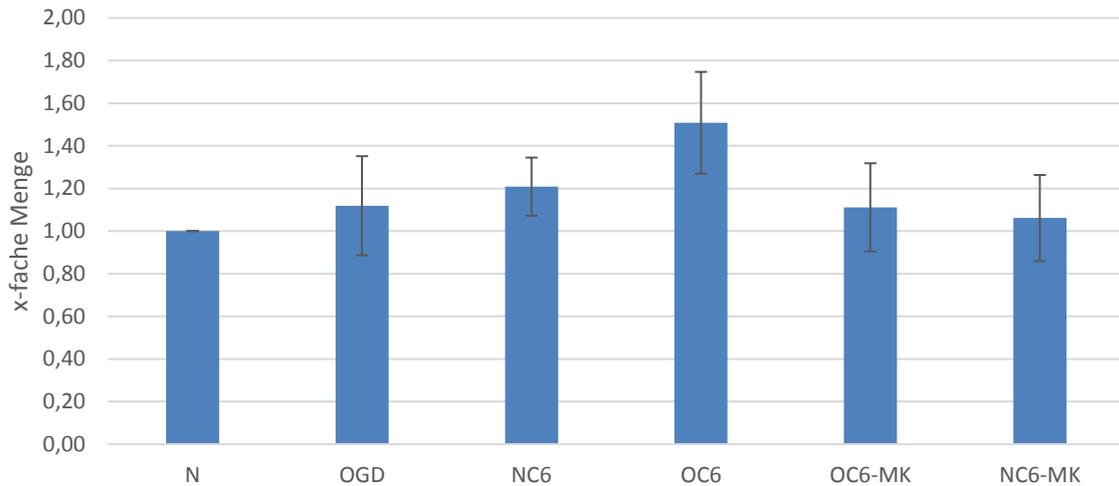


Diagramm 3-59 Western Blot, Auswirkungen von MK801 100µM während OGD und C6-konditioniertem Medium auf Claudin-5 nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Auch bei Claudin-5 konnte, wie bei Occludin nachzuweisen war, durch die OGD-Behandlung sowie das C6-konditionierte Medium die Proteinmenge gesteigert werden. So war unter der OC6-Bedingung die 1,51-fache ± 0,24 Proteinmenge nachzuweisen. 100µM MK 801 als Blocker bewirkte eine Absenkung der Proteinmenge auf 1,11-fach ± 0,21, was ungefähr das Niveau bei NC6 (1,21-fach ± 0,14) entsprach. Auch während der Normoxie verringerte MK801 die Proteinmenge auf 1,06-fach ± 0,20.

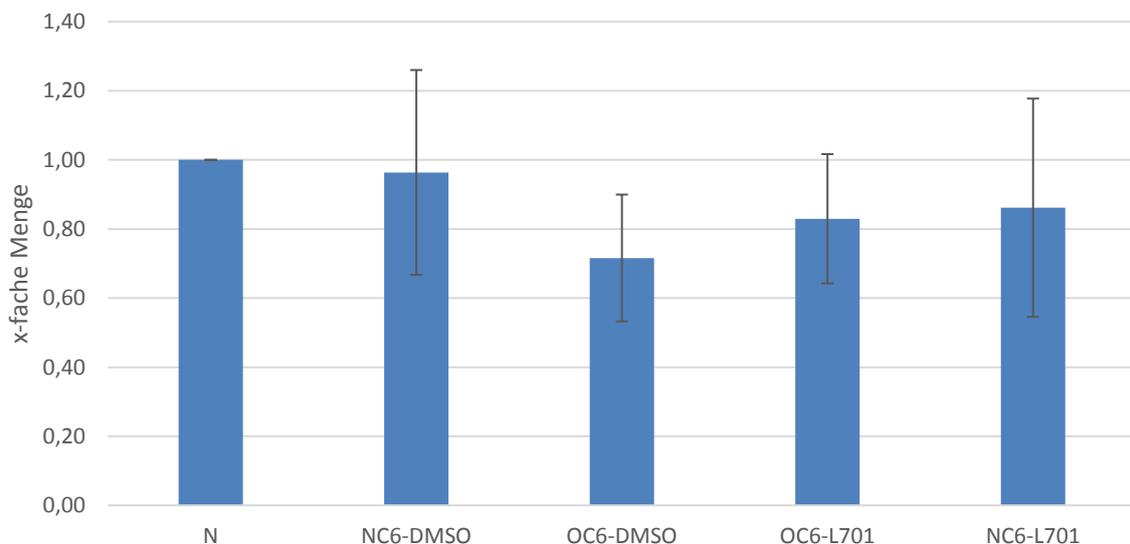


Diagramm 3-60 Western Blot, Auswirkungen von L701,324 10µM während OGD und C6-konditioniertem Medium auf Claudin-5 nach 4h Behandlung; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Bei der Anwendung von DMSO und der Blockersubstanz L701,324 ließen sich keine Effekte nachweisen, bis auf eine Reduzierung der Claudin-5-Proteinmenge durch die OC6-Behandlung auf 0,72-fach \pm 0,18. Diese Abnahme der Proteinmenge stand im Gegensatz zu der Zunahme unter OC6-Behandlung ohne DMSO.

3.5.4.2 Western Blot Claudin-5 nach 24h

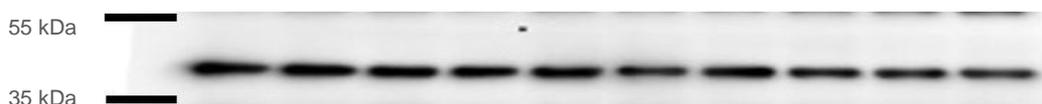


Abbildung 3-15 Western Blot: β -actin (42kDa) nach 4h OGD und 20h Reoxygenierung mit Blocker
 N OGD NC6 OC6 OC6 + MK801 NC6 + MK801 NC6 + DMSO OC6 + DMSO OC6 + L701,324 NC6 + L701,324

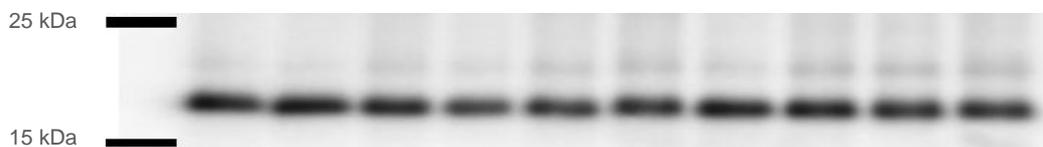


Abbildung 3-16 Western Blot: Claudin-5 (ca.25kDa) nach 4h OGD und 20h Reoxygenierung mit Blocker

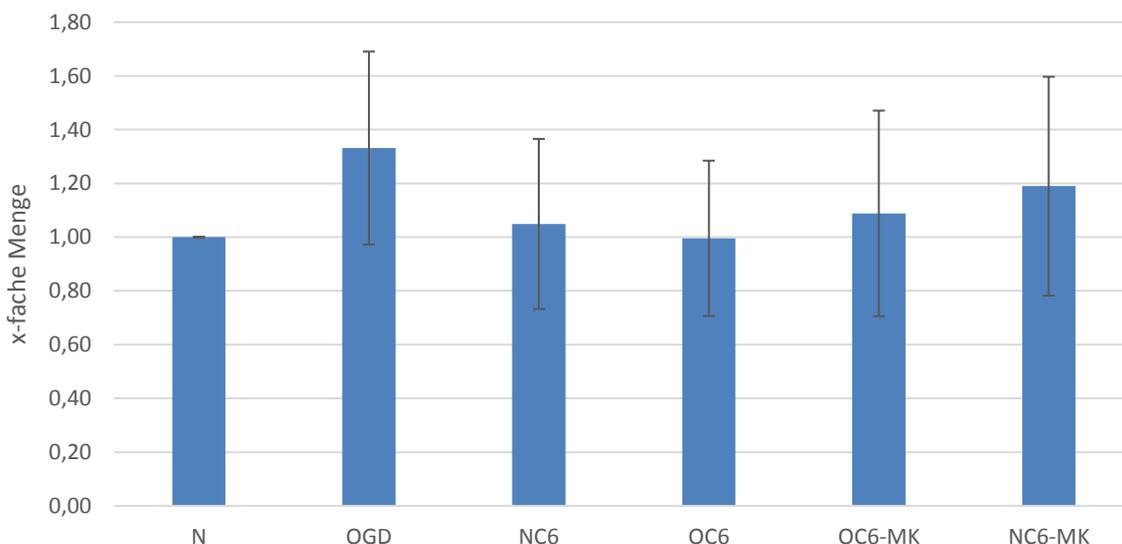


Diagramm 3-61 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf Claudin 5 nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit MK 801 100 μ M; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Für den Blocker MK801 ließen sich bei der Analyse der Proben mit vierstündiger OGD-Behandlung und anschließender 20-stündiger Reoxygenierungsphase keine Effekte nachweisen. Lediglich die reine OGD-Behandlung zeigte eine leichte Erhöhung der Proteinmenge von Claudin-5 um das 1,33-fache \pm 0,36.

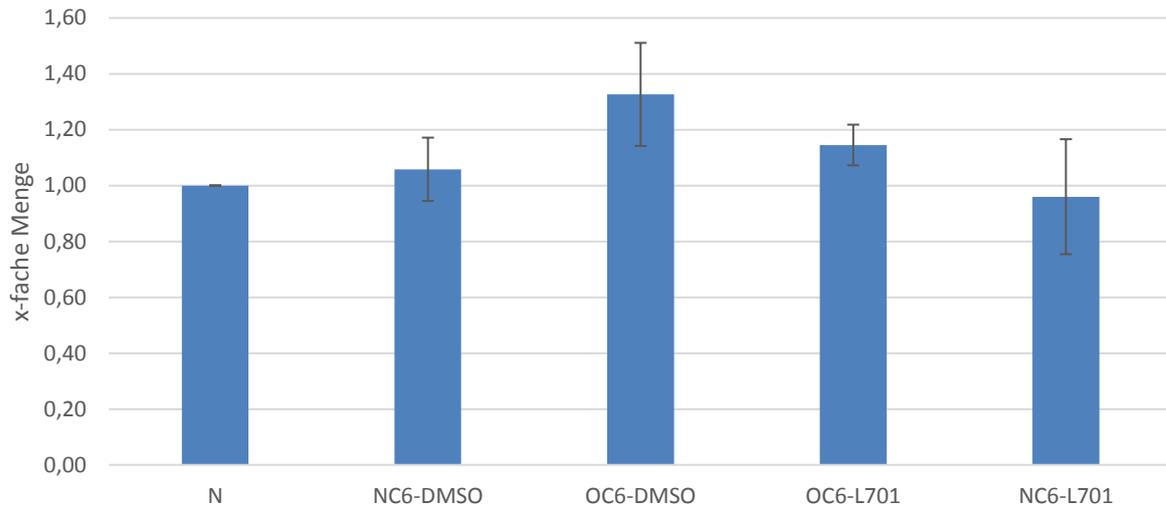


Diagramm 3-62 Western Blot, Auswirkungen von OGD und C6-konditioniertem Medium auf Claudin 5 nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit L701,324 10 μ M; Verwendung von C6-konditioniertem Medium den ganzen Versuch über; n=4; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

L701,324 konnte ebenfalls nicht wesentlich die Proteinmenge beeinflussen. Einzig die OC6-Behandlung steigerte die Proteinmenge von Claudin-5 um das 1,33-fache \pm 0,07.

3.6 Einfluss von Ischämie und NMDA-Rezeptor-Inhibitoren auf die Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität

Die Matrix-Metalloproteinasen(MMP)-Aktivitätstests wurden mit abzentrifugierten Medienüberständen durchgeführt. Dabei wurden spezielle Zentrifugenröhrchen benutzt, welche eine Filtermembran (10kDa) eingebaut haben. So konnten die MMPs zur besseren Analyse konzentriert werden.

3.6.1 Matrix-Metalloproteinasen-Aktivitätstest nach 4h

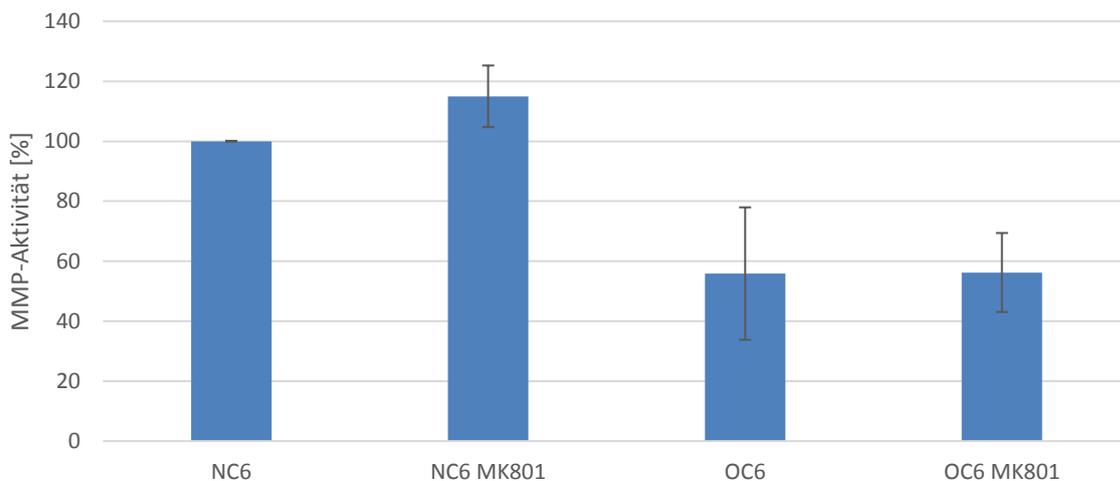


Diagramm 3-63 MMP-Aktivitätstest, Auswertung der Mediumüberstände nach 4h OGD-Phase und C6-konditioniertem Medium + MK801 100µM; n=3; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ±SEM.

Die Auswertung der 4h-Proben zeigte eine fast 50%ige Aktivitätsabnahme der MMPs unter OGD sowie Verwendung von C6-konditioniertem Medium auf 55,89% ± 22,08%. Die Behandlung mit dem NMDAR-Blocker MK 801 mit einer Konzentration von 100µM zeigte unter NC6-Bedingungen eine Aktivitätszunahme der MMPs auf 115,01% ± 10,27%. Die Anwendung des Blockers während OC6-Bedingungen zeigte keine Effekte (56,24% ± 13,17%).

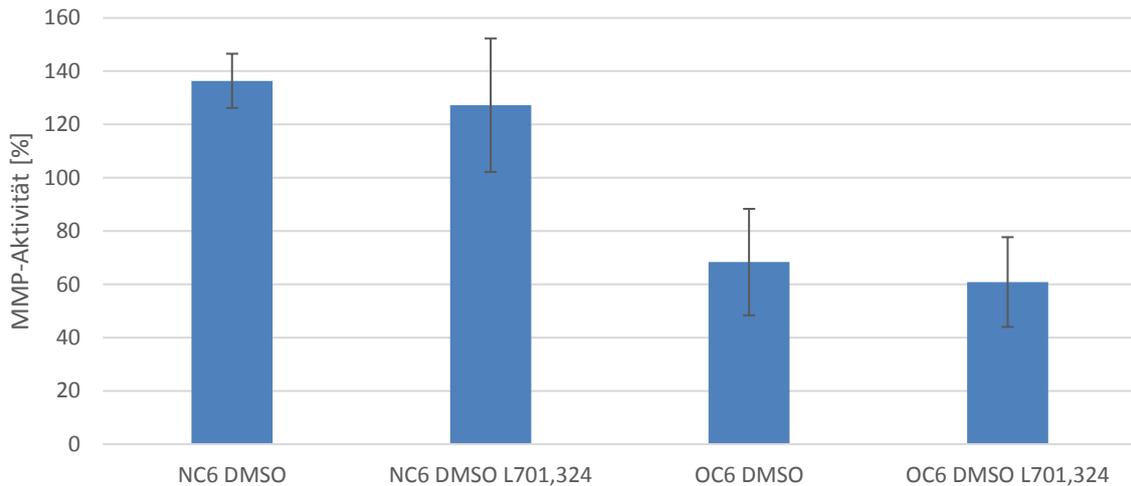


Diagramm 3-64 MMP-Aktivitätstest, Auswertung der Mediumüberstände nach 4h OGD-Phase und C6-konditioniertem Medium + L701,324 10 μ M; n=3; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; 100% entspricht NC6 nach 4h.

Die Behandlung mit L701,324 mit einer Konzentration von 10 μ M zeigte keine Effekte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Effekte der OC6-Behandlung zeigten sich auch bei Verwendung von DMSO und wurden in der Beschreibung des Diagramms 3-63 erwähnt. Auch hier konnte eine signifikante Reduzierung der MMP-Aktivität in der Behandlungsgruppe mit dem NMDAR-Blocker, hier nun L701,324 bei der zusätzlichen Anwendung von ischämischen Bedingungen beobachtet werden. So reduzierte sich die Aktivität von 127,21% \pm 25,05% bei der Normoxie-C6 L701,324 Behandlung auf 60,86% \pm 16,84% bei dem zusätzlichen Aussetzen der Zellen der Ischämie. Interessanterweise nimmt durch die alleinige Behandlung der Zellen mit DMSO die MMP-Aktivität im Vergleich zur NC6-Kontrolle signifikant auf 136,38% \pm 10,17% zu.

3.6.2 Matrix-Metalloproteinasen-Aktivitätstest nach 24h

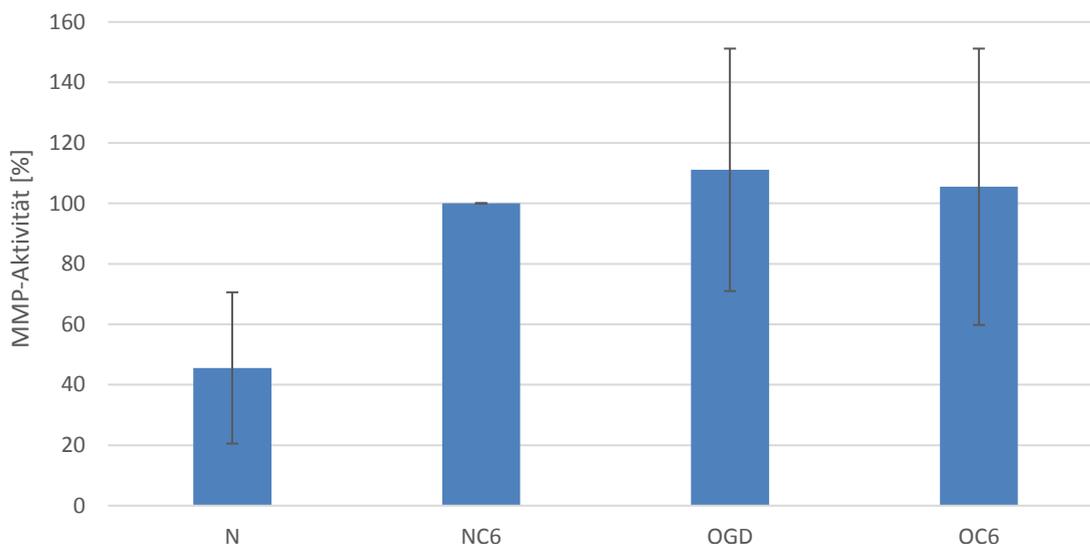


Diagramm 3-65 MMP-Aktivitätstest, Auswertung der Mediumüberstände nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase; n=2; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Die Analyse der Mediumüberstände nach 24h, welche sich in eine vierstündige OGD-Behandlung und einer anschließenden 20-stündigen Reoxygenierungsphase mit dem jeweiligen Blocker gliederte, zeigte eine deutliche Aktivitätssteigerung durch das C6-konditionierte Medium um mehr als 50%. Die Behandlung mit reiner OGD hatte ähnliche Effekt. So kann von einer Zunahme von 45,56% ± 25,02% unter Normoxie auf 111,09% ± 40,11% unter zusätzlicher Ischämie berichtet werden. Die Verwendung von C6-konditioniertem Medium während der OGD zeigte keine weitere Beeinflussung der MMP-Aktivität.

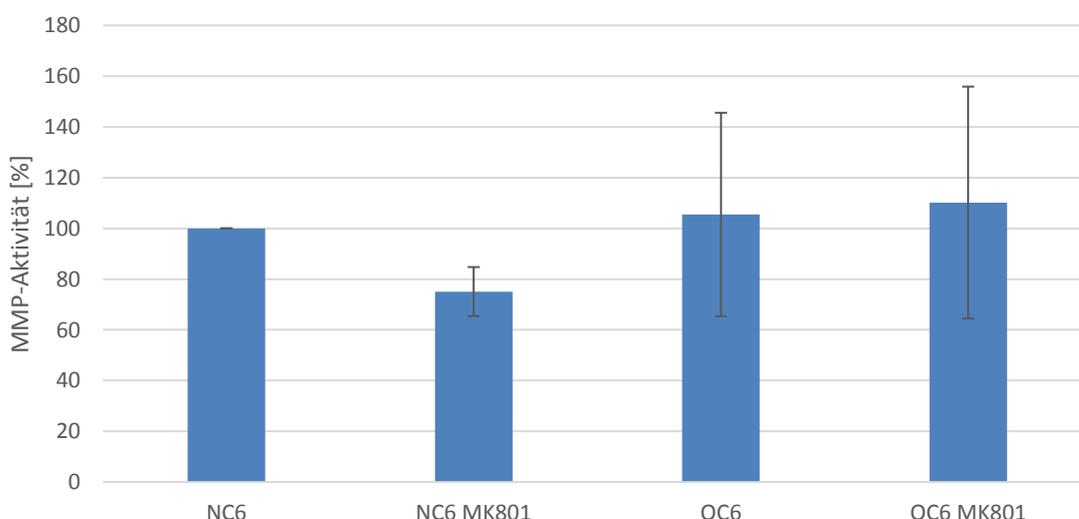


Diagramm 3-66 MMP-Aktivitätstest, Auswertung der Mediumüberstände nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit MK801 100µM; n=2; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Der NMDAR-Antagonist MK801 mit einer Konzentration von 100µM bewirkte eine Abnahme der MMP-Aktivität auf 75,09% ± 9,67%. Bei der OC6-Behandlung zeigte sich keine Aktivitätsbeeinflussung durch MK801.

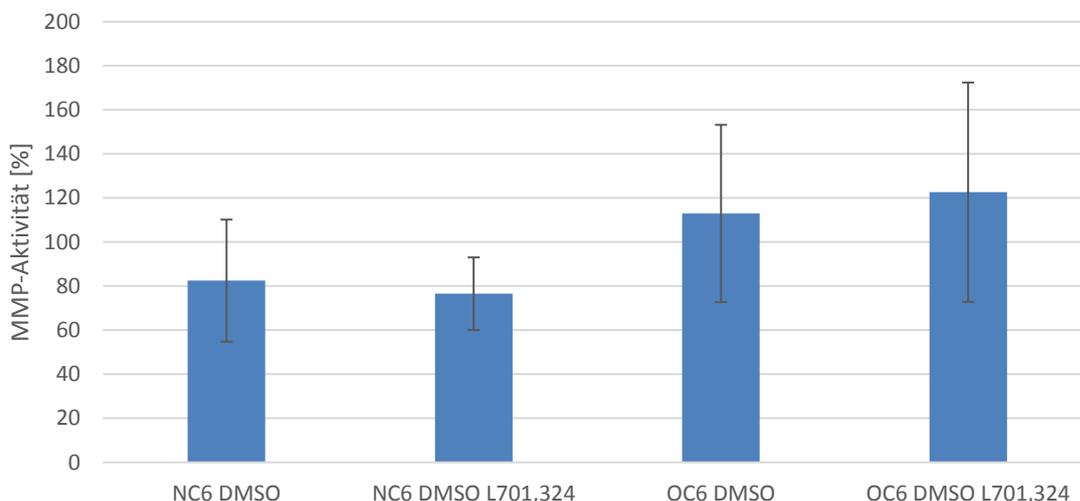


Diagramm 3-67 MMP-Aktivitätstest, Auswertung der Mediumüberstände nach 4h OGD-Phase und 20h Reoxygenierungsphase mit L701,324 10µM; n=2; 40000 Zellen/cm²; dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; 100% entspricht NC6 nach 24h.

Bei der Verwendung von DMSO zeigte sich eine Zunahme der MMP-Aktivität durch die OGD-Behandlung von 82,46% ± 27,72% bei NC6 auf 112,95% ± 40,24% bei OC6. Die Applikation von L701,324 mit einer Konzentration von 10µM während der Reoxygenierungsphase zeigte keine Effekte auf die Aktivität der MMPs.

4 Diskussion

Die Blut-Hirn Schranke hat eine essentielle Barrierefunktion in der Abschirmung des Gehirns vor äußeren Reizen, wie beispielsweise Neurotransmitter- und Elektrolytschwankungen oder auch vor Krankheitserregern. Durch die hohe Anzahl an Occludenskontakte ist die Blut-Hirn Schranke äußerst dicht für parazelluläre Transportvorgänge. Daher ist sie mit einer Reihe von Transportproteinen für endogene Substanzen sowie Xenobiotika ausgestattet und besitzt eine große Anzahl an Enzymen. All diese Eigenschaften tragen zum Schutz des Gehirns, wie dessen metabolischer Versorgung und Entgiftung, und schlussendlich zur Homöostase zwischen Blutkreislauf und zentralem Nervensystem bei.

Die Integrität der Blut-Hirn Schranke wird durch viele Krankheiten, wie beispielsweise Schlaganfall, Multiple Sklerose oder Schädel-Hirn-Trauma, gestört. Ob dieser Verlust der Schrankenfunktion ursächlich mit der Erkrankung einhergeht oder nur ein Symptom ist, wird gegenwärtig diskutiert. Im Fall des Schlaganfalls wird eher davon ausgegangen, dass die Öffnung der Blut-Hirn Schranke zur Ödembildung und somit zur Schadensentstehung beiträgt.

Die Lösung dieses Diskurs' ist von großem Interesse, da bei der aktuellen demografischen Entwicklung von einer deutlichen Zunahme an Schlaganfällen in den nächsten Jahrzehnten auszugehen ist. Foerch et al. geben für das Bundesland Hessen eine steigende Prävalenz an Schlaganfällen von 20.846 im Jahr 2005 um 68% auf 35.085 bis ins Jahr 2050 an (Foerch et al., 2008). In den Niederlanden prognostiziert Struijs et al. eine Zunahme der Inzidenz an Schlaganfällen in der Gesamtpopulation um 15% auf 250/100.000 Einwohner bis 2020. Die Prävalenz liegt dann im Jahre 2020 um 18% bei Männern und 40% bei Frauen höher als im Vergleich zum Jahr 2000 (Struijs et al., 2005). Der Anteil der Patienten mit schwerer neurologischer Beeinträchtigung bei der Entlassung wird nach Foerch et al. in gleichem Maße zunehmen. Daher ist die Etablierung einer adäquaten Therapie oder, noch besser, einer präventiven Therapie bei Risikopatienten von enormer medizinischer und sozioökonomischer Relevanz (Kolominsky-Rabas et al., 2006, DEGAM, 2012). Auf Grund der pathophysiologischen Komplexität der Vorgänge bei und nach einer Ischämie wird es nicht nur eine Therapieoption geben. Es müssen diverse Therapieansätze bedacht werden. Ein Ansatz ist dabei das Verhindern des

Zusammenbruchs der Blut-Hirn Schranke und im Falle einer bereits abgelaufenen Schädigung die Stabilisierung der BHS-Funktion (Alves, 2014).

Protektive Eigenschaften von NMDAR-Antagonisten

Vor einigen Jahren wurde durch Block et al. (Block & Schwarz, 1996) gezeigt, dass eine Behandlung von Ratten mit Memantin, einem NMDAR-Antagonist, die durch Ischämie induzierten morphologischen wie funktionellen Schäden vermindert werden konnten. Der wirkliche Mechanismus konnte zunächst nicht verstanden werden, da man bis ins Jahr 1998 davon ausging, dass NMDA-Rezeptoren im Gehirn nur an Neuronen (Bliss & Collingridge, 1993) vorkommen, bevor Krizbai (Krizbai et al., 1998) auch an Hirnendothelzellen von Ratten den NMDA-Rezeptor nachgewiesen hat.

Weitere Hinweise für die protektive Wirkung von NMDAR-Modulatoren zeigten Versuche mit Homocystein, welches als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten von Gefäßschäden wie Arteriosklerose und somit auch von Schlaganfällen gilt (Clarke et al., 1991, Chambers et al., 1998, Vermeer et al., 2002). Chen et al. konnten an aortalen Endothelzellen der Ratte bei Hyperhomocysteinämie die erhöhte Proliferation durch Homocystein unter der Behandlung mit MK801 signifikant verringern (Chen et al., 2005). Eine weitere Untersuchung an glatten Muskelzellen der Aorta von Ratten unter Behandlung mit MK801 bei Hyperhomocysteinämie zeigte eine Reduktion von MMP9, welches zur Degradierung der Extrazellulärmatrix fähig ist und von IL-1 β , ein Zytokin mit proinflammatorischer Wirkung (Qureshi et al., 2005). Eine erst vor kurzem veröffentlichte Studie von Beard et al. an der murinen Endothelzelllinie bEnd.3 stabilisierte unter der Behandlung mit Memantin die Blut-Hirn Schranke bei Hyperhomocysteinämie durch eine Wahrung der Occludenskontakte über eine Erhaltung von Claudin-5 (Beard et al., 2011).

Motilität im Blut-Hirn Schranken Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde an Hand der gut etablierten murinen cerebEND Zelllinie, der Frage nach der Beeinflussung von Hirnendothelzellen durch NMDAR-Antagonisten weiter nachgegangen. Dabei wurde im Speziellen die Motilität der Zellen untersucht, da es bisher keine Untersuchungen gibt, ob die Ischämie eine Änderung der Motilität bewirkt, beziehungsweise die Motilität einen Einfluss auf die

Heilung des durch die Ischämie entstandenen Schadens hat. Eine mögliche Reaktionskaskade gibt *Abbildung 4-1* wieder.

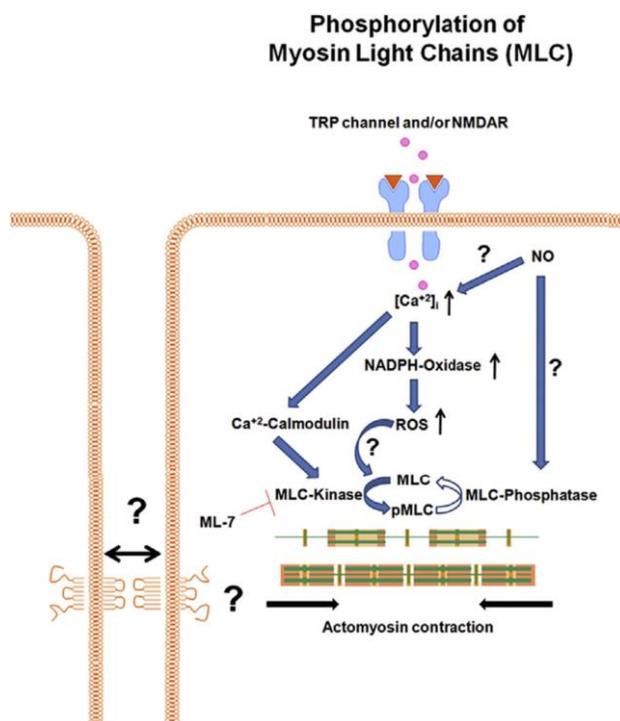


Abbildung 4-1 Möglicher Einfluss des NMDA-Rezeptors auf das Actin-Myosin-Zytoskelett (Thal & Neuhaus, 2014)

Es gibt Modelle zur Untersuchung und Beeinflussung der Motilität von Glia-gewebe auf pathologische Vorgänge wie Ischämie und der damit verbundenen Bildung von Narbengewebe (Jowers et al., 2013, Roy Choudhury et al., 2014), wobei Silver&Miller eine „Korrelation zwischen Größe der Narbe und der Stärke der BHS-Destabilisierung“ beschreiben. (Silver & Miller, 2004). Die Motilität der Hirnendothelzellen wurde bisher aber nicht wesentlich berücksichtigt. Kuhlmann et al. haben auf molekularer Ebene am Zellkultur-Modell durch Glutamat eine gesteigerte Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten gesehen, was eine Aktivierung der Zellkontraktur-Elemente bedeutet (Kuhlmann et al., 2008). Ob dies aber Effekte auf die Motilität der Zellen hat, wurde nicht untersucht. Die Motilität ist jedoch ein wichtiges Element im Rahmen der Wundheilung, dabei kommt es aber auch zur Auflösung von Zellkontakten, was wiederum eine Permeabilitätsstörung nach sich ziehen kann. Das Motilitätsmodell wurde zunächst etabliert und in der Folge durch Bestandteile der neurovaskulären Einheit erweitert. Im weiteren Verlauf folgten dann

molekularbiologische Untersuchungen, ob sich Regulationen in den motilitätsbeeinflussenden Faktoren, wie beispielsweise dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), nachweisen lassen. Die cerebEND-Zelllinie wurde bereits eingehend untersucht und etliche Rezeptoren und deren Regulation charakterisiert. So konnte durch unsere Arbeitsgruppe unter anderem die Glukosetransporter GLUT1 und sglT1, sowie der NMDA-Rezeptor nachgewiesen werden (Neuhaus et al., 2012a, Silwedel & Forster, 2006).

Ischämie führt zum BHS-Schaden und zur Beeinflussung der Motilität

Im *in-vitro* Modell der Ischämie werden die Zellen OGD-Bedingungen, also Sauerstoff- und Glukosemangel, ausgesetzt. Die Zellen werden dabei in glukosefreiem Medium bei Sauerstoffkonzentrationen zwischen null und einem Prozent kultiviert. Bereits nach einer dreistündigen OGD-Behandlung bei 0% Sauerstoff stellten Abbruscato und Davis eine Zunahme der Saccharose-Permeabilität von Rinderhirnendothelzellen (BBMEC) fest (Abbruscato & Davis, 1999). In unserer Arbeitsgruppe konnte nach vierstündiger OGD im Monokultur-Modell bei 1% Sauerstoff eine erhöhte Permeabilität für Fluoreszin, jedoch keine Veränderung des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER), welcher auch als Parameter für die Barrierefunktion gilt, aufgezeigt werden (Neuhaus et al., 2014). Zhu et al führten eine 24-stündige OGD-Behandlung mit 1% Sauerstoff von Mäusehirn-Endothelzellen durch, was eine signifikante Senkung des TEER und eine Erhöhung der Permeabilität für HRP, der Meerrettichperoxidase bewirkte (Zhu et al., 2012). Jedoch erscheint eine Behandlung über 24 Stunden recht lange. So haben Kleinschnitz et al. 2011 gezeigt, dass eine 16-stündige OGD Behandlung mit 1% Sauerstoff zu einer Schädigung von 66% der kultivierten Zellen bei der murinen Hirnendothel-Zelllinie cEND führt (Kleinschnitz et al., 2011). Und auch Engelhardt et al. konnten 2015 zeigen, dass es nach 24-stündiger OGD-Behandlung von Rattenhirnendothelzellen mit 0,2% sowie mit 1% Sauerstoff zu einem signifikanten Abfall der metabolischen Aktivität an der Endothelzelllinie RBE4 kommt, bemerkenswert ist jedoch die stabile beziehungsweise sogar gesteigerte Proliferation unter diesen Bedingungen (Engelhardt et al., 2015). So geht ein TEER-Verlust wohl mit einem deutlichen Zellschaden einher. Eine signifikante Beeinflussung der Motilität der Endothelzellen nach vierstündiger OGD-Therapie und 44-stündiger

Reoxygenierungsphase konnte in unserer Untersuchung nachgewiesen werden, wenn das während der OGD benutzte Medium weiter in der Kultur verblieb und Glukose zu Beginn der Reoxygenierung zugegeben wurde. Dabei stieg die Motilität um $29,10\% \pm 9,41\%$. Dies spiegelt jedoch nicht die pathophysiologischen Vorgänge bei einer Ischämie wider, da bei Beginn der Reoxygenierung der Blutfluss wieder einsetzt und so die autokrine Stimulation durch das Wegwaschen der Faktoren entfällt. Daher wurde ein Mediumwechsel nach der OGD-Phase zu unserem Standard-Vorgehen. Hierbei konnte nun eine Motilitätsabnahme auf $89,74\% \pm 6,79\%$ beobachtet werden. Derselbe Effekt der Motilitätszunahme bei Belassen des Mediums wurde bei den Versuchen mit hypoxischen Bedingungen beobachtet. Bei Verbleib des Mediums nach Beenden der Hypoxie zeigte sich eine signifikante beschleunigte Motilität nach 44h Reoxygenierung auf $160,61\% \pm 12,38\%$. Wenn stattdessen nach der Hypoxie ein Mediumwechsel stattfand, zeigte sich nur eine Beschleunigung der Motilität auf $117,45\% \pm 9,84\%$. In diesem Fall ist das „Auswaschen“ der während der Hypoxie sezernierten Faktoren, welche wohl motilitätsfördernde Eigenschaften haben, ebenfalls als Grund anzunehmen.

C6-konditioniertes Medium beschleunigt die Motilität

Die neurovaskuläre Einheit besteht, wie eingangs erwähnt, aus weiteren Zellarten neben Endothelzellen. Um den Einfluss von Astrozyten zu simulieren, wurden die Effekte konditionierten Mediums von C6-Glioma-Zellen getestet. Diese Zellen wurden aus Astroglomata von Ratten extrahiert und immortalisiert. Einige Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass eine Verwendung von C6-Zellen oder von Astrozyten in Ko-Kultur oder als konditioniertem Medium wichtig ist, um Endothelzellen in Richtung BHS-Phänotyp zu differenzieren (Fischer et al., 2000, Brillault et al., 2002), aber natürlich auch um die physiologische Kommunikation zwischen Astrozyten und zerebralen Endothelzellen nachzustellen. So konnten beispielsweise Zonta et al. eine Beeinflussung des Gefäßtonus durch Astrozyten nachweisen (Zonta et al., 2003). Die Anwesenheit von Astrozyten ist somit von großer Relevanz, um ein valides BHS-*in-vitro*-Modell zu etablieren. Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der Astrozyten konnte Minami et al. erst vor kurzem zeigen, wobei C6-konditioniertes Medium oder auch die Ko-Kultur mit C6-Zellen die Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen zu Hirnendothel-ähnlichen-Zellen induzieren konnte (Minami et al.,

2015). Zuvor hatte schon Janzer gezeigt, dass Astrozyten der Ratte bei nicht-neuronalen-Endothelzellen von Ratten und Hühnern Eigenschaften von BHS-Endothelzellen induzieren können (Janzer & Raff, 1987). In unseren Untersuchungen konnte eine signifikante Zunahme der Motilität der cerebENDs durch Erweiterung des Modells um das C6-konditionierte Medium beobachtet werden. Für eine maximale Stimulation wurde an Stelle primärer Astrozyten C6-Zellen benutzt, da diese um ein Vielfaches mehr an VEGF sezernieren (Boveri et al., 2005). Boveri et al. konnten in dieser Studie zwar einen höheren TEER und eine geringere Permeabilität von Kälber-Hirnendothelzellen durch primäre Astrozyten induzieren, jedoch sind C6-Zellen durch die Immortalisierung deutlich handhabbarer. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es durch die Verwendung von C6-Zellen in Ko-Kultur während Normoxie-Bedingungen nach vier Stunden Kultivierung zu einem Anstieg des TEERs kommt (Neuhaus et al., 2014).

Der Einfluss von Astrozyten auf die Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke während Ischämie wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht. Die bisherigen Untersuchungen legen einen schädigenden Einfluss nahe. So konnte Brillault et al. bereits nach einer zweistündigen OGD-Behandlung bei 0% Sauerstoff eine erhöhte Permeabilität für Inulin bei Rinderhirnendothelzellen (BBEC) in Ko-Kultur mit primären Astrozyten der Ratte nachweisen. Beim selben Versuch ohne Ko-Kultur mit Astrozyten konnte keine Permeabilitätszunahme des Endothels beobachtet werden. Brillault et al. führten auch Versuche mit konditioniertem Medium von Astrozyten der Ratte durch. Dabei wurde ebenfalls eine Zunahme der Permeabilität für Inulin an Rinderhirnendothelzellen (BBEC), welche nach einer vierstündigen OGD-Präkonditionierung für weitere zwei Stunden mit dem konditionierten Medium während erneuter OGD behandelt wurden, nachgewiesen. Die Autoren führten die Ergebnisse auf eine Induktion der Differenzierung der BBEC zu Endothelzellen durch die Ko-Kultur beziehungsweise durch das konditionierte Medium zurück (Brillault et al., 2002). Kuntz et al. haben nach vierstündiger OGD-Behandlung von Rinderhirnkapillarendothelzellen (BCEC) in Ko-Kultur mit Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia eine signifikante Zunahme von Glutamat im Medium gesehen, dessen Konzentration kurzfristig während der Reoxygenierung noch weiter im abluminalen Kompartiment angestiegen ist (Kuntz et al., 2014). Redzic et al. konnten von einer nicht-signifikanten Zunahme des Zelltods von primären

Rattenendothelzellen durch Astrozyten-konditioniertes Medium nach einer zweistündigen OGD-Behandlung bei 0% Sauerstoff berichten. Die Autoren haben die Endothelzellen auch konditioniertem Medium anderer Zellarten der neurovaskulären Einheit wie Perizyten und Mikroglia ausgesetzt. Dabei konnte dem Mikroglia-konditionierten Medium nach zweistündiger OGD eine protektive Rolle zugeschrieben werden (Redzic et al., 2015). In unserer Arbeitsgruppe konnte durch die vierstündige OGD-Behandlung von cerebENDs in Ko-Kultur mit C6-Zellen eine Zunahme der Permeabilität für Fluoreszin sowie eine Abnahme des TEERs, alles Parameter, welche auf eine Schädigung der kultivierten cerebENDs hinweisen, beobachtet werden (Neuhaus et al., 2014). Im Vergleich dazu konnte in der vorliegenden Arbeit zwar eine Beeinflussung der Motilität durch die OC6-Behandlung gezeigt werden, diese Zunahme der Motilität im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle mit C6-konditioniertem Medium war jedoch nicht signifikant.

Therapeutische Optionen des Schlaganfalls

- klinisch wie experimentell -

Die Therapie des nicht-hämorrhagischen Schlaganfalls ist momentan die Lysetherapie mit rekombinantem gewebespezifischem Plasminogenaktivator (rt-PA, Alteplase) oder die offene Thrombembolektomie bei extrakraniellm Verschluss der hirnersorgenden Arterien. Hier muss angemerkt werden, dass es für die Therapie mit rt-PA viele Kontraindikationen gibt und für t-PA eine aggravierende Schädigung der BHS nachgewiesen ist. So gaben Jin et al. eine Übersicht über die verschiedenen Wege, wie t-PA diesen zusätzlichen Schaden bedingt. Einer dieser Wege verläuft auch über die Aktivierung des NMDA-Rezeptors mit anschließender Veränderung der Bestandteile von Occludenskontakte (Jin et al., 2010). Aus diesen Erkenntnissen folgten viele Untersuchungen, um die Nebenwirkungen von rt-PA zu minimieren. Ein Ansatz besteht in der gleichzeitigen Therapie mit einem Antikörper gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, was beispielsweise in einer Stabilisierung der BHS-Permeabilität deutlich wird (Macrez et al., 2011). Eine relativ neue Therapie, welche im Jahr 2015 mit fünf erfolgreichen Studien als aktuell beste Therapieoption während der ersten 6 Stunden nach dem Schlaganfallereignis angesehen wird, ist die neuroradiologische Intervention mittels zurückziehbaren Stent. Dabei wird wie bei der Herzkatheter-Untersuchung über eine periphere Arterie ein Katheter eingebracht und

dieser bis zum Gefäßverschluss vorgeschoben. Der Thrombus wird mittels Drahtgeflecht gefasst und extrahiert (Mokin et al., 2016). Bei all den genannten Therapieformen besteht der Versuch, schnellstmöglich wieder einen Blutfluss herzustellen, um den Nährstoffmangel in der betroffenen Hirnregion zu beseitigen. Die Intaktheit der Blut-Hirn Schranke ist zum Interventionszeitpunkt im Regelfall schon gestört und die Symptome eines BHS-Schadens, wie ein Hirnödem, bilden sich, je nach Lage des Gefäßverschlusses und dessen Zeitdauer, mehr oder weniger schwer, aus. Um die Schädigung des Hirngewebes durch das expandierende Ödem zu vermindern, kann eine teilweise Entdeckung des Schädels vorgenommen werden. Eine kausale Therapie zur Stabilisierung der BHS ist nicht verfügbar. Es gibt eine Reihe von Untersuchungen am Zellkultur-Modell über die Effekte von NMDA-Rezeptor-Modulatoren aber nur wenige Studien unter OGD-Bedingungen. So konnte Kuhlmann et al. eine deutlich Stabilisierung des TEERs sowie eine Abnahme von reaktiven Sauerstoffspezies unter 10 μ M MK801-Behandlung nach zweistündiger Reoxygenierung bei vorangegangener zweistündiger Hypoxie nachweisen (Kuhlmann et al., 2009). Betzen et al. konnte eine dosisabhängige Stimulation des NMDA-Rezeptors durch NMDA und reaktiver Sauerstoffspezies an der murinen zerebrovaskulären Endothelzelllinie bEnd3 sowie die Verhinderung dieses Effekts durch Applikation von MK801 zeigen (Betzen et al., 2009). Die Verwendung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten zur Behandlung der zerebralen Ischämie und des Schädelhirntraumas wurde auch in Tierversuchen untersucht. Ein Erfolg im Sinne einer Reduzierung der Infarktgröße, der Stabilisierung der Blut-Hirn Schranke und einer Verminderung des vasogenen Ödems wurde in einigen Studien gezeigt (Germano et al., 2007, Gorgulu et al., 2000, Yang et al., 1994). Krivonos et al. konnten auch beim Menschen durch eine 10-tägige Therapie mit Amantadin das neurologische Endergebnis signifikant verbessern (Krivonos et al., 2010).

Der NMDA-Rezeptor-Antagonist MK801 beeinflusst je nach Behandlungszeitpunkt, Modalität und Konzentration die Motilität

Die soeben genannten Zellkultur-Modelle bestehen fast ausschließlich aus Hirnendothelzellen. Somit werden die beschriebenen Einflüsse der Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke umgebenden Zellen der neurovaskulären Einheit vernachlässigt. In unserem Modell werden Beeinflussungen der Motilität

durch NMDAR-Antagonisten deutlich, welche jedoch stark vom verwendeten Medium abhängt. So verlangsamt die Anwendung von 10 μM MK801 während der vierstündigen OGD mit C6-konditioniertem Medium die Motilität signifikant auf 85,66% im Vergleich zu OC6, während beim Verzicht auf konditioniertes Medium diese Dosis eine tendenzielle Zunahme der Motilität auf $138,34\% \pm 15,89\%$ im Vergleich zur OGD-Kontrolle bedingt. Eine Behandlung im Sinne einer Therapie des BHS-Schadens während der Reoxygenierungsphase zeigte für 100 μM MK801 eine Verlangsamung der Motilität auf unter 40% im Vergleich zur OC6-Kontrolle, was etwa der OGD-Bedingung ohne konditioniertes Medium und ohne NMDAR-Antagonisten entspricht. Eine ebenfalls Abnahme der Motilität um über 15% (nicht signifikant) bei dieser Behandlung während der Reoxygenierung konnte für 1 μM MK801 beobachtet werden. Bei der Verwendung des NMDA-Rezeptor-Antagonisten L701,324 konnten Beeinflussungen der Motilität nur für die Therapie-Gruppe gezeigt werden. So steigerte 1 μM L701,324 während der 44-stündigen Reoxygenierungsphase die Motilität ohne Verwendung von C6-konditioniertem Medium auf $144,21\% \pm 15,49\%$ im Vergleich zur OGD-Kontrolle. Im Gegensatz dazu verlangsamte 10 μM L701,324 die Motilität auf $81,76\% \pm 4,29\%$ bei Kultivierung der cerebENDs in C6-konditioniertem Medium im Vergleich zur OC6-Kontrolle. Diese Versuchsansätze zeigen, dass die Verwendung von C6-konditioniertem Medium der richtige Ansatz ist, ein Schritt weiter in Richtung valides *in-vitro*-Modell für die Blut-Hirn Schranke zu kommen.

Die Rolle von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren

Die Endothelzelle hat eine Vielzahl an Möglichkeiten auf die unterschiedlichen, sich ihr präsentierenden Umweltreize zu reagieren. Zusätzlich werden durch die weiteren Zellen der neurovaskulären Einheit eine Menge von Faktoren wie Zytokine, Chemokine und anderer Botenstoffe während physiologischen aber insbesondere während pathologischen Konditionen wie der Ischämie sezerniert (Ballabh et al., 2004, Weiss et al., 2009). Durch diese gegenseitige Beeinflussung reagieren die verschiedenen Zelltypen mit einer unterschiedlichen Regulierung der Signaltransduktionswege auf diese Einflüsse. So konnte gezeigt werden, dass ischämische Bedingungen zu einer erhöhten Konzentration von vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) an der Blut-Hirn Schranke führen, was in

einer Destabilisierung der Blut-Hirn Schranke resultiert (Bates et al., 1999). Als Ursprung des VEGF konnten Astrozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Neurone ausgemacht werden (Li et al., 2014, Kovacs et al., 1996). In unserer Untersuchung fand sich ebenfalls eine deutliche Zunahme der Expression von VEGF in den cerebENDs durch die vierstündige Ischämie. Als Transkriptionsfaktor fördert HIF-1 α die Expression von VEGF (Semenza, 1996). Sowohl die Ischämie als auch das C6-konditionierte Medium steigerten die Expression von HIF-1 α in den cerebENDs. Auf der Rezeptor-Ebene ist der VEGF-Rezeptor Typ2 (VEGFR-2) jener, welcher den größten Anteil an der Übertragung der permeabilitätssteigernden Wirkung von VEGF hat (Ferrara et al., 2003). Sköld et al. konnten am Ratten-Modell 24 Stunden nach der Simulation eines Schädel-Hirn-Traumas eine neu-aufgetretene Expression von VEGF-Rezeptor-2 an Blutgefäßen um die verursachte Läsion herum mittels Immunhistochemie und in-situ-Hybridisierung nachweisen, während nach sechs Stunden noch keine Veränderung des Expressionsniveaus gesehen werden konnte (Skold et al., 2005). Davis et al. stellten eine erhöhte Proteinexpression von VEGF-Rezeptor 2 sowie dessen phosphorylierte Form an Endothelzellen der Ratte (rbcec4) nach 24-stündiger Hypoxie fest (Davis et al., 2010). In dieser Untersuchung nahm die mRNA-Expression des VEGFR-2 bei der Behandlung der cerebENDs mit vierstündiger OGD und konditioniertem Medium signifikant ab. Tie2 ist ebenfalls ein Rezeptor für vaskuläre Wachstumsfaktoren, nämlich für Angiopoetin 1 bis 4. Angiopoetin 1 ist in der Lage die durch VEGF entstandene Permeabilitätsstörung an humanen Endothelzellen zu verringern (Gavard et al., 2008). Über Angiopoetin 2 liegen widersprüchliche Daten vor. So beschrieben Nag et al. an Ratten eine permeabilitätssteigernde Wirkung durch Angiopoetin 2 (Nag et al., 2005). Dagegen postulierten Marteau et al. am Mausmodell einen vasoprotektiven Effekt für Angiopoetin 2 in der Frühphase des Schlaganfalls (Marteau et al., 2013). Zhang et al. konnten am Tiermodell der Ratte mit fokaler Ischämie eine Zunahme der mRNA-Expression von Tie2 bereits nach zwei Stunden ausmachen und eine Abnahme von Ang1 für die ersten 24 Stunden (Zhang et al., 2002). In unserer Analyse nach vierstündiger OGD wurde eine Abnahme der mRNA-Expression von Tie2 beobachtet. Diese Abnahme steigerte sich noch bei Hinzunahme von C6-konditioniertem Medium. In dem Versuch von Zhang et al. zeigt sich ebenfalls im Gegensatz zu unserer Beobachtung eine Zunahme der mRNA-Expression von VEGFR-2 nach vierstündiger

Ischämie. Die Beobachtungen von Nourhaghighi et al. am Kälteverletzungsmodell der Ratte zeigen in der Frühphase der Verletzung eine Abnahme der Proteinexpression von Tie2 (Nourhaghighi et al., 2003). So sind die Ergebnisse der Untersuchungen von Sköld et al. und Davis et al. bereits in der Spätphase einzuordnen, was, neben der Beachtung des anderen Untersuchungsmodell, das gegensätzliche Expressionsmuster von VEGF-Rezeptor-2 erklären kann.

Gegensätzliche MMP-Aktivität vor und nach Reoxygenierung

Doch wie kommt es durch die eigentlich als positiv zu bewertenden Wachstumsfaktoren zur Schädigung der Blut-Hirn Schranke? Mit dieser Frage haben sich schon einige Untersuchungen beschäftigt (Valable et al., 2005, Rosenberg et al., 1998). Valable et al. sahen in ihren Untersuchungen am Schlaganfall-Modell der Maus eine deutliche Zunahme der MMP-9-Aktivität nach 12 Stunden permanenter Ischämie. Nach 24 Stunden wurde auch eine Steigerung der MMP-2-Aktivität berichtet. Auch wir führten MMP-Aktivitätstests vom vorhandenen Medium durch. Dabei zeigte sich nach vierstündiger OC6-Behandlung eine Abnahme der Gesamt-MMP-Aktivität im Vergleich zur Normoxie mit konditioniertem Medium. Nach vierstündiger OGD und 20-stündiger Reoxygenierung wurde eine Zunahme der Gesamt-MMP-Aktivität für das konditionierte Medium beziehungsweise die OGD-Behandlung beobachtet. Bei der Analyse des Expressionsmusters haben wir einzelne MMPs betrachtet. Für MMP-9 konnten wir nach vier Stunden Ischämie mit konditioniertem Medium eine vermehrte Expression nachweisen. Das konditionierte Medium bewirkte ebenfalls eine Zunahme der Expression von MMP-3, welche jedoch durch die zusätzliche OGD wieder vermindert wird. Rosenberg et al. propagierten schon 1998, dass die MMPs am frühen Zusammenbruch der Blut-Hirn Schranke schuld sind. Rosenberg et al. stellten jedoch fest, dass der Schaden nach 24 Stunden durch einen MMP-Inhibitor nicht aufgehalten werden kann und es weitere Mechanismen geben muss (Rosenberg et al., 1998). So konnte an Neuronen eine Beeinflussung der Lokalisation des NMDAR über MMP9 nachgewiesen werden, was ein möglicher Pfad auch an Endothelzellen der BHS sein könnte. MMP9 bewirkte in den Versuchen von Michaluk et al. eine verstärkte laterale Diffusion des NMDA-Rezeptors, welche über einen Integrin- β 1-Antikörper wiederum aufgehoben werden konnte (Michaluk et al., 2009). Eine Regulation konnten wir auch für einen

Gegenspieler der MMPs, für TIMP-1, sehen. Dessen mRNA wurde wie MMP-9 durch die OC6-Bedingungen hochreguliert. Die Behandlung mit dem NMDA-Rezeptor Antagonisten MK801 zeigte jedoch eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression für TIMP-1 auf 0,71 (\pm 0,03), was für MMP-9 nicht nachzuweisen war und damit im Endeffekt einer Erhöhung der MMPs dahinterstecken könnte.

Hoch-dosierte NMDAR-Antagonisten haben keine Auswirkungen auf den Phosphorylierungsgrad von ERK

Die Informationsübermittlung in der Zelle läuft über Signalkaskaden, an welchen oftmals Kinasen beteiligt sind. So erfolgt die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen unter anderem über die Phosphorylierung und damit Aktivierung der Extrazellulär-signal regulierten Kinase (ERK), was unter anderem Zeigler et al. an humanen Keratinozyten für MMP9 und Chen et al. an humanen Prostatakarzinomzellen für MMP3 zeigen konnten (Zeigler et al., 1999, Chen et al., 2015). Chen et al. setzten primären Mäusehirnkapillarendothelzellen (MCEC) 100 μ M NMDA aus, was eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 bewirkte und in einer erhöhten Proteinexpression von MMP2 und MMP9 mündete (Chen et al., 2016). Bei einer Schädigung der BHS über Mikrowellen an der humanen Zelllinie ECV304 in Ko-Kultur mit primären Astrozyten der Ratte konnte Wang et al. zeigen, dass ERK1/2 eine nachgeschaltete Serin/Threonin-Kinase des VEGF-Rezeptors-2 ist (Wang et al., 2015). Chen et al. konnten in der oben genannten Untersuchung im Jahre 2016 an Mäusehirnkapillarendothelzellen ebenfalls wie in einer vorangegangenen Studie von Wang et al. im Jahre 2004 an Korneaepithel-Zellen durch die Phosphorylierung von ERK eine Abnahme der Proteinexpression von Occludin beobachten (Wang et al., 2004). Dieser Verlust an Occludin durch eine 24-stündige NMDA-Behandlung konnte durch die einstündige Vorbehandlung mit 10 μ M MK801 verhindert werden. Eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK konnten wir durch vierstündige OGD-Therapie erreichen. Nach der anschließenden Reoxygenierungsphase von 20 Stunden wurde durch das C6-konditionierte Medium ein tendenziell erhöhter Phosphorylierungsgrad beobachtet. Die Verwendung weder von 100 μ M MK801 noch von 10 μ M L701,324 während der OGD-Phase oder auch als Therapie nach der OGD-Phase hatten einen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK.

NMDAR-Antagonisten haben im Gegensatz zu OGD und OC6 keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von Akt.

Eine weitere in der Migration und Proliferation wichtige vorgelagerte Kinase ist die Proteinkinase B, auch Akt genannt. Über VEGF wird dieser Phosphoinositol-3-Kinase/Akt-Pfad aktiviert und stimuliert die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) was einerseits zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) andererseits zu einer Aktivierung von intracellular adhesion molecule1 (ICAM1) führt, welches die transendotheliale Migration erleichtert (Radisavljevic et al., 2000). Ein Wachstumsfaktor, welcher über Akt die Zellfunktion beeinflusst, ist Angiopoetin 1, dessen Regulation im Vortext besprochen wurde. So konnten Kim et al. über die Phosphorylierung und somit Aktivierung von Akt die anti-apoptotische Wirkung von Ang1 nachvollziehen. Der Umkehrschluss konnte ebenfalls bewiesen werden, indem eine Inaktivierung von Akt den Zelluntergang trotz Ang1-Behandlung nicht aufhalten konnte (Kim et al., 2000). Pedram et al. zeigten an aortalen Rinderendothelzellen durch Stimulation des VEGF-R2 und dadurch Aktivierung der nachgeschalteten Kinasen ERK und Akt eine erhöhte Permeabilität der Endothelzellen über die Phosphorylierung von Occludin und ZO-1 (Pedram et al., 2002). Fischer et al. konnten wenig später auch an Hirnendothelzellen von Schweinen die Rolle des PI3K/Akt-Pfad an der VEGF und Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität über die Stimulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) nachweisen. So bestand bereits nach 60 Minuten Hypoxie eine verstärkte Phosphorylierung von Akt und nach 24 Stunden eine erhöhte Permeabilität für Inulin (Fischer et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte nach vierstündiger Ischämie keine Beeinflussung der Phosphorylierung von Akt gesehen werden. Nach der an die OGD angeschlossenen 20-stündigen Reoxygenierung konnte eine Abnahme der Phosphorylierung von Akt für die Ischämie ($63,59\% \pm 4,68\%$) wie auch für die zusätzliche Verwendung von C6-konditioniertem Medium zur Ischämie ($49,78\% \pm 8,27\%$) nachgewiesen werden. Die NMDA-Rezeptor-Modulatoren haben weder direkt nach der vierstündigen OGD noch nach der Reoxygenierung eine signifikante Beeinflussung des Phosphorylierungsgrads gezeigt.

Occludin und Claudin-5 werden nicht beeinflusst, aber Hinweise auf „frühe“ und „späte“ Effekte

Aus diesen Arbeiten und Ergebnissen leitet sich die Frage ab, ob auch in unseren Untersuchungen eine Beeinflussung von Bestandsproteinen der Occludenskontakte gesehen werden konnte. So konnten Colgan et al. eine Zunahme von Occludin auf Proteinebene unter serumfreien Bedingungen nach 24-stündiger Inkubation unter C6-Kokultur berichten. ZO-1 hat sich bei dieser Untersuchung ähnlich entwickelt (Colgan et al., 2008). Nach vorangegangener muriner neuronaler CATH.a Kokultur mit murinen Astrozyten C8-D1a unter ischämischen Bedingungen und folgender 24-stündiger Kokultur dieser Astrozyten und Mäusehirnendothelzellen bEnd3 konnte von Li et al. eine Abnahme von Occludin gesehen werden (Li et al., 2014). Liu et al. konnten nach zweistündiger OGD eine Abnahme an Occludin bei ihren Untersuchungen an der Mäusehirnendothelzelllinie bEnd3 sehen (Liu et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl nach vierstündiger wie auch nach 24-stündiger Analyse eine tendenzielle Zunahme von Occludin durch OGD und C6-konditioniertes Medium gesehen werden. Ein weiteres Protein als Bestandteil von Occludenskontakten ist Claudin-5, welches ebenfalls auf Regulierung hin untersucht wurde. So konnten Liu et al. an der bereits zitierten Arbeit im Gegensatz zu Occludin für Claudin-5 nach zweistündiger OGD keine Beeinflussung nachweisen (Liu et al., 2012). Dagegen konnten Li et al. in ihrer oben genannten Untersuchung etwa dieselbe Abnahme an Claudin-5 Proteinmenge beobachten, wie für Occludin (Li et al., 2014). Für Claudin-5 konnte in dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Ergebnisse erlangt werden. Was bei der Betrachtung der Ergebnisse auffällt, ist ein umgekehrter Einfluss der Bedingungen OGD beziehungsweise C6-konditioniertes Medium auf die Proteinmenge von Claudin-5 zwischen den 4h-Proben und den 24h-Proben. Ebenfalls gegensätzlich entwickeln sich die Proteinmengen bei Zugabe von DMSO während derselben Versuchsdauer.

Die Schädigung der Blut-Hirn Schranke durch beispielsweise einen Schlaganfall kann man, wie es bereits oben angeklungen ist, in zwei Phasen einteilen. So konnten Belayev et al. eine frühe Schädigung drei bis vier Stunden und eine späte Schädigung 48 bis 50 Stunden nach Beginn der Rezirkulation durch eine erhöhte Extravasation von an Albumin gebundenem Evan's Blue an der Ratte aufzeigen (Belayev et al.,

1996). Prakash und Carmichael zeigten jedoch in ihrem Übersichtsbeitrag dass es auf das Modell, die Tierspezies, die Okklusionsmethode und die Dauer der Ischämie ankommt, ob man von einer biphasischen oder monophasischen Schädigung sprechen kann (Prakash & Carmichael, 2015).

5 Zusammenfassung

Die Blut-Hirn Schranke mit ihren dichten Zell-Zell-Kontakten trägt zu einem großen Anteil an der Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Blutkreislauf und Gehirn bei. So bedingt eine Schädigung und im schlimmsten Fall ein Zusammenbruch der Schrankenfunktion erhebliche Gefährdung für das Individuum. Es gibt vielzählige Gründe für eine Alteration der Blut-Hirn Schranke wie beispielsweise der Schlaganfall mit ischämischer Genese oder die Multiple Sklerose als neurodegenerative Erkrankung. Aber auch ein Schädel-Hirn Trauma als Unfallfolge ist nicht selten Grund für zerebrale Dysfunktionen.

Daher gibt es auch eine Reihe an Untersuchungen, welche sich mit dem Thema Blut-Hirn Schrankenfunktion unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen auf molekularer, mikroskopischer und makroskopischer Ebene beschäftigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Speziellen das Motilitätsverhalten von Blut-Hirn Schranken-Endothelzellen unter ischämischen Bedingungen an Hand der cerebEND-Zelllinie untersucht. Da es bisher noch kein Modell für diese Fragestellung gab, wurde zunächst ein solches mit Hilfe des kommerziellen Motilitätsassay der Firma ibidi® etabliert. Danach konnte der Einfluss von ischämischen Bedingungen, von Astrozyten konditioniertem Medium und letztendlich der therapeutische Ansatz durch Modulation des NMDA-Rezeptors untersucht werden. Dabei zeigte sich durch das C6-konditionierte Medium eine deutliche Zunahme der Motilität. Diese verstärkte Motilität konnte durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK801 verhindert werden. Trotz Analyse einiger an der Proliferation und Migration beteiligter Botenstoffe wie VEGF und MMPs konnte keine Regulation dieser durch MK801 nachgewiesen werden.

Bisherige Untersuchungen haben ihren Fokus der Wundheilung nach zerebraler Ischämie auf die Analyse und Beeinflussung der Motilität von Glia-Gewebe gelegt. Mit diesem Modell kann zukünftig die Motilität von Hirnendothelzellen, eine wichtige Größe im Rahmen der Wundheilung und ein Grund für die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, noch eingehender untersucht werden. Das Modell mit Verwendung von C6-konditioniertem Medium bietet eine Annäherung an die neurovaskuläre Einheit. Die Erweiterung des Modells vom konditionierten Medium zur Ko-Kultur mit Zellen der neurovaskulären Einheit, wie Perizyten, Mikroglia oder Neuronen, könnte eine weitere Annäherung an die Bedingungen *in vivo* darstellen.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J., Ronnback, L. & Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7, 41-53.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R. & Begley, D.J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37, 13-25.
- Abbruscato, T.J. & Davis, T.P. (1999) Combination of hypoxia/aglycemia compromises in vitro blood-brain barrier integrity. *J Pharmacol Exp Ther*, 289, 668-675.
- Alves, J.L. (2014) Blood-brain barrier and traumatic brain injury. *J Neurosci Res*, 92, 141-147.
- Armulik, A., Genove, G., Mae, M., et al. (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 468, 557-561.
- Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 16, 1-13.
- Bates, D.O., Lodwick, D. & Williams, B. (1999) Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. *Microcirculation*, 6, 83-96.
- Bauer, B., Hartz, A.M., Pekcec, A., Toellner, K., Miller, D.S. & Potschka, H. (2008) Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Mol Pharmacol*, 73, 1444-1453.
- Beard, R.S., Jr., Reynolds, J.J. & Bearden, S.E. (2011) Hyperhomocysteinemia increases permeability of the blood-brain barrier by NMDA receptor-dependent regulation of adherens and tight junctions. *Blood*, 118, 2007-2014.
- Begley, D. & Brightman, M. (2003) Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. In *Peptide Transport and Delivery into the Central Nervous System*. (Eds.) Prokai, L. & Prokai-Tatrai, K. (Birkhäuser Basel) pp. 39-78.
- Belayev, L., Busto, R., Zhao, W. & Ginsberg, M.D. (1996) Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*, 739, 88-96.
- Betzen, C., White, R., Zehendner, C.M., et al. (2009) Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radic Biol Med*, 47, 1212-1220.
- Blecharz, K.G.Z. (2009) *Molekulare Ziele der Glukokortikoidbehandlung unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen in einem in vitro Modell der Blut-Hirn-Schranke*.
- Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- Block, F. & Schwarz, M. (1996) Memantine reduces functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats. *Neurosci Lett*, 208, 41-44.
- Boveri, M., Berezowski, V., Price, A., et al. (2005) Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line. *Glia*, 51, 187-198.
- Brightman, M. & Reese, T. (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.*, 40, 648-677.
- Brillault, J., Berezowski, V., Cecchelli, R. & Dehouck, M.P. (2002) Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem*, 83, 807-817.
- Bühning, P. (2006) Schädel-Hirn-Verletzungen: Folgeschäden vermeiden. *Dtsch Arztebl International*, 5, -356-.
- Butt, A.M., Jones, H.C. & Abbott, N.J. (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*, 429, 47-62.
- Cabezas, R., Avila, M., Gonzalez, J., et al. (2014) Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci*, 8, 211.
- Chambers, J.C., McGregor, A., Jean-Marie, J. & Kooner, J.S. (1998) Acute hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction. *The Lancet*, 351, 36-37.

- Chen, H., Fitzgerald, R., Brown, A.T., et al. (2005) Identification of a homocysteine receptor in the peripheral endothelium and its role in proliferation. *J Vasc Surg*, 41, 853-860.
- Chen, J., Wang, Z., Xu, D., Liu, Y. & Gao, Y. (2015) Aquaporin 3 promotes prostate cancer cell motility and invasion via extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated matrix metalloproteinase-3 secretion. *Mol Med Rep*, 11, 2882-2888.
- Chen, J.T., Chen, T.G., Chang, Y.C., Chen, C.Y. & Chen, R.M. (2016) Roles of NMDARs in maintenance of the mouse cerebrovascular endothelial cell-constructed tight junction barrier. *Toxicology*, 339, 40-50.
- Clarke, R., Daly, L., Robinson, K., et al. (1991) Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 324, 1149-1155.
- Colgan, O.C., Collins, N.T., Ferguson, G., et al. (2008) Influence of basolateral condition on the regulation of brain microvascular endothelial tight junction properties and barrier function. *Brain Res*, 1193, 84-92.
- Cucullo, L., Hossain, M., Puvenna, V., Marchi, N. & Janigro, D. (2011) The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci*, 12, 40.
- Cull-Candy, S., Brickley, S. & Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 327-335.
- Daneman, R. & Prat, A. (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, a020412.
- Davis, B., Tang, J., Zhang, L., et al. (2010) Role of vasodilator stimulated phosphoprotein in VEGF induced blood-brain barrier permeability in endothelial cell monolayers. *Int J Dev Neurosci*, 28, 423-428.
- Degam, D.G.F.a.U.F. (2012) DEGAM-Leitlinie Nr. 8: Schlaganfall.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M.A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-397.
- Duvernoy, H., Delon, S. & Vannson, J.L. (1983) The vascularization of the human cerebellar cortex. *Brain Res Bull*, 11, 419-480.
- Ehrlich, P. (1885) Das sauerstoffbedürfnis des organismus. *Eine Farbenanalytische Studie*.
- Engelhardt, S., Huang, S.F., Patkar, S., Gassmann, M. & Ogunshola, O.O. (2015) Differential responses of blood-brain barrier associated cells to hypoxia and ischemia: a comparative study. *Fluids Barriers CNS*, 12, 4.
- Faraci, F.M. & Heistad, D.D. (1998) Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*, 78, 53-97.
- Ferrara, N., Gerber, H.P. & Lecouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-676.
- Fischer, S., Wiesnet, M., Marti, H.H., Renz, D. & Schaper, W. (2004) Simultaneous activation of several second messengers in hypoxia-induced hyperpermeability of brain derived endothelial cells. *J Cell Physiol*, 198, 359-369.
- Foerch, C., Misselwitz, B., Sitzer, M., Steinmetz, H., Neumann-Haefelin, T. & Hesse Stroke Study, G. (2008) The projected burden of stroke in the German federal state of Hesse up to the year 2050. *Dtsch Arztebl Int*, 105, 467-473.
- Gavard, J., Patel, V. & Gutkind, J.S. (2008) Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell*, 14, 25-36.
- Gehlen, W. & Delank, H.-W. (2010) *Neurologie*, (Thieme: Stuttgart [u.a.]).
- Germano, A., Caffo, M., Angileri, F.F., et al. (2007) NMDA receptor antagonist felbamate reduces behavioral deficits and blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat. *J Neurotrauma*, 24, 732-744.
- Goldmann, E. (1913) Vitalfarbung am zentralnervensystem. *Abhandl Konigl preuss Akad Wiss*, 1, 1-60.
- Gorgulu, A., Kins, T., Cobanoglu, S., et al. (2000) Reduction of edema and infarction by Memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat. *Acta Neurochir (Wien)*, 142, 1287-1292.

- Haseloff, R.F., Dithmer, S., Winkler, L., Wolburg, H. & Blasig, I.E. (2014) Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: Structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol*.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J. & Stevenson, B.R. (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 141, 199-208.
- Hawkins, B.T. & Davis, T.P. (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 57, 173-185.
- Heo, J.H., Han, S.W. & Lee, S.K. (2005) Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med*, 39, 51-70.
- Iadecola, C. (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci*, 20, 132-139.
- Iadecola, C. (2010) The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol*, 120, 287-296.
- Igarashi, Y., Utsumi, H., Chiba, H., et al. (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, 261, 108-112.
- Janzer, R.C. & Raff, M.C. (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325, 253-257.
- Jesaitis, L.A. & Goodenough, D.A. (1994) Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol*, 124, 949-961.
- Jin, R., Yang, G. & Li, G. (2010) Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis*, 38, 376-385.
- Jowers, C.T., Taberner, A.J., Dragunow, M. & Anderson, I.A. (2013) The cell injury device: a high-throughput platform for traumatic brain injury research. *J Neurosci Methods*, 218, 1-8.
- Kalia, L.V., Kalia, S.K. & Salter, M.W. (2008) NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol*, 7, 742-755.
- Kandel, E. (2013) *Principles of Neural Science, Fifth Edition*, (McGraw-Hill Education).
- Kemp, J.A. & Mckernan, R.M. (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci*, 5 Suppl, 1039-1042.
- Kim, I., Kim, H.G., So, J.N., Kim, J.H., Kwak, H.J. & Koh, G.Y. (2000) Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res*, 86, 24-29.
- Kleinschnitz, C., Blecharz, K., Kahles, T., et al. (2011) Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome. *Stroke*, 42, 1081-1089.
- Kolominsky-Rabas, P.L., Heuschmann, P.U., Marschall, D., et al. (2006) Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke*, 37, 1179-1183.
- Kovacs, Z., Ikezaki, K., Samoto, K., Inamura, T. & Fukui, M. (1996) VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke*, 27, 1865-1872; discussion 1872-1863.
- Krivonos, O.V., Amosova, N.A. & Smolentseva, I.G. (2010) Use of the glutamate NMDA receptor antagonist PK-Merz in acute stroke. *Neurosci Behav Physiol*, 40, 529-532.
- Krizbai, I.A., Deli, M.A., Pestenacz, A., et al. (1998) Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res*, 54, 814-819.
- Kuhlmann, C.R., Gerigk, M., Bender, B., Closhen, D., Lessmann, V. & Luhmann, H.J. (2008) Fluvastatin prevents glutamate-induced blood-brain-barrier disruption in vitro. *Life Sci*, 82, 1281-1287.
- Kuhlmann, C.R., Zehendner, C.M., Gerigk, M., et al. (2009) MK801 blocks hypoxic blood-brain-barrier disruption and leukocyte adhesion. *Neurosci Lett*, 449, 168-172.

- Kuntz, M., Mysiorek, C., Petrault, O., et al. (2014) Transient oxygen-glucose deprivation sensitizes brain capillary endothelial cells to rtPA at 4h of reoxygenation. *Microvasc Res*, 91, 44-57.
- Laird, J.M., Mason, G.S., Webb, J., Hill, R.G. & Hargreaves, R.J. (1996) Effects of a partial agonist and a full antagonist acting at the glycine site of the NMDA receptor on inflammation-induced mechanical hyperalgesia in rats. *Br J Pharmacol*, 117, 1487-1492.
- Lee, S.W., Kim, W.J., Choi, Y.K., et al. (2003) SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med*, 9, 900-906.
- Legros, H., Launay, S., Roussel, B.D., et al. (2009) Newborn- and adult-derived brain microvascular endothelial cells show age-related differences in phenotype and glutamate-evoked protease release. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29, 1146-1158.
- Leonard, A.S., Lim, I.A., Hemsworth, D.E., Horne, M.C. & Hell, J.W. (1999) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 3239-3244.
- Lewandowsky, M. (1900) Zur lehre von der cerebrospinalflussigkeit. *Z Klin Med*, 40, 480-494.
- Li, Y.N., Pan, R., Qin, X.J., et al. (2014) Ischemic neurons activate astrocytes to disrupt endothelial barrier via increasing VEGF expression. *J Neurochem*, 129, 120-129.
- Lipton, S.A. (2005) The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Curr Alzheimer Res*, 2, 155-165.
- Liu, J., Jin, X., Liu, K.J. & Liu, W. (2012) Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage. *J Neurosci*, 32, 3044-3057.
- Logsdon, A.F., Lucke-Wold, B.P., Turner, R.C., Huber, J.D., Rosen, C.L. & Simpkins, J.W. (2015) Role of Microvascular Disruption in Brain Damage from Traumatic Brain Injury. *Compr Physiol*, 5, 1147-1160.
- Loscher, W. & Potschka, H. (2005) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*, 2, 86-98.
- Lüllmann, H., Mohr, K. & Hein, L. (2010) *Pharmakologie und Toxikologie Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 130 Tabellen*, (Thieme: Stuttgart [u.a.]).
- Macrez, R., Obiang, P., Gauberti, M., et al. (2011) Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke*, 42, 2315-2322.
- Mariano, C., Palmela, I., Pereira, P., et al. (2013) Tricellulin expression in brain endothelial and neural cells. *Cell Tissue Res*, 351, 397-407.
- Marteau, L., Valable, S., Divoux, D., et al. (2013) Angiotensin-2 is vasoprotective in the acute phase of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33, 389-395.
- Michaluk, P., Mikasova, L., Groc, L., Frischknecht, R., Choquet, D. & Kaczmarek, L. (2009) Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin beta1 signaling. *J Neurosci*, 29, 6007-6012.
- Michinaga, S. & Koyama, Y. (2015) Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *Int J Mol Sci*, 16, 9949-9975.
- Minami, H., Tashiro, K., Okada, A., et al. (2015) Generation of Brain Microvascular Endothelial-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Co-Culture with C6 Glioma Cells. *PLoS One*, 10, e0128890.
- Mitic, L.L., Van Itallie, C.M. & Anderson, J.M. (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons

- from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279, G250-254.
- Mokin, M., Rojas, H. & Levy, E.I. (2016) Randomized trials of endovascular therapy for stroke - impact on stroke care. *Nat Rev Neurol*.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., et al. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256, 1217-1221.
- Muir, A. & Peters, A. (1962) Quintuple-layered membrane junctions at terminal bars between endothelial cells. *J Cell Biol.*, 12, 443-448.
- Nag, S., Papneja, T., Venugopalan, R. & Stewart, D.J. (2005) Increased angiotensin II expression is associated with endothelial apoptosis and blood-brain barrier breakdown. *Lab Invest*, 85, 1189-1198.
- Nag, S., Manias, J.L. & Stewart, D.J. (2009) Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. *Acta Neuropathol*, 118, 197-217.
- Nassar, T., Yarovoi, S., Fanne, R.A., et al. (2011) Urokinase plasminogen activator regulates pulmonary arterial contractility and vascular permeability in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45, 1015-1021.
- Neuhaus, W., Freidl, M., Szkokan, P., et al. (2011) Effects of NMDA receptor modulators on a blood-brain barrier in vitro model. *Brain Res*, 1394, 49-61.
- Neuhaus, W., Burek, M., Djuzenova, C.S., et al. (2012a) Addition of NMDA-receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the upregulation of glucose uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells. *Neurosci Lett*, 506, 44-49.
- Neuhaus, W., Burek, M., Wunder, C. & Forster, C. (2012b) Novel Strategies to Restore Blood Brain Barrier Integrity after Brain Injury. In *The blood-brain barrier : new research*. (Nova Science Publishers: Hauppauge, N.Y.) pp. 145-172.
- Neuhaus, W., Gaiser, F., Mahringer, A., Franz, J., Riethmuller, C. & Forster, C. (2014) The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier. *Front Cell Neurosci*, 8, 352.
- Nishizaki, T., Kammesheidt, A., Sumikawa, K., Asada, T. & Okada, Y. (1995) A sodium- and energy-dependent glucose transporter with similarities to SGLT1-2 is expressed in bovine cortical vessels. *Neurosci Res*, 22, 13-22.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., et al. (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 161, 653-660.
- Nourhaghghi, N., Teichert-Kuliszewska, K., Davis, J., Stewart, D.J. & Nag, S. (2003) Altered expression of angiotensin II during blood-brain barrier breakdown and angiogenesis. *Lab Invest*, 83, 1211-1222.
- Ogden, K.K. & Traynelis, S.F. (2011) New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 32, 726-733.
- Paoletti, P., Bellone, C. & Zhou, Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 14, 383-400.
- Pardridge, W.M., Boado, R.J. & Farrell, C.R. (1990) Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem*, 265, 18035-18040.
- Patton, A.J., Genever, P.G., Birch, M.A., Suva, L.J. & Skerry, T.M. (1998) Expression of an N-methyl-D-aspartate-type receptor by human and rat osteoblasts and osteoclasts suggests a novel glutamate signaling pathway in bone. *Bone*, 22, 645-649.
- Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E.R. (2002) Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability. Inhibition by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem*, 277, 44385-44398.
- Prakash, R. & Carmichael, S.T. (2015) Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol*, 28, 556-564.
- Qureshi, I., Chen, H., Brown, A.T., et al. (2005) Homocysteine-induced vascular dysregulation is mediated by the NMDA receptor. *Vascular Medicine*, 10, 215-223.

- Radisavljevic, Z., Avraham, H. & Avraham, S. (2000) Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 275, 20770-20774.
- Redzic, Z.B., Rabie, T., Sutherland, B.A. & Buchan, A.M. (2015) Differential effects of paracrine factors on the survival of cells of the neurovascular unit during oxygen glucose deprivation. *Int J Stroke*, 10, 407-414.
- Reijerkerk, A., Kooij, G., Van Der Pol, S.M., et al. (2010) The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *J Neurochem*, 113, 447-453.
- Rickels, E., Von Wild, K. & Wenzlaff, P. (2010) Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain Inj*, 24, 1491-1504.
- Rosen, L.B., Ginty, D.D., Weber, M.J. & Greenberg, M.E. (1994) Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron*, 12, 1207-1221.
- Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y. & Dencoff, J.E. (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*, 29, 2189-2195.
- Rosenberg, G.A. (1999) Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis*, 42, 209-216.
- Roy Choudhury, G., Ryou, M.G., Poteet, E., et al. (2014) Involvement of p38 MAPK in reactive astrogliosis induced by ischemic stroke. *Brain Res*, 1551, 45-58.
- Schoknecht, K., David, Y. & Heinemann, U. (2014) The blood-brain barrier-Gatekeeper to neuronal homeostasis: Clinical implications in the setting of stroke. *Semin Cell Dev Biol*.
- Schwarzmaier, S.M., Kim, S.W., Trabold, R. & Plesnila, N. (2010) Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*, 27, 121-130.
- Semenza, G.L. (1996) Transcriptional regulation by hypoxia-inducible factor 1 molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Trends Cardiovasc Med*, 6, 151-157.
- Sharp, C.D., Fowler, M., Jackson, T.H.T., et al. (2003) Human neuroepithelial cells express NMDA receptors. *BMC Neurosci*, 4, 28.
- Silver, J. & Miller, J.H. (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, 5, 146-156.
- Silwedel, C. & Forster, C. (2006) Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli. *J Neuroimmunol*, 179, 37-45.
- Simard, J.M., Kent, T.A., Chen, M., Tarasov, K.V. & Gerzanich, V. (2007) Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *The Lancet Neurology*, 6, 258-268.
- Singh, J. & Kaur, G. (2009) Transcriptional regulation of PSA-NCAM expression by NMDA receptor activation in RA-differentiated C6 glioma cultures. *Brain Res Bull*, 79, 157-168.
- Skold, M.K., Von Gertten, C., Sandberg-Nordqvist, A.C., Mathiesen, T. & Holmin, S. (2005) VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *J Neurotrauma*, 22, 353-367.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S. & Goodenough, D.A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 103, 755-766.
- Struijs, J.N., Van Genugten, M.L., Evers, S.M., Ament, A.J., Baan, C.A. & Van Den Bos, G.A. (2005) Modeling the future burden of stroke in The Netherlands: impact of aging, smoking, and hypertension. *Stroke*, 36, 1648-1655.
- Thal, S.C. & Neuhaus, W. (2014) The blood-brain barrier as a target in traumatic brain injury treatment. *Arch Med Res*, 45, 698-710.

- Thomas, G.M. & Huganir, R.L. (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 5, 173-183.
- Tovar, K.R. & Westbrook, G.L. (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci*, 19, 4180-4188.
- Valable, S., Montaner, J., Bellail, A., et al. (2005) VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 1491-1504.
- Van Itallie, C.M. & Anderson, J.M. (2004) The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)*, 19, 331-338.
- Vermeer, S.E., Van Dijk, E.J., Koudstaal, P.J., et al. (2002) Homocysteine, silent brain infarcts, and white matter lesions: The Rotterdam Scan Study. *Ann Neurol*, 51, 285-289.
- Virgintino, D., Robertson, D., Errede, M., et al. (2002) Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50, 1671-1676.
- Wang, L.F., Li, X., Gao, Y.B., et al. (2015) Activation of VEGF/Flk-1-ERK Pathway Induced Blood-Brain Barrier Injury After Microwave Exposure. *Mol Neurobiol*, 52, 478-491.
- Wang, Y., Zhang, J., Yi, X.-J. & Yu, F.-S.X. (2004) Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 78, 125-136.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S. & Couraud, P.O. (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 842-857.
- Wolburg, H. & Lippoldt, A. (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*, 38, 323-337.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., et al. (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*, 105, 586-592.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K. & Fallier-Becker, P. (2009) Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res*, 335, 75-96.
- Woolsey, T.A., Rovainen, C.M., Cox, S.B., et al. (1996) Neuronal Units Linked to Microvascular Modules in Cerebral Cortex: Response Elements for Imaging the Brain. *Cerebral Cortex*, 6, 647-666O.
- Yang, G., Chan, P.H., Chen, S.F., Babuna, O.A., Simon, R.P. & Weinstein, P.R. (1994) Reduction of vasogenic edema and infarction by MK-801 in rats after temporary focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*, 34, 339-345; discussion 345.
- Zeigler, M.E., Chi, Y., Schmidt, T. & Varani, J. (1999) Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol*, 180, 271-284.
- Zenaro, E., Piacentino, G. & Constantin, G. (2017) The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 107, 41-56.
- Zhang, Z.G., Zhang, L., Tsang, W., et al. (2002) Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22, 379-392.
- Zhu, H., Wang, Z., Xing, Y., et al. (2012) Baicalin reduces the permeability of the blood-brain barrier during hypoxia in vitro by increasing the expression of tight junction proteins in brain microvascular endothelial cells. *J Ethnopharmacol*, 141, 714-720.
- Ziegenfuss, T. (2017) *Notfallmedizin*, (Springer: Berlin ; Heidelberg).
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., et al. (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*, 6, 43-50.

7 Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
7H6	Occludenskontakt-assoziiertes Protein
ABC-Transporter	ATP-bindende-Kassette Transporter
AF6	afadin
Akt	Proteinkinase B
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure
Ang1	Angiopoetin 1
ANOVA	(engl. Analysis of variance) Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn Schranke
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein; ABCG2
Ca ²⁺	Kalzium
CAT	kationischer Aminosäuretransporter
CD4+-T-Zellen	Cluster of differentiation 4 positive T-Zellen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cl ⁻	Chlorid
cm ²	Quadratcentimeter
COX	Cyclooxygenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DME+/-	Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10% FCS + 1% P/S
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extrazellulär-signal regulierte Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
GDNF	Engl. Gliazellen isolierter neurotropher Faktor

GLUT	Glukosetransporter
HIF1- α	Hypoxie-induzierbare Faktor 1 α
HRP	Meerrettichperoxidase
ICAM1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL	Interleukin
IFN	Interferon
JAM	junktionales Adhäsionsmolekül
K ⁺	Kalium
LAT	L-Typ Aminosäuretransporter
m ²	Quadratmeter
MAGUK	Membran-assoziierte-Guanylat-Kinase
MAP	mitogen-aktiviertes Protein
MDR	Multi-Medikamenten resistent
Mg ²⁺	Magnesium
MLC	Myosin-Leichtketten
MMP	Matrixmetalloproteinase
MS	Multiple Sklerose
Na ⁺	Natrium
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NC6	Normoxie-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NVU	Neurovaskuläre Einheit
OC6	Ischämie-Bedingungen mit C6-konditioniertem Medium, welches zuvor für vier Stunden unter Ischämie-Bedingungen konditioniert wurde
OGD	Oxygen-glucose deprivation; Ischämie-Bedingungen

P/S	Penicillin/Streptomycin
pAkt	phosphorylierte Proteinkinase B
PCR	Polymerasekettenreaktion
PECAM	Thrombozyten endotheliales Zelladhäsionsmolekül; CD31
pERK	phosphorylierte extrazellular-signal regulierte Kinase
P-GP	P-Glykoprotein
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rt-PA	rekombinanter Gewebeplasminogenaktivator
SGLT	Natrium-abhängiger Glukose Transporter
sVCAM	lösliches Gefäß-Zelladhäsionsmolekül
TEER	transendothelialer elektrischer Widerstand
TGF β	transformierender Wachstumsfaktor β
TIMP	Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen
TJ	engl. tight junctions; Occludenskontakte
TNF α	Tumornekrosefaktor α
t-PA	Gewebeplasminogenaktivator
VCAM	Gefäß-Zelladhäsionsmolekül
VE-Cadherin	Gefäß-endotheliales Cadherin
VEGF	Gefäß-endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR-2	Gefäß-endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor-2
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula-occludens - 1
ZO-2	Zonula-occludens - 2

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Aufbau der Occludenskontakte der BHS-Endothelzelle (N.J. Abbott et al. / Neurobiology of Disease 37 (2010) Seite 17)	- 2 -
Abbildung 1-2 Die verschiedenen Arten des Hirnödems, übernommen aus (Michinaga & Koyama, 2015); Punkte: Na ⁺ , Ellipsen: Albumin, Hirnblutkapillare im Querschnitt.	- 8 -
Abbildung 1-3 Aufbau des NMDA-Rezeptors mit Bindungsstellen und Modulatoren.....	- 10 -
Abbildung 1-4 Der NMDA-Rezeptor an BHS-Endothelzellen und intrazelluläre Mechanismen	- 12 -
Abbildung 2-1 lichtmikroskopische Aufnahme (10-fach): konfluenter Zellrasen mit cerebEND	- 24 -
Abbildung 3-1 Aufnahmen von cerebEnd (10-fach) während Normoxie bei Motilitätsversuchen mit ibidi®	- 50 -
Abbildung 3-2 Aufnahmen von cerebEnd (10-fach) während Ischämie bei Motilitätsversuchen mit ibidi®	- 58 -
Abbildung 4-1 Möglicher Einfluss des NMDA-Rezeptors auf das Actin-Myosin-Zytoskelett (Thal & Neuhaus, 2014)	- 97 -

Die Verwendung von Abbildungen bzw. Auszüge von Abbildungen aus anderen Arbeiten erfolgt mit freundlicher Zustimmung der jeweiligen Verlage bzw. des Urhebers.

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Betreuer Priv-Doz. Winfried Neuhaus bedanken, der mich die ganze Arbeit über angeleitet, begleitet, beraten, motiviert und zu jeder Tages- und Nachtzeit für meine Fragen zur Verfügung stand. Vielen Dank Winni!!

Natürlich gilt auch der Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Förster, welche mir die Gelegenheit gab, in ihrer Abteilung diese Arbeit anzufertigen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den beiden MTAs Bianca Schneiker, welche mich sehr gut in die Laborarbeit eingearbeitet hat und Anja Neuhoff, die ich auch mit jeder Frage löchern konnte und die mir oft zur Seite stand.

Nicht zu Letzt gilt der Dank auch meinen Eltern, die mich die ganze Arbeit über unterstützt haben und meiner Freundin Dorien Hoefnagel, die mich immer wieder motiviert und sehr viel Verständnis gezeigt hat.