

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Patrick Meybohm

Protocadherine an der Blut-Hirn-Schranke

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Lydia Gabbert  
aus Weimar

Würzburg, Juli 2020

Referentin: Priv.-Doz. Dr. Malgorzata Burek

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Wurmb

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2021

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Protocadherine	1
1.2	Transporter an der Blut-Hirn-Schranke	4
1.3	Signalwege und deren Beeinflussung durch Protocadherine	6
1.3.1	Mammalian Target of Rapamycin	6
1.3.2	Mitogen-activated Protein Kinase	7
1.3.3	Wnt	10
1.4	Ziel der Arbeit	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
2.1.2	Verwendete Substanzen	14
2.1.3	Verwendete Puffer und Lösungen	16
2.1.4	Verwendete Antikörper und PCR-Sonden	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Zellkultur	18
2.2.2	Zellmigration	20
2.2.3	Oxygen Glucose Deprivation-Versuche	22
2.2.4	Western Blot	25

2.2.5	Molekularbiologische Methoden .....	29
2.2.6	Statistische Auswertung .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Transporter-Proteinlevel an der Blut-Hirn-Schranke zwischen cerebEND-Wildtyp und cerebEND PcdhgC3 Knockout-Zelllinie .....	32
3.2	Veränderungen einzelner Signalwege in der cerebEND PcdhgC3 Knockout-Zelllinie .....	34
3.2.1	Mammalian Target of Rapamycin .....	34
3.2.2	Mitogen-activated Protein Kinase .....	37
3.2.3	Wnt-Signalweg .....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
4.1	Transporter .....	50
4.2	Mammalian Target of Rapamycin-Signalweg .....	52
4.3	Mitogen-activated Protein Kinase-Signalweg .....	54
4.4	Wnt-Signalweg .....	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>75</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>2</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>3</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Protocadherine

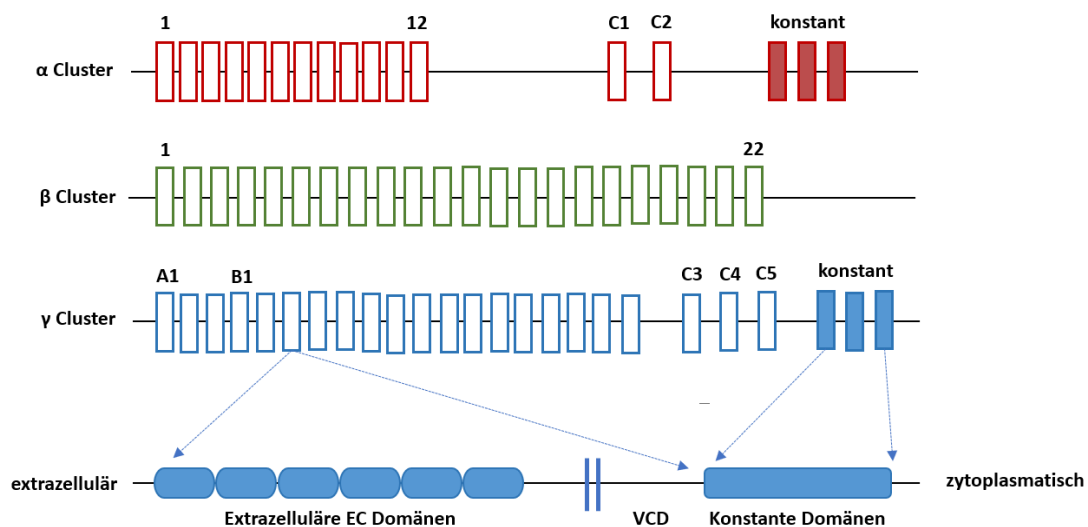
Protocadherine (Pcdhs) bilden mit über 80 derzeit identifizierten Vertretern die größte Subgruppe der Cadherin-Adhäsionsproteine, welche als transmembrane Glykoproteine Calcium-abhängig Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Während die klassischen Cadherine fünf extrazelluläre Cadherin (EC) Domänen mit jeweils ungefähr 100 Aminosäuren besitzen, finden sich bei den Pcdhs sechs bis sieben EC-Sequenzen (Gumbiner, 2005; Weiner, 2013). Pcdhs vermitteln weniger starke interzelluläre Kontakte als klassische Cadherine, zum Teil bewirken sie sogar abstoßende Effekte (Phillips et al., 2017). Protocadherine sind stark im sich entwickelnden zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert und wurden erstmals durch Sano et al. 1983 beschrieben. Mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden Proteine mit Cadherin-ähnlicher extrazellulärer Domäne, aber unterschiedlichen zytoplasmatischen Domänen, identifiziert und fortan Protocadherine genannt (Sano et al., 1983). Pcdhs können in geclusterte Protocadherine, welche in drei ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) Tandemanordnungen auf dem menschlichen Chromosom 5q31 bzw. murinen Chromosom 18 liegen, und in ungeclusterte Pcdhs eingeteilt werden (Wu et al., 2001). Die ungeclusterten  $\delta$ -Pcdhs sind über das ganze Genom verteilt (Kim et al., 2014).

Pcdhs sind vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS) stark exprimiert, beispielsweise in Astrozyten, Dendriten, Perizyten und Epithelzellen des Choroidplexus (Garrett, 2009; Lobas et al., 2012). Dabei sind sie bei vielen Prozessen der neuronalen Entwicklung beteiligt. Pcdhs spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Ausbildung axonaler Ausläufer im olfaktorischen und retinalen System.  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Pcdh-Knockout Mäuse zeigen ein reduziertes Riech- und Sehvermögen sowie Defekte in der Ausbildung serotonerger Axone (Chen et al., 2013; Meguro et al., 2015; Hasegawa et al., 2016). Mäuse mit fehlenden  $\gamma$ -Cluster sterben kurz nach ihrer Geburt infolge eines massiven Neuronenuntergangs im Hirnstamm und Rückenmark (Peek et al., 2017). Des Weiteren sind  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Pcdhs für die Ausbildung dendritischer Verzweigungen in pyramidalen und hippocampalen Neuronen des Kortex wichtig, wobei sowohl

fördernde als auch hemmende Einflüsse beschrieben sind (Suo et al., 2012; Molumby et al., 2017). Die Synaptogenese wird ebenfalls durch Pcdhs beeinflusst. Pcdhs sind vor allem in Neuronen und Astrozyten perisynaptisch lokalisiert und führen bei Mutation des  $\gamma$ -Clusters zur verzögerten Synapsenbildung (Garrett und Weiner, 2009). Aufgrund ihrer Rolle für die neuronale Reifung wurden neurologische Entwicklungsstörungen und Erkrankungen hinsichtlich veränderter Pcdh-Expression untersucht. Mutationen eines  $\delta$ -Pcdhs (Pcdh19) sind mit einer seltenen x-chromosomalen Epilepsieform sowie Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörungen oder Autismus-Spektrum-Störungen assoziiert (Dibbens et al., 2008; Fujitani et al., 2017). Bei der Trisomie 21 und dem fetalen Alkoholsyndrom, welche mit Beeinträchtigungen der Synapsen- und Dendritenbildung einhergehen, konnten Hypermethylierungen und erniedrigte Genexpressionen von geclusterten Pcdhs nachgewiesen werden (El Hajj et al., 2016). Da Pcdhs eine wichtige Rolle für die Ausbildung serotonerger Axone spielen, konnte ein Zusammenhang zu psychischen Erkrankungen gezeigt werden. Patienten mit Depression oder bipolarer Störung zeigen eine erniedrigte Dendritendichte und abnormale Morphologie kortikaler Neurone, was mit der Überexpression von  $\delta$ -Pcdh17 korreliert (Chang et al., 2018). Außerdem sind verschiedene Pcdhs in zerebralen und zerebellären Endothelzellen exprimiert (Dilling et al., 2017). Neben der Expression im ZNS sind Pcdhs in anderen Organen wie Lunge, Kolon und Niere nachgewiesen, vor allem im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen. Dabei kommen einzelnen Vertretern tumorsuppressive wie auch tumorprogressive Auswirkungen zu (Okazaki et al., 2002; Zhou et al., 2017). Vega-Benedetti et al. stellen zudem unterschiedliche Methylierungsmuster geclusterter Pcdh-Gene in soliden Tumoren fest und schlussfolgern, dass Pcdhs sich zukünftig als diagnostische Biomarker für verschiedene Tumorentitäten erweisen könnten (Vega-Benedetti et al., 2019).

Abbildung 1 gibt einen Überblick über den Aufbau geclusterter Pcdhs. Variable Exons (14 bei  $\alpha$ -Pcdhs, 22 bei  $\beta$ - und  $\gamma$ -Pcdhs) codieren für die sechs bis sieben Cadherin-ähnlichen Domänen, die Transmembran-Domäne und die intrazelluläre variable zytoplasmatische Domäne (VCD). Dabei besitzt jedes

variable Exon einen eigenen Promotor, von welchem die Transkription initiiert wird. Zudem besitzen  $\alpha$ -Pcdhs zwei C-artige variable Exons (C1, C2) und  $\gamma$ -Pcdhs drei C-artige variable Exons (C3, C4, C5). Diese C-artigen Exons unterscheiden sich durch eine ubiquitäre biallelische Expression in Neuronen von den anderen variablen Exons, welche lediglich monoallelisch und spärlich exprimiert sind. Außerdem besitzen  $\gamma$ -Pcdhs neben den drei C-Isoformen weitere  $\gamma$ -Pcdh-A und  $\gamma$ -Pcdh-B Subklassen.  $\alpha$  und  $\gamma$ -Pcdhs besitzen zusätzlich Exons, die für drei konstante C-terminale intrazelluläre Domänen kodieren (Kaneko et al., 2006; Kim et al., 2014; Phillips et al., 2017).



**Abbildung 1: Aufbau geclusterter Protocadherine**

Variable Exons (14 bei  $\alpha$ -Pcdhs, 22 bei  $\beta$ - und  $\gamma$ -Pcdhs) codieren für die extrazellulären Cadherin-ähnlichen (EC) Domänen, die Transmembran-Domäne und die variable zyttoplasmatische Domäne (VCD),  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Cluster besitzen zusätzlich C-artige variable Domänen (C1-C5) sowie Exons, die für drei konstante C-terminale Domänen kodieren. Des Weiteren ist eine Untergliederung des  $\gamma$ -Clusters in A, B und C-Subklassen (in Abbildung dargestellt A1, B1, C3, C4, C5) möglich (eigene Darstellung modifiziert nach Phillips et al., 2017, Abbildungslizenz vorliegend).

Das PcdhgC3 unterscheidet sich von anderen Vertretern der Pcdhs in einigen Aspekten. Zum ersten gehört es zu den fünf C-artigen Isoformen der Pcdhs mit biallelischer ubiquitärer Expression in Neuronen, wobei es wenig Erkenntnisse zur Bedeutung dieser Expression gibt. Als Vertreter des  $\gamma$ -Pcdh-Genclusters führt

ein Knockout zur massiven neuronalen Apoptose und zum Tod bei Mäusen, wohingegen Mäuse mit fehlender  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pcdh-Expression lebensfähig sind. Bei den  $\gamma$ -Pcdh-A,  $\gamma$ -Pcdh-B und  $\gamma$ -Pcdh-C Subklassen wird den C-Isoformen die fast ausschließliche Funktion für das neuronale Überleben zugesprochen. Mäuse, bei denen nur die C3, C4 und C5-Gene der  $\gamma$ -Pcdh ausgeschaltet sind, zeigen den gleichen neuronalen Zellverlust wie Mäuse mit kompletten  $\gamma$ -Pcdh-Knockout (Chen et al., 2012; Peek et al., 2017; Miralles et al., 2020). Durch Inhibierung verschiedener Signalwege, wie Wnt und mTOR, werden PcdhgC3 tumorsuppressive Funktionen zugeschrieben, die bei anderen untersuchten Isoformen nicht zu finden sind (Dalosso et al., 2012; Mah et al., 2016). Dilling et al. weisen in zerebellären Kapillarendothelzellen, in welchen PcdhgC3 ausgeschaltet ist, veränderte Proteinlevel einzelner tight junction Proteine in Endothelzellen der BHS nach, was auf regulatorische Eigenschaften von PcdhgC3 auf die Barrierefunktion der BHS hindeuten kann (Dilling et al., 2017).

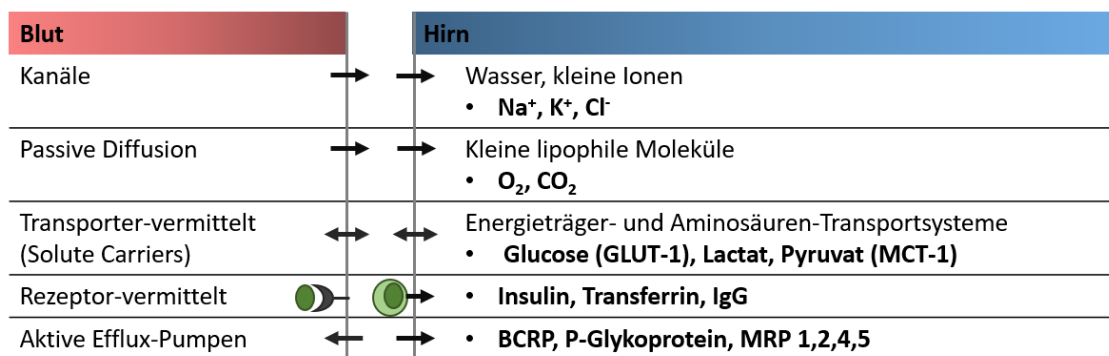
## **1.2 Transporter an der Blut-Hirn-Schranke**

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) grenzt als physiologische Barriere das zentrale Nervensystem vom Blutkreislauf ab. Sie besteht aus Kapillarendothelzellen, welche von Perizyten, einer Basalmembran und Astrozyten umgeben sind und mittels tight junctions (TJ) miteinander verknüpft sind (Helms et al., 2016). Die Homöostasefunktion der BHS schützt das ZNS vor Schäden durch Pathogene, Xenobiotika oder Neurotransmitter, Hormone, Ionen oder Aminosäuren. Konzentrationen dieser Stoffe variieren bei verschiedenen Stoffwechsellagen, etwa bei Nahrungsaufnahme oder körperlicher Anstrengung, im ZNS würden sie jedoch unkontrollierter neuronaler Aktivität und Zelluntergang führen (Abbott, 2013; Wong et al., 2013).

Dennoch müssen lebenswichtige Stoffe ins ZNS gelangen. Diese Aufgabe wird durch verschiedene Transporter gewährleistet. Durch die Beschaffenheit der TJ Proteine besitzt die BHS eine deutlich niedrigere Permeabilität als andere Gewebe, welche den parazellulären Durchtritt nahezu unmöglich macht (Lajoie, 2015). Abbildung 2 stellt verschiedene Transportmechanismen durch die BHS schematisch dar. Schmale lipophile Moleküle, Ionen und Wasser gelangen



mittels passiver Diffusion in das Gehirn. Kleine hydrophile Moleküle wie Glucose oder Aminosäuren gelangen durch Transporter, die entweder spezifisch für das zu transportierende Molekül sind oder verschiedene Moleküle transportieren, durch die BHS. Größere Moleküle werden rezeptor- oder adsorptionsvermittelt transportiert. Des Weiteren existieren Efflux-Pumpen, welche ATP-abhängig Stoffe gegen das Konzentrationsgefälle befördern (Wong et al., 2013). Das Nutzen dieser Transporteigenschaften zum Passieren der BHS von Xenobiotika ist zudem zur Behandlung neuronaler Erkrankungen von großem wissenschaftlichem Interesse (Lajoie, 2015).



**Abbildung 2: Darstellung der Transportmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke**

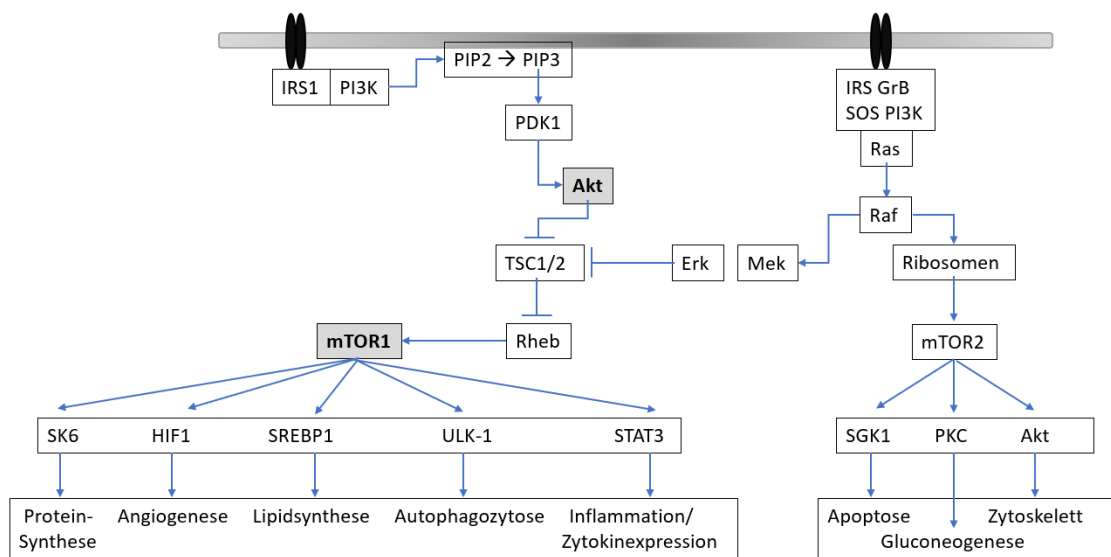
Kleine Ionen und lipophile Moleküle können diffundieren, während hydrophile Stoffe Transporter-, Rezeptor-, oder adsorptionsvermittelt in das Gehirn gelangen oder durch Pumpen aktiv transportiert werden (eigene Darstellung modifiziert nach Wong et al., 2013, Abbildungslizenz vorliegend).

Dilling et al. weisen erstmals verschiedene Pcdhs in Endothelzellen der BHS nach. Der Knockout von PcdhgC3 führt zu einer Veränderung im TJ Proteinlevel und somit möglicherweise veränderten Barrierefunktion der BHS. Die Beeinflussung der verschiedenen Transportmechanismen durch PcdhgC3 wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht.

## **1.3 Signalwege und deren Beeinflussung durch Protocadherine**

### **1.3.1 Mammalian Target of Rapamycin**

Die Serin-Threonin-Kinase mTOR (Mammalian Target of Rapamycin, zu Deutsch Ziel des Rapamycins im Säugetier) ist Teil einer Signalkaskade mit vielfältigen Funktionen. mTOR wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, inflammatorische Einflüsse oder Veränderungen des Energiehaushalts aktiviert. Durch Ligandenbindung an Rezeptortyrosin-Kinasen werden beispielsweise die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (AKT) stimuliert. Diese führen über Phosphorylierung weiterer Zielproteine zur Aktivierung von mTOR1 während der mTOR2-Proteinkomplex über den Ras-Raf-Signalweg stimuliert wird (Harries et al., 2012). Der mTOR-Signalweg ist in zahlreichen Erkrankungen, beispielsweise bei metabolischen und neurologischen Beschwerden, inflammatorischen Prozessen sowie Krebs dysreguliert (Dazert, 2011). Bei der koronaren Herzkrankheit kommt es zu einer durch endotheliale Dysfunktion bedingten zunehmenden Arteriosklerose der Herzkranzgefäße. Bei der Behandlung spielen Drug-eluting Stents, welche mit mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus oder Everolimus beschichtet sind, eine zentrale Rolle und zeigen eine signifikant reduzierte Restenoserate im Vergleich zu metallbeschichteten Stents. Dementsprechend kommt mTOR eine zentrale pathologische Bedeutung bei der endothelialen Proliferation in Koronargefäßen zu (Harari et al., 2018). Zudem scheint mTOR direkt das Wachstum von Endothelzellen in infantilen Hämangiomen zu beeinflussen (Wang et al., 2017). Abbildung 3 gibt eine Übersicht.



**Abbildung 3: Mammalian Target of Rapamycin-Signalweg**

Ligandenbindung an Rezeptortyrosinkinasen führt über Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Akt zur Aktivierung von mTOR1; mTOR2 wird über Ras-Raf aktiviert (eigene Darstellung modifiziert nach Harries et al., 2012, Abbildungslizenz vorliegend).

Dalosso et al. schreiben PcdhgC3 eine suppressive Funktion beim kolorektalen Karzinom, unter anderem über Verminderung des mTOR-Signalwegs, zu. In normalen Kolonepithelzellen ist PcdhgC3 hoch exprimiert, bei karzinomatös veränderten Zellen hypermethyliert und somit inaktiviert. Die PcdhgC3 Überexpression beim kolorektalen Karzinom führt zur Verminderung der mTOR-Aktivität (Dalosso et al., 2012). Ein möglicher Einfluss von PcdhgC3 auf den mTOR-Signalwegs in zerebellären Endothelzellen wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eruiert.

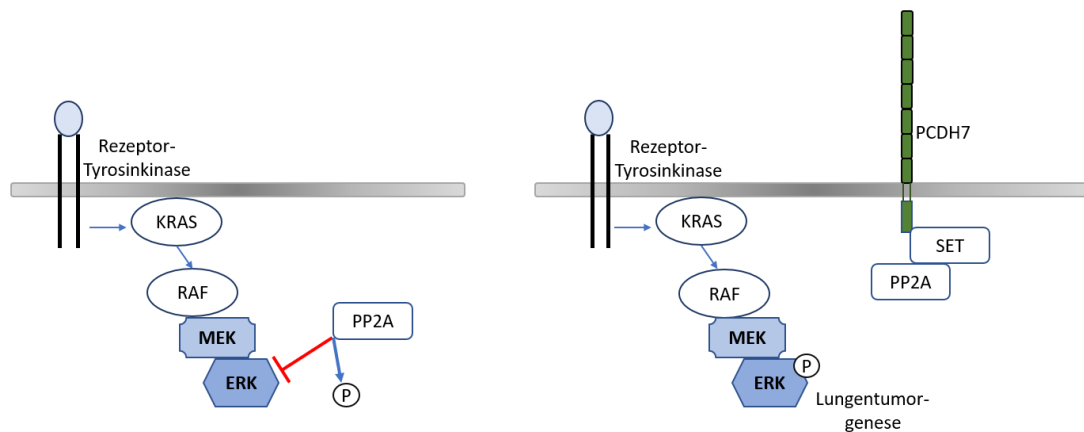
### 1.3.2 Mitogen-activated Protein Kinase

Der MAP (Mitogen-activated Protein)- Kinase-Signalweg umfasst mehrere in Reihe geschaltete Kinasen, die sich durch Phosphorylierung aktivieren. Derzeit sind sieben verschiedene Signalwege bekannt, wobei der Raf-Mek-Erk-Signalweg der bekannteste Vertreter ist (Vgl. Abbildung 4, links). Dieser reguliert unter anderem Zellproliferation, Differenzierung, Alterung und Überleben und wird durch Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert. Die Aktivierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z.B. vascular endothelial growth factor

receptor [VEGFR], epidermal growth factor receptor [EGFR], insulin like growth factor-1 receptor [IGF-1R]) führt zur Beladung des membrangebundenen Ras mit energiereichen Guanosin triphosphat (GTP). Ras aktiviert Raf, welches seinerseits die mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase (Mek) phosphoryliert. Durch die Mek-bedingte Phosphorylierung kann im Folgenden Erk1/2 im Zellkern verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren (Steelman et al., 2011).

Zahlreiche Erkrankungen sind mit der Dysregulierung des Raf-Mek-Erk-Signalwegs assoziiert, beispielsweise kongenitale Syndrome, Arthritis, Kardiomyopathien und Tumore. Medizinisch bedeutsam sind die einzelnen Kinasen als therapeutische Ziele durch spezifische Inhibitoren. Klinisch finden diese beispielsweise bereits bei BRAF mutierten Melanomen Anwendung (Cseh et al., 2014, Saba-EI-Leil et al., 2016). Dem MAPK-Signalweg wird ebenso eine Rolle bei der Störung der BHS-Integrität zugeschrieben, was seinerseits mit der Pathologie neuronaler Erkrankungen wie Schlaganfälle, Alzheimer oder Multipler Sklerose in Verbindung steht (Abbott et al., 2010; Zhu et al., 2018). Eine Aktivitätserhöhung während ischämischer Ereignisse ist in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen und trägt mittels proinflammatorischer Mediatoren zur Ausdehnung der Infarktgröße bei (Maddahi, 2010).

Über die Rolle von Protocadherinen im MAPK-Signalweg ist bisher wenig bekannt. Einzelne Untersuchungen beschreiben, dass ein Vertreter der ungeclusterten  $\delta$ -Protocadherine, Pcdh7, bei 74 % der Nicht-Kleinzelligen Lungentumoren (Non-small cell lung cancer, NSCLC) überexprimiert ist und die Wirkung von KRAS potenziert (Vgl. Abbildung 4, rechts). KRAS, das mit 30 % am häufigsten mutierte Gen beim NSCLC, führt über Dysregulierung des MAPK-Signalwegs zur malignen Transformation. Das Gesamtüberleben von Patienten mit Pcdh7-Überexpression ist durch das schnellere Tumorwachstum reduziert (Zhou et al., 2017).



**Abbildung 4: Raf-Mek-Erk-Signalweg des Mitogen-activated Protein Kinase-Signalwegs**

links: normale Raf-Mek-Erk Aktivierung durch z.B. Wachstumsfaktoren. Diese aktivieren Ras, das über die Signalkaskade Raf, Mek und Erk aktiviert. rechts: Pcdh7 inhibiert über Aktivierung von SET die inhibitorische Wirkung von PP2A auf Erk, was zur Potenzierung des MAPK-Signalwegs und zur malignen Transformation führt (eigene Darstellung modifiziert nach Zhou et al., 2017, Abbildungslizenz vorliegend).

Ein Target des MAPK-Pathways ist das Slc9a1. Slc9a1 (= Na/H-Exchanger NHE1) ist ein Transmembranprotein, welches extrazelluläres Natrium gegen intrazelluläre Wasserstoffionen im Verhältnis 1:1 tauscht. Von den derzeit bekannten 9 Isoformen ist NHE1 in der luminalen Membran von Endothelzellen der BHS exprimiert (Lam et al., 2009; Provost, 2013). Während ischämischer Ereignisse sowie Hypoglykämie, z.B. durch einen Schlaganfall, kommt es durch gesteigerte Sekretion von Natrium, Chlorid und Wasser über die BHS zu Hirnödemen und neuronalen Schäden. Die Rolle von NHE1 während ischämischer Ereignisse wird kontrovers diskutiert. Zum einen wird über eine Erk1/2 vermittelte gesteigerte Aktivität von NHE1 berichtet, die durch den Import von Natrium zur Zellschwellung während eines Schlaganfalls beiträgt. Es wird vermutet, dass NHE1 vor allem in der frühen Phase eines ischämischen Ereignisses (in den ersten fünf Stunden) stimuliert ist. Die Inhibition von Erk1/2 führe hiernach zur reduzierten NHE1-Aktivität. Im Folgenden strömt weniger Natrium in die Zellen, was niedrigere Zellmortalität und letztlich eine Reduktion des Infarktvolume mit sich bringt (Luo et al., 2007; Yuen et al., 2014). Andererseits wird eine Herunterregulierung von NHE1 durch Hypoxie und TME

(tumor microenvironment conditions = Hypoxie, niedrige Nährstoff- und Glukoselevel) beschrieben (Pedersen et al., 2017).

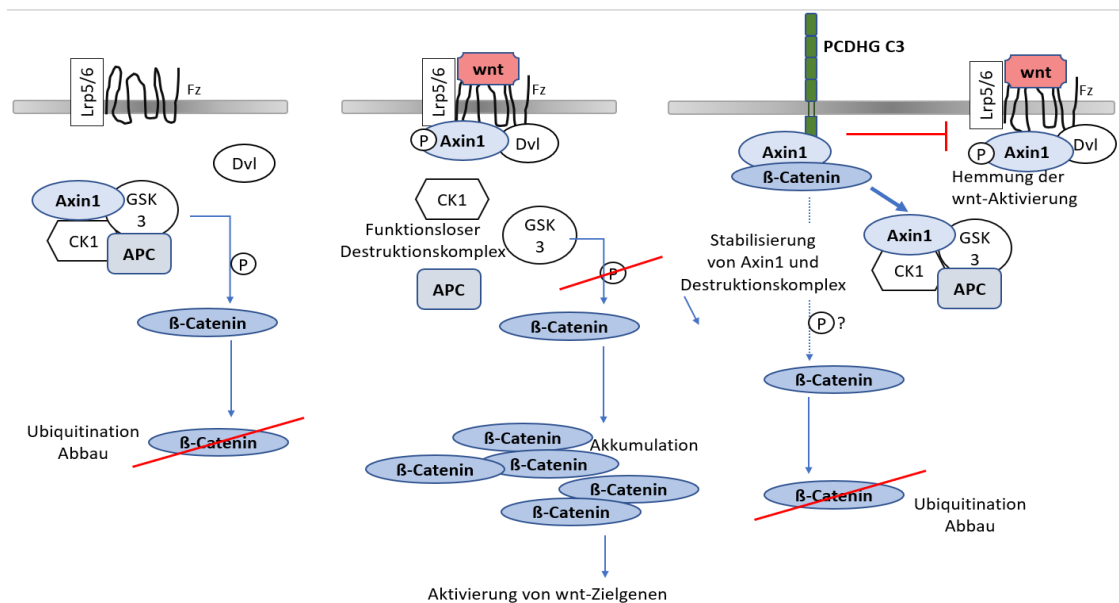
Derzeit wurden nach bestem Wissen noch keine Studien zur Beeinflussung des MAPK-Signalwegs und seinem Target NHE1 durch PcdhgC3 veröffentlicht.

### **1.3.3 Wnt**

Während der Wnt-Signalweg in adulten Zellen physiologischer Weise meistens inaktiviert ist, spielt er während der Embryogenese eine wichtige Rolle, vor allem für die neuronale Entwicklung. So reguliert er die Zellmorphologie, Proliferation und Motilität (Harrison-Uy, 2012). Pathologische Veränderungen des Wnt-Pathways werden häufig im Zusammenhang mit Tumoren beschrieben. Bei über 60 % der kolorektalen Karzinome findet sich eine Mutation des Adenomatous-polyposis-coli Gens (APC-Gens). Physiologischerweise wird  $\beta$ -Catenin durch einen Destruktionskomplex (bestehend aus APC, Axin1 u.a.) phosphoryliert, ubiquitiert und abgebaut (Vgl. Abbildung 5, links). In Anwesenheit von Wnt (Abbildung 5, mittig) sorgt APC für die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin, welches in den Nukleus transloziert und entsprechende Zielgene, beispielsweise für die Zellproliferation, aktiviert (Dallosso et al., 2012).

Fast alle in Studien untersuchten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ - Protocadherine sind sowohl beim Kolonadenom als auch bei Kolonkarzinom hypermethyliert. Die einzige Ausnahme bildet das PcdhgC3, welches sich ausschließlich beim Karzinom hypermethyliert und somit inaktiviert nachweisen lässt. Anders reduziert die PcdhgC3 Überexpression die  $\beta$ -Catenin vermittelte Transkriptionsaktivität im Karzinomzellen und fungiert somit als einziger Vertreter der Protocadherine als Tumorsuppressor beim kolorektalen Karzinom (Dallosso et al., 2012). Mah et al. beschreiben die Verminderung des Wnt-Signalwegs im zerebralen Kortex durch Bindung und Stabilisierung von PcdhgC3 an Axin1, welches zu einem vermehrten Abbau von  $\beta$ -Catenin (möglicherweise über vermehrte Phosphorylierung) und einer verringerten Wnt-Aktivität führt. Sowohl dem Wnt-Signalweg als auch den Protocadherinen werden wichtige Funktionen für die Neurogenese zugesprochen. Aus diesem Grund wird über die Bedeutung der

Wnt-Signalweg-Inhibierung durch PcdhgC3 im Rahmen der neuronalen Entwicklung diskutiert (Mah et al., 2016).



**Abbildung 5: Wnt-Signalweg**

(Links)  $\beta$ -Catenin wird durch den Destruktionsprozess abgebaut. (Mitte) In Anwesenheit von Wnt sorgt das Adenomatous-polyposis-coli-Gen (APC) für eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin. (Rechts) PcdhgC3 stabilisiert Axin1 als Teil des Destruktionskomplexes von  $\beta$ -Catenin (eventuell über Phosphorylierung) und führt zur reduzierten Wnt-Aktivität (eigene Darstellung modifiziert nach Mah et al. 2016, Abbildungslizenz vorliegend).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Protocadherine sind im zentralen Nervensystem in verschiedensten Zellen nachgewiesen und spielen eine große Rolle bei deren neuronalen Entwicklung. Die Expression in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke gibt einen Hinweis über ihre mögliche Rolle für den Schutz und die Homöostase des Hirnparenchyms.

Diese Arbeit beschränkt ist auf einen Vertreter der Pcdhs, PcdhgC3, dessen Rolle bisher vor allem im Rahmen der Neurogenese und Kanzerogenese diskutiert ist. Dilling et al. beschrieben erstmals, dass der Knockout von PcdhgC3 zu einer veränderten Expression von TJ Proteinen in zerebellären Endothelzellen führt. Ziel der Arbeit ist es, die Auswirkungen des PcdhgC3 Knockouts auf die Endothelzellen der BHS weiter zu charakterisieren. Zum einen werden die

Proteinlevel ausgewählter Transporter an der BHS untersucht, um mögliche Einflüsse von PcdhgC3 auf die Transportfunktion durch die BHS beschreiben zu können. Der Hauptteil der Arbeit befasst sich mit ausgewählten Untersuchungen des mTOR-, MAPK-, und Wnt-Signalwegs hinsichtlich Veränderungen durch Ausschalten des PcdhgC3. Die Dysregulierung von Signalwegen kann zu diversen metabolischen, inflammatorischen und neurologischen Beschwerden führen und ist dadurch Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Ein möglicher Einfluss von PcdhgC3 könnte pharmakologisch bei der Therapie dieser Erkrankungen genutzt werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

Geräte	Hersteller
Alpha Innotech FluorChem FC2 Imaging System	Alpha Innotech
Centrifuge 5418R	Eppendorf
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories
Elektrophoresekammer XCell SureLock™	Thermo Fisher Scientific
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000	Keyence
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Thalheimer Kühlung GmbH & Co
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific
Heizblock Dri-Block® heaters DB2A	Techne
Heracell™ 150i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Inkubator C60	Labotec GmbH
Inkubator Forma Steri-Cult	Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank profiline	Liebherr
Magnetrührer GLW M21	GLW Gesellschaft für Laborbedarf GmbH
Megafuge 16R Centrifuge	Heraeus
Microspin FV-2400 Personal Spin – Vortex	Biosan
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Reagenzglasmixer Mini-Vortexer	A. Hartenstein GmbH
StepOne Plus qPCR Maschine	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank Heraeus® HERA-safe®	Thermo Fisher Scientific
Thermal Cycler 2720	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transferkammer für Western Blot	Thermo Fisher Scientific
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus UW 3080	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Vortex GLW L46	GLW Gesellschaft für Laborbedarf GmbH
Zentrifuge PerfectSpin P	Thermo Fisher Scientific

**Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-Well Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific
Biosphere® Filter Tips, steril 0,5-20 µl	Sarstedt AG & Co
Biosphere® Filter Tips, steril 100-1000 µl	Sarstedt AG & Co
Biosphere® Filter Tips, steril 2-100 µl	Sarstedt AG & Co
Culture-Insert 2 Well in µ-Dish 35 mm	Ibidi GmbH
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories
Glas-Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co KG
Insulinspritze Omnican® 40	B. Braun Melsungen AG
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
Pipette 10 µl	Thermo Fisher Scientific
Pipette 100 µl	Eppendorf AG
Pipette 1000 µl	Eppendorf AG
Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran	Eppendorf AG
Röhrchen 15 ml, steril	Bio-Rad Laboratories
Tubes 1,5 ml	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen (T-25 und T-75)	Sarstedt AG & Co
Zellschaber 25 cm	Greiner Bio-One
	Sarstedt

**2.1.2 Verwendete Substanzen****Tabelle 3: Verwendete Substanzen**

Substanz	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH A2941
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich A7906
cOmplete™ ULTRA Tablets Proteaseinhibitor	Roche 05892970001
Destilliertes Wasser	B. Braun Melsungen AG 00088992
DMEM – No Glucose	Thermo Fisher Scientific 11966025
Dulbecco`s modified Eagle`s Medium - high glucose 4,5g/l	Sigma-Aldrich D5796
Fetales Kälberserum (FCS)	Merck S 0115
Gelatine	Serva 22151
Glycin	AppliChem 131340.1211
Isopropanolol	Sigma-Aldrich I9516
Luminol	Sigma-Aldrich A8511
Methanol	Honeywell Riedel-de-Haën

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich T9281
NaCl	Sigma-Aldrich 31434
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH A1112
Nonfat dried milk powder	AppliChem 2710453
Nukleasefreies Wasser	Thermo Fisher Scientific AM9937
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 17-well	Thermo Fisher Scientific NP0329
NuPAGE™ Antioxidant	Thermo Fisher Scientific NP0005
NuPAGE™ LDS Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific NP0007
NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer	Thermo Fisher Scientific NP0001
NuPAGE™ Sample Reducing Agent	Thermo Fisher Scientific NP0009
NuPAGE™ Transfer Buffer	Thermo Fisher Scientific NP0006
p-Coumaric acid	Sigma-Aldrich C9008
Penicillin/Streptomycin	Merck A2213
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich D8537
PhosStop™ Phosphataseinhibitor	Roche 04906845001
PhosStop™ Phosphataseinhibitor	Roche 04906845001
Protein-Marker V	Thermo Fisher Scientific 414465
Puromycin	Merck 540222
Rotiphorese® Gel 30 Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG 3029.2
SL327 Mek1/2 Inhibitor	Sigma-Aldrich S4069
Sodium Deoxycholate ≥97% (titration)	Sigma-Aldrich D6750
β-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich M6250
Stain Cell Solution	Millipore 90144
Torin2 mTOR-Inhibitor	Sigma-Aldrich SML1224
Tris Pufferan® ≥99,9 %, ultra quality	Carl Roth GmbH + Co. KG 5429
Tween® 20	Sigma-Aldrich 9005-64-5
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich 216763
XAV939 Wnt-Inhibitor	Sigma-Aldrich X3004

### 2.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen

#### RIPA-Puffer

50	mM	Tris pH 8,0
150	mM	NaCl
1	%	NP-40
0,5	%	Sodium Deoxycholate
0,1	%	SDS

#### Lämmli-Puffer

40	%	Glycerol
8	%	SDS
6	%	$\beta$ -Mercaptoethanol
250	mM	Tris HCL pH 6,8
0,004	%	Bromophenol blue

#### Trenngel 10%

4	mL	Destilliertes Wasser
3,33	mL	Acrylamid
2,5	mL	3M Tris pH 8,8
100	$\mu$ L	10 % SDS
100	$\mu$ L	10 % APS
6	$\mu$ L	TEMED

#### Sammelgel

2,85	mL	Destilliertes Wasser
850	$\mu$ L	Acrylamid/ Bis (30%)
1,25	mL	1M Tris pH 6,8
50	$\mu$ L	10 % SDS
50	$\mu$ L	10 % APS
5	$\mu$ L	TEMED

#### Elektrophoresepuffer

60,4	g	Tris
288	g	Glycin
20	g	SDS
H <sub>2</sub> O	auf	2l auffüllen

#### Transferpuffer

6,06	g	Tris
------	---	------

28,83 g Glycin  
 400 ml Methanol  
 7,5 ml 10 % SDS  
 H<sub>2</sub>O auf 2l auffüllen

ECL-I-Lösung  
 25 mL Tris pH 8,8  
 1 Cap Luminol  
 1 Cap p-Coumaric acid

ECL-II-Lösung  
 25 mL Tris pH 8,8  
 160 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 2.1.4 Verwendete Antikörper und PCR-Sonden

### 2.1.4.1 Primärantikörper

**Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller und Katalognummer
Anti-Akt, Kaninchen, polyklonal	1: 1000	Cell Signaling 9272
Anti-BCRP/ABCG2, Ratte, monoklonal	1: 100	Abcam Ab-24114
Anti-Glut1, Maus, polyklonal	1: 200	Millipore 07-1401
Anti-Lrp1, Kaninchen, monoklonal	1: 1000	Abcam Ab92544
Anti-MRP1, Maus, monoklonal	1: 1000	Millipore MAB4100
Anti-MRP4, Ratte, monoklonal	1: 1000	Enzo Liefe Science ALX-801-039-C100
Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2), Maus, monoklonal	1: 2000	Cell Signaling 9107
Anti-PhosAkt, Kaninchen, monoklonal	1: 1000	Cell Signaling 4058
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2), Kaninchen, monoklonal	1: 2000	Cell Signaling 4370
Anti-RAGE, Ziege, polyklonal	1: 200	Santa Cruz Sc-8230
Anti-Slc9a1, Kaninchen, polyklonal	1: 1000	Biorbyt orb399347

Anti-β-Actin, Maus, monoklonal	1: 20000	Sigma-Aldrich A3854
Anti-Transferrin Rezeptor, Maus, monoklonal	1: 500	Thermo Fisher Scientific 13-6800

#### 2.1.4.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller und Katalognummer
Esel Anti-Ziege	1: 3000	Santa Cruz Sc-2056
Kaninchen Anti-Ratte	1: 5000	Thermo Fisher Scientific 61-9520
Maus Anti-Kaninchen	1: 100	Roche 12015218001
Ziege Anti-Kaninchen	1: 2000	Cell Signaling 7074

#### 2.1.4.3 Verwendete real-time PCR-Sonden

**Tabelle 6: Verwendete Sonden**

Sonde	Hersteller und Katalognummer
Sc19a1	Thermo Fisher Scientific Mm00444270
Calnexin (Canx)	Thermo Fisher Scientific Mm00500330

#### 2.1.4.4 Verwendete fertige Reaktionssysteme (Kits)

**Tabelle 7: Verwendete Kits**

Kit	Hersteller und Katalognummer
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel 740955.250
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific 23225
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific 4368814

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

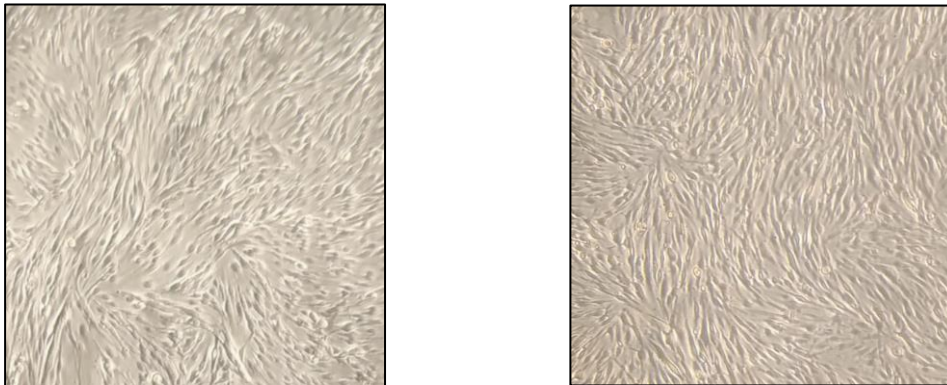
Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um zerebelläre Hirnendothelzellen (cerebEND). Diese immortalisierten murinen Endothelzellen wurden in der

Dissertation von C. Silwedel beschrieben und dienen als ein in vitro Modell für die Blut-Hirn-Schranke und wurden bereits für Untersuchungen der BHS Proteinexpression unter normalen und pathologischen Bedingungen genutzt (Silwedel, 2006; Helms et al., 2016). Durch Transfektion mit einem Pcdh2 HDR Plasmid etablierte C. Dilling die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie (Dilling et al., 2017).

Alle Arbeitsschritte zur Zellkultivierung wurden, soweit nicht anders beschrieben, unter der Sterilbank (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in einem Stickstofftank gelagert und vor Aussaat zunächst aufgetaut. Zellkulturflaschen wurden mit Gelatine (0,5 %) für 30 Minuten beschichtet. Die aufgetauten Zellen wurden mit auf 37°C erwärmtem Nährmedium vermischt und in eine 25 cm<sup>2</sup> großen Kulturflasche (Greiner Bio-One) ausgesät. Als Nährmedium diente DMEM – high glucose, welchem 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt worden. Das Medium der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie enthielt zusätzlich 2 % Puromycin. Diese Nährmedien wurden, soweit nicht anders beschrieben, für die jeweilige Zellreihe in allen aufgeführten Experimenten verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im SteriCult 200 Incubator kultiviert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte der Nährmediumwechsel. Hierbei wurde das verbrauchte Medium zunächst mittels Pasteurpipette abgesaugt und anschließend frisches, im Wasserbad auf 37°C erwärmtes Nährmedium (10 ml) auf die Zellen gegeben.

Einmal in der Woche wurden die konfluent gewachsenen Zellen gesplittet. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin für ca. drei Minuten inkubiert. Trypsin löst die adhärenen Zellen vom Boden der Kulturflasche. Dieses wurde mit dem Lichtmikroskop kontrolliert. In die Kulturflasche wurde Nährmedium gegeben und die gelösten Zellen anschließend in drei neue, beschichtete Kulturflaschen überführt. Dabei wurde ein Splitverhältnis von 1:3 gewählt. Nach dem ersten Splitten wurden alle Zellreihen in 75 cm<sup>2</sup> große Kulturflaschen überführt. Diese wurden mit 2 ml Trypsin behandelt, der Wechsel des Nährmediums fand mit 18 ml statt. Abbildung 6 zeigt lichtmikroskopische

Aufnahmen beider konfluent gewachsenen Zelllinien, wobei keine morphologischen Unterschiede erkennbar sind.



**Abbildung 6: Mikroskopischer Ausschnitt der konfluent gewachsenen Zelllinien**

Zwischen (A) cerebEND-Zelllinie und (B) cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie sind keine bildmorphologischen Unterschiede erkennbar.

Die konfluent wachsenden Zellen wurden nach einer Woche in 6 Well Platten (Thermo Fisher Scientific) mit jeweils 2,6 ml pro Well ausgesät und erhielten jeweils 3 ml frisches Nährmedium alle zwei bis drei Tage.

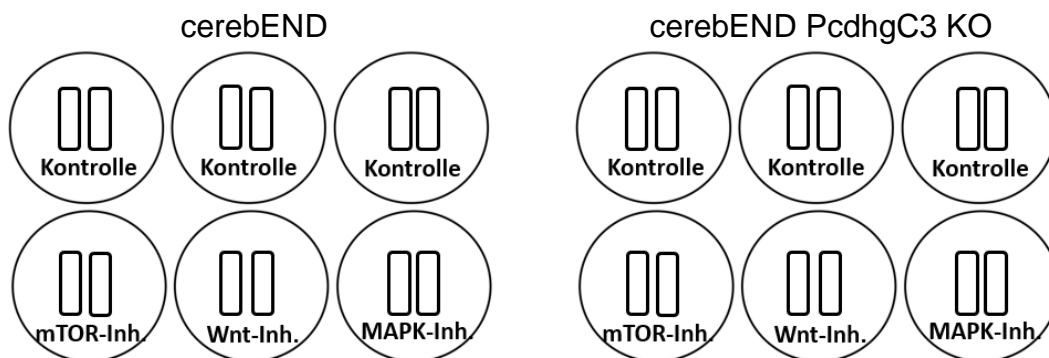
Nach einer Woche erfolgte ein Nährmediumwechsel auf 1 % FCS in DMEM für 24 Stunden. Zweck dieser Differenzierung ist das Verhindern weiteren Zellwachstums durch Entzug von Wachstumsfaktoren und Hormonen. Im Folgenden konnten die Zellproben für ihre Weiterverarbeitung lysiert werden.

### **2.2.2 Zellmigration**

Wundheilungsuntersuchungen (wound healing assays) sind weit verbreitete in vitro Untersuchungen zur Zellmigration. Hierbei wird eine zellfreie Lücke zwischen den zu untersuchenden Zellen geschaffen und das Wachstumsverhalten der Zellpopulation im zeitlichen Verlauf untersucht. Mithilfe der Zeit, die die Zellen zum Schließen der Lücke benötigen, können Aussagen über die Proliferationszeit getroffen werden. Häufig wird die Zellmigration unter bestimmten Bedingungen untersucht, beispielsweise durch Zugabe von Substanzen oder durch Verwendung von Knockout-Zelllinien (Jonkman et al., 2014).



Im vorliegenden Versuch wurde mit dem Culture-insert 2 Wells der ibidi GmbH gearbeitet. Hierbei sind zwei Silikoneinsätze durch eine 500 µm breite Lücke voneinander getrennt. Diese Einsätze befinden sich in einer behandelten Schale. Der größte Vorteil gegenüber der herkömmlich genutzten Kratz-Methode, bei welcher mithilfe einer Pipettenspitze oder Nadel eine Lücke geschaffen wird, ist die einheitliche Lücke zwischen den Zellen. Experimente mithilfe der Inserts sind besser reproduzierbar, aber auch teurer (Jonkman et al., 2014). Abbildung 7 zeigt den schematischen Aufbau der Wells mit Silikoneinsätzen sowie das weitere Versuchsprozedere, was anschließend erläutert wird.



**Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Zellmigrationsversuche**

CerebEND- und cerebEND PcdhgC3 KO-Zellsuspension mit den angegebenen Signalweginhibitoren bzw. den Kontrollen wurde in Wells mit Silikoneinsätzen gegeben. Nach Kultivierung wurden die Einsätze entfernt und das Zusammenwachsen der Zellen nach 24 und 48 Stunden fotografisch festgehalten.

mTOR-Inh.= Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Torin2; Wnt-Inh.= Wnt inhibitor XAV939; MAPK-Inh.= Mitogen-activated Protein Kinase Inhibitor SL327

CerebEND- und cerebEND PcdhgC3 KO-Zellen wurden wie bereits geschrieben kultiviert. Beim Splitten der Zellen wurde jeweils 70 µl Zellsuspension (mithilfe von Trypsin abgelöste und mit Nährmedium versetzte Zellen) pro Einsatz gegeben. Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern wurden 2 ml des jeweiligen Nährmediums der Zellen in die Schale gegeben. Die Schalen wurden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im SteriCult 200 Incubator für fünf Tage kultiviert.

Nach fünf Tagen wurden die Silikoneinsätze in den Schalen entfernt, das Nährmedium abgesaugt und neues – mit entsprechenden Zusätzen - hinzugegeben. Hierbei wurde DMEM mit 1 % FCS verwendet. Für den Versuchsaufbau wurden die Zellreihen in Kontroll- und Versuchsgruppen eingeteilt. Die Zellen der Versuchsgruppe erhielten DMEM 1 % FCS, welches mit Inhibitoren der zu untersuchenden Signalwege versetzt wurde. Tabelle 8 zeigt die Inhibitoren mit entsprechender Endkonzentration. Die Kontrollgruppen-Zellen erhielten DMEM 1 % FCS mit DMSO im gleichen Konzentrationsverhältnis (Vgl. Abbildung 7). Durch Entfernen der Silikoneinsätze wurde die Zellmigration initiiert. Diese wurde mikroskopisch (BZ-9000 von Keyence) bei Stunde 0, Stunde 24 und nach 48 Stunden untersucht und fotografisch festgehalten. Um das Zellwachstum besser sichtbar zu machen wurde das Nährmedium nach 48 Stunden abgesaugt und ein Tropfen Stain Cell Solution (Millipore) auf die Zellen gegeben.

**Tabelle 8: Verwendete Inhibitoren mit Endkonzentrationen**

Substanz	Endkonzentration	Kontrolle
mTOR-Inhibitor Torin2 (Sigma-Aldrich)	25 nM	DMSO
Wnt-Inhibitor XAV939 (Sigma-Aldrich)	20 µM	DMSO
MAP-Kinase-Inhibitor SL327 (Sigma-Aldrich)	200 nM	DMSO

Die Auswertung der Zellmigration erfolgte mit der BZ-II-Analyser Software (Keyence). Hierbei wurde der Zellzwischenraum des gleichen Ausschnitts nach den jeweiligen Zeitabschnitten ausgemessen.

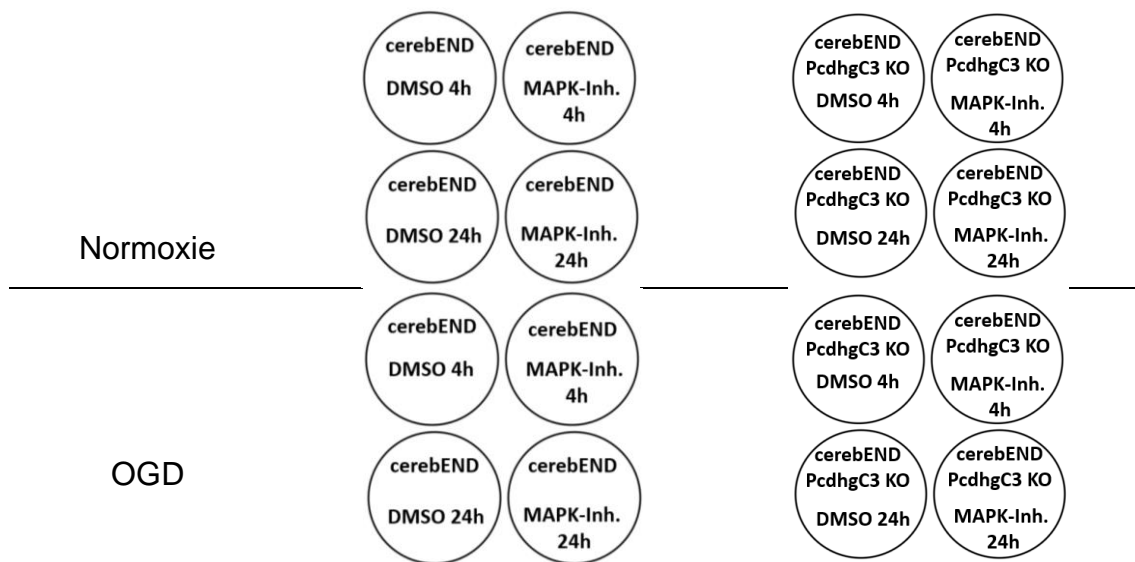
### 2.2.3 Oxygen Glucose Deprivation-Versuche

Der Sauerstoff-Glucose-Entzug, auch Oxygen Glucose Deprivation (OGD) genannt, stellt ein weit verbreitetes Modell zur Simulation von Gewebeschäden im Gehirn dar. So führt beispielsweise beim Schlaganfall der Verschluss einer Zerebralarterie zur mangelhaften Versorgung des betroffenen Gebietes mit

Sauerstoff und Nährstoffen wie Glucose. Während der Kern des ischämischen Ereignisses meist irreversibel geschädigt ist, ist das umgebene Gewebe lediglich unvollständig geschädigt. Diese sogenannte Penumbra kann sich nach Reperfusion wieder erholen oder durch Aktivierung zahlreicher Mechanismen (etwa Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder Entzündungsmediatoren) zugrunde gehen (Lahiani et al., 2018).

Das OGD-Modell wurde für die cerebEND- und cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinien genutzt. Bevor eine Hypoxie initiiert wurde, erhielten die in 6-Well-Platten kultivierten Zellen nach fünf Tagen einen Mediumwechsel mit DMEM und 1 % FCS für 24 Stunden. Dieses Differenzierungsmedium verhinderte das weitere Wachsen der Zellen.

Am Versuchstag wurden die Zellen in Versuchs- und Kontrollgruppen unterteilt. Abbildung 8 zeigt den Versuchsaufbau.



**Abbildung 8: Versuchsaufbau der Oxygen Glucose Deprivation-Versuche**

MAPK-Inh.= Mitogen-activated Protein Kinase Inhibitor SL327; 4h= 4 Stunden; 24h= 24 Stunden

Die Kontrollgruppe wurde unter Normoxiebedingungen mit 1 % FCS in DMEM kultiviert. Bei der Versuchsgruppe (OGD) fand ein Mediumwechsel zu glukosefreiem Medium (Thermo Fisher Scientific) statt.

Die Zellen wurden nicht nur hinsichtlich ihres Verhaltens bei Sauerstoff-Glucose-Entzug untersucht. Eine weitere Aufteilung in Versuchs- und Kontrollgruppen erfolgte hinsichtlich der Behandlung mit dem MAP-Kinase Inhibitor SL327 (Sigma-Aldrich). Die Versuchsgruppe erhielt 200 nM des Inhibitors jeweils in 1 % FCS/DMEM bzw. in glukosefreies Medium. Die Kontrollgruppe erhielt 200 nM DMSO in 1 % FCS/DMEM bzw. glukosefreies Medium.

Alle mit 1 % FCS in DMEM behandelten Zellen wurden im Stericult 200 Incubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach vier Stunden erfolgte eine Ernte von RNA und Proteinen der mit DMSO und für MAP-Kinase-Inhibitor behandelten Zellen, nach 24 Stunden erfolgte eine zweite Ernte.

Die mit glukosefreiem Medium behandelten Zellen wurden für vier Stunden in der Hypoxiekammer Inkubator C60 (Labotec GmbH) bei 37°C, 1 % O<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach vier Stunden erfolgte eine Ernte von RNA und Proteinen der mit DMSO und für MAP-Kinase-Inhibitor behandelten Zellen. Bei den verbliebenen Zellen sollte eine Reoxygenierung initiiert werden. Hierfür fand ein Nährmediumwechsel auf 1 % FCS/DMEM mit DMSO oder MAP-Kinase-Inhibitor versetzt statt. Die Zellen wurden für 20 Stunden im Stericult 200 Incubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abschließend fand die Ernte von RNA und Proteinen statt.

Tabelle 9 stellt eine Übersicht über die gewonnenen RNA- und Proteinproben dar.

**Tabelle 9: Gewonnene RNA- und Proteinproben**

	Kultivierungsbedingung und Zelllinie	Substanz	Zeit
1	Normoxie cerebEND	DMSO	4h
2	Normoxie cerebEND	MAPK-Inh.	4h
3	Normoxie cerebEND	DMSO	24h
4	Normoxie cerebEND	MAPK-Inh.	24h
5	OGD cerebEND	DMSO	4h + Reoxyg. 20h
6	OGD cerebEND	MAPK-Inh.	4h + Reoxyg. 20h
7	OGD cerebEND	DMSO	4h + Reoxyg. 20h
8	OGD cerebEND	MAPK-Inh.	4h + Reoxyg. 20h
9	Normoxie cerebEND PcdhgC3 KO	DMSO	4h

10	Normoxie cerebEND PcdhgC3 KO	MAPK-Inh.	4h
11	Normoxie cerebEND PcdhgC3 KO	DMSO	24h
12	Normoxie cerebEND PcdhgC3 KO	MAPK-Inh.	24h
13	OGD cerebEND PcdhgC3 KO	DMSO	4h + Reoxyg. 20h
14	OGD cerebEND PcdhgC3 KO	MAPK-Inh.	4h + Reoxyg. 20h
15	OGD cerebEND PcdhgC3 KO	DMSO	4h + Reoxyg. 20h
16	OGD cerebEND PcdhgC3 KO	MAPK-Inh.	4h + Reoxyg. 20h

OGD= Oxygen Glucose Deprivation; MAPK-Inh.= Behandlung mit 200 nM Mitogen-activated Protein Kinase Inhibitor SL327; DMSO= Kontrolle mit 200 nM DMSO, 4h= 4 Stunden; 4h + Reoxyg. 20h= 4 Stunden + Reoxygenierung 20 Stunden

## 2.2.4 Western Blot

### 2.2.4.1 Proteinaufbereitung

Zur Gewinnung der Proteinproben wurden die differenzierten cerebEND- und cerebEND PcdhgC3-KO Zellen auf Eis zweimalig mit gekühltem PBS gewaschen. Die Zellyse wurde pro Well mit 100 µl RIPA-Puffer, welcher mit 13 µl Protease-Inhibitor (Roche) und 13 µl Phosphatase-Inhibitor (Roche) vermischt war, auf Eis durchgeführt. Die lysierten Zellen wurden abgeschabt und in ein Röhrchen überführt, welche für die weitere Verarbeitung bei -80 °C weggefroren wurden.

Vor der Proteinbestimmung erfolgte die Homogenisierung der Proteinproben. Dieser Zellaufschluss dient zur Extraktion von Proteinen durch Zerstörung von Zellbestandteilen. Zunächst wurden die Proteinproben auf Eis aufgetaut und gevortext. Anschließend wurden sie bei 20 Watt zehn Mal für eine halbe Sekunde mit jeweils einer Pause von drei Sekunden auf Eis mittels Ultraschall sonifiziert (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG). Anschließend erfolgte das Zentrifugieren der Proben bei 4°C für eine Minute bei 10.000g.

Die Proteinbestimmung erfolgte mithilfe des Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kits. Es wurden Triplets mit jeweils 2 µl der Probe mit 23 µl Wasser in jedes Well einer unsterilen 96er Platte pipettiert. Anschließend wurden 200 µl der BCA-Reaktionslösung (50 Teile Reagenz A: 1 Teil Reagenz B) nach Anleitung des Herstellers hinzugegeben. Nach Pipettieren des Proteinstandards laut Verdünnungsschema des Kits wurden die Proben bei 37°C für 30 Minuten

inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 540 nm gemessen und anhand einer Regressionsgerade die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

Zum weiteren Aufbereiten wurde ein Teil der Proteinproben in neue Tubes überführt und mit 4 x Lämmli-Puffer, welcher mit 6%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt war, im Verhältnis 4:1 hinzugegeben.

#### **2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Page, auf Deutsch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülmasse. Dabei wandern kleinere Proteine schneller als größere. Durch das Natriumdodecylsulfat werden die Proteine denaturiert und einheitlich negativ geladen, damit sie sich unabhängig von ihrer Eigenladung auftrennen (Rehm und Letzel, 2011 // 2016).

Die Proben wurden für ihre Auftrennung zunächst in einem Sammelgel gesammelt und dann in einem 10 % igen Gel aufgetrennt.

Zunächst erfolgte das Gießen des 10 %-Trenngels. Hierbei wurden Acrylamid, SDS, APS, Tris und Wasser in entsprechenden Konzentrationen gemischt und durch die Zugabe von TEMED die Polymerisation gestartet. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten (Bio-Rad Laboratories) gegossen und zur Verhinderung von Blasenbildung mit Isopropanol (Sigma-Aldrich) überschichtet. Nach Aushärten des Trenngels (ca. 30-40 Minuten) wurde Isopropanol ausgeschüttet und das Sammelgel laut Anweisung gemischt und auf das Trenngel gegossen. Außerdem erfolgte das blasenfreie Einsetzen von 1,5 mm Kämmen, die beim Entfernen nach Aushärtung des Sammelgels eine Tasche für die Proben hinterließen (pro Gel 15 Taschen).

Die Gele wurden in eine Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad Laboratories) eingebaut und äußere und innere Kammer mit Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. Eventuell vorhandene Gelreste in den Probenaschen wurden mithilfe einer Pipette ausgespült. Zuerst wurden 3  $\mu$ l Protein-Marker V in die entsprechenden Taschen pipettiert. Die mit Lämmli verdünnten Proteinproben wurden bei 70°C für fünf Minuten erhitzt und das Gel gemäß der Proteinbestimmung mit 20  $\mu$ g pro

Tasche aufgeladen. Die Gelelektrophorese-Kammern wurden nach Aufladung für ca. 30 Minuten bei 60 V Spannung und 40 mA Stromstärke angeschlossen, damit die Proben ins Sammelgel laufen. Anschließend wurde im Trenngel die Spannung auf 130 V erhöht, bis die Lauffront ca. 5 mm vom Boden entfernt war (ca. 1,5 Stunden).

### **2.2.4.3 Blotting**

Der WB dient der Übertragung (Blotting) von Proteinen auf eine Trägermembran. Die Proteine können anschließend immunochemisch mittels Antikörper nachgewiesen werden. Nach erfolgter Gelelektrophorese, in welcher sich die Proteine bereits ihrer Größe nach aufgetrennt haben, wandern diese nun unter Anlegung einer Spannung in Richtung Anode und werden auf die Membran geblottet (Mülhardt, 2013).

Zum Transfer wurde eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) – Membran genutzt, die zunächst für eine Minute in Methanol aktiviert wurde. Dieser Schritt ist notwendig, um die Hydrophobie der Membran zu mindern (Rehm, 2011 // 2016). Anschließend wurde sie zusammen mit Vlies und Blotting-Papieren im Transferpuffer getränkt. Der Zusammenbau erfolgte in der Reihenfolge Vlies-Blotting-Papier – PVDF-Membran – Gel – Blotting-Papier – Vlies, wobei Gel und PVDF-Membran möglichst blasenfrei aufeinander gelegt wurden. Zum Elektrotransfer erfolgte der Einbau der Blotkassette in einen Tank-Blotter (Thermo Fisher Scientific). Dieser wurde mit Transferpuffer aufgefüllt, auf einen Magnetrührer gestellt und über Nacht bei 4°C und 80 mA an das Transfergerät (Biometra) angeschlossen.

Proteine bzw. ihre Antigene können mithilfe von Primär- und Sekundärantikörper angefärbt werden. Hierfür werden die Membranen zunächst mit dem Primärantikörper (Anti-Antigen-Antikörper) inkubiert, anschließend erfolgt die Inkubation des markierten Sekundärantikörpers. Dieser kann abschließend sichtbar gemacht werden (Rehm und Letzel, 2011 // 2016). Um eine unerwünschte Antikörperfärbung zu vermeiden, wurde die Membran nach dem Elektrotransfer eine Stunde in 5 % Milch (Carl Roth), gelöst in PBS, geblockt. Die Membran wurde über Nacht mit dem Primärantikörper, welcher in 1 % BSA/PBS

gelöst ist, inkubiert. Dazu wurde sie mit 2 ml der Antikörperverdünnung eingeschweißt und bei 4°C zwischen zwei Glasplatten eingespannt auf einem Rüttler gelagert. Zum Abwaschen einer unspezifischen Antikörperbindung wurde die Membran dreimalig für 10 Minuten mit 0,1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) in PBS gelöst gegeben. Nach anschließendem Blocken (20 Minuten) wurde der Sekundärantikörper, welcher an einer spezifischen Region im Primärantikörper bindet, für eine Stunde in 0,1 % BSA/PBS inkubiert. Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit einer Peroxidase markiert, die in einer Chemilumineszenz-Reaktion die Oxidation von Luminol katalysiert. Das hierbei emittierte Licht kann photometrisch gemessen werden (Rehm und Letzel, 2011 // 2016). Zur Entwicklung wurden die Elektrochemoluminezenzlösungen ECL I und ECL II im Verhältnis 1:1 gemischt und zu der Membran für zwei Minuten gegeben. Anschließend wurde die Membran mit dem Alpha Innotech Imaging System FlourChem FC und der AlphaView Software entwickelt. Alle Blots wurden abschließend mit ImageJ 1.50 ausgewertet.

#### **2.2.4.4 Besonderheiten bei den Oxygen Glucose Deprivation-Versuchen**

Die beschriebenen selbst gegossenen Gele enthielten jeweils 15 Taschen für Proteinproben. Zur besseren Vergleichbarkeit der Proben wurden aus diesem Grund für die OGD-Versuche, die pro Versuchsansatz 16 Proben enthielten, Fertiggele mit 17 Taschen verwendet.

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Schritte der Proteinkonzentrationsbestimmung, Gelelektrophorese und des Western Blots identisch durchgeführt. Unterschiede ergaben sich in der Zusammensetzung des Elektrophorese- und Transferpuffers.

Die Elektrophorese der aufgeladenen Gele erfolgte mit dem NuPAGE™ Running Buffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 0,25 % Antioxidant (Thermo Fisher Scientific) versetzt war. Zudem wurde die XCell SureLock™ Elektrophoresekammer (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Transferpuffer (Thermo Fisher Scientific) wurde mit 1 % Antioxidant und 10 % Methanol vermischt.



## **2.2.5 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.5.1 Ribonukleinsäure-Isolation**

Die Lyse der RNA erfolgte mithilfe des NucleoSpin® RNA-Kits von Macherey-Nagel und nach Standardprotokoll des Herstellers. Die Zellen wurden zwei Mal mit sterilem PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol auf die Zellen gegeben. Die Proben wurden mittels Zellschaber abgekratzt und in Röhrrchen bei -80°C zur weiteren Verwendung weggefroren.

Zur Lyse wurden die Proben nach dem Auftauen mit einer sterilen Insulinspritze (Omnican 1 ml B. Braun) zehn Mal aufgezogen. Die Lysate wurden durch einen NucleoSpin® Filter filtriert und bei 11000 g für eine Minute zentrifugiert (Centrifuge 5418R Eppendorf). Damit die Ribonukleinsäure besser binden kann, wurden die Proben mit 350 µl 70 %igen Ethanols versetzt. Anschließend wurden sie in neue Röhrrchen mit Filter überführt und für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 350 µl MDB Puffer erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 1000 g.

Zum Verdau vorhandener genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde 90 µl Reaktionspuffer mit 10 µl rDNase vermischt und 95 µl dieses Reaktionsgemisches auf jede Probe gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte das Waschen der Proben, zunächst mit 200 µl RA2-Puffer. Nach einer Zentrifugation von 30 Sekunden bei 11000 g erfolgte ein zweiter Waschgang mit 600 µl RA3-Puffer mit anschließender 30-sekündiger Zentrifugation. Alle Filter wurden in ein neues Röhrrchen gestellt. Beim letzten Waschgang wurden 250 µl RA3-Puffer verwendet, anschließend wurden die Proben bei 11000 g für zwei Minuten zentrifugiert. Die Filter wurden in ein neues Röhrrchen gestellt und zum Auswaschen der RNA mit 40 µl RNase freien Wasser versetzt. Nach einminütiger Zentrifugation der Proben bei 11000 g konnten die Filter verworfen werden.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels NanoDrop 2000 Spektrometers (Thermo Fisher Scientific). Die Konzentration wurde bei 260/280 nm mit jeweils 1,2 µl jeder Probe gemessen.

### 2.2.5.2 Complementary DNA-Herstellung

Zur Umschreibung der RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. 10 µl des Mastermixes wurden in auf Eis gestellte Caps gegeben. Um ein Endvolumen von 20 µl pro Cap zu erreichen wurde jeweils 1 µg Protein anhand der zuvor bestimmten Konzentration mit Nuklease-freien Wasser hinzugegeben. Die Menge des Nuklease-freien Wassers richtete sich dabei nach der RNA-Menge der jeweiligen Probe. Nach Abspinnen der Caps wurde die cDNA im Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) für zehn Minuten bei 25°C, 120 Minuten bei 37°C, fünf Minuten bei 85°C und anschließender Abkühlung bei 4°C synthetisiert.

**Tabelle 10: Reaktionsansatz für 20 µl cDNA**

Volumen	Substanz
2 µl	10 x RT Puffer
0,8 µl	25 x dNTP Mix (100 mM)
2 µl	10 x RT Random Primers
1 µl	Multiscribe Reverse Transkriptase
1 µl	RNAse Inhibitor
3,2 µl	Nuclease-freies Wasser
10 µl	Template (1 µg RNA + Nuclease-freies Wasser)

### 2.2.5.3 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

Bei der quantitativen real-time PCR werden wie bei der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion DNA-Frequenzen vervielfältigt. Zusätzlich können Aussagen über die Menge der amplifizierten DNA getroffen werden. Hierzu werden eine hitzestabile DNA-Polymerase, Ausgangs-DNA, Primer, Nukleotide und geeignete Reaktionsbedingungen. Mithilfe von TaqMan-Sonden, welche im PCR-Ansatz Fluoreszenzsignale freisetzen, kann das DNA-Produkt quantifiziert

werden. Die Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur vervielfältigten DNA-Menge (Mülhardt, 2013).

Zur Vorbereitung wurde die gevortexte cDNA mit Nuklease-freien Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und die verwendeten Sonden auf Eis aufgetaut. Master-Mix und Sonde wurden in entsprechenden Mengen vermischt und in die PCR-Platte MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) pro Well mit jeweils 11 µl vorgelegt. Hinzu kamen 9 µl der zuvor verdünnten cDNA, sodass jedes Well ein Endvolumen von 20 µl enthielt. Als endogene Kontrolle wurde Calnexin (Canx) verwendet. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie versiegelt (Applied Biosystems) und für eine Minute zentrifugiert (Perfect Spin von Thermo Fisher Scientific).

Die Platte wurde in die PCR-Maschine (StepOne Plus qPCR Maschine) und die Echtzeit-PCR gestartet. Hierbei wurden die Enzyme durch Erwärmen der Proben auf 95°C für 15 Minuten aktiviert. Anschließend durchliefen sie 50 Zyklen. Durch Erwärmung der Proben für 15 Sekunden auf 95°C mit folgender einminütiger Abkühlung bei 60°C kam es zur Amplifizierung der DNA. Die steigende Fluoreszenz wurde erfasst.

Die Analyse erfolgte mithilfe der PCR Step One™ Software 2.v3. Jede Probe wurde als Tripletts untersucht. Das Ergebnis wurde mit der endogenen Kontrolle Calnexin (Canx) normalisiert.

### **2.2.6 Statistische Auswertung**

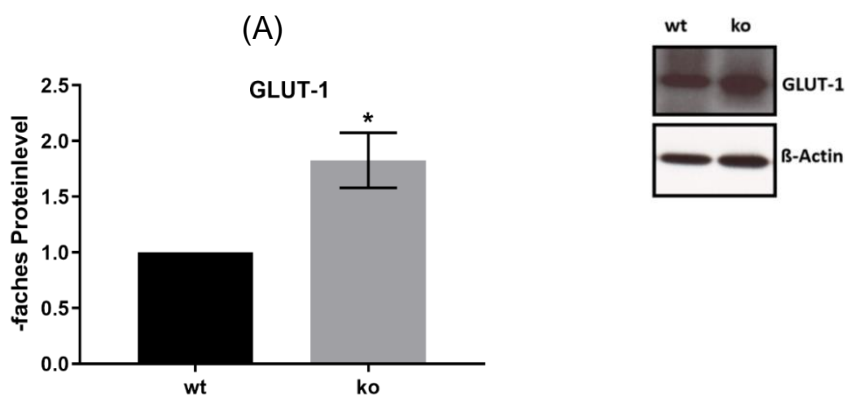
Alle Daten wurden mithilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 8 ausgewertet. Dargestellt wurden die jeweiligen Mittelwerte aus drei, vier oder fünf voneinander unabhängigen Versuchen mit ihrer Standardabweichung. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurden T-Test (bei zwei Stichproben) bzw. ANOVA (bei mehr als zwei Variablen) durchgeführt. Werte  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant (\*) erachtet. Werte  $p < 0,01$  wurden mit \*\* und Werte  $p < 0,001$  mit \*\*\* markiert.

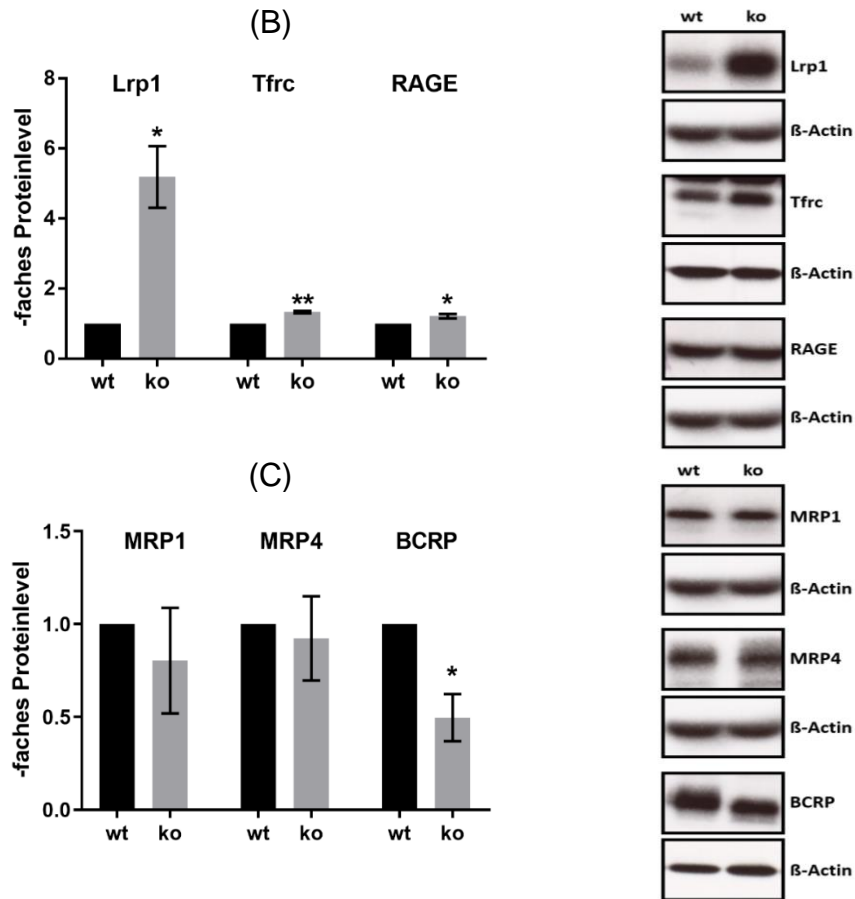
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Transporter-Proteinlevel an der Blut-Hirn-Schranke zwischen cerebEND-Wildtyp und cerebEND PcdhgC3 Knockout-Zelllinie

Veränderungen der Proteinlevel einzelner Transporter der BHS zwischen cerebEND- und cerebEND PcdhgC3 KO-Zellen wurden verglichen. Aus den verschiedenen Transporterfamilien wurden einzelne Vertreter ausgewählt. Der Glucose-1 Transporter (GLUT-1) ist Teil der Solute Carrier, Low density lipoprotein receptor-related protein (Lrp1), Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) und Transferrin-Rezeptor gehören den rezeptorvermittelten Transportmechanismen an. Aus der Gruppe der aktiven Efflux-Pumpen wurden Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), Multidrug Resistance-Related Protein 1 und 4 (MRP1 und MRP4) gewählt. Abbildung 9 zeigt das Proteinlevel in beiden Zelllinien.

Die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie zeigt eine Erhöhung des GLUT-1 Levels auf den 1,83-fachen Wert. Das Lrp1 Proteinlevel nimmt deutlich um das 5,19-fache zu, Tfrc und RAGE erhöhen sich in der Knockout-Zelllinie auf Werte von 1,32 bzw. 1,21. Bei den Efflux-Pumpen zeigt sich eine Erniedrigung des Proteinlevels in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie bei BCRP auf den 0,50-fachen Wert. Diese Veränderungen sind statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Die MRP1- und MRP4-Level verändern sich statistisch nicht signifikant auf das 0,80-fache bzw. 0,92-fache.





**Abbildung 9: Proteinlevel einzelner Transporter in cerebEND- und cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie**

(A mit Western Blot) Solute Carrier: 1,83-faches Glucose-1 Transporter (GLUT1)-Level in cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie (B mit Western Blot) Rezeptorvermittelter Transport: 5,19-faches Lrp1-Level, 1,32-faches Transferrin-Rezeptor-Level (Tfrc) bzw. 2,21-faches RAGE-Level in cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie (C mit Western Blot) Efflux-Pumpen: 0,50-faches BCRP-Level in cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie, MRP1 und MRP4 nicht signifikant verändert;  $\beta$ -Actin als Ladungskontrolle, n=3

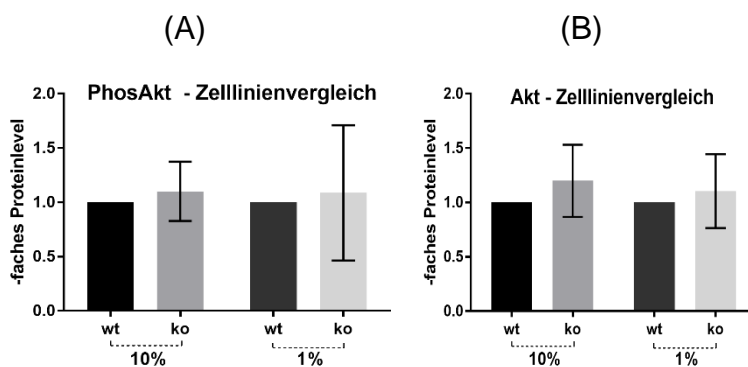
Wt= cerebEND; ko= cerebEND PcdhgC3 KO; GLUT-1= Glucose-1 Transporter; Lrp1= Low density lipoprotein receptor-related protein; Tfrc= Transferrin-Rezeptor; RAGE= Receptor for Advanced Glycation Endproducts; MRP1 und MRP4= Multidrug Resistance-Related Protein 1 und 4; BCRP= Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)

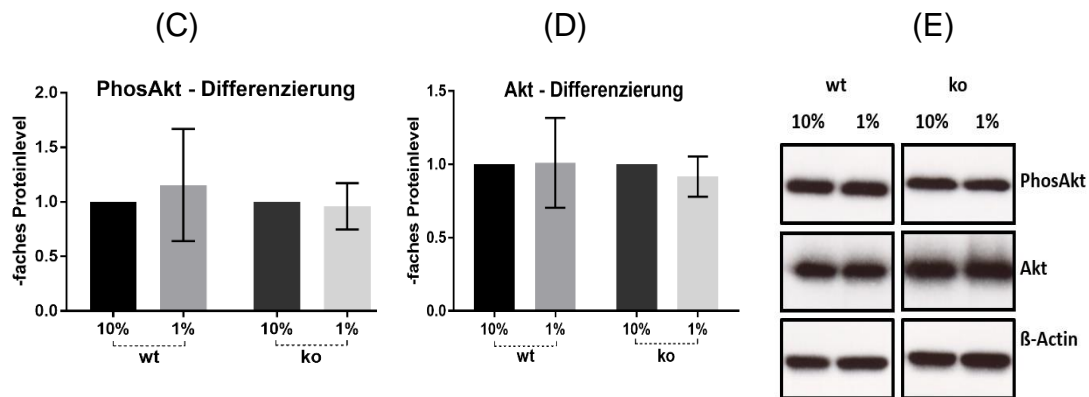
## 3.2 Veränderungen einzelner Signalwege in der cerebEND PcdhgC3 Knockout-Zelllinie

### 3.2.1 Mammalian Target of Rapamycin

#### 3.2.1.1 Differenzierung

Zur Untersuchung des mTOR-Signalwegs wurde exemplarisch ein Vertreter, die Proteinkinase B (Akt) ausgewählt, welche über Phosphorylierung anderer Proteine zur Aktivierung von mTOR führt. Akt reguliert durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren verschiedene Endothelzellfunktionen (Pedersen et al., 2017). Auf Proteinebene wurden die aktivierte phosphorylierte Form PhosAkt (Cell Signaling) mit dem unphosphorylierten Zustand Akt (Cell Signaling) verglichen (Harries et al., 2012). Es zeigen sich in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie keine relativen Veränderungen im PhosAkt-Proteinlevel im Vergleich zur cerebEND-Zelllinie. Zur Untersuchung der absoluten Veränderung von PhosAkt durch Differenzierung für 24 Stunden durch Zugabe von 1 % FCS in DMEM wurden die PhosAkt-Proteinlevel vor und nach Differenzierung miteinander verglichen. Das PhosAkt-Level verändert sich nach Differenzierung in beiden Zelllinien nicht. Ebenso verhält sich das Gesamt-Akt-Proteinlevel zwischen den Zelllinien (Abbildung 10 B) und bei Differenzierung (Abbildung 10 D) konstant.





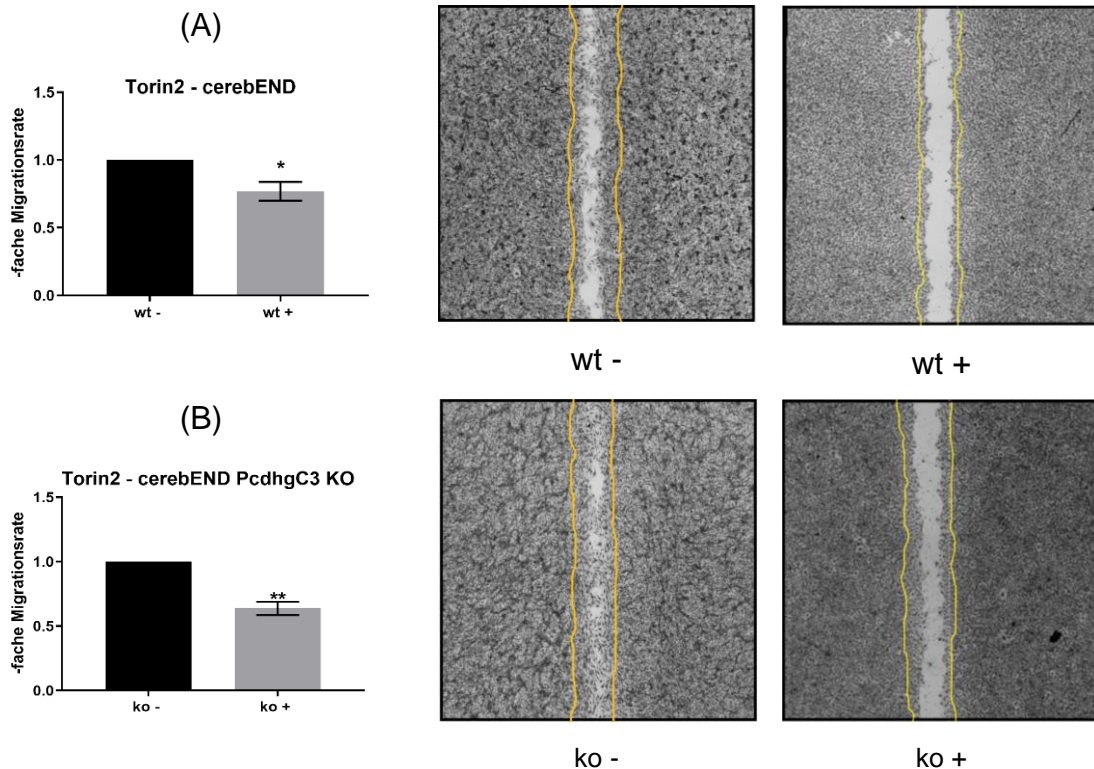
**Abbildung 10: PhosAkt- und Akt-Proteinlevel**

(A) Vergleich beider Zelllinien, das PhosAkt-Proteinlevel unterscheidet sich nicht zwischen den Zelllinien, weder unter 10 % FCS in DMEM noch unter 1 % FCS in DMEM. (B) Das Gesamt-Akt-Proteinlevel zwischen den Zelllinien bleibt konstant. (C) Vergleich des PhosAkt-Proteinlevels vor (10% FCS) und nach (1% FCS) Differenzierung, keine signifikante Veränderung des Levels in beiden Zelllinien. (D) Das Gesamt-Akt-Proteinlevel bleibt bei Differenzierung konstant (E) Western Blot von PhosAkt und Akt,  $\beta$ -Actin als Ladungskontrolle, n=4-5

Wt= cerebEND; ko= cerebEND PcdhgC3 KO; 10%= 10 % FCS in DMEM; 1%= 1 % FCS in DMEM; PhosAkt= phosphoryliertes Akt

### 3.2.1.2 Zellmigration

Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens beider Zelllinien wurden wound healing assays durchgeführt. Um Veränderungen, die durch den mTOR-Signalweg beeinflusst werden, darzustellen wurden beide Zelllinien mit dem mTOR-Inhibitor Torin2 (Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 25 nM in 1 % FCS/ DMEM behandelt. Diese wurden mit Kontrollen, die die gleiche Konzentration an DMSO in DMEM erhielten, verglichen. Durch Zugabe von Torin2 reduziert sich das Wachstumsverhalten nach 48 Stunden auf den 0,77-fachen Wert in der cerebEND-Zelllinie und auf den 0,64-fachen Wert in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie.



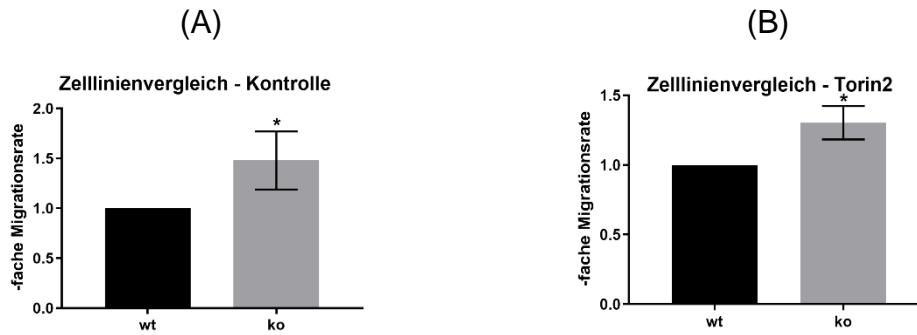
**Abbildung 11: Zellmigration mit mTOR-Inhibitor Torin2**

(A links) Die cerebEND-Zelllinie zeigt nach Inhibitorzugabe ein 0,77-faches Migrationsverhalten. (A rechts) Lichtmikroskopische Fotos mit und ohne Inhibitor („+“ und „-“) im Vergleich nach 48 Stunden, gelbe Linie zeigt Zellen bei 0 Stunden. (B links) Die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie weist eine 0,64-fache Zellmigration nach Torin2-Gabe auf. (B rechts) Vergleich mit und ohne Inhibitor nach 48 Stunden; n= 3

Wt= cerebEND; ko= cerebEND PcdhgC3 KO; -= 25 nM DMSO in 1 % FCS/ DMEM; += 25 nM Torin2 in 1 % FCS/ DMEM

Außerdem erfolgte ein Vergleich der Migrationsrate zwischen den Zelllinien, um eine etwaige Beeinflussung des cerebEND PcdhgC3 Knockouts zu untersuchen. Während die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie unter Kontrollbedingungen eine 1,49-fache Migrationsrate im Vergleich zur cerebEND Wildtyp-Zelllinie aufweist, ist sie bei Torin2-Gabe nach 48 Stunden 1,30-fach höher.





**Abbildung 12: Vergleich zwischen cerebEND und cerebEND PcdhgC3 KO mit und ohne mTOR-Inhibitor**

Unter Kontrollbedingungen (25 nM DMSO in 1 % FCS/ DMEM) zeigt die KO-Zelllinie eine auf das 1,49-fache erhöhte Migration. (B) Unter 25 nM Torin2 in 1 % FCS/ DMEM verzeichnet die KO-Zelllinie eine 1,30-fache Zellmigration.; n= 3

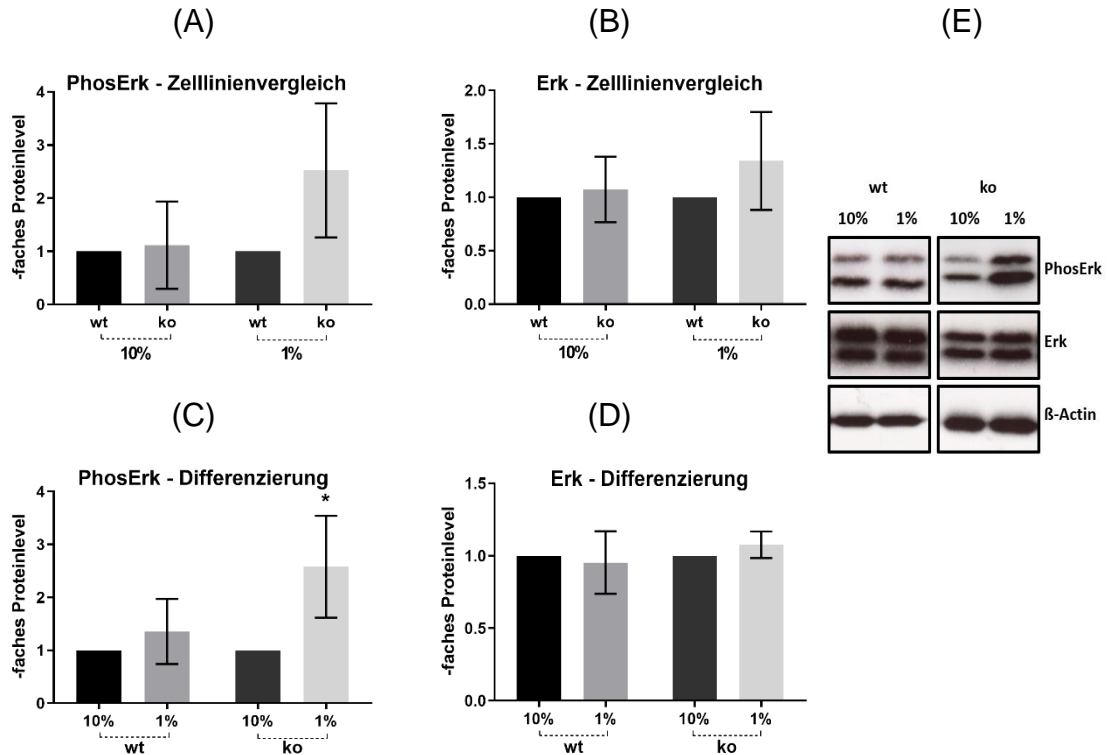
Wt= cerebEND; ko= cerebEND PcdhgC3 KO

### 3.2.2 Mitogen-activated Protein Kinase

#### 3.2.2.1 PhosErk-Proteinlevel in den Zelllinien

Zur Untersuchung des MAP-Kinase-Signalwegs beider Zelllinien auf Proteinebene wurde ein Erk1/2-Antikörper (Cell Signaling) gewählt. Ihre aktivierten Formen (PhosErk1/2) phosphorylieren vielfältige zytoplasmatische und nukleäre Zielstrukturen. In den meisten Zellen stellt Erk2 die dominierende Isoform dar. Dessen Verlust bewirkt einen größeren Abfall der Gesamt-Erk-Aktivität (Cseh et al., 2014; Saba-EI-Leil et al., 2016). Das PhosErk-Proteinlevel ist zwischen den beiden Zelllinien unter herkömmlichen Kultivierungsbedingungen mit 10 % FCS in DMEM gleich (Abbildung 13 A links). Nach Differenzierung durch Zugabe von 1 % FCS in DMEM für 24 Stunden zeichnet sich ein tendenziell erhöhtes PhosErk-Proteinlevel der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie relativ zur cerebEND-Zelllinie auf das 2,52-fache ab, welches aber nicht statistisch signifikant ist (Abbildung 13 A rechts). Um herauszufinden, inwiefern sich das PhosErk-Proteinlevel in den Zelllinien durch Differenzierung absolut verändert, wurden die Proteinlevel vor und nach Differenzierung miteinander verglichen. Nach Differenzierung der Zelllinien erhöht sich das PhosErk-Proteinlevel in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie auf

den 2,58-fachen Wert (Abbildung 13 C rechts). Die cerebEND-Zelllinie verzeichnet keine signifikante Veränderung des Proteinlevels von PhosErk durch Differenzierung (1,30-facher Wert, Abbildung 13 C links). Abbildungen 13 B und D zeigen das Gesamt-Erk-Proteinlevel, was sich bei Änderungen der aktivierten PhosErk-Form dennoch nicht verändert.



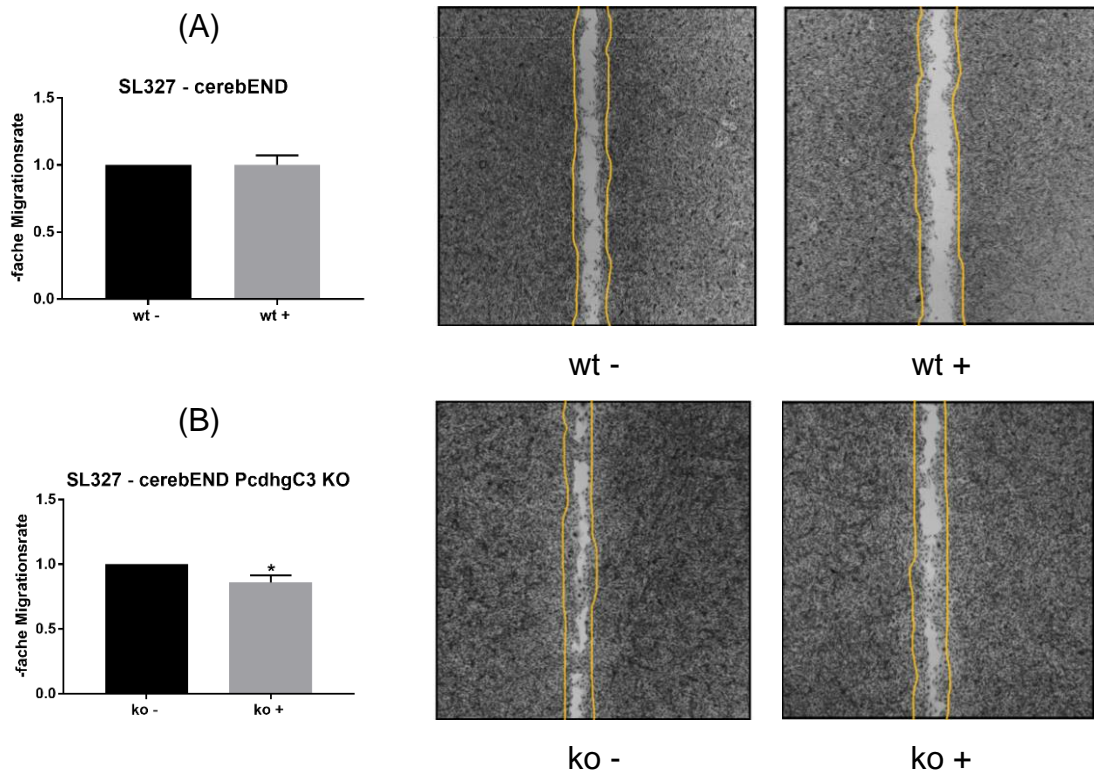
**Abbildung 13: PhosErk- und Erk-Proteinlevel**

(A) Vergleich beider Zelllinien, PhosErk-Proteinlevel unter 10 % FCS in DMEM unterscheidet sich nicht zwischen den Zelllinien, Tendenz zum erhöhten PhosErk-Proteinlevel bei cerebEND PcdhgC3 KO nach Differenzierung (1% FCS) auf das 2,52-fache. (B) Das Gesamt-Erk-Proteinlevel zwischen den Zelllinien bleibt konstant (C) Vergleich des PhosErk-Proteinlevels vor (10% FCS) und nach (1% FCS) Differenzierung, keine Veränderung des Levels in der cerebEND-Zelllinie, das PhosErk-Proteinlevel steigt bei cerebEND PcdhgC3 KO auf den 2,58-fachen Wert. (D) Das Gesamt-Erk-Proteinlevel bleibt bei Differenzierung konstant (E) Western Blot von PhosErk und Erk, β-Actin als Ladungskontrolle, n=4-5

Wt= cerebEND; ko= cerebEND PcdhgC3 KO; 10%= 10 % FCS in DMEM; 1%= 1 % FCS in DMEM; PhosErk= phosphoryliertes Erk

### 3.2.2.2 Zellmigration

Die wound healing assays dienen der Untersuchung des Wachstumsverhaltens verschiedener Zellen. Beide Zelllinien wurden mit dem Mek1/2 Inhibitor SL327 (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 200 nM in 1 % FCS/ DMEM behandelt. Als Teil des MAP-Kinase-Signalwegs phosphoryliert und aktiviert Mek Erk1/2 (Steelman et al., 2011). Im wound healing assay verzeichnet die cerebEND-Zelllinie nach Inhibitorzugabe keine signifikant veränderte Zellmigration im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrolllinie. Die Migrationsrate bei der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie reduziert sich bei Inhibitorzugabe nach 48 Stunden auf den 0,86-fachen Wert.

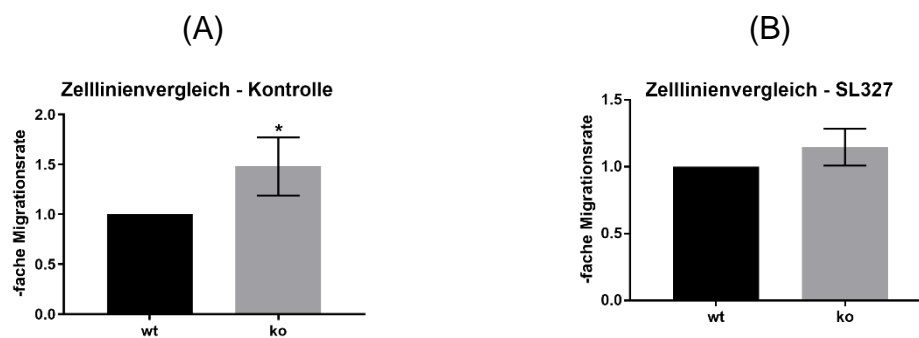


**Abbildung 14: Zellmigration mit MAPK-Inhibitor SL327**

(A links) Die cerebEND-Zelllinie zeigt nach Inhibitorzugabe keine Veränderung im Migrationsverhalten. (A rechts) Lichtmikroskopische Fotos mit und ohne Inhibitor („+“ und „-“) im Vergleich nach 48h, gelbe Linie zeigt Zellen bei 0 Stunden. (B links) Die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie zeigt eine 0,86-fache Zellmigration nach SLC327-Gabe auf. (B rechts) Vergleich mit und ohne Inhibitor nach 48 Stunden. n= 3

Wt= cerebEND; ko= cerebEND PcdhgC3 KO; -= 200 nM DMSO in 1 % FCS/ DMEM; += 200 nM SL327 in 1 % FCS/ DMEM

Beim Vergleich der Zelllinien untereinander weist die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie eine relative Erhöhung der Migration auf das 1,49-fache unter Kontrollbedingungen ohne Inhibitorzugabe im Vergleich zur Wildtyp Zelllinie auf. Bei SL327-Gabe reduziert sich die Migrationsrate der Knockout-Zelllinie auf einen 1,10-fachen Wert relativ zur cerebEND Wildtyp-Zelllinie, welcher keine statistische Signifikanz erreicht (Vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Vergleich zwischen cerebEND und cerebEND PcdhgC3 KO mit und ohne MAPK-Inhibitor**

(A) Unter Kontrollbedingungen (200 nM DMSO in 1 % FCS/ DMEM) zeigt die KO-Zelllinie eine auf das 1,49-fache erhöhte Migration (B) Unter 200 nM SL327 in 1 % FCS/ DMEM verzeichnet die KO-Zelllinie eine 1,10-fache Zellmigration (nicht signifikant); n= 3

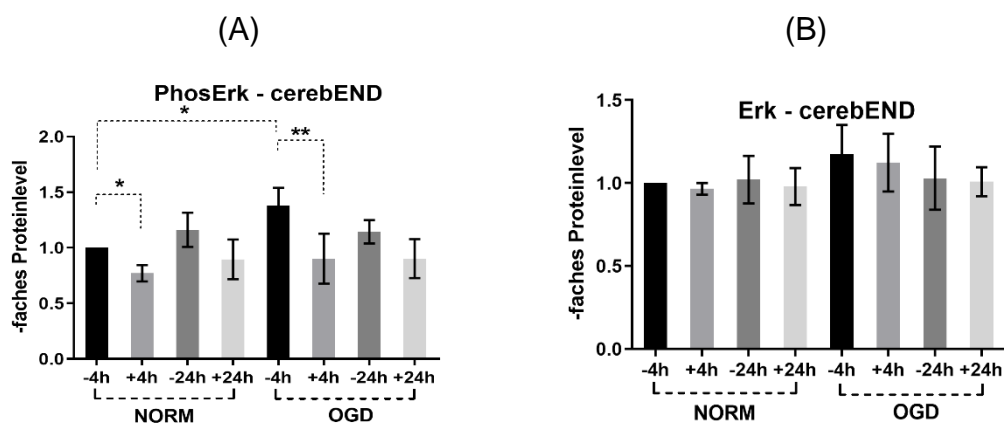
Wt= cerebEND ko= cerebEND PcdhgC3 KO

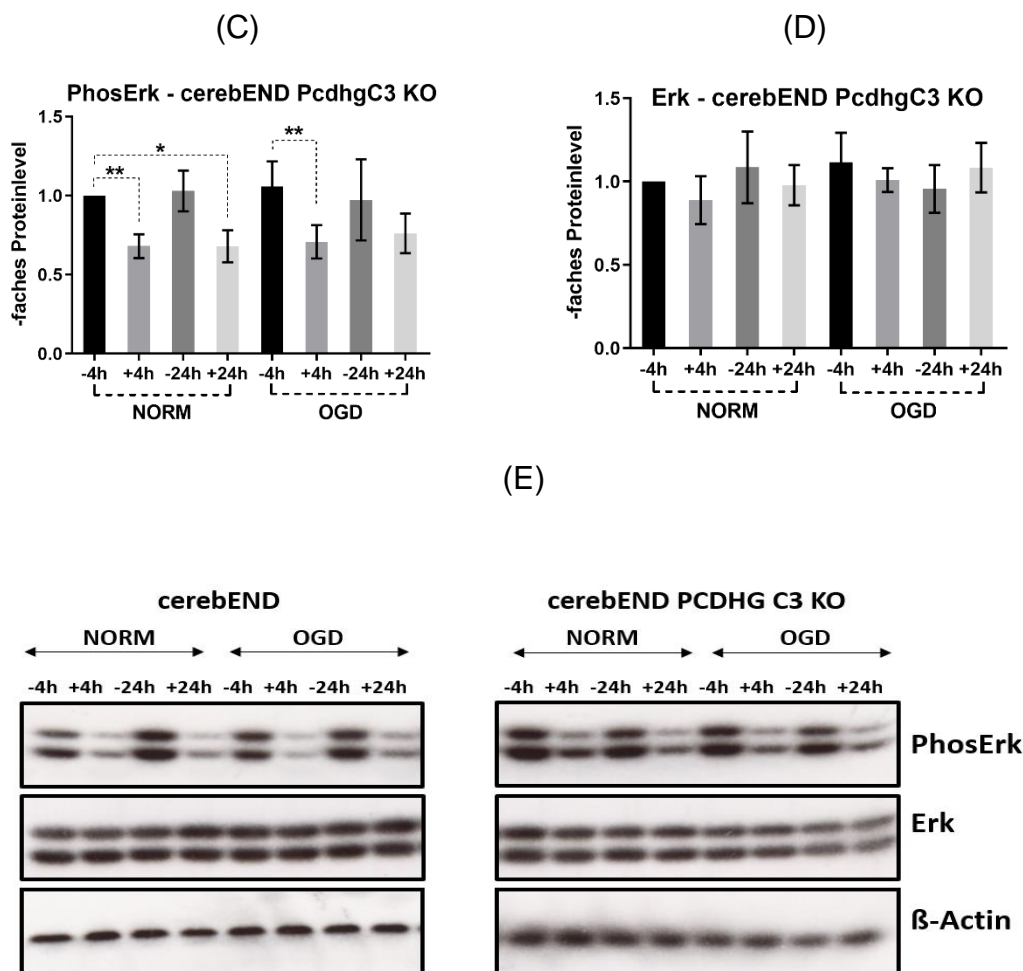
### 3.2.2.3 Oxygen Glucose Deprivation-Versuche

Der MAPK-Signalweg ist mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert, so kommt ihm durch Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren eine Bedeutung bei der Größe des Schlaganfallvolumens zu. Durch Inhibierung von Mek1/2 konnte in Tiermodellen eine Reduktion der Hirnschädigung erreicht werden (Maddahi, 2010; Gladbach et al., 2014). Zur Untersuchung des MAPK-Signalwegs in den cerebEND-Zellen und in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie wurden OGD-Versuche durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Mek1/2-Inhibitor SL327 behandelt und anschließend das PhosErk-Proteinlevel nach vier Stunden und 24

Stunden betrachtet. Dieser Versuch wurde unter Normoxie- sowie OGD-Bedingungen durchgeführt.

In der cerebEND-Zelllinie zeigt sich durch Mek-Inhibitorzugabe eine Reduktion des PhosErk-Proteinlevels sowohl unter Normoxie- (0,77-fach) als auch unter OGD-Bedingungen (0,90-fach) nach vier Stunden (Abbildung 16 A). Nach 24 Stunden ist ein erniedrigter Trend des PhosErk-Proteinlevels erkennbar, welcher jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Das PhosErk-Level ist nach vier Stunden OGD im Vergleich zur Normoxie auf den 1,38-fachen Wert erhöht. Nach 24 Stunden gleichen sich die Proteinlevel in Normoxie und OGD. Abbildung 16 B zeigt die Erk-Proteinlevel, welche während der Versuche konstant bleiben. Die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie zeigt ebenfalls durch Inhibitorzugabe nach vier Stunden in Normoxie und OGD ein verringertes Proteinlevel (0,68-fach bzw. 0,71-fach). Zusätzlich zeigt sich eine signifikante Reduktion des PhosErk-Proteinlevels 24 Stunden nach Mek-Inhibitorzugabe unter Normoxiebedingungen auf den 0,68-fachen Wert. Unter OGD-Bedingungen und Inhibitorzugabe zeichnet sich ein reduzierter Trend ab (0,76-fach). Das PhosErk-Proteinlevel nach vier Stunden ohne Inhibitorzugabe ist zwischen NORM und OGD im Gegensatz zur Wildtyp-Zelllinie nicht verändert. Abbildung 16 B zeigt die unveränderten Erk-Proteinlevel.





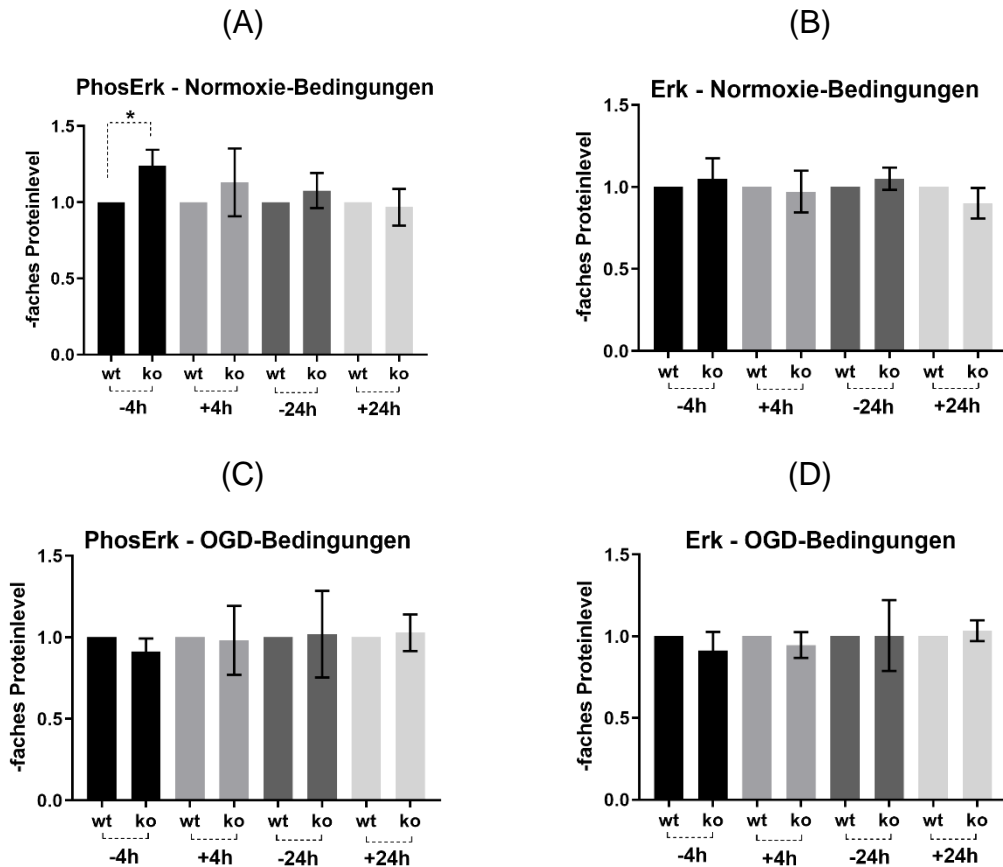
**Abbildung 16: PhosErk- und Erk-Proteinlevel in cerebEND und cerebEND PcdhgC3 KO Zellen unter Normoxie-(NORM) und OGD-Bedingungen und unter Mek1/2-Inhibitorzugabe**

(A) Die cerebEND-Zellen zeigen unter NORM- und OGD-Bedingungen eine Reduktion des Proteinlevels (0,77-fach bzw. 0,90-fach) bei 4 Stunden nach Inhibitorzugabe. (+4h). Das Level ist bei 4 Stunden ohne Inhibitorzugabe (-4h) unter OGD-Bedingungen erhöht (1,38-fach). (B) konstantes Erk-Proteinlevel in allen Versuchsteilen (C) Das PhosErk-Proteinlevel in den cerebEND PcdhgC3 KO-Zellen ist in NORM und OGD durch SL327-Gabe verringert nach 4 Stunden. (0,68-fach bzw. 0,71-fach) verringert (+4h) sowie nach 24 Stunden unter Normoxiebedingungen auf das 0,68-fache (+24h). (D) Das Erk-Proteinlevel bleibt gleich. (E) Western Blot von cerebEND und cerebEND PcdhgC3 KO der Phos-Erk und Erk-Proteinlevel,  $\beta$ -Actin als Ladungskontrolle, n=5

-4h/-24h= Kontrolle mit 200 nM DMSO nach 4 Stunden/ 24 Stunden; +4h/24= Behandlung mit 200 nM SL327 nach 4 Stunden/ nach 24 Stunden; PhosErk= phosphoryliertes Erk

Beim Vergleich der Zelllinien untereinander ist das PhosErk-Proteinlevel unter Normoxiebedingungen nach vier Stunden ohne Inhibitorzugabe in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie auf das 1,24-fache erhöht. Nach 24 Stunden

ist keine signifikante Erhöhung des PhosErk-Level mehr feststellbar. Nach SL327-Zugabe unterscheidet sich PhosErk auf Proteinebene zwischen den Zelllinien nicht, weder nach vier noch nach 24 Stunden (Vgl. Abbildung 17).



**Abbildung 17: PhosErk- und Erk-Proteinlevel zwischen den Zelllinien**

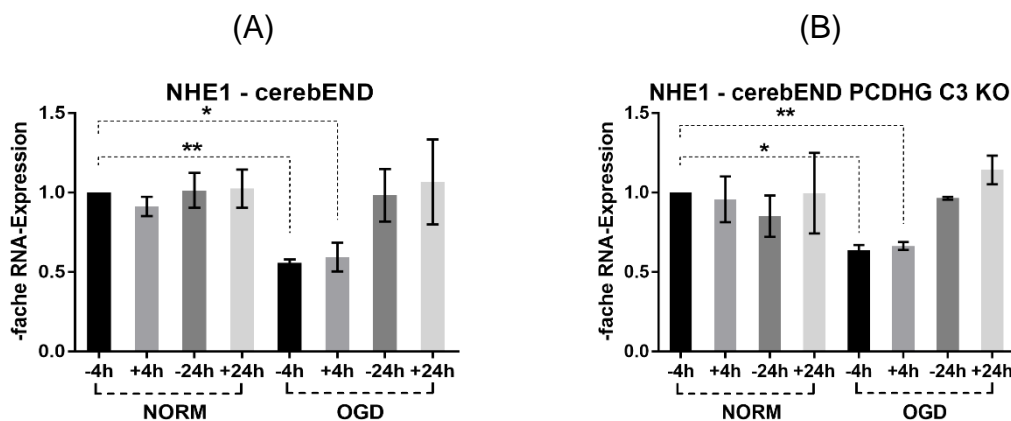
(A) Unter Normoxie-Bedingungen nach 4 Stunden ohne Inhibitorzugabe erhöht sich PhosErk in der Knockout Zelllinie auf das 1,24-fache. (B) Erk bleibt zwischen den Zelllinien konstant. (C) Unter OGD-Bedingungen keine signifikanten Veränderungen des PhosErk-Proteinlevels zwischen den Zelllinien. (D) konstante Erk-Proteinlevel;  $\beta$ -Actin als Ladungskontrolle, n=5

Wt= cerebEND ko= cerebEND PcdhgC3 KO; -4h/-24h= Kontrolle mit 200 nM DMSO nach 4 Stunden/ 24 Stunden; +4h/24= Behandlung mit 200 nM SL327 nach 4 Stunden/ nach 24 Stunden

Ein Target des MAPK-Signalwegs ist NHE1, dessen Rolle in Rahmen neuronaler Schädigung kontrovers diskutiert wird. NHE1 könnte bei ischämischen und hypoglykämischen Ereignissen über MAPK-Aktivierung zur Zellschwellung und

neuronaler Schädigung beitragen (Luo et al., 2007; Yuen et al., 2014). Eine Herunterregulierung durch Hypoxie ist ebenso beschrieben (Pedersen et al., 2017). Zur Untersuchung der NHE1-Aktivität in den cerebEND-Zellen wurden OGD Behandlungen durchgeführt. Nach vier Stunden Inkubation unter OGD-Verhältnissen wurde eine 20 stündige Reoxygenierung durchgeführt.

Unter Normoxiebedingungen zeigen beide Zelllinien im zeitlichen Verlauf zwischen vier und 24 Stunden keine Veränderung in der Genexpression auf mRNA-Ebene (Abbildung 18 A und B). Durch Zugabe des Mek1/2 Inhibitors wird ebenfalls kein Effekt auf die NHE1-Expression erzielt. Im Vergleich zur Normoxie sinkt die NHE1-Expression auf mRNA-Ebene unter OGD-Bedingungen nach vier Stunden in der cerebEND-Zelllinie, sowohl ohne Inhibitorzugabe (auf den 0,56-fachen Wert) als auch mit SI327 (0,59-fach). Durch Reoxygenierung steigt die Expression auf das Level unter Normoxiebedingungen. Die Knockout Zelllinie verhält sich unter OGD-Bedingungen ähnlich und verzeichnet eine verminderte NHE1-Expression nach vier Stunden auf den 0,64-fachen Wert ohne Behandlung mit SL327 und auf den 0,66-fachen Wert bei Inhibitorzugabe. Nach erfolgter Reoxygenierung steigen die NHE1-Expressionsraten auf mRNA-Ebene auf unter Normoxiebedingungen.



**Abbildung 18: Vergleich der NHE1-RNA-Expression zwischen Normoxie (NORM)- und OGD-Bedingungen**

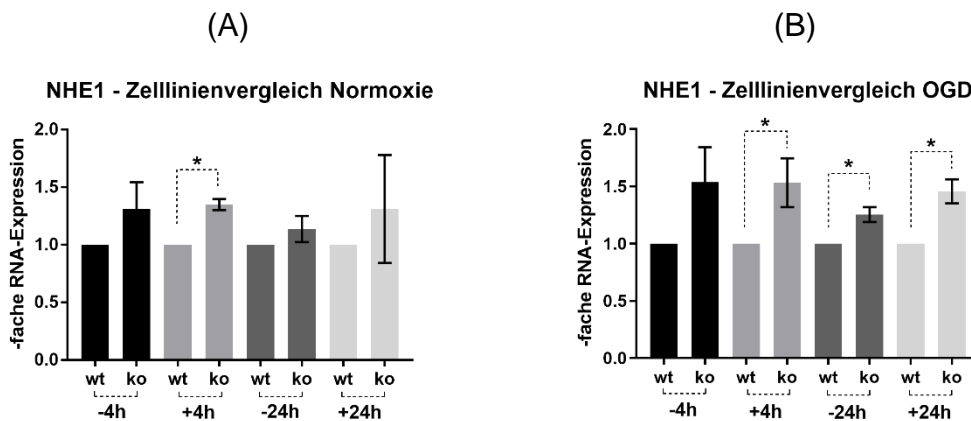
(A) Bei der cerebEND-Zelllinie verringerte Expression unter OGD-Bedingungen auf den 0,56-fachen Wert (-4h) bzw. auf den 0,59-fachen Wert (+4h), durch 20 Stunden Reoxygenierung zeigt NHE1 eine ähnliche Expression (B) In cerebEND PcdhgC3 KO-



Zelllinie verminderte Expression unter OGD-Bedingungen auf das 0,64-fache bei -4h bzw. 0,66-fache bei +4h. Durch Reoxygenierung ähnliche Expression wie unter Normoxiebedingungen.; Canx als Negativkontrolle, n=3

4h/-24h= Kontrolle mit 200 nM DMSO nach 4 Stunden/ 24 Stunden; +4h/24= Behandlung mit 200 nM SL327 nach 4 Stunden/ nach 24 Stunden

Beim Vergleich der NHE1-Expression zwischen den Zelllinien zeichnet sich unter Normoxiebedingungen eine leicht erhöhte Expression in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie ab, die aber nur vier Stunden nach Mek1/2-Inhibitorzugabe statistisch signifikant ist (1,35-facher Wert). Unter OGD-Bedingungen findet sich signifikant erhöhte mRNA-Raten vier Stunden nach Inhibitorzugabe (1,53-fach), 24 Stunden nach Inhibitorzugabe (1,48-fach) und 24 Stunden ohne Zugabe von SL327 (1,25-fach).



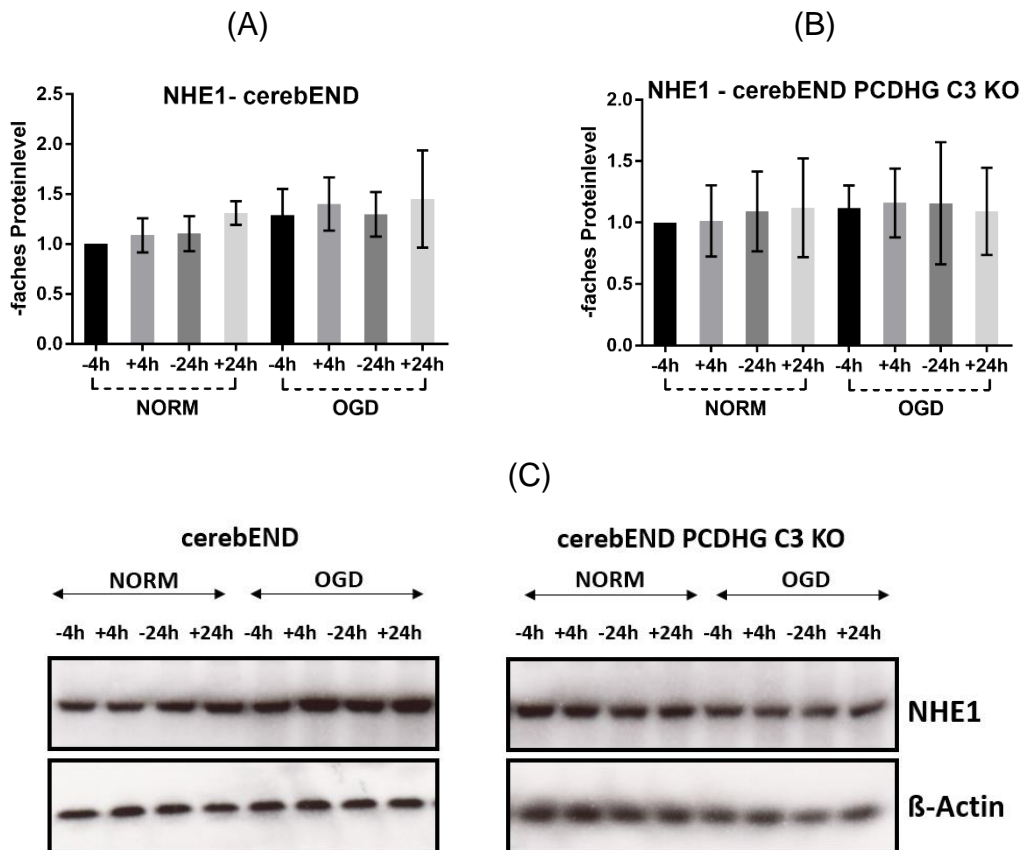
**Abbildung 19: Vergleich der NHE1-RNA-Expression zwischen cerebEND (wt) und cerebEND PcdhgC3 KO (ko)**

(A) Unter Normoxie-Bedingungen erhöhter Trend bei -4h bzw. -24h, Erhöhung auf das 1,35-fache bei +4h. (B) Unter OGD-Bedingungen signifikant erhöhte mRNA-Expression auf das 1,53-fache nach +4h, auf das 1,25-fache nach -24h und auf das 1,46-fache nach +24h.; Calnexin als Negativkontrolle, n=3

Wt= cerebEND ko= cerebEND PcdhgC3 KO; -4h/-24h= Kontrolle mit 200 nM DMSO nach 4 Stunden/ 24 Stunden; +4h/24= Behandlung mit 200 nM SL327 nach 4 Stunden/ nach 24 Stunden

Im Anschluss wurde das NHE1-Proteinlevel im Western Blot untersucht. Unter Normoxiebedingungen kann in beiden Zelllinien keine Veränderung von NHE1

zwischen vier und 24 Stunden festgestellt werden. Ebenso verändert sich das Proteinlevel durch Zugabe des Mek1/2-Inhibitors nicht. Die auf mRNA-Ebene verzeichnete verminderte NHE1-Expression unter OGD-Bedingungen bei vier Stunden kann auf Proteinebene nicht gezeigt werden, sondern bleibt in beiden Zelllinien konstant.

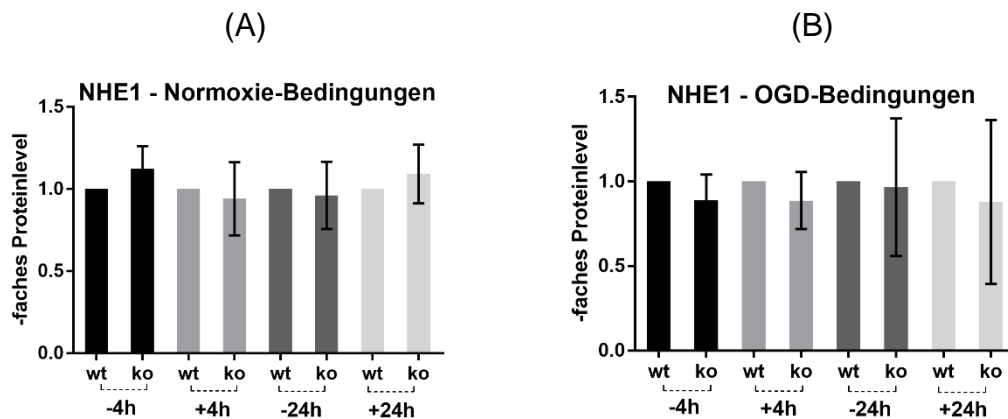


**Abbildung 20: Vergleich des NHE1-Proteinlevels**

(A und B) keine Veränderung unter NORM- und OGD-Bedingungen zwischen 4 und 24 Stunden sowie durch Mek1/2-Inhibitorzugabe (C) Western Blot;  $\beta$ -Actin als Ladungskontrolle, n=4

-4h/-24h= Kontrolle mit 200 nM DMSO nach 4 Stunden/ 24 Stunden; +4h/24= Behandlung mit 200 nM SL327 nach 4 Stunden/ nach 24 Stunden

Zwischen den Zelllinien zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im NHE1-Proteinlevel, sowohl unter Normoxie- als auch unter OGD-Bedingungen.



**Abbildung 21: NHE1-Proteinlevel zwischen den Zelllinien**

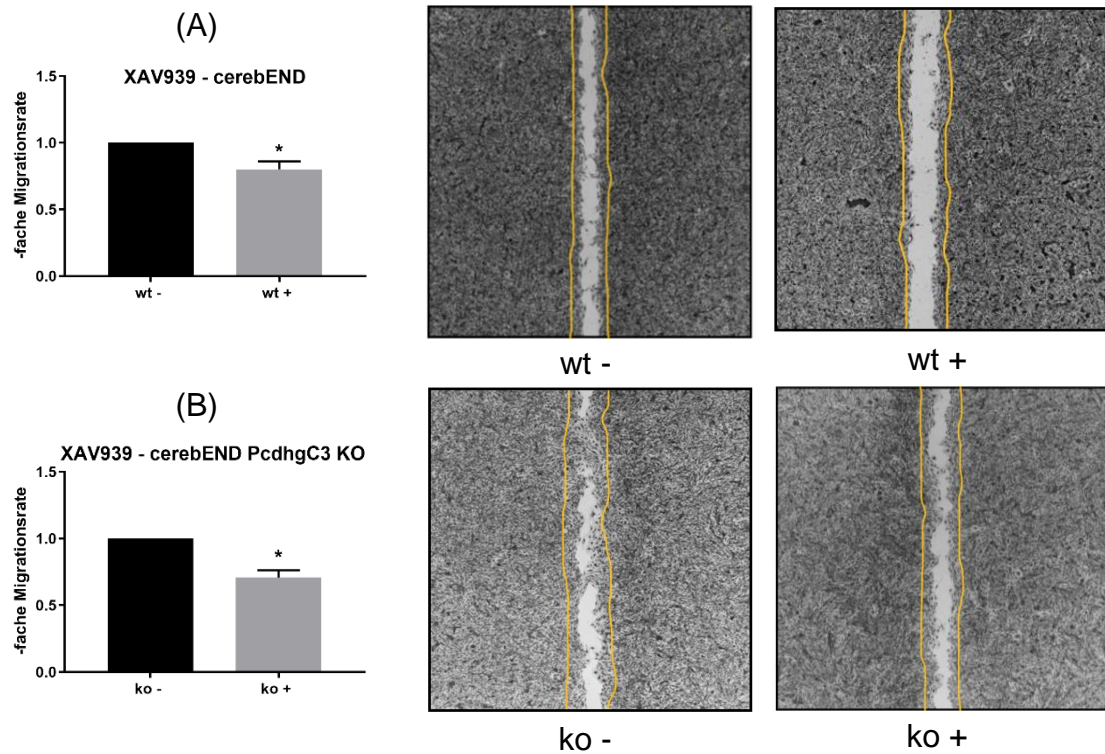
(A und B) keine Unterschiede zwischen cerebEND (wt) und cerebEND PcdhgC3 KO (ko);  $\beta$ -Actin als Ladungskontrolle, n=5

Wt= cerebEND ko= cerebEND PcdhgC3 KO; -4h/-24h= Kontrolle mit 200 nM DMSO nach 4 Stunden/ 24 Stunden; +4h/24= Behandlung mit 200 nM SL327 nach 4 Stunden/ nach 24 Stunden

### 3.2.3 Wnt-Signalweg

#### 3.2.3.1 Zellmigration

Die Zelllinien wurden mit XAV939 (Sigma-Aldrich), einem Inhibitor des  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalwegs, in einer Endkonzentration von 20  $\mu$ M behandelt. Die cerebEND-Zelllinie zeigt im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrolllinie eine statistisch signifikante Reduktion der Migration auf das 0,80-fache (Vgl. Abbildung 22). Die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie verzeichnet eine reduzierte Migrationsrate durch Inhibitorzugabe auf den 0,70-fachen Wert nach 48 Stunden.

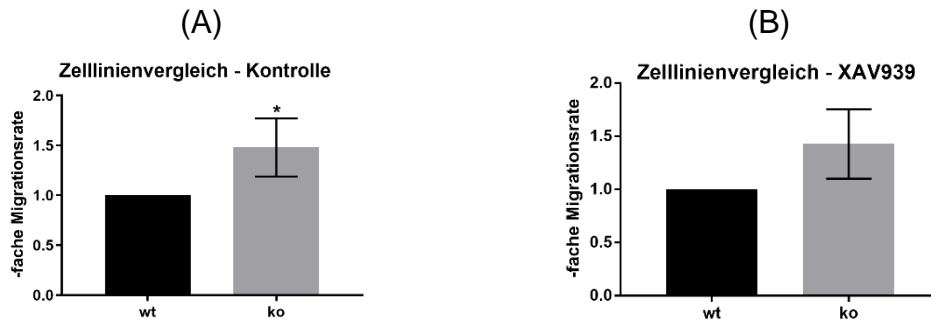


**Abbildung 22: Zellmigration mit Wnt-Inhibitor XAV939**

(A links) Die cerebEND-Zelllinie zeigt nach Inhibitorzugabe eine Reduktion des Wachstumsverhaltens auf das 0,80-fache. (A rechts) Lichtmikroskopische Fotos mit und ohne Inhibitor („+“ und „-“) im Vergleich nach 48 Stunden, gelbe Linie zeigt Zellen bei 0 Stunden. (B links) Die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie zeigt eine 0,70-fache Zellmigration nach XAV939-Gabe auf. (B rechts) Vergleich mit und ohne Inhibitor („+“ und „-“) nach 48 Stunden. n= 3

Wt= cerebEND; ko= cerebEND; cerebEND PcdhgC3 KO; -= 20 µM DMSO in 1 % FCS/ DMEM; += 20 µM XAV939 in 1 % FCS/ DMEM

Während die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie unter Kontrollbedingungen eine 1,49-fache Migrationsrate im Vergleich zur cerebEND Wildtyp-Zelllinie aufweist, beträgt die Zellmigration in der KO-Zelllinie nach Wnt-Inhibitorgabe das 1,42-fache, was jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (Vgl. Abbildung 23).



**Abbildung 23: Vergleich zwischen cerebEND und cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie mit und ohne Wnt-Inhibitor**

(A) Unter Kontrollbedingungen (20  $\mu$ M DMSO) zeigt die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie eine auf das 1,49-fache erhöhte Migration. (B) Unter 20  $\mu$ M XAV939-Gabe 1,42-fache (nicht statistisch signifikant) Zellmigration bei der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie; n= 3

Wt= cerebEND ko= cerebEND PcdhgC3 KO

## 4 Diskussion

### 4.1 Transporter

Die Therapie von Erkrankungen des ZNS stellt aufgrund der hohen Barriereigenschaften der BHS eine besondere Herausforderung in der Medizin dar. Transporter, welche physiologischerweise Stoffe durch die BHS ins ZNS transportieren, sind integraler Bestandteil der Forschung zur Behandlung neuronaler Erkrankungen (Lajoie, 2015).

Fettlösliche Stoffe können über verschiedene Transportmoleküle das Gehirn erreichen. Eine Möglichkeit zum Passieren der BHS ist die Kopplung von Therapeutika an diese liposomalen Stoffe. Das Nutzen von Transferrin-Rezeptoren ist eine weit untersuchte Therapieoption (Johnsen, 2016). So konnten im Mausmodell bereits erfolgreich Transferrin-Rezeptor-Antikörper bei Morbus Parkinson oder Alzheimer Demenz eingesetzt werden. Auch bei Gliomen können Medikamente durch Transferrin-Rezeptoren die BHS passieren (Lajoie, 2015; Wang et al., 2015). Der Knockout von PcdhgC3 führt zu einem 1,32-höheren Transferrin-Proteinlevel. So könnte PcdhgC3 allenfalls moderate Effekte auf den Stofftransport über Transferrin-Rezeptoren haben.

Lrp1 (low density lipoprotein receptor-related protein) ist ein Transmembranprotein, welches an der BHS hoch exprimiert ist. Es besitzt eine hohe Endozytoserate seiner Substrate und bildet das Ziel antitumoröser Therapie von primären und sekundären Hirntumoren. Zytostatika wie Paclitaxel werden mit Angiopep-2, dem bekanntesten Liganden von Lrp1, konjugiert und gelangen dadurch über die BHS (Thomas et al., 2009; Wang et al., 2015). Das Proteinlevel von Lrp1 ist in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie deutlich auf das 5,19-fache erhöht. So könnte das Ausschalten von PcdhgC3 eine Zunahme des Transports mittels Lrp1 bewirken und so vom therapeutischen Interesse sein.

RAGE spielt in vielen chronischen Erkrankungen eine Rolle. Dessen Liganden, advanced glycation end products, sind altersabhängig glykierte und geschädigte Proteine, die akkumulieren und bei degenerativen Erkrankungen (z.B. Alzheimer Demenz, Arteriosklerose) eine Rolle spielen. Demzufolge stellen Möglichkeiten

zur Inhibierung des RAGE vermittelten Transportes eine große klinische Herausforderung dar (Rojas et al., 2018). Durch Knockout von PcdhgC3 findet lediglich eine geringe Erhöhung des RAGE-Proteinlevels statt, womit wahrscheinlich von keiner klinisch relevanten Beeinflussung des durch RAGE vermittelten Transportes auszugehen ist.

Mittels Carrier gelangen kleine hydrophile Moleküle wie Aminosäuren und Glucose sowie kleinmolekulare Medikamente konzentrationsabhängig ins ZNS. Aus der Familie der GLUT-Transporter sind vor allem GLUT-1 und GLUT-3 für den Transport von Glucose in das Gehirn verantwortlich. Während GLUT-3 in Neuronen lokalisiert ist, befindet sich GLUT-1 in Kapillarendothelzellen der BHS und in Gliazellen (Simpson et al., 2007; Johnsen, 2016). In OGD Versuchen erhöht sich die Glucoseaufnahme über GLUT1 in murinen Kapillarendothelzellen der BHS deutlich, was möglicherweise durch den erhöhten Energiebedarf der Zellen unter Hypoxiebedingungen zu erklären ist. Da GLUT1 neben Glucose auch Wasser ins ZNS transportiert, könnte es so zur Ödembildung bei ischämischen Ereignissen beitragen (Vemula et al., 2009; Neuhaus et al., 2012; Stokum et al., 2016). Durch den Knockout von PcdhgC3 erhöht sich das GLUT-1-Proteinlevel, was zur einem höheren Glucosetransport ins ZNS führen könnte. Dies könnte einerseits unter Hypoxiebedingungen zur Sicherung des Energiebedarfs vitaler Zellen beitragen aber als Nebeneffekt durch den zusätzlichen Wassereinstrom ein Hirnödem begünstigen.

Efflux-Pumpen wie Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) und Multidrug Resistance Proteins (MRP) können kleine liposomale Moleküle, die passiv durch das Kapillarendothel diffundiert sind, wieder aktiv zurückpumpen (Lajoie und Shusta, 2015). Sie schützen natürlicherweise Körperkompartimente vor schädlichen Stoffen. Pharmakologische Stoffe, die Liganden für BCRP oder MRP bilden, gelangen jedoch unzureichend an ihren Wirkort. So sind Zytostatika wie Doxorubicin und Mitoxantron Substrate von BCRP und können durch den aktiven Efflux schlechter akkumulieren (Sanchez-Covarrubias et al., 2014; Goncalves et al., 2018). Durch Knockout von PcdhgC3 sinkt das BCRP-Proteinlevel. So könnte dieser Schutzmechanismus des ZNS durch Fehlen von PcdhgC3 herunterreguliert sein. Die MRP Isoformen besitzen die Fähigkeit, verschiedene

Toxine, Karzinogene aber auch anionische Medikamente zu transportieren, beispielsweise Methotrexat (Sanchez-Covarrubias et al., 2014). Sowohl die MRP1- als auch MRP4-Proteinlevel werden nicht durch Knockout von PcdhgC3 beeinflusst.

## **4.2 Mammalian Target of Rapamycin-Signalweg**

Der mTOR-Signalweg wird mit vielfältigen Erkrankungen assoziiert, etwa mit Krebs, Diabetes mellitus oder neurodegenerativen Prozessen (Dazert, 2011). Im Rahmen des kolorektalen Carcinoms, bei dem es Veränderungen des Wnt- und mTOR-Signalwegs kommt, wird PcdhgC3 eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben (Dallosso et al., 2012).

Zur Untersuchung des mTOR-Signalwegs in Endothelzellen der BHS wurde die aktivierte Form von Akt, PhosAkt, in den Zelllinien untersucht. Über mehrere Phosphorylierungen führt Akt zur Aktivierung von mTOR (Dazert, 2011). Unter normalen Kultivierungsbedingungen mit 10 % FCS in DMEM unterscheiden sich die Proteinlevel in cerebEND- und cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinien nicht, durch Knockout von PcdhgC3 findet anscheinend keine Aktivierung von Akt statt. Auch nach Differenzierung der Zellen, dem Entzug von Wachstumsfaktoren und Hormonen, unterscheidet sich das relative PhosAkt-Proteinlevel zwischen den Zelllinien nicht. Dallosso et al. 2012 beschreiben eine Hemmung des mTOR-Signalwegs in kolorektalen Karzinomzellen durch Überexpression von PcdhgC3, allerdings findet sich keine Erniedrigung auf PhosAkt-Ebene. Diese Beobachtungen können bestätigt werden; durch den Knockout von PcdhgC3 in murinen Endothelzellen scheint PhosAkt auf Proteinebene unberührt. So könnte PcdhgC3 den mTOR-Signalweg beeinflussen, jedoch scheint dieser Effekt den downstream Targets von Akt zu gelten.

Wound healing assays können Aufschluss über das Migrationsverhalten von Zelllinien geben. Durch Zugabe von Substanzen wie Signalweginhibitoren können Erkenntnisse über die Rolle verschiedener Signalwege während der Zellmigration in den untersuchten Zelllinien gewonnen werden. In den durchgeführten Experimenten zeigt die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie ohne Zugabe eines Signalweg-Inhibitors nach 48 Stunden im Vergleich zur Wildtyp-



Zelllinie eine schnellere Migration. Durch den Verlust von PcdhgC3 scheinen die cerebEND-Zellen schneller zu proliferieren. Zur Untersuchung des Einflusses von mTOR wurde die Zellmigration nach 48 Stunden unter Zugabe des mTOR-Inhibitors Torin2 untersucht. Auch hierbei ist das Wachstum in der Knockout-Zelllinie relativ im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie erhöht, allerdings weniger stark als unter Kontrollbedingungen ohne Inhibitorzugabe. So scheint der mTOR-Signalweg die erhöhte Zellmigration der KO-Zelllinie zusätzlich zu beeinflussen. Beim Vergleich des Migrationsverhaltens beider Zelllinien mit und ohne Inhibitorzugabe verzeichnen beiden Zelllinien ein verringertes Wachstum 48 Stunden nach Inhibitorzugabe, wobei die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie stärker reduzierte Migrationsraten aufweist. Durch Zugabe des mTOR-Inhibitors könnten beide Zelllinien weniger Wachstumssignale erhalten, weswegen sich ihre Migrationsraten verringern. Jedoch könnte die KO-Zelllinie stärker durch den mTOR-Signalweg beeinflusst werden, weswegen sich ihre Migrationsrate durch Torin2 stärker verringert. Folglich scheint der mTOR-Signalweg in den KO-Zellen von größerer Bedeutung sein und PcdhgC3 möglicherweise einen schützenden Effekt auf die mTOR begünstigte Zellmigration haben.

Tumorzellen besitzen die Fähigkeit zur unkontrollierten Proliferation und reduzierten Apoptoserate begleitet von veränderter Nährstoffaufnahme und Energiemetabolismus. Der mTOR-Signalweg kontrolliert diese Prozesse und trägt somit zum Tumorprogress bei. Die Inhibierung mTORs wird bereits pharmakologisch durch den Einsatz von Rapamycin genutzt (Steelman et al., 2011; Li et al., 2014). Dalosso et al. beschreiben eine Herunterregulierung von mTOR in Kolon-Karzinomzellen durch Überexpression von PcdhgC3 und schlussfolgern, dass PcdhgC3 tumorsuppressive Eigenschaften haben könnte. Die in den Experimenten gezeigte stärkere Verringerung der Migrationsrate in der PcdhgC3 KO-Zelllinie bei mTOR-Inhibitorzugabe im Vergleich mit der Wildtyp-Zelllinie bestätigt einen Zusammenhang zwischen PcdhgC3-Expression und mTOR-bedingter Migration und unterstützt die Vermutung der PcdhgC3-Hemmung auf den mTOR-Pathway und antiproliferativer Effekte bei Überexpression. Zudem ist die durch mTOR-begünstigte abnormale Proliferation endothelialer Zellen bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) und in infantilen

Hämangiomen beschrieben. Die Hemmung des mTOR-Signalwegs mittels Inhibitoren wie Sirolimus oder Everolimus findet bei der Behandlung der KHK mittels Drug-eluting Stents breite klinische Anwendung und stellt bei der Behandlung infantiler Hämangiome eine mögliche Therapieoption dar (Wang et al., 2017; Harari et al., 2018). In den cerebEND- und cerebEND PcdhgC3 KO-Zellen bestätigt sich der durch mTOR-bedingte positive Proliferationseinfluss in Endothelzellen durch reduzierte Migrationsraten in den zerebralen Zelllinien nach mTOR Inhibitorzugabe. Die in der cerebEND PcdhgC3 Knockout-Zelllinie im Vergleich zur cerebEND Wildtyp-Zelllinie erhöhte Zellmigration könnte auch in anderen Endothelzellen von Bedeutung sein und so PcdhgC3 diese endotheliale Proliferation beeinflussen.

### **4.3 Mitogen-activated Protein Kinase-Signalweg**

Neuronale Krankheitsbilder wie Schlaganfall oder Demenzen zeichnen sich durch eine Beeinträchtigung der BHS aus. Diese Störung der BHS wird unter anderem mit dem MAPK-Signalweg in Verbindung gebracht, welcher durch Aktivierung proinflammatorischer Stoffe zur Funktionsminderung der BHS führt und folglich zur Größe des Infarktolumens beiträgt (Maddahi, 2010; Zhu et al., 2018). Andere PCDHs werden über Stimulierung des MAPK-Signalwegs mit schlechteren klinischen Outcome bei Patienten mit NSCLC in Verbindung gebracht (Zhou et al., 2017). Zur Rolle von PcdhgC3 im MAPK-Signalweg gibt es noch keine hinreichenden Untersuchungen.

Als Bestandteil der MAPK-Signalkaskade wurde die PhosErk-Aktivität beider Zelllinien verglichen. Unter normalen Kultivierungsbedingungen mit 10 % FCS in DMEM zeigen sich in beiden Zelllinien ähnliche PhosErk-Proteinlevel. Durch die Differenzierung der Zelllinien, dem Entzug von Wachstumsfaktoren und Hormonen durch Verwendung von 1 % FCS in DMEM, erhöht sich das PhosErk-Proteinlevel in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie, die Wildtyp-Zelllinie verzeichnet keine signifikante Veränderung des PhosErk-Proteinlevels. Das Gesamt-Erk-Proteinlevel in beiden Zelllinien bleibt gleich. So scheint in der cerebEND Wildtyp-Zelllinie durch veränderte Wachstumsbedingungen eine

erhöhte Aktivierung des MAPK-Signalwegs auf Erk1/2 Ebene keine Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu könnte der Verlust von PcdhgC3 auf einer erhöhten MAPK-Aktivität bei veränderten Wachstumsfaktoren hindeuten und ein Hinweis auf eine erhöhte Anfälligkeit der Zellen auf den Entzug von Wachstumsfaktoren durch den Knockout von PcdhgC3 sein. Anders herum könnte PcdhgC3 vor übermäßiger MAPK-Aktivierung schützen, wie es in den Wildtyp Zellen scheint.

Im wound healing assay wurden Veränderungen der Zellmigration beider Zelllinien durch Hinzugabe eines Mek-Inhibitors getestet. Im MAPK-Signalweg aktiviert Mek über Phosphorylierung Erk (Steelman et al., 2011). Die cerebEND Wildtyp-Zelllinie zeigt durch Inhibitorzugabe nach 48 Stunden keine Veränderungen im Wachstumsverhalten, die Migration scheint folglich wahrscheinlich nicht durch den MAPK-Signalweg beeinflusst zu werden. Im Gegensatz dazu verringert sich die Wachstumsrate der cerebEND PcdhgC3 Knockout-Zelllinie signifikant. Beim Vergleich der Zelllinien untereinander zeigt die KO-Zelllinie ohne Inhibitoren eine erhöhte Migrationsrate gegenüber der Wildtyp-Zelllinie. Nach Inhibitorzugabe ist die Migrationsrate der Knockout-Zelllinie nicht mehr statistisch signifikant zur Wildtyp-Zelllinie verändert. Der Verlust von PcdhgC3 könnte zur erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit der Endothelzellen führen, die durch den MAPK-Signalweg begünstigt wird und folglich möglicherweise schädigende Folgen für die Integrität der BHS haben. So zeichnen sich Tumore unter anderem durch unkontrolliertes Wachstumsverhalten aus, z.B. über den MAPK-Signalweg (Steelman et al., 2011). Die verlangsamte Migration der PcdhgC3 Knockout-Zelllinie durch Mek-Inhibitorzugabe sowie die nicht mehr signifikante Erhöhung der Migrationsrate bei SL327-Gabe deuten auf eine erhöhte MAPK-Aktivierung in der KO-Zelllinie im Zuge des Zellwachstums hin. Anders als Pcdh7, dessen Expression von Zhou et al. 2017 beschrieben mit erhöhter MAPK-Aktivität und schlechteren Überleben bei Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkrebs assoziiert ist, könnte die Expression von PcdhgC3 suppressive Effekte über verringerte MAPK-Aktivität beim Vergleich mit dem PcdhgC3 Knockout aufweisen. Des Weiteren könnte das Vorhandensein von PcdhgC3 protektiv gegenüber MAPK-begünstigte

Beeinträchtigungen der BHS aufgrund von Aktivierung proinflammatorischer Prozesse sein.

Zur Simulation von Gewebeschäden wurden OGD-Versuche durchgeführt und das PhosErk-Proteinlevel beider Zelllinien im zeitlichen Verlauf und bei Zugabe des Mek1/2-Inhibitors SL327 untersucht. Beide Zelllinien zeigen eine signifikante Reduktion des Proteinlevels vier Stunden nach Behandlung mit SL327 unter Normoxiebedingungen, die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie weist zusätzlich nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion auf. Ebenso verringert sich das PhosErk-Proteinlevel unter OGD-Bedingungen nach vierstündiger Behandlung mit SL327 in beiden Zelllinien, nach 24 Stunden Behandlung ist ein verringerter Trend sichtbar. Das Gesamt-Erk-Proteinlevel bleibt in allen Versuchsteilen gleich. So könnte der MAPK-Signalweg sowohl unter NORM- als auch OGD-Bedingungen in den zerebellaren Endothelzellen von Bedeutung zu sein, die Inhibierung des MAPK-Signalwegs durch SL327 hat in beiden Zelllinien reduzierte Proteinlevel zufolge. Jedoch scheint eine erhöhte Aktivität von Erk unter OGD-Bedingungen, die bereits in Studien und Tiermodellen gezeigt wurde, in diesem Versuch nicht feststellbar zu sein (Maddahi, 2010; Gladbach et al., 2014). Allenfalls ist eine Erhöhung des PhosErk-Proteinlevels in der cerebEND-Zelllinie nach vier Stunden im Vergleich zwischen Normoxie- und OGD-Bedingungen feststellbar. Beim Vergleich des PhosErk-Proteinlevels in der cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie findet sich kein Unterschied zwischen Normoxie- und OGD-Bedingungen. Möglicherweise könnte ein größerer Effekt von OGD-Bedingungen auf das PhosErk-Proteinlevel durch Verkürzung des Versuchszeitraumes erreicht werden, da von einer Erk-Aktivierung bereits nach fünf, 30 oder 60 Minuten unter OGD-Bedingungen in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen berichtet wurde (Yuen et al., 2014). Zudem könnten die Unterschiede in der Verwendung verschiedener Zelllinien begründet sein.

Beim Vergleich mit der cerebEND-Zelllinie verzeichnet die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie nach vier Stunden ohne Mek1/2-Inhibitor erhöhte PhosErk-Proteinlevel und bestätigt somit die in den Differenzierungsversuchen gezeigten

erhöhten PhosErk-Level. Dieser Effekt ist nach vier Stunden unter SL327-Gabe nicht messbar. So könnte die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie stärker durch den MAPK-Signalweg beeinflusst werden. Nach 24 Stunden ist keine signifikante Erhöhung des PhosErk-Proteinlevels in der KO-Zelllinie nachweisbar, möglicherweise zeigen sich die Unterschiede in den PhosErk-Proteinleveln zwischen den Zelllinien nur über eine kurze Zeitspanne. Unter OGD-Bedingungen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien, so scheint Erk in beiden Zelllinien ähnlich stark aktiviert werden. Eine Beeinflussung dieser Aktivierung unter OGD-Bedingungen durch Knockout von PcdhgC3 ist nicht erkennbar. Die Bedeutung von PcdhgC3 bei der MAPK-bedingten Beeinflussung neuronaler Erkrankungen wie Schlaganfall könnte daher eher von untergeordneter Rolle sein.

Ein Target des MAPK-Signalwegs ist NHE1. Als Natrium/Wasserstoffionen-Austauscher trägt NHE1, welcher durch Erk1/2 aktiviert wird, möglicherweise bei ischämischen Ereignissen zur Bildung von Hirnödemen und folglich neuronaler Schädigung bei. NHE1 scheint vor allem in den ersten Stunden der Ischämie stimuliert zu sein (Luo et al., 2007; Yuen et al., 2014). Es bestehen allerdings ebenso Belege für die Suppression von NHE1 unter hypoxischen und TME (tumor microenvironment)-Bedingungen (Pedersen et al., 2017). Veränderungen von NHE1 wurden auf RNA- und Proteinebene untersucht. Unter Normoxiebedingungen zeigen beide Zelllinien keine Veränderung der NHE1-Expression auf mRNA-Ebene nach vier und 24 Stunden. Auch die Zugabe des Mek-Inhibitors SL327 hat keine veränderte mRNA-Expression von NHE1 zur Folge. Unter OGD-Bedingungen zeichnet sich in beiden Zelllinien eine verringerte NHE1-mRNA-Expression vier Stunden mit bzw. ohne Mek-Inhibitor ab. Nach 20 stündiger Reoxygenierung steigt die NHE1-Expression auf Werte der Expressionsraten unter Normoxiebedingungen. Zusammenfassend scheint die NHE1-Expression auf mRNA unter OGD-Bedingungen zunächst erniedrigt sein, um nach Wiederherstellung normoxischer Bedingungen erneut anzusteigen. So könnten Hypoxie und Hypoglykämie hemmend auf die NHE1-mRNA-Expression wirken, die möglicherweise im Zuge einer Reoxygenierung wieder rückgängig sind. Auf Proteinebene zeigen sich keine statistisch

signifikanten Veränderungen des NHE1-Levels, weder im zeitlichen Verlauf zwischen vier und 24 Stunden noch zwischen Normoxie- und OGD-Bedingungen oder durch Mek1/2-Inhibitorzugabe. Dies lässt mehrere diskussionswürdige Schlüsse zu. Zum einen könnte die Diskrepanz zwischen erniedrigter NHE1-Expression auf mRNA-Ebene unter OGD-Bedingungen nach vier Stunden und dem konstanten Proteinlevel im Western Blot auf eine posttranskriptionale Modifikation zurückzuführen sein. So kann durch alternatives Spleißen der RNA-Informationsgehalt nach erfolgter Transkription verändert werden. Des Weiteren kann die durch von Yuen et. al. 2014 beschriebene Erhöhung des NHE1-Proteinlevels in bovinen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bzw. die von Pederson et. al. 2017 berichtete Erniedrigung unter ischämischen und hypoglykämischen Bedingungen in humanen Nabelvenen-Endothelzellen nicht bestätigt werden. Das NHE1-Proteinlevel unter OGD-Bedingungen ist gegenüber normoxischen Bedingungen nach vier Stunden nicht verändert. Möglicherweise könnte die Verwendung anderer Zelllinien zu den unterschiedlichen Ergebnissen beitragen, sodass Signalwege in den Zelltypen variieren. Außerdem könnte die NHE1-Aktivität nach vier Stunden Behandlung eventuell bereits wieder Ausgangswerte angenommen haben, sodass die Wahl des Zeitrahmens überdacht werden kann. In den erfolgten Experimenten kann keine Beeinflussung von Mek1/2 auf NHE1 auf mRNA- sowie Proteinebene nachgewiesen werden. Da Mek1/2 durch Phosphorylierung Erk1/2 stimuliert (welches im Rahmen der OGD-Versuche nachvollzogen werden konnte), wäre eine Mek1/2-Beeinflussung von NHE1 naheliegend gewesen. Die SL327-Inhibitorzugabe führte anders als erwartet nicht zur Veränderung des NHE1-Proteinlevels, sodass andere noch nicht bekannte Mechanismen zur Aktivierung von NHE1 führen könnten. Außerdem könnte erneut die Wahl des Zeitrahmens eine Rolle spielen, da die von Yuen et. al. 2014 beschriebene Erk1/2 vermittelte Erhöhung der NHE1-Aktivität vor allem in den ersten fünf Stunden eines hypoxischen oder aglykämischen Ereignisses stattfindet und möglicherweise auch eine kürzere Zeitspanne bei Mek1/2-bedingten Veränderungen gewählt werden muss.

Beim Vergleich der NHE1-Expression auf mRNA-Ebene zwischen den Zelllinien verzeichnet die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie unter Normoxiebedingungen nach vier Stunden unter Mek1/2-Inhibitorzugabe eine erhöhte NHE1-Expression. Unter OGD-Bedingungen findet sich nach vier Stunden mit Mek1/2-Inhibitor sowie nach 24 Stunden mit und ohne Inhibitorzugabe eine signifikant erhöhte NHE1-Expression in der KO-Zelllinie. So könnte der Verlust von PcdhgC3 zu einer fraglich erhöhten NHE-Expression unter OGD-Bedingungen führen. Der anschließende WB bestätigt sich die auf mRNA-Ebene gezeigte ähnliche Expression von NHE1 in beiden Zelllinien unter Normoxiebedingungen. Außerdem zeigen sich auf Proteinebene auch unter OGD-Bedingungen keine signifikant höheren NHE1-Proteinlevel. Schlussfolgend lassen sich im WB keine Veränderungen von NHE1 durch Knockout von PcdhgC3 feststellen; zur Diskrepanz zwischen mRNA-Ebene und Proteinebene können die bereits aufgeführten Diskussionspunkte wie eine posttranskriptionale Modifizierung erneut aufgegriffen werden. So könnte der Knockout von PcdhgC3 keinen Effekt auf NHE1 begünstigte Prozesse in zerebellären Endothelzellen zu haben.

#### **4.4 Wnt-Signalweg**

In adulten Zellen ist der Wnt-Signalweg meist von pathologischer Bedeutung, am besten untersucht ist seine Rolle bei der Kanzerogenese und Zellmigration in Krebszellen (Mah, 2017). Im Wound healing assay verzeichnet die cerebEND Wildtyp-Zelllinie bei Zugabe des Wnt-Inhibitors XAV939 eine reduzierte Migrationsrate, cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie zeigt nach 48 Stunden XAV939-Gabe eine noch stärker reduzierte Migrationsrate im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Während die Zellmigration der KO-Zelllinie ohne Inhibitor im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie erhöht ist, zeigt sie durch XAV939-Gabe nach 48 Stunden lediglich die Tendenz zur erhöhten Migration. Die cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie scheint durch Wnt-Inhibitorzugabe stärker im Wachstum beeinträchtigt zu sein, so könnte der Verlust von PcdhgC3 zur geringfügig schnelleren durch den Wnt-Pathway begünstigten Zellproliferation führen. Dieser Effekt kann beim Vergleich der Zelllinien untereinander bestätigt werden. Die Knockout-Zelllinie proliferiert im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie unter Kontrollbedingungen schneller; jedoch kann eine Veränderung der Migration in der Knockout-Zelllinie bei

Inhibitorzugabe nicht statistisch signifikant nachgewiesen werden. Allerdings finden sich relativ hohe Standardabweichungen bei der Auswertung der wound healing assays, sodass statistisch signifikante und damit aussagekräftigere Ergebnisse durch Erhöhung der Versuchszahlen erreicht werden könnten. Klinisch wird PcdhgC3 in Epithelzellen des kolorektalen Karzinoms und in embryonalen Nierenzellen eine tumorsuppressive Funktion durch Inhibierung des Wnt-Pathways zugeschrieben (Dallosso et al., 2012; Mah et al., 2016). Die Untersuchungen könnten eine Korrelation zwischen PcdhgC3 und Wnt bestätigen, da durch Knockout die Wnt-begünstigte Zellmigration geringfügig schneller stattfindet. Ein weiterer klinisch relevanter Punkt ist die Bedeutung von Wnt und PcdhgC3 in der neuronalen Entwicklung. Wnt werden förderliche Einflüsse für die Morphogenese von Dendriten zugeschrieben, den  $\gamma$ -Protocadherinen sowohl fördernde als auch hemmende (Garrett et al., 2012; Harrison-Uy, 2012; Molumby et al., 2017). Die Inhibierung des Wnt-Signalwegs durch PcdhgC3 im zerebralen Kortex ist bereits beschrieben (Mah et al. 2016). Die hier durchgeführten wound healing assays deuten an, dass die durch Wnt begünstigte Zellmigration bei Ausschaltung von PcdhgC3 schneller verläuft, folglich könnte eine erhöhte Wnt-Aktivität in den cerebEND PcdhgC3 KO-Zellen vorliegen. Vor dem Hintergrund der Rolle von Wnt für die Neurogenese ist die genaue Bedeutung von PcdhgC3 hinsichtlich der Beeinflussung von Wnt in zerebralen Endothelzellen zukünftig zu eruieren.



## 5 Zusammenfassung

Die Bedeutung von PcdhgC3 ist vor allem im Zusammenhang mit neuronaler Entwicklung und in Karzinomen beschrieben. Untersuchungen zur Rolle von PcdhgC3 in Kapillarendothelzellen des ZNS sind rar. Dilling et al. zeigen erstmals veränderte tight junction Proteinlevel in zerebellaren Endothelzellen durch Knockout von PcdhgC3 auf. Ziel der Arbeit war es, die Auswirkungen des Ausschaltens von PcdhgC3 in Kapillarendothelzellen der BHS näher zu untersuchen.

Transporter, welche trotz der hohen Barriereigenschaften der BHS Stoffe ins ZNS transportieren, werden im Rahmen der Behandlung neuronaler Erkrankungen häufig erforscht. So können Medikamente entwickelt werden, die aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften das ZNS über jene Transportmechanismen erreichen. Der Knockout von PcdhgC3 bewirkt veränderte Proteinlevel verschiedener Transporter wie Lrp1, GLUT1 und BCRP und könnte somit eine Rolle bei der Versorgung des ZNS mit Nährstoffen spielen.

Signalwege sind aufgrund ihrer vielfältigen physiologischen und pathologischen Funktionen Bestandteil zahlreicher Untersuchungen. Durch Knockout von PcdhgC3 kommt zur erhöhten Zellmigration im wound healing assay, welche scheinbar durch die untersuchten Signalwege mitbeeinflusst wird. Die Gabe des mTOR-Inhibitors Torin2 führt in der Knockout Zelllinie mehr als in der Wildtyp Zelllinie zur Verringerung der Migrationsrate, was auf eine Erhöhung des mTOR-Signalweges durch Ausschalten von PcdhgC3 hindeuten könnte. Dieses geschieht möglicherweise nicht auf Akt-Ebene, da die Phos-Akt-Proteinlevel zwischen Knockout und Wildtyp Zelllinie nicht variiert.

Die Zellmigration durch Gabe des MAPK-Inhibitors SL327 verringert sich lediglich in der PcdhgC3 Knockout Zelllinie, die cerebEND Wildtyp-Zelllinie bleibt davon unbeeinflusst. Dies deutet ebenso auf eine erhöhte Signalweg-Aktivierung durch Ausschalten von PcdhgC3 hin. Im Vergleich zur Wildtyp Zelllinie finden sich erhöhte PhosErk-Proteinlevel in der PcdhgC3 Knockout-Zelllinie im Differenzierungsmedium, was die Hypothese der MAPK-Aktivierung bestätigen

könnte. Allerdings zeigt der Knockout von PcdhgC3 keine Veränderung im PhosErk-Proteinlevel unter OGD-Bedingungen. Somit scheint PcdhgC3 von untergeordneter Bedeutung für MAPK-bedingte Veränderungen bei Gewebeschäden, die mit verringerter Sauerstoff- und Nährstoffversorgung einhergehen, zu sein. Zudem führt der Knockout von PcdhgC3 zu keinen signifikant veränderten Proteinleveln des MAPK-Targets NHE1, dessen Rolle bei ischämischen Ereignissen diskutiert wird. Ein Trend zur erhöhten NHE1-Expression durch Knockout zeichnet sich lediglich auf mRNA-Ebene ab.

Das Ausschalten von PcdhgC3 bewirkt im wound healing assay bei Gabe des Wnt-Inhibitors XAV939 eine stärkere Reduzierung der Migration im Vergleich zur Wildtyp Zelllinie, was auf eine Erhöhung des Wnt-Signalwegs durch PcdhgC3 Knockout hinweist.

Zusammenfassend lassen sich durch Knockout des PcdhgC3 Veränderungen aller untersuchten Signalwege in den zerebellären Kapillarendothelzellen feststellen. Hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der Regulierung von pathologischen Prozessen wie der neuronalen Schädigung infolge ischämischer Ereignisse oder Proliferationsgeschwindigkeit verschiedener Tumoren könnte der Verlust von PcdhgC3 diese Signalwege beeinflussen. Weitere Untersuchungen über den klinischen Einfluss dieser Signalweg-Veränderungen auf die Funktion der BHS sind zukünftig sinnvoll.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abbott NJ (2013):** Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis* 36: 437–449.

**Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ (2010):** Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* 37: 13–25.

**Chang H, Hoshina N, Zhang C, Ma Y, Cao H, Wang Y, Wu D-D, Bergen SE, Landén M, Hultman CM, Preisig M, Kutalik Z, Castelao E, Grigoriou-Serbanescu M, Forstner AJ, Strohmaier J, Hecker J, Schulze TG, Müller-Myhsok B, Reif A, Mitchell PB, Martin NG, Schofield PR, Cichon S, Nöthen MM, Walter H, Erk S, Heinz A, Amin N, van Duijn CM, Meyer-Lindenberg A, Tost H, Xiao X, Yamamoto T, Rietschel M, Li M (2018):** The protocadherin 17 gene affects cognition, personality, amygdala structure and function, synapse development and risk of major mood disorders. *Molecular psychiatry* 23: 400–412.

**Chen WV, Alvarez FJ, Lefebvre JL, Friedman B, Nwakeze C, Geiman E, Smith C, Thu CA, Tapia JC, Tasic B, Sanes JR, Maniatis T (2012):** Functional significance of isoform diversification in the protocadherin gamma gene cluster. *Neuron* 75: 402–409.

**Chen Y, Londraville R, Brickner S, El-Shaar L, Fankhauser K, Dearth C, Fulton L, Sochacka A, Bhattarai S, Marrs JA, Liu Q (2013):** Protocadherin-17 function in Zebrafish retinal development. *Developmental neurobiology* 73: 259–273.

**Cseh B, Doma E, Baccarini M (2014):** "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS letters* 588: 2398–2406.

**Dallosso AR, Oster B, Greenhough A, Thorsen K, Curry TJ, Owen C, Hancock AL, Szemes M, Paraskeva C, Frank M, Andersen CL, Malik K (2012):** Long-range epigenetic silencing of chromosome 5q31 protocadherins is involved in early and late stages of colorectal tumorigenesis through modulation of oncogenic pathways. *Oncogene* 31: 4409–4419.

**Dazert E, Hall MN (2011):** mTOR signaling in disease. *Current opinion in cell biology* 23: 744–755.

**Dibbens LM, Tarpey PS, Hynes K, Bayly MA, Scheffer IE, Smith R, Bomar J, Sutton E, Vandeleur L, Shoubridge C, Edkins S, Turner SJ, Stevens C, O'Meara S, Tofts C, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Halliday K, Jones D, Lee R, Madison M, Mironenko T, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Dicks E, Butler A, Menzies A, Jenkinson A, Shepherd R, Gusella JF, Afawi Z, Mazarib A, Neufeld MY, Kivity S, Lev D, Lerman-Sagie T, Korczyn AD, Derry CP, Sutherland GR, Friend K, Shaw M, Corbett M, Kim H-G, Geschwind DH, Thomas P, Haan E, Ryan S, McKee S, Berkovic SF, Futreal PA, Stratton MR, Mulley JC, Géczy J (2008):** X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nature Genetics* 40: 776–781.

**Dilling C, Roewer N, Forster CY, Burek M (2017):** Multiple protocadherins are expressed in brain microvascular endothelial cells and might play a role in tight junction protein regulation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*: 271678X16688706.

**El Hajj N, Dittrich M, Böck J, Kraus TFJ, Nanda I, Müller T, Seidmann L, Tralau T, Galetzka D, Schneider E, Haaf T (2016):** Epigenetic dysregulation in the developing Down syndrome cortex. *Epigenetics* 11: 563–578.

**Fujitani M, Zhang S, Fujiki R, Fujihara Y, Yamashita T (2017):** A chromosome 16p13.11 microduplication causes hyperactivity through dysregulation of miR-484/protocadherin-19 signaling. *Molecular psychiatry* 22: 364–374.

**Garrett AM, Schreiner D, Lobas MA, Weiner JA (2012):**  $\gamma$ -protocadherins control cortical dendrite arborization by regulating the activity of a FAK/PKC/MARCKS signaling pathway. *Neuron* 74: 269–276.

**Garrett AM, Weiner JA (2009):** Control of CNS synapse development by  $\gamma$ -protocadherin-mediated astrocyte-neuron contact. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 11723–11731.

**Gladbach A, van Eersel J, Bi M, Ke YD, Ittner LM (2014):** ERK inhibition with PD184161 mitigates brain damage in a mouse model of stroke. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996) 121: 543–547.

**Goncalves J, Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcao A (2018):** Relevance of breast cancer resistance protein to brain distribution and central acting drugs: a pharmacokinetic perspective. *Current drug metabolism*.

**Gumbiner BM (2005):** Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6: 622–634.

**Harari E, Guo L, Smith SL, Paek KH, Fernandez R, Sakamoto A, Mori H, Kutyna MD, Habib A, Torii S, Cornelissen A, Jinnouchi H, Gupta A, Kolodgie FD, Virmani R, Finn AV (2018):** Direct Targeting of the mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) Kinase Improves Endothelial Permeability in Drug-Eluting Stents-Brief Report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38: 2217–2224.

**Harries LW, Fellows AD, Pilling LC, Hernandez D, Singleton A, Bandinelli S, Guralnik J, Powell J, Ferrucci L, Melzer D (2012):** Advancing age is associated with gene expression changes resembling mTOR inhibition: evidence from two human populations. *Mechanisms of ageing and development* 133: 556–562.

**Harrison-Uy SJ, Pleasure SJ (2012):** Wnt signaling and forebrain development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4: S. 1–10.

**Hasegawa S, Kumagai M, Hagihara M, Nishimaru H, Hirano K, Kaneko R, Okayama A, Hirayama T, Sanbo M, Hirabayashi M, Watanabe M, Hirabayashi T, Yagi T (2016):** Distinct and Cooperative Functions for the Protocadherin- $\alpha$ , - $\beta$  and - $\gamma$  Clusters in Neuronal Survival and Axon Targeting. *Frontiers in molecular neuroscience* 9: 1–21.

**Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud P-O, Deli MA, Forster C, Galla HJ, Romero IA, Shusta EV, Stebbins MJ, Vandenhoute E, Weksler B, Brodin B (2016):** In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use.

Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 36: 862–890.

**Johnsen KB, Moos T (2016):** Revisiting nanoparticle technology for blood-brain barrier transport: Unfolding at the endothelial gate improves the fate of transferrin receptor-targeted liposomes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 222: 32–46.

**Jonkman JEN, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, Colarusso P (2014):** An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion & migration* 8: 440–451.

**Kaneko R, Kato H, Kawamura Y, Esumi S, Hirayama T, Hirabayashi T, Yagi T (2006):** Allelic gene regulation of Pcdh-alpha and Pcdh-gamma clusters involving both monoallelic and biallelic expression in single Purkinje cells. *The Journal of biological chemistry* 281: 30551–30560.

**Kim S-Y, Yasuda S, Tanaka H, Yamagata K, Kim H (2014):** Non-clustered protocadherin. *Cell adhesion & migration* 5: 97–105.

**Lahiani A, Brand-Yavin A, Yavin E, Lazarovici P (2018):** Neuroprotective Effects of Bioactive Compounds and MAPK Pathway Modulation in "Ischemia"-Stressed PC12 Pheochromocytoma Cells. *Brain sciences* 8.

**Lajoie JM, Shusta EV (2015):** Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the blood-brain barrier. *Annual review of pharmacology and toxicology* 55: 613–631.

**Lam TI, Wise PM, O'Donnell ME (2009):** Cerebral microvascular endothelial cell Na/H exchange: evidence for the presence of NHE1 and NHE2 isoforms and regulation by arginine vasopressin. *American journal of physiology. Cell physiology* 297: C278-89.

**Li J, Kim SG, Blenis J (2014):** Rapamycin: one drug, many effects. *Cell metabolism* 19: 373–379.

**Lobas MA, Helsper L, Vernon CG, Schreiner D, Zhang Y, Holtzman MJ, Thedens DR, Weiner JA (2012):** Molecular heterogeneity in the choroid plexus epithelium: the 22-member gamma-protocadherin family is differentially

expressed, apically localized, and implicated in CSF regulation. *Journal of neurochemistry* 120: 913–927.

**Luo J, Kintner DB, Shull GE, Sun D (2007):** ERK1/2-p90RSK-mediated phosphorylation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1. A role in ischemic neuronal death. *The Journal of biological chemistry* 282: 28274–28284.

**Maddahi A, Edvinsson L (2010):** Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. *Journal of neuroinflammation* 7: 14.

**Mah KM, Houston DW, Weiner JA (2016):** The gamma-Protocadherin-C3 isoform inhibits canonical Wnt signalling by binding to and stabilizing Axin1 at the membrane. *Scientific reports* 6: 31665.

**Mah KM, Weiner JA (2017):** Regulation of Wnt signaling by protocadherins. *Seminars in cell & developmental biology* 69: 158–171.

**Meguro R, Hishida R, Tsukano H, Yoshitake K, Imamura R, Tohmi M, Kitsukawa T, Hirabayashi T, Yagi T, Takebayashi H, Shibuki K (2015):** Impaired clustered protocadherin- $\alpha$  leads to aggregated retinogeniculate terminals and impaired visual acuity in mice. *Journal of neurochemistry* 133: 66–72.

**Miralles CP, Taylor MJ, Bear J, Fekete CD, George S, Li Y, Bonhomme B, Chiou T-T, Blas AL de (2020):** Expression of protocadherin- $\gamma$ C4 protein in the rat brain. *The Journal of comparative neurology* 528: 840–864.

**Molumby MJ, Anderson RM, Newbold DJ, Koblesky NK, Garrett AM, Schreiner D, Radley JJ, Weiner JA (2017):**  $\gamma$ -Protocadherins Interact with Neuroligin-1 and Negatively Regulate Dendritic Spine Morphogenesis. *Cell reports* 18: 2702–2714.

**Mülhardt C (2013):** *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Springer Berlin Heidelberg, 7., aktualisierte Auflage, Berlin, Heidelberg, s.l.

**Neuhaus W, Burek M, Djuzenova CS, Thal SC, Koepsell H, Roewer N, Förster CY (2012):** Addition of NMDA-receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the upregulation of glucose

uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells. *Neuroscience letters* 506: 44–49.

**Okazaki N, Takahashi N, Kojima S-I, Masuho Y, Koga H (2002):** Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis* 23: 1139–1148.

**Pedersen AK, Mendes Lopes de Melo J, Mørup N, Tritsarlis K, Pedersen SF (2017):** Tumor microenvironment conditions alter Akt and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 expression in endothelial cells more than hypoxia alone: implications for endothelial cell function in cancer. *BMC cancer* 17: 542.

**Peek SL, Mah KM, Weiner JA (2017):** Regulation of neural circuit formation by protocadherins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74: 4133–4157.

**Phillips GR, LaMassa N, Nie YM (2017):** Clustered protocadherin trafficking. *Seminars in cell & developmental biology* 69: 131–139.

**Provost JJ, Wallert MA (2013):** Inside out: targeting NHE1 as an intracellular and extracellular regulator of cancer progression. *Chemical biology & drug design* 81: 85–101.

**Rehm H, Letzel T (2011 // 2016):** Der Experimentator: Proteinbiochemie Proteomics // Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag; Springer Spektrum, 7., überarbeitete und aktualisierte Auflage, Heidelberg.

**Rojas A, Morales M, Gonzalez I, Araya P (2018):** Inhibition of RAGE axis signaling: a pharmacological challenge. *Current drug targets*.

**Saba-EI-Leil MK, Frémin C, Meloche S (2016):** Redundancy in the World of MAP Kinases: All for One. *Frontiers in cell and developmental biology* 4: 67.

**Sanchez-Covarrubias L, Slosky LM, Thompson BJ, Davis TP, Ronaldson PT (2014):** Transporters at CNS barrier sites: obstacles or opportunities for drug delivery? *Current pharmaceutical design* 20: 1422–1449.



**Sano K, Tanihara H, Heimark RL (1983):** Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *The EMBO Journal*: 2249–2256.

**Silwedel C, Forster C (2006):** Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli. *Journal of neuroimmunology* 179: 37–45.

**Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ (2007):** Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27: 1766–1791.

**Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L, Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA (2011):** Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* 3: 192–222.

**Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM (2016):** Molecular pathophysiology of cerebral edema. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36: 513–538.

**Suo L, Lu H, Ying G, Capecchi MR, Wu Q (2012):** Protocadherin clusters and cell adhesion kinase regulate dendrite complexity through Rho GTPase. *Journal of molecular cell biology* 4: 362–376.

**Thomas FC, Taskar K, Rudraraju V, Goda S, Thorsheim HR, Gaasch JA, Mittapalli RK, Palmieri D, Steeg PS, Lockman PR, Smith QR (2009):** Uptake of ANG1005, a novel paclitaxel derivative, through the blood-brain barrier into brain and experimental brain metastases of breast cancer. *Pharmaceutical research* 26: 2486–2494.

**Vega-Benedetti AF, Loi E, Moi L, Blois S, Fadda A, Antonelli M, Arcella A, Badiali M, Giangaspero F, Morra I, Columbano A, Restivo A, Zorcolo L,**

**Gismondi V, Varesco L, Bellomo SE, Giordano S, Canale M, Casadei-Gardini A, Faloppi L, Puzzone M, Scartozzi M, Ziranu P, Cabras G, Cocco P, Ennas MG, Satta G, Zucca M, Canzio D, Zavattari P (2019):** Clustered protocadherins methylation alterations in cancer. *Clinical epigenetics* 11: 100.

**Vemula S, Roder KE, Yang T, Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Abbruscato TJ (2009):** A functional role for sodium-dependent glucose transport across the blood-brain barrier during oxygen glucose deprivation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 328: 487–495.

**Wang S, Meng Y, Li C, Qian M, Huang R (2015):** Receptor-Mediated Drug Delivery Systems Targeting to Glioma. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 6.

**Wang Y, Chen J, Tang W, Zhang Y, Li X (2017):** Rapamycin inhibits the proliferation of endothelial cells in hemangioma by blocking the mTOR-FABP4 pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 85: 272–279.

**Weiner JA, Jontes JD (2013):** Protocadherins, not prototypical: a complex tale of their interactions, expression, and functions. *Frontiers in molecular neuroscience*: 1–10.

**Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC (2013):** The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in neuroengineering* 6: 7.

**Wu Q, Zhang T, Cheng JF, Kim Y, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Noonan JP, Zhang MQ, Myers RM, Maniatis T (2001):** Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters. *Genome research* 11: 389–404.

**Yuen N, Lam TI, Wallace BK, Klug NR, Anderson SE, O'Donnell ME (2014):** Ischemic factor-induced increases in cerebral microvascular endothelial cell Na/H exchange activity and abundance: evidence for involvement of ERK1/2 MAP kinase. *American journal of physiology. Cell physiology* 306: C931-42.

**Zhou X, Updegraff BL, Guo Y, Peyton M, Girard L, Larsen JE, Xie X-J, Zhou Y, Hwang TH, Xie Y, Rodriguez-Canales J, Villalobos P, Behrens C, Wistuba**

**Li, Minna JD, O'Donnell KA (2017):** PROTOCADHERIN 7 Acts through SET and PP2A to Potentiate MAPK Signaling by EGFR and KRAS during Lung Tumorigenesis. *Cancer research* 77: 187–197.

**Zhu H, Dai R, Zhou Y, Fu H, Meng Q (2018):** TLR2 Ligand Pam3CSK4 Regulates MMP-2/9 Expression by MAPK/NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in Primary Brain Microvascular Endothelial Cells. *Neurochemical research*.

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau geclusterter Protocadherine .....	3
Abbildung 2: Darstellung der Transportmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke .....	5
Abbildung 3: Mammalian Target of Rapamycin-Signalweg .....	7
Abbildung 4: Raf-Mek-Erk-Signalweg des Mitogen-activated Protein Kinase-Signalwegs.....	9
Abbildung 5: Wnt-Signalweg .....	11
Abbildung 6: Mikroskopischer Ausschnitt der konfluent gewachsenen Zelllinien .....	20
Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Zellmigrationsversuche .....	21
Abbildung 8: Versuchsaufbau der Oxygen Glucose Deprivation-Versuche.....	23
Abbildung 9: Proteinlevel einzelner Transporter in cerebEND- und cerebEND PcdhgC3 KO-Zelllinie .....	33
Abbildung 10: PhosAkt- und Akt-Proteinlevel .....	35
Abbildung 11: Zellmigration mit mTOR-Inhibitor Torin2 .....	36
Abbildung 12: Vergleich zwischen cerebEND und cerebEND PcdhgC3 KO mit und ohne mTOR-Inhibitor .....	37
Abbildung 13: PhosErk- und Erk-Proteinlevel .....	38
Abbildung 14: Zellmigration mit MAPK-Inhibitor SL327.....	39
Abbildung 15: Vergleich zwischen cerebEND und cerebEND PcdhgC3 KO mit und ohne MAPK-Inhibitor.....	40
Abbildung 16: PhosErk- und Erk-Proteinlevel in cerebEND und cerebEND PcdhgC3 KO Zellen unter Normoxie-(NORM) und OGD-Bedingungen und unter Mek1/2-Inhibitorzugabe .....	42
Abbildung 17: PhosErk- und Erk-Proteinlevel zwischen den Zelllinien.....	43
Abbildung 18: Vergleich der NHE1-RNA-Expression zwischen Normoxie (NORM)- und OGD-Bedingungen .....	44
Abbildung 19: Vergleich der NHE1-RNA-Expression zwischen cerebEND (wt) und cerebEND PcdhgC3 KO (ko).....	45

Abbildung 20: Vergleich des NHE1-Proteinlevels .....	46
Abbildung 21: NHE1-Proteinlevel zwischen den Zelllinien .....	47
Abbildung 22: Zellmigration mit Wnt-Inhibitor XAV939.....	48
Abbildung 23: Vergleich zwischen cerebEND und cerebEND PcdhgC3 KO- Zelllinie mit und ohne Wnt-Inhibitor.....	49

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte .....	13
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	14
Tabelle 3: Verwendete Substanzen .....	14
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper.....	17
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper .....	18
Tabelle 6: Verwendete Sonden .....	18
Tabelle 7: Verwendete Kits .....	18
Tabelle 8: Verwendete Inhibitoren mit Endkonzentrationen .....	22
Tabelle 9: Gewonnene RNA- und Proteinproben .....	24
Tabelle 10: Reaktionsansatz für 20 µl cDNA.....	30

## 9 Veröffentlichungen

### Veröffentlichte Abstracts:

**Burek M, Gabbert L, Dilling C, Roewer N (2019):** Protocadherin gamma C3 (PcdhgC3) knockout brain microvascular endothelial cells show reduced barrier properties. *Fluids and Barriers of the CNS* 2019, 16(Suppl1):A123.

**Gabbert L, Dilling C, Sisario D, Soukhoroukov V, Burek M (2017):** Protocadherins at the blood-brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS* (2017), 14(Supp 2):A18.

### Kongresspräsentationen:

**Gabbert L, Dilling C, Roewer N, Burek M (2019):** Protocadherin gamma C3 (PcdhgC3) knockout brain microvascular endothelial cells show reduced barrier properties. 13<sup>th</sup> International Conference on Cerebral Vascular Biology, 25-28.06.2019, Miami, USA

**Gabbert L, Dilling C, Roewer N, Burek M (2018):** Protocadherin gamma C3 influences multiple signaling pathways in brain microvascular endothelial cell lines. 21<sup>st</sup> International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers, 19-21.09.2018, Arad, Rumänien

**Gabbert L, Dilling C, Sisario D, Soukhoroukov V, Burek M (2017):** Protocadherins at the blood-brain barrier. 20th International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers, 13-15.09.2017, Krakau, Polen

**Gabbert L, Dilling C, Burek M (2017):** Influence of Protocadherin-gamma deletion on inflammatory response in brain microvascular endothelial cells. Else-Kröner-Symposium Translational Immunology-From Target to Therapy IV, 4-5.05.2017, Würzburg

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzen Herzen bei Frau PD Dr. rer. nat. M. Burek bedanken. Sie gab mir die Möglichkeit, unter Ihrer Betreuung eine experimentelle Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Blut-Hirn-Schranke der Anästhesie des Universitätsklinikums Würzburg anzufertigen. Jederzeit war sie als meine Ansprechpartnerin für alle Belange erreichbar und führte mich sowohl thematisch als auch methodisch in das labortechnische Arbeiten und die statistische Auswertung ein. Stets gelassen half sie mir bei allen Fragen, gab neue Impulse und fand darüber hinaus aufmunternde Worte, wenn etwas nicht nach meinen Vorstellungen verlief. Frau Dr. Burek war die beste Betreuerin, die ich mir nur wünschen konnte.

Großer Dank gebührt Frau E. Wilken und Frau A. Neuhoff, die als labortechnische Assistentinnen stets an meiner Seite waren. Geduldig führten sie mich in die verschiedenen Methodiken ein und standen bei Fragen an meiner Seite. Außerdem schufen sie eine angenehme Arbeitsatmosphäre, die es mir ermöglichte, mich gut in das Team einzufügen.

Univ.- Prof. Dr. med. T. Wurmb danke ich für die Betreuung meiner Arbeit als Zweitgutachter und PD. Dr. rer. nat. C. Hagemann als Drittgutachter.

Zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die immerwährende liebevolle Unterstützung, mit welcher ich jederzeit rechnen konnte. Sie brachten mir viel Verständnis entgegen und verstanden es, mich aufzumuntern. Ein besonderer Dank gilt meiner Großmutter, deren positive Lebenseinstellung mir kontinuierlich Kraft gegeben hat.



# **Lebenslauf**

## **Zur Person**

Lydia Marie Gabbert

## **Akademischer Werdegang**

04/2014 – 06/2020

Studium der Humanmedizin an der  
Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

Seit 12/2016

Promotion am Universitätsklinikum  
Würzburg in der Anästhesiologie

Seit 07/2020

Ärztin in Weiterbildung für Innere  
Medizin im Sophien- und Hufeland  
Klinikum Weimar

