

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Patrick Meybohm

**Einfluss einer Dexamethason/Bortezomib-Kombinationstherapie
auf den Glukokortikoidrezeptor und die Tight Junction-Moleküle
Claudin-5 und Occludin in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke
in experimentellen Modellen des Schädel-Hirn-Traumas**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

David Scheffer

aus Johannesberg

Würzburg, August 2020



Referentin: Professor Dr. rer. nat. Carola Förster

Korreferent: Professor Dr. med. Srikanth Karnati

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2020

Der Promovend ist Arzt

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Schädel-Hirn-Trauma.....	1
1.2.	Die Blut-Hirn-Schranke.....	1
1.2.1.	Histologischer Aufbau der BHS und ihre Funktion.....	2
1.2.2.	Ultrastruktureller Aufbau der BHS.....	4
1.3.	Pathophysiologische Vorgänge an der BHS nach SHT.....	7
1.4.	Die Glukokortikoide und der Glukokortikoidrezeptor – ihre molekulare Wirkung und Einfluss auf die BHS.....	11
1.5.	Die Grundlagen des Ubiquitin-Proteasom-Systems und der Proteasom-Inhibitor Bortezomib.....	14
1.6.	Ziele der Arbeit.....	16
2.	Material und Methoden	18
2.1.	Material.....	18
2.1.1.	Verwendete Testsubstanzen.....	18
2.1.2.	Verwendete Lösungen und Puffer	19
2.1.3.	Verwendete Kulturmedien.....	20
2.1.4.	Liste der verwendeten Chemikalien	21
2.2.	Immunhistochemische Untersuchungen von Mäusehirnschnitten.....	22
2.2.1.	Kryoschnitte	22
2.2.2.	Indirekte Immunfluoreszenz	23
2.3.	Zellkultur	24
2.3.1.	Zelllinien.....	24
2.3.2.	Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD).....	25
2.3.3.	Herstellung von hormonbereinigtem ssFCS.....	27
2.4.	Messung des Transendothelialen Elektrischen Widerstands	27
2.5.	Proteinanalysen von hCMEC/D3 durch Western Blot.....	29
2.5.1.	Gesamt-Protein-Isolierung.....	29
2.5.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung	29
2.5.3.	SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
2.5.4.	Blotten der SDS/Polyacrylamidgele auf PVDF-Membranen	31

2.5.5.	Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern	31
2.5.6.	Chemilumineszente Darstellung der Proteinbanden und semiquantitative Auswertung durch Densitometrie.....	32
2.6.	mRNA-Analyse von hCMEC/D3	33
2.6.1.	Isolierung der Gesamt-RNA.....	33
2.6.2.	RNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.6.3.	Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (PCR)	34
2.6.4.	Quantitative real time RT-PCR	34
2.7.	Blockade des Glukokortikoidrezeptors durch RU486	35
2.8.	Proteasomaktivität.....	36
2.9.	Immunhistochemische Untersuchung von hCMEC/D3.....	38
2.10.	Statistische Analyse.....	39
3.	Ergebnisse	40
3.1.	Immunhistochemische Untersuchung der Expression der <i>Tight Junction</i> -Moleküle Claudin-5 und Occludin in Mäusehirnen nach controlled cortical impact.....	40
3.1.1.	Immunhistochemische Untersuchung der Expression des GRs in Mäusehirnen nach CCI.....	42
3.1.2.	Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Occludin in Mäusehirnen nach CCI	45
3.1.3.	Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Claudin-5 in Mäusehirnen nach CCI	48
3.2.	Einfluss von OGD auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors und der <i>Tight Junction</i> -Proteine Claudin-5 und Occludin sowie auf die Barrierefunktion in hCMEC/D3	49
3.2.1.	Einfluss von OGD auf die Protein- und mRNA-Expression des Glukokortikoidrezeptors	49
3.2.2.	Einfluss von OGD auf die Expression der <i>Tight Junction</i> -Proteine Claudin-5 und Occludin	51
3.2.2.1.	Einfluss von OGD auf die Protein- und mRNA-Expression von Claudin-5.....	51
3.2.2.2.	Einfluss von OGD auf die Protein- und mRNA-Expression von Claudin-5.....	52
3.2.3.	Einfluss von OGD auf die Barrierefunktion in hCMEC/D3.....	53
3.3.	Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors und der <i>Tight Junction</i> -Proteine Claudin-5 und Occludin sowie auf die Barrierefunktion in hCMEC/D3	54

3.3.1.	Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression und Aktivität des Glukokortikoidrezeptors.....	54
3.3.2.	Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression der <i>Tight Junction</i> -Proteine Claudin-5 und Occludin.....	57
3.3.2.1.	Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Protein- und mRNA-Expression von Claudin-5.....	57
3.3.2.2.	Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Protein- und mRNA-Expression von Occludin.....	58
3.3.2.3.	Einfluss des nicht-selektiven Glukokortikoidrezeptorblockers RU486 auf die Proteinexpression von Claudin-5 und Occludin unter Dexamethason und Bortezomib.....	60
3.3.3.	Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Barrierefunktion in hCMEC/D3.....	60
3.4.	Einfluss von Astrozyten auf einen OGD-induzierten Barrierschaden des BHS-Modells basierend auf einer hCMEC/D3-Kokultur.....	62
3.5.	Bortezomib hemmt signifikant die Proteasomaktivität in hCMEC/D3.....	65
4.	Diskussion	67
4.1.	Bortezomib kann im murinen <i>in-vivo</i> Modell den proteasomalen Abbau des GRs nach SHT reversieren und in Kombination mit Dexamethason die BHS-Integrität wiederherstellen.....	68
4.2.	Eine vierstündige Hypoxie in hCMEC/D3 zeigt keinen Einfluss auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors und spiegelt, als <i>in-vitro</i> Modell, die <i>in-vivo</i> gezeigte Situation nicht wider.....	70
4.3.	Eine hypoxiebedingte Barrierschädigung der BHS zeigt sich nicht in hCMEC/D3, manifestiert sich jedoch in Kokultur mit Astrozyten.....	74
4.4.	Dexamethason verbessert die Barriereigenschaften in hCMEC/D3 und zeigt hierbei eine Speziesdifferenz zu murinen Hirnendothelzellen.....	76
4.5.	Rolle der OGD als SHT-Modell und mögliche Erweiterungen für den Ausbau eines umfassenderen SHT-Modells <i>in-vitro</i>	78
5.	Zusammenfassung	81
6.	Literaturverzeichnis	83
7.	Abbildungsverzeichnis	91
8.	Tabellenverzeichnis	93
9.	Abkürzungsverzeichnis	94
	Danksagung.....	

1. Einleitung

1.1. Das Schädel-Hirn-Trauma

Das Krankheitsbild des Schädel-Hirn-Traumas (SHT) stellt ein großes medizinisches, wirtschaftliches und gesellschaftliches Problem dar. Es ist die häufigste Todesursache im Kindes- und jungen Erwachsenenalters in Industrienationen (Shlosberg, Benifla et al. 2010). In Deutschland liegt die Inzidenz des SHTs für alle Schweregrade bei 332/100.000 Einwohner/Jahr. Das ist fast doppelt so hoch wie die Inzidenz von Schlaganfällen in Deutschland (182/100.000 Einwohner/Jahr) (Scheid and Cramon 2010). Führt man sich vor Augen, dass das Durchschnittsalter bei 39 Jahren liegt, sind die Implikationen für das Gesundheitssystem und die Gesellschaft offensichtlich. Eine mögliche Pflegebedürftigkeit des Betroffenen dauert lange und ist entsprechend kostenintensiv. Die jährlichen direkten und indirekten Kosten belaufen sich für Deutschland auf 2,5 Milliarden Euro (Scheid and Cramon 2010). Es gibt wenig evidenzbasierte Therapie und klinische Studien sind schwer zu konstruieren und durchzuführen (Narayan, Michel et al. 2002).

Ein tiefer greifendes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge bei einem SHT und, daraus ableitend, die Entwicklung neuer therapeutischer Verfahren ist ein wichtiges Ziel medizinischer Forschung.

1.2. Die Blut-Hirn-Schranke

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist ein hochempfindliches System im menschlichen Körper. Die Arbeitsfähigkeit des Gehirns ist die Grundfeste des Lebens. Sein vollständiger Funktionsverlust bedeutet unwiederbringlich den Tod des Organismus. Der konstanten Versorgung mit Nährstoffen, dem Schutz des Hirngewebes vor toxischen Substanzen und der Aufrechterhaltung der Homöostase kommt daher eine zentrale

Rolle zu. Diese Aufgaben übernehmen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und die Blut-Liquor-Schranke (Segal 1993; Brown, Davies et al. 2004). Der BHS wird mit ihrer enormen Oberfläche von etwa 20m² pro 1,3kg Hirnmasse und der geringen Diffusionsstrecke zwischen Neuronen und Kapillaren des Hirngewebes eine dominante Stellung in diesem Regulationssystem zu Teil (Abbott, Ronnback et al. 2006).

1.2.1. Histologischer Aufbau der BHS und ihre Funktion

Die Hirnendothelzellen bauen mit ihren *Tight Junctions* (TJ) die eigentliche mechanische Barriere der BHS auf (Rubin and Staddon 1999). Man sollte die BHS jedoch nicht alleine auf die Endothelzellen reduzieren. Neurone, Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen, Perizyten und Extrazelluläre Matrix (EZM) sind in gut strukturierten funktionellen Einheiten organisiert. Sie bilden die „neurovaskuläre Einheit“ (Iadecola 2004), in deren Kontext man die BHS betrachten sollte.

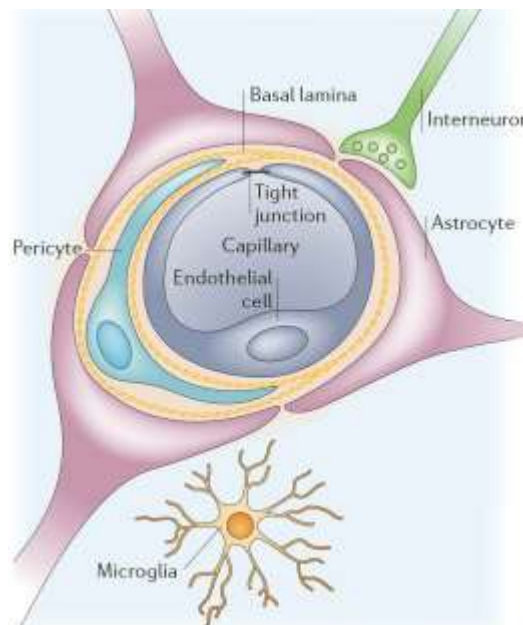


Abbildung 1: Aufbau der BHS, adaptiert nach Abbott et al., 2006, (Abbott, Ronnback et al. 2006) Die Reproduktionserlaubnis des Verlags liegt vor.

Im Zentrum der BHS sind die Endothelzellen lokalisiert. Sie stehen in engem Kontakt zu Perizyten, Astrozyten, Mikroglia, Neuronen und der Extrazellulären Matrix. Diese Vielzahl an Zelltypen bildet ein gut strukturiertes, funktionelles Gebilde, die „neurovaskuläre Einheit“.

Im Zentrum der BHS (siehe Abbildung 1, Seite 2) sind die Endothelzellen mit ihren TJs lokalisiert. Ihnen liegen direkt die Basalmembran und die Perizyten an. Astrozyten stehen durch ihre perivaskulären Endfüßchen ebenfalls in unmittelbarem Kontakt zu den Endothelzellen und vermitteln die zelluläre Verknüpfung zu den Neuronen, welche ihrerseits kaum mehr als etwa 10-40µm von der nächsten Kapillare entfernt liegen (Schlageter, Molnar et al. 1999). Zudem ist das gesamte Zellgefüge von Mikroglia umgeben, den Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS). Aus Zellkulturversuchen gibt es starke Evidenz, dass Astrozyten viele Eigenschaften der BHS beeinflussen. Sie induzieren z.B. die Ausbildung stärkerer TJs (Dehouck, Meresse et al. 1990; Rubin, Hall et al. 1991). Ähnliches konnte auch für Perizyten, Mikroglia und Neuronen gezeigt werden (Ramsauer, Krause et al. 2002; Schiera, Bono et al. 2003; Berezowski, Landry et al. 2004). Die neurovaskuläre Einheit erscheint als hochkomplexes Regulationssystem, in dem die Vielzahl an beteiligten Zellen sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer korrekten Funktionsweise voneinander abhängig zu sein scheinen (Hawkins and Davis 2005; Lok, Wang et al. 2014). Die Integrität dieser neurovaskulären Einheit ist essentiell für die Aufrechterhaltung und adäquaten Funktion der BHS.

Die BHS stellt eine physikalische Barriere dar. Sie verhindert einen parazellulären Transport, wie er in den meisten Endothelien vorkommt (Hawkins and Davis 2005), fast vollständig. Dadurch erzwingt sie einen transzellulären Transport über die Zellmembranen der Endothelzellen. Außerdem erlaubt die Positionierung der TJ eine differenzierte Anordnung an Kanälen, Transportern und Pumpen in der apikalen, luminalen und basolateralen, nicht-luminalen Membran. Beides sind die Voraussetzung für kontrollierte Transportvorgänge. Kleine lipophile Moleküle wie Ethanol oder Barbiturate und Gase wie O₂ oder CO₂ diffundieren entlang ihres Konzentrationsgradienten über die Lipiddoppelmembran. Für den Transport hydrophiler oder größerer Moleküle, wie Glucose, Aminosäuren oder Nucleoside, stehen hochspezialisierte Kanäle, Transporter und Pumpen zu Verfügung. Hierbei handelt es sich meist um primär- oder sekundäraktive, Energie verbrauchende Prozesse, was sich in einer deutlich erhöhten Anzahl an Mitochondrien in zentralennervösen

Endothelzellen gegenüber peripheren Endothelien zeigt (Oldendorf, Cornford et al. 1977). Sehr große Moleküle wie Insulin oder Transferrin werden durch rezeptorvermittelte Transzytose über die BHS transportiert. Das geschieht sehr restriktiv, was sich in der geringen pinozytotischen Aktivität widerspiegelt (Sedlakova, Shivers et al. 1999).

1.2.2. Ultrastruktureller Aufbau der BHS

Die TJs sind als zentrale mechanische Komponente der BHS ein komplexes, interzelluläres Barriersystem. Dieses besteht aus integralen Membranproteinen (z.B. Occludin, Claudine, JAMs), die über eine Vielzahl zytoplasmatischer Plaqueproteine (z.B. *Zonula occludens-1, 2 und 3, Cingulin*), mit dem Zellzytoskelett (Aktin/Vinculin) verbunden sind (siehe Abbildung 2).

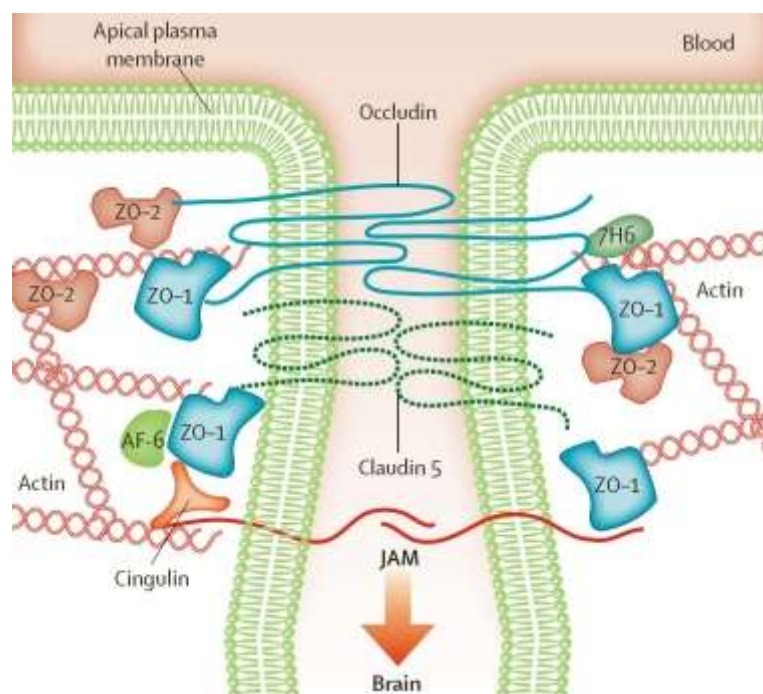


Abbildung 2: Molekularer Aufbau endothelialer *Tight Junctions*, adaptiert nach Neuwelt et al., 2008, (Neuwelt, Abbott et al. 2008). Die Reproduktionserlaubnis des Verlags liegt vor.

Zu den integralen Membranproteinen gehören vor allem Occludin und die Claudine.

Occludin war das erste TJ-Molekül, das vor knapp 30 Jahren entdeckt wurde (Furuse, Hirase et al. 1993). Es ist ein 65kDa großes Phosphoprotein mit vier Transmembrandomänen, einem kurzen zytoplasmatischen N-Terminus und einem längeren zytoplasmatischen C-Terminus, über den es mit den Plaqueproteinen interagiert. Die gewebespezifische Expression von Occludin charakterisiert die epitheliale und endotheliale transzelluläre Permeabilität und korreliert dabei direkt mit dieser (Hirase, Staddon et al. 1997). Die Bedeutung von Occludin ist jedoch nicht alleine in seiner direkten Funktion als Verschlussprotein zu sehen, sondern auch indirekt durch seine regulatorischen Einflüsse, die es zu übernehmen scheint (Hirase, Kawashima et al. 2001; Wolburg and Lippoldt 2002; Hawkins and Davis 2005). Auf Grund seiner großen Bedeutung für die BHS und seiner Expression in Hirnendothelzellen, ist Occludin ein konsistenter Marker für die BHS-Integrität (Furuse, Hirase et al. 1993; Forster, Silwedel et al. 2005).

Die Familie der Claudine besteht aus über 20 Mitgliedern (Ballabh, Braun et al. 2004). Wie Occludin sind sie Phosphoproteine mit vier Transmembrandomänen und zwei zytoplasmatischen Domänen. Ebenso binden sie mit ihrem C-Terminus an Plaqueproteine wie ZO-1, -2 und -3 (Furuse, Fujita et al. 1998) und sind so mit dem Zytoskelett verbunden. Aus der Großen Familie der Claudine werden in der BHS vor allem Claudin-3, Claudin-5 und Claudin-12 exprimiert (Reinhold, Rittner et al. 2017). Während die Expression von Claudin-1 lange Zeit noch diskutiert wurde (Liebner, Fischmann et al. 2000), gibt es dafür mittlerweile starke Evidenz (Neuhaus, Wirth et al. 2008; Pfeiffer, Schafer et al. 2011). Claudine sind maßgeblich an der geringen parazellulären Permeabilität und den hohen transendothelialen elektrischen Widerständen, die Hirnendothelien aufbauen, beteiligt (Liebner, Kniesel et al. 2000; Wolburg and Lippoldt 2002). Wie Occludin ist auch Claudin-5 ein konsistenter Marker für die Integrität der BHS.

Zur Gruppe der TJs gehören außerdem die ca. 40kDa großen Junctionalen Adhäsionsmoleküle JAM-A, JAM-B und JAM-C (Palmeri, van Zante et al. 2000) sowie das

endothelial selective adhesion molecule (ESAM) (Hirata, Ishida et al. 2001; Nasdala, Wolburg-Buchholz et al. 2002). Beide gehören zur Immunglobulinsuperfamilie und sind an der Bildung und Aufrechterhaltung der BHS beteiligt (Palmeri, van Zante et al. 2000; Hirata, Ishida et al. 2001).

Die beschriebenen Membranproteine sind mit einem großen Komplex aus Proteinen verbunden, die zahlreiche Protein-Protein-Interaktionsdomänen besitzen. Diese Komplexe liegen plaqueartig, direkt unterhalb der Zellmembran, daher der Name zytoplasmatische Plaques. Zu den Adapterproteinen gehören ZO-1, -2, -3 (*Zonula occludens 1, 2, 3*) und CASK (*Ca²⁺-dependent serine kinase*), sowie Cingulin und JACOP (*junction-associated coiled-coil protein*). Sie sind mit zahlreichen Signal- und Regulationsproteinen wie MUPP1 (*multi-PDZ-protein 1*), MAGI-1, -2, -3 (*membrane associated guanylate kinase 1, -2,-3*) und ZONAB (*ZO-1-associated nucleic acid-binding protein*) assoziiert. Alle diese Bindungs-, Signal- und Regulationsproteine kontrollieren und vermitteln die Kopplung der integralen Membranproteine wie Occludin und Claudine an das Aktin/Vinculin Zytoskelett der humanen Hirnendothelzellen.

Die Zell-Zell-Interaktion durch TJ wird durch *Adherens Junctions* (AJ) stabilisiert. In Epithelzellen sind TJs und AJs strikt voneinander getrennt. In Endothelien hingegen sind sie stark vermischt (Abbott, Ronnback et al. 2006).

Eines der wichtigsten endothelspezifischen AJ-Molekülen ist das VE-Cadherin. Durch Homodimerisierung verzahnt es die Endothelzellen ähnlich eines Reisverschlusses (Brasch, Harrison et al. 2011). Über die Gruppe der Catenine steht es mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung (Bazzoni and Dejana 2004). Die große Bedeutung des VE-Cadherins verdeutlicht eine knock-out Studie an Mäusen. VE-Cadherin – defiziente Mäuseembryonen verstarben innerhalb der ersten fünf Tage der Embryonalentwicklung (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999).

Neben VE-Cadherin ist das *platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1, CD31) ein hoch endothelspezifisches AJ-Molekül. In der Embryonalentwicklung ist es einer der frühesten Endothelmarker und spielt eine bedeutende Rolle, sowohl in der Vaskulogenese, als auch in der Angiogenese des sich entwickelnden Embryos (Baldwin,

Shen et al. 1994). Obwohl PECAM-1 in CD31-defizienten erwachsenen Mäusen funktionell eher überflüssig erscheint (Duncan, Andrew et al. 1999), ist es dennoch ein hochspezifischer Marker für Hirnendothelzellen.

1.3. Pathophysiologische Vorgänge an der BHS nach SHT

Das Gehirn ist unter vielen Gesichtspunkten wie Anatomie, zellulärer Organisation und Funktion ein sehr komplexes Organ. Die pathophysiologischen Vorgänge an der neurovaskulären Einheit sind heterogen und ebenso komplex; die physiologische Antwort auf eine Hirnschädigung facettenreich. Bedingt wird das zum einen durch die große Anzahl an interagierenden Systemen der neurovaskulären Einheit, wie zerebrale Endothelzellen, Astrozyten, Perizyten, Mikroglia, Neuronen und der Extrazellulären Matrix. Zum anderen durch die verschiedenen zeitlichen Phasen der einzelnen pathophysiologischen Mechanismen, die bei einem SHT eine Rolle spielen.

Diese Vorgänge laufen vereinfacht in zwei Phasen ab. Die initiale Schädigung des Gehirns ist eine mechanische Schädigung und beginnt sofort mit dem Trauma. Die pathoanatomischen Konsequenzen dieses Primärschadens sind Epi- (EDH) und Subduralhämatome (SDH), Subarachnoidalblutungen (SAB), intrazerebrale Kontusionsblutungen (ICB) und diffuse axonale Scherverletzungen (DAI) der Nervenfasern. Eine direkte therapeutische Intervention ist in diesen Fällen schwierig. Diffuse axonale Scherverletzungen sind keinerlei therapeutischem Ansatz zugänglich. Eine Intrazerebrale Kontusionsblutung wird in den wenigsten Fällen entlastet. Dies geschieht nur dann, wenn sie stark raumfordernd ist. Bei einem Epi- und Subduralhämatom hat man zwar die Möglichkeit, die Hämatome operativ zu entlasten, jedoch ist dies eine rein symptomatische Therapie, die nicht die Ursache behandelt. Lediglich bei der interventionellen oder chirurgischen Versorgung einer Subarachnoidalblutung verfolgt man eine echte therapeutische Intention. Daher gelten die Pathologien des Primärschadens als kaum behandelbar, jedoch als präventabel (Shlosberg, Benifla et al. 2010).

Etwa 24-72h nach dem Initialtrauma addiert sich ein indirekter Sekundärschaden auf die Primärschäden. Sowohl tierexperimentelle als auch klinische Daten zeigen, dass ein Zusammenbruch der BHS nach SHT stattfindet (Shapira, Setton et al. 1993; Barzó, Marmarou et al. 1996; Strbian, Durukan et al. 2008; Tomkins, Shelef et al. 2008). Es gibt eine Reihe von Arbeiten, welche der vaskulären Integrität, vor allem der gestörten Permeabilität der BHS, eine zentrale Rolle in der Mediation des Hirnschadens zusprechen (Unterberg, Stover et al. 2004; Hawkins and Davis 2005; Abbott, Ronnback et al. 2006; Tomkins, Shelef et al. 2008). SHT-Modelle in Ratten propagieren einen biphasischen Anstieg der BHS-Permeabilität für Albumin und andere hochmolekulare Substanzen nach 4-6h und nach 2-3 Tagen nach SHT (Shapira, Setton et al. 1993; Hicks, Baldwin et al. 1997).

Die gesteigerte Durchlässigkeit der BHS unter pathologischen Bedingungen scheint maßgeblich von den funktionellen Veränderungen an der BHS abzuhängen und weniger durch das mechanische Aufreißen der Gefäßwand (Chodobski, Zink et al. 2011). Wie diese funktionellen Veränderungen auf molekularer Ebene ablaufen, ist weiterhin nicht genau geklärt.

Der Zusammenbruch der BHS ist ein multifaktorielles Geschehen (siehe Abbildung 3, nächste Seite). Durch das SHT kommt es durch Scherverletzungen (Rodríguez-Baeza, Reina-de la Torre et al. 2003) zur Schädigung von Blutgefäßen mit Störungen der Autoregulation des zerebralen Blutflusses (Rangel-Castilla, Gasco et al. 2008) und einer Schädigung des Endothels. Aus diesem Geschehen resultieren Vasospasmen (Lee, Martin et al. 1997), eine gesteigerte Koagulopathie (Nekludov, Antovic et al. 2007) und eine irreguläre NO-Sekretion (Cherian, Hlatky et al. 2004). Konsekutiv wird die lokale Minderperfusion verstärkt. Die hieraus resultierende Gewebshypoxie führt indirekt, in Kombination mit dem primären Trauma, zur Schädigung des Hirnparenchyms. Es kommt lokal zur metabolischen Imbalance (Shlosberg, Benifla et al. 2010) und zur extrazellulären Akkumulation exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat, was zu Exzitotoxizität führen kann (Faden, Demediuk et al. 1989). Solche Zustände können die strukturelle BHS-Integrität reduzieren und so den lokalen Zusammenbruch der BHS

erleichtern (Fischer, Wobben et al. 2002). Ischämiebedingte Änderung neuronaler Membranpotentiale und der Verlust von Effluxpumpen in den Endothelzellen (Teichberg, Cohen-Kashi-Malina et al. 2009) können ebenfalls zum Zusammenbruch der BHS beitragen.

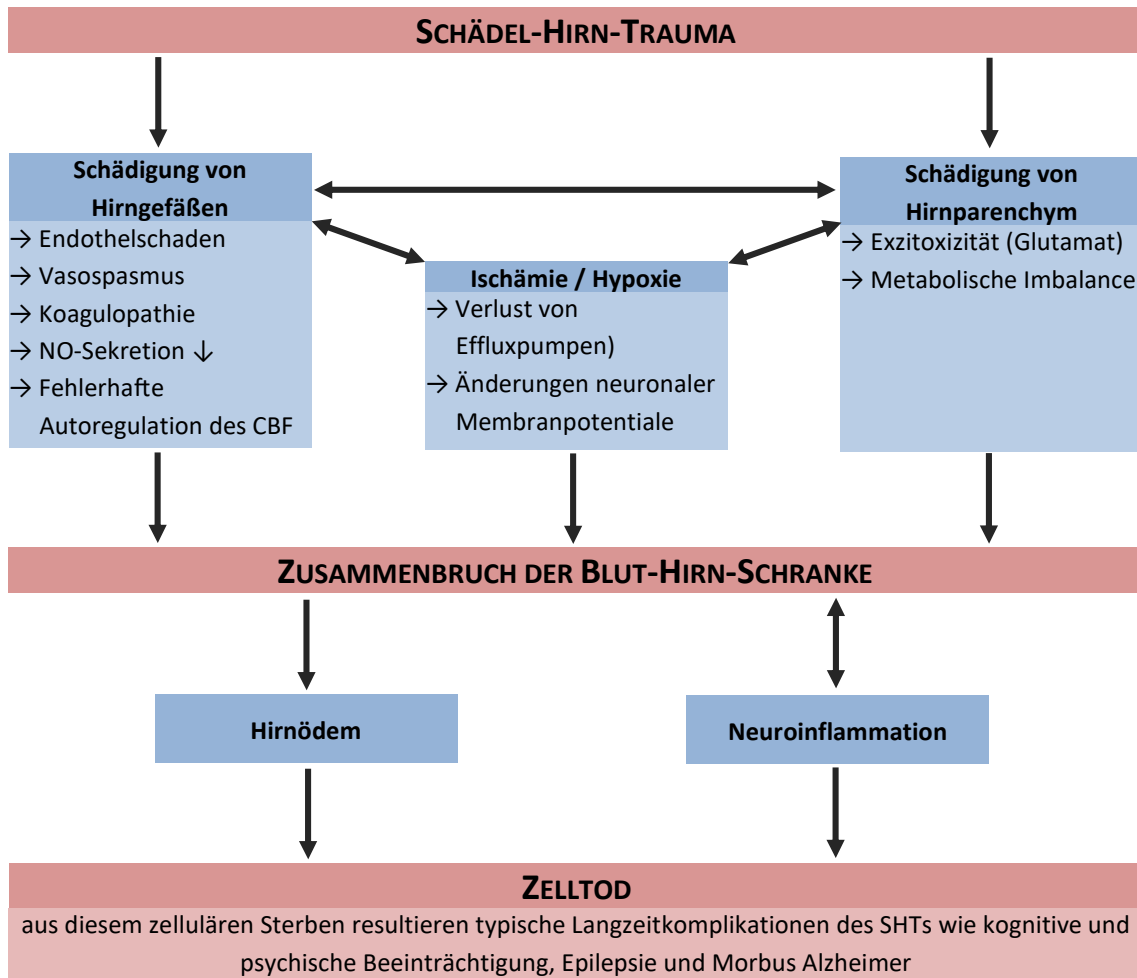


Abbildung 3: Pathophysiologische Vorgänge an der Blut-Hirn-Schranke nach Schädel-Hirn-Trauma.

Aus der primären Schädigung der BHS folgen verzögert Sekundärschäden wie Hirnödem und Neuroinflammation. Diese resultieren entweder aus einer Störung der funktionellen Integrität der neurovaskulären Einheit oder einer strukturellen Schädigung des TJ-Komplexes der BHS.

Die Bildung eines Hirnödems nach SHT mit konsekutivem Anstieg des intrakraniellen Druckes ist eine der häufigsten und ernsthaftesten Komplikationen nach SHT. Es ist mit einem erhöhten Risiko für Mortalität und bleibenden neurologischen Schäden assoziiert

und ein valider Vorhersagewert für ein schlechtes Patienten-Outcome (Donkin and Vink 2010). Nach einem SHT sind zwei Arten von Hirnödemen beschrieben: Das vasogene und das zytotoxische Hirnödem (Klatzo 1994).

Das zytotoxische Hirnödem basiert auf einem Zusammenbruch des Zellmetabolismus. Die Na^+ / K^+ -ATPase ist durch den zellulären Energiemangel nicht mehr in der Lage, den transmembranären Ionengradienten aufrechtzuerhalten. Es kommt zum osmotischen Einfluss von Wasser aus dem Intravasal- und Extrazellulärraum in die Zelle. Unter den Zellen der neurovaskulären Einheit scheinen Astrozyten am stärksten zur Ausbildung eines zytotoxischen Hirnödems beizutragen (Liang, Bhatta et al. 2007).

Das vasogene Hirnödem beruht auf einem Zusammenbruch der BHS. Auf Grund der vaskulären Leckage kann der hydrostatische Druckgradient zwischen intravasaler Flüssigkeit und extravasaler/extrazellulärer Flüssigkeit nicht mehr bewahrt werden. Es kommt zum Wassereinfluss ins Hirnparenchym, unter dem die einzelnen Zellen auseinanderschere und ihren Kontakt zueinander verlieren. Funktion und Überleben der Neuronen, Astrozyten etc. kann so nicht länger gewährleistet werden.

Frühere Theorien, die das Gehirn als immunprivilegiertes Organ ansehen, sind widerlegt. Inflammatorische Prozesse spielen eine bedeutende Rolle in Erkrankungen des ZNS, wie Multiple Sklerose, Alzheimer etc. (Skaper 2007; Blecharz, Haghikia et al. 2010). Auch nach SHT spielen neuroinflammatorische Prozesse eine bedeutende Rolle (Chodobski, Zink et al. 2011). In Tiermodellen zeigte sich das Einwandern peripherer Neutrophiler Granulozyten in das ZNS. Dabei korrelierte dieser Vorgang zeitlich mit dem Zusammenbruch der BHS (Holmin and Mathiesen 2000). Auch Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und T-Helfer-Zellen finden sich im Hirngewebe nach SHT. Ihre Migration in die verletzten Hirnareale wird durch die Expression des endothelialen intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) vermittelt, welches in experimentellen SHT-Modellen hochreguliert ist (Chen, Shi et al. 2008). Dabei korreliert der Spiegel an löslichem ICAM-1 im Liquor von Patienten mit schwerem SHT mit dem Ausmaß der BHS-Schädigung (Pleines, Stover et al. 1998). Leukozyten generieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS), aktivieren die Mikroglia und erhöhen die Expression von

Matrix-Metallo-Proteasen (MMP). Diese Faktoren können dazu beitragen, die Permeabilität der BHS zu erhöhen. So führen erhöhte ROS-Level in Hirnendothelzellkultur zu einem verstärkten Abbau von Occludin und Claudin-5 (Schreibelt, Kooij et al. 2007).

Nach dem initialen Zellsterben durch den primären Schaden durch das SHT wird in Mensch und Tier eine zweite Welle des Zellsterbens durch die Aktivierung von Apoptosesignalwegen beobachtet (Rink, Fung et al. 1995; Uzan, Erman et al. 2006). Interessanterweise korreliert der Zeitverlauf der Apoptoseaktivierung mit dem Auftreten von Neuroinflammation und Ausbildung eines Hirnödems (siehe Abbildung 3). Das propagiert, dass beiden Prozesse wichtige Initiatoren des Zelltods nach SHT darstellen (Zhang, Chen et al. 2005). Langzeitkomplikationen eines SHTs wie kognitive oder psychische Beeinträchtigungen, Epilepsie oder Morbus Alzheimer (Ruttan, Martin et al. 2008) basieren auf diesem neuronalen Sterben (Shlosberg, Benifla et al. 2010).

1.4. Die Glukokortikoide und der Glukokortikoidrezeptor – ihre molekulare Wirkung und Einfluss auf die BHS

Glukokortikoide (GK) gehören mit den Mineralokortikoiden, den Sexualhormonen und dem Calciferol zu den Steroidhormonen. Sie alle gehen in einem mehrstufigen Syntheseprozess aus dem Cholesterin hervor. GK werden größtenteils in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet. Neben dem physiologisch vorkommenden Cortisol (Hydrocortison) gibt es eine Reihe synthetisch hergestellter GK, wie Prednisolon oder Dexamethason, die sich maßgeblich in ihrer biologischen Potenz, ihrer biologischen Halbwertszeit und ihrer Affinität zum Mineralokortikoidrezeptor unterscheiden.

Auf Grund ihres lipophilen Grundgerüsts können GK über die Zellmembran diffundieren. Der Glukokortikoid-Rezeptor (GR) ist nicht membranständig, sondern befinden sich frei löslich im Zytosol. Dort liegt er als Monomer vor und ist mit einem großen Multi-Protein-

Chaperon-Komplex assoziiert (Nixon, Andrew et al. 2013). Dieser Komplex blockiert zum einen die DNA-Bindungsstellen (Baulieu 1987), zum anderen hält er den GR in einer Konformation, die eine hoch-affine Ligandenbindung zulässt (Echeverria and Picard 2010). Nach der Bindung des GKs an den GR zerfällt dieser Komplex. Es kommt zur Homodimerisierung (Bledsoe, Montana et al. 2002) und der aktivierte GR-Komplex wandert in den Zellkern ein (Dittmar, Demady et al. 1997), um dort seine facettenreiche Wirkung zu entfalten.

Als Mitglied der Kernrezeptor-Superfamilie besteht der GR aus drei Hauptregionen (siehe Abbildung 4).

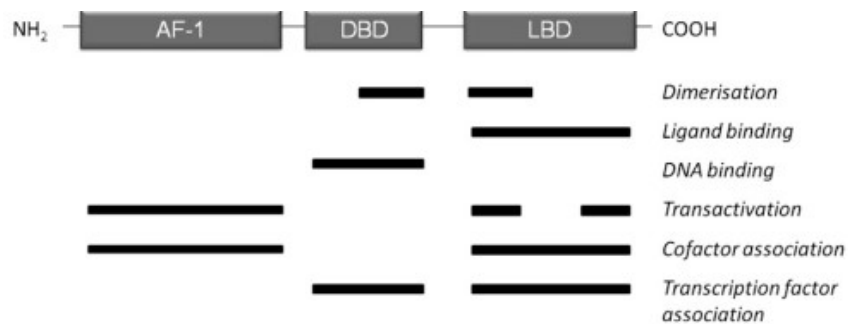


Abbildung 4: Funktionelle Struktur des Glukokortikoidrezeptors, adaptiert nach Nixon et al., 2013, (Nixon, Andrew et al. 2013). Die Reproduktionserlaubnis des Verlags liegt vor.

Einer sehr variablen, wenig konservierten Amino-terminalen Domäne (NTD), einer hochkonservierten zentralen DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer gut konservierten C-terminalen Liganden-Bindungsdomäne (LBD).

Innerhalb der NTD befindet sich die AF-1 Region (*activation function 1*), die eine Schlüsselrolle bei der transkriptionellen Aktivierung spielt, in dem sie mit Transkriptionsfaktoren wie TBP (*TATA-binding protein*) und CBP (*CREB-binding protein*) interagiert (Kumar and Thompson 2005). Die LBD/AF-2 ist ebenfalls an der Bindung von Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren sowie die Bindung des Liganden verantwortlich. Durch die Bindung des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung, die

maßgeblich die *Downstream*-Effekte über die Rekrutierung von Histon-Acetylasen beziehungsweise Histon-Deacetylasen beeinflusst. So präferiert die GR-Konformation nach Dexamethasonbindung eine Interaktion mit TIF2 (*transcriptional mediators/intermediary factor 2*), was eine Bindung an die Promotorregionen erlaubt. Bindet hingegen der GR-Blocker RU486 (Mifepriston) an den GR, so nimmt dieser eine Konformation ein, die eine höher Affinität zu NCoR (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) besitzt und so die Kopplung an Promotorregionen eher verhindert (Nixon, Andrew et al. 2013). Die Bindung des Rezeptors an die DNA wird durch die DBD vermittelt. In ihrem Zentrum stehen zwei Zink-Finger Domänen, die an ihre jeweilige Promotorregion, den *Glukokortikoid Responsive Elements* (GRE), binden. Durch diese Bindung kann nun die Transkription des jeweiligen Zielgens aktiviert oder unterdrückt werden (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995; Sever and Glass 2013).

Als Dreh- und Angelpunkt in der Stressreaktion des menschlichen Organismus beeinflussen GK physiologischerweise Stoffwechsel und Energieproduktion, Wasser- und Elektrolythaushalt, das Nervensystem, das Immunsystem und das Herz-/Kreislaufsystem.

Betrachtet man den Einfluss von GK auf die BHS, ist festzuhalten, dass sie in der Lage sind, die BHS effektiv zu stabilisieren und neoplasiebedingte oder inflammatorische Hirnödeme zu reduzieren (Reichardt, Gold et al. 2006). So wurde die Einführung der Dexamethasonbehandlung peritumorale Hirnödeme als „*one of the greatest translational contributions in the history of neurosurgery*“ bezeichnet (McClelland and Long 2008). In molekularen Analysen konnte gezeigt werden, dass GK die Stabilisierung über die Hochregulierung der TJ-Moleküle Occludin und Claudin-5 (Forster, Silwedel et al. 2005; Forster, Burek et al. 2008; Harke, Leers et al. 2008) und des AJ-Moleküls VE-Cadherin (Blecharz, Drenckhahn et al. 2008) erzielen. Hierdurch wird die mechanische Barriere der BHS verstärkt. Durch die GK-induzierte verstärkte Expression der *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP-1 und TIMP-3) (Förster, Kahles et al. 2007; Rosenberg 2009) wird der vermehrte Abbau der Extrazellulären Matrix (EZM) als wichtige Komponente der BHS durch Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) verhindert.

VEGF ist durch die Öffnung der BHS ein wichtiger Mediator des Hirnödems nach Ischämie-Reperfusion. GK wirken auch durch die verminderte Produktion von VEGF barriestabilisierend (Paul, Zhang et al. 2001).

Durch posttranskriptionelle Modifikation der GR-mRNA können zwei verschiedene Splicevarianten GR α und GR β mit diametraler Wirkung generiert werden. Während die α -Variante die Hauptform des GR darstellt, wird die β -Variante nur sehr restriktiv gebildet. Bei ihr ist die LBD so verändert, dass sie nicht mehr in der Lage ist, Dexamethason oder einen anderen Liganden zu binden. Ihre DNA-Bindungsfähigkeit besitzt sie weiterhin ohne jedoch in der Lage zu sein, die Zielgene zu aktivieren. GR β fungiert somit als GR α -Inhibitor (Nixon, Andrew et al. 2013). In Anbetracht, dass GR α die absolut dominante Splicevariante ist und alle GK-Effekte über GR α vermittelt werden, bezieht sich die Bezeichnung „GR“ in dieser Arbeit präziser auf GR α .

1.5. Die Grundlagen des Ubiquitin-Proteasom-Systems und der Proteasom-Inhibitor Bortezomib

Das Proteasom ist ein großer intrazellulärer Multienzymkomplex mit Proteaseaktivität. Es befindet sich sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleus. Das Proteasom ist das Hauptsystem des nicht-lysosomalen, ATP-abhängigen Abbaus intrazellulärer Proteine (Hideshima, Richardson et al. 2011). Es ist besonders wichtig für die intrazelluläre Proteinhomöostase und dient dem Abbau fehlerhafter oder zytotoxischer Proteine (Hideshima, Richardson et al. 2011).

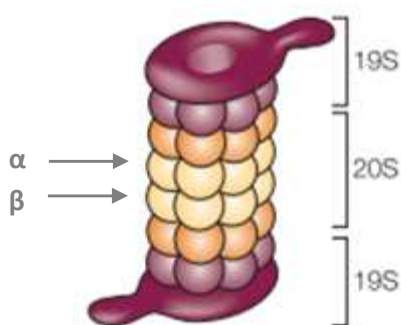


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines 26S Proteasoms, modifiziert nach Adams et al., 2004, (Adams 2004). Die Reproduktionserlaubnis des Verlags liegt vor.

In eukaryontischen Zellen liegt das Proteasom als 26S Proteasom vor. Es besteht aus einer katalytischen 20S Untereinheit und zwei regulatorischen 19S Untereinheiten. Die innere 20S Untereinheit bildet einen Zylinder aus vier Ringen. Jeder Ring ist aus sieben Untereinheiten aufgebaut. Die äußeren α Untereinheiten flankieren von beiden Seiten die beiden β Untereinheiten, die ebenfalls aus sieben Untereinheiten aufgebaut sind (Adams 2004). Drei dieser sieben Untereinheiten sind es, die die eigentliche katalytische Eigenschaft des Proteasoms besitzen. Die Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ zeigen Protease-Aktivität. Sie weisen jeweils eine andere Substratspezifität auf, welche als Chymotrypsin-ähnlich für die $\beta 5$, Trypsin-ähnlich für die $\beta 2$ und Caspase-ähnlich, oder genauer *post glutamyl peptidyl hydrolytic*-ähnlich für die $\beta 1$ Untereinheit charakterisiert wurden (Micale, Ettari et al. 2013). An beiden Enden der 20S Untereinheit sitzen die 19S wie Kappen auf. Sie besitzen regulatorische Funktion und erkennen Polyubiquitinmuster, durch welche intrazelluläre Proteine für den proteasomalen Abbau markiert werden. Durch ATP-abhängige Hydrolyse entfalten die 19S Untereinheiten die Proteine und erleichtern so den Eintritt in das Innere des Proteasoms (Adams 2004).

Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Velcade®) wurde 2003 von der amerikanischen Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde, *Food and Drug Administration* (FDA), zur Therapie des therapierefraktären und/oder rezidierten Multiplen Myeloms zugelassen. Bortezomib inhibiert reversibel primär die katalytische Untereinheit mit Chymotrypsin-ähnlicher Proteaseaktivität (LeBlanc, Catley et al. 2002). Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich in einem murinen Schlaganfallmodell (*transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO*) zeigen, dass Hypoxie den proteasomalen Abbau des GRs induziert und dadurch eine reduzierte GK-Sensitivität resultiert. Diese GK-Resistenz konnte durch die Blockade des Proteasoms durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib überwunden werden (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011).

1.6. Ziele der Arbeit

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) hat eine große klinische und ökonomische Bedeutung und das weltweit (Scheid and Cramon 2010; Shlosberg, Benifla et al. 2010). Eine der relevantesten Komplikationen nach SHT ist die Ausbildung eines Hirnödems, das maßgeblich das Überleben und die Lebensqualität der Patienten mitbestimmt (Donkin and Vink 2010). Glukokortikoide (GK) werden seit mehr als 50 Jahren erfolgreich in der Therapie neoplastischer und inflammatorischer Hirnödeme eingesetzt (Hall 1992; Reichardt, Gold et al. 2006). Ihr Einsatz ist effektiv und kostengünstig. GK können die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stabilisieren, indem sie die Bildung von Strukturproteinen der BHS induzieren (Forster, Silwedel et al. 2005; Blecharz, Drenckhahn et al. 2008; Forster, Burek et al. 2008). So kann die vermehrte Expression von VE-Cadherin, Occludin und Claudin-5 in einer Reduktion des Ödemvolumens resultieren (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Trotz der experimentellen und klinischen Evidenz für die Wirksamkeit von GK im Rahmen inflammatorischer und neoplastischer Prozesse im zentralen Nervensystem, fehlt diese für Patienten mit ischämischen Hirnverletzungen wie Schlaganfall oder SHT, wie z.B. die *CRASH*-Studie u.a. zeigten (Poungvarin 2004; Roberts, Yates et al. 2004). Laut der *Brain Trauma Foundation* können GK nach schwerem SHT weder das Patienten-Outcome verbessern, noch den intrakraniellen Druck senken. Daher ist in den aktuellen amerikanischen Leitlinien für das Management von schweren Kopfverletzungen der Einsatz von GK nicht empfohlen (Bratton, Chestnut et al. 2007). Die molekularen Mechanismen, die dieser Wirkdiskrepanz zu Grunde liegen, sind weitgehend unverstanden.

Eine Voraussetzung für die Wirksamkeit von GK ist das Vorkommen von funktionellen Glukokortikoidrezeptoren (GRs). GRs werden in sehr vielen Zellen exprimiert, darunter Hirnendothelzellen. Da die Expressionslevel von GR mit ihrer transkriptionellen Aktivität korrelieren (Zhou and Cidlowski 2005), ist ihre Regulation wichtig. Das geschieht u.a. durch posttranslationelle Modifikation und Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Wallace and Cidlowski 2001). Dieser Abbau ist zum einen als Regulationsmechanismus im Sinne eines negativen Feedbacks eine physiologische

Notwendigkeit, zum anderen kann er unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen transkriptionelle Signalwege, die durch GK induziert werden, limitieren und so die GK-Funktion kompromittieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich in einem murinen Schlaganfallmodell (*transient middle cerebral artery occlusion*, tMCAO) zeigen, dass Hypoxie den proteasomalen Abbau des GRs induziert, was zum Verlust der Transkriptionsaktivität führt und dadurch eine reduzierte GK-Sensitivität resultiert. Diese GK-Resistenz konnte durch die Blockade des Proteasoms durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Velcade®) überwunden werden (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Interessanterweise führen verschiedene experimentelle SHT-Schweregrade zu einem unterschiedlich starken Abfall der GK-Sensitivität (Taylor, Rahman et al. 2010). Diese Entdeckungen lassen die Vermutung zu, dass auch nach SHT verminderte GR-Level, durch einen gesteigerten proteasomalen Abbau, die Resistenz gegen eine Dexamethasontherapie vermitteln, die im klinischen Rahmen beobachtet wird.

Daher wurde in dem *in-vivo* Teil der Dissertation der Einfluss einer Kombinationstherapie aus Dexamethason und dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib auf die Expression des GR und verschiedener TJ-Moleküle immunhistochemisch in einem murinen SHT-Modell untersucht.

In dem *in-vitro* Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen dieser Kombinationstherapie auf humane Hirnendothelzellen unter funktionellen (Transendothelialer Widerstand und Proteasomaktivität) und strukturellen (Expression von GR und verschiedenen TJ-Molekülen auf Protein- und RNA-Ebene) Aspekten nach Sauerstoff- und Glucose-Mangel getestet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Testsubstanzen

Für die Arbeit mit hCMEC/D3 Zellen wurden folgende Testsubstanzen verwendet:

Tabelle 1: Verwendete Testsubstanzen für Zellkulturuntersuchungen

Substanz	Hersteller	Katalognummer	Konzentration
Dexamethason	RBI	TOW-1298-2	100nM
Bortezomib	Zentralapotheke der Uniklinik Würzburg		10nM
Mifepriston (RU486)	Sigma-Aldrich	M8046	100nM

Das Glukokortikoid Dexamethason und der Steroidrezeptorblocker Mifepriston (RU486) wurden in Ethanol gelöst und als 100µM Stocklösung angesetzt. Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib wurde von der Zentralapotheke der Uniklinik Würzburg zur Verfügung gestellt. Für die Stocklösung wurde 2,6mM Bortezomib im Verhältnis 1:260 in EBM-2 Medium (Lonza, CC-3156) verdünnt.

2.1.2. Verwendete Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffer und ihre Zusammensetzung

Lösungen / Puffer	Zusammensetzung
10X Running Buffer	25mM Tris 250mM Glycin 0,1% SDS ad 2L H ₂ O
4X Lämmli	8% SDS 40% Glycerol 0,004% Bromophenol 0,25M Tris HCL, pH 6,8
ECL-I	1ml 250mM Luminol (in DMSO) 440µL 90mM p-coumaric-acid (in DMSO) 5mL 1M Tris (pH 8,8) mit H ₂ O auf 50mL Gesamtvolumen auffüllen
ECL-II	5mL 1M Tris (pH 8,8) 32µL H ₂ O ₂ mit H ₂ O auf 50mL Gesamtvolumen auffüllen
Proteasomactivitybuffer	10mM Tris-HCL mit pH 7,8 1mM ETDA 0,5mM Dithiothreitol 0,5% Triton X-100 5mM MgCl ₂
RIPA Puffer	50mM Tris (pH 8,9) 150mM NaCl 0,1% SDS 0,5% Natriumdeoxycholate 1% NP40
Semidry Buffer	48mM Tris 39mM Glycin 1,3mM SDS ad 1L H ₂ O bei pH 8,8 bis 9,2
Towbin Buffer	25mM Tris 192mM Glycin 20% Methanol 0,1% SDS mit H ₂ O auf 2L Gesamtvolumen auffüllen

2.1.3. Verwendete Kulturmedien

Tabelle 3: Verwendete Kulturmedien

Verwendungszweck	Bezeichnung	Kulturmedium plus Zusätze [Vol.-%]	Firma, Katalog- nummer
Einfriermedium	EBM-2	EBM-2 Medium + 10% DMSO + 20% FCS	Lonza, CC-3156
Anzüchtmedium	EBM-2++	EBM-2 Medium + EGM-2 SingleQuots: 0,4% rhFGF-B 0,1% R ³ -IGF-1 0,1% Ascorbinsäure 0,1% VEGF 0,1% rhEGF 0,1% GA-1000 0,1% Heparin gemäß Hersteller sowie: 2% ssFCS 0,5% P/S	Lonza, CC-3156 Lonza, CC-4176
Reduktionsmedium	EBM-2	EBM-2 Medium + 0,2% ssFCS	Lonza, CC-3156
OGD Medium	DMEM ohne Glucose	DMEM glucosefrei + 1% ssFCS	Gibco, 11966
Medium der Normoxie- kontrollgruppe	DMEM mit Glucose	DMEM + Glucose + 1% ssFCS	Sigma, D5796
Reoxygenierungs- medium	EBM-2	EBM-2 Medium + 0,2% ssFCS	Lonza, CC-3156

2.1.4. Liste der verwendeten Chemikalien

Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Firma, Katalognummer
Aktivkohle	Merck, 102184
APS	Roth, 9592.3
Aqua dest.	Braun
Bromophenol	AppliChem, A2331
DAPI	Roth, 6335.1
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, D9779
EDTA	Merck, 324503
Ethanol	AppliChem, A3678
Glycerol	AppliChem, A1123
Glycin	AppliChem, A1067
H₂O₂ (30%)	Sigma-Aldrich, H1009
Inhibitor Cocktail complete mini	Roche, 11836153001
Luminol	Sigma-Aldrich, Fluka 09253
Methanol	Sigma-Aldrich, 32213
Milchpulver	Roth, T145.3
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, D6750
Natriumfluoreszin	Sigma-Aldrich, F6377
NP40	AppliChem, A1694
PBS Lösung	BiochromAG, L1825
PBS Tabletten	Sigma-Aldrich, P4417
p-coumaric-acid	Sigma-Aldrich, C-900
PMSF	Fluka, 78830
Proteaseinhibitor Cocktail, cComplete	Sigma-Aldrich, 11836153001
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, 3029.1
SDS	Sigma-Aldrich, 862010
TEMED	Sigma-Aldrich, T9281
Tris	Merck, 108382
Triton X-100	Sigma-Aldrich, T8787
Tween 20	Sigma-Aldrich, P2287
β-Mercaptoethanol	Merck, 805740

2.2. Immunhistochemische Untersuchungen von Mäusehirnschnitten

2.2.1. Kryoschnitte

Alle Versuchstiere (Mäuse) und die hieraus hergestellten kryokonservierten Gewebeschnitte wurden freundlicherweise von Professor Dr. med. Serge Thal, Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinik Mainz, zur Verfügung gestellt. Die Versuchstiere wurden mit Isoflurane in Maskennarkose unter Spontanatmung mit einer $FiO_2 = 0,4$ narkotisiert. Um tierexperimentell ein SHT zu simulieren, wurde ein CCI-Modell mit folgender Konfiguration verwendet (Thal, Wyschkon et al. 2008):

- Einschlaggeschwindigkeit: 8m/s
- Einschlagdauer: 150ms
- Eindringtiefe: 1mm
- Durchmesser des Schlagbolzens: 3mm

Nach CCI wurden die Tiere in vier Behandlungsgruppen eingeteilt.:

1. Kontrollgruppe: NaCl
2. Dexamethason-Gruppe: 10mg/kg KG
3. Bortezomib-Gruppe: 0,2mg/kg KG
4. Dexamethason + Bortezomib-Gruppe: siehe Punkt 2 und 3

In allen Behandlungsgruppen erfolgte die medikamentöse Therapie als subkutane Einmalgabe 30 min nach CCI. Der Überlebenszeitraum betrug 24h. Bei den Kryoschnitten handelte es sich um Horizontalschnitte. Das Einverständnis der Tierschutzkommission lag vor (Protokollnummer: G07-1-021, Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz).

2.2.2. Indirekte Immunfluoreszenz

Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde das qualitative Vorkommen des GRs, Occludin und Claudin-5 in CCI-geschädigtem und gesundem Mäusehirngewebe untersucht. Als Endothelmarker diente das platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), welches sich in den Versuchen als inert gegen regulatorische Einflüsse der Versuchsbedingungen zeigte.

Bei -80°C gelagerte Kryoschnitte wurden für die Analyse des GRs und Claudin-5 langsam bei RT aufgetaut und für 5min mit -20°C vorgekühltem Aceton in einem eisgekühlten Färbetrog permeabilisiert und fixiert. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und mit 1% BSA/PBS für 5min gewaschen. Nach dem Blocken mit 5% normal swine serum (NSS) in 1% BSA/PBS für 20min bei RT wurden die Kryoschnitte mit den primären Antikörpern in 1% BSA/PBS bei 4°C über Nacht in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3-mal für jeweils 5min mit 1% BSA/PBS gewaschen, bevor sie mit den sekundären Antikörpern in 1% BSA/PBS für 1h bei RT in Dunkelheit inkubiert wurden. Danach wurden sie wieder 3-mal für jeweils 5min mit 1% BSA/PBS gewaschen.

Kryoschnitte für die Analyse von Occludin wurden ebenfalls bei -80°C gelagert und langsam bei RT aufgetaut aber mit 3,5% Formaldehyd für 10min bei RT fixiert. Dann wurden sie 3-mal für jeweils 5min mit 1% BSA/PBS gewaschen und für 2h bei RT mit 1% Triton X-100 und 5% NSS in PBS permeabilisiert. Die Kryoschnitte wurden mit den primären Antikörpern in 0,5% Triton X-100 und 1% NSS in PBS über Nacht bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3-mal für jeweils 5min mit 1% BSA/PBS gewaschen, bevor sie mit den sekundären Antikörpern in 0,5% Triton X-100 und 1% NSS in PBS für 1h bei RT in Dunkelheit inkubiert wurden. Dann wurden die Kryoschnitte wieder 3-mal für jeweils 5min mit 1% BSA/PBS gewaschen.

Zum Schluss wurden alle Objektträger in Vectashield Hard Set mounting medium (Vector Laboratories, H-1400) eingebettet und mit einem Deckglas versehen. Die gefärbten Kryoschnitte wurden vor ihrer mikroskopischen Analyse bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Bilder wurden mit dem konfokalen Lasermikroskop LSM 510 der Firma Zeiss und der

Software LSM Image Browser aufgenommen. Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Tabelle 5: Primäre Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen von Mäusehirnschnitten

I° Antikörper	Firma	Katalognummer	Konzentration
rat anti-PECAM-1	BD Biosciences	557355	1:100
rabbit anti-Claudin-5	Invitrogen	34-1600	1:200
rabbit anti-Occludin	Invitrogen	71-1500	1:100
rabbit anti-GR (H-300)	Santa Cruz	sc-8992	1:100

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen von Mäusehirnschnitten

II° Antikörper	Firma	Katalognummer	Konzentration
donkey anti-rat IgG Alexa 488	Invitrogen	A21208	1:200
donkey anti-rabbit IgG Alexa 594	Invitrogen	A21207	1:200

2.3. Zellkultur

2.3.1. Zelllinien

Die humanen Hirnendothelzellen der hCMEC/D3 Zelllinie wurden unter Lizenz des „Institut national de la santé et de la recherche médicale“ (INSERM), Frankreich, erworben. Die ersten Endothelzellen der Passage 0, die der Generierung der Zelllinie dienten, stammten aus dem Temporallappen einer erwachsenen Frau, die sich einer therapeutischen Lobektomie bei Epilepsie unterzog. Durch die frühe sequentielle lentivirale Transduktion der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) und des SV40 large T Antigens in die ersten Passagen der hCMEC/D3 Zelllinie wurde die stabile Lebensspanne von differenzierten Zellen verlängert und deren Proliferation verstärkt. Die hCMEC/D3 Zelllinie exprimiert typische Endothelmarker wie CD31, VE-Cadherin und den von-Willebrand Faktor (Weksler, Subileau et al. 2005).

Die hCMEC/D3 wurden auf 0,5%-iger Gelatine in EBM-2 Medium (Lonza, CC-3156), ergänzt durch EGM-2 SingleQuots (Lonza, CC-4176; 500ml EBM-2 Medium ergänzt durch 2mL rhFGF-B, 0,5mL R³-IGF-1, 0,5mL Ascorbinsäure, 0,5mL VEGF, 0,5mL rhEGF, 0,5mL

GA-1000 und 0,5mL Heparin gemäß Hersteller sowie 2% ssFCS und 0,5% P/S (im Folgenden EBM-2++), in einem Inkubator (Steri-Cult 200) bei 37°C, 21% O₂, 4-5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Das Kulturmedium (EBM-2++) wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Sind die Zellen bis zur Konfluenz gewachsen, wurden sie durch Trypsinierung gesplittet. Dafür wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die hCMEC/D3 einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde auf 37°C vorgewärmte Trypsin/EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und kurze Zeit unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Die Ablösung der Zellen von ihrem Untergrund wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Durch kurzes, kräftiges Anschlagen der Kulturflaschen wurde die enzymatische Lösung vom Untergrund mechanisch verstärkt. Zum Stoppen der Trypsinwirkung wurde EMB-2++ Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 oder 1:3 gesplittet.

Das Anzüchten der Zellen für strukturelle Protein- und RNA-Analysen sowie Proteasomaktivitätsmessungen erfolgte direkt auf Nunclon Delta Surface 6-well Platten (Thermo Scientific, Katalognummer 140675). Transwells für funktionelle Analysen des BHS-Modells wurden mit Kollagen I (1h bei 37°C, 0,01%, Sigma, Katalognummer C7661) beschichtet.

Die für die Versuche verwendeten hCMEC/D3 stammen aus den Passagen 22-71.

Die Kryokonservation der hCMEC/D3 erfolgte in EBM-2 Medium (ohne die in 2.3.1. genannten Zusätze des EBM-2++ Mediums) +10% DMSO + 20% FCS.

2.3.2. Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD)

Das Milieu in Hirngewebe, welches durch ein SHT geschädigt ist, wird maßgeblich durch metabolische (Hypoxie, Azidose, etc.) und inflammatorische Prozesse bestimmt. Zur Simulation eines solchen Milieus nach SHT wurden im Zellkulturmodell

Mangelbedingungen an Sauerstoff und Glucose (OGD) geschaffen, die die metabolische und inflammatorische Situation *in-vivo* auf das *in-vitro* Modell übertragen.

hCMEC/D3 wurden wie in 2.3.1 beschrieben bis zur Konfluenz bebrütet und mit EBM-2 Medium ohne die in 2.3.1 genannten Zusätze (im Folgenden nur EBM-2) mit 0,2% ssFCS für 24h für Proteinanalysen des GRs und Occludin beziehungsweise 48h für Proteinanalysen von Claudin-5, RNA Analysen, Transwellversuche, GR-Blockade-Versuche mit RU486 und Proteasomaktivitätsversuche reduziert.

Die OGD erfolgte für 4h bei 1% O₂, 5% CO₂ bei 37°C in der Hypoxiekammer (HERAcell 150) mit DMEM Medium ohne Glucose (Gibco, Katalognummer 11966) + 1% ssFCS. Die Normoxie Proben wurden für die gleiche Zeit unter den in 2.3.1 beschriebenen Bedingungen mit DMEM Medium (Sigma, D5796) + 1% ssFCS weitergezogen. Der Medienwechsel war notwendig, da es kein glucosefreies EBM-2 Medium gibt.

Anschließend wurden die zu untersuchenden SHT-Therapien nach folgendem Schema hinzugefügt und die Zellen mit EBM-2 Medium + 0,2% ssFCS für 24h bei 21% O₂, 4-5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit reoxygeniert:

Tabelle 7: Übersicht der untersuchten SHT-Therapieformen

Probennummer	Normoxie / OGD	Therapie nach OGD Behandlung
1	Normoxie	EBM-2 Medium + 0,2% ssFCS
2	Normoxie	wie 1 + 100nM Dexamethason
3	Normoxie	wie 1 + 100nM Dexamethason + 10nM Bortezomib
4	Normoxie	wie 1 + 10nM Bortezomib
5	OGD	EBM-2 Medium + 0,2% ssFCS
6	OGD	wie 5 + 100nM Dexamethason
7	OGD	wie 5 + 100nM Dexamethason + 10nM Bortezomib
8	OGD	wie 5 + 10nM Bortezomib

2.3.3. Herstellung von hormonbereinigtem ssFCS

Im Rahmen von Zellkulturversuchen ist fetales Kälberserum (FCS) ein häufig verwendetes Agens. FCS enthält eine Vielzahl meist unbestimmter Hormone. Für die Arbeit mit Glukokortikoiden ist das normale FCS von den natürlichen Hormonen zu bereinigen. Hormonbereinigtes FCS nennt man ssFCS.

Dafür wurden 5,61g Aktivkohle (Merck, 102184) in 170mL ddH₂O gelöst. Nachdem die Aktivkohle am Boden sedimentiert war, wurde das ddH₂O abpipettiert und der Vorgang insgesamt dreimal wiederholt. Das Aktivkohlesediment wurde anschließend in 170mL PBS gemischt. Es wurden 560mg Dextran-T70 in einer geringen Menge PBS gelöst. Beide Lösungen wurden mit einem Magnetrührer in einander gelöst. Es wurden immer 17mL der entstandenen Lösung in ein 50mL Falcon Röhrchen gegeben und für 20min bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Falcon Röhrchen bis 50mL mit hitzeinaktiviertem FCS (für 1h bei 56°C inkubiert) aufgefüllt. Im Anschluss wurden die Röhrchen 1h lang bei 37°C geschüttelt und wieder für 20min bei 1000g zentrifugiert. Zum Sedimentieren wurden die Röhrchen über Nacht bei 4°C belassen. Am nächsten Tag wurde der Flüssigkeitsüberstand mit einer Spritze abgenommen und mit Hilfe eines 0,45µm Filteraufsatzes sterilfiltriert. Die ssFCS Aliquots wurden bei -20°C gelagert (Blecharz 2011).

2.4. Messung des Transendothelialen Elektrischen Widerstands

Der Transendotheliale Elektrische Widerstand (TEER) einer Monolayer Zellschicht ist ein Indikator für den parazellulären Transport kleiner Ionen über diese Zellschicht, in diesem Fall also über die BHS. Für die Versuche wurden die hCMEC/D3 Zellen (80.000 Zellen/cm²) auf 24-well Transwell Inserts (BD Falcon, # 353095, 0,4µm Porengröße, 0,3 cm² Wachstumsfläche) kultiviert, die mit Kollagen I (0,01%, Sigma, C7661), beschichtet wurden. Wegen der Rückstände der Essigsäure der Kollagenlösungen wurden die Inserts vor dem Aussäen der Zellen 3-mal mit PBS

gewaschen. Der weitere Versuchsablauf ist bezüglich des Kultivierens und des medikamentösen Behandlungsregimes der hCMEC/D3 identisch zu allen anderen Untersuchungen und in 2.3.2 beschrieben. Es gab drei Zeitpunkte für die Messung des TEERs:

1. TEER-Messung: nach 48h Reduktion (die Messung erfolgte in dem bereits für den weiteren Versuchsablauf gewechseltem OGD / Normoxie Medium, also in DMEM ± Glucose + 1% ssFCS)
2. TEER-Messung: nach 4h OGD / Normoxie in DMEM ± Glucose + 1% ssFCS
3. TEER-Messung: nach 24h Therapie gemäß des jeweiligen Behandlungsregimes (siehe 2.3.2)

Der TEER wurde nach einer 30-45 minütigen Akklimatisation auf RT mit einem Volt-Ohm-Meter mit Stäbchenelektroden der Firma World Precision Instruments gemessen.

Die Widerstände, die nur durch die Monolayer Zellschicht der hCMEC/D3 aufgebaut wurde, erhielt man durch Abzug des Mittelwerts aller Inserts ohne Zellen (blanks, n=4) von jedem Insert mit Zellen. Die Differenz dieser Widerstände [Ohm] wurde mit der Wachstumsfläche der Inserts [cm^2] multipliziert, um die eigentlichen TEER-Werte [$\text{Ohm} \times \text{cm}^2$] gemäß folgender Formel zu erhalten:

$$TEER [\Omega \text{cm}^2] = (R(\text{Zellen}) - MW(R(\text{blanks}))) [\Omega] \times \text{Wachstumsfläche} [\text{cm}^2]$$

Die blank-Inserts wurden äquivalent zu den zellbeschichteten Inserts behandelt.

2.5. Proteinanalysen von hCMEC/D3 durch Western Blot

Für nicht im Text beschriebene Reagenzien, Puffer und ähnliches siehe 2.1.

Das qualitative Vorkommen von Occludin, Claudin-5 und des GRs wurde mittels Western Blot untersucht. Eine semiquantitative Analyse erfolgte durch densitometrische Messung.

2.5.1. Gesamt-Protein-Isolierung

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. hCMEC/D3 Zellen wurden vor der Lyse zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Es wurden pro well 50µL Lysispuffer (260µL RIPA, 40µL Proteaseinhibitor Cocktail und 6µLPMSF in Isopropanol, siehe 2.1) für 30min zugegeben. Der Wellinhalt wurde durch mehrfaches scrapen zusätzlich mechanisch lysiert und homogenisiert. Vor und nach Zugabe von 4X Lämmli + 6% beta-Mercaptoethanol wurde das Zelllysate im Sonicator (pulse on: 0,5sek., pulse off: 5sek.) jeweils 5-mal auf Eis weiter homogenisiert.

2.5.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Es erfolgte eine BCA-Proteinbestimmung (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Katalognummer 23225) um das Auftragen gleicher Proteinmengen sicherzustellen. Die Reaktion der Bicinchoninsäure mit den in den Proben enthaltenen Eiweißmolekülen, und damit die Proteinkonzentration, wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 540nm gemessen und in Bezug zu einem genormten Proteinstandard gesetzt. Zusätzlich wurde eine interne Ladekontrolle mit beta-Aktin durchgeführt, welches in den Versuchen inert gegen regulatorische Einflüsse der Versuchsbedingungen war.

2.5.3. SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Molekulargröße der untersuchten Proteine unterlag einer großen Spanne und reichte von etwa 23kDa für Claudin-5 bis ca. 95kDa für den GR. Daher wurden für die Auftrennung der Proben je nach Target verschiedene Trenngele verwendet. Für den GR ein 8%, für Occludin ein 12% und für Claudin-5 ein 18% Gel. Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten SDS/Polyacrylamidgele:

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten SDS/Polyacrylamidgele

	8%	12%	18%	pro
	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
H₂O [mL]	4,7	3,35	1,35	2,85
Rotiphorese Gel 30	2,66	4	6	0,85
(Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1) [mL]				
3M Tris (pH 8,8) [mL]	2,5	2,5	2,5	-
0,5M Tris (pH 6,8) [mL]	-	-	-	1,25
10% SDS [µL]	100	100	100	50
10% APS [µL]	100	100	100	50
TEMED [µL]	5	5	5	5

Vor dem Aufladen des SDS/Polyacrylamidgels wurden die Proben für 5-10min bei 70°C erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 10X Runningpuffer aus 25mM Tris, 250mM Glycin und 0,1% SDS in H₂O bei einer Spannung zwischen 60V und 135V bis die Proben ausreichend aufgetrennt waren.

Als Bandenmarker diente der peqGOLD Proteinmarker V (peqlab, Katalognummer 27-2211).

2.5.4. Blotten der SDS/Polyacrylamidgele auf PVDF-Membranen

Für den Transfer der Proteinproben von den SDS/Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen (Santa Cruz, Katalognummer sc-3723, Porengröße: 0,45µm), die zuvor für 1 min. in Methanol (Sigma, Katalognummer 32213) aktiviert wurden, wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Zum einen wurde ein Semidry-Transfer bei 18V Spannung für 75min und einem Semidry-Puffer aus 48mM Tris, 39mM Glycin und 1,3mM SDS in H₂O bei pH 8,8 bis 9,2 durchgeführt. Zum anderen erfolgte der Transfer durch einen Tankblot bei 80mA, bei 4°C über Nacht in einem Towbin-Transferpuffer aus 25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol und 0,1% SDS.

2.5.5. Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

Nach dem Transfer auf PVDF-Membranen wurden die Blots für min. 1h in 5% Milchpulver/PBS geblockt und mit den primären Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Dem anschließenden 3-maligen Waschen für jeweils 5min mit 0,1% Tween20/PBS folgte ein weiteres Blocken mit 5% Milchpulver/PBS für 15min. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern erfolgte für min. 1,5h bei RT. Letzte Waschschritte erfolgten 3-mal für jeweils 5min mit 0,1% Tween20/PBS. Es wurden folgende primäre und sekundäre Antikörper verwendet (siehe nächste Seite):

Tabelle 9: Primäre Antikörper für Western Blot Analysen

I° Antikörper	Firma	Katalognummer	Konzentration
mouse anti-Aktin	Sigma Aldrich	A3854	1:20.000 in 1% BSA/PBS
rabbit anti-Claudin-5	Invitrogen	34-1600	1:200 in 0,5% BSA/PBS
rabbit anti-Occludin	Invitrogen	71-1500	1:200 in 1% BSA/PBS
rabbit anti-GR (H-300)	Santa Cruz	sc-8992	1:200 in 1% BSA/PBS

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für Western Blot Analysen

II° Antikörper	Firma	Katalognummer	Konzentration
ECL IgG HRP-linked anti-rabbit (whole antibody)	GE Healthcare	NA934V	1:3000 – 1:5000 in 1% BSA/PBS
ECL IgG HRP-linked anti-mouse (F(ab') ₂ fragment)	GE Healthcare	NA931V	1:3000 – 1:5000 in 1% BSA/PBS

2.5.6. Chemilumineszente Darstellung der Proteinbanden und semiquantitative Auswertung durch Densitometrie

Die Blots wurden für 2 min in ECL-Entwicklerlösung (ECL-I und ECL-II in gleichen Teilen) inkubiert und entwickelt. Die Belichtungszeiten betragen 30sek. bei beta-Aktin, 2-5min bei GR und Occludin sowie 30min bei Claudin-5.

Für die semiquantitative Analyse wurden die integrated density values (IDV) der Proteinbanden durch Densitometrie bestimmt. Alle Proben wurden zu Zwecken der Ladungskontrolle zu dem IDV-Wert der korrespondierenden beta-Aktin Bande relativiert. Die Normoxie-Kontrollgruppe wurde als 100% festgelegt. Alle anderen Proben wurden in Bezug zu den 100% der Normoxie-Kontrollgruppe gesetzt.

Die Aufnahmen und Analysen wurden mit dem FluorChem FC2 und der Software FluorChem SP von AlphaInnotech durchgeführt.

2.6. mRNA-Analyse von hCMEC/D3

Für nicht im Text beschriebene Reagenzien, Puffer und ähnliches siehe 2.1.

Das qualitative und quantitative Vorkommen von Occludin-mRNA, Claudin-5-mRNA und mRNA des GRs wurden durch Real-Time-PCR untersucht.

2.6.1. Isolierung der Gesamt-RNA

Die RNA-Isolierung aus hCMEC/D3 erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA II Kits (Marcherey-Nagel, Katalognummer 740955). hCMEC/D3 Zellen wurden vor der Lyse zweimal mit PBS unter der Sterilbank gewaschen. Es wurden pro well 350µL RA1 Lysispuffer + 1% β-Mercaptoethanol für kurze Zeit zugegeben. Der Wellinhalt wurde durch mehrfaches Scrapen zusätzlich mechanisch lysiert und homogenisiert, ehe das Lysat abpipettiert und ggf. bei -80°C weggefroren wurde. Durch 10-maliges Auf- und Abziehen mit einer sterilen Insulinspritze wurde das Lysat weiter homogenisiert und bei 11.000 rcf für 1min filtriert. Anschließend wurden zu jeder Probe 350µL 70%-iges Ethanol zugegeben und durch Zentrifugation für 30sek. bei 11.000 rcf die RNA an den Nucleospin Filter gebunden. Durch die Zugabe von jeweils 350µL Membrane Desalting Buffer (MDB) und Zentrifugation für 1min bei 11.000 rcf wurde die Silicat-Membran des NucleoSpin Filters entsalzt. Im Folgenden wurde mittels Zugabe von jeweils 95µL DNase Reaktionsmixes für 15min bei RT die im Filtrat enthaltene DNA verdaut. Anschließend folgten mehrere Wasch- und Trocknungsschritte (Waschen mit 200µL RA2 und zentrifugieren für 30sek. bei 11.000 rcf, waschen mit 600µL RA3 und zentrifugieren für 30sek. bei 11.000 rcf, sowie ein letzter Waschschrift mit nochmals 250µL RA3 und abschließender Zentrifugation für 2min bei 11.000 rcf). Zum Schluss wurde die im Filter sitzende RNA durch die Zugabe von H₂O und 2-minütige Zentrifugation bei 11.000 rcf aus dem Filter ausgewaschen und bei -80°C eingefroren.

2.6.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Menge an isolierter RNA wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop2000 von peqLab bestimmt. Die Absorption der Probenlösungen wurde bei 260nm und 280nm gemessen. Der Quotient der Absorptionen A_{260}/A_{280} zeigte eine eventuelle Verunreinigung mit Proteinen an und sollte größer als 1,8 sein.

2.6.3. Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Katalognummer 4368814) wurde die aus den hCMEC/D3 Zellen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und durch PCR amplifiziert. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Pro PCR Reaktion wurden 2 μ L 10X Reverse Transcriptase Buffer, 2 μ L 10X Random Primers, 0,8 μ L dNTP Mix (100mM) und jeweils 1 μ L Reverse Transcriptase und RNase Inhibitor zugegeben. Gemäß der RNA-Konzentrationsmessung wurde RNA Probe und H₂O hinzugefügt. Die PCR lief für 10min im 2720 Thermal Cycler von Applied Biosystems (Einstellung des Thermal Cyclers: 10min bei 25°C; 120min bei 37°C; 5min bei 85°C). Die pure cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

2.6.4. Quantitative real time RT-PCR

Die RT-PCR erfolgte mit dem 7300 Real-Time PCR System von Applied Biosystems. Alle Arbeitsschritte zur Vorbereitung erfolgten auf Eis. Neben den eigentlichen Zielmolekülen Occludin, Claudin-5 und dem GR wurde die Menge an 2-Microglobulin cDNA bestimmt. Es diente als interne Kontrolle, da es sich in den Versuchen inert gegen regulatorische Einflüsse der Versuchsbedingungen zeigte.

Pro Reaktion wurden 12,5 μ L Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Katalognummer AB-1159/A), 4 μ L H₂O, je 1,75 μ L pro Primer und 5 μ L cDNA (1:8 vorverdünnt) zusammenpipettiert. Die Primer wurden 1:33,3 verdünnt. Die PCR

Reaktion wurde für 50 Zyklen durchgeführt. Mit der 7300 SDS Software von Applied Biosystems konnte der threshold cycle bestimmt werden, der Zyklus bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Die Software errechnete daraus die raw relative quantitation. Die Normoxie-Kontrollgruppe wurde als 100% festgelegt. Alle anderen Proben wurden in Bezug zu den 100% der Normoxie-Kontrollgruppe gesetzt. Es wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 11: Primer für RNA Analysen

Target	Primer Sequenz	Bestellnummer	Firma
2-Microglobulin	5'-TGA GTG CTG TCT CCA TGT TTG A-3'	51-4032-7/7	MWG Biotech
2-Microglobulin rev	5'-TCT GKT CCC CAC CTC TAA GTT G-3'	51-4032-6/7	MWG Biotech
hCLDN5-5'	5'-GAG GKG TGK TCT ACC TGT TT-3'	43-2077-7/14	MWG Biotech
hCLDN5-3'	5'-GTA CTT CAC GGG GAA GKT GA-3'	43-2077-8/14	MWG Biotech
hGR-5'	5'-TAC CCT GKA TGT ACG ACC AA-3'	43-2077-13/14	MWG Biotech
hGR-3'	5'-TCC TTC CCT CTT GAC AAT GG-3'	43-2077-14/14	MWG Biotech
hOCLN-5'	5'-TCC AAT GGK AAA GTG AAT GA-3	43-2077-1/14	MWG Biotech
hOCLN-3'	5'-GKA GGT GKT CTT TTT GAA GG-3'	43-2077-2/14	MWG Biotech

2.7. Blockade des Glukokortikoidrezeptors durch RU486

Um zu evaluieren, ob Effekte Dexamethason-vermittelt über die Wirkung am GR erfolgen, wurde der Einfluss des nicht-selektiven GR-Blockers RU486 auf die Proteinexpression in hCMEC/D3 untersucht. Die Zellen wurden unter Normoxie und OGD Bedingungen, wie in 2.3.2 beschrieben, mit Dexamethason (100nM) und Bortezomib (10nM) behandelt, jeweils mit und ohne Zugabe von 100nM RU486. Es wurde eine qualitative und semiquantitative Analyse der Proteine Claudin-5, Occludin

und des GRs durchgeführt, wie in 2.5 beschrieben. Eine Übersicht der Versuchsbedingungen gibt die folgende Tabelle wider:

Tabelle 12: Übersicht der Versuchsbedingungen für die Blockade des GR durch RU486

Probennummer	Normoxie / OGD	Behandlung
1	Normoxie	Dex (100nM) + Borte (10nM)
2	Normoxie	Dex (100nM) + Borte (10nM) + RU486 (100nM)
3	OGD	Dex (100nM) + Borte (10nM)
4	OGD	Dex (100nM) + Borte (10nM) + RU486 (100nM)

2.8. Proteasomaktivität

Das humane 26S Proteasom besitzt drei katalytische Zentren mit unterschiedlicher Spezifität der Proteinspaltung. Die β 1-Untereinheit (UE) besitzt PGPH-ähnliche Aktivität und spaltet Proteine nach sauren Aminosäuren (AS). Die β 2-UE arbeitet Trypsin-ähnlich und spaltet nach basischen AS und die β 5-UE spaltet Eiweißmoleküle ähnlich wie Chymotrypsin hinter hydrophoben AS. Die funktionelle Aktivität des Proteasoms in hCMEC/D3 wurde durch Fluoreszenzmessung bestimmt. Es wurden alle drei katalytischen Zentren des 26S Proteasoms untersucht.

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. hCMEC/D3 wurden 2-mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die Lyse wurden pro well 300 μ L eiskalter Proteasomactivitybuffer (PAB, 10mM Tris-HCL mit pH 7,8, 1mM ETDA, 0,5mM Dithiothreitol, 0,5% Triton X-100 und 5mM MGKl2) zugegeben und für 30min bei 4°C auf einer Schüttelplatte bei etwa 52rpm inkubiert.

Es erfolgte eine BCA-Proteinbestimmung (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Katalognummer 23225). Es wurden Volumen für 40 μ g Protein und entsprechend PAB für ein Arbeitsvolumen von 196 μ L zugegeben. Jede Reaktion wurde

durch die Zugabe von 4µL PGPH-, Trypsin- oder Chymotrypsinsubstrat auf Eis gestartet. Die Kinetikmessung der funktionellen Proteasomaktivität wurde durch die Fluoreszenz der Spaltprodukte des jeweiligen PGPH-, Trypsin- oder Chymotrypsinsubstrats bei einer Exzitationswellenlänge von 340nm und einer Emissionswellenlänge von 460nm bei 36,5 -37,5°C alle 10min für insgesamt 2h mit dem GENios (Tecan) in relative fluorescence units (RFU) gemessen. Die Grundfluoreszenz des PAB wurde von den RFU der untersuchten Proben abgezogen. Der zeitliche Verlauf wurde als Liniendiagramm geplottet. Exemplarisch ist in Abbildung 6 **A** der zeitliche Verlauf der Aktivität der katalytischen β 2-UE des 26S Proteasoms nach 4h OGD und 24h Reoxygenierung mit 100nM Dexamethasontherapie dargestellt.

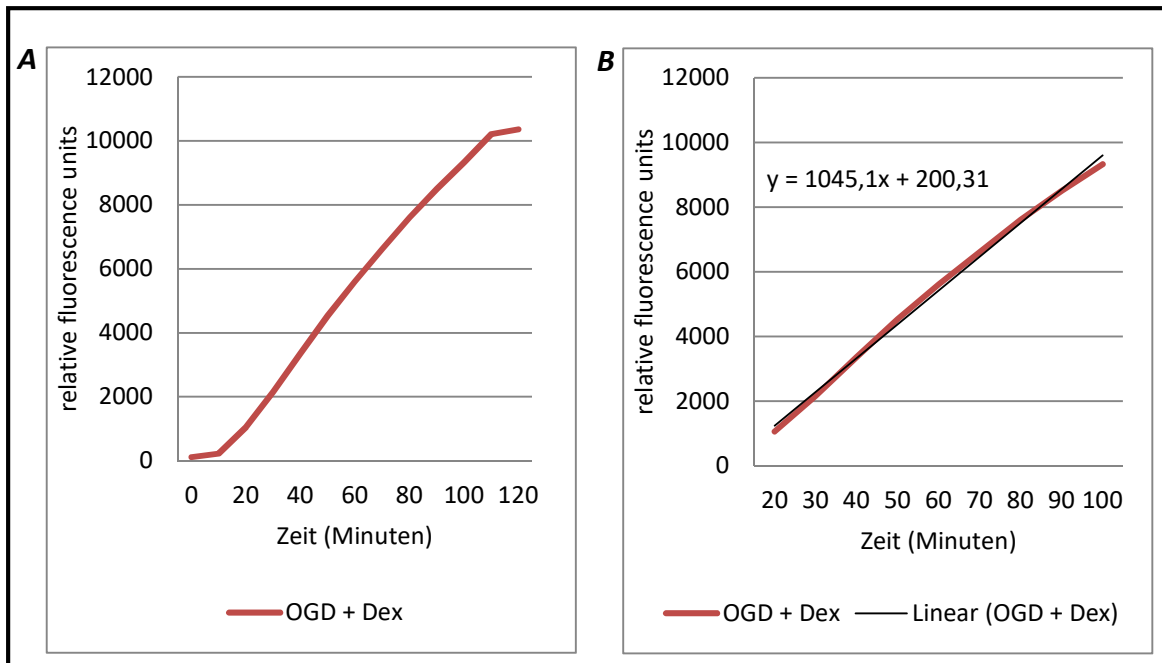


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der Aktivität der katalytischen Untereinheit des 26S-Proteasoms.

Bei allen Versuchen gab es einen deutlichen linearen Verlauf der Aktivität zwischen Minute 20 und Minute 100. Für diesen linearen Bereich wurde eine Trendlinie eingefügt (Abbildung 6 **B**), deren Steigung die funktionelle Aktivität des 26S Proteasoms über die Zeit darstellt. Die Normoxie-Kontrollgruppe wurde als 100% festgelegt. Alle anderen Proben wurden in Bezug zu den 100% der Normoxie-Kontrollgruppe gesetzt.

2.9. Immunhistochemische Untersuchung von hCMEC/D3

Nach der funktionellen Analyse der hCMEC/D3 Zellen auf transparenten Transwell-Inserts folgte eine immunhistochemische Untersuchung. Dafür wurde das Medium in den inserts abgenommen und die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen. Pro well wurden 500-1000 μ L -20°C kaltes Methanol zugegeben und die 24well Platten für 20min bei -20°C fixiert. Erneut wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und mit PBS für 20min bei RT rehydratisiert. Zum Permeabilisieren erfolgte die Inkubation mit 0,1% Triton X-100 Lösung für 10min. Nach 3-maligem waschen mit PBS wurden 250 μ L der primären Antikörperlösungen auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C, in Alufolie umwickelt, gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wiederum 3-mal mit PBS gewaschen und mit 250 μ L der sekundären Antikörperlösungen für 60min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand mit einer Pipette fein abpipettiert. Für eine Darstellung der Zellkerne wurden die Zellen mit 250 μ L einer DAPI-Lösung (5mg/mL; 1:3000 in PBS) inkubiert. Ein letztes Waschen erfolgte 3-mal mit PBS. Die flexiblen insert Böden wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten und Restflüssigkeit mit einem Küchenpapier vorsichtig aufgesogen. Die Membranen wurden mit der Zellschicht nach oben auf einen Objektträger gegeben, in Vectashield Hard Set mounting medium (Vector Laboratories, H-1400) eingebettet und mit einem Deckglas versehen. Die Objektträger wurden vor der mikroskopischen Analyse bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Tabelle 13: Primäre Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen von hCMEC/D3

I° Antikörper	Firma	Katalognummer	Konzentration
mouse anti Lamin A	Abcam	ab8980	1:100 in 1% BSA/PBS
rabbit anti-Claudin-5	Invitrogen	34-1600	1:100 in 1% BSA/PBS
rabbit anti-Occludin	Invitrogen	71-1500	1:100 in 1% BSA/PBS
rabbit anti-GR (H-300)	Santa Cruz	sc-8992	1:100 in 1% BSA/PBS

Tabelle 14: Sekundäre Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen von hCMEC/D3

II° Antikörper	Firma	Katalognummer	Konzentration
donkey anti-rabbit IgG Alexa 488	Invitrogen	A21206	1:200
donkey anti-mouse IgG Alexa 594	Invitrogen	A21203	1:200

2.10. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte durch einen zweiseitigen studentischen T-Test und wurde mit Microsoft Excel™ berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Bei $p < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen, $p < 0,01$ wurde als hochsignifikant gewertet.

3. Ergebnisse

In dem *in-vivo* Teil der Dissertation wurde der Einfluss einer Kombinationstherapie aus Dexamethason und dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib auf die Expression des GR und verschiedener *Tight Junction*-Moleküle immunhistochemisch in einem murinen SHT-Modell untersucht. In dem *in-vitro* Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen dieser Kombinationstherapie auf humane Hirnendothelzellen unter funktionellen (Transendothelialer Widerstand, TEER und Proteasomaktivität) und strukturellen (Expression von GR und verschiedenen TJ-Molekülen auf Protein- und RNA-Ebene) Aspekten nach Sauerstoff- und Glucose Mangel getestet.

3.1. Immunhistochemische Untersuchung der Expression der *Tight Junction*-Moleküle Claudin-5 und Occludin in Mäusehirnen nach controlled cortical impact

Um *in-vivo* ein SHT zu simulieren, wurde die Technik des *controlled cortical impact* (CCI) verwendet. Dabei wird dem Versuchstier unter genau definierten Bedingungen (siehe 2.2) ein Schlag mittels eines Bolzens auf den Schädelknochen versetzt. Es entsteht eine irreversibel geschädigte, nekrotische Hirnregion in unmittelbarer Lokalisation zum Hauptaufschlagpunkt des Bolzens. Um die Zone des unwiderruflich zerstörten Hirngewebes entwickelt sich wie ein Halbmond eine Region, die reversible und inkomplett durch Sauerstoffmangel und metabolische Noxen geschädigt ist. Diese Zone wird Penumbra (lateinisch für Halbschatten) genannt und kann im weiteren Verlauf komplett zu Grunde gehen oder sich vollständig erholen. Aus den Hirnregionen um die Penumbra herum (peripenumbral), deren Ausmaß man makro- und auch mikroskopisch nicht scharf abgrenzen kann, wurden die Bilder der Schadensregion aufgenommen (in Abbildung 7 mit Pfeilen gekennzeichnet).

Ergebnisse

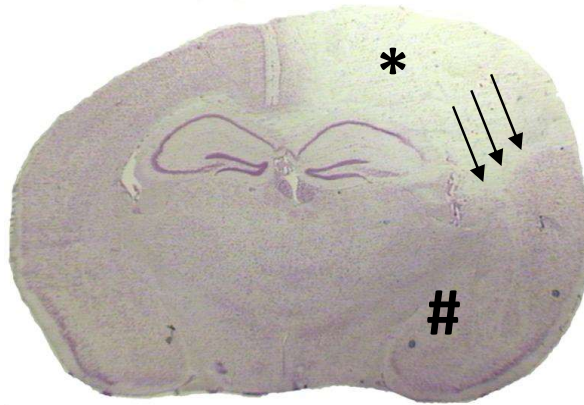


Abbildung 7: Makroskopische Aufnahme eines Mäusehirnschnitts 24h nach CCI, Koronarschnitt, Nissl Färbung, modifiziert nach Thal et al., 2013, (Thal, Schaible et al. 2013).

Die linke Hemisphäre (rechte Bildhälfte) ist die kontusionale Seite. Kranial erkennt man die durch CCI irreversibel zerstörte Gehirnregion (farblose mit * markierte Region im oberen rechten Bildausschnitt). Basal dieser Schadensregion (unterhalb der Seitenventrikel) erkennt man gesundes Hirngewebe in normaler Nissl Färbung (mit # markierte Region im unteren rechten Bildausschnitt). Am Übergang von irreversibel zerstörtem zu gesundem Hirngewebe befindet sich die mit Pfeilen markierte Penumbra. Diese Region ist potentiell reversibel geschädigt. Die Penumbra, deren Ausdehnung weder makro- noch mikroskopisch scharf abzugrenzen ist, gilt es durch eine adäquate SHT-Therapie zu retten um eine bessere funktionelle Rekonvaleszenz zu erzielen. Bilder der kontusionalen Hemisphäre wurden in Hirnregionen um die Penumbra herum (peripenumbral) aufgenommen. Bilder der gesunden Hemisphäre stammten von der korrespondierenden Hirnregion der kontralateralen Hemisphäre.

Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 7, mit freundlicher Genehmigung von Professor Dr. Serge Thal (Thal, Schaible et al. 2013) eine makroskopische Aufnahme eines Mäusehirnschnitts nach CCI im Koronarschnitt. Die rechte Bildhälfte zeigt die linke, kontusionale Hemisphäre. Den Ort der Schädigung durch den Bolzeneinschlag des CCI erkennt man daran, dass das dort irreversibel zerstörte, nekrotische Hirngewebe keine Nissl Färbung mehr aufnimmt und farblos imponiert (helle Region im oberen rechten Bildabschnitt mit * markiert). Im Übergang zu makroskopisch gesund erscheinendem Hirngewebe, welche den dunkleren, normal nach Nissl anfärbbaren Regionen im unteren rechten Bildabschnitt, mit # markiert, entspricht, liegt, mit Pfeilen markiert, die Penumbra. Die Bilder der gesunden Hirnregion wurden von der korrespondierenden Hirnregion der nicht-kontusionalen, kontralateralen Hemisphäre aufgenommen.

3.1.1. Immunhistochemische Untersuchung der Expression des GRs in Mäusehirnen nach CCI

Die Expression und funktionelle Anwesenheit des Glukokortikoidrezeptors (GRs) im Hirnendothel ist eine fundamentale Voraussetzung für eine erfolgreiche SHT-Therapie, die auf Glukokortikoiden wie z.B. Dexamethason basiert.

Der übermäßige Abbau des GRs nach SHT in den Proteasomen der Hirnendothelzellen könnte die Refraktärität der Dexamethason-basierten Therapie erklären, die sich im klinischen Alltag zeigt (Poungvarin 2004; Bratton, Chestnut et al. 2007). Daher wurden der Einfluss von Dexamethason, Bortezomib und ihre Kombination auf die Lokalisation des GRs im Mäusehirnendothel nach SHT mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Abbildung 8 **A – E** (Seite 44) zeigt repräsentativ die Veränderung der GR-Expression im Mäusehirnendothel nach CCI unter verschiedenen Therapieregimen. PECAM-1 (CD31, grün) wurde als Marker des Hirnendothels verwendet und wurde physiologischerweise in allen untersuchten Proben gefunden. **A** (gesunde Hirnregion) und **B** (geschädigte Hirnregion) zeigen Hirnausschnitte von mit NaCl behandelten Mäusen nach CCI. **A** zeigt eine Kolo-kalisation von GR (rot) und PECAM-1 (grün) in der gesunden Hirnregion. Daher kann man die physiologische Expression des GR im Mäusehirnendothel propagieren. Das wurde als Referenz für die folgenden Proben verwendet. **B** (NaCl, keine SHT-Therapie) zeigt im Vergleich zu **A** den vollständigen Verlust der GR-Expression in der peripenumbralen Hirnregion der verletzten Hemisphäre, verursacht durch CCI. Die Behandlung mit Dexamethason alleine erzielte keine Wiederherstellung der GR-Expression im Mäusehirnendothel der kontusionalen Hemisphäre (**C**). Im Gegensatz zur Dexamethason-Monotherapie wird der GR unter Bortezomib-Monotherapie weiterhin in der kontusionalen Hemisphäre exprimiert (**D**). Des Weiteren zeigt die Kombinationstherapie mit Dexamethason und Bortezomib einen ähnlichen Effekt auf die Expression des GR im Mäusehirnendothel. Dies deutet bereits an, dass sowohl Bortezomib als auch die duale Therapie mit Dexamethason plus Bortezomib in der Lage

Ergebnisse

sein kann, den CCI bedingten proteasomalen Abbau des GR im Mäusehirnendothel abzuschwächen.

Bilder der gesunden Hirnregionen der kontralateralen Hemisphäre unter Dexamethason oder Bortezomib-Monotherapie und Dexamethason/Bortezomib-Kombinationstherapie (Bilder nicht gezeigt) zeigen keinen signifikanten Unterschied zu korrespondierenden Bildern von NaCl behandelten Kontrolltieren.

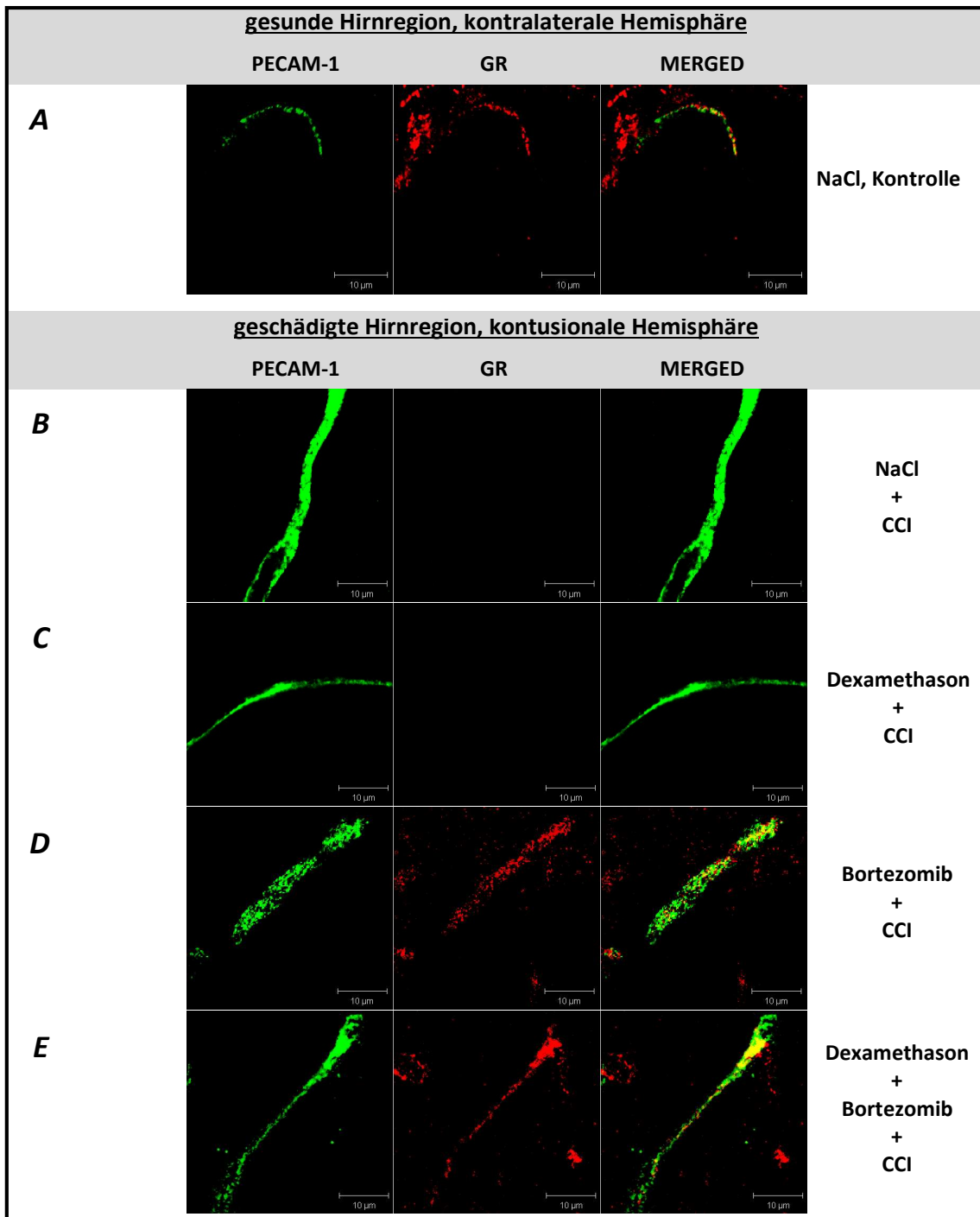


Abbildung 8: Glukokortikoidrezeptor (GR) Expression in Mäusehirnendothelien nach controlled cortical impact (CCI) und verschiedenen therapeutischen Behandlungen.

A – E zeigen die immunhistochemische Detektion des GR (rot), gegengefärbt gegen platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) (grün) in Kryoschnitten von Mäusen nach CCI die mit NaCl als Kontrolle (A und B), Dexamethason (C), Bortezomib (D) und einer Kombination aus Dexamethason und Bortezomib (E) behandelt wurden. PECAM-1 als Hirnendothelzellmarker wurde physiologischerweise in allen untersuchten Proben exprimiert. Eine GR-Expression in gesundem Hirngewebe der nicht kontusionalen Hirnhemisphäre konnte gezeigt werden (A). Weder eine Behandlung mit NaCl als Kontrolle (B), noch eine Therapie mit Dexamethason (C) zeigte eine Expression des GR in geschädigtem Hirngewebe der kontusionalen Hemisphäre. In Vergleich dazu konnte eine GR-Expression nach Kombinationstherapie mit Dexamethason und Bortezomib in der geschädigten kontusionalen Hirnhemisphäre nachgewiesen werden (D und E).

3.1.2. Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Occludin in Mäusehirnen nach CCI

Das Vorkommen des *Tight Junction*-Netzwerks im Hirnendothel ist eine grundlegende Voraussetzung für eine intakte BHS, nicht nur unter physiologischen Bedingungen, sondern in eminenter Weise im Kontext solcher Erkrankungen wie Schlaganfall oder SHT, deren pathophysiologische Ursache in einer direkten oder indirekten Kompromittierung der BHS liegt.

Da das *Tight Junction*-Protein Occludin über GR-Signaltransduktionswege reguliert wird (Forster, Silwedel et al. 2005; Harke, Leers et al. 2008) wurde die Expression von Occludin als ein Marker der BHS-Integrität nach SHT mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie unter Dexamethason-Monotherapie, Bortezomib-Monotherapie und Dexamethason/Bortezomib-Kombinationstherapie analysiert.

Abbildung 9 **A – E** (Seite 47) zeigt repräsentativ die Expression von Occludin im Mäusehirnendothel nach CCI unter den oben genannten therapeutischen Regimen. PECAM-1 (CD31, grün) wurde wieder als Marker des Hirnendothels verwendet und wurde in allen untersuchten Proben gefunden. **A** zeigt einen Hirnausschnitt NaCl behandelter Mäuse nach CCI. Man sieht ein durchgehendes Expressionsmuster von Occludin (rot), das in Kolokalisation zu PECAM-1 in der gesunden Hemisphäre steht. Das impliziert nicht nur das physiologische Vorkommen von Occludin im Mäusehirnendothel, sondern zudem eine intakte BHS. Das wurde als Referenz für die folgenden Proben verwandt. Einen partiellen Verlust der Barrierefunktion durch SHT postulierend, zeigen **B – D** eine diskontinuierliche Expression von Occludin mit Kaliberschwankungen (gepunktete Pfeile in Abbildung 9 **B** und **C**) und sogar kompletten Unterbrechungen (durchgezogene Pfeile in Abbildung 9 **B – D**) in der peripenumbralen Hirnregion der kontusionalen Hemisphäre, verursacht durch CCI. Diesen Effekt sieht man sowohl in NaCl behandelten Kontrolltieren (**B**) als auch unter Dexamethason-Monotherapie (**C**) und Bortezomib-Monotherapie (**D**). Im Gegensatz zu diesen Proben zeigen Bilder peripenumbraler Hirnregionen in den geschädigten Hemisphären nach

Ergebnisse

kombinierter Dexamethason/Bortezomib-Therapie wieder ein kontinuierliches Expressionsmuster von Occludin (**E**). Das propagiert eine intakte BHS in der durch CCI geschädigten Hirnregion ähnlich zu den gesunden Kontrollproben (**A**). Das weist darauf hin, dass die kombinierte Dexamethason/Bortezomib-Therapie möglicherweise in der Lage ist, den Verlust der BHS nach SHT zu verhindern.

Bilder der gesunden Hirnregionen der kontralateralen Hemisphäre von Mäusen unter Dexamethason-Monotherapie, Bortezomib-Monotherapie und Kombinationstherapie (Bilder nicht gezeigt) offenbaren keinen signifikanten Unterschied zu den korrespondierenden Bildern von NaCl behandelten Kontrollen (**A**).

Ergebnisse

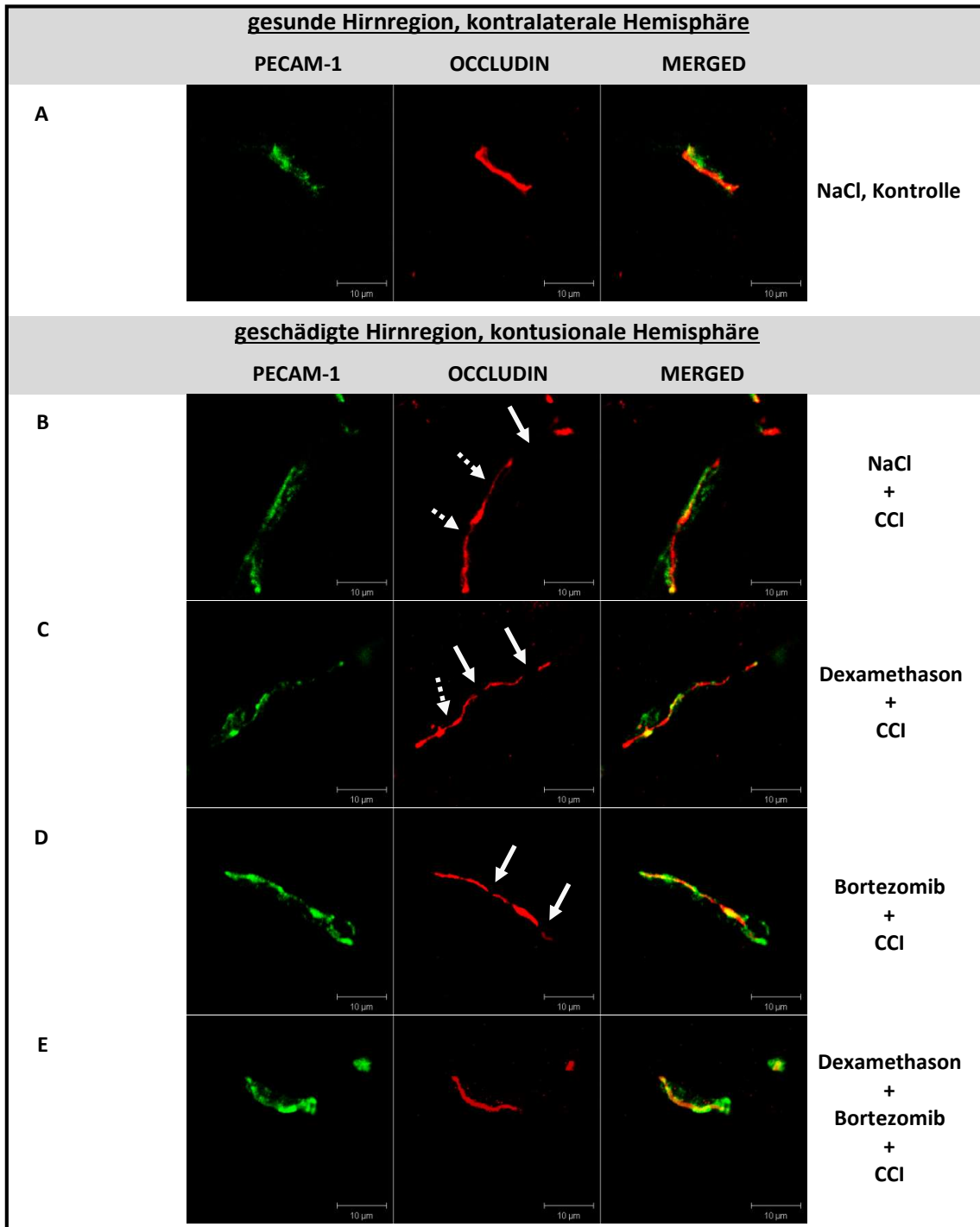


Abbildung 9: Occludin-Expression in Mäusehirnendothelien nach controlled cortical impact (CCI) und verschiedenen therapeutischen Behandlungen.

A – E zeigen die immunhistochemische Detektion von Occludin (rot), gegengefärbt gegen platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) (grün) in Kryoschnitten von Mäusen nach CCI, die mit NaCl als Kontrolle (**A** und **B**), Dexamethason (**C**), Bortezomib (**D**) und einer Kombination aus Dexamethason und Bortezomib (**E**) behandelt wurden. PECAM-1 als Hirnendothelzellmarker wurde physiologischerweise in allen untersuchten Proben exprimiert. Eine kontinuierliche Occludin-Expression in gesundem Hirngewebe der nicht kontusionalen Hirnhemisphäre konnte gezeigt werden (**A**). Die Hirnendothelien von Mäusen die eine Behandlung mit NaCl als Kontrolle (**B**), eine Therapie mit Dexamethason (**C**) oder mit Bortezomib (**D**) unterliefen, zeigten eine diskontinuierliche Occludin-Expression in geschädigtem Hirngewebe der kontusionalen Hemisphäre (vollständige Unterbrechung = Pfeile, Kaliberschwankungen = gepunktete Pfeil). Lediglich die Kombinationstherapie aus Dexamethason und Bortezomib zeigt wieder eine unterbrechungsfreie Occludin-Expression in geschädigtem Hirngewebe (**E**).

3.1.3. Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Claudin-5 in Mäusehirnen nach CCI

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Proben gefunden werden (Bilder nicht gezeigt). Dieses Ergebnis stützt die Hypothese einer Speziesdifferenz zwischen humanen und murinen Hirnendothelzellen bezüglich der Expressionsziele über Zielgene von Glukokortikoiden (Forster, Burek et al. 2008) (siehe 4.4).

3.2. Einfluss von OGD auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors und der *Tight Junction*-Proteine Claudin-5 und Occludin sowie auf die Barrierefunktion in hCMEC/D3

3.2.1. Einfluss von OGD auf die Protein- und mRNA-Expression des Glukokortikoidrezeptors

Die Expression eines funktionsfähigen und aktivierbaren Glukokortikoidrezeptors (GR) im Zytosol der Hirnendothelzellen ist eine entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Schädel-Hirn-Trauma (SHT)-Therapie, die auf Glukokortikoiden (GK) wie Dexamethason basiert. Im Falle einer Dexamethason-vermittelten Hochregulation von TJ-Molekülen sollte das über den GR vermittelt sein (Forster, Burek et al. 2008; Hue, Cho et al. 2015). Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe bereits eine hypoxiebedingte Regulation des GRs in einem murinen *in-vitro* (OGD in cEND) und *in-vivo* (*transient middle cerebral artery occlusion*, tMCAO) Ischämiemodell nachweisen (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011).

Zusätzlich konnte hier in dieser Arbeit auch eine Regulation des GR nach *controlled cortical impact* in einem murinen SHT-Modell gezeigt werden. Um eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf hCMEC/D3 als humanes Zellmodell zu evaluieren, wurde die Expression des GRs mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene und durch western blotting auf Proteinebene analysiert sowie durch immunhistochemische Färbung der hCMEC/D3-Zellen untersucht.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen an der Maus konnten nach einer vierstündigen OGD mit anschließender Reoxygenierung über 24h für den GR keinerlei Unterschiede in der mRNA- (siehe Abbildung 10 **A**, Seite 50) oder Proteinexpression (siehe Abbildung 10 **B** und **C**, Seite 50) im Vergleich zur Normoxie in hCMEC/D3 gezeigt werden.

Ergebnisse

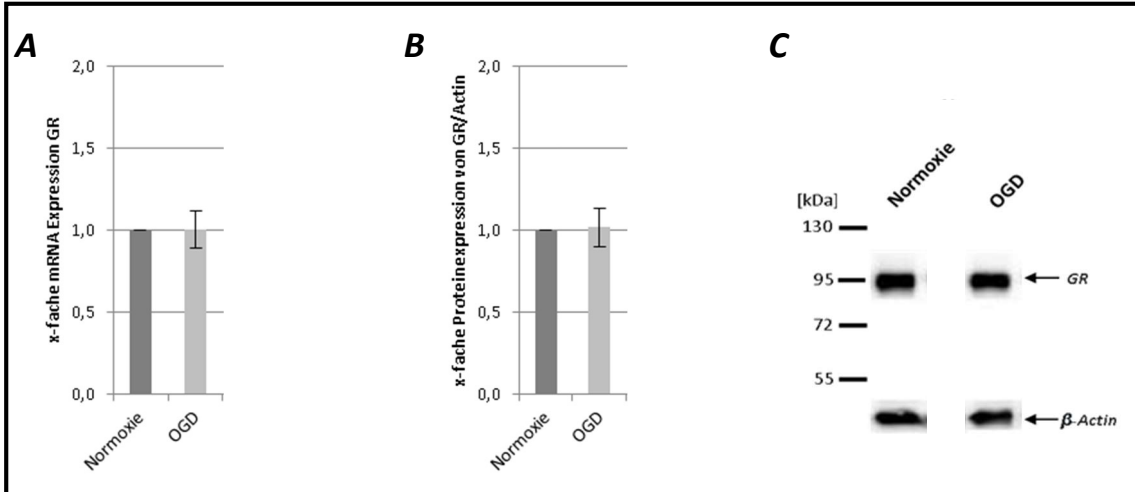


Abbildung 10: Einfluss von OGD auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors in hCMEC/D3.

A – C zeigen die mRNA- (**A**) und Proteinlevel des GR mittels qRT-PCR beziehungsweise western blotting in einer semiquantitativen Analyse mittels densitometrischer Messung (**B**) und qualitativen Darstellung durch Immunoblotting (**C**) in hCMEC/D3. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Normoxie-Kontrollgruppen gezeigt werden; $n=3-6$; $MW \pm SEM$.

3.2.2. Einfluss von OGD auf die Expression der *Tight Junction*-Proteine Claudin-5 und Occludin

3.2.2.1. Einfluss von OGD auf die Protein- und mRNA-Expression von Claudin-5

In den Normoxie-Kontrollen zeigte sich im Immunoblot eine dezente Proteinbande oberhalb von 17kDa (siehe Abbildung 11 **A**). Das zeigte die geringe physiologische Expression des 23kDa großen TJ-Moleküls Claudin-5 in hCMEC/D3.

Es manifestierte sich in den Proteinmengen von Claudin-5 kein signifikanter Unterschied zwischen Normoxie und 4h OGD samt 24h Reoxygenierung (Abbildung 11 **B**).

Das gleiche war für die mRNA-Expression zu sehen. Eine Reoxygenierung für 24h nach 4h OGD offenbarte keinen signifikanten Unterschied der mRNA-Expression von Claudin-5 im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle (Abbildung 11 **C**).

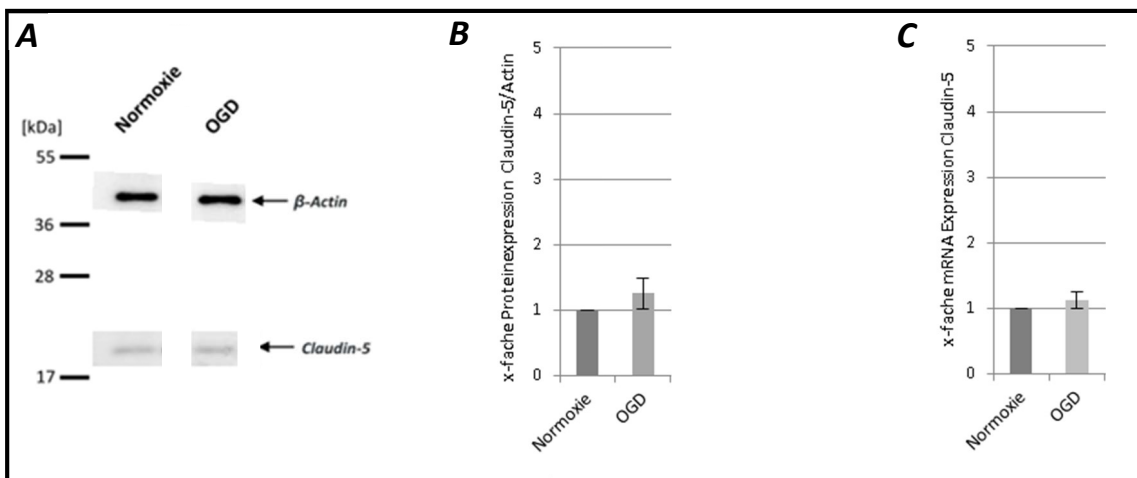


Abbildung 11: Einfluss von OGD auf die Expression von Claudin-5 in hCMEC/D3.

A – C zeigen die Protein- und mRNA-Level von Claudin-5 mittels western blotting in einer qualitativen Darstellung durch Immunoblotting (**A**) und einer semiquantitativen Analyse mittels densitometrischer Messung (**B**) beziehungsweise qRT-PCR (**C**) in hCMEC/D3. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Normoxie-Kontrollgruppen gezeigt werden; $n=3-8$; $MW \pm SEM$.

3.2.2.2. Einfluss von OGD auf die Protein- und mRNA-Expression von Occludin

Bei der Proteinanalyse zeigte sich unter Normoxie-Bedingungen im Immunoblot eine deutliche Bande zwischen 55 und 72kDa (Abbildung 12 **A**). In diesem Bereich ist das 65kDa schwere Occludin zu erwarten. Das zeigt die physiologische Expression von Occludin in humanen Hirnendothelzellen.

Es zeigte sich für Occludin keinerlei Regulation durch eine vierstündige OGD mit anschließender Reoxygenierung für 24h, weder auf die Protein- (Abbildung 12 **B**), noch auf die mRNA-Expression (Abbildung 12 **C**).

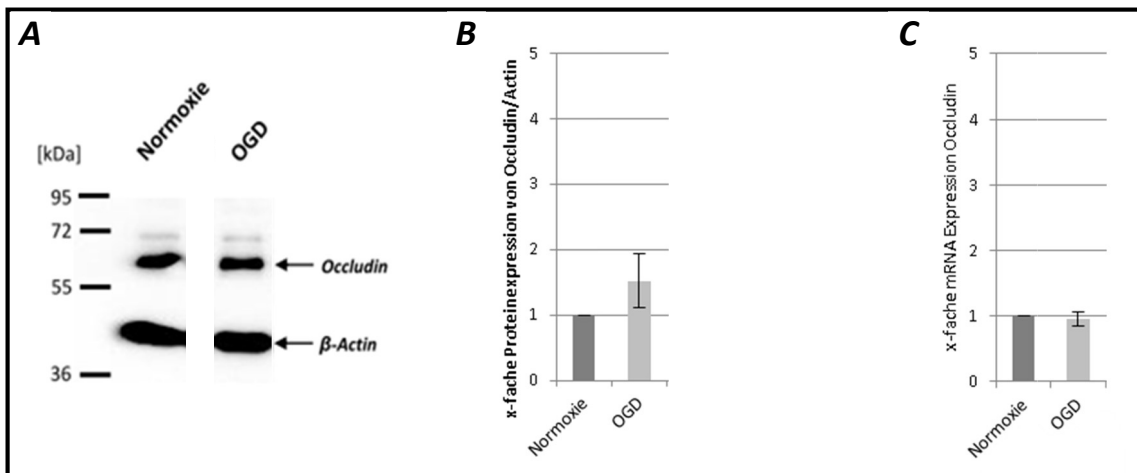


Abbildung 12: Einfluss von OGD auf die Expression von Occludin in hCMEC/D3.

A – C zeigen die Protein- und mRNA-Level von Occludin mittels western blotting in einer qualitativen Darstellung durch Immunoblotting (**A**) und einer semiquantitativen Analyse mittels densitometrischer Messung (**B**) beziehungsweise qRT-PCR (**C**) in hCMEC/D3. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Normoxie-Kontrollgruppen gezeigt werden; $n=3-8$; $MW \pm SEM$.

3.2.3. Einfluss von OGD auf die Barrierefunktion in hCMEC/D3

Veränderungen der Proteinexpression von *Tight Junction*-Proteinen, wie sie hier in einem murinen SHT-Modell *in-vivo* gezeigt werden konnten (siehe 3.1, Seite 40), können mit Änderungen der Barriereintegrität assoziiert sein. Als validiertes SHT-Modell in der Zellkultur dient die OGD, da sie die metabolische und inflammatorische Situation nach SHT *in-vivo* auf das *in-vitro*-Modell übertragen kann. Daher wurde der Einfluss von OGD unter funktionellen Aspekten, wie Transendothelialen Elektrischen Zellwiderstands (TEER) in hCMEC/D3 analysiert.

Die Barrieraldichte als funktioneller Parameter der BHS wurde durch Messung des TEER untersucht. Die Unterschiede der Rohdaten zwischen Zelllayern und den Einsätzen der well-Platten ohne Zellen lagen bei dem verwendeten 24-well insert Modell (0,3 cm² Wachstumsfläche) zwischen 20-50Ω und resultierten in absoluten TEER-Werten zwischen 67-167Ω/cm².

Eine vierstündige OGD wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits in einem cEND-Modell (murine Hirnendothelzelllinie) als valides Ischämie-Modell etabliert (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011) und hier auf hCMEC/D3 übertragen. Eine OGD von 4h (ohne 24h Reoxygenierung) führte in hCMEC/D3 im Vergleich zur Normoxiebehandlung zu keiner signifikanten Änderung der TEER-Werte (Normoxie 100 ± 4,95% vs. OGD 97,54 ± 3,73%;

n=50, Abbildung 13). Die absoluten TEER-Werte lagen um 86Ω/cm² und damit im Bereich anderer publizierter Daten für hCMEC/D3 (Biemans et al. 2017, Page et al., 2016).

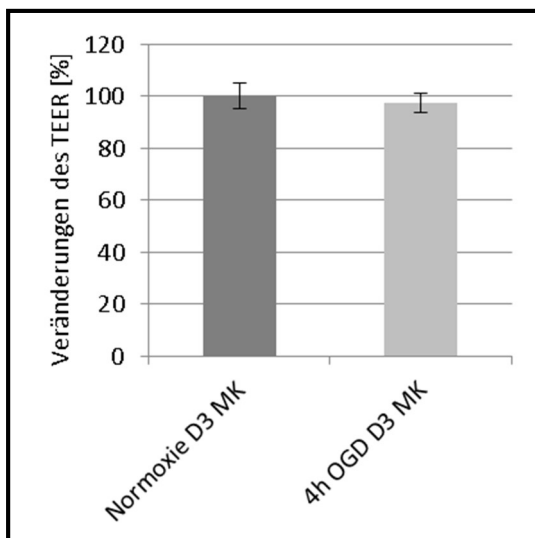


Abbildung 13: TEER in hCMEC/D3 nach Normoxie und 4h OGD.

TEER in hCMEC/D3 nach Normoxie und 4h OGD ohne 24h Reoxygenierung. Nach OGD konnte keine signifikante Veränderung des Transendothelialen Widerstands gezeigt werden; n=50; MW ± SEM in %.

3.3. Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors und der *Tight Junction*-Proteine Claudin-5 und Occludin sowie auf die Barrierefunktion in hCMEC/D3

3.3.1. Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression und Aktivität des Glukokortikoidrezeptors

3.3.1.1. Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Protein- und mRNA-Expression des Glukokortikoidrezeptors

Abbildung 14 **A** und **B** präsentieren die Proteinexpression des Glukokortikoidrezeptors (GRs). Unter Normoxie stellt sich im Immunoblot der Kontrollproben eine deutliche Bande bei etwa 95kDa dar (**B**). Das zeigt die physiologische Expression des GRs im humanen Hirnendothel und diente als Referenz für die weiteren Untersuchungen.

In der semiquantitativen Analyse (**A**) zeigte sich nach einer Monotherapie mit Dexamethason ein Abfall der Expression auf das $0,53 \pm 0,05$ -fache ($p < 0,001$) unter Normoxie und das $0,57 \pm 0,08$ -fache ($p < 0,001$) nach OGD im Vergleich zu Normoxie-Kontrolle. Analog ergab sich ein Abfall der GR-Expression in Dexamethason-behandelten Zellen nach OGD im Vergleich zur OGD-Gruppe, die keine Therapie erhielt ($p = 0,011$, # in **A**).

Ebenso führte die Kombination aus Dexamethason und Bortezomib zu einem jeweils signifikanten Abfall der Expression auf das $0,62 \pm 0,06$ -fache ($p < 0,001$) in der Normoxie bzw. das $0,68 \pm 0,12$ -fache ($p = 0,026$) nach OGD.

Die alleinige Zugabe von Bortezomib brachte keinen signifikanten Unterschied der GR-Expression im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle, weder in der Normoxie ($1,16 \pm 0,3$ -fach), noch nach OGD ($1,06 \pm 0,16$ -fach) (**A**).

In Abbildung 14 **C** ist die mRNA-Expression des GRs mittels qRT-PCR wiedergegeben. Die mRNA-Expression des GRs wurde durch Dexamethason signifikant auf das $0,81 \pm 0,04$ -

Ergebnisse

fache ($p=0,008$) unter Normoxie und das $0,86 \pm$ fache $0,01$ -fache ($p=0,0001$) nach OGD gesenkt, was eine GR Aktivierung implizieren könnte (Kadmiel and Cidlowski 2013).

Die Kombination von Dexamethason mit Bortezomib steigerte die mRNA-Level in der Normoxie signifikant auf $1,19 \pm 0,06$ ($p=0,04$) und in der OGD auf $1,29 \pm 0,13$ ($p>0,05$). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen einer Dexamethason-Monotherapie und einer dualen Therapie zusammen mit Bortezomib, sowohl unter Normoxie ($p=0,007$), als auch unter OGD ($p=0,029$).

Die alleinige Applikation von Bortezomib führte zu den höchsten mRNA-Level, mit jeweils einem Anstieg auf das $1,46 \pm 0,14$ -fache ($p=0,028$) unter Normoxie und das $1,52 \pm 0,12$ -fache ($p=0,013$) nach OGD (siehe Abbildung 14 C).

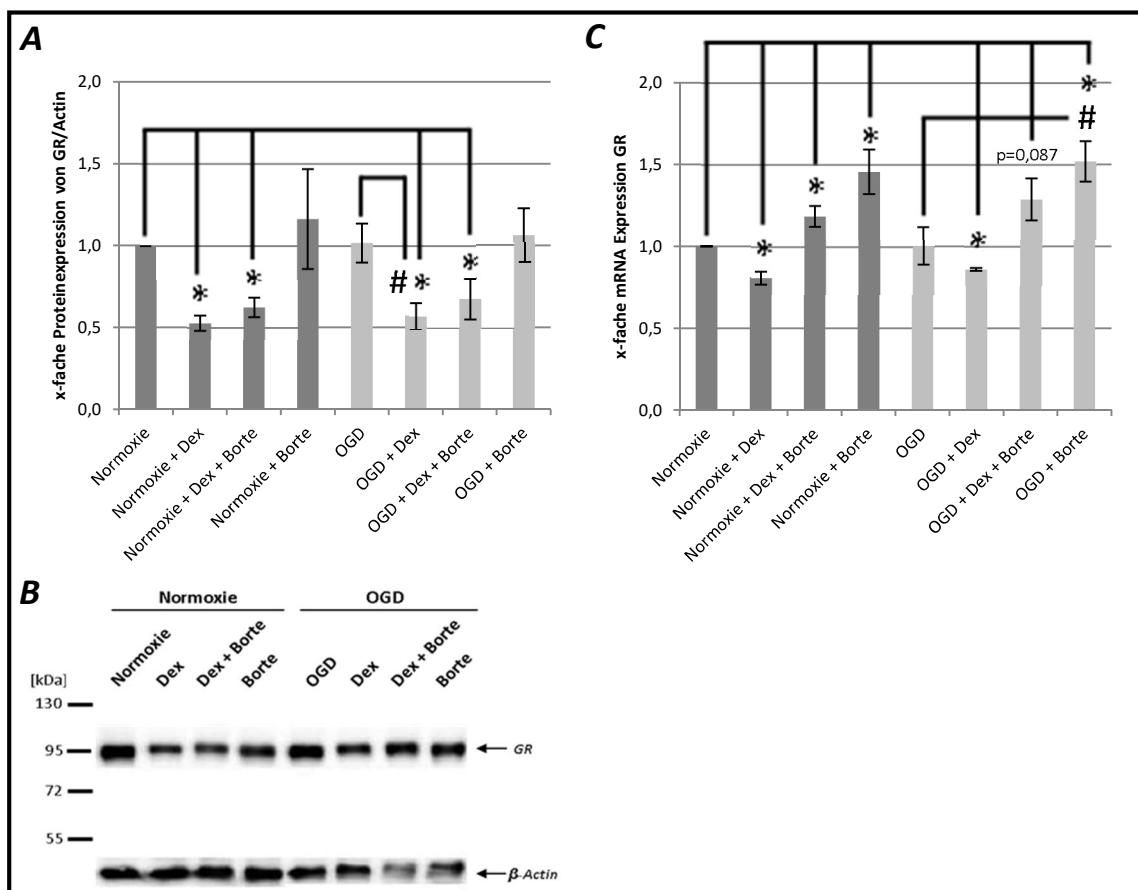


Abbildung 14: Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors (GR) nach Normoxie und OGD in hCMEC/D3.

A – C zeigen die Protein- und mRNA-Level des GR mittels western blotting in einer semiquantitativen Analyse mittels densitometrischer Messung (A) und einer qualitativen Darstellung durch Immunoblotting (B) beziehungsweise qRT-PCR (C) in hCMEC/D3. Statistisch signifikante Unterschiede zu den Normoxie-Kontrollgruppen sind mit * gekennzeichnet, statistisch signifikante Unterschiede zu den OGD-Kontrollen sind mit # hervorgehoben; $n=3-6$; $MW \pm SEM$.

3.3.1.2. Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors in unbehandelten und mit Dexamethason-behandelten hCMEC/D3

Um eine Aktivierung des GRs in hCMEC/D3 zu bestätigen, die die Ergebnisse in 3.3.1.1 erklären könnten, wurden zusätzlich immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Zuerst wurde die zelluläre Lokalisation des GRs mittels Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt (Abbildung 15). Distinkte Mengen an grün gefärbtem GR konnten im Zytosol gefunden werden (**A**), welche sich nach Zugabe von 100nM Dexamethason in den Zellkern (blau: DAPI Kernfärbung, rot: Lamin Färbung der Kernmembran) verlagerte (**B**). Das legt die Aktivierung des GRs und die konsekutive Migration in den Zellkern nahe, um dort seine genomischen Wirkungen zu entfalten.

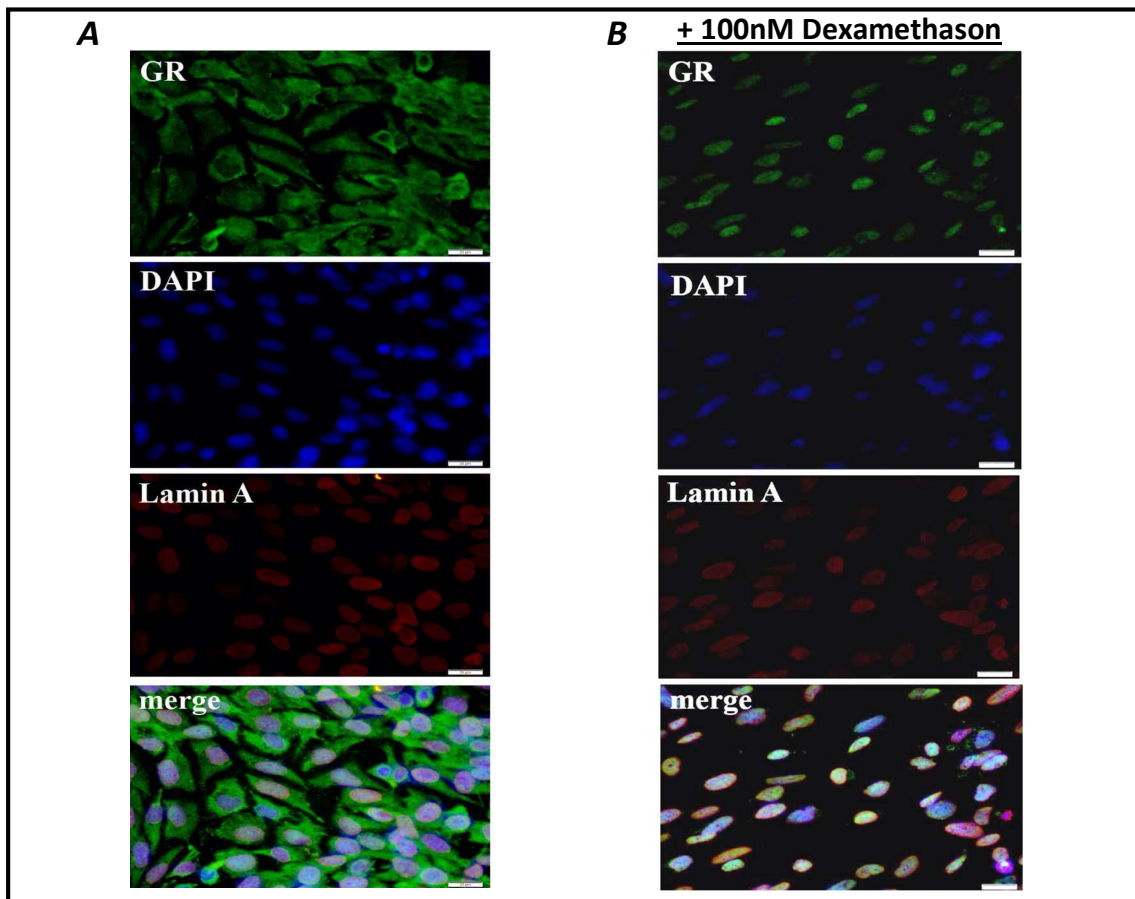


Abbildung 15: Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors in unbehandelten und mit Dexamethason-behandelten hCMEC/D3.

A und B zeigen die immunhistochemische Detektion des GR (grün), gegengefärbt gegen DAPI als Kernfärbung (blau) und Lamin A als Färbung der Kernmembran (rot) in unbehandelten nativen (A) und mit 100nM Dexamethason (B) behandelten hCMEC/D3. In unbehandelten D3 lassen sich im Zytosol der Zellen distinkte Mengen an Glukokortikoidrezeptoren nachweisen (A), die nach Behandlung mit Dexamethason in den Zellkern migrieren (B), um dort ihre genomische Wirkung zu entfalten.

3.3.2. Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression der *Tight Junction*-Proteine Claudin-5 und Occludin

In einem murinen *in-vivo* SHT-Modell konnte in dieser Arbeit mittels *controlled cortical impact* ein traumabedingter Verlust des TJ-Moleküls Occludin gezeigt werden (siehe 3.1.2., Seite 45). Dieser Verlust konnte durch eine Kombinationstherapie aus Dexamethason und Bortezomib reversiert werden. Um eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf hCMEC/D3 als humanes Zellmodell zu evaluieren, wurde die Expression der wichtigen TJ-Moleküle Claudin-5 und Occludin auf mRNA-Level mittels qRT-PCR und auf Proteinlevel durch western blotting analysiert.

3.3.2.1. Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Protein- und mRNA-Expression von Claudin-5

Im Immunoblot stellte sich eine dezente Proteinbande oberhalb von 17kDa dar (Abbildung 16 *E*, Seite 59). Das zeigte die geringe physiologische Expression des 23kDa großen TJ-Moleküls Claudin-5 in hCMEC/D3.

Im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle erhöht die Monotherapie mit Dexamethason die Claudin-5-Expression in der Normoxie $3,77 \pm 1,1$ -fach ($p=0,065$) und nach 4h OGD signifikant auf das $4,00 \pm 0,64$ -fache ($p=0,01$).

Die Kombinationstherapie zusammen mit Bortezomib führte in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg von Claudin-5, $3,34 \pm 0,36$ -fach nach Normoxie ($p=0,003$) und $2,40 \pm 0,36$ -fach nach OGD ($p=0,017$). Insgesamt zeigte die Kombination allerdings geringere Level an Claudin-5 als die Monotherapie mit Dexamethason.

Außerdem führt die alleinige Therapie mit Bortezomib zu keinem signifikanten Unterschied zu den Normoxie-Kontrollen (Abbildung 16 *C* und *E*, Seite 59).

Die mRNA-Expression von Claudin-5 (Abbildung 16 **A**, Seite 59). wurde durch eine 24h Therapie mit Dexamethason in der Normoxie-Gruppe signifikant auf das $2,68 \pm 0,61$ -fache ($p=0,049$) und nach 4h OGD nicht signifikant auf das $2,40 \pm 0,56$ -fache ($p=0,068$) erhöht.

Die Kombination von Dexamethason und Bortezomib steigerte die mRNA-Expression hingegen signifikant in beiden Gruppen, $3,89 \pm 0,74$ -fach ($p=0,018$) nach Normoxie und $2,82 \pm 0,17$ -fach ($p<0,01$) nach OGD. Die zusätzliche Gabe von Bortezomib zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zu der Dexamethason-Monotherapie.

Des Weiteren führte die alleinige Gabe von Bortezomib zu keinem signifikanten Unterschied zu der unbehandelten Normoxie-Kontrollgruppe. Eine 4h OGD mit Reoxygenierung für 24h offenbarte keinen signifikanten Unterschied der mRNA-Expression von Claudin-5 im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle (Abbildung 16 **A**, Seite 59).

3.3.2.2. Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Protein- und mRNA-Expression von Occludin

Bei der Proteinanalyse zeigte sich unter Normoxie-Bedingungen im Immunoblot eine deutliche Bande zwischen 55 und 72kDa (Abbildung 16 **F**, Seite 59). In diesem Bereich ist das 65kDa schwere Occludin zu erwarten. Das zeigt die physiologische Expression von Occludin im humanen Hirnendothelzellen. Im Gegensatz zu Claudin-5 wurde Occludin sowohl auf Protein- (Abbildung 16 **D**) als auch auf mRNA-Level (Abbildung 16 **B**) kaum reguliert. Lediglich die Gabe von Bortezomib zeigte in der OGD-Gruppe einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression auf das $1,43 \pm 0,11$ -fache ($p=0,016$, * in Abbildung 16 **B**). Die Kombinationstherapie mit Dexamethason und Bortezomib für 24h führte ebenfalls zu einem $2,35 \pm 0,52$ -fachen Anstieg der mRNA-Menge, war allerdings nur unter Verwendung eines einseitigen t-tests statistisch signifikant ($p=0,03$, † in Abbildung 16 **B**.)

Ergebnisse

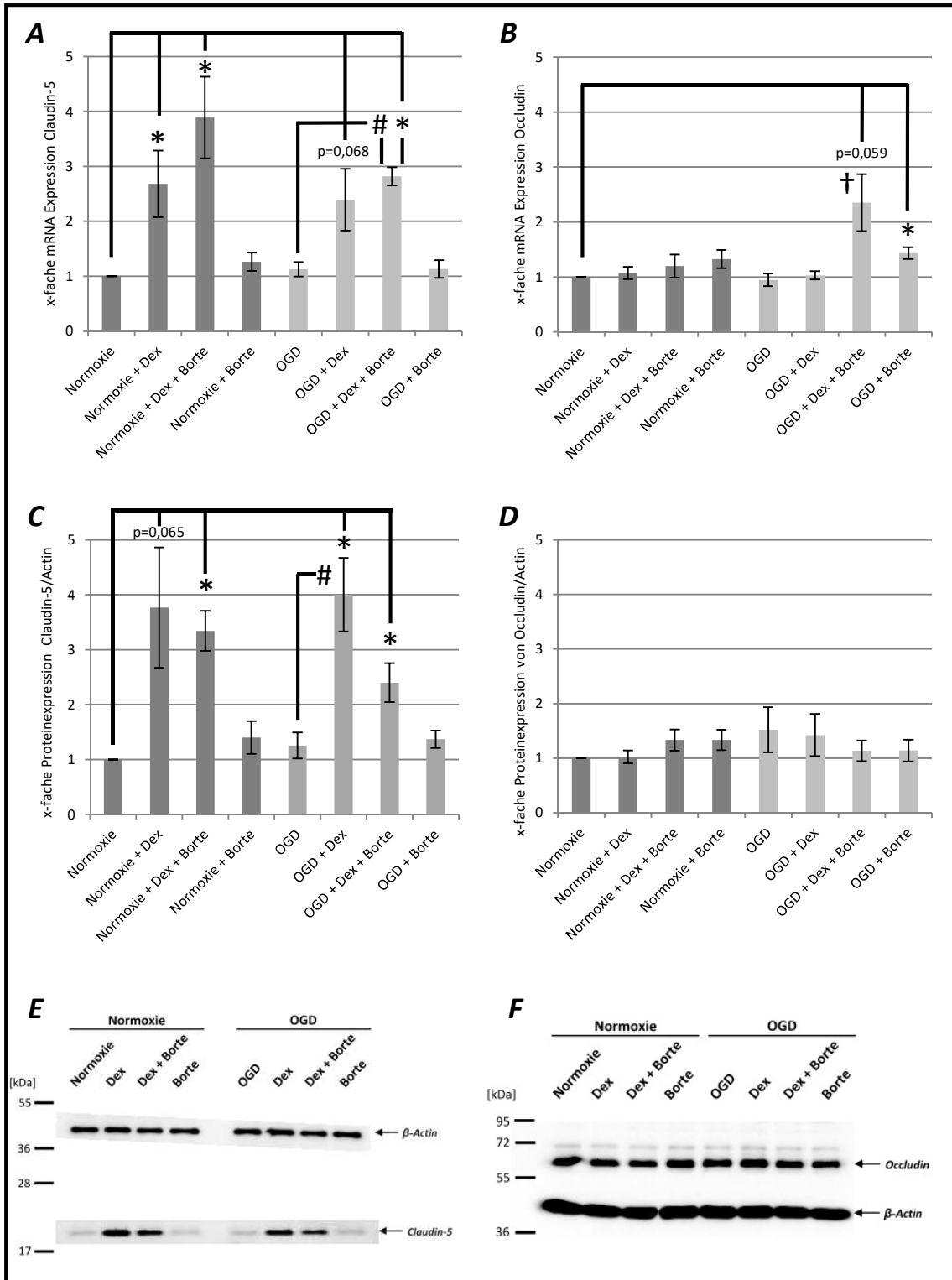


Abbildung 16: Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression von Claudin-5 und Occludin als struktureller Integritätsmarker der Blut-Hirn-Schranke nach Normoxie und OGD in hCMEC/D3.

A und **B** zeigen die mRNA-Level von Claudin-5 und Occludin mittels qRT-PCR in hCMEC/D3. **C – F** zeigen die Proteinlevel von Claudin-5 und Occludin nach western blotting in einer semiquantitativen Analyse mittels densitometrischer Messung (**C** und **D**) und qualitativen Darstellung durch Immunoblotting (**E** und **F**) in hCMEC/D3. Statistisch signifikante Unterschiede zu den Normoxie-Kontrollgruppen sind mit * gekennzeichnet, statistisch signifikante Unterschiede zu den OGD-Kontrollen sind mit # hervorgehoben; n=3-8; MW ± SEM.

3.3.2.3. Einfluss des nicht-selektiven Glukokortikoidrezeptorblockers RU486 auf die Proteinexpression von Claudin-5 und Occludin unter Dexamethason und Bortezomib

Um zu evaluieren, ob die beobachteten Effekte Dexamethason-vermittelt über die Wirkung am GR erfolgen, wurde der Einfluss des nicht-selektiven GR-Blockers RU486 auf die Proteinexpression in hCMEC/D3 untersucht. Die Zellen wurden unter Normoxie- und OGD-Bedingungen, wie in 2.3.2. beschrieben, mit Dexamethason (100nM) und Bortezomib (10nM) behandelt, jeweils mit und ohne Zugabe von 100nM RU486. Es wurde eine qualitative und semiquantitative Analyse der TJ Moleküle Occludin und Claudin-5 sowie des GRs durchgeführt, wie in 2.5 beschrieben.

Durch die Zugabe von RU486 zeigte sich sowohl in der Normoxie-Gruppe als auch in der OGD-Gruppe ein deutlicher Abfall der Claudin-5-Expression auf das $0,58 \pm 0,12$ -fache (Normoxie, $p=0,063$) beziehungsweise auf das $0,44 \pm 0,06$ -fache (OGD, $p=0,012$) im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle ohne RU486. Das legt nahe, dass die in Abbildung 16, Seite 59, gezeigte Hochregulation des Claudin-5, GR-vermittelt ist.

Nach der Zugabe von 100nM RU486 konnten für Occludin keine signifikanten Veränderungen in der Proteinexpression gezeigt werden (Daten nicht präsentiert).

3.3.3. Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Barrierefunktion in hCMEC/D3

In 3.2.3. wurde bereits die Barrieredichte als funktioneller Parameter der BHS eingeführt und durch Messung des Transendothelialen Elektrischen Widerstands (TEER) untersucht. Die Unterschiede der Rohdaten zwischen Zelllayern und den Einsätzen der well-Platten ohne Zellen lagen bei dem verwendeten 24-well insert Modell ($0,3 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche) zwischen $20\text{-}50\Omega$ und resultierten in absoluten TEER-Werten zwischen $67\text{-}167\Omega/\text{cm}^2$.

Ergebnisse

Es wurde untersucht, ob eine Therapie für 24h mit 100nM Dexamethason, 10nM Bortezomib oder in Kombination, die im Anschluss an die vierstündige OGD erfolgte, die Barrierefunktion steigern kann. Abbildung 17 zeigt die Effekte auf die TEER nach Normoxie und 4h OGD plus anschließender Reoxygenierung für 24h. Daten der TEER wurden im zeitlichen Verlauf auf Normoxie-Proben normalisiert, die zu jedem Zeitpunkt als 100% definiert wurden. Nach 24h Dexamethason-Behandlung stieg die TEER signifikant auf $164,5 \pm 13,1\%$ in der Normoxie-Gruppe und $149,9 \pm 15,2\%$ in der OGD-Gruppe ($n=12-13$, $p<0,05$). Die Kombination von Dexamethason und Bortezomib resultierte im Vergleich zur Normoxie-Kontrollgruppe ebenfalls in einem signifikanten Anstieg der TEER nach 24h Therapie (Normoxie: $154,1 \pm 11,5\%$, OGD: $132,7 \pm 11,2\%$, $n=14$, $p<0,05$). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Dexamethason-Monotherapie. Die Monotherapie mit Bortezomib zeigte keinen signifikanten Effekt auf den transendothelialen Widerstand in Relation zur Normoxie-Kontrolle.

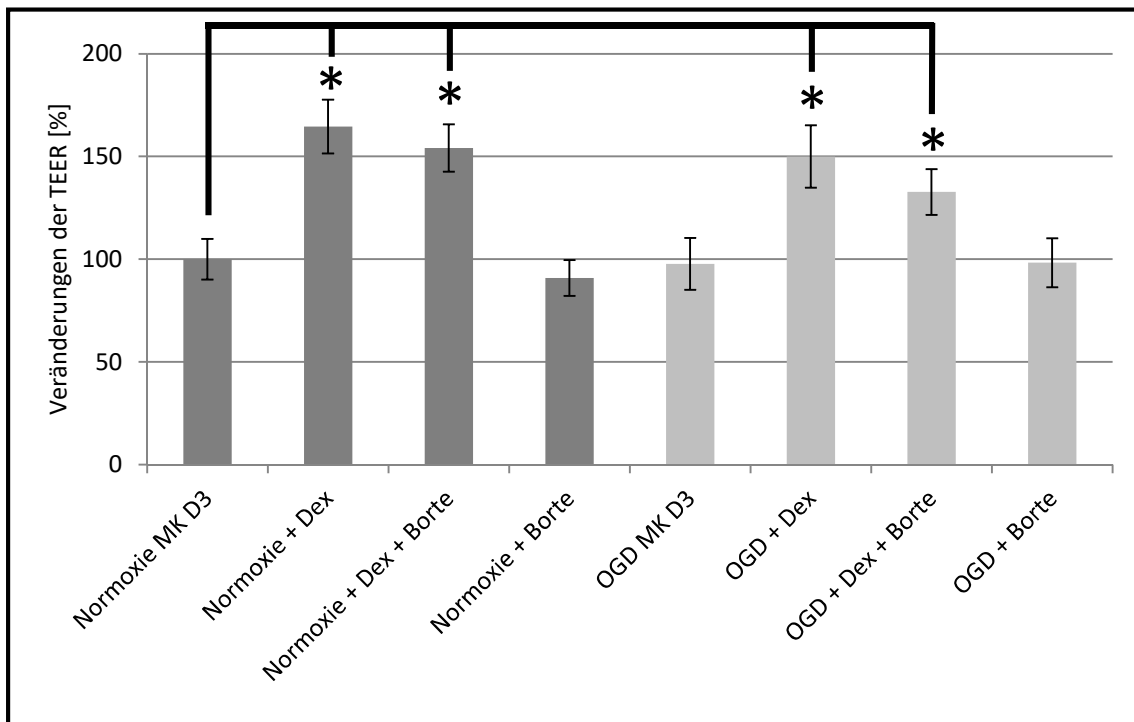


Abbildung 17: Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf den TEER als Marker der Blut-Hirn-Schranken Funktion nach Normoxie und OGD in hCMEC/D3.

TEER in hCMEC/D3 Monokultur unter Normoxie und OGD, 24h nach verschiedenen SHT-Therapien; MW +/- SEM in %; $n=10-15$; Die Monotherapie mit Dexamethason und die duale Therapie in Kombination mit Bortezomib zeigen im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle einen statistisch signifikanten Anstieg der TEER ($p < 0,05$, mit * markiert). Hierbei zeigt sich jedoch kein Unterschied zwischen der Dexamethason-Monotherapie und der Kombination aus Dexamethason und Bortezomib. Bortezomib alleine hat keinen Einfluss auf die TEER in hCMEC/D3.

3.4. Einfluss von Astrozyten auf einen OGD-induzierten Barrierschaden des BHS-Modells basierend auf einer hCMEC/D3-Kokultur

Bisher ließ sich in dieser Arbeit kein relevanter hypoxiebedingter Effekt einer OGD auf hCMEC/D3 nachweisen, weder strukturell durch eine Beeinflussung der mRNA- oder Proteinexpression des Glukokortikoidrezeptors oder der *Tight Junction*-Moleküle Claudin-5 und Occludin, noch auf die Barrierefunktion in Form des Transendothelialen Elektrischen Widerstands.

Es gibt Daten (Schiera, Bono et al. 2003; Abbott, Ronnback et al. 2006; Augustine, Cepinskas et al. 2014; Neuhaus, Gaiser et al. 2014), die die große Bedeutung von Astrozyten in BHS-*in-vitro* Modellen, vor allem bezüglich der Untersuchung pathologischer Zustände, hervorheben. Daher wurde das verwendete Modell mit hCMEC/D3 Zellen um astrozytäre C6 Zellen erweitert. C6 sind Astrozyten aus einer immortalisierten Gliom Zelllinie aus Ratten und ein validiertes Astrozytenmodell für BHS-*in-vitro* Modelle (Hurst and Fritz 1996; Neuhaus, Gaiser et al. 2014). Die Nutzbarkeit für die Induktion eines Schadens der BHS haben die C6 Zellen bereits in einem Ischämiemodell der Maus gezeigt (Neuhaus, Krämer et al. 2017).

Während sich in der reinen hCMEC/D3 Monokultur nach 4h OGD kein relevanter OGD-Schaden durch einen Abfall der TEER manifestierte (Abbildung 18 **A**, Seite 64), zeigten hCMEC/D3, welche mit C6 kokultiviert wurden, nach einer 4h OGD einen deutlichen Barrierschaden. Der TEER der kokultivierten Hirnendothelzellen sank statistisch signifikant auf $43,96 \pm 4,06\%$ ($p < 0,01$) im Vergleich zu $100 \pm 6,75\%$ nach 4h Normoxie (Abbildung 18 **B**, Seite 64).

Dennoch führte die Behandlung mit Dexamethason und/oder Bortezomib zu sehr ähnlichen Resultaten wie in der reinen hCMEC/D3 Monokultur. Eine Behandlung mit Dexamethason für 24h führte zu einer gesteigerten Barrierefunktion, sowohl in der Normoxie mit $161,48 \pm 24,31\%$ ($p = 0,085$), als auch der OGD mit $163,59 \pm 18,94\%$ ($p = 0,025$). Die zusätzliche Gabe von Bortezomib führte zu einem weiteren Anstieg der TEER auf $188,29 \pm 14,92\%$ ($p = 0,007$) in der Normoxie und zu einem leicht geringeren

Ergebnisse

Anstieg nach der OGD auf $140,81 \pm 8,79\%$. Diese Unterschiede waren allerdings im Vergleich zur Dexamethason-Monotherapie nicht statistisch signifikant (Abbildung 19, Seite 64).

Insgesamt besteht nach der 24-stündigen Reoxygenierungs- und Therapiephase kaum ein Unterschied zwischen Mono- und Kokultur. Auch wenn in der OGD-Gruppe nach 24h Reoxygenierung kein signifikanter Unterschied mehr zur Normoxie-Kontrolle besteht (4h OGD plus 24h Reoxygenierung: $89,39 \pm 16,48\%$, Normoxie: $100 \pm 19,61\%$), so scheint dennoch der signifikante OGD-Schaden der in hCMEC/D3 der Kokultur in Form eines relevanten TEER Abfalls auftrat, durch die Kokultivierung mit Astrozyten länger *in-vitro* zu „konservieren“ zu sein (# in Abbildung 19, Seite 64).

Ergebnisse

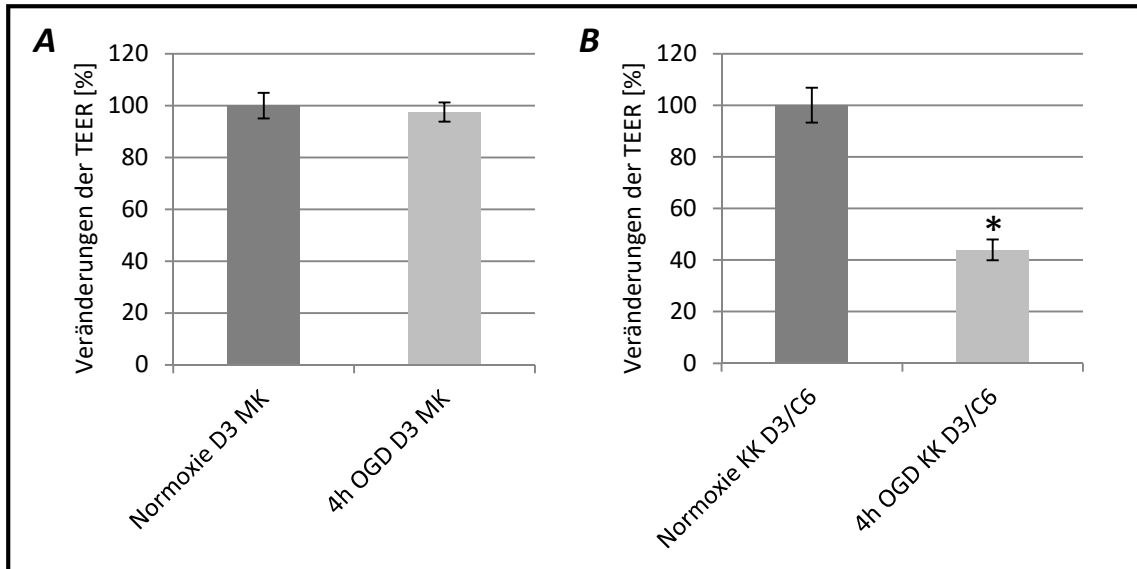


Abbildung 18: TEER in hCMEC/D3 Monokultur und Endothelzellen/Astrozyten Kokultur (hCMEC/D3 und C6) nach Normoxie und 4h OGD.

A – B zeigen die Veränderungen der TEER in einer hCMEC/D3 Monokultur (**A**) und einer Kokultur mit astrozytären C6 Zellen (**B**) nach 4h OGD. In der Monokultur hatten 4h OGD keinen Einfluss auf den TEER (**A**). In der Kokultur manifestierte sich ein deutlicher OGD-Schaden in den Hirnendothelzellen in Form eines signifikanten TEER Abfalls (**B**). Statistisch signifikante Unterschiede zu den Normoxiekontrollgruppen sind mit * gekennzeichnet; MK-Versuche: n=50, KK-Versuche: n=18-20; MW ± SEM in %.

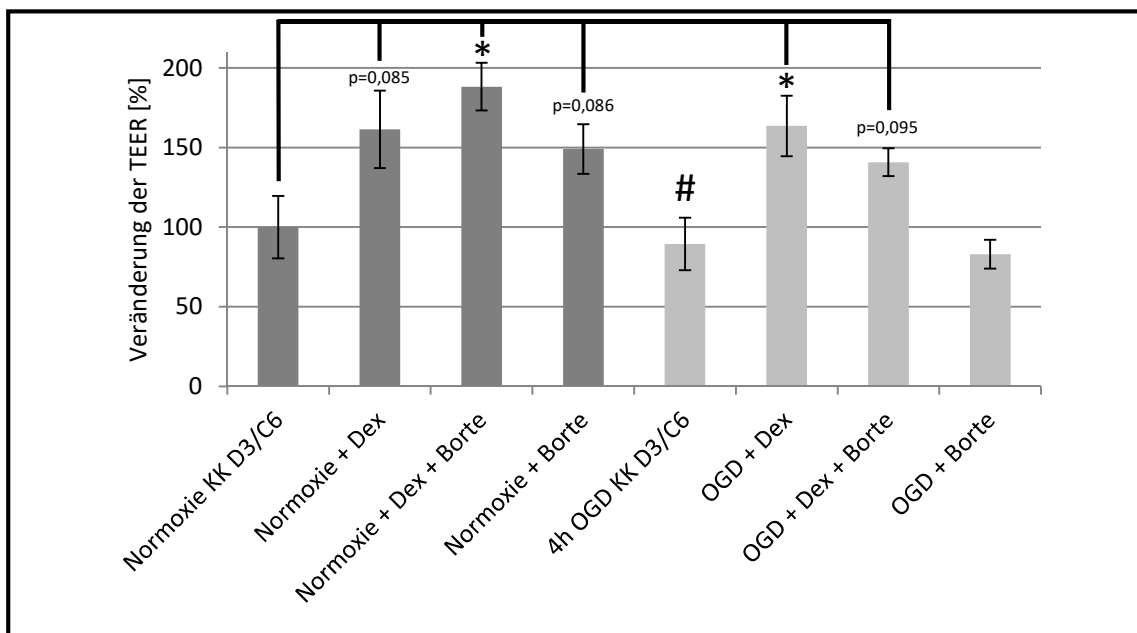


Abbildung 19: TEER in Endothelzellen/Astrozyten Kokultur (hCMEC/D3 und C6) unter Normoxie und OGD, 24h nach verschiedenen SHT-Therapien.

TEER in hCMEC/D3 und C6 Kokultur unter Normoxie und OGD, 24h nach verschiedenen SHT-Therapien; Die versch. Therapieformen zeigen sehr ähnliche Ergebnisse der TEER wie in der D3 Monokultur. Auch wenn nach 24h Reoxygenierung in der OGD-Gruppe kein signifikanter Unterschied mehr zur Normoxie-Kontrollgruppe besteht (analog zur Monokultur), so scheint der signifikante OGD-Schaden in der Kokultur der nach 4h OGD beobachtet wurde, in der Kokultur länger in-vitro konserviert zu bleiben, als in der Monokultur (#). Unterschiede zu der Normoxie-Kontrollgruppe sind mit * gekennzeichnet; n=5; MW ± SEM in %.

3.5. Bortezomib hemmt signifikant die Proteasomaktivität in hCMEC/D3

Bortezomib ist ein potenter Proteasom-Inhibitor, der weitere Zulassungen gegen die Bekämpfung onkologischer Erkrankungen erhält. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass ischämische Bedingungen im Mausmodell den proteasomalen Abbau des Glukokortikoidrezeptors (GR) induzieren und die konsekutive Glukokortikoid-Resistenz (GK-Resistenz) durch die Gabe von Bortezomib überwunden werden kann (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011).

Um zu überprüfen, ob eine postulierte GK-Resistenz in humanen Hirnendothelzellen gegebenenfalls durch proteasomale Blockade zu verhindern ist, wurde der Einfluss von Bortezomib auf das Proteasom-System von hCMEC/D3 untersucht.

Die funktionelle Aktivität des Proteasoms wurde durch Fluoreszenzmessung bestimmt. Es wurden alle drei katalytischen Zentren des 26S Proteasoms (β 1 Untereinheit: PGPH-ähnlich, β 2 UE: Trypsin-ähnlich und β 5 UE: Chymotrypsin-ähnlich) untersucht.

Nach Inkubation der hCMEC/D3 mit 10nM Bortezomib für 24h zeigte sich ein Einbruch der proteasomalen Aktivität aller drei katalytischen Untereinheiten. Die Aktivität der PGPH-ähnlichen β 1 UE ging unter Normoxie und OGD jeweils hochsignifikant auf $17,07 \pm 1,98\%$ ($p < 0,01$) beziehungsweise $17,86 \pm 2,90\%$ ($p < 0,01$) der Kontrollgruppe zurück (Abbildung 20 **A**). Bei der Trypsin-ähnlichen β 2 UE zeigte sich ein deutlicher, wenn auch nicht statistisch signifikanter Abfall der Aktivität auf $52,33 \pm 18,92\%$ in der Normoxie- und $54,67 \pm 17,69\%$ in der OGD-Gruppe (Abbildung 20 **B**). Die Chymotrypsin-ähnlichen β 5 UE ist der Hauptangriffsort des Bortezomibs am humanen 26S Proteasom (Myung, Kim et al. 2001). Hier sank die proteasomale Aktivität mit $6,74 \pm 1,54\%$ ($p < 0,01$) in der Normoxie und $7,07 \pm 1,58\%$ ($p < 0,01$) in der OGD hochsignifikant und am stärksten von allen katalytischen Untereinheiten (Abbildung 20 **C**)

Interessanterweise deutete sich in allen katalytischen Untereinheiten bei der kombinierten Gabe von Bortezomib mit Dexamethason eine noch stärkere Hemmung der proteasomalen Aktivität an, ohne jedoch statistisch signifikant gegenüber der

Ergebnisse

Monotherapie mit Bortezomib gewesen zu sein, wohl aber gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe.

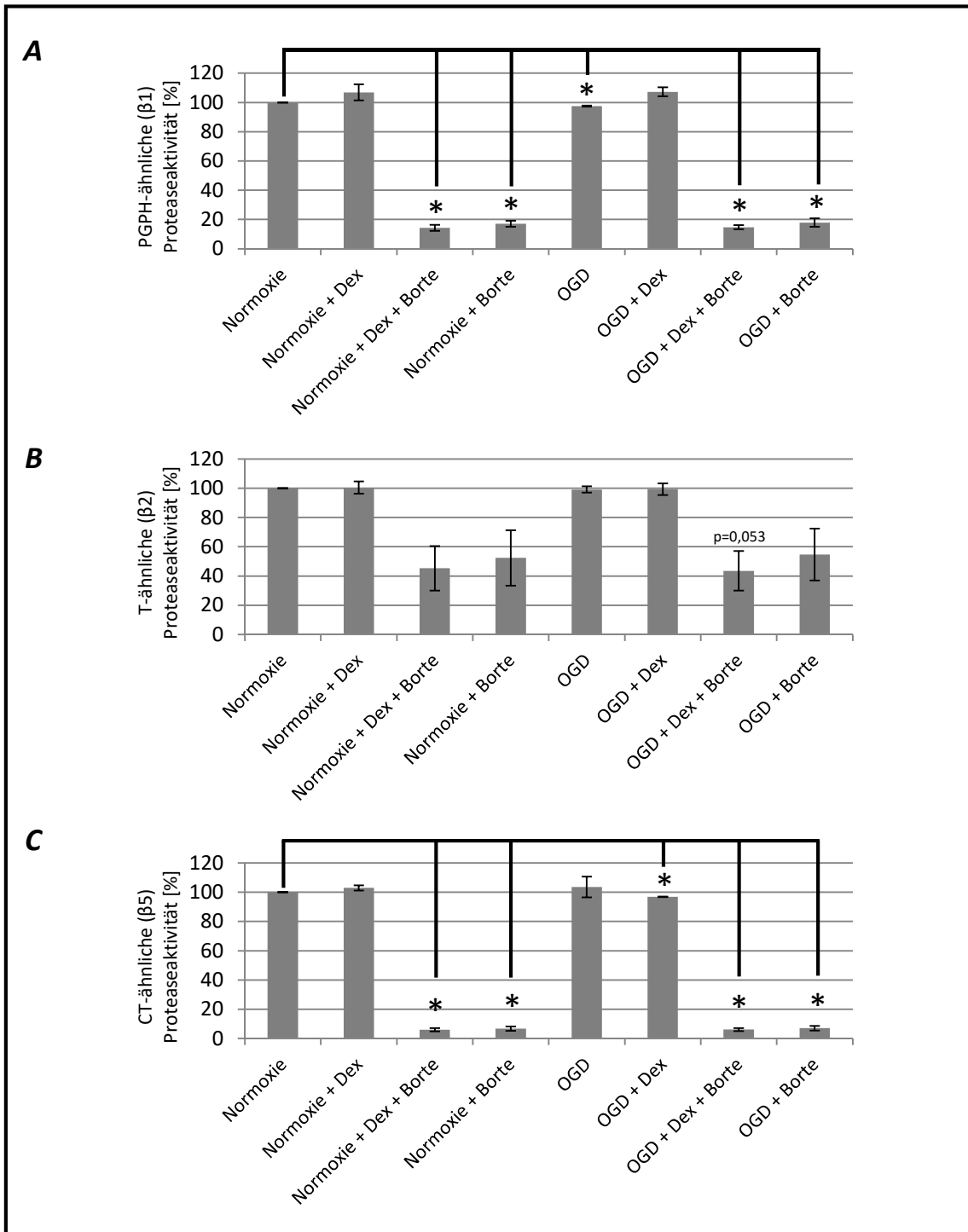


Abbildung 20: Inhibition der verschiedenen katalytischen Untereinheiten des humanen 26S Proteasoms durch Bortezomib in hCMEC/D3.

A – C zeigen die Proteaseaktivitäten der PGPH-ähnlichen $\beta 2$ (**A**) der Trypsin-ähnlichen $\beta 2$ (**B**), und der Chymotrypsin-ähnlichen $\beta 5$ Untereinheit (**C**) des 26S Proteasoms in hCMEC/D3. Bortezomib hemmt deutlich die Proteaseaktivität aller drei katalytischen Zentren. Statistisch signifikante Unterschiede zu den Normoxie-Kontrollgruppen sind mit * gekennzeichnet; $n=4$ aus zwei unabhängigen Versuchen; $MW \pm SEM$.

4. Diskussion

Der Verlust der Barriereintegrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine wesentliche pathophysiologische Komponente zahlreicher Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS). Auf zellulärer Ebene führt sie zur Hirnödembildung und neuroinflammatorischen Prozessen. Beide Komponenten können zum Zelltod und somit zum irreversiblen Untergang von Hirngewebe führen.

Glukokortikoide (GK) werden seit vielen Jahrzehnten in der Therapie neoplastischer und inflammatorischer Hirnödeme eingesetzt (Hall 1992; Reichardt, Gold et al. 2006) und sind in der Lage, diese signifikant zu reduzieren (Schroeder et al. 2019). GK können die BHS stabilisieren, indem sie die Bildung von Strukturproteinen der BHS induzieren (Poungvarin 2004; Forster, Silwedel et al. 2005; Forster, Burek et al. 2008). Trotz der experimentellen und klinischen Evidenz für die Wirksamkeit von GK im Rahmen inflammatorischer und neoplastischer Prozesse im ZNS, fehlt diese für Patienten mit Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma (SHT) (Poungvarin 2004; Roberts, Yates et al. 2004). Aktuell kann der Einsatz von GK für das Management eines schweren SHT nicht empfohlen werden (Bratton, Chestnut et al. 2007), da ihr Einsatz weder den Hirnödembedingten intrakraniellen Druck senken, noch das Patienten-Outcome verbessern kann. Darüber hinaus gibt es klinische Evidenz für toxische und deletäre Effekte von Glukokortikoiden im SHT (Beez et al. 2017, Zhang et al. 2019). Die Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie konstatiert in ihrer aktuellen Leitlinie zur Behandlung des SHT: *„Auf die Gabe von Glukokortikoiden zur Behandlung des SHT soll aufgrund einer signifikant erhöhten 14 Tage-Letalität verzichtet werden“* (S2e-Leitlinie „Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter“; Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. (DGNC); awmf.org; Registernummer 008 – 001; Stand: 02.12.2015, gültig bis 01.12.2020).

Die Gründe und Mechanismen weshalb man diese GK-Resistenz zwar bei ischämischen und traumatischen Erkrankungen wie Schlaganfall oder SHT vorfindet, nicht jedoch in Entzündlichen, wie z.B. Multiple Sklerose, sind weitgehend unverstanden.

4.1. Bortezomib kann im murinen *in-vivo* Modell den proteasomalen Abbau des GRs nach SHT reversieren und in Kombination mit Dexamethason die BHS-Integrität wiederherstellen

Eine Voraussetzung für die Wirksamkeit von GK ist das Vorkommen von funktionellen Glukokortikoid-Rezeptoren (GRs). GRs werden in sehr vielen Zellen exprimiert, darunter Hirndothelzellen (Forster, Burek et al. 2008). Da die Expressionslevel von GR mit ihrer transkriptionellen Aktivität korrelieren (Zhou and Cidlowski 2005), ist ihre Regulation wichtig. Das geschieht u.a. durch posttranslationelle Modifikation und Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Wallace and Cidlowski 2001). Dieser Abbau ist zum einen als Regulationsmechanismus im Sinne eines negativen Feedbacks eine physiologische Notwendigkeit, zum anderen kann er unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen transkriptionelle Signalwege, die durch GK induziert werden, limitieren und so die GK-Funktion kompromittieren.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in einem murinen *in-vivo* und *in-vitro* Schlaganfallmodell (cEND Zellen) zeigen, dass Hypoxie den proteasomalen Abbau des GRs induziert und dadurch eine reduzierte GK-Sensitivität resultiert (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Wir konnten somit Ergebnisse bestätigen, die schon früher den hypoxieinduzierten proteasomalen Abbau eines anderen Steroid-Rezeptors zeigten, nämlich des Östrogen-Rezeptors α (Stoner 2002). Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die zu beobachtende GK-Resistenz, durch die Blockade des Proteasoms durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Velcade®) überwunden werden konnte (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Dieses Überwinden der GK-Resistenz durch eine Proteasom-Blockade ließ sich auch *in-vivo* beobachten. Im murinen Schlaganfallmodell (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) führte die GK-Therapie unter Proteasom-Blockade zu einer reduzierten Hirnödembildung und geringeren funktionellen Defiziten. Interessanterweise führen verschiedene experimentelle SHT-Schweregrade zu einem unterschiedlich starken Abfall der GK-Sensitivität (Taylor, Rahman et al. 2010). Diese Entdeckungen lassen die Vermutung zu, dass auch nach SHT verminderte GR Level,

durch einen gesteigerten proteasomalen Abbau, die Resistenz gegen eine Dexamethasontherapie vermitteln, die im klinischen Setting beobachtet wird.

Diese Arbeit konnte nun dazu beitragen, die Beobachtungen, die wir im murinen Schlaganfallmodell erhoben, auf ein SHT-Modell (controlled cortical impact, CCI) zu übertragen. In dem verwendeten *in-vivo* Mausmodell zeigte sich eine deutliche Reduktion von GR in geschädigten Hirnarealen gegenüber gesundem Hirngewebe. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit veröffentlichten Daten, die auf molekularer Ebene erhoben wurden. Sie zeigten eine Herunterregulation von Steroidhormonrezeptoren mRNA in einem Ratten SHT-Modell (McCullers, Sullivan et al. 2002) beziehungsweise nach fokaler cerebralen Ischämie in neonatalen Ratten (Lee, Wen et al. 2007). Eine Monotherapie mit Dexamethason zeigte keine GR-Expression nach Trauma. Diese Reduktion im GR-Expressionsmuster konnte durch die Blockade des Proteasoms durch Bortezomib reversioniert werden. Hierbei entdeckte man in geschädigtem Hirngewebe wieder ein ähnliches GR-Expressionsmuster in Endothelzellen wie in gesundem Hirngewebe. Das murine *in-vivo* SHT-Modell (mittels CCI) brachte also kohärente Ergebnisse zu unserem *in-vivo* Schlaganfall-Modell (mittels tMCAO) (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Des Weiteren zeigte die Immunfluoreszenz verminderte Expressionslevel von Occludin, als wichtigem Integritätsmarker der BHS, nach traumatischer Schädigung, im Vergleich zu gesundem Hirngewebe. Bortezomib alleine hatte hier keine Auswirkungen auf die Proteinexpression von Occludin. In Kombination mit Dexamethason konnte wieder eine kontinuierliche Occludin-Expression erzielt werden.

Das erlaubt die Vermutung, dass in dem verwendeten murinen SHT-Modell Bortezomib zum einen in der Lage ist, den postulierten traumatisch bedingten Abbau des GRs zu reversieren. Zum anderen könnte nun, durch die Konservierung des GRs trotz Trauma, das GK Dexamethason seine BHS-stabilisierende Wirkung über den GR entfalten und so die GK-Resistenz, die im klinischen Umfeld beobachtet wird, überwinden. Diese mikroskopischen Beobachtungen werden auf makroskopischer Ebene dadurch untermauert, dass Thal et al. zeigen konnte, dass die Applikation von Dexamethason

und Bortezomib 30 Minuten nach CCI in einer statistisch signifikanten Reduktion des Hirnödems bei Mäusen resultiert (Thal, Schaible et al. 2013). Die Monotherapien mit Dexamethason oder Bortezomib führten im Modell nicht zu einer Reversierung der schädigenden Effekte durch SHT. Im Falle der Dexamethason-Monotherapie am ehesten durch den beobachteten Mangel an GR. Des Weiteren scheint eine Bortezomib-Monotherapie keinen Einfluss auf die Proteinexpression von TJ-Molekülen zu haben. Die immunhistologischen Ergebnisse konnten durch molekularbiologische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bereits validiert werden (Thal, Schaible et al. 2013).

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen bestätigen daher frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe in einem murinen *in-vivo* Schlaganfallmodell (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Sie unterstützen die Hypothese, dass der proteasomale Abbau des GRs einer der Gründe für die beobachtete GK-Resistenz nach Trauma ist und diese Resistenz durch die Blockade des Proteasoms überwunden werden kann. Zudem zeigen die Ergebnisse die Übertragbarkeit eines murinen *in-vivo* Schlaganfall-Modells auf ein murines *in-vivo* SHT-Modell.

4.2. Eine vierstündige Hypoxie in hCMEC/D3 zeigt keinen Einfluss auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors und spiegelt, als *in-vitro* Modell, die *in-vivo* gezeigte Situation nicht wider

In dem untersuchten humanen *in-vitro* SHT-Modell in hCMEC/D3 fanden sich keine Hinweise für eine hypoxiebedingte Reduktion des Glukokortikoidrezeptors (GR). Des Weiteren zeigte eine Bortezomibgabe additiv zu Dexamethason keine Verbesserung der BHS-Barriere, weder auf funktioneller Ebene durch TEER-Messung, noch auf molekularbiologischer Ebene durch die Expression der eminent wichtigen TJ-Moleküle Occludin und Claudin-5. Sowohl der hypoxiebedingte Mangel des GRs, als auch eine Restitution der BHS durch eine Kombination aus Dexamethason und Bortezomib konnten durch unsere Arbeitsgruppe bereits in einem murinen Ischämiemodell *in-vivo* und *in-vitro* gezeigt werden (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). In dieser Arbeit ließen

sich diese Effekte einer vierstündigen OGD auf ein SHT-Modell, welches auf der humanen Zelllinie hCMEC/D3 basiert, nicht übertragen. Vor allem die Regulation des GRs würde hierbei eine zentrale Rolle einnehmen.

Der Glukokortikoidrezeptor wird in einer Reihe verschiedenster Gewebe exprimiert, einschließlich des vaskulären Endothels und ist dort verantwortlich für die physiologischen Effekte von Glukokortikoiden (GK). Dabei korrelieren die Expressionslevel des GRs stark positiv mit der transkriptionellen Aktivität (Zhou and Cidlowski 2005). Genetische Transaktivierung lässt sich durch Mutation des GRs oder durch Blockade der Substratbindungsstelle am GR verhindern (Tronche, Kellendonk et al. 1998). Das therapeutische Potential einer GK-Behandlung hängt also von den Expressionslevel der Glukokortikoidrezeptoren und ihrer Bioverfügbarkeit ab (Zhou and Cidlowski 2005). Das Therapieversagen einer GK-Behandlung, wie man sie bei Schlaganfall und Schädel-Hirn-Trauma (SHT) vorfindet, kann daher entweder durch eine verminderte Rezeptoraffinität der GK oder durch reduzierte GR-Expressionslevel bedingt sein. Letzteres konnte für die Situation des Schlaganfalls bereits nachgewiesen werden. Förster, Kleinschnitz et al. zeigten, dass Hypoxie signifikant die Herunterregulation des GRs induziert, sowohl *in-vitro* an cEND Zellen unter OGD, als auch *in-vivo* an Mäusen nach tMCAO (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011).

Die Datenlage bezüglich des Einflusses von Hypoxie auf die Expressionslevel und Funktion des GRs in menschliche Zellen ist sehr gering. In der hier verwendeten humanen Hirnendothelzelllinie hCMEC/D3 zeigte sich, dass eine 4h OGD mit einer Reoxygenierung von 24h die Expression des GRs in einer reinen Monokultur nahezu unverändert lässt. Es gibt Studien, die eine hypoxieinduzierte Expressionssteigerung des GRs zeigen. Diese verlaufen in ihrer Kinetik sowohl Sauerstoff-, als auch Zeit-abhängig und werden über den Hypoxie-induzierenden-Faktor 1α (HIF- 1α) vermittelt (Jenq, Rabb et al. 1996; Leonard, Godson et al. 2005). Allerdings wurden dabei epitheliale Zellen untersucht. In menschlichen Endothelzellen wurde bisher erst in Nabelschnurendothelzellen der HUVEC Linie (human umbilical vein endothelial cells) ein möglicher Hypoxie-Einfluss auf den GR untersucht. In diesem Zelltyp ließ sich ebenfalls

ein hypoxiebedingter Anstieg der GR-Expression nachweisen (Sengupta and Wasyluk 2001). Jedoch gibt es keine veröffentlichten Daten, die derartiges für hCMEC/D3 belegen. An einer OGD-Dauer von vier Stunden wurde hier dennoch festgehalten, da diese Bedingungen in unserer Arbeitsgruppe als Ischämiemodell in cEND validiert sind (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011) und dieses Modell auf die humane Zellreihe hCMEC/D3 übertragen werden sollte. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die auf molekularer Ebene einen unterschiedlichen Einfluss von Hypoxie auf die Expression des GRs in murinen und menschlichen Hirnendothelzellen zeigen, sind möglicherweise durch eine Speziesdifferenz zu erklären.

Die Monotherapie mit Dexamethason reduzierte die mRNA- und Proteinlevel des GRs. Dies impliziert eine Rezeptoraktivierung, die in hCMEC/D3 bereits für Hydrocortison gezeigt werden konnte (Forster, Burek et al. 2008). Die konsekutive Translokation des aktivierten Rezeptor-Substrat-Komplexes in den Zellkern, konnte hier durch Immunfluoreszenz bestätigt werden. Die erniedrigten GR-Level stehen im Einklang mit Daten, welche einen Liganden- und Proteasom-abhängigen Abbau des GRs durch GK zeigten (Silva, Powell-Oliver et al. 1994).

Die Monotherapie mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib brachte für den GR die höchsten mRNA-Level aller Therapieformen. Auf Proteinebene zeigten sich ähnlich hohe Werte wie in der Normoxie-Kontrolle. Bereits Cidlowski et al. konnten für eine Therapie mit Dexamethason \pm Proteasom-Inhibitor die höchste GR-Expression für die Monotherapie des Proteasom-Inhibitors zeigen (Wallace, Cidlowski et al. 2010). Ein möglicher Liganden-bedingter Abbau durch das Proteasom kann durch Bortezomib daher verhindert werden. Diese Beobachtungen korrelieren auch mit den *in-vivo* Daten in der Maus, bei denen unter Bortezomib-Monotherapie auch nach Schädigung eine GR-Expression, ähnlich zu gesundem Hirngewebe, nachgewiesen wurde. Es scheint also möglich, dass die Gabe eines Proteasom-Inhibitors den hypoxiebedingten proteasomalen Abbau des GRs nicht nur nach Schlaganfall in Mäusen verhindern kann, sondern auch nach Schädel-Hirn-Trauma in Mäusen und nach OGD auch in humanen Hirnendothelzellen.

Es ließ sich kein Benefit einer Bortezomib-Monotherapie oder einer dualen Therapie mit Dexamethason gegenüber einer Steroidmonotherapie nachweisen, weder funktionell durch TEER-Messung, noch strukturell auf Ebene der TJ-Moleküle Occludin und Claudin-5. Das kann dadurch bedingt sein, dass in hCMEC/D3 trotz einer OGD von 4h weiterhin ausreichend aktivierbarer GR vorhanden ist, um eine Restitution der BHS zu vermitteln. Ein zusätzlicher positiver Effekt durch eine Blockade des postulierten hypoxiebedingten Abbaus des GRs nach SHT oder Schlaganfall könnte sich unter solchen Umständen nicht manifestieren. In Ratten jedoch zeigten Zhang et al. eine Verbesserung des Barrierschadens der BHS nach Schlaganfall durch eine Therapie mit Bortezomib und dem tissue plasminogen activator (tPA). So offenbarte sich darunter z.B. eine verminderte Fibrin/Fibrinogen-Extravasation aus den Blutgefäßen ins Interstitium. Des Weiteren konnten sie im Vergleich zur Kontrollgruppe indirekt geringere Mengen an MMP-9 nachweisen. Dadurch wurde der Abbau der Basalmembran in Form des Kollagen Typ IV reduziert, der nach Ischämie beobachtet wird (Zhang, Zhang et al. 2010). Bezogen auf die strukturelle Integrität der BHS erscheint die Zelllinie hCMEC/D3 möglicherweise ungeeignet um hypoxiebedingte Veränderung des GRs und seiner Zielgene wie Occludin oder Claudin-5 in einem Ischämiemodell zu untersuchen. Daher ist die Validität von hCMEC/D3 als Barrieremodell kritisch zu hinterfragen.

Neben den diskutierten Effekten einer Bortezomib ± Dexamethason Therapie auf die strukturelle Integrität der BHS und diesen Auswirkungen auf das Gesamtergebn sind allerdings noch andere neuroprotektive beziehungsweise BHS-protective Wirkungen, welche GR-vermittelt stattfinden können, wie z.B. anti-inflammatorische Signalwege, nicht auszuschließen. So gibt es Daten, die eine positive Wirkung von Proteasom-Inhibitoren in Ischämie/Reperfusion-Modellen *in-vivo* zeigen. NF-κB ist ein wichtiger Bestandteil inflammatorisch wirkender Signalkaskaden und wird sowohl nach SHT (Nonaka, Chen et al. 1999) als auch nach globaler Ischämie (Clemens, Stephenson et al. 1998) hochreguliert. Williams et al. konnten *in-vivo* nach SHT anti-inflammatorische Effekte durch Proteasom-Inhibitoren über Hemmung von NF-κB Signalkaskaden nachweisen (Williams, Dave et al. 2006). Die Bereitstellung aktivierbarer GR kann hier möglicherweise unterstützend wirken, da ein hemmender Einfluss des GRs auf NF-κB

beschrieben ist (Nelson, Wilde et al. 2003). Daher sind in menschlichen Hirnendothelzellen positive Effekte einer Monotherapie beziehungsweise einer Kombination aus Bortezomib und Dexamethason die über die strukturelle Integrität der BHS hinausgehen, nicht auszuschließen.

Der Einfluss von Bortezomib auf das Proteasom wurde in der humanen Zellreihe hCMEC/D3 noch nicht untersucht. Allerdings kann ein additiver Effekt des Bortezomib nur auftreten, wenn Bortezomib das humane 26S Proteasom auch in diesem Zelltyp blockiert. Die blockierende Wirkung des Bortezomib in hCMEC/D3 konnte hier validiert werden. In allen 3 katalytischen Untereinheiten (UE) des 26S Proteasoms zeigte sich eine sehr deutliche bis hochsignifikante Reduktion der enzymatischen Aktivität. Interessanterweise deutete sich in allen drei katalytischen UE bei der kombinierten Gabe von Bortezomib mit Dexamethason eine noch stärkere Hemmung der proteasomalen Aktivität gegenüber der Monogabe von Bortezomib an, ohne jedoch bei $n=4$ (aus zwei unabhängigen Versuchen) eine statistische Signifikanz aufzuweisen.

4.3. Eine hypoxiebedingte Barrierschädigung der BHS zeigt sich nicht in hCMEC/D3, manifestiert sich jedoch in Kokultur mit Astrozyten

Für die humanen hCMEC/D3 ließ sich in dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss der vierstündigen OGD-Behandlung auf den TEER feststellen. Ebenso scheint eine fünfstündige OGD keinen Effekt auf den transendothelialen Widerstand in hCMEC/D3 zu haben (Gerhartl, Pracser et al. 2020). Im Gegensatz hierzu aktiviert eine sechsstündige OGD hypoxieinduzierte Signalkaskaden in hCMEC/D3 (Jacob, Potin et al. 2015) und Page et al. konnten in hCMEC/D3 nach 6h OGD einen signifikanten TEER-Abfall und nach 24h OGD einen hochsignifikanten Abfall feststellen (Page et al. 2016). Interessant ist jedoch, dass Page, Raut et al. in einer späteren Arbeit nach 6h OGD in hCMEC/D3 nur noch einen leichten TEER-Abfall feststellen konnten, ohne statistische Signifikanz (Page, Raut et al. 2019). Daher besteht die Möglichkeit, dass sich ein Einfluss der OGD auf den transendothelialen elektrischen Widerstand in der hCMEC/D3

Monokultur erst zu einem späteren Zeitpunkt manifestiert. Wie schon erwähnt, wurde hier dennoch an einer vierstündigen OGD festgehalten, um die Übertragbarkeit, der von uns im murinen Modell gefundenen Ergebnisse, auf hCMEC/D3 zu überprüfen.

Wie in der Einleitung bereits aufgezeigt, spielt *in-vivo* eine Reihe weiterer Zellen eine entscheidende Rolle in den komplexen Regulationsvorgängen des ZNS, sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen. Die Bedeutung der neurovaskulären Einheit für das ZNS nach SHT wurde in einer Übersichtsarbeit von Lok et al. hervorgehoben (Lok, Wang et al. 2014). Historisch gesehen sind Astrozyten der, für seine neurosupportive Funktion, meist anerkannte Zelltyp der neurovaskulären Einheit. Versuche mit Mikrodialysaten von Patienten mit SHT zeigten rasch erhöhte extrazelluläre Glutamat-Spiegel nach SHT (Vespa, Prins et al. 1998) und Rosenberg et al. konnte zeigen, dass die Anwesenheit von Astrozyten Neurone vor dieser Glutamat-Überladung schützen können (Rosenberg and Aizenman 1989). Ebenso können Astrozyten ihre schützende Rolle über antioxidative Mechanismen durch die Expression hoher Spiegel an Superoxid Dismutase und Glutathion ausüben (Hamby and Sofroniew 2010). Die Exzitotoxizität durch Glutamat und oxidative Schädigung sind, wie in 1.3 bereits beschrieben, wesentliche Komponenten der pathophysiologischen Vorgänge an der BHS nach SHT. Daher wurde der Einfluss von OGD und anschließender Therapie durch Dexamethason und/oder Bortezomib in dieser Arbeit auch auf hCMEC/D3-Astrozyten Kokulturen untersucht. Mit Astrozyten kokultiviert, zeigte sich in den Hirnendothelzellen ein signifikanter Abfall des TEER nach 4h OGD. Dieses Ergebnis deckt sich mit Kokultur-Modellen der BHS sowohl in Mäuseendothelzellen (cerebEND) (Neuhaus, Gaiser et al. 2014), als auch in den humanen Hirnendothelzellen der hCMEC/D3, wie Gerhartl, Pracser et al. Anfang 2020 zeigen konnten (Gerhartl, Pracser et al. 2020). Auch in diesen Arbeiten trat eine signifikante Reduktion der TEER durch OGD lediglich im Beisein von Astrozyten auf, nicht jedoch in der Endothelmonokultur. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass der aus OGD resultierende Zusammenbruch der BHS in Form eines signifikanten TEER Abfalls entweder zum Teil durch die Astrozyten vermittelt wird oder sogar komplett auf sie zurückzuführen ist, und die hCMEC/D3 ausschließlich sekundär, durch die Astrozyten direkt, geschädigt werden.

So konnte Augustine et al. in einem mechanischen *in-vitro* SHT-Modell zeigen, dass ein definierter mechanischer Stress zwar transient die Morphologie von Astrozyten Monolayern ändert, hCMEC/D3 Zellen jedoch durch dieses Trauma weitgehend unversehrt bleiben. Sie schlossen daraus, dass bei einer Schädigung *in-vivo* die Mikroblutgefäße relativ intakt bleiben. Durch die in ihren Versuchen beobachtete Astrozyten-Retraktion werde die räumliche Integrität von Astrozyten und Endothel gestört, was zu einer sekundären Schädigung des Endothels führen könne (Augustine, Cepinskas et al. 2014). Aus diesen Untersuchungen ist daher zu schließen, dass hCMEC/D3 ohne astrozytäre Kokultur eventuell kein hinreichend gutes Barrieremodell darstellen, um Veränderungen der Barriereintegrität *in-vitro* wiederzugeben.

4.4. Dexamethason verbessert die Barriereigenschaften in hCMEC/D3 und zeigt hierbei eine Speziesdifferenz zu murinen Hirnendothelzellen

In den humanen Hirnendothelzellen hCMEC/D3 steigert das Glukokortikoid (GK) Dexamethason den transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) signifikant. Es konnte damit die Barriereigenschaften in hCMEC/D3 nachweislich verbessern. Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die diese Barriere-induzierenden Eigenschaften auf hCMEC/D3 bereits für das GK Hydrocortison zeigen konnten (Forster, Burek et al. 2008). In dem Versuch die molekularen Zielstrukturen dieser Dexamethasonwirkung zu finden, zeigten sich durch Dexamethasongabe deutlich erhöhte Level an Claudin-5 mRNA, die sich auch in einer signifikant erhöhten Proteinexpression widerspiegelten. Bortezomib alleine brachte keinen Anstieg der TEER-Werte und auch in der Kombination mit Dexamethason wurden im Vergleich zur Monotherapie mit diesem GK keine signifikanten Unterschiede gefunden. Die Dexamethason-vermittelten Effekte auf die Expression von Claudin-5 konnten durch den GR-Blocker RU486 gehemmt werden. Das bestätigt, dass die Hochregulation von Claudin-5 durch Dexamethason zumindest teilweise über den GR vermittelt wurde. RU486 hatte hingegen weder auf die Expression des GRs selbst, noch auf die Expression

von Occludin einen Einfluss. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die gesteigerte Expression von Claudin-5 auch über andere Signalkaskaden vermittelt wurde.

Für Occludin als weiterem wichtigen Integritätsmarker der BHS zeigte sich keinerlei Einfluss auf mRNA- oder Proteinebene, weder durch Dexamethason, noch durch Bortezomib. Es gibt bisher (Stand 27.01.2020) keine veröffentlichten Daten über den Einfluss von Dexamethason auf die Expression von Occludin oder Claudin-5 in hCMEC/D3 (pubmed Recherche, Suchbegriffe: hCMEC/D3 AND dexamethasone AND occludin, beziehungsweise: hCMEC/D3 AND dexamethasone AND Claudin-5). Jedoch ist in hCMEC/D3 Zellen eine gesteigerte Proteinexpression für Claudin-5 und Occludin durch Hydrocortison in der Vergangenheit bereits nachgewiesen worden (Forster, Burek et al. 2008). Durch die hier beobachtete Diskrepanz in der Wirkung zweier verschiedener GK auf hCMEC/D3 lässt sich eine differenzierte Wirkung von Dexamethason und Hydrocortison in diesen Hirnendothelzellen nicht ausschließen.

Während Claudin-5 in hCMEC/D3 als Hauptziel des Dexamethasons ausgemacht werden konnte, zeigt sich in den murinen Hirnendothelzellen cEND kein Einfluss von GK auf dieses TJ-Molekül (Förster, Kahles et al. 2007). Für cEND Zellen wurde in der Vergangenheit das Occludin als Zielmolekül von GK indentifiziert (Forster, Silwedel et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen daher die Hypothese der Speziesdifferenz zwischen humanen und murinen Hirnendothelzellen bezüglich der Hauptziele von GK, die schon früher von unserer Arbeitsgruppe postuliert wurde. Abschließend sei noch erwähnt, dass die allgemeine Vorstellung der dominanten Rolle des Claudin-5 mit geringerer Beteiligung von Claudin-3 und Claudin-12 sowie Occludin an der strukturellen Integrität der BHS veraltet ist. Wie Berndt et al. zeigen konnten, ist nicht nur das quantitative Vorkommen anderer Claudine wie Claudin-1 und Claudin-11 differenzierter als bisher allgemein angenommen, sondern auch die funktionelle Bedeutung anderer Claudine wie z.B. Claudin-10 komplexer und oftmals noch unbekannt.

4.5. Rolle der OGD als SHT-Modell und mögliche Erweiterungen für den Ausbau eines umfassenderen SHT-Modells *in-vitro*

In *in-vitro* Modellen wird eine Sauerstoff-Glucose-Deprivation (OGD) seit jeher zur Simulation pathophysiologischer Prozesse verwendet, wie sie auf zellulärer Ebene nach Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Traumata (SHT) auftreten. Während dieses Vorgehen im Falle eines Schlaganfall-Modells die Pathophysiologie recht adäquat widerspiegelt, ist es im Falle des SHTs zu kurz gegriffen. Das SHT stellt einen komplexen Ablauf pathophysiologischer Prozesse dar. Der zelluläre Schaden nach SHT entsteht durch eine von außen auf das Zellsystem einwirkende Kraft. Dieser Schaden gliedert sich in zwei zeitlich gestaffelten Phasen, den Primär- und Sekundärschaden. Der Primärschaden entsteht durch Scherkräfte, also die direkte mechanische Schädigung, die auf das zelluläre System wirkt. Auf Ebene der Nervenzellen kommt es zu einer diffusen axonalen Schädigung. Durch die Zerstörung der Gefäßintegrität kommt es makroskopisch zur Hämatombildung (Epidural-, Subduralhämatom) und intrazerebralen Kontusionsblutung. Mikroskopisch resultieren Störungen in der zerebralen Autoregulation und Vasospasmen. Diese Ereignisse des Primärschadens führen im Verlauf zu weiteren sekundären Schäden. Durch eine lokale Minderperfusion resultiert ein Sauerstoff- und Glucose-Mangel und konsekutiv eine metabolische Imbalance auf Zellebene. Daraus folgt der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (BHS), die Ausbildung eines Hirnödems und die Initiierung neuroinflammatorischer Prozesse. Die in dieser Arbeit verwendete OGD vermag daher näherungsweise nur den Sekundärschaden nach SHT zu simulieren. Die Prozesse die durch den Primärschaden in Gang gesetzt werden, müssen dadurch außen vorgelassen werden.

Daher begann unsere Arbeitsgruppe ein bestehendes BHS-Modell in murinen cEND Zellen zu erweitern (Salvador, Burek et al. 2015). Dabei wurden cEND Zellen auf flexiblen BioFlex Kulturplatten kultiviert und mittels eines kontrollierten Überdruck Pulses, der für 50ms auf die Zellen auf den flexiblen Platten einwirkte, ein biaxialer mechanischer Stress auf die Zellmonolayer simuliert. Übertragen auf die Situation eines realen SHTs entspreche diese simulierte Zelldehnung dem Primärschaden, der im Gehirn nach SHT

gesetzt wird. Im Anschluss an diesen mechanischen Stress wurden die cEND Zellen wiederum einer 4h OGD ausgesetzt, um die pathophysiologischen Vorgänge des Sekundärschadens zu simulieren. Salvador et al. konnten zeigen, dass eine alleinige OGD im Vergleich zu einem rein mechanischen Zellschaden zwar größere Effekte auf beispielsweise die Expression von *Tight Junctions* zeigt, der rein mechanische Stress in cEND Zellen jedoch spezifische Effekte zeigt, die in cEND nach alleiniger OGD nicht nachzuweisen waren, wie z.B. eine gesteigerte Expression des TNF- α (Salvador, Burek et al. 2015).

Wie in 4.3 diskutiert, spielen Astrozyten im Sinne der neurovaskulären Einheit nicht nur unter physiologischen Bedingungen eine wesentliche Rolle für die Aufrechterhaltung der Homöostase. Ihnen kommt insbesondere unter pathophysiologischen Vorgängen wie Schlaganfall und SHT eine herausragende Bedeutung zu. Neuhaus, Gaiser et al. konnten die Bedeutung von Astrozyten in einem murinen *in-vitro* Schlaganfall-Modell der BHS nochmals aufzeigen (Neuhaus, Gaiser et al. 2014). Im SHT-Modell kann die Bedeutung der Astrozyten eventuell noch größer angesehen werden. Gerade im Hinblick auf eine Erweiterung des SHT-Modells *in-vitro* um einen mechanisch induzierten Zellschaden, müssen die Untersuchungen von Augustine et al. bedacht werden. Auf Grund ihrer Beobachtungen diskutieren sie die Möglichkeit, dass Hirnendothelzellen nach SHT relativ intakt bleiben und der mechanische Schaden sich hauptsächlich auf Astrozyten im Sinne einer Zellretraktion auswirkt. Durch die gestörte räumliche Integrität der neurovaskulären Einheit werde der Schaden der BHS auf die Endothelzellen erst sekundär durch die Astrozyten vermittelt (Augustine, Cepinskas et al. 2014).

Die komplexen Vorgänge mit einem zweiphasigen Auftreten nach SHT lassen sich *in-vitro* nicht alleine durch eine OGD nachstellen. Durch die Erweiterung der humanen Monokultur von hCMEC/D3 um eine Astrozytenkokultur und das Einfügen einer zusätzlichen mechanischen Schadensqualität, könnten die bestehenden Modelle der BHS erweitert werden. Eine solche Erweiterung der bestehenden Modelle könnte vor

Diskussion

allem für das Verständnis pathophysiologischer Vorgänge nach SHT und der Identifizierung neuer therapeutischer Ansätze eine sinnvolle Entwicklung darstellen.

5. Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist weltweit mit einer hohen Mortalität und enormen Krankheitsfolgen vergesellschaftet. Ein wesentlicher Faktor für die Prognose nach SHT ist die Entwicklung eines Hirnödems. Dieses wird unter anderem durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (BHS) vermittelt, der durch ein SHT induziert wird. Glukokortikoide (GK) führen durch die vermehrte Bildung von Strukturproteinen, wie *Tight Junctions* (TJ) und ähnlichem, zu einer Stabilisierung der BHS. Sie stellen so einen wesentlichen Eckpfeiler in der Therapie neoplastischer und inflammatorischer Hirnödeme dar. Allerdings versagen GK bei Trauma- oder Ischämie-bedingten Hirnödemen, so dass sie in den aktuellen nationalen und internationalen Leitlinien zur Therapie des SHT oder Schlaganfalls keine Rolle spielen.

Eine Ursache dieser GK-Resistenz kann in dem proteasomalen Abbau des Glukokortikoidrezeptors (GR) liegen, der nach Trauma und Schlaganfall möglich ist, wie er von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt wurde. In diesem Fall steht kein funktioneller GR zur Verfügung, über den GK ihre BHS-stabilisierende Wirkung entfalten könnten.

In dem *in-vivo* Teil dieser Dissertation wurde der Einfluss einer Kombinationstherapie aus Dexamethason und dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib auf die Expression des GR und verschiedener TJ-Moleküle immunhistochemisch in einem murinen SHT-Modell untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Bortezomib den proteasomalen Abbau des GR reversieren und in Kombination mit Dexamethason die BHS-Integrität wiederherstellen kann. Während sich für das TJ-Molekül Claudin-5 keine Regulation nachweisen ließ, scheint die beobachtete Restitution der BHS im murinen Modell hauptsächlich über die Regulation des Occludin zu erfolgen.

Die im murinen SHT-Modell sowie die von unserer Arbeitsgruppe im murinen *in-vivo* und *in-vitro* Ischämiemodell erhobenen Daten, ließen sich hier nicht auf ein Sauerstoff- und Glucosemangel-Ischämie-Modell, welches auf hCMEC/D3 basiert, übertragen.

Die alleinige Therapie mit Dexamethason verbesserte die funktionellen Eigenschaften in hCMEC/D3 in Form des Transendothelialen Widerstands (TEER). In der Wirkung der GK auf die Expression von TJs zeigte sich hier eine Speziesdifferenz zu murinen Hirnendothelzellen, da im hCMEC/D3 Modell die Regulation hauptsächlich über Claudin-5, anstelle des Occludins, erfolgte.

Durch die additive Gabe von Bortezomib zu Dexamethason ließ sich im Vergleich zum murinen SHT-Modell in hCMEC/D3 keine Verbesserung der BHS-Barriere zeigen, weder auf funktioneller Ebene durch TEER-Messung, noch auf molekularbiologischer Ebene durch die Expression der TJ-Moleküle Occludin und Claudin-5. Ein postulierter Hypoxieinduzierter Einfluss auf den GR, der in murinen SHT bzw. Schlaganfallmodellen, sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* beobachtet wird, manifestierte sich nicht in hCMEC/D3. Funktionell ließ sich in den humanen Hirnendothelzellen kein signifikanter Einfluss einer vierstündigen OGD auf den TEER feststellen.

Astrozyten kommt in BHS-Modellen, speziell bei der Untersuchung pathophysiologischer Vorgänge, eine herausragende Bedeutung zu. In einer Erweiterung des verwendeten Ischämie-Modells um eine Kokultur mit astrozytären Gliomazellen C6, zeigte sich nach vierstündiger OGD ein signifikanter OGD-Schaden im Vergleich zur Monokultur.

Zum einen unterstreichen diese Ergebnisse die Notwendigkeit, bestehende Zellkulturmodelle kontinuierlich zu erweitern, um die komplexen pathophysiologischen Vorgänge, wie sie *in-vivo* stattfinden, *in-vitro* zu integrieren. Zum anderen sind sie ein weiterer Beleg, für die Bedeutung humaner Zellmodelle, um Speziesdifferenzen, wie hier zwischen Mensch und Maus, Rechnung zu tragen. Es sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig, um die Grundlagen für die gezeigte Speziesdifferenz aufzuklären. Dies wäre die Basis für eine erfolgreiche Translation des, im murinen Modell wirksamen, Therapiekonzepts auf den Menschen.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., L. Ronnback, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." *Nat Rev Neurosci* **7**(1): 41-53.
- Adams, J. (2004). "The proteasome: a suitable antineoplastic target." *Nat Rev Cancer* **4**(5): 349-360.
- Augustine, C., G. Cepinskas, et al. (2014). "Traumatic injury elicits JNK-mediated human astrocyte retraction in vitro." *Neuroscience* **274**(0): 1-10.
- Baldwin, H. S., H. M. Shen, et al. (1994). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development." *Development* **120**(9): 2539-2553.
- Ballabh, P., A. Braun, et al. (2004). "The blood–brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications." *Neurobiology of Disease* **16**(1): 1-13.
- Barzó, P., A. Marmarou, et al. (1996). "Magnetic resonance imaging—monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury." *Journal of Neurosurgery* **85**(6): 1113-1121.
- Baulieu, E. E. (1987). "Antihormone-steroid hormonal activity, heat-shock protein hsp 90 and receptors." *Horm Res* **28**(2-4): 181-195.
- Bazzoni, G. and E. Dejana (2004). "Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis." *Physiological Reviews* **84**(3): 869-901.
- Beez T, Steiger HJ, Etminan N. (2017) "Pharmacological targeting of secondary brain damage following ischemic or hemorrhagic stroke, traumatic brain injury, and bacterial meningitis - a systematic review and meta-analysis." *BMC Neurol.* 2017;**17**(1):209. Published 2017 Dec 7. doi:10.1186/ s12883-017-0994-z
- Berezowski, V., C. Landry, et al. (2004). "Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood–brain barrier." *Brain Research* **1018**(1): 1-9.
- Berndt P, Winkler L, Cording J, et al. (2019) "Tight junction proteins at the blood-brain barrier: far more than claudin-5." *Cell Mol Life Sci.* 2019;**76**(10):1987-2002. doi:10.1007/s00018-019-03030-7
- Biemans, E., Jäkel, L., de Waal, R., Kuiperij, H. B., & Verbeek, M. M. (2017). "Limitations of the hCMEC/D3 cell line as a model for A β clearance by the human blood-brain barrier." *Journal of neuroscience research* **95**(7): 1513–1522. doi.org/10.1002/jnr.23964
- Blecharz, K. G., D. Drenckhahn, et al. (2008). "Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells." *J Cereb Blood Flow Metab* **28**(6): 1139-1149.
- Blecharz, K. G., A. Haghikia, et al. (2010). "Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis." *Multiple Sclerosis* **16**(3): 293-302.
- Blecharz, K. G. y. (2011). Molekulare Ziele der Glukokortikoidbehandlung unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen in einem in vitro Modell der Blut-Hirn-Schranke. Würzburg, Universitätsbibliothek der Universität Würzburg.
- Bledsoe, R. K., V. G. Montana, et al. (2002). "Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator Recognition." *Cell* **110**(1): 93-105.
- Brasch, J., O. J. Harrison, et al. (2011). "Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin: a divergent classical cadherin." *J Mol Biol* **408**(1): 57-73.

- Bratton, S. L., R. M. Chestnut, et al. (2007). "Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XV. Steroids." *J Neurotrauma* **24 Suppl 1**: S91-95.
- Brown, P. D., S. L. Davies, et al. (2004). "Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production." *Neuroscience* **129**(4): 955-968.
- Carmeliet, P., M.-G. Lampugnani, et al. (1999). "Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis." *Cell* **98**(2): 147-157.
- Chen, G., J. Shi, et al. (2008). "Inhibitory effect on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in rats: a potential neuroprotective mechanism of N-acetylcysteine." *Mediators Inflamm* **2008**: 716458.
- Cherian, L., R. Hlatky, et al. (2004). "Nitric oxide in traumatic brain injury." *Brain Pathol* **14**(2): 195-201.
- Chodobski, A., B. J. Zink, et al. (2011). "Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury." *Transl Stroke Res* **2**(4): 492-516.
- Clemens, J. A., D. T. Stephenson, et al. (1998). "Drug-Induced Neuroprotection From Global Ischemia Is Associated With Prevention of Persistent but Not Transient Activation of Nuclear Factor- κ B in Rats." *Stroke* **29**(3): 677-682.
- Dehouck, M. P., S. Meresse, et al. (1990). "An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro." *J Neurochem* **54**(5): 1798-1801.
- Dittmar, K. D., D. R. Demady, et al. (1997). "Folding of the Glucocorticoid Receptor by the Heat Shock Protein (hsp) 90-based Chaperone Machinery: THE ROLE OF p23 IS TO STABILIZE RECEPTOR·hsp90 HETEROCOMPLEXES FORMED BY hsp90·p60·hsp70." *Journal of Biological Chemistry* **272**(34): 21213-21220.
- Donkin, J. J. and R. Vink (2010). "Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments." *Curr Opin Neurol* **23**(3): 293-299.
- Duncan, G. S., D. P. Andrew, et al. (1999). "Genetic Evidence for Functional Redundancy of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1): CD31-Deficient Mice Reveal PECAM-1-Dependent and PECAM-1-Independent Functions." *The Journal of Immunology* **162**(5): 3022-3030.
- Echeverria, P. C. and D. Picard (2010). "Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1803**(6): 641-649.
- Faden, A. I., P. Demediuk, et al. (1989). "The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury." *Science* **244**(4906): 798-800.
- Fischer, S., M. Wobben, et al. (2002). "Hypoxia-Induced Hyperpermeability in Brain Microvessel Endothelial Cells Involves VEGF-Mediated Changes in the Expression of Zonula Occludens-1." *Microvascular Research* **63**(1): 70-80.
- Forster, C., M. Burek, et al. (2008). "Differential effects of hydrocortisone and TNF α on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier." *J Physiol* **586**(7): 1937-1949.
- Förster, C., T. Kahles, et al. (2007). "Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND." *The Journal of Physiology* **580**(3): 937-949.
- Forster, C., C. Silwedel, et al. (2005). "Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system." *J Physiol* **565**(Pt 2): 475-486.
- Furuse, M., K. Fujita, et al. (1998). "Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin." *The Journal of Cell Biology* **141**(7): 1539-1550.

- Furuse, M., T. Hirase, et al. (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." The Journal of Cell Biology **123**(6): 1777-1788.
- Gerhartl, Anna & Pracser, Nadja & Vladetic, Alexandra & Hendrikx, Sabrina & Friedl, Heinz-Peter & Neuhaus, Winfried. (2020). "The pivotal role of micro-environmental cells in a human blood–brain barrier in vitro model of cerebral ischemia: functional and transcriptomic analysis." Fluids and Barriers of the CNS. 17. 19. 10.1186/s12987-020-00179-3.
- Hall, E. D. (1992). "The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone." Journal of Neurosurgery **76**(1): 13-22.
- Hamby, M. E. and M. V. Sofroniew (2010). "Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders." Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics **7**(4): 494-506.
- Harke, N., J. Leers, et al. (2008). "Glucocorticoids regulate the human occludin gene through a single imperfect palindromic glucocorticoid response element." Molecular and Cellular Endocrinology **295**(1–2): 39-47.
- Hawkins, B. T. and T. P. Davis (2005). "The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease." Pharmacological Reviews **57**(2): 173-185.
- Hicks, R. R., S. A. Baldwin, et al. (1997). "Serum extravasation and cytoskeletal alterations following traumatic brain injury in rats. Comparison of lateral fluid percussion and cortical impact models." Mol Chem Neuropathol **32**(1-3): 1-16.
- Hideshima, T., P. G. Richardson, et al. (2011). "Mechanism of Action of Proteasome Inhibitors and Deacetylase Inhibitors and the Biological Basis of Synergy in Multiple Myeloma." Molecular Cancer Therapeutics **10**(11): 2034-2042.
- Hirase, T., S. Kawashima, et al. (2001). "Regulation of Tight Junction Permeability and Occludin Phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent Mechanisms." Journal of Biological Chemistry **276**(13): 10423-10431.
- Hirase, T., J. M. Staddon, et al. (1997). "Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells." Journal of Cell Science **110**(14): 1603-1613.
- Hirata, K.-i., T. Ishida, et al. (2001). "Cloning of an Immunoglobulin Family Adhesion Molecule Selectively Expressed by Endothelial Cells." Journal of Biological Chemistry **276**(19): 16223-16231.
- Holmin, S. and T. Mathiesen (2000). "Intracerebral administration of interleukin-1 β and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema." Journal of Neurosurgery **92**(1): 108-120.
- Hue, C. D., F. S. Cho, et al. (2015). "Dexamethasone potentiates in vitro blood-brain barrier recovery after primary blast injury by glucocorticoid receptor-mediated upregulation of ZO-1 tight junction protein." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **35**(7): 1191-1198.
- Hurst, R. D. and I. B. Fritz (1996). "Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier." Journal of Cellular Physiology **167**(1): 81-88.
- Iadecola, C. (2004). "Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **5**(5): 347-360.
- Jacob, A., S. Potin, et al. (2015). "Hypoxia interferes with aryl hydrocarbon receptor pathway in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells." Journal of Neurochemistry **132**(4): 373-383.
- Jenq, W., H. Rabb, et al. (1996). "Hypoxic Effects on the Expression of Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors in Human Renal Cortex Epithelial Cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **218**(2): 444-448.

- Kadmiel, M. and J. A. Cidlowski (2013). "Glucocorticoid receptor signaling in health and disease." Trends in pharmacological sciences **34**(9): 518-530.
- Klatzo, I. (1994). "Evolution of brain edema concepts." Acta Neurochir Suppl (Wien) **60**: 3-6.
- Kleinschnitz, C., K. Blecharz, et al. (2011). "Glucocorticoid Insensitivity at the Hypoxic Blood-Brain Barrier Can Be Reversed by Inhibition of the Proteasome." Stroke **42**(4): 1081-1089.
- Kumar, R. and E. B. Thompson (2005). "Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: function relationship." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **94**(5): 383-394.
- LeBlanc, R., L. P. Catley, et al. (2002). "Proteasome Inhibitor PS-341 Inhibits Human Myeloma Cell Growth in Vivo and Prolongs Survival in a Murine Model." Cancer Research **62**(17): 4996-5000.
- Lee, B. H., T. C. Wen, et al. (2007). "Glucocorticoid Receptor Expression in the Cortex of the Neonatal Rat Brain with and without Focal Cerebral Ischemia." Neonatology **91**(1): 12-19.
- Lee, J. H., N. A. Martin, et al. (1997). "Hemodynamically significant cerebral vasospasm and outcome after head injury: a prospective study." Journal of Neurosurgery **87**(2): 221-233.
- Leonard, M. O., C. Godson, et al. (2005). "Potentiation of Glucocorticoid Activity in Hypoxia through Induction of the Glucocorticoid Receptor." The Journal of Immunology **174**(4): 2250-2257.
- Liang, D., S. Bhatta, et al. (2007). "Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling." Neurosurg Focus **22**(5): E2.
- Liebner, S., A. Fischmann, et al. (2000). "Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme." Acta Neuropathol **100**(3): 323-331.
- Liebner, S., U. Kniessel, et al. (2000). "Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells." Eur J Cell Biol **79**(10): 707-717.
- Lok, J., X.-S. Wang, et al. (2014). "Targeting the Neurovascular Unit in Brain Trauma." CNS Neuroscience & Therapeutics: n/a-n/a.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: The second decade." Cell **83**(6): 835-839.
- McClelland, S., 3rd and D. M. Long (2008). "Genesis of the use of corticosteroids in the treatment and prevention of brain edema." Neurosurgery **62**(4): 965-967; discussion 967-968.
- McCullers, D. L., P. G. Sullivan, et al. (2002). "Traumatic brain injury regulates adrenocorticosteroid receptor mRNA levels in rat hippocampus." Brain Research **947**(1): 41-49.
- Micale, N., R. Ettari, et al. (2013). "Development of peptidomimetic boronates as proteasome inhibitors." European Journal of Medicinal Chemistry **64**(0): 23-34.
- Myung, J., K. B. Kim, et al. (2001). "The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors." Medicinal Research Reviews **21**(4): 245-273.
- Narayan, R. K., M. E. Michel, et al. (2002). "Clinical trials in head injury." J Neurotrauma **19**(5): 503-557.
- Nasdala, I., K. Wolburg-Buchholz, et al. (2002). "A Transmembrane Tight Junction Protein Selectively Expressed on Endothelial Cells and Platelets." Journal of Biological Chemistry **277**(18): 16294-16303.

- Nekludov, M., J. Antovic, et al. (2007). "Coagulation abnormalities associated with severe isolated traumatic brain injury: cerebral arterio-venous differences in coagulation and inflammatory markers." *J Neurotrauma* **24**(1): 174-180.
- Nelson, G., G. J. C. Wilde, et al. (2003). "NF- κ B signalling is inhibited by glucocorticoid receptor and STAT6 via distinct mechanisms." *Journal of Cell Science* **116**(12): 2495-2503.
- Neuhaus, W., F. Gaiser, et al. (2014). "The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier." *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**: 352.
- Neuhaus, W., M. Wirth, et al. (2008). "Expression of Claudin-1, Claudin-3 and Claudin-5 in human blood-brain barrier mimicking cell line ECV304 is inducible by glioma-conditioned media." *Neuroscience Letters* **446**(2-3): 59-64.
- Neuhaus W, Krämer T, Neuhoff A, Gölz C, Thal SC, Förster CY. (2017) "Multifaceted mechanisms of WY-14643 to stabilize the blood-brain barrier in a model of traumatic brain injury." *Front Mol Neurosci*. 2017;**10**:149. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00149>
- Neuwelt, E., N. J. Abbott, et al. (2008). "Strategies to advance translational research into brain barriers." *The Lancet Neurology* **7**(1): 84-96.
- Nixon, M., R. Andrew, et al. (2013). "It takes two to tango: Dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions." *Steroids* **78**(1): 59-68.
- Nonaka, M., X. H. Chen, et al. (1999). "Prolonged activation of NF-kappaB following traumatic brain injury in rats." *J Neurotrauma* **16**(11): 1023-1034.
- Oldendorf, W. H., M. E. Cornford, et al. (1977). "The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat." *Ann Neurol* **1**(5): 409-417.
- Page, S., Munsell, A., & Al-Ahmad, A. J. (2016). "Cerebral hypoxia/ischemia selectively disrupts tight junction complexes in stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells." *Fluids and barriers of the CNS* **13**(1), 16. doi.org/10.1186/s12987-016-0042-1
- Page S, Raut S, Al-Ahmad A. (2019) "Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Barrier Disruption at the Human Blood-Brain Barrier is Partially Mediated Through the HIF-1 Pathway." *Neuromolecular Med*. 2019;**21**(4):414-431. [doi:10.1007/s12017-019-08531-z](https://doi.org/10.1007/s12017-019-08531-z)
- Palmeri, D., A. van Zante, et al. (2000). "Vascular Endothelial Junction-associated Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily, Is Localized to Intercellular Boundaries of Endothelial Cells." *Journal of Biological Chemistry* **275**(25): 19139-19145.
- Paul, R., Z. G. Zhang, et al. (2001). "Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral protection following stroke." *Nat Med* **7**(2): 222-227.
- Pfeiffer, F., J. Schafer, et al. (2011). "Claudin-1 induced sealing of blood-brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis." *Acta Neuropathol* **122**(5): 601-614.
- Pleines, U. E., J. F. Stover, et al. (1998). "Soluble ICAM-1 in CSF coincides with the extent of cerebral damage in patients with severe traumatic brain injury." *J Neurotrauma* **15**(6): 399-409.
- Poungvarin, N. (2004). "Steroids Have No Role in Stroke Therapy." *Stroke* **35**(1): 229-230.
- Ramsauer, M., D. Krause, et al. (2002). "Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes." *The FASEB Journal*.
- Rangel-Castilla, L., J. Gasco, et al. (2008). "Cerebral pressure autoregulation in traumatic brain injury." *Neurosurgical Focus* **25**(4): E7.
- Reichardt, H. M., R. Gold, et al. (2006). "Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." *Expert Review of Neurotherapeutics* **6**(11): 1657-1670.

- Reinhold, A., Rittner, H. (2017) "Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review." *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **469**, 123–134 (2017). doi.org/10.1007/s00424-016-1920-8
- Rink, A., K. M. Fung, et al. (1995). "Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat." *Am J Pathol* **147**(6): 1575-1583.
- Roberts, I., D. Yates, et al. (2004). "Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial." *Lancet* **364**(9442): 1321-1328.
- Rodríguez-Baeza, A., F. Reina-de la Torre, et al. (2003). "Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: A three-dimensional and immunocytochemical study." *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* **273A**(1): 583-593.
- Rosenberg, G. A. (2009). "Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases." *The Lancet Neurology* **8**(2): 205-216.
- Rosenberg, P. A. and E. Aizenman (1989). "Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex." *Neuroscience Letters* **103**(2): 162-168.
- Rubin, L. L., D. E. Hall, et al. (1991). "A cell culture model of the blood-brain barrier." *The Journal of Cell Biology* **115**(6): 1725-1735.
- Rubin, L. L. and J. M. Staddon (1999). "The cell biology of the blood-brain barrier." *Annu Rev Neurosci* **22**: 11-28.
- Ruttan, L., K. Martin, et al. (2008). "Long-Term Cognitive Outcome in Moderate to Severe Traumatic Brain Injury: A Meta-Analysis Examining Timed and Untimed Tests at 1 and 4.5 or More Years After Injury." *Archives of physical medicine and rehabilitation* **89**(12, Supplement): S69-S76.
- Salvador, E., M. Burek, et al. (2015). "Stretch and/or oxygen glucose deprivation (OGD) in an in vitro traumatic brain injury (TBI) model induces calcium alteration and inflammatory cascade." *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**: 323.
- Scheid, R. and D. Y. v. Cramon (2010). "Klinische Befunde im chronischen Stadium nach Schädel-Hirn-Trauma: Daten aus 12 Jahren Behandlung in der Tagesklinik für Kognitive Neurologie, Universität Leipzig." *Dtsch Arztebl International* **107**(12): 199-205.
- Schiera, G., E. Bono, et al. (2003). "Synergistic effects of neurons and astrocytes on the differentiation of brain capillary endothelial cells in culture." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **7**(2): 165-170.
- Schlageter, K. E., P. Molnar, et al. (1999). "Microvessel Organization and Structure in Experimental Brain Tumors: Microvessel Populations with Distinctive Structural and Functional Properties." *Microvascular Research* **58**(3): 312-328.
- Schreibelt, G., G. Kooij, et al. (2007). "Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling." *The FASEB Journal* **21**(13): 3666-3676.
- Schroeder T, Bittrich P, Noebel C, et al.(2019) "Efficiency of Dexamethasone for Treatment of Vasogenic Edema in Brain Metastasis Patients: A Radiographic Approach." *Front Oncol.* 2019;**9**:695. Published 2019 Jul 30. doi:10.3389/
- Sedlakova, R., R. R. Shivers, et al. (1999). "Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit." *J Submicrosc Cytol Pathol* **31**(1): 149-161.
- Segal, M. B. (1993). "Extracellular and cerebrospinal fluids." *J Inherit Metab Dis* **16**(4): 617-638.
- Sengupta, S. and B. Wasylyk (2001). "Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2." *Genes & Development* **15**(18): 2367-2380.

- Sever, R. and C. K. Glass (2013). "Signaling by Nuclear Receptors." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **5**(3): a016709.
- Shapira, Y., D. Setton, et al. (1993). "Blood-Brain Barrier Permeability, Cerebral Edema, and Neurologic Function After Closed Head Injury in Rats." Anesthesia & Analgesia **77**(1): 141-148.
- Shlosberg, D., M. Benifla, et al. (2010). "Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury." Nat Rev Neurol **6**(7): 393-403.
- Silva, C. M., F. E. Powell-Oliver, et al. (1994). "Regulation of the human glucocorticoid receptor by long-term and chronic treatment with glucocorticoid." Steroids **59**(7): 436-442.
- Skaper, S. D. (2007). "The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies." Ann N Y Acad Sci **1122**: 23-34.
- Stoner (2002). "Hypoxia Induces Proteasome-Dependent Degradation of Estrogen Receptor α in ZR-75 Breast Cancer Cells." Molecular Endocrinology **16**(10): 2231-2242.
- Strbian, D., A. Durukan, et al. (2008). "The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia." Neuroscience **153**(1): 175-181.
- Taylor, A. N., S. U. Rahman, et al. (2010). "Injury severity differentially alters sensitivity to dexamethasone after traumatic brain injury." J Neurotrauma **27**(6): 1081-1089.
- Teichberg, V. I., K. Cohen-Kashi-Malina, et al. (2009). "Homeostasis of glutamate in brain fluids: An accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies." Neuroscience **158**(1): 301-308.
- Thal, S. C., E. V. Schaible, et al. (2013). "Inhibition of proteasomal glucocorticoid receptor degradation restores dexamethasone-mediated stabilization of the blood-brain barrier after traumatic brain injury." Crit Care Med **41**(5): 1305-1315.
- Thal, S. C., S. Wyschkon, et al. (2008). "Selection of Endogenous Control Genes for Normalization of Gene Expression Analysis after Experimental Brain Trauma in Mice." Journal of Neurotrauma **25**(7): 785-794.
- Tomkins, O., I. Shelef, et al. (2008). "Blood-brain barrier disruption in post-traumatic epilepsy." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **79**(7): 774-777.
- Tronche, F., C. Kellendonk, et al. (1998). "Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice." Current Opinion in Genetics & Development **8**(5): 532-538.
- Unterberg, A. W., J. Stover, et al. (2004). "Edema and brain trauma." Neuroscience **129**(4): 1019-1027.
- Uzan, M., H. Erman, et al. (2006). "Evaluation of apoptosis in cerebrospinal fluid of patients with severe head injury." Acta Neurochirurgica **148**(11): 1157-1164.
- Vespa, P., M. Prins, et al. (1998). "Increase in extracellular glutamate caused by reduced cerebral perfusion pressure and seizures after human traumatic brain injury: a microdialysis study." Journal of Neurosurgery **89**(6): 971-982.
- Wallace, A. D., Cao, Y., Chandramouleeswaran, S., & Cidlowski, J. A. (2010). Lysine 419 targets human glucocorticoid receptor for proteasomal degradation. Steroids, **75**(12), 1016–1023. doi:10.1016/j.steroids.2010.06.015
- Wallace, A. D. and J. A. Cidlowski (2001). "Proteasome-mediated Glucocorticoid Receptor Degradation Restricts Transcriptional Signaling by Glucocorticoids." Journal of Biological Chemistry **276**(46): 42714-42721.
- Weksler, B. B., E. A. Subileau, et al. (2005). "Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line." The FASEB Journal.
- Williams, A. J., J. R. Dave, et al. (2006). "Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: Relation to nuclear factor κ B (NF- κ B), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration." Neurochemistry International **49**(2): 106-112.

Literaturverzeichnis

- Wolburg, H. and A. Lippoldt (2002). "Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation." *Vascular Pharmacology* **38**(6): 323-337.
- Zhang B, Zhu X, Wang L, et al. (2019) "Dexamethasone impairs neurofunctional recovery in rats following traumatic brain injury by reducing circulating endothelial progenitor cells and angiogenesis." *Brain Res.* 2019;1725:146469. doi:10.1016/j.brainres.2019.146469
- Zhang, L., Z. G. Zhang, et al. (2010). "Combination Treatment With VELCADE and Low-Dose Tissue Plasminogen Activator Provides Potent Neuroprotection in Aged Rats After Embolic Focal Ischemia." *Stroke* **41**(5): 1001-1007.
- Zhang, X., Y. Chen, et al. (2005). "Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury." *Critical Care* **9**(1): 66 - 75.
- Zhou, J. and J. A. Cidlowski (2005). "The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses." *Steroids* **70**(5–7): 407-417.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aufbau der BHS, adaptiert nach Abbott et al., 2006, (Abbott, Ronnback et al. 2006)...	2
Abbildung 2:	Molekularer Aufbau endothelialer <i>Tight Junctions</i> , adaptiert nach Neuwelt et al., 2008, (Neuwelt, Abbott et al. 2008).....	4
Abbildung 3:	Pathophysiologische Vorgänge an der Blut-Hirn-Schranke nach Schädel-Hirn-Trauma..	9
Abbildung 4:	Funktionelle Struktur des Glukokortikoidrezeptors, adaptiert nach Nixon et al., 2013, (Nixon, Andrew et al. 2013)..	12
Abbildung 5:	Schematischer Aufbau eines 26S Proteasoms, modifiziert nach Adams et al., 2004, (Adams 2004).....	14
Abbildung 6:	Zeitlicher Verlauf der Aktivität der katalytischen Untereinheit des 26S-Proteasoms. ...	37
Abbildung 7:	Makroskopische Aufnahme eines Mäusehirnschnitts 24h nach CCI, Koronarschnitt, Nissl Färbung, modifiziert nach Thal et al., 2013, (Thal, Schaible et al. 2013).....	41
Abbildung 8:	Glukokortikoidrezeptor (GR) Expression in Mäusehirnendothelien nach controlled cortical impact (CCI) und verschiedenen therapeutischen Behandlungen.....	44
Abbildung 9:	Occludin-Expression in Mäusehirnendothelien nach controlled cortical impact (CCI) und verschiedenen therapeutischen Behandlungen.	47
Abbildung 10:	Einfluss von OGD auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors in hCMEC/D3.	50
Abbildung 11:	Einfluss von OGD auf die Expression von Claudin-5 in hCMEC/D3.	51
Abbildung 12:	Einfluss von OGD auf die Expression von Occludin in hCMEC/D3.....	52
Abbildung 13:	TEER in hCMEC/D3 nach Normoxie und 4h OGD.....	53
Abbildung 14:	Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression des Glukokortikoidrezeptors (GR) nach Normoxie und OGD in hCMEC/D3.	55
Abbildung 15:	Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors in unbehandelten und mit Dexamethason-behandelten hCMEC/D3.	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 16: Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf die Expression von Claudin-5 und Occludin als struktureller Integritätsmarker der Blut-Hirn-Schranke nach Normoxie und OGD in hCMEC/D3.	59
Abbildung 17: Einfluss von Dexamethason und Bortezomib auf den TEER als Marker der Blut-Hirn-Schranken Funktion nach Normoxie und OGD in hCMEC/D3.	61
Abbildung 18: TEER in hCMEC/D3 Monokultur und Endothelzellen/Astrozyten Kokultur (hCMEC/D3 und C6) nach Normoxie und 4h OGD.	64
Abbildung 19: TEER in Endothelzellen/Astrozyten Kokultur (hCMEC/D3 und C6) unter Normoxie und OGD, 24h nach verschiedenen SHT-Therapien.	64
Abbildung 20: Inhibition der verschiedenen katalytischen Untereinheiten des humanen 26S Proteasoms durch Bortezomib in hCMEC/D3.	66

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Testsubstanzen für Zellkulturuntersuchungen.....	18
Tabelle 2:	Verwendete Lösungen und Puffer und ihre Zusammensetzung	19
Tabelle 3:	Verwendete Kulturmedien	20
Tabelle 4:	Liste der verwendeten Chemikalien.....	21
Tabelle 5:	Primäre Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen von Mäusehirnschnitten	24
Tabelle 6:	Sekundäre Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen von Mäusehirnschnitten	24
Tabelle 7:	Übersicht der untersuchten SHT-Therapieformen	26
Tabelle 8:	Zusammensetzung der verwendeten SDS/Polyacrylamidgele.....	30
Tabelle 9:	Primäre Antikörper für Western Blot Analysen	32
Tabelle 10:	Sekundäre Antikörper für Western Blot Analysen	32
Tabelle 11:	Primer für RNA Analysen	35
Tabelle 12:	Übersicht der Versuchsbedingungen für die Blockade des GR durch RU486	36
Tabelle 13:	Primäre Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen von hCMEC/D3	38
Tabelle 14:	Sekundäre Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen von hCMEC/D3	38

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AF-1	activation function 1
AJ	adherent junction
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	bovine serum albumin
CBP	CREB-binding protein
CCI	<i>in-vitro</i> : controlled cell injury; <i>in-vivo</i> : controlled cortical impact
cDNA	complementary DNA
CLD5	Claudin – 5
DAI	diffuser axonaler Schaden
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	DNA-Bindungsdomäne
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
EBM-2	endothelial basal medium 2
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDH	Epiduralhämatom
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
<i>g</i>	<i>g</i> -Kraft, Lastvielfaches, das auf einen Körper wirkt
<i>g</i>	Gramm
GA-1000	Gentamycin / Amphotericin
GK	Glukokortikoide, Glukokortikoiden
GR	Glukokortikoid – Rezeptor
GRE	Glukokortikoid Responsive Elements

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1α
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IDV	integrated density value
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LBD	Ligandenbindungsdomäne
M	molar
min	Minute, Minuten
min.	mindestens
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NCoR	Nuclear Receptor Co-Repressor
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NSS	normal swine serum
NTD	Amino-terminale Domäne
OCLN	Occludin
OGD	oxygen-glucose-deprivation, Sauerstoff-Glucose Mangel
P/S	Penicillin / Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecul 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R³-IGF-1	Arginin³ insulin like growth factor 1
rcf	relative centrifugal force
rhEGF	recombinant human epidermal growth factor
rhFGF-B	recombinant human fibroblast growth factor

Abkürzungsverzeichnis

RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SAB	Subarachnoidalblutung
SDH	Subduralhämatom
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	standard error of the mean
SHT	Schädel – Hirn – Trauma
ssFCS	fetal calf serum
SV40	simian vacuolating virus 40
TBP	TATA-binding protein
TEER	transendothelialer elektrischer Widerstand
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TIF2	transcriptional mediators/intermediary factor 2
tMCAO	transient middle cerebral artery occlusion
TNFα	tumor necrosis factor α
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UE	Untereinheit
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol.	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Großer Dank gilt Frau Professor Dr. rer. nat. et med. habil. Carola Förster für die Bereitstellung des Themas. Ihre wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation sowie ihre ehrliche und konstruktive Kritik war mir ein hohes Gut.

Ich danke Herrn Professor Dr. Karnati für sein Zweitgutachten und die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. Serge Thal und seinem Team der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsklinik Mainz für die Bereitstellung der Kryoschnitte für meine immunhistochemischen Untersuchungen der Mäusehirne danken.

Von Herzen danke ich Herrn Privatdozent Dipl.-Ing. Dr. Winfried Neuhaus, der mir in all der Zeit treu zur Seite stand, selbst über Ländergrenzen hinweg. Größten Dank für seine unermüdliche Hilfe, seine Ideen und Ratschläge, die mich auch in schwierigen Zeiten auf dem rechten Pfad hielten. Ich bin ihm dankbar für die zahlreichen fachlichen Gespräche, die mich auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte und Ansätze entdecken ließen. Auch die vielen Gespräche abseits des wissenschaftlichen Arbeitens haben mich in außerordentlichem Maße unterstützt.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe bin ich für die hervorragende Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Hervorheben möchte ich hierbei Frau Privatdozentin Dr. Malgorzata Burek, Frau Anja Neuhoff und in besonderem Maße Frau Elisabeth Wilken. Nicht nur für ihre unermessliche Unterstützung im Laboralltag, sondern vor allem dafür, dass Sie mir im Labor stets eine freundschaftliche und familiäre Atmosphäre bereiteten, möchte ich ihnen sehr danken.

Ein abschließendes, großes Dankeschön gilt meiner gesamten Familie und Freunden, die mich über all die Jahre des Studiums, der Arbeit und der Promotion immer unterstützt haben und mir bei Problemen stets mit Ruhe und Kraft zur Seite standen.