

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus

**Effekte von Tumor Treating Fields (TTFields) auf die Blut-Hirn-Schranke in
einem murinen (cerebEND) und humanen (HBMVEC) Zellkulturmodell**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vorgelegt von

Aiste Marija Giniunaite

aus Vilnius, Litauen

Würzburg, 2022

Referent: Herr Prof. Dr. Carsten Hagemann

Korreferent: Herr Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Dekan: Herr Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2022

Die Promovendin ist Assistenzärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Glioblastom IDH-Wildtyp	1
1.2. Pathologie und Pathogenese	2
1.3. Standardtherapie	4
1.4. Tumor Treating Fields	5
1.5. Blut-Hirn-Schranke.....	8
1.6. Strategien zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	16
1.7. Blut-Hirn-Schranken Modelle	23
1.8. Vorarbeiten.....	26
1.9. Zielsetzung.....	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Materialien	28
2.1.1. Geräte.....	28
2.1.2. Chemikalien.....	30
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	33
2.1.4. Antikörper	34
2.1.5. Zelllinien.....	35
2.1.6. Software.....	36
2.1.7. Lösungen und Medien	36
2.2. Methoden	40
2.2.1. Zellkultur	40
2.2.2. Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von HBMVEC Zellen auf Claudin-5, PECAM-1	45
2.2.3. TTFields Applikation.....	47
2.2.4. Mikroskopie.....	51
2.2.5. FITC-Dextran Permeabilitätsassay	52
2.2.6. Western-Blot zum Nachweis von tight junction Proteinen.....	53
2.2.7. TEER Messung.....	57
2.2.8. Statistik	59

3. Ergebnisse	60
3.1. cerebEND Zellkultur	60
3.1.2. Expression und Lokalisation der TJ-Proteine Claudin-5 und PECAM-1 in cerebEND Zellen.....	60
3.1.2. Bestimmung der BHS-Integrität mit Hilfe von TEER	62
3.2. HBMVEC Zellkultur	64
3.2.1. Etablierung eines humanen BHS-Zellkulturmodells	64
3.2.2. Integrität und Permeabilität des HBMVEC BHS-Zellkulturmodells	67
4. Diskussion	68
4.1. cerebEND Zellkultur	68
4.2. HBMVEC Zellkultur	72
4.3. Ausblick	74
5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis.....	77
7. Appendix	1

1. Einleitung

1.1. Glioblastom IDH-Wildtyp

Glioblastom IDH-Wildtyp (GBM) sind die häufigsten malignen hirneigenen Tumoren des Erwachsenenalters (Robert Koch-Institut 2017) und werden dem WHO-Grad 4 zugeordnet (Louis et al. 2021). GBM entwickeln sich vor allem in den Großhirnhemisphären, können sich aber auch in anderen Teilen des Gehirns sowie dem Hirnstamm oder dem Rückenmark bilden. Ihre Inzidenz liegt bei 5-8 pro 100 000 Einwohner pro Jahr.

Fast die Hälfte der Patienten mit einem GBM sind zum Zeitpunkt der Diagnose älter als 65 Jahre (Ostrom et al. 2013). GBM treten mit einem Verhältnis von Männern zu Frauen von 1,6:1 auf (Trifiletti et al. 2017).

Das mediane Gesamtüberleben beträgt trotz multimodaler Therapie aus Bestrahlung und Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) nur 14,5 Monate und die kumulative 5-Jahres-Überlebensrate 5,8 %. Erst durch die Einführung von Tumortheraiefeldern (TTFields) konnte eine signifikante Steigerung des medianen Überlebens auf 20,7 Monate erreicht werden (Stupp et al. 2005; Marenco-Hillebrand et al. 2020).

1.2. Pathologie und Pathogenese

GBM wachsen diffus, was ihre ungewöhnliche Fähigkeit aufzeigt, in das umliegende Hirngewebe zu infiltrieren, ohne zunächst dessen Zyto- bzw. Faserarchitektur sowie neuronale Funktionen zu zerstören. Aufgrund des infiltrativen Wachstums kann eine Totalresektion nicht erreicht werden. Metastasen außerhalb der Neuralachse hingegen sind sehr selten (Giese et al. 2003; Xie et al. 2014). Charakteristisch für GBM ist eine zytologische Polymorphie mit hoher mitotischer Aktivität, starker Angiogenese und Mikronekrosen (Reifenberger et al. 2004).

GBM entstehen aus neuronalen Stammzellen, Astrozyten oder Oligodendrozyten und wurden bis 2016 in der WHO-Klassifikation zunächst nur nach lichtmikroskopischen Kriterien als Grad 4 eingeteilt, was mit der biologischen Aggressivität des Tumors und mit der Überlebenszeit des Patienten korrelierte (Louis et al. 2007; Ohgaki et al. 2005). Erst 2016 wurden prädiktive molekulare Marker in die WHO-Klassifikation integriert (Wick et al. 2012; Hegi et al. 2013). Der wichtigste Marker ist der Mutationsstatus der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH). Die IDH-Enzymgruppe umfasst drei Proteine, die sich im Zytoplasma und in den Peroxysomen (IDH-1) sowie in den Mitochondrien (IDH-2 und IDH-3) befinden (Yen et al. 2010). IDH-1 und IDH-2 sind wichtige Stoffwechsellzyme, die Isocitrat in α -Ketoglutarat umwandeln und dabei NADP zu NADPH reduzieren (Mondesir et al. 2016). IDH-1 ist der wichtigste NADPH-Produzent im Gehirn (Bleeker et al. 2010). Es wurden auch Mutationen in IDH-2 identifiziert, obwohl sie viel seltener auftreten als IDH-1-Mutationen, und beide schließen sich gegenseitig aus (Yan et al. 2009).

In der WHO Klassifikation von 2021 wurden für die Diagnostik des GBM der Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Promotors, die Chromosomen 7 und 10 sowie der Endothel Growth Factor Receptor (EGFR) als molekulare Marker hinzugefügt (Louis et al. 2021).

Bei älteren Patienten treten die GBM IDH-Wildtyp am häufigsten auf. Nur 2 % der über 70-jährigen Patienten haben ein Astrozytom, IDH-mutiert Grad 4 (Wiestler et al. 2013).

Diese treten hauptsächlich bei jüngeren Patienten auf und entwickeln sich aus Gliomen niedrigeren Grades (Louis et al. 2016; Ohgaki & Kleihues 2013).

1.3. Standardtherapie

Die aktuelle Standardtherapie besteht aus drei Schritten. Als erstes wird eine möglichst vollständige Tumorresektion durchgeführt. Anschließend erfolgt eine Strahlentherapie mit konkomitanter Temozolomid (TMZ) Chemotherapie, der sich die adjuvante Gabe von TMZ nach dem so genannten Stupp-Protokoll anschließt (Stupp et al. 2005; Stupp et al. 2009). TMZ ist eine alkylierende Substanz, deren Wirkung auf der Methylierung von Purinen, wie z.B. Guaninresten der DNA, beruht. Das entstandene O⁶-Methylguanin paart sich während der Replikation fälschlicherweise mit Thymin, es kommt zur Aktivierung der Mismatch-Reparatur, vergeblichen Reparaturzyklen, gefolgt von Zellzyklusarrest und Apoptose. Die O⁶-Methylierung des Guanins, und somit der durch TMZ induzierte Schaden, kann durch das DNA-Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) entfernt werden (Cai et al. 2005). Die MGMT-Expression lässt sich durch epigenetische Promotormethylierung regulieren, die zu transkriptioneller Repression und einer verminderten MGMT-Proteinexpression führt (Kaina et al. 2007). Daher spielt der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors eine wichtige Rolle für den Erfolg einer Therapie. Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor und somit einem Verlust der MGMT-Expression profitieren stärker von einer TMZ Behandlung als Patienten ohne diese Methylierung (Hegi et al. 2013).

Für GBM-Rezidive gibt es keine Standardtherapie. Angewandt werden neben den zuvor erwähnten Therapien wie TMZ beispielsweise auch Nitrosoharnstoffe wie Carmustin und Lomustin oder der Antikörper Bevacizumab (Weller et al. 2013).

1.4. Tumor Treating Fields

Tumor Treating Fields (TTFields) sind elektrische Wechselfelder mit geringer Intensität (1-3 V/cm) und mittlerer Frequenz (100-400 kHz) (Kirson et al. 2004).

Elektrische Wechselfelder können eine Vielzahl verschiedener Wirkungen auf lebendiges Gewebe haben. Bei sehr niedrigen Frequenzen (<1 kHz) stimulieren elektrische Felder erregbare Zellen wie Neuronen oder Myozyten und führen zu einer Membrandepolarisation (Palti 1966). Dadurch kann auch das Knochenwachstum stimuliert und die Frakturheilung beschleunigt werden (Bassett 1985). Nur deutlich höhere Frequenzen (>1 MHz) erzeugen Wärme, die Zellen schädigen kann (Polk & Postow 1995).

Vier verschiedene humane GBM-Zelllinien, nämlich GAMG, U-138 MG, U-343 MG und U-87 MG wurden 100-400 kHz TTFields ausgesetzt und die maximale Wirkung auf die Zellproliferation wurde bei 200 kHz beobachtet (Kessler et al. 2018), obwohl auch 100 kHz zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation führte (Kirson et al. 2004; Kirson et al. 2007).

Es sind zwei Mechanismen bekannt, wie TTFields auf die Tumorzellen wirken. Während der Mitose verteilt die Spindel die verdoppelten Chromosomen gleichmäßig auf zwei Tochterzellen. Aus Tubulin-Untereinheiten, polaren Molekülen, bilden sich die Spindelfasern, die sich an die Schwester-Chromatiden binden (Abb. 1 A) (Kong et al. 2016). Die Finite-Elemente-Analyse zeigt, dass TTFields selektiv die Zellteilung beeinflussen, während sich nicht teilende Zellen nicht betroffen sind. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen dem inhärenten Dipol in der Mitose ist das Mikrotubuli-Protein-Dimer parallel zur Richtung des angelegten elektrischen Feldes und nicht zur Mikrotubuli-Achse ausgerichtet. TTFields unterbrechen dadurch die Polymerisation und behindern so die Spindelfaserbildung. Dies führt zu einem anschließenden mitotischen Arrest, was zur Apoptose oder mitotischen Katastrophe führen kann (Abb. 1B) (Luo et al. 2020).

In der Anaphase beginnt sich die Zellmembran zusammenzuziehen und die beiden

Chromosomensätze werden zu den beiden Polen der Zelle gezogen. Anschließend bildet sich in der Telophase eine Teilungsfurche und die beiden Tochterzellen werden vollständig getrennt (Zytokinese). Die mitotische Furche ist eine schmale Membranfuge. An dieser schmalen Zellmembrangrenze bilden TTFields ein sanduhrförmiges, ungleichmäßiges elektrisches Feld unterschiedlicher Feldstärke. Die höchste elektrische Feldstärke befindet sich in der Mitte der Stenose. Polare Moleküle und Zelldipole werden von den starken elektrischen Feldkräften beeinflusst und bewegen sich in die Teilungsfurche. Dieser Prozess wird als Dielektrophorese bezeichnet und führt zu struktureller Unordnung und Dysfunktion in der Zelle und schließlich zur Apoptose (Abb. 1 B). Somit können TTFields die Dielektrophorese in Zellen im mittleren und späten Stadium der Mitose induzieren, was ebenfalls zur Störung der Mitose führt und letztlich das Tumorwachstum hemmt (Luo et al. 2020).

Laut Li et al. sind diese zwei Hypothesen über den Wirkungsmechanismus der TTFields limitiert. Es wird vorgeschlagen, dass die TTFields Ionenkanäle beeinflussen, indem sie eine Veränderung des Zellmembranpotenzials bewirken, wodurch es zu einem vermehrten Calcium-Influx kommt, was wiederum die Bildung der Spindelfasern negativ beeinflusst (Li et al. 2020).

Bei der Behandlung der GBM mit TTFields erfolgt die Applikation über vier Transducer Arrays, welche auf der rasierten Kopfhaut der Patienten angebracht werden. Um eine signifikante Wirkung zu erreichen, soll die Anwendung mindestens 18 h am Tag durchgeführt werden (Stupp et al. 2017). Im Gegensatz zu den oft starken systemische Nebenwirkungen der Chemotherapie treten bei Patienten unter TTFields Therapie lediglich lokale Hautirritationen unter den Transducer Arrays auf (Stupp et al. 2012; Stupp et al. 2017).

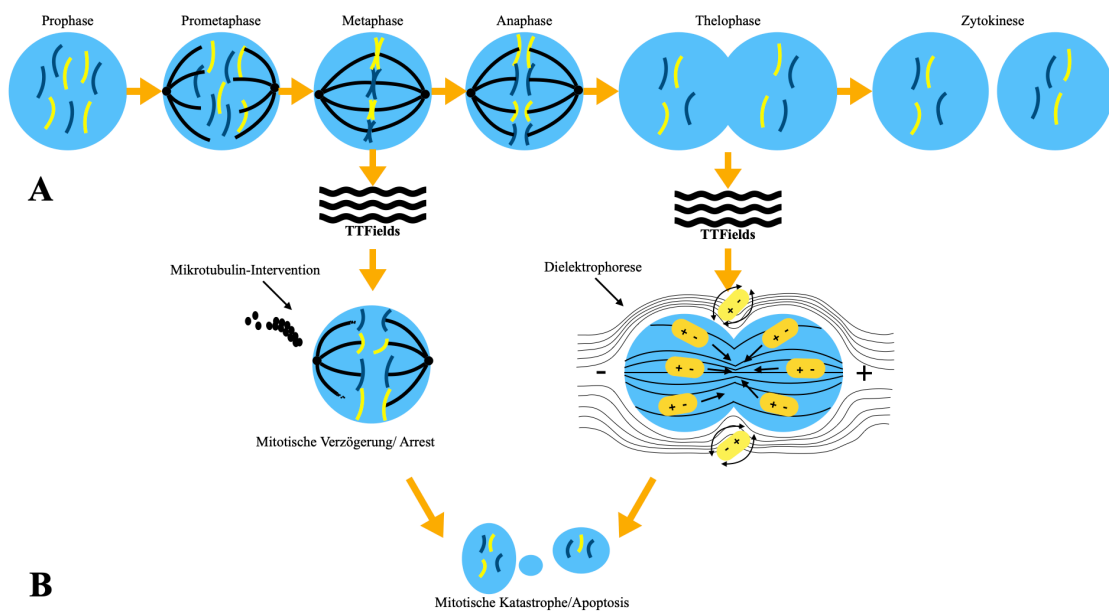


Abb. 1. (A) Der Zellteilungszyklus. (B) TTFIELDS Wirkungsmechanismen auf Tumorzellen.

Verhinderung der Bildung von Microtubuli und Dielektrophorese nach Apoptose (modifiziert nach Arvind et al. 2021). (Eigene Abbildung)

Diese Behandlungsmodalität hat in zwei unterschiedlichen Studien (EF-11 und EF-14) als alleinige Therapie oder in Kombination mit TMZ im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung zu einem vergleichbaren bzw. verlängerten Gesamtüberleben (OS) der Patienten geführt (Mehta et al. 2017; Stupp et al. 2012).

Die 2017 publizierte EF-14 Studie zeigte, dass die mediane OS bei Patienten der TTFIELDS in Kombination mit Chemotherapie im Vergleich zur Chemotherapie-Gruppe signifikant länger war (11,8 vs. 9,2 Monate; $p=0,049$). Die Patienten, die nach einem ersten Rezidiv mit TTFIELDS behandelt wurden, erreichten ein OS von 20 Monaten (Kesari et al. 2017). Außerdem zeigten TTFIELDS ein niedriges Toxizitäts-Sicherheitsprofil ohne gerätebedingte unerwünschte Ereignisse des Grades 3 und 4 (Fabian et al. 2019).

1.5. Blut-Hirn-Schranke

Anatomie

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine hochkomplexe und dynamische Struktur. Sie ist die selektive physiologische Barriere zwischen den Flüssigkeitsräumen der Gefäße und dem zentralen Nervensystem (ZNS). Die BHS wurde erstmals von dem deutschen Mikrobiologen Paul Ehrlich 1885 beschrieben (Ehrlich, 1885). Der Begriff BHS wurde zum ersten Mal 1922 von Stern und Gaultier verwendet (Stern et al. 1922). Die BHS kommt in allen Hirnregionen vor, mit Ausnahme der zirkumventrikulären Organe, einschließlich Area postrema, mediane Eminenz, Neurohypophyse, Zirbeldrüse, subfornisches Organ und Lamina terminalis.

Die BHS setzt sich überwiegend aus mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns (Brain Microvascular Endothelium Cells BMVEC), Perizyten, Astrozyten und der Basalmembran (BM) zusammen. Die BMVEC sind ein spezialisierter Typ von Endothelzellen. Es wird geschätzt, dass die Kapillaren im menschlichen Gehirn eine Gesamtlänge von rund 650 km und eine Gesamtoberfläche von etwa 10-20 m² aufweisen (Pardridge et al. 1990). Strukturell haben BMVEC im Vergleich zu peripheren Endothelzellen mehr Mitochondrien und weniger pinozytotische Vesikel bzw. Fenestrationsen (Fenstermacher et al. 1988). Funktionell bilden BVMEC ein wesentlich dichteres kapillares Endothel im Vergleich zum peripheren Endothel.

Die BMVEC sind durch spezifische tight junction (TJ) und adherens junction (AJ) Proteine eng miteinander verbunden. Dadurch wird der paravaskuläre Transport der hydrophilen Moleküle verhindert. Die BMVEC werden von der kapillaren Basalmembran (BM) und Astrozyten-Endfüßen umhüllt. Die Astrozyten sind die am häufigsten vorkommenden Gliazellen im Gehirn und bedecken mehr als 99 % der Gefäßoberfläche (Winkler et al. 2011). Sie leisten damit einen Beitrag zur Integrität der BHS (Cohen-Kashi Malina et al. 2009).

Zwischen BMVEC und astrozytären Endfüßen sind die Perizyten in die BM eingebettet (Sá-Pereira et al. 2012).

Die BM bildet sich durch Sekretion extrazellulärer Matrix Proteine von Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten (Baeten & Akassoglou 2011). Sie hat zahlreiche wichtige Funktionen, wie die strukturelle Unterstützung, Zellverankerung und Signaltransduktion (Baeten & Akassoglou 2011; Kim et al. 2011; Hynes 2009). Im Gehirn sind zwei Arten von BM beschrieben: eine endotheliale BM und eine parenchymale BM, die durch Perizyten getrennt sind (Hallmann et al. 2005). Unter physiologischen Bedingungen sind die beiden BM-Schichten nicht unterscheidbar und sehen in Bereichen ohne Perizyten mikroskopisch wie eine Schicht aus (Ruben et al. 1994; Yurchenco 2011). Die vaskuläre BM hat eine Dicke von 20-200 nm und besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk, das sich vorwiegend aus Proteinen wie Laminen, Kollagen IV-Isoformen, Nidogene und Heparansulfat-Proteoglykanen zusammensetzt (Engelhardt et al. 2009; Timpl 1989). Das Kollagen IV, wie auch Laminin und Fibronectin, beeinflussen die Barriereigenschaften von Endothelzellen, wie die erhöhte transepitheliale bzw. transendotheliale elektrische Resistenz (TEER), was in *in vitro* Modellen gezeigt wurde (Tilling et al. 1998). Kollagen IV ist der am häufigsten vorkommende Bestandteil der BM. Verschiedene angeborene Mutationen von Kollagen IV, sowohl in BMVEC, als auch in Perizyten führen zu zerebrovaskulären Defekten und intrazerebralen Blutungen mit unterschiedlichem Schweregrad, was auf eine entscheidende Rolle von Kollagen IV für die vaskuläre Integrität hinweist (Gould et al. 2006; Gould et al. 2005; Jeanne et al. 2015; Jeanne et al. 2012).

Die Perizyten haben eine wichtige Rolle in der Angiogenese, der strukturellen Integrität und der Differenzierung intrakranieller Gefäße (Allt et al. 2001; Balabanov et al. 1996; Bandopadhyay et al. 2001; Lindahl et al. 1997). Sie regulieren die Aktivität des P-Glykoproteins der Endothelzellen, das ein ATP-abhängiges Transportprotein ist. Es führt einen aktiven Rücktransport von vielen relativ großen (>400 Da) hydrophoben Substanzen durch. Damit ist es für die sehr schlechte Penetration in das Gehirn von diversen Therapeutika verantwortlich, die nicht zur Behandlung von ZNS-Erkrankungen eingesetzt werden können (Schinkel 1999).

Des Weiteren beeinflussen die Perizyten die Permeabilität der BMVEC (Edelman et al. 2006). Der Grad der Bedeckung der Kapillaren mit Perizyten im Gehirn korreliert negativ mit der kapillaren Permeabilität (Armulik et al. 2011). Diese Funktion der Perizyten ist abhängig von ihrem Differenzierungsstatus. Die TEER-Messung der Barriere-Integrität von Endothelzellen ergab, dass α -smooth muscle actin-negative (α -SMA) Perizyten die Barriere-Integrität stabilisieren, während α -SMA-positive Perizyten die Barriere-Integrität vermindern (Thanabalasundaram et al. 2011). Daher sollte der Differenzierungsstatus von Perizyten berücksichtigt werden, wenn sie in *in vitro* Modellen der BHS verwendet werden.

Außerdem wurde auch beschrieben, dass der Verlust von Perizyten *in vivo* zu einem Abbau der BHS führt (Armulik et al. 2010; Bell et al. 2010).

Darüber hinaus sind Perizyten und Astrozyten wichtig für die Regulation des Endothelphänotyps durch Mechanismen, die noch nicht vollständig verstanden sind, die aber Zell-Zell-Kontakte über lösliche Faktoren und möglicherweise auch direkte Kontakte beinhalten (Abbott 2014; Abbott et al. 2006). Die Endothelzellen im Gehirn und die sie umgebenden Begleitzelltypen bilden somit eine "neurovaskuläre Einheit" (NVU). Dieser Begriff spiegelt die spezialisierte und einzigartige zelluläre Struktur des Mikrogefäßsystems des Gehirns wider.

Tight junction Proteine

TJ bestehen aus integralen Membranproteinen, nämlich Claudin-1 und Claudin-5, Occludin und Verbindungsadhäsionsmolekülen, Junctional Adhesion Molecules (JAM), zytoplasmatischen akzessorischen Proteinen, darunter Zonula Occludens (ZO)-1, ZO-2, ZO-3, Cingulin und anderen verbindenden Membranproteinen wie Aktin. Aktin ist primär ein Zytoskelettprotein, das für die Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität des Endothels zuständig ist.

TJ-Protein-Konzentrationen korrelieren negativ mit der parazellulären Permeabilität und der Verlust ihrer Expression führt zu parazellulärer Leckage (Kniesel et al. 2000). Dies

deutet darauf hin, dass TJ-Proteinen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der parazellulären Permeabilität zukommt.

Claudin

Claudin ist ein 22-34 kDa Phosphoprotein. Die Claudin-Proteinfamilie besteht aus 27 Mitgliedern (Mineta et al. 2011). Diese Proteingruppe wurde 1998 als integraler Bestandteil der TJ bei Mäusen und Menschen identifiziert (Furuse et al. 1998). Die Bezeichnung Claudin kommt vom lateinischen *claudere*, was "schließen" bedeutet. Basierend auf der Sequenzanalyse der Claudin-Proteine der Maus, wurde später eine ähnliche Aufteilung für die menschlichen Proteine vorgeschlagen. Claudin-1-9, 14, 17, 19 und 20, die eine sehr große Sequenzhomologie haben, sind die klassischen Claudine und Claudin-10-12, 15, 16, 18 und 21-24 die nicht-klassischen Claudine (Krause et al. 2008; Lal-Nag et al. 2009).

An der BHS ist Claudin-5 das am stärksten angereicherte TJ-Protein (Greene et al. 2019). Es ist speziell in den Endothelzellen des Gehirns, sowie der Lunge (Morita et al. 1999), der Leber (Rahner et al. 2001), der Niere (Reyes et al. 2002) und der Haut (Morita et al. 2003) lokalisiert, während es im Magen in der Epithelzellschicht exprimiert wird (Rahner et al. 2001).

Claudin-5 hat vier Transmembrandomänen. Das Carboxylende der Claudine bindet an zytoplasmatische Proteine einschließlich ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Furuse et al. 1999).

Claudin-5 hat eine parazelluläre Dichtungsfunktion durch seine Verbindung mit Claudin-Proteinen auf benachbarten Endothelzellen. Somit stellen diese Proteine einen Mechanismus der Zell-Zell-Adhäsion dar, indem sie mit anderen TJ-Proteinen auf gegenüberliegenden Zellmembranen an so genannten "kissing points" interagieren, um den interzellulären Abstand auf nahezu Null zu reduzieren. Claudine sind zuständig für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Gefäßsystems und verhindern die Diffusion von gelösten Substanzen und Ionen durch den interzellulären Raum. Ein hoher elektrischer Widerstand von etwa 1 500-2 000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ist das Ergebnis dieser dichten Konstruktion (Abbott et al. 2010). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Bezug

eine Rolle in der Motilitätsregulation von Tumorzellen spielt. Dies lässt vermuten, dass Bezug zur Ausbreitung von Hirnmetastasen beitragen könnte (Jia et al. 2014).

Occludin

Das zweite wichtige TJ-Protein ist Occludin. Es ist ein 55-65 kDa Phosphoprotein, das sich auch direkt an die zytoplasmatischen ZO-Proteine bindet. Die Expression von Occludin ist in Hirnendothelzellen im Vergleich zu nicht-neuralen Geweben viel höher. Occludin spielt als regulatorisches Protein für die parazelluläre Permeabilität eine wichtige Rolle (Hirase et al. 1997). Sein Expressionsgrad korreliert mit der BHS Permeabilität (Arshad et al. 2011). Der Abbau der BHS in Gewebe, welches Hirntumore umgibt, erfolgt unter gleichzeitigem Verlust der Occludin-Expression (Papadopoulos et al. 2001).

ZO-Proteine

Die drei ZO-Proteine, ZO-1, -2 und -3, sind multidomäne Polypeptide. Sie sind wichtige Regulatoren des TJ-Zusammenbaus und dienen als Gerüstproteine, die die TJ-Proteine, die innerhalb der Zellmembran verankert sind, mit dem Aktinzytoskelett verbinden und verankern (Fanning et al. 2009, Itoh et al. 1997).

ZO-1 ist ein peripheres Membranphosphoprotein mit einer polare Masse von 220 kDa (Stevenson et al. 1986), das in allen Epithel- und Endothelzellen sowie auch in Zellen ohne TJ exprimiert wird (Howarth et al. 1992). ZO-1 dient als Erkennungsprotein für die TJ- Platzierung und als Unterstützung für Signaltransduktionsproteine (Youakim & Ahdieh 1999). Deshalb führt der Verlust von ZO-1 möglicherweise zu einer Desorganisation der TJ (Date et al. 2006).

JAM

JAM sind 40 kDa groß und gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Sie bestehen aus dem Membranprotein Cadherin, das sich über das Intermediärprotein Catenin mit dem Aktin des Zytoskeletts verbindet, um Zell-Zell-Kontakte zu bilden (Stamatovic et al. 2016). PECAM-1 ist ein JAM, das an der Transmigration von Monozyten durch die BHS beteiligt ist und mit anderen JAM an der parazellulären Permeabilität und der Leukozytenmigration durch die BHS mitwirkt (Arshad et al. 2011).

Transport durch die Blut-Hirn-Schranke

Die BHS schützt das Gehirn vor schädlichen Stoffen, die im Kreislaufsystem zirkulieren. Substanzen können die BHS durch parazellulären Transport oder durch Transzytose durchqueren. Beim parazellulären Transport werden sie zwischen den Endothelzellen hindurchgeleitet. Bei der Transzytose werden die Substanzen transzellulär transportiert, indem sie über die Luminalseite der Endothelzelle in das Zytoplasma und von dort über die Abluminalseite der Endothelzelle in das Interstitium des Gehirns gelangen.

Mehr als 90 % aller kleinmolekularen Medikamente und fast 100 % aller größeren Therapeutika (> 1 000 Da) werden daran gehindert, die BHS zu durchqueren (Pardridge et al. 2005), auch 98 % der potenziellen Neurotherapeutika, die aus Proteinen und Peptiden bestehen (500-1 000 Da) (Prabhakarandian et al. 2013).

Darüber hinaus werden die wenigen Medikamente, die in der Lage sind, die Luminalseite der BHS zu überwinden, durch Efflux-Transporter, wie z.B. P-Glykoprotein 1, einem Mitglied der Familie der ATP-abhängigen Transportproteine, wieder aktiv in das Gefäßsystem zurücktransportiert (van Tellingen et al. 2015). Diese aktiven Efflux-Transporter können ein breites Spektrum von Verbindungen erkennen (> 60% aller auf dem Markt befindlichen Medikamente) und zur Arzneimittelresistenz beitragen (Demeule et al. 2002). Es gibt auch Hinweise darauf, dass der metabolische Abbau eine Rolle bei der Verringerung der Medikamentenakkumulation im Gehirn spielt (Pardridge et al. 2005).

Die Transzytose erfolgt durch passive und aktive Mechanismen. Der passive Transport durch die BMVEC wird durch physikalisch-chemische Eigenschaften, wie Molekulargewicht, elektrische Ladung und Lipophilie reguliert und ist typischerweise auf kleine, lipophile Moleküle mit einer Größe von weniger als 500 Da beschränkt (Pardridge et al. 2012). Sauerstoff- und Kohlendioxid-Moleküle diffundieren frei über Plasmamembranen, je nach vorherrschendem Konzentrationsgradienten (Grieb et al. 1985). Auch kleine lipidlösliche Moleküle (< 500 Da) wie Alkohol, Drogen und Antikonvulsiva können die BMVEC relativ leicht überwinden.

Für Nährstoffe und Proteine, die größer und weniger lipophil sind, sind aktive Transportmechanismen über spezifische Rezeptoren und Transporter erforderlich, welche sich in Abhängigkeit der subzellulären Verteilung in drei Haupttypen einteilen lassen.

Der erste Typ sind bidirektionale Rezeptoren und Transporter, die sowohl auf der luminalen als auch auf der abluminalen Seite der BMVEC exprimiert werden. Sie dienen dazu, den Nährstofftransport zu erleichtern. Dazu gehören der Glucose-Transporter-1 (Glut-1), Mono-Carboxylat-Transporter-1, L1-Aminosäure-Transporter und der γ^+ kationische Aminosäure-Transporter. Sie transportieren jeweils Glukose, Laktat und große neutrale und kationische essentielle Aminosäuren über die BHS (Redzic 2011).

Zum zweiten Typ gehören die unidirektionalen Rezeptoren und Transporter, die auch auf beiden Seiten der BMVEC exprimiert werden. Diese Gruppe verschiebt Moleküle entweder in oder aus dem Gehirn, jeweils nur in eine Richtung. Der Transferrin- und der Insulin-Rezeptor vermitteln die Endozytose von Transferrin und Insulin, was zur Akkumulation dieser Liganden im Gehirn führt (Pardridge et al. 1985; Zhang & Pardridge 2001).

Die dritte Gruppe wird entweder auf der luminalen oder der abluminalen Seite der BMVEC exprimiert, wie z. B. das β -Glykoprotein, welches vorwiegend auf der luminalen Seite der BMVEC zu finden ist (van Vliet et al. 2005). Diese ungleichmäßig

verteilten Rezeptoren und Transporter wirken an der Polarität der BMVEC mit und sind in den unidirektionalen Transport von Substanzen involviert. Diese Transporter erkennen ein großes Spektrum lipophiler Substrate und pumpen sie aus dem Gehirn in das Kapillarlumen (Giacomini et al. 2010). Durch Verhinderung des Eintritts der Medikamente in das ZNS-Gewebe verursachen sie Multiresistenzen von Chemotherapeutika (Gottesman et al. 2002).

Wenn die Integrität der BHS beeinträchtigt ist, werden die TJ zwischen den Endothelzellen geöffnet und damit erhöht sich die Permeabilität der Barriere. Dies ermöglicht wiederum den Fluss von größeren Molekülen in das ZNS (Luissint et al. 2012).

1.6. Strategien zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Um die BHS zu überwinden und die Anreicherung von Arzneimitteln im Gehirn zu ermöglichen, wurden verschiedene Techniken entwickelt. Diese reichen von der Störung der Barrierefunktion selbst bis zur Modifizierung der transportierten Stoffe und ihrer Träger.

Verwendung finden hierbei osmotische bzw. chemische Störungen der BHS, verstärkte Transzytose (z.B. rezeptorvermittelte Mechanismen), Nanopartikel bzw. Nanoröhrchen, zellvermittelte Verabreichung und ultraschallinduzierte Öffnung der BHS. Interstitielle Wafer bzw. Mikrochips und katheterverstärkte lokale Verabreichung von Arzneien umgehen die Barriere vollständig (Hersh et al. 2016).

Osmotischer Mechanismus

Osmotische Agenzien wie Mannitol, Arabinose und Harnstoff wirken über verschiedene Mechanismen auf die BHS. Zum einem wird Wasser aus den BMVEC in das Blutgefäßlumen verlagert, was zu einer Schrumpfung der Zellen führt. Außerdem kommt es dadurch zu einer Vasodilatation, wodurch die Endothelzellmembran gedehnt wird. Zum anderen führen Wechselwirkungen zwischen Aktin und Cadherin über einen kalziumabhängigen Mechanismus zur Kontraktion des Endothelzell-Zytoskeletts. Jeder dieser drei Mechanismen belastet die TJ-Proteine, was schließlich zu einer Verbreiterung der Zell-Zell-Verbindung führt und einen parazellulären Transport in das Hirnparenchym ermöglicht (Rapoport et al. 1986). Ein Nachteil ist das Auftreten von transienten Hirnödemen mit einem Anstieg des Hirnwasserdrucks um 1,5 % (Rapoport et al. 1980). Die osmotische Öffnung der BHS ist unspezifisch und findet auch im normalen Hirngewebe statt. Dadurch können Eiweißbestandteile des Blutes in das Hirnparenchym gelangen, darunter Albumin, das für Nervengewebe toxisch ist (Nadal et al. 1995). Weitere Nebenwirkungen sind Krampfanfälle und neurologische Defizite.

Chemischer Mechanismus

Für die chemische Öffnung der BHS werden vasoaktive Substanzen eingesetzt, die eine vorübergehende Entzündungsreaktion in den Endothelzellen hervorrufen. Alkylglycerine wurden untersucht, weil sie sich durch eine nichtionische Amphiphilie auszeichnen, die es ihnen erlaubt, sich schnell in die Endothelzellmembran zu integrieren und diese zu destabilisieren, was zu einer Öffnung der BHS für 3-15 min führt (Lee et al. 2002). Bradykinin erhöht selektiv die Permeabilität der BHS im Bereich eines Hirntumors (Nomura et al. 1994). Es bindet an die B2-Rezeptoren auf den Endothelzellen und führt zu einem vorübergehenden Anstieg des zytosolischen Kalzium, das die Stickstoffmonoxid-Synthase aktiviert, ein Enzym, das in den Gefäßen von Tumoren häufig vorkommt (Lowry et al. 2013). Das Endergebnis ist ein Anstieg von Stickstoffmonoxid, einem Signalmolekül, welches eine Vasodilatation und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität bewirkt (Durán et al. 2013). Ein synthetisches Bradykinin-Analogon, RMP-7, zeigt ähnliche Effekte mit höherer Wirksamkeit, größerer Spezifität für den B2- Rezeptor (Bartus et al. 1996) und einer höheren Resistenz gegen Abbau, was zu einer höheren Halbwertszeit führt und eine intravenöse Verabreichung ermöglicht. RMP-7 ist daher der am häufigsten untersuchte Wirkstoff für die chemische Öffnung der BHS (Emerich et al. 2001). Allerdings konnten die früheren Untersuchungen in einer multizentrischen plazebokontrollierten Studie, in der das RMP-7/Carboplatin-Schema weiterentwickelt wurde, nicht repliziert werden und die Kombination erwies sich als unwirksam (Prados et al. 2003).

Rezeptorvermittelter Mechanismus

Eine andere Strategie zur Überwindung der BHS ist die Verstärkung des transzellulären Transports. Wirkstoffe werden mit Liganden oder Antikörpern konjugiert, die die Rezeptor-vermittelte Transzytose auslösen. Hier ist eine Vielzahl von Rezeptoren beteiligt, darunter der Insulinrezeptor, der Transferrinrezeptor und der Low-Density Lipoproteinrezeptor (LDL-R). Von Nachteil ist die geringe Effizienz, sodass nur geringe Konzentrationen transportiert werden (Boado et al. 2013).

Nanopartikel basierter Mechanismus

Vielversprechender, aber auch komplexer, sind Nanopartikel-Träger. Die verwendeten Nanopartikel haben mehrere einzigartige Eigenschaften, wie z.B. eine verbesserte Arzneimittellöslichkeit, die Fähigkeit zur Multifunktionalität, ein kontrolliertes Wirkstofffreisetzungsprofil und das Potenzial für ortsspezifisches Targeting (Alam et al. 2010). Die verschiedenen Klassen von Nanopartikeln, darunter metallische, polymere und Lipid-Nanopartikel, durchqueren die BHS und gelangen ins Gehirn durch eine Vielzahl von endozytotischen Mechanismen (De Jong et al. 2008). Metallische Nanopartikel bestehen in der Regel aus anorganischen Materialien und umfassen Gold-, Silber- und Eisenoxidpartikel sowie metallische Allotrope von Nichtmetallen, wie Kohlenstoff-Fullerene. Metallische Nanopartikel sind typischerweise kleiner als Polymer- oder Lipid-Nanopartikel, was einen Vorteil hinsichtlich der Überwindung der BHS bietet. Sie können über verschiedene Wege ins Gehirn transportiert werden, darunter passive Diffusion, trägervermittelter Transport oder transsynaptischer Transport. Aber aufgrund der festen und dichten Struktur von metallischen Nanopartikeln können Medikamente nicht in ihnen eingekapselt werden, sondern müssen an ihre Oberflächen gebunden werden (Yang et al. 2010).

Im Gegensatz zu metallischen Nanopartikeln bestehen polymere Nanopartikel aus "weichen" Materialien der organischen Chemie. Polymere Nanopartikel sind weniger starr und dicht, sodass in sie Chemotherapeutika, Proteine, Nukleinsäuren und Kontrastmittel eingekapselt werden können. Es besteht auch ein hohes Maß an Flexibilität in Bezug auf die Anpassung ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften, einschließlich ihrer Größe, Oberflächenladung und des Aspektverhältnisses (Form) der Partikel, mit dem Ziel, die BHS effektiver zu durchqueren (Hersh et al. 2016). Die Endozytose ist der Hauptmechanismus, über den sie sich im Gehirn anreichern (Barbu et al. 2009). Dieser Weg wurde an kleinen polymeren Nanopartikeln aus Albumin oder Polybutylcyanoacrylat demonstriert (Park et al. 2009). Lipid-Nanopartikel oder Liposomen sind Vesikel aus amphiphilen Phospholipiden, die die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran nachahmen. Liposomen sind biokompatible Träger, die hydrophile,

hydrophobe und amphotere Arzneimittelmoleküle tragen können (Micheli et al. 2012). Zu den grundlegenden Mechanismen des liposomalen Transports über die BHS gehören adsorptionsvermittelte und Rezeptor-vermittelte Transzytose.

Die beschriebenen metallischen, polymeren und Lipid-Nanopartikel durchqueren die BHS typischerweise über transzelluläre Wege. Die Konjugation der Nanopartikel mit einer Targeting-Einheit erleichtert diese Passage (Jones et al. 2007).

Zellvermittelte Verabreichung von Nanopartikeln

Um die Verfügbarkeit von Medikamenten im Gehirn weiter zu verbessern, können Nanopartikel auch mit anderen neuen Verabreichungsstrategien wie z.B. mit Zellen kombiniert werden.

Für die zellbasierte BHS-Überwindung können Immunzellen bzw. neurale sowie mesenchymale Stammzellen verwendet werden. Diese Zelltypen sind mobil und wandern über einen entzündungsvermittelten Weg aktiv in das ZNS ein. Eine Reihe von Vorteilen machen diese Zellen zu einer attraktiven Option für die Verabreichung von Therapeutika in das ZNS (Zhang et al. 2015). Immunzellen wandern über Endothelbarriere, einschließlich der BHS, durch Diapedese ein. Sie binden sich vorübergehend an die Endothelzellen, rollen an ihnen entlang und transmigrieren schließlich durch Interaktionen mit Integrinen (Zelladhäsionsmolekülen (z.B. VCAM-1 (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1) und ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)) und Selektinmolekülen (z.B. P-Selektin-Glykoprotein-1). Problematisch ist die potenziell toxische Wirkung der Therapeutika auf den Zellträger selbst (Steinfeld et al. 2006). Folglich muss das therapeutische Mittel entweder für die Trägerzelle ungiftig sein oder letztere muss von der toxischen Wirkung abgeschirmt werden, bis sie das Ziel erreicht hat. Die räumliche und zeitliche Kontrolle über die Freisetzung des Therapeutikums durch die Zelle stellt eine weitere Herausforderung für die zellvermittelte Abgabe dar (Batrakova et al. 2011). Zudem kann die Ladeeffizienz von Therapeutika in Zellträgern gering sein, sodass für die Abgabe therapeutischer Dosen eine große Anzahl von Zellen erforderlich ist (Batrakova et al. 2011).

Die zellvermittelte Anreicherung von Medikamenten kann durch Nanopartikel-Träger verstärkt werden. Sie bieten die Möglichkeit, viele Hürden für eine erfolgreiche zellvermittelte Therapie zu überwinden. Durch die Fähigkeit von Makrophagen und Monozyten Nanopartikel zu phagozytieren, können diese effektiv mit Therapeutika beladen und in das Innere der Zelle transportiert werden (Panyam, 2003). Die Nanopartikel schützen den Zellträger zumindest vorübergehend vor seiner Fracht. Allerdings beeinträchtigen ihre Eigenschaften die Phagozytose. Nanopartikel mit positiv geladenen Oberflächenresten werden schneller endozytiert als neutrale oder negativ geladene Partikel, größere Partikel werden effizienter phagozytiert als kleinere Partikel und Partikel mit scharfen Kanten werden von Makrophagen schneller endozytiert als solche mit stumpfen Kanten (Nowacek et al. 2009; Champion et al. 2007).

Magnetische Nanopartikel wurden verwendet, um die Akkumulation von mit Medikamenten beladenen Immunzellen im ZNS zu verstärken. So wurden Monozyten mit magnetischen Liposomen beladen, die das entzündungshemmende Medikament Diclofenac enthalten. Nach der Endozytose wurde ein Magnet in der Nähe des Kopfes des Tieres platziert, um die Wanderung der Monozyten zu manipulieren und dadurch die Dosis des Medikaments im Gehirn signifikant zu erhöhen (Jain et al. 2003).

Ultraschall-induzierte Öffnung der BHS

Es wurde gezeigt, dass fokussierter Ultraschall (FUS) die BHS reversibel öffnen kann. Aktuell ist der Ultraschall als diagnostisches Hilfsmittel weit verbreitet, obwohl er zuerst für seine therapeutischen Anwendungen erforscht wurde. Bereits in den 1950er Jahren wurden die Auswirkungen von Ultraschall auf die BHS erkannt. Ballantine und Kollegen haben in Experimenten eine starke Trypanblau-Färbung im Hirngewebe nach einem defokussierten Ultraschallstrahl aufgezeigt, ohne dass es Anzeichen einer diskreten Läsion gab (Ballantine et al. 1960). Aufgrund der Strahlverzerrung und Abschwächung durch den Schädelknochen, die ein Knochenfenster zur Fokussierung des Ultraschalls erforderte, wurde FUS als therapeutisches Hilfsmittel jedoch weitgehend aufgegeben. Erst in den 1990er Jahren wurde dieses Problem überwunden,

als ein hemisphärisches phased-array von Schallköpfen in Verbindung mit einer Software entwickelt wurde, die mit Hilfe einer koregistrierten Computertomographie (CT) die vom Schädel erzeugten Phasenaberrationen vorhersagt und kompensiert (Hynynen et al. 1998). Dadurch kann akustische Energie nicht-invasiv durch den intakten Schädel fokussiert werden.

Außerdem können Temperaturänderungen am akustischen Fokus mit Magnetresonanz (MR)-Thermometrie überwacht werden (Cline et al. 1994). Hierdurch wurde das Interesse an potenziellen neurologischen Anwendungen von FUS wiedererweckt. Die kurzen FUS Pulse erzeugen hauptsächlich mechanische Effekte mit Temperaturerhöhungen von nur 4-5 °C. Daher wurde FUS in der Forschung für den Transport von Medikamenten über die BHS eingesetzt.

In frühen Studien versuchte man die BHS allein durch FUS zu stören. Deshalb waren hohe Intensitäten erforderlich und die Auswirkungen auf die Gewebeintegrität waren variabel. Die Einführung intravenös verabreichter lipid- oder proteinumhüllter Gasmikrobläschen mit einem Durchmesser von 1-10 µm als Ultraschallkontrastmittel war ein entscheidender Schritt, um eine bessere Kontrolle der BHS-Öffnung zu erzielen (Hynynen et al. 2001). Die Mikrobläschen akkumulieren sich typischerweise in der Nähe von Kapillarwänden, wo sie bei gepulster Ultraschallexposition mit niedrigen Frequenzen und Druckamplituden eine stabile Kavitation bilden. Die intravenösen Mikrobläschen induzieren über verschiedene Mechanismen eine transiente, reversible BHS Öffnung. Die aus der FUS-Applikation resultierenden Oszillationen führen zur mechanischen Überlastung der TJ-Proteine und erzeugen dadurch einen parazellulären Transportweg. Elektronenmikroskopisch zeigte sich die Reduktion mehrerer TJ-Proteine, darunter Claudin-5, Occludin und ZO-1 (Sheikov et al. 2008). Andererseits wurden auch transzelluläre Wege identifiziert. Mehreren Studien zeigten die transiente Bildung von Kanälen und Fenestrationen innerhalb der Endothelzellmembran, ein Prozess, der als Sonoporation bezeichnet wird und der möglicherweise zur Transzytose über die BHS beiträgt (Sheikov et al. 2004; Meijering et al. 2009). Außerdem hat die Multiphotonen-Bildgebung gezeigt, dass die Sonikation zu einer vorübergehenden

Vasokonstriktion führt, bevor ein Tracer austritt, was darauf hindeutet, dass eine vorübergehende Ischämie zur BHS Störung führen kann (Raymond et al. 2007). Mit Platin- oder Palladiumverbindungen beladene Mikrobläschen zeigten *in vitro* in Verbindung mit FUS eine hohe Wirksamkeit gegenüber GBM-Zellen (Schulz et al. 2019).

Zusammenfassend kann man sagen, dass FUS zwar die BHS lokal beeinträchtigen kann, dazu aber Ultraschallkontrastmittel benötigt und es zu Gewebeschädigungen kommen kann (Kinoshita et al. 2006; Choi et al. 2005; Mesiwala et al. 2002). Neue Methoden, mit denen die BHS vorübergehend lokal kontrolliert geöffnet werden kann, um eine Anreicherung von Medikamenten im Gehirn zu ermöglichen, sind also weiterhin wünschenswert. Sie sollten nicht nur effizient, sondern auch sicher sein.

BHS-Problematik bei Hirnerkrankungen

Veränderungen der TJ-Proteine wurden mit einer erhöhten Permeabilität der BHS bei verschiedenen pathologischen Zuständen des Gehirns in Verbindung gebracht.

Claudin-5 ist das an der BHS am stärksten angereicherte TJ-Protein. Seine Dysfunktion ist in neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, neuroinflammatorischen Störungen wie Multipler Sklerose sowie psychiatrischen Störungen wie Depression und Schizophrenie (Greene et al. 2019) involviert.

Unter pathologischen Bedingungen, wie bei einer Hirntumorerkrankung, einem Schlaganfall oder einer Entzündung wurde in den Hirngefäßen der Verlust von Claudin-1, jedoch nicht von Claudin-5 nachgewiesen (Liebner et al. 2000a und 2000b; Lippoldt et al. 2000). Allerdings kam es 3 h und 24 h nach der Reperfusion nach zerebraler Ischämie zu einer signifikanten Reduktion von Claudin-5 und in der Folge zu einer Unterbrechung der BHS (Yang et al. 2007). Ein selektiver Verlust von Claudin-3 mit daraus resultierendem Hirnödem tritt bei Autoimmunenzephalitis und GBM auf (Wolbung et al. 2003). Veränderungen von Occludin und ZO-1 sind an der Dysfunktion der BHS bei ischämischen Hirnverletzungen beteiligt (Kago et al. 2006).

1.7. Blut-Hirn-Schranken Modelle

Die Etablierung von *in vitro* Modellen zur Untersuchung der BHS ist aufgrund der Speziesunterschiede, der geringen Verfügbarkeit von primären humanen Hirndothelzellen und der schlechten Barrierebildung durch immortalisierte BMVEC eine schwierige Aufgabe. Die weit verbreiteten primären Zellkulturen sind Hirndothelzellen aus einem Spektrum von Säugetieren wie Ratte, Maus, Schwein, Rind oder Mensch.

Es existieren verschiedene statische und dynamische BHS-Modelle menschlicher Endothelzellen. Die statischen Modelle können weiter in Monolayer- und Kokulturmodelle unterteilt werden (Bagchi et al. 2019). Aber es gibt kein perfektes *in vitro* Modell der BHS, das die *in vivo* Bedingungen vollständig reproduzieren könnte.

In statischen Modellen wird die durch den Blutfluss erzeugte Scherspannung nicht repliziert. Wie gut das Modell ist, kann durch funktionelle Analysen, wie z.B. TEER-Messung, Permeabilitätsassay, Expressionsanalyse von TJ-Proteinen sowie deren Lokalisation in der Zellmembran beurteilt werden.

Primäre oder niedrig passagierte BMVEC behalten viele biochemische und morphologische Eigenschaften bei, die die BHS *in vivo* charakterisieren, wie z.B. das Vorhandensein von TJ-Proteinen und die polarisierte Expression von Transportern, Rezeptoren und Enzymen (Cecchelli et al. 2007). Primäre menschliche Zellen sind aus ethischen Gründen in der Regel nicht verfügbar. Um dieses Problem zu umgehen, wurden immortalisierte humane Zelllinien erzeugt.

Obwohl zerebrale Endothelzellen die Hauptkomponenten der BHS sind, gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass andere Zelltypen wie Gliazellen, Perizyten und Neuronen eine wichtige regulatorische Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der BHS spielen. Daher wurden komplexe *in vitro* Kokulturmodelle entwickelt (Deli et al. 2005).

Der Unterschied zwischen statischen und dynamischen BHS Modellen ist, dass durch den Scherstress, der durch den Blutfluss unter physiologischen Bedingungen erzeugt wird, die Transporter- und TJ-Expression sowie die endotheliale Barrierefunktion beeinflusst wird (Tarbell et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass die Einbeziehung des Flusses in BHS Modelle z.B. die Expression von ZO-1 signifikant erhöht und die Durchlässigkeit des menschlichen BMVEC Zellmonolayers verringert. Es sind drei Haupttypen von dynamischen BHS-Modellen beschrieben worden, nämlich der Kegel-Platte-Apparat, das dynamische und das mikrofluide *in vitro* Modell (He et al. 2014).

Der Kegel-Platte-Apparat besteht aus Kegel- und Plattenviskosimetern, die die Scherkräfte aufbauen (Bussolari et al. 1998). Ein rotierender Kegel erzeugt eine Scherkraft, über die das Medium auf den endothelialen Monolayer übertragen wird. Die Winkelgeschwindigkeit und der Kegelwinkel bestimmen die erzeugte Scherspannung. Da diese nicht gleichmäßig über den Radius der Platten verteilt ist, wirken auf den endothelialen Monolayer je nach Lage unterschiedliche Scherspannungen. Dieses BHS-Modell verwendet nur einen Zelltyp. Auf Kokultur mit Astrozyten oder Perizyten wird wegen der Komplexität des Systems verzichtet, was die Signifikanz der Daten einschränkt (He et al. 2014).

Das dynamische *in vitro* Modell der BHS ist ein komplexeres System, wofür mikroporöse Hohlfasern verwendet werden (Cucullo et al. 2008). BMVEC und Astrozyten werden in der inneren (luminalen) bzw. äußeren (abluminalen) Seite der porösen Hohlfasern kultiviert. Das Kulturmedium wird dann mittels einer Pumpe variabler Geschwindigkeit durch das System geleitet, um eine Scherbeanspruchung zu erzeugen, die mit derjenigen unter physiologischen Bedingungen *in vivo* vergleichbar ist (Dewey et al. 1981; Koutsiaris et al. 2007). Um eine stabile Mikroumgebung aufrechtzuerhalten, wird ein gasdurchlässiges Rohrsystem für den Austausch von O₂ und CO₂ verwendet. Dieses dynamische *in vitro* Modell wurde zur Untersuchung der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen des ZNS verwendet, wie z.B. Ischämie-Reperfusion-induzierter Verletzungen und Epilepsie (Cucullo et al. 2008; Peppiatt et al. 2006; Cucullo et al. 2007). Es hat aber einige Nachteile. Es ist zu beachten, dass der

Raum zwischen BMVEC und Astrozyten 150 μm beträgt, entsprechend der Dicke der Hohlfaser (Cucullo et al. 2011). *In vivo* existiert solch ein Abstand nicht. Diese dicke Schicht kann die Paravasation von Immunzellen und anderen größeren Molekülen von der Luminalseite zur Abluminalseite beeinträchtigen. Zusätzlich erlaubt dieses System keine direkte Visualisierung der Endothelmorphologie im Luminalkompartiment und die erforderliche Zellzahl ($> 10^6$) sowie der technische Aufwand für den Bau dieses Modells ist relativ hoch. Darüber hinaus braucht man im Vergleich zu statischen Kokulturmodellen (3-4 Tage) auch mehr Zeit, um eine stabile TEER zu erreichen (9-12 Tage) (Cucullo et al. 2011; Cucullo et al. 2002).

Das mikrofluidische *in vitro* Modell wurde entwickelt, um die Einschränkungen des dynamischen *in vitro* Modells zu beheben (Booth et al. 2012a). Es verwendet eine dünnere Membran ($<10 \mu\text{m}$) und ermöglicht so die *in vivo* Struktur der BHS besser zu replizieren und Transmigrationsstudien durchzuführen. Aufgrund der Transparenz der Materialien ist eine nicht-destruktive Mikroskopie möglich. Auch wird eine stabile TEER bereits nach 3-4 Tagen erreicht. Ein weiterer Vorteil ist, dass nur eine geringe Zellmenge benötigt wird (Booth et al. 2011; Booth et al. 2012a, Booth et al. 2012b). Allerdings weisen solche mikrofluiden Modelle auch einige Unzulänglichkeiten, wie z. B. einen niedrigen TEER-Wert (250-300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) auf.

Obwohl keines dieser *in vitro* Modelle der BHS die *in vivo* Bedingungen vollständig reproduzieren kann, spart die Wahl eines geeigneten Modells nicht nur Zeit und Geld, sondern ermöglicht auch eine genaue Interpretation der Daten.

1.8. Vorarbeiten

In Untersuchungen mit immortalisierten kapillaren Endothelzellen des Kleinhirns der Maus (cerebEND) und *in vivo* mit Ratten wurde gezeigt, dass TTFIELDS von 100 kHz zu einer transienten und reversiblen Öffnung der BHS führen. Diese Ergebnisse haben eine große Bedeutung, wenn man an die Möglichkeit einer vorübergehenden Öffnung der BHS für die Verabreichung von Medikamenten zur Behandlung von ZNS-Erkrankungen denkt. Diese Vorarbeiten stellen eine erste Beobachtung von TTFIELDS-Effekten auf nicht-maligne, gesunde Zellen dar und wurden in einem monolayer Modellsystem der BHS durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die BHS-Öffnung auf einer Delokalisierung der TJ-Proteine Claudin-5 und Occludin basierte (Salvador et al. 2020). Nach Beendigung der TTFIELDS-Behandlung kehrten die Endothelzellen in ihre ursprüngliche Morphologie zurück und die BHS hatte sich nach 96 h vollständig erholt (Salvador et al. 2022). Die gleichen Effekte zeigten sich *in vivo* in Versuchen mit Ratten. TTFIELDS-Applikation von 100 kHz für 72 h führte zu einer signifikanten Anreicherung der eigentlich nicht BHS-gängigen Substanzen Evan's Blue (EB), TRITC-Dextran und Gadolinium im Rattengehirn.

Diese Vorarbeiten führten zu einem Therapieexperiment. Experimentelle, orthotope GBM wurden mit TTFIELDS in Kombination mit Paclitaxel behandelt. Die TTFIELDS induzierte Öffnung der BHS erlaubte Paclitaxel, welches normalerweise die BHS nicht überqueren kann, in das Rattenhirn überzutreten und führte so zu einer Reduktion des Tumorwachstums (Salvador et al. 2022). Daher könnten TTFIELDS einen neuen klinischen Ansatz zur Verabreichung nicht-BHS-gängiger Therapeutika für die Behandlung von ZNS Erkrankungen darstellen.

1.9. Zielsetzung

Hauptziel dieser Arbeit war die Etablierung eines humanen BHS-Modells, um die an cerebEND Zellen gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen. Dazu wurden zunächst TTFields-induzierte TJ-Protein Lokalisationen und BHS Integritätsveränderungen an cerebEND reproduziert. Anschließend wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HBMVEC) als statisches Humanzellen Monolayer-Modell etabliert.

Die BHS Zusammensetzung wurde sowohl in Monokultur, als auch in Kokultur mit bovinen Perizyten untersucht. Anschließend wurden erste Experimente zur BHS-Integrität und Permeabilität unter TTFields-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden Lichtmikroskopie, Immunfluoreszenzfärbungen, Western-Blots, TEER-Messungen und Permeabilitäts-Assays durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 1. Geräte

Gerät	Firma
Autoklav Systec VX-150	Systec, Labor-Systemtechnik
Sterilbank Clean Bench	NuAire
Crasheismaschine ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen
Cryofuge 6 000i	Heraeus Instruments
Dispenser Multipette E3	Eppendorf
Elektrophorese Gerät Consort EV265 Power Supply	Carl Roth
Epithelial Voltohmmeter 1 (EVOM1)	World Precision Instruments
Fluorescence Reader	TECAN GENios Prc
Folienschweissgerät Vacupack plus	KRUPS
Gefrierschrank <ul style="list-style-type: none"> • -20 °C • -80 °C 	Liebherr-International Deutschland Fryka-Kältetechnik
Gel Elektrophorese Kammer Mini-PROTEAN Tetra Cel	Bio-Rad
Imaging System FlourChem FC2	Cell Biosciences
Inkubator: <ul style="list-style-type: none"> • Heracell 240 i (37 °C, 5 % CO₂) • Heraeus Instruments Function Line (37 °C, ohne CO₂ Zufuhr) • Forma Serie II 3110 (18 °C, 5 % CO₂) • Kühlung: Accel 500LC 	Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific
TFields Lab Bench System Invitro™ (Generatoren, Verbindungskabel, Basisplatten, Keramik-Kulturschälchen)	Novocure
Leuchtplatte (Ultraviolett-Strahler)	Konrad Benda Laborgeräte
Kryo-Einfriergerät Qualifreeye	Qualilab
Kühlschrank Profil line	Liebherr-Deutschland

Gerät	Firma
Mikroskop • Hellfeldmikroskop • Mikroskop DMI300 B Fluorescence	Helmuth Hund Leica Microsystems
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipetten: • Discovery (comfort) (1 000 µl) • Eppendorf Reference (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 2500 µl) • Eppendorf Research (5 000 µl) • Multipette (100 µl, 500 µl, 5 ml)	HTL Lab Solutions Eppendorf Eppendorf Eppendorf
Pipettierhilfe Accurpette	VWR International
Qubit™ 2.0 Fluorimeter Protein Assay	Life technologies
Rotamax	Heidolph
Scepter™ Handheld Automated Cell Counter	Merck
Strecktisch MEDAX 12801	Nagel
Sterilbank Herasafe type HS 12	Heraeus Instruments
Stickstoffbehälter Chronos 10000397	Messer Industriegase
Universalschrank UF750	Memmert
Vortex Genie-2	Scientific Industries
Universalwasserbad WTE var 3185	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Zentrifuge: • Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R • Mikrozentrifuge Micro Star 17R • Zentrifuge MEGA STAR 3.0R	Heraeus Instruments VWR International VWR International

2.1.2. Chemikalien

Tabelle 2. Chemikalien

Chemikalie	Firma
Aceton	Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bis	Bio-Rad
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Antikörper Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme LabLine
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau (pH 6,8)	Sigma-Aldrich
Claudin-5 (Human)	OriGene
Cytoplasmic Extraction Buffer (CEB)	Aus Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells Thermo Fisher Scientific
Destilliertes Wasser	BBraun
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1 g/l D-Glucose, L-Glutamine, Pyruvate)	Sigma-Aldrich
DMEM (high glucose)	Thermo Fisher Scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Donkey Serum	abcam; Merck
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	ScienceCell
Endothelial Cell Medium (ECM)	ScienceCell
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SERVA Electrophoresis
Essigsäure (Eisessig)	Chemsolute
Ethanol, 70 %, absolut	Otto-Fischer
Fettfreie 5 % Trockenmilch	Carl Roth
Fetal Bovine Serum (FBS)	ScienceCell
FITC-Dextran 4 kDa	Sigma-Aldrich
Fluoroshield mit DAPI	Sigma-Aldrich
Gel-Ladepuffer	Ambion

Chemikalie	Firma
Gelatine 5 %	Sigma-Aldrich
Glucose 5 %	BBraun
Glycerol	SERVA Electrophoresis
Glycin Pulver	Hartenstein Art
Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kollagen IV	Sigma-Aldrich
Luminol 97 %	Sigma-Aldrich
Membrane Extraction Buffer (MEB) Aus Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells	Thermo Fisher Scientific
Methanol (CH ₃ OH) (≥ 99,8 %)	Sigma-Aldrich
Milchpulver	AppliChem
Minimum Essential Medium (MEM) ohne Phenol red	Thermo Fisher Scientific
Mounting Medium mit DAPI ab 104139	abcam
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine acrylamide (TRIS-acrylamide)	Sigma Life Science
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	BBraun
Natriumchlorid (NaCl) 25 %	Sigma-Aldrich
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
para-coumaric Essigsäure (pCA)	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (1 000 U/ml, 1 000 µg/ ml)	Thermo Fisher Scientific
peqGold Protein-Marker (prestained)	Thermo Fisher Scientific
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Thermo Fisher Scientific
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom

Chemikalie	Firma
Qubit™ Protein Reagent	Life technologies
Qubit™ Protein Buffer	Life technologies
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth
Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells	Thermo Fisher Scientific
Trizin	Sigma-Aldrich
Tris	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA Solution 0,25 %/0,02 % (w/v)* in PBS w/o** Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Biochrom
Tween 20	Sigma-Aldrich
Ultrareines Wasser	Biochrom
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich
Ziegenserum	Vector Labs
2-Propanol	Sigma Life Science

* w/v Gewicht in Volumen (weight by volume)

** w/o ohne (without)

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Deckgläschen Glas, rund (20 mm Durchmesser)	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Deckgläschen Glas, viereckig (24x50 mm)	Paul Marienfeld
Filter Filtropur S (0,2 µm)	Sarstedt Nümbrecht
Handschuhe (Nitril)	Asia Pacific Sdn Bhd
Inserts Transparent PET Membrane 24-Well (Porengröße 0,4 µm)	Falcon
Inserts Transparent PET Membrane 6-Well (Porengröße 0,4 µm)	Falcon
Kryoröhrchen Nalgene Cryoware vial 2 ml	Thermo Fisher Scientific
Objektträger (76x26 mm)	Langenbrinck
Parafilm	Pechiney Plastic Packing
Pipettenspitzen <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl, 200 µl, 1 000 µl • 2,5 ml, 5 ml 	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf
Polyvinylidenfluorid-Membran	BioRad
Qubit™ assay tubes	invitrogen by Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäße <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 ml, 2 ml (Safe-Lock) • 1,5 ml • 5 ml (SafeSeal) • 15 ml • 50 ml • Polystyrene Round-Bottom Tubes 5 ml (FACS) 	Biozym Scientific Eppendorf Sarstedt Sarstedt Greiner Bio-One Corning Inc
Scepter Sensor-Spitzen 60 µm	Merck
Spritzen <ul style="list-style-type: none"> • 20 ml • 50 ml 	BD Discardit™ II BBraun
Stericlin Klarsichtschläuche ohne Seitenfalte aus Papier und Folie (Breite 25 cm)	Vereinigte Papierwarenfabriken
Sterilisations-Klebeband Spritzen <ul style="list-style-type: none"> • Dampf • Heißluft 	Hartenstein Hartenstein

Verbrauchsmaterial	Firma
Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche 25 cm ² , 75 cm ²)	Corning
Zellkulturplatten <ul style="list-style-type: none"> • 6-Well (Costar) • 24-Well • 96-Well 	Corning Falcon, Beckton Dickinson Labware Sarstedt

2.1.4. Antikörper

Tabelle 4. Antikörper für Immunohistochemie

Antikörper	Firma
Primär- Antikörper	
Claudin-5 (Alexa Fluor 488 nm)	Thermo Fischer Scientific
Occludin (Alexa Fluor 488 nm)	Thermo Fischer Scientific
PECAM-1 (Alexa Fluor 594 nm)	BD Pharmingen (Abcam)
PECAM-1 monoklonal Antikörper (Purified Rat Anti-Mouse CD 31)	BD Biosciences
Sekundär- Antikörper	
anti-rabbit oder anti-rat Alexa Fluor (488 oder 594 nm)	Invitrogen

Tabelle 5. Antikörper für Western-Blot

Primär-Antikörper	Spezies	Verdünnung	Größe (kDa)	Aufbewahrung (°C)	Katalognummer	Firma
β-Actin	mit HRP gekoppelt	1:2 500	42	-20	A5316	Sigma-Aldrich
Glut-1	Kaninchen	1:2 000	45-55	+4	3135973	EMDS Millipore
Claudin-5	Maus	1:500	22	-20	4C3C2, 3525588	Thermo Fisher Scientific
Claudin-5	Mensch	1:100	23,1	-20	RG225423	OriGene
PECAM-1	Kaninchen	1:2 000	130	4	NB100-2284	Novus
Occludin	Kaninchen	1:800	65	4	331588	Thermo Fisher Scientific
VE-cadherin	Ziege	1:100	87	4	sc-9989	Novus
ZO-1	Maus	1:1 000	250	-20	sc-33725	Thermo Fisher Scientific
Sekundär-Antikörper						
Anti-Kaninchen		1:3 000				GE Healthcare
Anti-Maus		1:3 000				GE Healthcare
Anti-Ziege		1:3 000				Sigma-Aldrich

2.1.5. Zelllinien

Tabelle 6. Zelllinien

Name	Spezies	Organ	Katalog Nummer	Herkunft
cerebEND	Neonatale Maus (WT 139 Sv strain)	Cerebellum	-	Ellaine Salvador, Anästhesie, Universität Würzburg
HBMVEC	Homo sapiens	Humanes Hirngewebe	10HU-051	iXCells Biotech
Bovine Perizyten	Rind	Rinderhirn	-	Université de Lille, Frankreich

2.1.6. Software

Tabelle 7. Software

Software	Firma
AlphaView (Version 1.3.0.7)	Alpha Innovatech Corporation
Inovitro (Version. 1.0)	Novocure
Leica Application Suite (Version 4.5)	Leica Microsystems
magellan	TECAN
ImageJ	NIH

2.1.7. Lösungen und Medien

Tabelle 8. Zusammensetzung verwendeter Lösungen, Medien, Gele und Puffer

Lösung/Medium/Gel/Puffer	Zusammensetzung
Antikörper-Verdünnungspuffer I	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 % BSA • 99,5 % PBS
Antikörper-Verdünnungspuffer II	<ul style="list-style-type: none"> • 1 % BSA in PBS • 99 % PBS
Blocking Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 5 % Milchpulver • 95 % PBS
Donkey Serum 5 %	<ul style="list-style-type: none"> • 5 % Donkey Serum, bei Raumtemperatur aufgetaut • 95 % Antikörper-Verdünnungspuffer
Einfriermedium cerebEND	<ul style="list-style-type: none"> • 100 % Zellkulturmedium cerebEND • 10 % FBS • 10 % DMSO
Einfriermedium HBMVEC	<ul style="list-style-type: none"> • 100 % Zellkulturmedium HBMVEC • 10 % FBS • 10 % DMSO

Lösung/Medium/Gel/Puffer	Zusammensetzung
Einfrüermedium bovine Perizyten	<ul style="list-style-type: none"> • 100 % Zellkulturmedium bovine Perizyten • 10 % FBS • 10 % DMSO
ECL 1	<ul style="list-style-type: none"> • 25 ml 1 M Tris (pH 8,8) • 5 ml Luminol • 5 ml para-coumaric Essigsäure (pCA) • 250 ml destilliertes Wasser
ECL 2	<ul style="list-style-type: none"> • 25 ml 1 M Tris (pH 8,8) • 160 µl H₂O₂ • 250 ml destilliertes Wasser
Elektrophorese Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 12,11 g 100 mM Tris (pH 8,25) • 17,92 g 100 mM Trizin • 1 g 0,1 % SDS • 1 l destilliertes Wasser
FITC-Dextran Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 100 µl FITC Dextran (lichtempfindlich, mit lichtgeschützten 1,5 ml Reaktionsgefäßen arbeiten) • 4,9 ml Minimum Essential Medium ohne Phenolrot
Kollagen IV Lösung 0,1mg/ml	<p>Tag 1.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 10 ml PBS • 25 µl 0,25 % Essigsäure • 5 ml Kollagen IV <p>Lagerung im Kühlschrank bei +4 °C</p> <p>Tag 2.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 45 ml PBS • 5 ml verdünntes Kollagen IV von Tag 1.
Lämmli-Probenpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 8 % SDS • 40 % Glycerol • 0,250 mM Tris • 0,4 ‰ Bromphenolblau <p>Frisch vor Verwendung zugeben</p> <ul style="list-style-type: none"> • 6 % β-Mercaptoethanol

Lösung/Medium/Gel/Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 85 ml destilliertes Wasser • 5 ml 50 mM Tris (pH 8,0) • 5 ml 0,5 % Natriumdeoxycholat • 3 ml 150 mM NaCl • 1 ml 0,1 % SDS • 1 ml 1 % Triton X-100
Sammelgel: 1 Gel	<ul style="list-style-type: none"> • 3,48 ml destilliertes Wasser • 0,85 ml Acrylamid/Bis (30 %) • 0,625 ml 3M Tris (pH 8,8) • 50 µl 10 % SDS • 50 µl 10 % APS • 5 µl TEMED
SDS-Running Puffer 1:100	<ul style="list-style-type: none"> • 1 000 ml destilliertes Wasser • 10 ml Towbin Puffer
Stripping Puffer I	<ul style="list-style-type: none"> • 0,2 M NaOH
Stripping Puffer II	<ul style="list-style-type: none"> • 62 mM Tris • 2 % SDS (pH 6,8)
Towbin Puffer -20 °C	<ul style="list-style-type: none"> • 6,06 g Tris • 28,83 g Glycin • 400 ml Methanol • 7,5 ml 10 % SDS
Trenngel 12 %	<ul style="list-style-type: none"> • 3,35 ml destilliertes Wasser • 4 ml Acrylamid/Bis (30 %) • 2,5 ml 3M Tris (pH 8,8) • 100 µl 10 % SDS • 100 µl 10 % APS • 6 µl TEMED
Tris-Puffer (pH 8,8)	<ul style="list-style-type: none"> • 6,05 g Tris • 8,77 g NaCl • pH mit 25 % HCl auf pH 8,8 einstellen
Waschpuffer 0,1 %	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml Tween 20 • 1 l PBS
Zellkulturmedium cerebEND	<ul style="list-style-type: none"> • 500 ml DMEM • 35 ml 5 % Glucose • 5 ml Penicillin-Streptomycin • 50 ml FBS

Lösung/Medium/Gel/Puffer	Zusammensetzung
Zellkulturmedium HBMVEC	<ul style="list-style-type: none"> • 500 ml ECM • 5 ml Penicillin-Streptomycin • 5 ml ECGS • 25 ml FBS • 5 mg Kollagen IV
Zellkulturmedium bovine Perizyten	<ul style="list-style-type: none"> • 500 ml DMEM • 100 ml FBS • 5 ml Penicillin-Streptomycin

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

cerebEND Zellen

Die cerebEND Zelllinie ist eine immortalisierte BVMEC, die aus neonatalen Mäusen gewonnen wurde. Als Methode zur Immortalisierung wurde die Transformation mit dem Onkoprotein des murinen Polyomavirus, dem Polyoma-Mittel-T-Antigen, verwendet. CerebEND Zellen haben eine ähnliche Morphologie wie Primärkulturen von humanen Hirn-Endothelzellen, mit Monolayern dicht gepackter länglicher Zellen, die bei der Konfluenz eine Wachstumshemmung zeigen. Obwohl Occludin und Claudin-1 im Vergleich zu Cortex Endothelzellen (cEND) in cerebEND Zellen geringer und Claudin-3 und -12 höher exprimiert sind (Silwedel & Forster, 2006), sind Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin-Proteine, die an den Zell-Zell-Verbindungen lokalisiert sind, gut in der Immunfluoreszenz nachweisbar (Burek et al. 2012).

HBMVEC Zellen

HBMVEC werden in großem Umfang zur Untersuchung der molekularen und zellulären Grundlagen der BHS eingesetzt. Es handelt sich um Primärzellen aus dem menschlichen Gehirn, die als Passage 1 in einer Konzentration von mehr als 500 000 Zellen pro Fläschchen kryokonserviert wurden. Diese HBMVEC exprimieren den vWF Faktor VIII (Von-Willebrand Faktor VIII), CD31 (PECAM) und Ac-LDL (acetylierte Low Density Lipoprotein aus menschlichem Plasma) (iXCellsBiotechnologies; Product Information).

Umgang mit Zellen

Vorbereitung der Zellkulturflaschen

Zur Vorbereitung der cerebEND und bovinen Perizyten wurde der Boden von 25 cm² bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen mit 2 ml 5 % Gelatine bedeckt und 30 min bei Raumtemperatur (RT) belassen. Die Beschichtung der Zellkulturflasche mit Gelatine verbessert die Zellhaftung. Die Gelatinereste wurden entfernt und die Flasche wurde mit

6 ml (25 cm²) bzw. 13 ml (75 cm²) vorgewärmtem entsprechendem Zellkulturmedium befüllt.

Zur Vorbereitung der HBMVEC wurde der Boden einer 25 cm² Zellkulturflasche mit 6 ml und der einer 75 cm² Zellkulturflasche mit 9 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium HBMVEC befüllt.

Zellen auftauen

Zum Auftauen der Zellen aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden diese zügig im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald keine Eiskristalle im Kryoröhrchen mehr zu sehen waren, wurde der gesamte Inhalt des Kryoröhrchens in eine vorbereitete 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Flasche wurde unmittelbar bei 37 °C inkubiert. Sobald sich ein gleichmäßiger Zellrasen ausgebildet hatte, wurden die Zellen nach 2-3 Tagen (cerebEND), nach 7 Tagen (HBMVEC) bzw. nach 5-7 Tagen (bovine Perizyten) in eine 75 cm² Flasche überführt.

Aus der 25 cm² Flasche wurde das Medium entfernt. Die Flasche wurde zweimal mit 5 ml PBS gespült. Dann wurde 1 ml 0,25 % Trypsin auf die Zellen gegeben. Die Flasche wurde für 12 min (cerebEND), 5 min (HBMVEC) bzw. 3 min (bovine Perizyten) bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 4 ml entsprechendes vorgewärmtes Medium hinzugegeben, um die Trypsinierung zu stoppen. In die 75 cm² Flasche wurden dann die gesamten 5 ml Zellsuspension gegeben und sie wurde bei 37 °C inkubiert.

Zellen splitten

Das Medium wurde aus der 75 cm² Flasche entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurde 2 ml (cerebEND und bovine Perizyten) bzw. 3 ml (HBMVEC) 0,25 % Trypsin in die 75 cm² Zellkulturflasche gegeben und sie wurde für 12 min (cerebEND), 5 min (HBMVEC) bzw. 3 min (bovine Perizyten) bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen des Zellrasens wurde visuell mit dem Lichtmikroskop überprüft. Anschließend wurden 4 ml (cerebEND), 3 ml (HBMVEC) bzw. 10 ml (bovine Perizyten) vorgewärmtes Medium hinzugegeben, um die Trypsinierung zu stoppen.

Die Zellsuspension wurde durch Resuspendieren mit dem Medium vermischt. Um im Verhältnis 1:3 zu splitten, wurden jeweils 2 ml (cerebEND und HBMVEC) bzw. 4 ml (bovine Perizyten) der Zellsuspension auf drei 75 cm² Flaschen (bei cerebEND und bovinen Perizyten mit 5 % Gelatine beschichtet und mit je 16 ml Medium befüllt) verteilt. Das Medium wurde zweimal die Woche, am zweiten und vierten Tag nach dem Splitten der Zelllinie, gewechselt, das alte Medium wurde abgesaugt, das frische, angewärmte Medium (18 ml cerebEND und HBMVEC, 20 ml bovine Perizyten) wurde über die Wand der Flasche hinzugegeben.

Zellen ausplattieren

Zur Vorbereitung der HBMVEC Zelle wurde die Kollagen IV Lösung in Tropfenform jeweils zentral auf Deckgläschen in die Wells von 6-Well-Platten (500 µl) bzw. in Transwell-Inserts für 24-Well-Platten (200 µl) gegeben. Anschließend wurden die Platten für 2 h in RT inkubiert, das Kollagen IV abpipettiert und das Well oder Insert zweimal mit 1 ml bzw. 300 µl PBS ausgewaschen. Die 6-Well- und 24-Well-Platten mit Inserts wurden kurz bei 37 °C Grad im Brutschrank inkubiert, damit die Deckgläschen austrockneten.

Vorbereitung für bovine Perizyten: 6-Well- oder 24-Well-Platten wurden mit jeweils 2 ml bzw. 800 µl 5 % Gelatine befüllt und für 30 min bei RT belassen, anschließend wurde die Gelatine abpipettiert.

Die in 75 cm² Flaschen wachsenden Zellen wurden wie oben beschrieben abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein beschriftetes 50 ml Reaktionsgefäß überführt und gevortext, um eine homogene Durchmischung zu gewährleisten. 300 µl Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und gevortext, um die Zellzahl mit dem Scepter zu bestimmen. An der Scepterspitze wurde ein Scepter-Aufsatz eingesetzt, in das 1,5 ml Reaktionsgefäß eingetaucht und solange gehalten, bis die Probe geladen worden war und schließlich auf dem Bildschirm die Zellzahl angezeigt wurde.

Um die am Ende gewünschte Zellzahl von 50 000 Zellen (cerebEND) bzw. 40 000 Zellen (HBMVEC und bovine Perizyten) pro Well oder pro Transwell-Insert zu erreichen, wurde anhand des folgenden Rechenweges eine Zellverdünnung angefertigt.

$$\frac{40\,000 \text{ Zellen}}{\text{gemessene Zellzahl}} \times 1\,000 \mu\text{l} = a \mu\text{l}$$

$$6\text{-Well-Platten } 2000 \mu\text{l} - a = b \mu\text{l}$$

$$24\text{-Well-Platten } 800\mu\text{l} - a = b \mu\text{l}$$

$$a \mu\text{l} \times n = A \mu\text{l}$$

$$b \mu\text{l} \times n = B \mu\text{l}$$

$$6\text{-Well-Platten } A \mu\text{l} + B \mu\text{l} = C \mu\text{l} = 2\,000 \mu\text{l}$$

$$6\text{-Well-Platten Insert } A \mu\text{l} + B \mu\text{l} = C \mu\text{l} = 1\,000 \mu\text{l}$$

$$24\text{-Well-Platten } A \mu\text{l} + B \mu\text{l} = C \mu\text{l} = 800 \mu\text{l}$$

$$24\text{-Well-Platten Insert } A \mu\text{l} + B \mu\text{l} = C \mu\text{l} = 300 \mu\text{l}$$

a = benötigte Zellsuspension in μl pro Insert,

b = benötigtes Medium in μl pro Insert,

n = Anzahl an Inserts,

A = gesamtes benötigtes Volumen der Zellsuspension,

B = gesamtes benötigtes Volumen des Mediums,

C = Gesamtmenge

Die berechnete Menge wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit dem angewärmten entsprechenden Zellkulturmedium gemischt und resuspendiert.

Für 24-Well Transwell-Inserts wurden die Wells mit je 800 μl angewärmtem Zellkulturmedium cerebEND befüllt und dann die Inserts hineingelegt.

Ein Monolayer aus cerebEND oder HBMVEC Zellen, die im Transwell-Insert gezüchtet worden waren, wurde als vereinfachtes Modell der BHS verwendet. Das Insert imitierte die (luminale) Blutseite, während das Well, in dem das Insert lag, die parenchymale Seite des Gefäßes imitierte. Die dazwischen liegende mikroporöse Membran (0,4 µm) ermöglichte den Austausch von kleinen Molekülen, verhinderte aber die Migration von Zellen zwischen den beiden Kompartimenten. In einem Kokulturmodell wurden die Endothelzellen im Transwell-Insert gezüchtet, während die Perizyten auf dem Boden der Wells wuchsen.

Pro 24-Well Transwell-Insert wurden zentral 300 µl Zellkulturmedium mit der entsprechenden Zellzahl pipettiert, in die zugehörigen Wells 800 µl Medium gegeben. Pro 6-Well Transwell-Insert wurden 1 000 µl Zellsuspension und in die zugehörigen Wells 2 000 µl Zellkulturmedium bzw. Zellsuspension auspipettiert. Die Platten wurden dann bei 37 °C inkubiert. Der Mediumwechsel mit der gleichen Menge angewärmten Mediums fand alle zwei Tage statt. Ein durchgängiger Zellrasen bildete sich nach 5-7 Tagen.

2.2.1.4. Zellen einfrieren

Alle für das Einfrieren von Zellen verwendeten Medien, Zusätze und Röhrchen wurden gut gekühlt und auf Eis gelagert. Außerdem wurde möglichst zügig gearbeitet, um die Zellen vor Schäden durch DMSO in nicht gefrorenem Zustand zu schützen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen und trypsiniert. Die gesamte Zellsuspension von 20 ml wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 100 xg für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. 1 ml des Einfriermediums wurde zum Zellpellet hinzugegeben. Die Zellen wurden pro Zellkulturflasche in Einfriermedium resuspendiert und sofort in beschrifteten Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Eine Langzeitlagerung fand in flüssigem Stickstoff bei -195 °C statt.

2.2.2. Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von HBMVEC Zellen auf Claudin-5, PECAM-1

Immunfluoreszenz ist eine biochemische Analysemethode. Das gewünschte histologische Material wird mit bestimmten Antikörpern, an denen ein fluoreszierender Farbstoff gebunden ist, markiert und die Zielproteine dadurch indirekt sichtbar gemacht.

In diesem Fall wurden Claudin-5, PECAM-1 und Occludin gefärbt, welche von HBMVEC exprimiert wurden (iXCellsBiotechnologies; Product Information) und die parazelluläre Permeabilität der BHS beeinflussen.

Färbung

Am Tag 1 wurde ein 2 ml Reaktionsgefäß auf Eis bis zur Verwendung gekühlt. Bei der Kontrollgruppe wurde das Medium aus den Well-Platten entfernt und über die Wand des Wells wurden auf die Deckgläschen mit den darauf wachsenden Zellen 500 µl kaltes Methanol (-20°C) pipettiert. Die Deckgläschen mit den darauf wachsenden Zellen der Behandlungsgruppe wurden in bereits mit 500 µl kaltem Methanol befüllte 6-Well-Platten überführt. Die 6-Well-Platten wurden mit Parafilm abgedeckt und für 20 min in den -20 °C kalten Gefrierschrank gestellt. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS auf dem Schüttler (Stufe 2) 2 Mal für 10 min und 1 Mal für 20 min gewaschen. Während dieser Zeit wurden die Zellen kurz vom Schüttler genommen, um lichtmikroskopische Aufnahmen zu machen.

Der Zellrasen in den Wells wurde mit 500 µl 5 % Donkey Serum geblockt und die Platten wurden für 60 min auf den Schüttler gestellt. Das 5 % Donkey Serum wurde verworfen und die Deckgläschen wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze zentral ausgerichtet. Der Claudin-5 sowie der PECAM-1 Antikörper wurde 1:500, der Occludin Antikörper 1:800 mit 5 % Donkey Serum in einem gekühlten 2 ml Reaktionsgefäß verdünnt. Pro Probe wurden 100 µl Antikörper-Serum-Mischung gebraucht. Der verdünnte Antikörper wurde mittig auf die Deckgläschen gegeben. Die 6-Well-Platten wurden für 24 h bei 4 °C gelagert.

Am Tag 2 wurden die Antikörperreste entfernt und die Proben wurden dreimal mit 1 ml PBS für 10 min auf dem Schüttler gewaschen. Währenddessen wurde der fluoreszierende Sekundärantikörper bei Dunkelheit vorbereitet. Polyklonales IgG wurde 1 : 500 mit 5 % Donkey Serum in einem schwarzen, lichtundurchlässigen Reaktionsgefäß verdünnt. Pro Probe wurden 100 µl des verdünnten IgG zugegeben. Polyklonales IgG der Ziege ist an den Farbstoff Alexa Fluor Plus 488 konjugiert und bindet an den zuvor angewendeten Claudin-5, bzw. PECAM-1 Antikörper. Dies macht diese TJ-Proteine indirekt sichtbar. Für den Nachweis des Occludin-Antikörpers wurde an Alexa Fluor Plus 594 konjugiertes IgG des Kaninchens verwendet. Die Proben wurden in Dunkelheit bei RT für 60 min inkubiert. Der Antikörper wurde verworfen und die Proben wurden wieder dreimal mit 1 ml PBS für 10 min auf dem Schüttler gewaschen. Die Reste des PBS wurden mit einem saugfähigem Papier abgetupft.

Auf einen beschrifteten Objektträger wurde ein Tropfen Mounting Medium mit DAPI gegeben. Das Deckgläschen mit der bewachsenen Seite wurde nach unten eingedeckt. Die Präparate wurden vor dem Mikroskopieren für mindestens 48 h bei 4 °C in einer Objektträgermappe gelagert.

2.2.3. TTFIELDS Applikation

Das Inovitro™ System von Novocure gibt es seit 2013 für die Laborforschung. Es besteht aus einem TTFIELDS-Generator, proprietärer Steuersoftware und Basisplatten mit je 8 Keramik-Kulturschalen mit sehr hoher Dielektrizitätskonstante (Abb. 2).

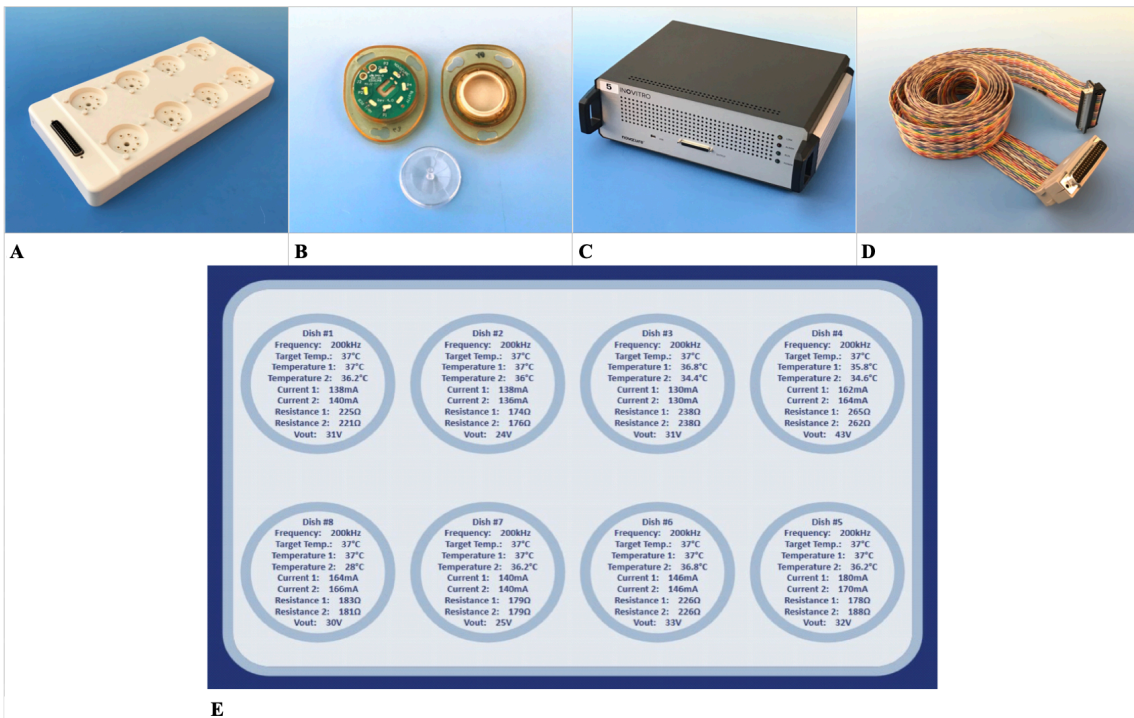


Abb. 2 Inovitro™ TTFIELDS Lab Bench System.

Komponenten des Inovitro™ Systems: (A) Basisplatte; (B) Keramik- Kulturschälchen mit Deckel; (C) TTFIELDS-Generator; (D) Verbindungskabel; (E) Benutzeroberfläche der Inovitro™ Software zur Einstellung und Kontrolle der Parameter. (Fotos: Dominik Domröse)

Zur Verfügung stehen flache Keramik-Kulturschalen, in die mit Zellen bewachsene 20 mm Deckgläschen gegeben werden können oder hohe Keramik-Kulturschalen, in die mit Zellen bewachsene Transwell-Inserts (24-Well-Format) hineinpassen (Abb. 2 B).

Autoklavierte Keramik-Kulturschalen wurden in die Basisplatte eingedreht und mit 2 ml vorgewärmtem Medium (in hohe Keramik-Kulturschalen 4 ml) befüllt. Dabei sollten keine Bläschen entstehen. Deckgläschen oder Inserts wurden mit einer Pinzette in die Keramik-Kulturschalen transferiert. Sobald eine Keramik-Kulturschale befüllt war, wurde sie mit einem Stück Parafilm abgedeckt. Der Deckel wurde auf den Parafilm

gelegt und leicht angedrückt, um Verdunstung des Mediums zu vermeiden. Die Verdunstungsrate ist wegen des Unterschieds zwischen der Temperatur innerhalb der Keramik-Kulturschale und der Inkubortemperatur sehr hoch. Die Basisplatte wurde in den Inkubator gestellt. Das Kabel wurde an die Basisplatte angeschlossen. Der Generator der Basisplatte wurde angeschaltet. Die gewünschte Frequenz wurde ausgewählt. Die Keramik-Kulturschalen wurden eingedreht, bis alle Parameter (Frequenz, Temperatur, Spannung und Widerstand) die gewünschten Werte erreicht hatten. Sobald dies erfolgreich war, wurden Keramik-Kulturschalen in der Software blau umrandet angezeigt (Abb. 2 E).

Die Kontrollzellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der TTField-Inkubator war auf 18 °C gekühlt, weil durch die Wechselfelder Wärme entsteht. Im Medium wurde dadurch eine Endtemperatur von 37 °C bei der Feldintensität von 1,7 V/cm² erreicht.

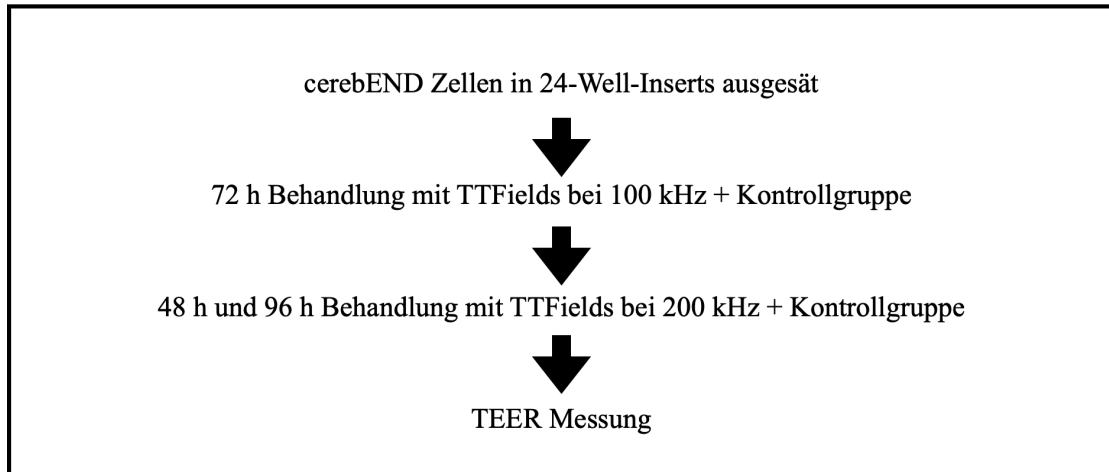
Ein Mediumwechsel fand nach 72 h statt. Das Programm wurde pausiert und die Basisplatte wurde unter die Sterilbank gebracht. Deckel und Parafilm wurden abgenommen und Kondenswasser wurde entfernt. Das alte Medium wurde entfernt und die Keramik-Kulturschalen wurden mit der entsprechenden Menge an frischem angewärmten Mediums befüllt. Das Medium wurde auch in der Kontrollgruppe gewechselt. Am Ende des Versuches wurden die Deckgläschen in eine 6-Well-Platte und die Transwell-Inserts in eine 24-Well-Platte überführt.

Nachfolgend werden die verschiedenen Versuchsansätze aufgelistet:

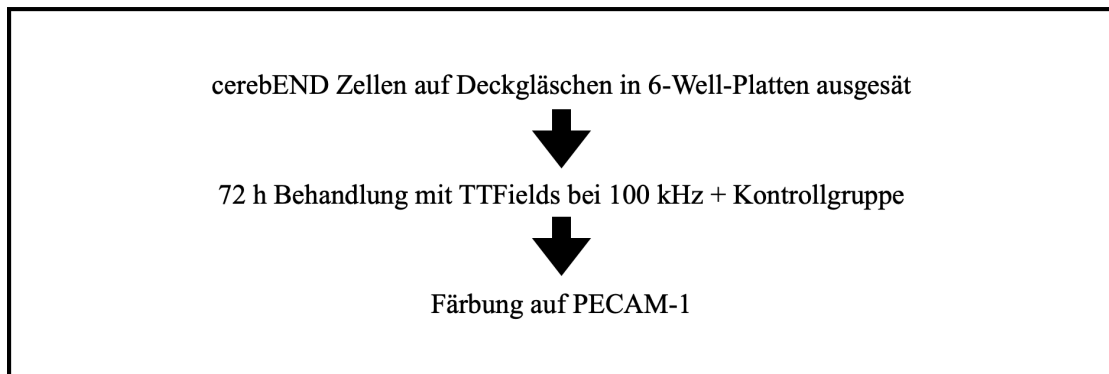
TTFields Versuchsansätze

Für cerebEND Zellen

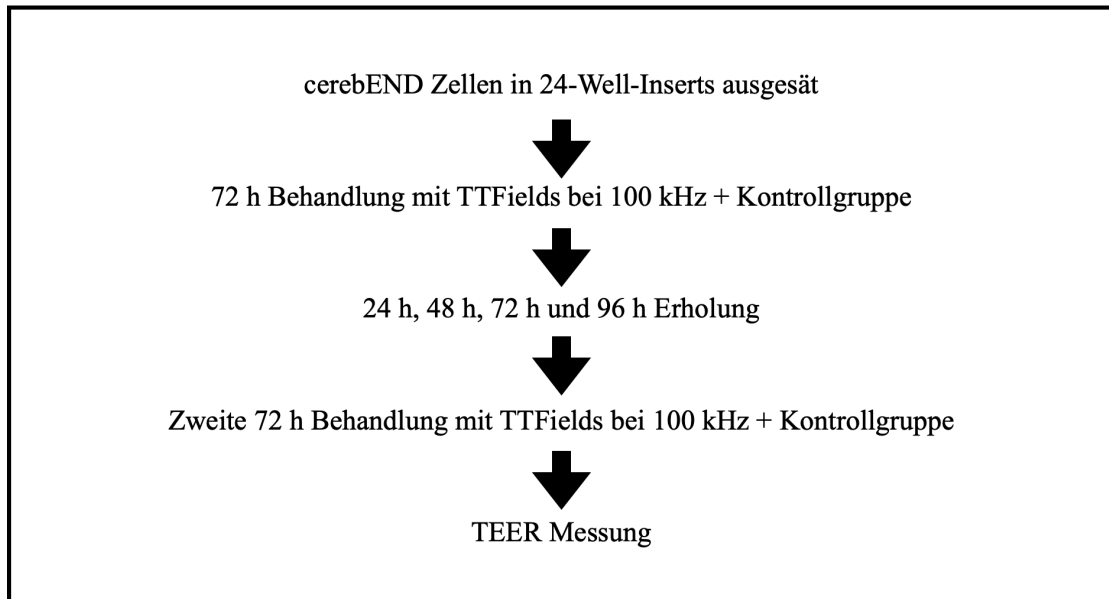
1.



2.

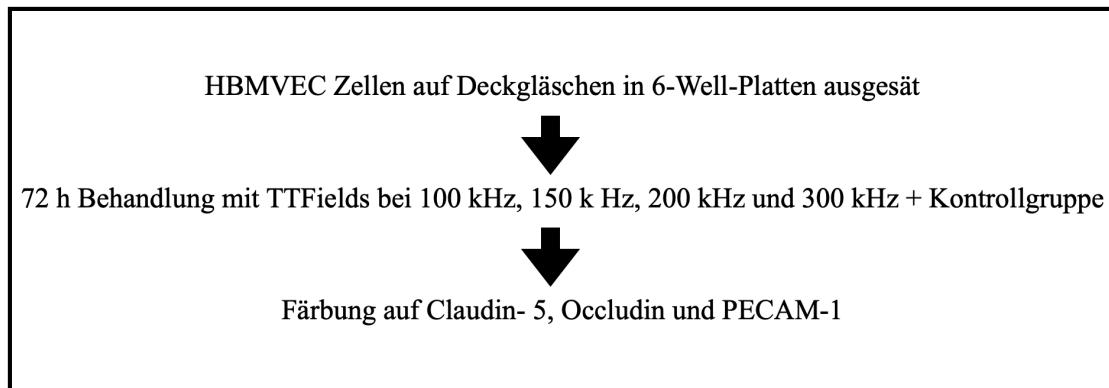


3.



Für HBMVEC Zellen

4.



2.2.4. Mikroskopie

Lichtmikroskopie

Auf Glasdeckgläschen wachsende mit TTFields behandelte sowie Kontrollzellen wurden in den Wells einer 6-Well-Platte, die mit PBS befüllt war, mit einem Leica Mikroskop unter den 10x und 40x Objektiven begutachtet und fotografiert.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzfärbung von TTFields behandelten und Kontrollzellen erfolgte wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben. Nach der Färbung und mindestens 48 h Inkubationszeit wurden die Deckgläschen mittels Fluoreszenzmikroskopie mit dem 40x Objektiv, bestimmten Farbfiltern (A für DAPI; L5 ET für Claudin-5 und Occludin; TXR ET für PECAM-1) und entsprechenden Belichtungszeiten (DAPI 500 ms; Claudin-5 1,2-2,7 s; Occludin 1-2,7s , PECAM-1 7,2 s) betrachtet und fotografiert.

2.2.5. FITC-Dextran Permeabilitätsassay

Als Permeabilitätsindikator für HBMVEC Zellen wurde der fluoreszierende Farbstoff FITC-Dextran (4 kDa) verwendet. Gemessen wurde die Menge des durch die Endotheliumzellen diffundierten Farbstoffes.

Das Medium wurde aus der 24-Well-Platte mit HBMVEC Zellen abgesaugt und aus den Inserts abgekippt. Jedes Well wurde mit 800 µl MEM ohne Phenol rot befüllt. In die Inserts wurde 200 µl verdünnte FITC-Dextran Lösung gegeben. Die 24-Well-Platte wurde mit Folie abgedeckt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurde in beschriftete, lichtgeschützte 1,5 ml Eppendorfgefäße 140 µl Flüssigkeit aus jedem Well überführt und die Gefäße wurden bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Die 24-Well-Platte wurde mit Folie abgedeckt und wieder für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der gesamte restliche Inhalt jedes Wells in neue beschriftete lichtgeschützte 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Reste der FITC-Dextran Lösung aus dem Insert wurden ebenfalls in beschriftete, lichtgeschützte 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach Entnahme der zweiten Proben wurden jeweils 70 µl jeder Probe in zwei Wells einer 96-Well-Platte für die Messung überführt. Zusätzlich wurden zwei Wells mit 70 µl PBS (Blank) befüllt. Die Messungen wurden mit dem Fluoreszenzreader bei einer Absorbtionswellenlänge von 492 nm, Emissionswellenlänge von 535 nm und Integrationszeit von 40 µs durchgeführt.

2.2.6. Western-Blot zum Nachweis von tight junction Proteinen

Der Western-Blot ist ein molekularbiologisches Untersuchungsverfahren zur Identifikation von Proteinen. Zunächst wurden Zellysate hergestellt, die mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und dann auf eine Trägermembran übertragen (Blotting) wurden. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden die Proteine sichtbar gemacht. Um Protein-Expressionsverhältnisse in verschiedenen Zellkompartimenten wie z. B. dem Zytoplasma bzw. der Membran nachzuweisen, wurde ein fraktionierter Western-Blot durchgeführt.

Vorbereitung des Proteinlysats

Die in der 6-Well-Platte wachsenden Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Well-Platte wurde auf Eis gestellt. Aus dem ersten Well wurde PBS vollständig abgesaugt. 100 µl RIPA-Puffer wurde in das erste Well dazugegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber aus dem Well abgekratzt. Aus dem nächsten Well wurde PBS vollständig abgesaugt. RIPA-Puffer wurde aus dem ersten Well in das nächste Well überführt. Die gleichen Schritte wurden mit allen Wells gleicher Behandlungsgruppen wiederholt und die Flüssigkeit wurde schließlich in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Diese wurden 10 min bei 2 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Separieren des Zytoplasmas von der Membranfraktion bei cerebEND Zellen

Die Fraktionierung zellulärer Kompartimente von cerebEND Zellen wurde mit dem Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells durchgeführt.

Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA für 5 min inkubiert und dann 5 min bei 500 xg zentrifugiert. Sie wurden dann gewaschen, indem das Zellpellet mit 1 ml eiskaltem PBS suspendiert wurde. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und bei 500 xg für 2-3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig entfernt und verworfen, um das Zellpellet so trocken wie möglich zu erhalten.

Dem Zellpellet wurde 100 µl eiskalter Cytoplasmic Extraction Buffer (CEB), der Protease-Inhibitoren enthält, zugegeben. Danach wurde das Röhrchen für 10 min bei 4 °C unter leichtem Mischen inkubiert und anschließend bei 500 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (Zytoplasmaextrakt) wurde sofort in ein sauberes vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Auf das Pellet wurde 100 µl eiskalter Membrane Extraction Buffer (MEB) mit Protease-Inhibitoren zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde 5 s bei der höchsten Einstellung gevortext und anschließend 10 min bei 4 °C unter leichtem Mischen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß erneut bei 3 000 xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand (Membran-Extrakt) wurde in ein sauberes vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt.

Die Fraktionen wurden bis zu ihrer Verwendung im Western-Blot bei -80 °C gelagert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung des Elektrophoresegels wurden die Trenngel- und Sammelgellösungen gleichzeitig hergestellt. Die Trenngellösung wurde in den entsprechenden Spalt zwischen zwei Glasplatten eingefüllt. Unmittelbar nach dem Einfüllen wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade obere Linie des Trenngels zu erhalten und um Blasen zu vermeiden. Das Trenngel wurde 30 min zum Aushärten stehengelassen, bevor Isopropanol abgegossen und mit Papierstreifen abgetupft wurde. Die Kämme wurden mit der hervortretenden Linie nach vorne in den Spalt platziert. Das Sammelgel wurde gegossen und für 30 min zum Aushärten stehen gelassen.

15 µl des Proteinlysats wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 3,75 µl Lämmli-Probenpuffer zur Verdünnung (4:1) gegeben. Das Gel wurde in das Elektrophorese-Gerät eingebaut. Die Kammer wurden mit Elektrophoresepuffer befüllt. Die Kämme wurden unter dem Puffer entfernt und die Taschen mit dem Puffer gespült. Nach dem Auftauen des Proteinmarkers (peqGold prestained) wurden 10 µl in die erste Tasche von links geladen. Die weiteren Taschen wurden mit 10 µl der entsprechenden Proben befüllt, die vorher für 5 min bei 70-90 °C erhitzt und

zentrifugiert worden waren, um Sekundär- und Tertiär-Strukturen aufzubrechen. Damit die Banden senkrecht laufen, wurde mit einer Spannung von 70 V begonnen. Sobald die Banden das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 150 V erhöht, bis die grüne Bande des Markes ca. 5 mm vom Boden entfernt war, was ca. 90 min pro Gel benötigte. Die Stromstärke sollte nicht größer als 30-40 mA sein.

Western-Blot

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel entnommen, um die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren. Das Gel und die Membran wurden von Anode zu Kathode übereinander geschichtet: Schwamm, Filterpapier, Gel, Transfermembran, Filterpapier und Schwamm. Das Power Supply wurde auf 40 V, 80 mA und 150 W eingestellt und über Nacht bei +4 °C laufen gelassen. Die Proteine, die durch Elektrophorese aufgetrennt und vom Gel durch elektrische Spannung auf die Membran übertragen worden waren, wurden mit entsprechenden Antikörpern durch Western-Blotting detektiert.

Antikörper-Inkubation und Auswertung

Nach dem Blotting wurden die Membranen für 1 h in 5 % fettfreier Trockenmilch-Lösung geblockt. In 50 ml Reaktionsgefäße wurden 1,5 ml der mit 50 % BSA entsprechend Tab. 8 verdünnten Primärantikörper vorgelegt. Die Membran wurde hineingelegt und für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschbuffer auf dem Schüttler gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper 1 h auf dem Schüttler bei RT fixiert. Erneut wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschbuffer auf dem Schüttler gewaschen. Der β -Actin-Antikörper diente zur Visualisierung der internen Kontrolle.

Für die Entwicklung wurden jeweils 5 ml der ECL 1 und ECL 2-Lösungen (1:1) in einer schwarzen Box vorbereitet. Die Membran wurde für 2 min in der ECL 1 und ECL 2 Mischung bei händischem Schütteln inkubiert. Die Entwicklung wurde mit dem Imaging System FlourChem FC2 sowie mit der AlphaView Software durchgeführt.

Anschließend wurde die densitometrische Analyse mit ImageJ durchgeführt. Die Größe der Proteine wurde über mitlaufende Marker bestimmt, deren Bandengrößen bekannt waren. Zur weiteren Verwendung mit anderen Primäantikörpern wurden die Membranen gestrippt. Sie wurden jeweils für 5 min mit PBS, H₂O, 0,2 M NaOH, H₂O und anschließend PBS (so viel, dass die Membran in der Flüssigkeit komplett benetzt war) gewaschen und dann für 1 h mit 5 % Milchpulver-Lösung geblockt und in TBST im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

2.2.7. TEER Messung

Transendotheliale Resistenzmessung und beeinflussende Faktoren

Transendotheliale elektrische Resistenz (TEER) Messungen werden zur Beurteilung der Barrierefunktion von Epithelzellen auf porösen Trägern verwendet. Es ist die Methode der Wahl, um die Integrität der BHS zu beurteilen (Srinivasan et al. 2015). Bei der Bestimmung der elektrischen Impedanz fließt ein kontinuierlicher Strom sowohl auf transzellulärem als auch auf parazellulärem Weg durch die Zellen (Powell 1981). Der transzelluläre Widerstand wird hauptsächlich durch die apikale und basolaterale Plasmamembran gebildet.

Der elektrische Widerstand eines zellulären Monolayers wird in Ohm (Ω) gemessen und ist ein quantitatives Maß für die Integrität der Barriere (Benson et al. 2013). Es gibt zwei TEER-Messsysteme: einfache Ohm'sche Gesetz-Methode und Impedanz-Spektroskopie.

Das erstgenannte TEER-Messsystem verwendet ein Epithelial Voltohmmeter (<http://www.wpi-europe.com/products/cell-and-tissue/teer-measurement/evom2.aspx>) (Srinivasan et al. 2015).

Für elektrische Messungen werden zwei Elektroden verwendet. Eine Elektrode wird in der oberen und die andere in der unteren Kammer platziert. Die Elektroden sind durch den zellulären Monolayer getrennt. Theoretisch kann der Ohm'sche Widerstand durch Anlegen einer Gleichspannung an die Elektroden und Messung des resultierenden Stroms bestimmt werden. Der Ohm'sche Widerstand wird auf der Grundlage des Ohm'schen Gesetzes als Verhältnis von Spannung und Strom berechnet. Gleichströme können jedoch sowohl die Zellen als auch die Elektroden beschädigen. Um dieses Problem zu überwinden, wird ein Wechsellspannungssignal mit einer Rechteckwellenform angelegt (Srinivasan et al. 2015).

Die TEER-Messwerte mit dem hier verwendeten EVOM1 sind sehr stark von der Elektrodenposition abhängig und deshalb ist beim Einführen der Elektroden in die Testvertiefung eine sorgfältige Handhabung der Elektroden erforderlich, um Störungen der Zellen zu vermeiden. Die Gleichmäßigkeit der Stromdichte, die durch die

Elektroden über die Zellschicht geschickt wird, hat einen signifikanten Einfluss auf die TEER-Messungen.

Durchführung

Die TEER Untersuchung wurde mit dem EVOM1 durchgeführt. Die Monolayer von cerebEND Zellen wurden auf Transwell-Inserts in 24- und 6-Well-Platten mit einem Porendurchmesser von 0,4 μm kultiviert. Sie wurden mit TFields einer Frequenz von 100 kHz für 72 h behandelt. Anschließend wurde der TEER-Wert alle 24 h über einen Zeitraum von 96 h bestimmt. In Experimenten mit Humanzellen wurde die Monokultur von HBMVEC Zellen mit deren Kokultur mit Perizyten verglichen.

Die TEER Messung wurde auf einer Wärmeplatte bei 37 °C unter der Sterilbank durchgeführt. Ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml vorgewärmtem Medium und ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml 70 % Ethanol wurden vorbereitet. Die Stäbchenelektroden des EVOM1 wurden für 5 min im Röhrchen mit 70% Ethanol sterilisiert. Die nächsten 5 min wurden die Stäbchenelektroden in das Röhrchen mit den 5 ml vorgewärmtem Medium getaucht. Die erste Messung erfolgte am oberen Insertteil mit der kürzeren Stäbchenelektrode im Insert und der längeren Stäbchenelektrode außen bis zum Boden des Wells. Es wurde auf "Messure" gedrückt und solange, bis sich der angezeigte Wert nicht mehr änderte, gemessen. Die Werte wurden auf den zugehörigen Wells notiert. Die zweite Messung erfolgte nach dem gleichen Prinzip am unteren Insertteil. Zum Schluss wurde die gleiche Messung in einem mit Medium gefüllten Insert ohne Zellen durchgeführt. Zur Beendigung wurden die Stäbchenelektroden für 5 min in das vorgewärmte Medium und für weitere 5 min in 70 % Ethanol gehalten.

Für jedes Insert wurde ein Mittelwert berechnet. Von den Mittelwerten der gefüllten Inserts wurde der Mittelwert des Inserts ohne Zellen abgezogen. Die TEER-Werte ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) wurden je nach Insertgröße (6-Well Insertfläche = 4,67 cm^2 ; 24-Well Insertfläche = 0,336 cm^2) berechnet und dann wurde von allen gleichartigen Versuchansätzen der Mittelwert berechnet.

Als interne Kontrolle wurden Blindfilter verwendet.

2.2.8. Statistik

Für den FITC-Dextran Permeabilitätsassay wurde der arithmetische Mittelwert aus allen gleichen Proben berechnet und um den Istwert zu erhalten wurden die Werte der PBS gefüllten Inserts abgezogen.

Die TEER-Werte wurden wie unten beschrieben berechnet:

$$(\text{Insert oben } (\Omega) + \text{Insert unten } (\Omega)) / 2 = \text{Insert Mittelwert } (\Omega)$$

$$\text{Insert Mittelwert } (\Omega) - \text{Mittelwert des Inserts ohne Zellen } (\Omega) = \text{Istwert } (\Omega)$$

$$\text{Istwert } (\Omega) \times \text{Insertfläche (cm}^2\text{)} = \text{TEER Wert } (\Omega \cdot \text{cm}^2)$$

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mittels gepaarter zweiseitiger Student's t-Tests mit Excel berechnet. $P < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. cerebEND Zellkultur

3.1.2. Expression und Lokalisation der TJ-Proteine Claudin-5 und PECAM-1 in cerebEND Zellen

In Vorarbeiten hatte sich gezeigt, dass TTFIELDS bei einer Frequenz von 100 kHz zu einer Delokalisation des TJ-Proteins Claudin-5 von der Membran in das Zytoplasma führten. Diese Daten waren mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen gewonnen worden und konnten hiermit bestätigt werden (Abb. 3 A). Eine Quantifizierung dieses Effektes fehlte allerdings bislang. Es war bisher nur gezeigt worden, dass es zu keiner Veränderung des Gesamt-Claudin-5 Proteingehaltes in cerebEND Zellen nach TTFIELDS Behandlung kommt. Daher wurden fraktionierte Western-Blots durchgeführt, für die das Zytoplasma- von der Membranfraktion getrennt wurde. Hier zeigte sich eine Anreicherung von Claudin-5 im Zytoplasma TTFIELDS behandelter cerebEND Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 3 B, C). Obwohl diese Anreicherung nicht statistisch signifikant war, deutete der Trend auf eine Delokalisierung von Claudin-5 von den Zellmembranen in das Zytoplasma hin. PECAM-1 ist ebenfalls an den TJ in der Membran lokalisiert und wird von Claudin-5 in Position gehalten. Hier wurde die Immunfluoreszenzfärbung von PECAM-1 etabliert und ein erstes Experiment zu TTFIELDS-Effekten durchgeführt (Abb. 3 D). In Kontrollzellen war PECAM-1 an den Zellgrenzen lokalisiert. Nach der Behandlung der cerebEND Zellen mit 100 kHz TTFIELDS für 72 h war diese Lokalisation aufgehoben und die Färbung erschien verwaschener und schwächer, da sich PECAM-1 nun über die gesamte Zelloberfläche verteilte.

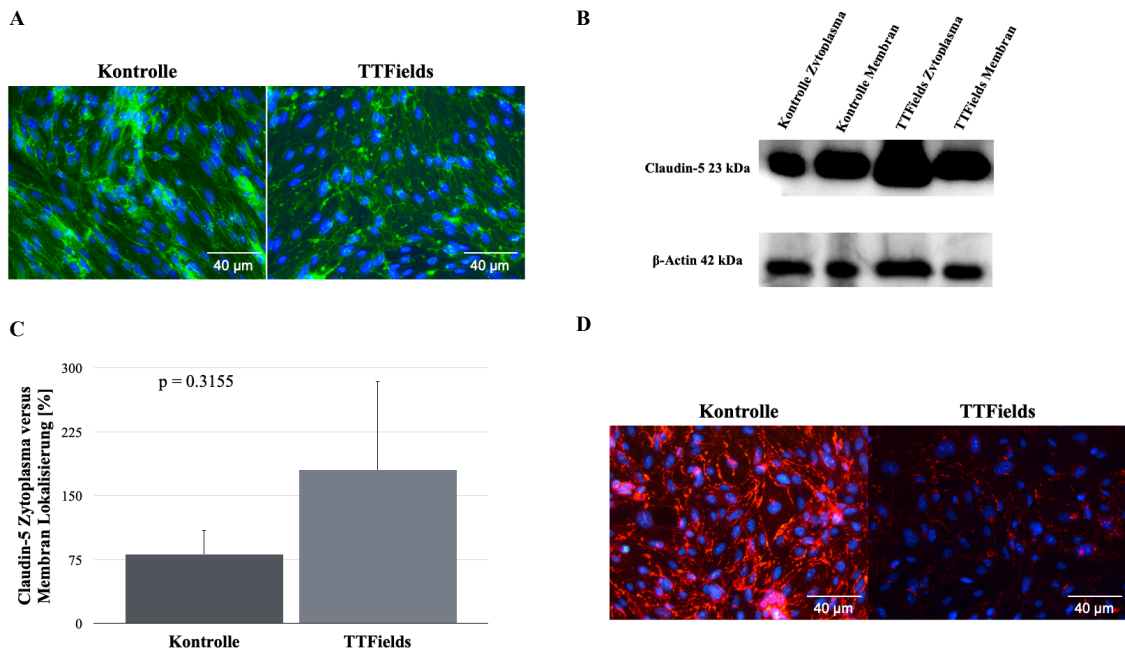


Abb. 3. Expression von TJ-Proteinen durch cerebEND Zellen.

(A) Immunfluoreszenzfärbung von unbehandelten Zellen (Kontrolle) und solchen, die für 72 h mit 100 kHz TTFIELDS behandelt wurden (TTFIELDS). Nachweis von Claudin-5 (grün). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus (n=3). (B) Fraktionierter Western-Blot und (C) zugehörige densitometrische Analyse der Claudin-5 Expression im Zytosol bzw. in der Membranfraktion (n=3). (D) Immunfluoreszenzfärbung von PECAM-1 (rot) und DAPI (blau). Gezeigt sind repräsentative Bilder von (n=3).

3.1.2. Bestimmung der BHS-Integrität mit Hilfe von TEER

Als nächstes wurde untersucht, ob die optisch sichtbaren Veränderungen der cerebEND Zellen auch zu einer Verringerung der BHS-Integrität führten. TEER-Messungen sind eine sensitive Methode, um dies zu tun. Unbehandelte Kontrollzellen wurden zum Vergleich aufgesetzt. In Vorarbeiten war so bereits gezeigt worden, dass TTFIELDS von 100 kHz nach 72 h die BHS-Integrität verringerten. Hier sollte nun gezeigt werden, ob sich die BHS nach Abschalten der TTFIELDS erholt und ob die Behandlung wiederholt werden kann. Tatsächlich führte eine Behandlung mit 100 kHz TTFIELDS nach 72 h zu 21 % niedrigeren TEER Werten (Abb. 4 A). Nach 24 h ergab sich sogar ein 27 % niedrigerer TEER Wert. Ab 48 h war dann eine vollständige Erholung zu beobachten. Erneute Behandlung mit 100 kHz TTFIELDS für 72 h führte zu einer erneuten Öffnung der BHS.

In einem zweiten Versuch wurden die Zellen zunächst mit 100 kHz TTFIELDS für 72 h und dann direkt im Anschluß 24 h bis 48 h mit 200 kHz TTFIELDS behandelt. Auch hier zeigten sich zunächst niedrigere TEER Werte. Unter der Behandlung mit 200 kHz TTFIELDS setzte die Erholung verzögert ein und war erst nach 120 h vollständig (Abb. 4 B).

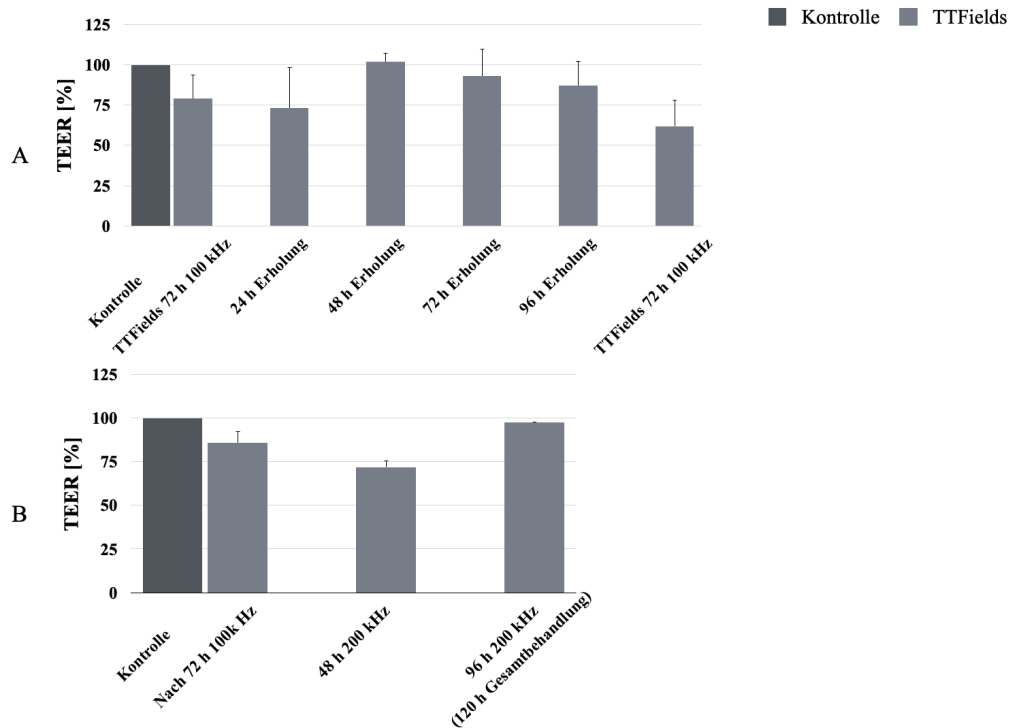


Abb. 4. Bestimmung der BHS-Integrität mit Hilfe von TEER.

(A) cerebEND Zellen wurden 72 h mit 100 kHz TTFIELDS behandelt und konnten sich dann 24 h bis 96 h erholen, bevor sie erneut für 72 h mit 100 kHz TTFIELDS behandelt wurden (n=3). (B) Nach 72 h Behandlung mit 100 kHz TTFIELDS wurde die Frequenz auf die therapeutisch relevanten 200 kHz erhöht und für weitere 24 h bzw. 48 h behandelt (n=3).

3.2. HBMVEC Zellkultur

3.2.1. Etablierung eines humanen BHS-Zellkulturmodells

Um die an murinen Zellen gewonnenen Daten in einem BHS-Modell zu verifizieren, wurden HBMVEC Zellen im Labor etabliert und charakterisiert.

Dabei handelt es sich um Primärzellen aus dem menschlichen Gehirn. Die HBMVEC Zellen wurden auf Kollagen IV als Stimulator für die Aktivierung der Barriereigenschaften von Endothelzellen und die Ausbildung einer BHS kultiviert (Tilling et al. 1998). Ihre leicht längliche, dicht gepackte Morphologie war jener primärer endothelialer Zellen des Gehirns ähnlich (Abb. 5 A). Nach TTFIELDS Therapie mit unterschiedlicher Frequenz (100 kHz, 150 kHz, 200 kHz und 300 kHz) für 72 h zeigte sich in lichtmikroskopischen Untersuchungen kein Unterschied der Zellverteilung oder Zellkerngröße zwischen Kontrolle und behandelten Zellen, jedoch ein leichter Unterschied bei Zellen in der Zellgröße nach Behandlung mit 100 kHz TTFIELDS für 72 h (Abb. 5 A). In der Fluoreszenzfärbung waren die TJ-Proteine Claudin-5, Occludin und PECAM-1 kaum nachweisbar (Abb. 5 B, C, D). Man konnte eine minimal stärkere Anfärbung von PECAM-1 in den Kontrollzellen im Vergleich zu den behandelten Zellen beobachten (Abb. 5 D). Zwischen verschiedenen Frequenzen ergab sich jedoch fluoreszenzmikroskopisch keine objektivierbare Differenz.

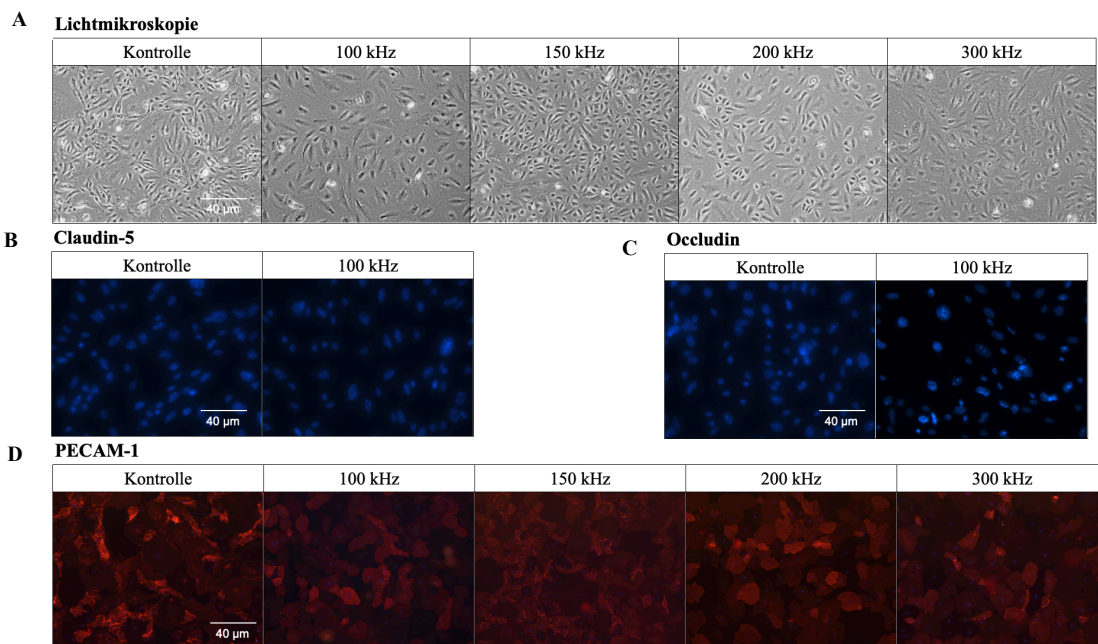


Abb. 5 Etablierung eines humanen BHS-Modells aus HBMVEC.

Die Zellen wurden für 72 h mit TTFields unterschiedlicher Frequenz behandelt und (A) lichtmikroskopisch bzw. (B) immunfluoreszenzmikroskopisch auf Claudin-5 (grün), (C) Occludin (grün) und (D) PECAM-1 (rot) gefärbt. DAPI (blau) färbte die Zellkerne an. Gezeigt sind repräsentative Bilder von (n=3).

HBMVEC sind Primärzellkulturen. Es ist bekannt, dass Primärzellen funktionell dichte TJ erst in Kokultur mit anderen Zellen, wie z. B. Perizyten, ausbilden, da ansonsten wichtige sezernierte Faktoren fehlen (Daneman et al. 2010). Daher wurde im Western-Blot untersucht, wie sich die Kokultur von bovinen Perizyten auf die Expression der TJ-Proteine durch HBMVEC auswirkte (Abb. 6).

Die HBMVEC Zellen exprimierten durch Western-Blot nachweisbare Konzentrationen von Claudin-5, PECAM-1, Occludin, und ZO-1 (Abb. 6 A). Diese Expression wurde durch Kokultur mit bovinen Perizyten für Claudin-5 von 18 auf 45 (+150 %), für Occludin von 41 auf 54 (+32 %) und für PECAM-1 von 64 auf 93 (+45 %) relative Intensität der Proteinbanden gesteigert, auch wenn die Unterschiede in diesem ersten Experiment noch nicht statistisch signifikant waren. Die zwei untersuchten TJ-Proteine ZO-1 und VE-Cadherin waren dagegen nicht verändert. Im Gegensatz zu den oben

genannten TJ-Proteinen war die Expression des Glukosetransporters Glut-1 in der Monokultur mit einer relativen Intensität von 54 höher als in der Kokultur mit 24 (Abb. 6). Diese Ergebnisse zeigten, dass durch eine Kokultur mit bovinen Perizyten die Expression von TJ-Proteinen gesteigert werden konnte, aber noch weiter optimiert werden muss.

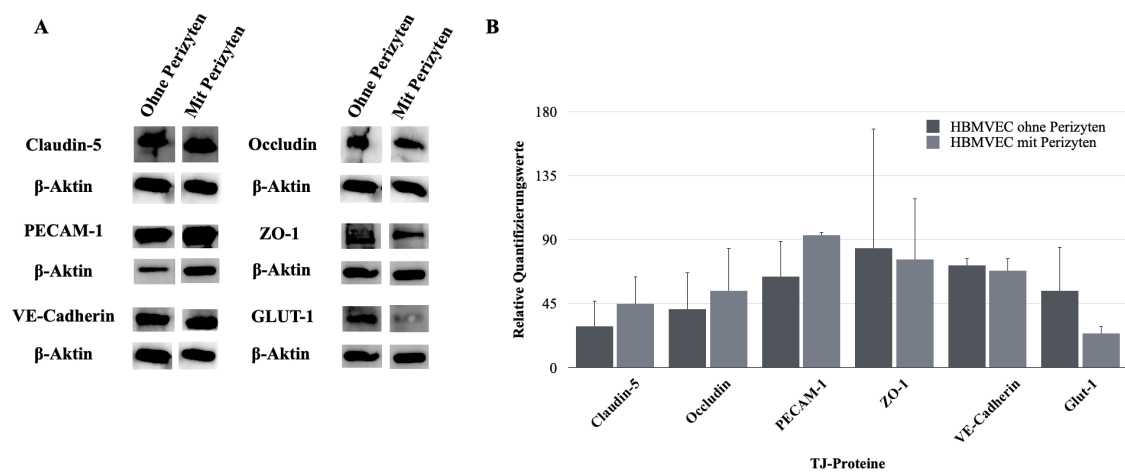


Abb. 6 TJ-Proteinexpression durch HBMVEC mit und ohne Kokultur von bovinen Perizyten.

(A) Western-Blot und (B) Quantifizierung von (A) durch Densitometrie (n=3).

3.2.2. Integrität und Permeabilität des HBMVEC BHS-Zellkulturmodells

Da die Kokultur von HBMVEC mit Perizyten zu einer erhöhten Expression verschiedener TJ-Proteine führte, wurde nun untersucht, ob sich dies auch in einer erhöhten BHS-Integrität und reduzierten Permeabilität widerspiegelte. Dies war allerdings nicht der Fall (Abb. 7). Die Beobachtungen der Integrität mittels TEER-Messungen und der Permeabilität für 4 kDa große Moleküle ergaben zwischen beiden Modellen keinen Unterschied.

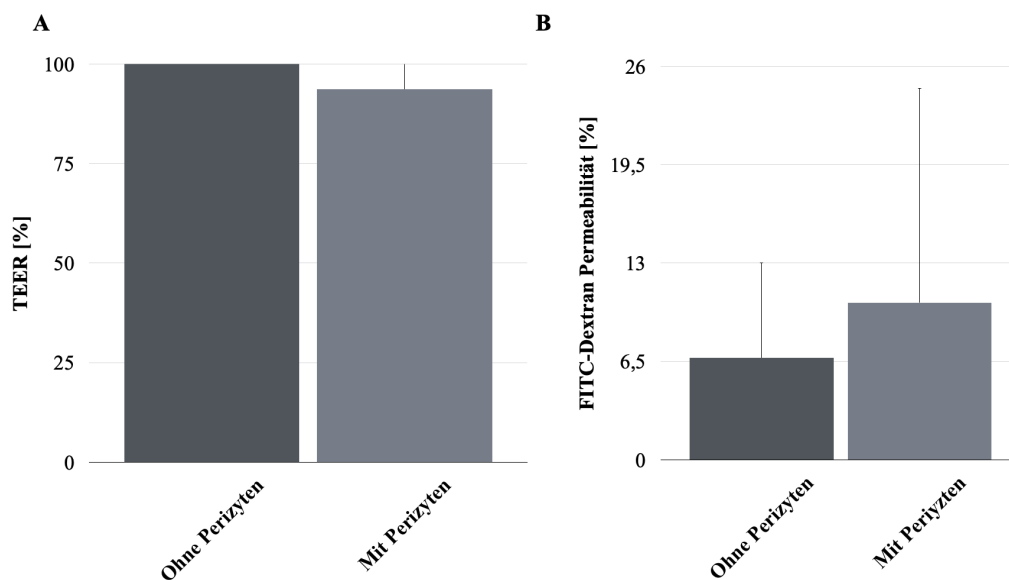


Abb. 7 Bestimmung der BHS Integrität und Permeabilität vom HBMVEC Monolayerkulturen und Kokulturen mit Perizyten.

(A) TEER-Messung und (B) Bestimmung der Permeabilität für 4 kDa FITC-Dextran ohne und mit Perizyten-Kokultur (n=3).

4. Diskussion

4.1. cerebEND Zellkultur

TTFields sind eine zur GBM-Behandlung zugelassene Therapie, die zu einer erheblichen Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens im Vergleich zur alleinigen Temozolomid Therapie führte (Stupp et al. 2012, Guzauskas et al. 2019; Guzauskas et al. 2018). Der Wirkungsmechanismus liegt in der Störung der Spindelfaserbildung während der Mitose der GBM-Zellen (Kirson et al. 2007; Kirson et al. 2004). Während der späten Mitosephase treten dielektrophoretische Effekte auf und führen zu einer Fehllokalisierung geladener Proteinkomplexe an der Teilungsfurche, wodurch die Zellteilung gestört wird.

In Untersuchungen mit murinen cerebEND-Zellen und Ratten wurde gezeigt, dass eine TTFields Frequenz von 100 kHz zu einer transienten und reversiblen Öffnung der BHS führte, während 200 kHz keinen Effekt hatte. Der *in vitro* Befund konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Auch eine Fluoreszenz-Doppelfärbung bestätigte eine Delokalisation des TJ-Proteins Claudin-5 in das Zytoplasma, während PECAM-1 an der Zellmembran verblieb.

Während ein zunächst durchgeführter Western-Blot zeigte, dass sich die gesamte Expression von Claudin-5 nicht durch TTFields veränderte (Salvador et al. 2020), konnte mit Hilfe eines fraktionierten Western-Blots eine Anreicherung von Claudin-5 im Zytoplasma nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dies auf TTFields-induzierte Veränderungen des Zytoskeletts zurückzuführen. Claudin-5 ist über ZO-1, ZO-2 und ZO-3 mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (Furuse et al. 1999; Greene et al. 2019). Da der Zellmonolayer intakt bleibt und der primäre Wirkmechanismus von TTFields die Störung der Mikrotubuli-Spindelfaserbildung durch Verringerung des Verhältnisses zwischen polymerisiertem und Gesamttubulin ist (Giladi et al. 2015), nehmen wir an, dass TTFields ihre Wirkung durch eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts ausüben und wahrscheinlich keine direkte Wirkung auf die TJ-Proteine selbst haben. In der

Literatur wurde vorgeschlagen, dass die Expression von Claudin-5 mit der endothelialen Abstammungslinie und nicht mit undichten Kapillaren assoziiert ist (Firth 2002). Dies unterstützt unsere Beobachtungen, dass die Anwendung von TTFields nur die Verteilung der TJ-Proteine verändert, aber nicht ihre Expressionsstärke. Der Zerfall der TJ-Komplexe durch diese Umverteilung könnte dann zum Verlust der BHS Barrierefunktion führen.

Integrität und Permeabilität der BHS sind zwei wichtige Kriterien, um eine intakte oder kompromittierte BHS nachzuweisen. Die TEER Messung ist eine weit anerkannte quantitative Technik zur Messung der TJ-Protein Integrität in Zellkulturmodellen von Endotheliumbarrieren. Die TEER ist auch die Methode der Wahl, um die Integrität des Endotheliums als Zellbarriere in Hinblick auf den Medikamententransport zu beurteilen (Srinivasan et al. 2015). Mit dieser Technik haben wir die Integritätsveränderungen des murinen BHS-Modells nach einer Behandlung mit TTFields von 100 kHz für 72 h beobachtet. Dieses führte zu 21 % niedrigeren TEER Werten im Vergleich zu Kontrollzellen. Nach 48 h war eine vollständige Erholung der behandelten Zellen zu beobachten. Erneute Behandlung mit TTFields führte dann zu einer erneuten Öffnung der BHS, was zeigt, dass wiederholte Öffnungen und Erholungen der BHS möglich sein sollten. Unser Experiment, bei dem die Zellen zunächst mit 100 kHz TTFields und dann direkt im Anschluss mit 200 kHz behandelt wurden, deutet darauf hin, dass sich die BHS trotz andauernder Behandlung mit 200 kHz für die GBM-Therapie nach initialer Öffnung für eine Medikamentengabe vermutlich regenerieren kann.

Weiterführende *in vivo* Experimente unseres Labors zeigten, dass eine Kombinationstherapie von TTFields mit 100 kHz und Paclitaxel zur Behandlung experimenteller GBM eingesetzt werden kann. Paclitaxel ist ein Medikament, das normalerweise nicht die BHS überqueren kann. TTFields öffneten die BHS und ermöglichten eine Wirkung von Paclitaxel auf die GBM-Zellen (Salvador et al. 2022).

Integritäts- und Permeabilitätsveränderungen der BHS wurden *in vivo* bestätigt. Es konnten Anreicherungen von Evan's Blue (EB), TRITC-Dextran sowie Gadolinium (in

Serial Dynamic Contrast Enhanced (DCE)-MRT) nach Behandlung von Ratten mit 100 kHz TFields für 72 h festgestellt werden (Salvador et al. 2020).

Der parazelluläre Widerstand entsteht durch Zell-Substrat sowie Zell-Zell-Kontakte. Es ist bekannt, dass spezifische TJ-Proteine den epithelialen Widerstand beeinflussen (Anderson 2001; Lo et al. 1999). Die TEER-Methode zur Überprüfung der Integrität von Zellmonolayern ist sehr empfindlich und zuverlässig. Allerdings müssen Faktoren, die die Messungen beeinflussen können, wie z.B. Temperatur (Matter et al. 2003), Nummer der Zellpassage, Zusammensetzung des Zellkulturmediums und Zeitdauer des Wachstums der Zellkultur bis zur Messung beachtet werden. Wir haben alle diese möglichen Fehlerquellen in unseren Versuchen berücksichtigt.

Idealerweise sollten die TEER-Messungen daher in einem Inkubator bei 37°C durchgeführt werden. Andernfalls, z.B. bei RT, wäre es notwendig, vor ihrer Durchführung zunächst die Temperatur auszugleichen, um durch Temperaturschwankungen induzierte TEER-Änderungen zu vermeiden, was der Zellphysiologie und Zellfunktion abträglich sein könnte. Daher wurde von uns eine Wärmeplatte verwendet, um die Temperatur während der TEER-Messung konstant bei 37 °C Grad zu halten.

Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums, die Herkunft der Zelllinien und die Protokolle können zwischen den Laboratorien variieren. Dies kann zu unterschiedlichen morphologischen und funktionellen Zelleigenschaften führen (Srinivasan et al. 2015). Die Zusammensetzung des Zellkulturmediums wurde für cerebEND Zellen adaptiert und standardisiert.

Es ist zu empfehlen, eine frühere Zellpassage zu nutzen, um genauere TEER-Werte zu erzielen. In einer Studie mit Caco-2 Zellen wurde beobachtet, dass die TEER-Werte bis Passage 36 zunahmen, der Widerstand bis Passage 70 variabel war und es bis Passage 100 einem Rückgang gab (Briske-Anderson et al. 1997, Lu et al. 1996). cerebEND Zellen haben bei niedriger Passagenummer Barriereigenschaften mit hoher Expression von TJ-Proteinen, verlieren aber ihre Eigenschaften mit dem Alter (Burek et

al. 2012). Deshalb haben wir bezüglich der cerebEND Zellen keine Passage über 10 verwendet.

Des Weiteren müssen Zellkulturen gleicher Kulturdauer verwendet werden, um eine vergleichbare Expression von TJ-Proteinen zu erlangen. Die gleiche Zeit des Wachstums der Zellkultur wird als wichtiger Punkt für die Bildung der TJ-Proteine in Zellen angesehen (Sambuy et al. 2005). Daher wurden die Zellen in unseren Versuchen standardisiert nach 7 Tagen Wachstum gemessen, einem Zeitpunkt, zu dem sie gute BHS-Eigenschaften aufwiesen.

Auch Scherstress spielt eine wichtige Rolle für die Expression von TJ-Proteinen, die Barrierefunktion und BHS-Durchlässigkeit (Tarbell, 2010). Scherstress, der durch den Blutfluss hervorgerufen wird, hat eine mechanotransduktive Wirkung auf verschiedene endotheliale molekulare Signalwege durch die Aktivierung von Membranrezeptoren (Booth et al. 2012a). Damit erhöht sich die Gen- und Proteinexpression, was zur Produktion von TJ-Proteinen, u.a. ZO-1 führt (Siddharthan et al. 2007). Damit wird auch die Zytoskelettstruktur moduliert, was eine Neuorientierung und Umstrukturierung von Zellen fördert (Galbraith et al. 1998). So können sich die TEER-Werte unter verschiedenen Fließbedingungen in dynamischer und statischer Kultur unterscheiden. Diese Bedingungen konnten aus technischen Gründen nicht rekonstruiert werden. Unsere Versuche wurden mit Hilfe eines statischen BHS-Modells durchgeführt. Hypothetisch könnten unter Strömungsbedingungen die TEER-Werte höher sein, sodass hier eine Limitierung unserer Studie liegt. Nichtsdestoweniger konnten wir zeigen, dass TTFelds mit 100 kHz zu einer reversiblen Öffnung der BHS führten, die reproduzierbar war und wahrscheinlich auf eine Delokalisierung von Claudin-5 von der Zellmembran in das Zytoplasma zurückzuführen war.

4.2. HBMVEC Zellkultur

Für eine Translation in die Klinik müssen die im murinen System gewonnenen Daten in humanen Modellen reproduziert werden. Es existieren keine *in vitro* Modelle der BHS, die die *in vivo* BHS Bedingungen vollständig wiedergeben können (Bagchi et al. 2019). Unser Ziel war es daher, ein geeignetes humanes Endothelzell-BHS-Modell für TTFields Experimente zu etablieren.

Da mit cerebEND Zell-Monokulturen gute Ergebnisse erzielt worden waren, wurden die Versuche zunächst mit einer einfachen humanen HBMVEC Monokultur wiederholt. Leider führte dies zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. TJ-Proteine waren in der Fluoreszenzmikroskopie nicht oder nur schwach nachweisbar und TTFields-Effekte waren nicht offensichtlich.

Die Literatur weist darauf hin, dass humane *in vitro* BHS-Modelle das Vorhandensein weiterer Strukturen der Neurovaskulären Einheit (NVU) wie Astrozyten und Perizyten benötigen, um TJ-Proteine funktional zu exprimieren (Stone et al. 2019; He et al. 2014; Jo et al. 2013). Insbesondere Perizyten haben einen Einfluss auf die Permeabilität der Endothelzellen (Edelman et al. 2006). Im Kokulturmodell mit humanen Zellen erhöhen sie im Vergleich zur Monokultur deutlich den TEER-Wert (Hayashi et al. 2004). Außerdem scheinen Perizyten die Bildung von TJ-Protein durch die Interaktion mit Endothelzellen auch ohne die Unterstützung von Astrozyten regulieren zu können (Jo et al. 2013). Basierend auf dieser Schlüsselrolle von Perizyten haben wir ein HBMVEC-Perizyten-Kokulturmodell entwickelt, um Monokultur- mit Kokulturmodellen vergleichen zu können. In unseren Versuchen haben die Perizyten die Menge an TJ-Proteinen in den HBMVEC-Zellen erhöht, aber noch nicht ausreichend, um die Permeabilität und Integrität der BHS signifikant zu beeinträchtigen. Es ist bekannt, dass eine niedrigere Passage der Zellen zu höheren TEER-Werten führt und mit höheren Passagen werden diese variabel (Briske-Anderson et al. 1997; Lu et al. 1996; Zucco et al. 2005). Ein Problem könnte sein, dass die HBMVEC nur eine kurze Überlebenszeit haben. Sie können nur bis Passage acht gut verwendet werden. Bis die Zellen für den

Versuch vorbereitet waren, hatten sie bereits Passagen von sechs bis acht erreicht. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die HBMVEC Zellen schwer zu handhaben sind.

Ein weiterer Nachteil ist, dass die TTFields Versuche mehrere Tage in Anspruch nehmen und das Kokulturmodell aus technischen Gründen nicht kontrolliert in die TTFields-Platte eingebracht werden kann. Daher bedarf es noch weiterer Folgeversuche, bis belastbare Resultate erzielt werden können.

In der Literatur wurde beschrieben, dass man ein dreifaches BMVEC-Perizyten-Astrozyten-Kokultursystem benötigt, um die anatomische Struktur der BHS *in vitro* vollständig nachzubilden. Dieses Dreifach-Kokulturmodell hat eine signifikant höhere TEER und eine geringere Permeabilität, was darauf hinweist, dass sowohl Perizyten als auch Astrozyten zur Integrität der BHS beitragen (Nakagawa et al. 2009; Nakagawa et al. 2007). Dieses Modell wurde bereits in einigen Permeabilitätsstudien der BHS verwendet (Hellinger et al. 2012; Imamura et al. 2011; Ceruti et al. 2011; Veszelka et al. 2013). Aus diesem Grund könnte das BMVEC-Perizyten-Astrozyten-Dreifach-Kokulturmodell ein zuverlässigeres *in vitro* Modell der BHS für unsere Folgeversuche darstellen.

4.3. Ausblick

Die Öffnung der BHS durch TFields könnte nicht nur für die Behandlung von GBM, sondern auch von anderen Erkrankungen des ZNS von großem Vorteil sein. Da die BHS eine wesentliche Barriere zwischen dem Blut und dem Gehirn darstellt und damit die Zufuhr von Medikamenten zum ZNS behindert, sind innovative therapeutische Ansätze zur Überwindung dieser Barriere notwendig. Die Vielzahl von Erkrankungen des ZNS, darunter Depression, Epilepsie, Multiple Sklerose, neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, neuropathische Schmerzen und Schizophrenie, erfordern neue Ansätze zur Verbesserung der therapeutischen Versorgung des ZNS, mit möglichst geringer assoziierter Toxizität. Die Anwendung von TFields in Verbindung mit den derzeit bereits verfügbaren Therapeutika könnte sich als eine mögliche Lösung für dieses Problem erweisen.

Allerdings bedarf es vor einer Translation unserer Befunde in die Klinik noch weiterer Anstrengungen. So muss der Wirkmechanismus, durch den TFields die BHS öffnen, aufgeklärt werden. Idealerweise werden dynamische BHS-Modelle angewendet, die aber aufgrund technischer Einschränkungen des *in vitro* Systems schwierig zu handeln sind. Außerdem muss ein geeignetes humanes BHS-Modell optimiert werden, bevor eine klinische Studie in Betracht gezogen werden kann.

5. Zusammenfassung

TTFields sind eine zugelassene Therapie für die Behandlung von Glioblastom IDH-Wildtyp. Es handelt sich dabei um elektrische Wechselfelder niedriger Intensität und mittlerer Frequenz, die therapeutisch aus zwei Richtungen durch ein tragbares, nicht-invasives Gerät appliziert werden. Sie verhindern die Spindelfaserbildung während der Mitose.

Die Wirkung vieler effektiver Chemotherapeutika ist im ZNS durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) eingeschränkt. Die BHS wird nach TTFields Applikation bei 100 kHz in einem murinen cerebEND-Zell-Modell vorübergehend geöffnet. Dieser Effekt wurde in dieser Arbeit zunächst mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie und dann durch einen fraktionierten Western-Blot bestätigt, dass der mutmaßliche Wirkungsmechanismus von TTFields in der Delokalisierung des tight junction Proteins Claudin-5 von der Membran in das Zytoplasma liegt. TEER-Messungen zeigten, dass sich die Integrität der BHS durch 100 kHz TTFields nach 72 h verringerte und 48 h - 72 h nach Ende der Behandlung wieder normalisierte, auch wenn statt eines Behandlungsendes auf 200 kHz TTFields umgeschaltet wurde. Der zweite Teil der Untersuchung bestand darin, ein BHS-Modell aus humanen HBMVEC Zellen zu etablieren, um die Auswirkungen von TTFields im humanen System verifizieren zu können. Zunächst konnten keine Effekte von TTFields unterschiedlicher Frequenz auf eine HBMVEC-Monokultur festgestellt werden. In einer Kokultur mit Perizyten gab es eine erhöhte Expression von Claudin-5, Occludin und PECAM-1. Allerdings zeigten die TEER-Messungen und ein Permeabilitätsassay keine Unterschiede zwischen den Mono- und Kokultur-Modellen der BHS auf.

Durch eine transiente Öffnung der BHS könnte eine höhere Dosis von Therapeutika, die normalerweise die BHS nicht überwinden können, im ZNS erreicht werden. Damit könnten TTFields eine innovative Methode zur Behandlung von Hirntumoren und anderen Erkrankungen des ZNS darstellen. Die hier präsentierten Daten geben erste Hinweise in diese Richtung, müssen aber noch optimiert und verifiziert werden.

Abstract

TTFIELDS are an approved therapy for the treatment of glioblastoma IDH-wildtype. They are low intensity, medium frequency alternating electric fields which are applied therapeutically from two directions by a portable, non-invasive device. TTFIELDS prevent spindle fiber formation during mitosis by aligning the strongly polar tubulin subunits in the electrical fields.

The achievement of effective chemotherapy of glioblastoma IDH-wildtype and other central nervous system (CNS) disorders is limited by the blood-brain barrier (BBB). Application of TTFIELDS at 100 kHz at the mouse cell line cerebEND temporarily opens the BBB. This TTFIELDS effect was observed in fluorescence microscopy. Fractionated Western-Blots revealed delocalisation of the TJ-Protein Claudin-5 from the membrane to the cytoplasm due to the application of TTFIELDS. The integrity of the BBB has been shown in TEER measurements to be interrupted by 72 h TTFIELDS application at 100 kHz. This effect was reversible and repeatable. In addition, if TTFIELDS at 200 kHz were applied after BBB-opening at 100 kHz the cells recovered.

The second part of this project was to establish a human cell culture BBB model (HBMVEC) to investigate TTFIELDS effects on human cells. There were no effects of TTFIELDS at different frequencies on HBMVEC cells detectable. HBMVEC cells had lower expression of Claudin-5, Occludin and PECAM-1 compared to their co-culture with pericytes. However, TEER measurements and permeability assays revealed no differences between such mono- and co-cultures.

By overcoming the BBB a higher dose of the drugs could be achieved in a more controlled manner in the CNS. As a result, TTFIELDS could be an innovative method for the treatment of brain tumours and other diseases of the CNS. The presented experiments provide a first rationale in this direction but require optimisation and verification.

6. Literaturverzeichnis

Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. In *Nature Reviews Neuroscience*, 7. S. 41-53. doi.org/10.1038/nrn1824

Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. In *Neurobiology of disease*, 37(1), S. 13-25. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030

Abbott, N. J. (2014) Anatomy and physiology of the blood-brain barriers. In Hammarlund-Udenaes, M; de Lange, ECM; Thorne, RG. (eds). *Drug delivery to the brain*, New York, NY: Springer, S. 3-21. doi:10.1016/j.semcd.2015.01.002

Alam, M. I., Beg, S., Samad, A., Baboota, S., Kohli, K., Ali, J., Ahuja, A., & Akbar, M. (2010) Strategy for effective brain drug delivery. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40. S. 385-403. doi: 10.1016/j.ejps.2010.05.003

Allt, G., & Lawrenson, J. G. (2001) Pericytes: cell biology and pathology. In *Cells Tissues Organs*, 169. S. 1-11. doi: 10.1159/000047855.

Anderson, J. M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. (2001) In *News in Physiological Sciences*, 16. S. 126-130. doi:10.1152/physiologyonline.2001.16.3.126

Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. In *Nature*, 468. S. 557-561. doi: 10.1038/nature09522. Epub 2010 Oct 13

Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C. (2011) Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. In *Developmental Cell*, 21. S. 193-215. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001

Arshad, F., Wang, L., Sy, C., Avraham, S., & Avraham, H. K. (2011) Blood-brain barrier integrity and breast cancer metastasis to the brain. In *Pathology Research International*. S. 920-509. doi:10.4061/2011/920509

- Arvind, R., Chandana, S.R., Borad, M.J., Pennington, D., Mody, K. & Babiker H.** (2021) Tumor-Treating Fields: A fourth modality in cancer treatment, new practice updates. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. S. 168:103535. doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103535
- Baeten, K.M., & Akassoglou, K.** (2011) Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. In *Developmental Neurobiology*, 71(11). S. 1018-1039. doi:10.1002/dneu.20954
- Bagchi, S., Chhibber, T., Lahooti, B., Verma, A., Borse, V., & Jayant, R. D.** (2019) In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: an overview. In *Drug, Design, Development and Therapy*, 13. S. 3591-3605. doi:10.2147/DDDT.S218708
- Balabanov, R., Washington, R., Wagnerova, J., & Dore-Duffy, P.** (1996) CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2. In *Microvascular Research*, 52. S. 127-142. doi: 10.1006/mvre.1996.0049
- Ballantine, H.T., Bell, E., & Manlapaz, J.** (1960) Progress and problems in the neurological applications of focused ultrasound. In *Journal of Neurosurgery*, 17. S. 858-76. doi: 10.3171/jns.1960.17.5.0858
- Bandopadhyay, R., Orte, C., Lawrenson, J. G., Reid, A. R., De Silva, S., & Allt, G.** (2001) Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. In *Journal of Neurocytology* 30. S. 35-44. doi.org/10.1023/A:1011965307612
- Barbu, E., Molnár, E., Tsibouklis, J., & Górecki, D. C.** (2009) The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. In *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6. S. 553-565. doi: 10.1517/17425240902939143
- Bartus, R. T., Elliott, P., Hayward, N., Dean, R., McEwen, E. L., & Fisher, S. K.** (1996) Permeability of the blood brain barrier by the bradykinin agonist, RMP-7: evidence for a sensitive, auto-regulated, receptor-mediated system. In *Immunopharmacology*, 33. S. 270-278. doi: 10.1016/0162-3109(96)00070-7

- Bassett, C.A.** (1985) The development and application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for ununited fractures and arthrodeses. In *Clinics in Plastic Surgery*, 12. S. 259-277.
- Batrakova, E. V., Gendelman, H. E., & Kabanov, A. V.** (2011) Cell-mediated drugs delivery. In *Expert opinion on drug delivery*, 8. S. 415-433. doi: 10.1517/17425247.2011.559457
- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., & Zlokovic, B. V.** (2010) Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. In *Neuron*, 68. S. 409-427. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.043
- Benson, K., Cramer, S., & Galla, H. J.** (2013) Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. In *Fluids Barriers CNS*, 10(1). S. 5. doi: 10.1186/2045-8118-10-5.
- Bleeker, F. E., Atai, N. A., Lamba, S., Jonker, A., Rijkeboer, D., Bosch, K. S., Tigchelaar, W., Troost, D., Vandertop, W. P., Bardelli, A., & Van Noorden, C. J.** (2010). The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. In *Acta neuropathologica*, 119(4). S. 487-494. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0645-6>
- Boado, R. J., Hui, E. K., Lu, J. Z., Sumbria, R. K., & Pardridge, W. M.** (2013) Blood-brain barrier molecular trojan horse enables imaging of brain uptake of radioiodinated recombinant protein in the rhesus monkey. In *Bioconjugate Chemistry*, 24. S. 1741-1749. doi: 10.1021/bc400319d
- Booth, R., & Kim, H.** (2011) A multi-layered microfluidic device for in vitro blood-brain barrier permeability studies. In *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. Red Hook, NY: Curran Associates. S. 1388-1390.
- Booth, R., & Kim, H.** (2012a) A parallel array microfluidic blood-brain barrier model for high-throughput quantitation of shear stress effects. In *Society, C. a. B. M., editor.; 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. MicroTAS; Okinawa, Japan. S. 491-493.

- Booth, R., & Kim, H. (2012b)** Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). In *Lab on a Chip*, 12. S.1784-1792. doi: 10.1039/c2lc40094d
- Briske-Anderson, M.J., Finley, J. W., & Newman, S.M. (1997)** The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. In *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 214(3). S. 248-257. doi:10.3181/00379727-214-44093.
- Burek, M., Salvador, E., & Foerster, C.Y. (2012)** Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model. In *Journal of Visualized Experiments*, 66, e4022. doi:10.3791/4022.
- Bussolari, S. R., Dewey, C. F., Jr, & Gimbrone, M. A., Jr. (1998)** Jr Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. In *Review of Scientific Instruments*, 2(53). S. 1851-1854. doi: 10.1063/1.1136909
- Cai, S., Xu, Y., Cooper, R. J., Ferkowicz, M. J., Hartwell, J. R., Pollok, K. E., & Kelley, M. R. (2005).** Mitochondrial targeting of human O6-methylguanine DNA methyltransferase protects against cell killing by chemotherapeutic alkylating agents. In *Cancer research*, 65(8), S. 3319–3327. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3335>
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M. P., & Fenart, L. (2007)** Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. In *Nature Reviews Drug Discovery*, 6. S. 650-661. doi: 10.1038/nrd2368
- Ceruti, S., Colombo, L., Magni, G., Viganò, F., Boccazzi, M., Deli, M. A., Sperlagh B., Abbracchio M. P., & Kittel A. (2011)** Oxygen-glucose deprivation increases the enzymatic activity and the microvesicle-mediated release of ectonucleotidases in the cells composing the blood-brain barrier. In *Neurochemistry International*, 59. S. 259-271. doi: 10.1016/j.neuint.2011.05.01
- Champion, J. A., Katare, Y. K., & Mitragotri, S. (2007)** Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. In *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 121. S. 3-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.03.022

- Choi, J., Pernot, M., Small, S., & Konofagou, E. (2005)** Feasibility of transcranial, localized drug-delivery in the brain of Alzheimer's-model mice using focused ultrasound. In *IEEE Symposium Proceedings Ultrasound Ferroelectrics Frequency Quality Control*, 2 (18-21). S. 988-999.
- Clague, D. S., & Wheeler, E. K. (2001)** Dielectrophoretic manipulation of macromolecules: the electric field. In *Physical Review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 64 026605. doi: 10.1103/PhysRevE.64.026605
- Cline, H. E., Hynynen, K., Hardy, C. J., Watkins, R. D., Schenck, J. F., & Jolesz, F. A. (1994)** MR temperature mapping of focused ultrasound surgery. In *Magnetic resonance in medicine*, 31. S. 628-636. doi: 10.1002/mrm.1910310608
- Cohen-Kashi Malina, K., Cooper, I., & Teichberg, V. I. (2009)** Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness. In *Brain Research*, 1284. S. 12-21. doi: 10.1016/j.brainres.2009.05.072
- Cucullo, L., McAllister, M. S., Kight, K., Krizanac-Bengez, L., Marroni, M., Mayberg, M. R., Stanness, K. A., & Janigro, D. (2002)** A new dynamic in vitro model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier. In *Brain Research*, 951. S. 243-254. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03167-0
- Cucullo, L., Hossain, M., Rapp, E., Manders, T., Marchi, N., & Janigro, D. (2007)** Development of a humanized in vitro blood-brain barrier model to screen for brain penetration of antiepileptic drugs. In *Epilepsia*, 48. S. 505-516. doi: 10.1111/j.1528-1167.2006.00960.x
- Cucullo, L., Couraud, P. O., Weksler, B., Romero, I. A., Hossain, M., Rapp, E., & Janigro, D. (2008)** Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28. S. 312-328. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600525
- Cucullo, L., Marchi, N., Hossain, M., & Janigro, D. (2011)** A dynamic in vitro BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31. S. 767-777. doi: 10.1038/jcbfm.2010.162

- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010).** Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. In *Nature*, 468(7323), 562-566. doi.org/10.1038/nature09513
- Date, I., Takagi, N., Takagi, K., Tanonaka, K., Funakoshi, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., & Takeo, S. (2006).** Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced increase in permeability of the blood-brain barrier and decreases in expression of tight junctional proteins in cerebral vessels. In *Neuroscience letters*, 407(2). S 141-145. doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.050
- De Jong, W. H., & Borm, P. J. A. (2008)** Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. In *International Journal of Nanomedicine*, 3. S.133-149. doi: 10.2147/ijn.s596
- Deli, M. A., Abrahám, C. S., Kataoka, Y., & Niwa, M. (2005)** Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology. In *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25. S. 59-127. doi: 10.1007/s10571-004-1377-8
- Demeule, M., Régina, A., Jodoin, J., Laplante, A., Dagenais, C., Berthelet, F., Moghrabi, A., & Béliveau, R. (2002)** Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. In *Vascular Pharmacology*, 38. S. 339-348. doi: 10.1016/s1537-1891(02)00201-x
- Dewey, C. F., Jr, Bussolari, S. R., Gimbrone, M. A., Jr, & Davies, P. F. (1981)** The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. In *Journal of Biomechanical Engineering*, 103. S. 177-185. doi: 10.1115/1.3138276
- Durán, W. N., Beuve, A. V., & Sánchez, F. A. (2013)** Nitric oxide, S-nitrosation, and endothelial permeability. In *IUBMB life*, 65(10), S. 819–826. https://doi.org/10.1002/iub.1204
- Edelman, D. A., Jiang, Y., Tyburski, J., Wilson, R. F., & Steffes, C. (2006)** Pericytes and their role in microvasculature homeostasis. In *Journal of Surgical Research*, 135. S. 305-311. doi: 10.1016/j.jss.2006.06.010
- Ehrlich, P. (1885)** Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. In *Eine Farbenanalytische Studie*. Berlin: Hirschwald.

- Emerich, D. F., Dean, R. L., Osborn, C., & Bartus, R. T. (2001)** The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation. In *Clinical Pharmacokinetics*, 40. S. 105-23. doi: 10.2165/00003088-200140020-00003
- Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009)** The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. In *Seminars in Immunopathology*, 31. S. 497-511. doi: 10.1007/s00281-009-0177-0
- Fabian, D., Guillermo Prieto Eibl, M., Alnahhas, I., Sebastian, N., Giglio, P., Puduvalli, V., Gonzalez, J., & Palmer, J. D. (2019)** Treatment of glioblastoma (GBM) with the addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. In *Cancers (Basel)*, 11(2). S. 174. doi:10.3390/cancers11020174
- Fanning, A. S., & Anderson, J. M. (2009)**. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165. S. 113-120. doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x
- Fenstermacher, J., Gross, P., Sposito, N., Acuff, V., Pettersen, S., & Gruber, K. (1988)** Structural and functional variations in capillary systems within the brain. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 529. S. 21-30. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb51416.x.
- Firth, J. A. (2002)** Endothelial barriers: from hypothetical pores to membrane proteins. In *Journal of Anatomy*, 200(6). S. 541-548. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00059.x
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998)** Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. In *Journal of Cell Biology*, 141. S. 1539-1550. doi: 10.1083/jcb.141.7.1539
- Furuse, M., Sasaki, H., & Tsukita, S. (1999)** Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. In *Journal of Cell Biology*, 147. S. 891-903. doi: 10.1083/jcb.147.4.891
- Galbraith, C. G., Skalak, R., & Chien, S. (1998)** Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. In *Cell Motility and the*

Cytoskeleton, 40. S. 317-30. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1998)40:4<317::AID-CM1>3.0.CO;2-8

Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., Zhang, L. (2010) Membrane transporters in drug development. In *Nature Reviews Drug Discovery*, 9. S. 215-236. doi: 10.1038/nrd3028

Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. E., & Westphal, M. (2003) Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. In *Journal of clinical oncology* 21 (8). S. 1624-1636. doi: 10.1200/JCO.2003.05.063.

Giladi, M., Schneiderman, R. S., Voloshin, T., Porat, Y., Munster, M., Blat, R., Sherbo, S., Bomzon, Z., Urman, N., Itzhaki, A., Cahal, S., Shteingauz, A., Chaudhry, A., Kirson, E. D., Weinberg, U., & Palti, Y. (2015) Mitotic spindle disruption by alternating electric fields leads to improper chromosome segregation and mitotic catastrophe in cancer cells. In *Scientific Reports*, 5. S. 18046. doi: 10.1038/srep18046.

Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. In *Nature Reviews Cancer*, 2. S. 48-58. doi: 10.1038/nrc706

Gould, D. B., Phalan, F. C., Breedveld, G. J., van Mil, S. E., Smith, R. S., Schimenti, J. C., Aguglia, U., van der Knaap, M. S., Heutink, P., & John, S. W. (2005) Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. In *Science*, 308. S. 1167-1171. doi:10.1126/science.1109418

Gould, D. B., Phalan, F. C., van Mil, S. E., Sundberg, J. P., Vahedi, K., Massin, P., Bousser, M. G., Heutink, P., Miner, J. H., Tournier-Lasserre, E., & John, S. W. (2006) Role of COL4A1 in small-vessel disease and hemorrhagic stroke. In *New England Journal of Medicine*, 354. S.1489-96. doi:10.1056/NEJMoa053727

Greene, C., Hanley, N., & Campbell, M. (2019) Claudin-5: gatekeeper of neurological function. In *Fluids Barriers CNS*, 16. S. 3. doi: 10.1186/s12987-019-0123-z

Grieb, P., Forster, R. E., Strome, D., Goodwin, C. W., & Pape, P. C. (1985) O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator- dilution

technique. In *Journal of Applied Physiology*, 58; S. 1929-1941. doi: 10.1152/jappl.1985.58.6.1929

Guzauskas, G.F., Salzberg, M., & Wang, B.C. (2018) Estimated lifetime survival benefit of tumor treating fields and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma patients. In *CNS Oncology*, 7(3):CNS23. doi:10.2217/cns-2018-0010

Guzauskas, G. F., Pollom, E. L., Stieber, V. W., Wang, B., & Garrison, L. P., Jr. (2019) Tumor treating fields and maintenance temozolomide for newly-diagnosed glioblastoma: a cost-effectiveness study. In *Journal of Medical Economics*, 3. S. 1-8. doi: 10.1080/13696998.2019.1614933.

Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., & Sorokin, L. M. (2005) Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. In *Physiological Reviews*, 85. S. 979-1000. doi:10.1152/physrev.00014.2004

Haorah, J., Schall, K., Ramirez, S. H., & Persidsky, Y. (2008) Activation of Protein Tyrosine Kinases and Matrix Metalloproteinases Causes Blood-Brain Barrier Injury: Novel Mechanism for Neurodegeneration Associated with Alcohol Abuse. In *Glia*, 56. S. 78-88. doi: 10.1002/glia.20596.

Hayashi, K., Nakao, S., Nakaoka, R., Nakagawa, S., Kitagawa, N., & Niwa, M.(2004) Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. In *Regulatory Peptides*, 123. S. 77-83. doi: 10.1016/j.regpep.2004.05.023

He, Y., Yao, Y., Tsirka, S. E., & Cao, Y. (2014) Cell-culture models of the blood-brain barrier. In *Stroke*, 45(8). S. 2514-2526. doi:10.1161/STROKEAHA.114.005427

Hegi, M. E., & Stupp, R. (2013) Neuro-oncology: in search of molecular markers of glioma in elderly patients. In *Nature Reviews Neurology*, 9(8). S. 424-425. doi: 10.1038/nrneurol.2013.127

Hellinger, E., Veszelka, S., Tóth, A. E., Walter, F., Kittel, A., Bakk, M. L., Tihanyi, K., Háda, V., Nakagawa, S., Duy, T. D., Niwa, M., Deli, M. A., & Vastag, M. (2012) Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82. S. 340-351. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.07.020

- Hersh, D. S., Wadajkar, A. S., Roberts, N., Perez, J. G., Connolly, N. P., Frenkel, V., Winkles, J. A., Woodworth, G. F., & Kim, A. J. (2016)** Evolving drug delivery strategies to overcome the blood brain barrier. In *Current Pharmaceutical Design*, 22(9). S. 1177-1193. doi:10.2174/1381612822666151221150733
- Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., & Rubin, L. L. (1997)** Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. In *Journal of Cell Science*, 110. S. 1603-1613.
- Howarth, A. G., Hughes, M. R., & Stevenson, B. R. (1992)** Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. In *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 262 (2). S. C461-C469. doi.org/10.1152/ajpcell.1992.262.2.C461
- Huang, H., Lin, H., Zhang, X., & Li, J. (2012)** Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF- κ B-dependent pathway. In *Oncology Reports*, 27(6). S. 2050-2056. doi:10.3892/or.2012.1715
- Hynes, R. O. (2009)** The extracellular matrix: not just pretty fibrils. In *Science*, 326. S. 1216-1219. doi:10.1126/science.1176009
- Hynynen, K., & Jolesz, F. A. (1998)** Demonstration of potential noninvasive ultrasound brain therapy through an intact skull. In *Ultrasound in medicine & biology*, 24. S. 275-283. doi: 10.1016/s0301-5629(97)00269-x
- Hynynen, K., McDannold, N., Vykhodtseva, N., & Jolesz, F. A. (2001)** Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. In *Radiology*, 220. S. 640-646. doi: 10.1148/radiol.2202001804
- Imamura, S., Tabuchi, M., Kushida, H., Nishi, A., Kanno, H., Yamaguchi, T., Sekiguchi, K., Ikarashi, Y., & Kase, Y. (2011)** The blood-brain barrier permeability of geissoschizine methyl ether in *Uncaria hook*, a galenical constituent of the traditional Japanese medicine yokukansan. In *Cellular and Molecular Neurobiology*, 31. S. 787-793. doi: 10.1007/s10571-011-9676-3

- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., & Tsukita, S. (1997).** Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. In *The Journal of cell biology*, 138(1). S. 181-192. doi.org/10.1083/jcb.138.1.181
- Jain, S., Mishra, V., Singh, P., Dubey, P. K., Saraf, D. K., & Vyas, S. P. (2003)** RGD-anchored magnetic liposomes for monocytes/neutrophils-mediated brain targeting. In *International Journal of Pharmaceutics*, 261. S. 43-55. doi: 10.1016/s0378-5173(03)00269-2
- Jeanne, M., Labelle-Dumais, C., Jorgensen, J., Kauffman, W. B., Mancini, G. M., Favor, J., Valant, V., Greenberg, S. M., Rosand, J., & Gould, D. B. (2012)** COL4A2 mutations impair COL4A1 and COL4A2 secretion and cause hemorrhagic stroke. In *American Journal of Human Genetics*, 90. S. 91-101. doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.022
- Jeanne, M., Jorgensen, J., & Gould, D. B. (2015)** Molecular and genetic analyses of collagen type IV mutant mouse models of spontaneous intracerebral hemorrhage identify mechanisms for stroke prevention. In *Circulation*, 131. S. 1555-1565. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013395
- Jia, W., Lu, R., Martin, T. A., & Jiang, W. G. (2014)** The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases. In *Molecular Medicine Reports*, 9(3). S. 779-785. doi: 10.3892/mmr.2013.1875.
- Jo, D. H., Kim, J. H., Heo, J. I., Kim, J. H., & Cho, C. H. (2013)** Interaction between pericytes and endothelial cells leads to formation of tight junction in hyaloid vessels. In *Molecules and Cells*, 36(5). S. 465-471. doi:10.1007/s10059-013-0228-1
- Jones, A. R., & Shusta, E. V. (2007)** Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. In *Pharmaceutical research*, 24. S. 1759-1771. doi: 10.1007/s11095-007-9379-0
- Kago, T., Takagi, N., Date, I., Takenaga, Y., Takagi, K., & Takeo, S. (2006).** Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries. In *Biochemical and biophysical research communications*, 339(4). S. 1197-1203. doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.133

- Kaina, B.,** Christmann, M., Naumann, S., & Roos, W. P. (2007) MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. In *DNA Repair (Amst)*, 6(8). S. 1079-1099. doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.008
- Kesari, S.,** Ram, Z., & EF-14 Trial Investigators. (2017) Tumor-treating fields plus chemotherapy versus chemotherapy alone for glioblastoma at first recurrence: a post hoc analysis of the EF-14 trial. In *CNS oncology*, 6(3). S. 185-193. doi.org/10.2217/cns-2016-0049
- Kessler, A.F.,** Frömbling, G. E., Gross, F., Hahn M., Dzokou W., Ernestus R. I., Löhr M., & Hagemann C. (2018) Effects of tumor treating fields (TTFields) on glioblastoma cells are augmented by mitotic checkpoint inhibition. In *Cell Death Discovery*, 4 (77). S. 12. doi: 10.1038/s41420-018-0079-9
- Kessler, A. F.,** Salvador, E., Domröse, D., Burek, M., Schaeffer, C., Tempel Brami, C., Voloshin, T., Giladi, M., Ernestus, R. I., Löhr, M., Förster, C., & Hagemann, C. (2019) Blood Brain Barrier (BBB) Integrity Is Affected By Tumor Treating Fields (TTFields) in vitro and in vivo. In *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 105. S162-163. doi:10.1016/j.ijrobp.2019.06.182
- Kim, S. H.,** Turnbull, J., & Guimond, S. (2011) Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. In *Journal of Endocrinology*, 209. S. 139-51. doi:10.1530/JOE-10-0377
- Kinoshita, M.,** McDannold, N., Jolesz, F. A., & Hynynen, K. (2006) Targeted delivery of antibodies through the blood-brain barrier by MRI-guided focused ultrasound. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(4). S. 1085-1090. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.112
- Kirson, E. D.,** Gurvich, Z., Schneiderman, R., Dekel, E., Itzhaki, A., Wasserman, Y., Schatzberger, R., & Palti, Y. (2004) Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. In *Cancer Research*, 64(9). S.3288-3295. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-0083.
- Kirson, E. D.,** Dbalý, V., Tovarys, F., Vymazal, J., Soustiel, J. F., Itzhaki, A., Mordechovich, D., Steinberg-Shapira, S., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Wasserman, Y., Salzberg, M., Ryffel, B., Goldsher, D., Dekel, E., & Palti, Y. (2007) Alternating

electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24). S. 10152-10157. doi: 10.1073/pnas.0702916104.

Kniesel, U., & Wolburg, H. (2000) Tight junctions of the blood-brain barrier. In *Cellular and Molecular Neurobiology*, 20. S. 57-76. doi: 10.1023/a:1006995910836

Kong, X., Yang, S., Gong, F., Lu, C., Zhang, S., Lu, G., & Lin, G. (2016) The relationship between cell number, division behavior and developmental potential of cleavage stage human embryos: A time-lapse study. In *PLoS One*, 11 (4), S. e0153697. doi: 10.1371/journal.pone.0153697

Koutsiaris, A. G., Tachmitzi, S. V., Batis, N., Kotoula, M. G., Karabatsas, C. H., Tsironi, E., & Chatzoulis, D. Z. (2007) Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. In *Biorheology*, 44. S. 375-386.

Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J., & Blasig, I. E. (2008) Structure and function of claudins. In *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778. S. 631-645. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.10.018.

Lal-Nag, M., & Morin, P. J. (2009) The claudins. In *Genome Biology*, 10. S. 235. doi: 10.1186/gb-2009-10-8-235.

Lee, H. J., Zhang, Y., & Pardridge, W. M. (2002) Blood-brain barrier disruption following the internal carotid arterial perfusion of alkyl glycerols. In *Journal of Drug Targeting*, 10. S. 463-467. doi: 10.1080/1061186021000038337

Li, X., Yang, F., & Rubinsky, B. (2020) A Theoretical Study on the Biophysical Mechanisms by Which Tumor Treating Fields Affect Tumor Cells During Mitosis. In *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 67, (9). S. 2594-2602, Sept. 2020. doi: 10.1109/TBME.2020.2965883.

Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E. H., Kalbacher, H., & Wolburg, H. (2000a) Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. In *Acta Neuropathologica (Berl.)*, 100. S. 323-331.

- Liebner, S., Kniesel, U., Kalbacher, H., & Wolburg, H. (2000b)** Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells. In *European Journal of Cell Biology*, 79. S. 707-717. doi: 10.1078/0171-9335-00101
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P., & Betsholtz, C. (1997)** Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. In *Science*, 277. S. 242-245. doi: 10.1126/science.277.5323.242
- Lippoldt, A., Kniesel, U., Liebner, S., Kalbacher, H., Kirsch, T., Wolburg, H., & Haller, H. (2000)** Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. In *Brain Research*, 885. S. 251-261. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02954-1
- Lo, C. M., Keese, C. R., & Giaever, I. (1999)** Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. In *Experimental Cell Research*, 250(2). S. 576-580. doi:10.1006/excr.1999.4538
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007)** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. In *Acta Neuropathologica*, 114. S. 97-109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016)** The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. In: *Acta Neuropathologica* 131(6). S. 803-820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, N. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison D. E. (2021)** The 2021 WHO Classification of tumors of the central nervous system: a summary. In *Neuro-Oncology* 23 (8). S. 1231-1251. doi.org/10.1093/neuonc/noab106
- Lowry, J. L., Brovkovich, V., Zhang, Y., & Skidgel, R. A. (2013)** Endothelial nitric-oxide synthase activation generates an inducible nitric-oxide synthase-like output of

nitric oxide in inflamed endothelium. In *The Journal of biological chemistry*, 288(6), S. 4174–4193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436022>

Lu, S., Gough, A. W., Bobrowski, W. F., & Stewart, B. H. (1996) Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. In *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85. S. 270-273. doi: 10.1021/js950269u

Luissint, A. C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., & Couraud, P. O. (2012) Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. In *Fluids Barriers CNS*, 9. S. 23. doi: 10.1186/2045-8118-9-23.

Luo, C., Xu, S., Dai, G., Xiao, Z., Chen, L., & Liu, Z. (2020). Tumor treating fields for high-grade gliomas. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 127. S. 110193. doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110193

Marenco-Hillebrand, L., Wijesekera, O., Suarez-Meade, P., Mampre, D., Jackson, C., Peterson, J., Trifiletti, D., Hammack, J., Ortiz, K., Lesser, E., Spiegel, M., Prevatt, C., Hawayek, M., Quinones-Hinojosa, A., & Chaichana, K. L. (2020) Trends in glioblastoma: outcomes over time and type of intervention: a systematic evidence based analysis. In *Journal of Neuro-Oncology*, 147. S. 297-307. doi.org/10.1007/s11060-020-03451-6

Matter, K., & Balda, M. S. (2003) Functional analysis of tight junctions. In *Methods*, 30. S. 228-234. doi: 10.1016/s1046-2023(03)00029-x

Mehta, M., Wen, P., Nishikawa, R., Reardon, D., & Peters, K. (2017) Critical review of the addition of tumor treating fields (TTFields) to the existing standard of care for newly diagnosed glioblastoma patients. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 111. S. 60-65. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.01.005

Meijering, B. D., Juffermans, L. J., van Wamel, A., Henning, R. H., Zuhorn, I. S., Emmer, M., Versteilen, A. M., Paulus, W. J., van Gilst, W. H., Kooiman, K., de Jong, N., Musters, R. J., Deelman, L. E., & Kamp, O. (2009) Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore

formation. In *Circulation research*, 104. S. 679-687. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183806

Mesiwala, A., Farrell, L., Wenzel, H., Silbergeld, D., Crum, L., Winn, HR., & Mourad, P. D. (2002) High- intensity focused ultrasound selectively disrupts the blood-brain barrier in vivo. In *Ultrasound in Medicine and Biology*, 28, S. 389-400.

Micheli, M. R., Bova, R., Magini, A., Polidoro, M., & Emiliani, C. (2012) Lipid-based nanocarriers for CNS-targeted drug delivery. Recent patents on CNS drug. In *Discovery*, 7. S. 71-86. doi: 10.2174/157488912798842241

Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., & Tsukita, S. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. In *FEBS Letters*, 585. S. 606-612. doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.028.

Mondesir, J., Willekens, C., Touat, M., & de Botton, S. (2016) IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. In *Journal of Blood Medicine vol 7*. S.171-180. doi:10.2147/JBM.S70716

Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., & Tsukita, S. (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. In *The Journal of cell biology*, 147(1), S. 185-194. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.185>

Morita, K., Sasaki, H., Furuse, K., Furuse, M., Tsukita, S., & Miyachi, Y. (2003) Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. In *Experimental dermatology*, 12(3), S. 289-295. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2003.120309.x>

Nadal, A., Fuentes, E., Pastor, J., & McNaughton, P. A. (1995) Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92. S. 1426-1430. doi: 10.1073/pnas.92.5.1426

Nakagawa, S., Deli, M. A., Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoke, R., Kataoka, Y., & Niwa, M. (2007) Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. In *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27. S. 687-694. doi: 10.1007/s10571-007-9195-4.

- Nakagawa, S.,** Deli, M.A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, A., Tanaka, K., & Niwa, M. (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. In *Neurochemistry International*, 54. S. 253-263. doi: 10.1016/j.neuint.2008.12.002
- Nomura, T.,** Inamura, T., & Black, K.L. (1994) Intracarotid infusion of bradykinin selectively increases blood-tumor permeability in 9L and C6 brain tumors. In *Brain Research*, 659. S. 62-66. doi: 10.1016/0006-8993(94)90863-x
- Nomura, T.,** Inamura, T., & Black, K.L. (1998) Intracarotid low dose bradykinin infusion selectively increases tumor permeability through activation of bradykinin B2 receptors in malignant gliomas. In *Brain research*, 792. S. 10-15. doi: 10.1016/s0006-8993(97)01502-3
- Nowacek, A. S.,** Miller, R. L., McMillan, J., Kanmogne, G., Kanmogne, M., Mosley, R. L., Ma, Z., Graham, S., Chaubal, M., Werling, J., Rabinow, B., Dou, H., & Gendelman, H. E. (2009) NanoART synthesis, characterization, uptake, release and toxicology for human monocyte-macrophage drug delivery. In *Nanomedicine (London, England)*, 4. S. 903-917. doi:10.2217/nnm.09.71
- Ohgaki, H.,** & Kleihues, P. (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. In *Acta neuropathologica*, 109. S. 93-108. doi: 10.1007/s00401-005-0991-y
- Ohgaki, H.,** & Kleihues, P. (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. In *Clinical Cancer Research*, 19(4). S. 764-772. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
- Ostrom, Q. T.,** Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2013) CBTRUS Statistical Report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. In *Neuro-Oncology*, 17(4). S. iv1-iv62. doi: 10.1093/neuonc/nov189
- Palti, Y.** (1966) Stimulation of internal organs by means of externally applied electrodes. In *The Journal of Applied Physiology*, 21(5). S. 1619-1623. doi: 10.1152/jappl.1966.21.5.1619

- Panyam, J.** (2003) Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. In *Pharmaceutical Research*, 20. S. 212-220. doi: 10.1023/a:1022219003551
- Papadopoulos, M. C., Saadoun, S., Woodrow, C. J., Davies, D. C., Costa-Martins, P., Moss, R. F., Krishna, S., & Bell, B. A.** (2001) Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain. In *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 27. S. 384-395. doi: 10.1046/j.0305-1846.2001.00341.x
- Pardridge, W. M., Eisenberg, J., & Yang, J.** (1985) Human blood-brain barrier insulin receptor. In *Journal of Neurochemistry*, 44. S. 1771-1778. doi: 10.1111/j.1471-4159.1985.tb07167.x
- Pardridge, W. M., Triguero, D., Yang, J., & Cancilla, P. A.** (1990) Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier. In *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 253. S. 884-891.
- Pardridge, W. M.** (2005) The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. In *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(1). S. 3–14. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3>
- Pardridge, W. M.** (2012) Drug transport across the blood-brain barrier. In *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32. S. 1959-1972. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.126>
- Park, K.** (2009) Transport across the blood-brain barrier using albumin nanoparticles. In *Journal of Controlled Release*, 137. S. 1. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.05.004
- Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P., & Attwell, D.** (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. In *Nature*, 443. S. 700-704. doi: 10.1038/nature05193
- Polk, C., & Postow, E.** (1995) Biological Effects of Electromagnetic Fields Handbooks, Manuals, Etc. Boca Raton, FL: CRC; S. 618.
- Powell, D. W.** (1981) Barrier function of epithelia. In *American Journal of Physiology*, 241(4). S. G275-G288. doi:10.1152/ajpgi.1981.241.4.G275
- Prabhakarandian, B., Shen, M. C., Nichols, J. B., Mills, I. R., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Aschner, M., & Pant, K.** (2013) SyM-BBB: A microfluidic blood

brain barrier model. In *Lab on a chip*, 13(6). S. 1093-1101. <https://doi.org/10.1039/c2lc41208j>

Prados, M. D., Schold, S. C., Jr, Fine, H. A., Jaeckle, K., Hochberg, F., Mechtler, L., Fetell, M. R., Phuphanich, S., Feun, L., Janus, T. J., Ford, K., & Graney, W. (2003) A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma. In *Neuro-oncology*, 5. S. 96-103. doi: 10.1093/neuonc/5.2.96

Rahner, C., Mitic, L. L., & Anderson, J. M. (2001). Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. In *Gastroenterology*, 120(2), S. 411-422. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.21736>

Rapoport, S. I., Fredericks, W. R., Ohno, K., & Pettigrew, K. D. (1980) Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. In *The American journal of physiology*, 238. S. R421-431. doi: 10.1152/ajpregu.1980.238.5.R421

Rapoport, S. I., & Robinson, P. J. (1986) Tight-junctional modification as the basis of osmotic opening of the blood-brain barrier. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 481. S. 250-267. doi: 10.1111/j.1749-6632.1986.tb27155.x

Raymond, S. B., Skoch, J., Hynynen, K., & Bacskai, B. J. (2007) Multiphoton imaging of ultrasound/Optison mediated cerebrovascular effects in vivo. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27. S. 393-403. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600336

Redzic, Z. (2011) Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. In *Fluids Barriers CNS*, 8. S. 3. doi.org/10.1186/2045-8118-8-3

Reifenberger, G., & Collins, V. P. (2004) Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. In *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 82(10). S. 656-670. doi: 10.1007/s00109-004-0564-x.

Reyes, J. L., Lamas, M., Martin, D., del Carmen Namorado, M., Islas, S., Luna, J., Tauc, M., & González-Mariscal, L. (2002). The renal segmental distribution of claudins changes with development. In *Kidney international*, 62(2), S. 476-487. doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00479.x

- Ruben, G. C., & Yurchenco, P. D.** (1994) High resolution platinum-carbon replication of freeze-dried basement membrane. In *Microscopy Research and Technique*, 28. S. 13-28. doi:10.1002/jemt.1070280104
- Salvador, E., Kessler, A., Hörmann, J., Domröse, D; Schäffer, C., Burek, M., Tempel-Brami, C., Voloshin, T., Giladi, M., Ernestus, R. I., Löhr, M., Förster, C., & Hagemann, C.** (2020) Tumor treating fields effects on the blood-brain barrier in vitro and in vivo. In *Journal of Clinical Oncology*, 38(15). S. 2551. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.2551
- Salvador, E., Kessler, A., Domröse, D., Hörmann, J., Giniunaite, A., Köppl, T., Schäffer, C., Burek, M., Brami, C.T., Voloshin, T., Giladi, M., Ernestus, R.I., Loehr, M., Foerster, C.Y. & Hagemann, C.** (2022) Breaching the blood brain barrier (BBB) by Tumor Treating Fields (TTFields) could be a novel chemotherapeutic delivery strategy. In *Brain Tumor Research and Treatment*. Mar;10 (Suppl): S. 31. <https://doi.org/10.14791/btrt.2022.10.F-1029>
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., & Zucco, F.** (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. In *Cell biology and toxicology*, 21(1). S. 1-26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>
- Sá-Pereira, I., Brites, D., & Brito, M. A.** (2012) Neurovascular unit: a focus on pericytes. In *Molecular Neurobiology*, 45. S. 327-347. doi: 10.1007/s12035-012-8244-2
- Schinkel, A. H.** (1999) P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. In *Advanced drug delivery reviews*, 36(2-3). S. 179-194. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(98\)00085-4](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(98)00085-4)
- Schulz, E., Mawamba, V., Sturm, V., Ernestus, R. I., Schatzschneider, U., Löhr M., & Hagemann, C.** (2019) EXTH-17. Treatment of malignant gliomas with drug-loaded microbubbles: conception of a promising future therapeutic strategy. In *Neuro-Oncology*, 21(Suppl 6). S. vi85-vi86. doi:10.1093/neuonc/noz175.351
- Sheikov, N., McDannold, N., Vykhodtseva, N., Jolesz, F., & Hynynen, K.** (2004) Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in

presence of microbubbles. In *Ultrasound in medicine & biology*, 30. S. 979-989. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2004.04.010

Sheikov, N., McDannold, N., Sharma, S., & Hynynen, K. (2008) Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. In *Ultrasound in medicine & biology*, 34. S. 1093-1104. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.12.015

Siddharthan, V., Kim, Y. V., Liu, S., & Kim, K. S. (2007) Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. In *Brain Research*, 1147. S. 39-50. doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.029

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. In *Journal of Neuroimmunology*, 17. S. 37. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.06.019

Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., & Hickman, J. J. (2015) TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. In *Journal of Laboratory Automation*, 20(2). S. 107-126. doi:10.1177/2211068214561025

Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2016) Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. In *Tissue Barriers*, 4(1). S. e1154641. doi:10.1080/21688370.2016.1154641

Steinfeld, U., Pauli, C., Kaltz, N., Bergemann, C., & Lee, H. H. (2006) T lymphocytes as potential therapeutic drug carrier for cancer treatment. In *International Journal of Pharmaceutics*, 311. S. 229-236. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.12.040

Stern, L., & Gautier, R. (1922) Les Rapports entre le liquide céphalo-rachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal. In *Archives of International Physiology* 17. S 391-408. <https://doi.org/10.3109/13813452209146219>

Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., & Goodenough, D. A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. In *The Journal of Cell Biology*, 103(3). S. 755-766. doi: 10.1083/jcb.103.3.755.

Stone, N. L., England, T. J., & O'Sullivan, S. E. (2019) A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells. In *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. S. 230. doi:10.3389/fncel.00230

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. In *The New England journal of medicine* 352(10). S. 987-996. doi: 10.1056/NEJMoa043330.

Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. In *The Lancet Oncology* 10(5). S. 459-466. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.

Stupp, R., Wong, E. T., Kanner, A. A., Steinberg, D., Engelhard, H., Heidecke, V., Kirson, E. D., Taillibert, S., Liebermann, F., Dbalý, V., Ram, Z., Villano, J. L., Rainov, N., Weinberg, U., Schiff, D., Kunschner, L., Raizer, J., Honnorat, J., Sloan, A., Malkin, M., ... Gutin, P. H. (2012) NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. In *European journal of cancer* 48 (14). S. 2192-2202. doi: 10.1016/j.ejca.2012.04.011.

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idhah, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meo, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D., Brem, S., Hottinger, A., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., ... Ram, Z. (2017) Effect of Tumor-Treating Fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with

glioblastoma: a randomized clinical trial. In *JAMA*, 318 (23). S. 2306-2316. doi: 10.1001/jama.2017.18718.

Tarbell, J. M. (2010) Shear stress and the endothelial transport barrier. In *Cardiovascular Research*, 87. S. 320-330. doi: 10.1093/cvr/cvq146

Thanabalasundaram, G., Schneidewind, J., Pieper, C., & Galla, H. J. (2011) The impact of pericytes on the blood-brain barrier integrity depends critically on the pericyte differentiation stage. In *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43. S. 1284-1293. doi: 10.1016/j.biocel.2011.05.002

Tilling, T., Korte, D., Hoheisel, D., & Galla, H. J. (1998) Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. In *Journal of Neurochemistry*, 71. S.1151-1157. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71031151.x

Timpl, R. (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. In *European Journal of Biochemistry*, 180. S. 487-502. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14673.x

Trifiletti, D. M., Alonso, C., Grover, S., Fadul, C. E., Sheehan, J.P., & Showalter, T. N. (2017) Prognostic implications of extent of resection in glioblastoma: analysis from a large database. In *World Neurosurgery*, 103. S. 330-340. doi:10.1016/j.wneu.2017.04.035

van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., de Gooijer, M. C., Wesseling, P., Wurdinger, T., & de Vries, H. E. (2015) Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. In *Drug Resistance Updates*, 19. S. 1-12. doi: 10.1016/j.drug.2015.02.002

van Vliet, E. A., Redeker, S., Aronica, E., Edelbroek, P. M., & Gorter, J. A. (2005) Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. In *Epilepsia*, 46. S. 1569-1580. doi: 10.1111/j.1528-1167.2005.00250.x

Veszelka, S., Tóth, A. E., Walter, F. R., Datki, Z., Mózes, E., Fülöp, L., Bozsó, Z., Hellinger, E., Vastag, M., Orsolits, B., Környei, Z., Penke, B., & Deli, M. A. (2013) Docosaehaenoic acid reduces amyloid-beta induced toxicity in cells of the

neurovascular unit. In *Journal of Alzheimer's Disease*, 36. S. 487-501. doi: 10.3233/JAD-120163

Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J. R., & Wick, W. (2013). Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet?. In *Neuro-oncology*, 15(1), S. 4–27. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos273>

Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., Nikkhah, G., Papsdorf, K., Steinbach, J. P., Sabel, M., Combs, S. E., Vesper, J., Braun, C., Meixensberger, J., Ketter, R., Mayer-Steinacker, R., Reifenberger, G., Weller, M., & NOA-08 Study Group of Neuro-oncology Working Group (NOA) of German Cancer Society (2012) Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. In *Lancet Oncology*, 13. S. 707-715. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X

Wiestler, B., Claus, R., Hartlieb, S. A., Schliesser, M. G., Weiss, E. K., Hielscher, T., Platten, M., Dittmann, L. M., Meisner, C., Felsberg, J., Happold, C., Simon, M., Nikkhah, G., Papsdorf, K., Steinbach, J. P., Sabel, M., Grimm, C., Weichenhan, D., Tews, B., Reifenberger, G., Capper, D., Muller, W., Plass, C., Weller, M., & Wick, W. (2013) Malignant astrocytomas of elderly patients lack favorable molecular markers: an analysis of the NOA-08 study collective. In *Neuro-Oncology*, 15(8). S. 1017-1026. doi: 10.18632/oncotarget.13452

Winkler, E. A., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2011) Central nervous system pericytes in health and disease. In *Nature neuroscience*, 14(11), S. 1398–1405. <https://doi.org/10.1038/nn.2946>

Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E. H., Risau, W., & Engelhardt, B. (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. In *Acta neuropathologica*, 105(6), S. 586-592. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0688-z>

Wu, J., Yang, S., Luo, H., Zeng, L., Ye, L., & Lu, Y. (2006) Quantitative evaluation of monocyte transmigration into the brain following chemical opening of the blood-brain barrier in mice. In *Brain Research*, 1098. S. 79-85. doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.074

- Xie, Q., Mittal, S., & Berens, M. E.** (2014) Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. In *Neuro-oncology*, 16(12). S. 1575-1584. doi: 10.1093/neuonc/nou147. doi: 10.1093/neuonc/nou147
- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., & Bigner, D. D.** (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. In *New England Journal of Medicine*, 360(8). S. 765-773. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>.
- Yang, Y., Estrada, E. Y., Thompson, J. F., Liu, W., & Rosenberg, G. A.** (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. In *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(4). S. 697-709. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600375>
- Yang, Z., Liu, Z. W., Allaker, R. P., Reip, P., Oxford, J., Ahmad, Z., & Ren, G.** (2010) A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. In *Journal of the Royal Society Interface*, 7. S. 411-S422. doi: 10.1098/rsif.2010.0158.focus
- Yen, K. E., Bittinger, M. A., Su, S. M., & Fantin, V. R.** (2010) Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. In *Oncogene*, 29(49) S. 6409-6417. doi: 10.1038/onc.2010.444
- Youakim, A., & Ahdieh, M.** (1999). Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. In *The American journal of physiology*, 276(5). S. G1279-G1288. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.5.G1279>
- Yurchenco, P. D.** (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(2). S. a004911. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004911>

Zhang, Y., & Pardridge, W. M. (2001) Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. In *Journal of Neurochemistry*, 76. S. 1597-1600. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00222.x

Zhang, F., Xu, C. L., & Liu, C. M. (2015) Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma. In *Drug Design, Development and Therapy*, 9. S. 2089-2100. doi: 10.2147/DDDT.S79592

Zucco, F., Batto, A. F., Bises, G., Chambaz, J., Chiusolo, A., Consalvo, R., Cross, H., Dal Negro, G., de Angelis, I., Fabre, G., Guillou, F., Hoffman, S., Laplanche, L., Morel, E., Pinçon-Raymond, M., Prieto, P., Turco, L., Ranaldi, G., Rousset, M., Sambuy, Y., Stamatii, A. (2005) An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. In *Alternatives to laboratory animals*, 33(6), S. 603-618. <https://doi.org/10.1177/026119290503300618>

7. Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
α -SMA	α -glattes Muskelaktin (α -smooth muscle actin)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BM	Basalmembran
BMVEC	mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns (brain microvascular endothelium cells)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CEB	Zytoplasmaextraktionspuffer (cytoplasmic extraction buffer)
cerebEND	immortalisierte kapillare Endothelzellen des Kleinhirns der Maus (immortalized mouse cerebellar capillary endothelial cells)
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (Dulbecco's modified Eagle medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EB	Evan's Blue
ECGS	Endotheliumzellen Wachstums Zusatz (endothelial cell growth supplement)
ECM	endotheliales Zellmedium (endothelial cell medium)
ECL	verstärkte Chemoluminiszenz-Lösung (enhanced chemoluminescence solution)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
et al.	und andere (et alii)
FBS	fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
FUS	fokussierter Ultraschall

Abkürzung	Bedeutung
GBM	Glioblastom IDH-Wildtyp
Glut-1	Glucose-Transporter-1
HBMVEC	humane Hirn mikrovaskuläre Endotheliumzellen (human brain microvascular endothelial cells)
HCl	Hydrochlorid
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IgG	Immunoglobulin G
JAM	Adhäsionsmoleküle der Verbindungsstellen (junctional adhesion molecules)
MEB	Membranextraktionspuffer (membrane extraction buffer)
MEM	minimales essentielles Medium (minimum essential medium)
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA Methyltransferase
MR	Magnetresonanz
NVU	neurovaskuläre Einheit (neurovascular unit)
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Hydrogen
OS	Gesamtüberlebensrate (overall survival)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
pCA	para-Cumarinsäure (para-coumaric acid)
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül CD-31 (platelet endothelial cell adhesion molecule CD-31)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin (tetramethylethylenediamine)
TEER	transendotheliale elektrische Resistenz
TMZ	Temozolomid
TJ	dichte Verbindung (tight junction)
TTFields	Tumortheraiefelder (tumor treating fields)

Abkürzung	Bedeutung
VE-cadherin	vaskuläres Endotheliales Cadherin
vWF	Von-Willebrand Faktor
w/o	without
WHO	Weltgesundheitsorganisation (world health organisation)
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO	Zonula Occludens

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. (A) Der Zellteilungszyklus. (B) TTFIELDS Wirkungsmechanismen auf Tumorzellen.	7
Abb. 2 In vitro™ TTFIELDS Lab Bench System.	47
Abb. 3. Expression von TJ-Proteinen durch cerebEND Zellen.	61
Abb. 4. Bestimmung der BHS-Integrität mit Hilfe von TEER.	63
Abb. 5 Etablierung eines humanen BHS-Modells aus HBMVEC.	65
Abb. 6 TJ-Proteinexpression durch HBMVEC mit und ohne Kokultur von bovinen Perizyten.	66
Abb. 7 Bestimmung der BHS Integrität und Permeabilität vom HBMVEC Monolayerkulturen und Kokulturen mit Perizyten.	67

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Geräte	28
Tabelle 2. Chemikalien.....	30
Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 4. Antikörper für Immunohistochemie	34
Tabelle 5. Antikörper für Western-Blot.....	35
Tabelle 6. Zelllinien.....	35
Tabelle 7. Software.....	36
Tabelle 8. Zusammensetzung verwendeter Lösungen, Medien, Gele und Puffer	36

IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Carsten Hagemann bedanken für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und des Arbeitsplatzes im Tumorbologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg sowie für meine Integration in die Arbeitsgruppe. Die Zeit im Labor vertiefte meine Faszination für die Grundlagen- und Tumorforschung immens. Zugleich ist Herr Prof. Dr. Carsten Hagemann Erstgutachter dieser Arbeit, auch hierfür ein herzliches Dankeschön! Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. A. Rosenwald für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. K. Brehm für die Tätigkeit als Koreferent.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. G. H. Vince für die Ermutigung und Vermittlung des Kontakts zur Forschungsgruppe. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Ellaine Salvador für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit bedanken. Sie war immer eine geduldige Ansprechpartnerin und wesentlich an der Durchführung der Experimente beteiligt.

Auch danke ich an allen Mitgliedern der Tumorbologischen Arbeitsgruppe für meine Einarbeitung und alle wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Hilfestellungen. Danke auch für Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung im Labor, besonders Frau Ellina Schulz, Frau Sigrid Kühnel und Frau Elli Karl. Vielen Dank auch an Dr. Stephan Pabst für die fachliche und sprachliche Korrektur sowie an meine Kollegin Laura Lansink Rotgerink für die sprachliche Korrektur.

Und schließlich Danke an meinen Biologielehrer Gedas Batulevicius, der mich auf dem Weg zur Naturwissenschaft als erster begleitet hat und Dr. Irina Arechvo, die mich in der Studienzeit weiterbegleitet hat.

Sie alle haben mich immer, und vor allem in diesem Forschungsjahr, mit allen Hoch- und Tiefphasen begleitet und unterstützt.