

# Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
*doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*



Julius-Maximilians-Universität Würzburg

## **Etablierung und Qualifizierung eines humanen Blut-Hirn-Schranken-Modells unter Verwendung von induziert pluripotenten und multipotenten Stammzellen**



vorgelegt von

Antje Appelt-Menzel

geboren in

Jena

angefertigt am

Universitätsklinikum Würzburg - Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin  
und Fraunhofer IGB – Institutsteil Würzburg  
Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen

Würzburg 2016

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Erstgutachter: Prof. Dr. Heike Walles

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....



**Wenn wir die Natur auf das reduzieren, was wir verstanden  
haben, sind wir nicht überlebensfähig.**

– Hans-Peter Dürr (1929-2014), deutscher Physiker und Essayist –

– **Für meine Familie** –

## Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war es, ein standardisiertes *in vitro*-Modell der humanen Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu etablieren, welches als Testsystem für einen Einsatz in der Grundlagen- oder präklinischen Forschung geeignet ist.

Kriterien, die an zellbasierte *in vitro*-BHS-Modelle gestellt werden, mussten erfüllt sein. Diese schließen u. a. die reproduzierbare Permeabilität von Referenzsubstanzen, eine physiologische Morphologie der Zellen, das Vorhandensein von komplexen Tight Junction-Strukturen und eine charakteristische Expression von BHS-phänotypischen Transportern ein. Zudem sollte das etablierte Modell einfach und standardisierbar aufgebaut sein, um ein Wirkstoffscreening mit reproduzierbaren Ergebnissen zu ermöglichen.

Die Verwendung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) ermöglicht eine reproduzierbare Entwicklung von standardisierten BHS-Modellen. Sie stellen eine effektive Zellquelle dar, um unabhängig von postnatalen Gehirnbiopsien, samt deren Variabilitäten und Limitationen in der *in vitro*-Kultur, funktionelle Gehirnzellen zu generieren. Die hiPSC-Technologie ermöglicht zudem die Generierung von großen Mengen humaner Zelltypen ausgehend von einer Einzelzelle. Weiterhin wurden mit Hilfe von hiPSC-basierten Testsystemen bislang die höchsten Barriereigenschaften, ähnlich der *in vivo*-Situation, erzielt.

Im ersten Schritt sollten Methoden zur standardisierten Differenzierung von hiPSCs und humanen multipotenten Stammzellen etabliert werden, um BHS-Endothelzellen, neurale Stammzellen und Astrozyten zu generieren. Die differenzierten Zellen sollten unter Verwendung von gen- und proteombasierten Analyseverfahren charakterisiert und mit primären Zellen verglichen werden.

Weiterhin war es Aufgabe, basierend auf den primären Zellen, iPSCs und multipotenten Stammzellen, *in vitro*-Kokulturmodelle der humanen BHS aufzubauen. Hierbei war darauf zu achten, systematisch den individuellen Einfluss der unterschiedlichen Kokulturzellen auf die Funktion und Genexpression des BHS-Endothels zu untersuchen.

Final sollte eine präzise Qualifizierung der Modelle durchgeführt werden, um deren potentiellen Einsatz als *in vitro*-Testsystem für die Medikamentenentwicklung und die Durchführung von Zytotoxizitätsuntersuchungen zu belegen. Methoden, wie Protein- und Gennachweis sowie ultrastrukturelle Analysen zur Untersuchung der Tight Junction-Strukturen, die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) und die Bestimmung der Permeabilität von Referenzsubstanzen sollten hierfür einbezogen werden.

## Zusammenfassung

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt eine der dichtesten und wichtigsten Barrieren zwischen Blutzirkulation und Zentralnervensystem (ZNS) dar. Sie besteht aus spezialisierten Endothelzellen, welche die zerebralen Kapillaren auskleiden und durch sehr dichte Tight Junctions (TJs) miteinander verbunden sind. Weitere Komponenten der dynamischen Blut-Hirn-Schrankenbarriere stellen Perizyten, Astrozyten, Neurone und Mikrogliazellen dar, welche zusammen mit der extrazellulären Matrix der Basalmembran der Gehirnkapillaren und den zuvor genannten Endothelzellen ein komplexes regulatorisches System, die so genannte neurovaskuläre Einheit bilden (Hawkins und Davis 2005).

Die Hauptfunktionen der BHS lassen sich in drei Untergruppen untergliedern, die physikalische, metabolische und Transport-Barriere (Neuhaus und Noe 2010). Hauptsächlich dient die BHS der Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS und dem Schutz vor neurotoxischen Substanzen sowie Pathogenen, wie Bakterien und Viren. Zudem ist sie auch für die Versorgung der Neuronen mit Nährstoffen und regulierenden Substanzen sowie den Efflux von Stoffwechselendprodukten des ZNS zurück ins Blut verantwortlich.

Für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose oder Gehirntumoren, stellt die Dichtigkeit der BHS gegenüber Substanzen und die hohe metabolische Aktivität der Endothelzellen aber ein großes Problem dar. Viele Medikamente sind nicht in der Lage in ausreichender Konzentration die BHS zu überwinden, um an ihren Wirkort zu gelangen oder werden vor dem Transport metabolisiert und die Wirksamkeit dadurch eingeschränkt. Weiterhin spielen auch Defekte der BHS eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung der Pathogenese vieler ZNS-Erkrankungen.

Aufgrund des hohen Bedarfs an geeigneten Testsystemen in der Grundlagen- sowie präklinischen Forschung für Medikamentenentwicklung und Infektionsstudien wurden eine Vielzahl unterschiedlicher BHS-Modelle entwickelt. Neben *in silico*-, azellulären *in vitro*- und *in vivo*-Modellen sind auch zahlreiche zellbasierte Modelle der BHS entwickelt worden. Standardisierte Modelle auf Basis immortalisierter Zelllinien jedoch weisen nur eine inhomogene TJ-Expression auf und verfügen meist über eine geringe Barriereintegrität, erfasst über transendotheliale elektrische Widerstände (TEER) unter  $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Deli et al. 2005). Im Vergleich dazu wurden in Tierexperimenten TEER-Werte von mehr als  $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  an der BHS gemessen (Butt et al. 1990; Crone und Olesen 1982). Die Verfügbarkeit humaner primärer BHS-Zellen ist sehr limitiert und ihr Einsatz nicht nur im Hinblick auf ethische Aspekte bedenklich. Humane Gehirnzellen können z. B. aus Biopsie- oder Autopsiematerial von Patienten mit Epilepsie oder Gehirntumoren isoliert werden. Allerdings besteht hier das Risiko, dass die isolierten Zellen krankheitsbedingt verändert sind, was die Eigenschaften der BHS-Modelle erheblich beeinflussen kann.

Eine Alternative, die diese Probleme umgeht, ist die Verwendung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSCs), um standardisierte humane BHS-Modelle unter reproduzierbaren Bedingungen bereitzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, hiPSCs *in vitro* nach etablierten und standardisierten Methoden in Endothelzellen der BHS, neurale Stammzellen (hiPS-NSCs) sowie Astrozyten (hiPS-A) zu differenzieren (Lippmann et al. 2012; Lippmann et al. 2014; Wilson et al. 2015; Yan et al. 2013;

Reinhardt et al. 2013) und zum Aufbau der Modelle einzusetzen. Die Endothelzellen wurden mit Hilfe protein- und genbasierter Nachweismethoden auf das Vorhandensein von endothelzellspezifischen TJ-Markern sowie spezifischen Transportern untersucht und funktionell charakterisiert. Die Kryokonservierung der hiPS-EC-Progenitoren, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde, ermöglicht eine größere räumliche und zeitliche Flexibilität beim Arbeiten mit den stammzellbasierten Modellen sowie das Anlegen standardisierter Zellbanken. Weiterhin wurden multipotente NSCs aus fetalen Gehirnbiospien isoliert (fNSCs) und als Kontrollkulturen zu den hiPS-NSCs für den Aufbau von BHS-Modellen eingesetzt.

Mit dem Ziel die *in vivo*-BHS bestmöglich zu imitieren und die Modelleigenschaften zu optimieren, wurde ein Set aus zehn unterschiedlichen BHS-Modellen basierend auf primären Zellen, hiPSCs und fNSCs analysiert. Der Aufbau der BHS-Modelle erfolgte unter Verwendung von Transwellsystemen. Durch die systematische Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Zelltypen der neurovaskulären Einheit auf die Barriereintegrität und Genexpression des BHS-Endothels, konnten die Quadrupel-Kulturen mit Perizyten, Astrozyten und hiPS-NSCs als die Kultur mit den physiologischsten Eigenschaften identifiziert werden. Auf Grund der signifikant erhöhten TEER-Werte von bis zu  $2500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und einer um mindestens 1,5-fachen Steigerung der Genexpression BHS-relevanter Transporter und TJ-Moleküle gegenüber den Monokulturen, wurden diese Modelle für weiterführende Studien ausgewählt.

Das Vorhandensein eines komplexen, *in vivo*-ähnlichen TJ-Netzwerkes, bestehend aus Occludin, Claudin 1, 3, 4 und 5, konnte mittels quantitativer Realtime-PCR, Western Blot sowie ultrastruktureller Analyse in der Gefrierbruch- und Raster-Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden.

Neben der Begrenzung der parazellulären Permeabilität, welche über die geringe Permeation von FITC-Dextran (4 kDa und 40 kDa), Fluoreszein und Lucifer Yellow nachgewiesen wurde, stellt die BHS ebenfalls eine Barriere für den transzellulären Transport von Substanzen dar. Eine Beurteilung der Modelle hinsichtlich der Qualifikation für die Nutzung im Wirkstoffscreening wurde mit Hilfe von Transportversuchen unter dem Einsatz von BHS-relevanten Referenzsubstanzen durchgeführt. Die Klassifikation der Testsubstanzen erfolgte analog ihrer Permeationsgeschwindigkeiten: Diazepam und Koffein gelten als schnell transportierte Wirkstoffe, Ibuprofen, Celecoxib und Diclofenac werden mit einer mittleren Geschwindigkeit über die BHS transportiert und Loratadin sowie Rhodamin 123 sind langsam permeierende Substanzen. Innerhalb der Versuche mit den Quadrupelkulturen wurde diese Reihenfolge bestätigt, lediglich für Koffein wurde ein signifikant niedrigerer Permeationskoeffizient verglichen mit der Monokultur erzielt.

Der Einsatz der hiPSC-Technologie ermöglicht es zudem, aus einer Stammzelllinie große Mengen an humanen somatischen Zelltypen zu generieren und für gezielte Anwendungen bereitzustellen. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit Hilfe eines eigens für diese Zwecke konstruierten Rührreaktorsystems eine reproduzierbare Expansion der hiPSCs unter definierten Bedingungen ermöglicht wurde. Basierend auf dieser Grundlage ist nun ein Hochdurchsatz-Screening von Medikamenten denkbar.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten belegen die Etablierung eines stammzellbasierten *in vitro*-Quadrupelmodells der humanen BHS, welches über *in vivo*-ähnliche Eigenschaften verfügt. Die Anforderungen, die an humane BHS-Modelle gestellt werden, wie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, eine angemessene Charakterisierung, welche die Untersuchung der Permeabilität von Referenzsubstanzen einschließt, die Analyse der Expression von BHS-relevanten Transportermolekülen

sowie die solide und physiologische Morphologie der Zellen, wurden erfüllt. Das etablierte BHS-Modell kann in der Pharmaindustrie für die Entwicklung von Medikamenten eingesetzt werden. Ausreichend qualifizierte Modelle können hier in der präklinischen Forschung genutzt werden, um Toxizitäts- und Transportstudien an neu entwickelten Substanzen durchzuführen und eine bessere *in vitro-in vivo*-Korrelation der Ergebnisse zu ermöglichen oder Mechanismen zu entwickeln, um die BHS-Barriere gezielt zu überwinden.

## Abstract

The blood-brain barrier (BBB) presents one of the tightest and most important barriers between the blood circulation and the central nervous system (CNS). The BBB consists of specialized endothelial cells, which line the cerebral capillaries and are connected through very dense tight junctions (TJs). Together with pericytes, astrocytes, neurons, microglial cells and the extracellular matrix of the basal membrane of the brain capillaries, they form a dynamic and complex regulatory system, the so-called neurovascular unit (Hawkins and Davis 2005).

The main functions of the BBB can be divided into three subgroups, the physical-, metabolic- and transport-barrier (Neuhaus and Noe 2010). The BBB mainly serves to maintain the homeostasis of the CNS and for protection against neurotoxic substances and pathogens, such as bacteria and viruses. Moreover, the BBB ensures the supply of neurons with nutrients and regulatory substances. Furthermore, it is responsible for the efflux of CNS metabolism waste products.

For the development of drugs applied for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Multiple Sclerosis or even brain tumors, the tightness of the BBB models towards substances and the high metabolic activity of the endothelial cells pose a problem. Numerous drugs cannot overcome the BBB in sufficient enough concentration to reach the target location or they are metabolized before transportation and thus become less effective. Moreover, defects of the BBB play a decisive role in the manipulation of the pathogenesis of numerous CNS diseases. Due to the high demand for test systems in basic and preclinical research of drug development and infection studies, a range of different BBB models have been developed. Besides the *in silico*, acellular *in vitro* and *in vivo* models, numerous cell-based BBB models have been developed. However, standardized models based on immortalized cell lines show only inhomogeneous TJ expression and possess low barrier integrity which is detected through transendothelial electrical resistance (TEER) below  $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Deli et al. 2005). In comparison, the TEER values in animal tests reached more than  $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  at the BBB (Butt et al. 1990; Crone and Olesen 1982). The availability of human primary BBB cells is highly limited. Moreover, using human primary BBB cells is an extremely serious matter, not only in respect of ethical aspects. Human brain cells can, for instance, be isolated from biopsy or autopsy material obtained from patients suffering epilepsy or brain cancer. However, there is the risk that the isolated cells are altered due to disease, which may significantly change the features of the BBB models.

An alternative to avoid such problems and to provide standardized human BBB models by the use of reproducible conditions, is the application of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs).

In this context, it has been successful to differentiate hiPSCs *in vitro* – under established and reproducible methods – into endothelial cells of the BBB (hiPS-ECs), neural stem cells (hiPS-NSCs) as well as astrocytes (hiPS-A) (Lippmann et al. 2012; Lippmann et al. 2014; Wilson et al. 2015; Yan et al. 2013; Reinhardt et al. 2013) and to use them for model establishment. The endothelial cells were examined for the existence and the functionality of endothelial-specific markers as well as specific transporters by protein- and gene-based methods. Within this work, the cryopreservation of hiPS-EC progenitors was established. This will allow an increase of the spatial and temporal flexibility while working with the stem cell based models as well as the establishment of standardized cell banks. Furthermore, multipotent NSCs, isolated from fetal brain biopsies (fNSCs), were

used as a control population for hiPSC-NSCs and for BBB modelling.

In order to imitate the *in vivo* BBB in the best possible way and to optimize model characteristics, a set of ten different BBB models based on primary cells, hiPSCs and fNSCs was analyzed. Model establishment was done by the use of transwell systems. By the systematic analysis of the influence of the different neurovascular unit cell types on barrier integrity and on endothelial cell gene expression, the quadruple culture with pericytes, astrocytes and hiPS-NSCs was identified demonstrating the most physiological properties. Due to the significant increase of TEER results up to  $2500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  as well as the at least 1.5-fold increase in gene expression of BBB relevant transporter and TJ markers compared to the mono-cultures, this model was selected for further studies. The presence of a complex *in vivo*-like TJ network, based on occludin, claudin 1, 3, 4 and 5 was detected by quantitative real time PCR, Western blot analyses as well as on ultrastructural level by freeze fracture electron microscopy and transmission electron microscopy.

Beside the limitation of the paracellular permeability, proven by the low permeation of FITC dextran (4 kDa and 40 kDa), fluorescein and Lucifer yellow, the BBB represents also a barrier for transcellular transported substances. A model evaluation, to assess the models qualification to be used for drug screenings, was proven by transport studies based on BBB relevant reference substances. The classification of the test substances was made analog their permeation rates: diazepam and caffeine are classified as fast, ibuprofen, celecoxib and diclofenac as medium, and loratadine and rhodamine 123 as slow permeating substances. Within our tests, this ranking based on literature data could be confirmed by using the quadruple-culture models, only caffeine was transported with a significantly decreased permeation coefficient compared to the mono-cultures.

Furthermore, the implementation of the hiPSC technology allows the generation of a large quantity of human somatic cell types from only one single stem cell line and their provision for specific applications. Within this work it was shown, that by the use of an in-house constructed stirred tank bio-reactor, providing defined culture conditions, a reproducible expansion of hiPSCs was enabled. On this basis, a high throughput drug screening might be possible.

The data presented within this work demonstrate the establishment of a stem cell based *in vitro* quadruple-model of the human BBB with *in vivo*-like characteristics. All minimal requirements for human BBB modeling, including the reproducibility of the results, adequate characterization with regard on the permeability of reference components, expression of BBB transporters as well as the robust and physiological morphology are fulfilled.

The established BBB model can be used in pharmaceutical drug development. In preclinical research adequate qualified models are asked for toxicity and transport studies with new developed substances in order to allow a better *in vitro-in vivo* correlation of the results. Moreover, the model can be used to develop mechanisms to selectively overcome the barrier.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	XII
<b>Tabellenverzeichnis</b>	XIV
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	XV
<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Barriersysteme des Gehirns	1
1.2 Die Blut-Hirn-Schranke	2
1.2.1 Anatomie der Blut-Hirn-Schranke	2
1.2.1.1 Endothelzellen der Kapillaren	2
1.2.1.2 Perizyten	3
1.2.1.3 Astrozyten	4
1.2.1.4 Neurone	5
1.2.1.5 Extrazelluläre Matrix	5
1.2.2 Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke	5
1.2.3 Funktionen der Blut-Hirn-Schranke	7
1.2.3.1 Physikalische Barriere	7
1.2.3.2 Transportbarriere	8
1.2.3.3 Metabolische Barriere	10
1.2.4 Blut-Hirn-Schranke und neurodegenerative Erkrankungen	11
1.2.5 Blut-Hirn-Schranken Modelle	12
1.3 Stammzellen	15
<b>2 Materialien</b>	20
2.1 Zellen	20
2.2 Kits	22
2.3 Antikörper	23
2.4 Primer	25
2.5 Chemikalien	26
2.6 Medien, Puffer und Lösungen	29
2.7 Verbrauchs- und Labormaterialien	37
2.8 Laborgeräte	39
2.9 Software	40
<b>3 Methoden</b>	41
3.1 Zellkulturtechniken	41
3.1.1 Primärkultur humaner adulter Astrozyten und Endothelzellen	41
3.1.2 Primärkultur von humanen fetalen Astrozyten und Perizyten	41
3.1.3 Isolation humaner fetaler neuraler Stammzellen	42
3.1.4 Kultivierung der Zelllinie HUVEC	42



---

3.1.5 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	42
3.1.6 Einfrieren und Auftauen von primären Zellen	43
3.1.6.1 Einfrieren primärer Zellen	43
3.1.6.2 Auftauen primärer Zellen	43
3.1.7 Adhärente Kultivierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen	43
3.1.7.1 Matrigel™-Beschichtung	44
3.1.7.2 Medienwechsel der humanen induziert pluripotenten Stammzellen	44
3.1.7.3 Enzymatisches Passagieren von humanen induziert pluripotenten Stammzellen	44
3.1.8 Suspensionskultur von humanen induziert pluripotenten Stammzellen	45
3.1.9 Einfrieren und Auftauen von humanen induziert pluripotenten Stammzellen	46
3.1.9.1 Einfrieren von humanen induziert pluripotenten Stammzellen	46
3.1.9.2 Auftauen von humanen induziert pluripotenten Stammzellen	46
3.2 Differenzierung humaner induziert pluripotenter und multipotenter Stammzellen	46
3.2.1 Ablösen und Vereinzeln der adhärennten humanen induziert pluripotenten Stammzellen und neuralen Stammzellen	46
3.2.2 Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in Gehirndothelzellen	47
3.2.3 Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in neurale Stammzellen	48
3.2.4 Differenzierung neuraler Stammzellen zu Astrozyten	49
3.3 Aufbau und Qualifizierung von Blut-Hirn-Schranken-Modellen	49
3.3.1 Aufbau von Blut-Hirn-Schranken-Modellen auf Basis von Transwellsystemen	49
3.3.2 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes	50
3.3.3 Transporttestungen und Bestimmung des Permeationskoeffizienten	51
3.4 Charakterisierung von Zellen und Blut-Hirn-Schranken-Modellen	53
3.4.1 Bestimmung der Funktionalität der Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen	53
3.4.1.1 Testung der Gefäßbildung in 3D-Umgebung	53
3.4.1.2 Testung der Ac-LDL-Aufnahme	53
3.4.2 Alkalische Phosphatasefärbung	54
3.4.3 Immunhistologische Charakterisierung	54
3.4.3.1 Anfertigung von Kryoschnitten	54
3.4.3.2 Immunfluoreszenzfärbung	54
3.4.3.3 Durchflusszytometrie	55
3.4.4 Ultrastrukturelle Analyse	56
3.4.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie	56
3.4.4.2 Gefrierbruchelektronenmikroskopie	56
3.4.5 Western Blot	57
3.4.6 Genexpressionsanalyse	58
3.4.6.1 RNA-Isolation	58
3.4.6.2 cDNA-Synthese	59
3.4.6.3 Quantitative Realtime-Polymerase Kettenreaktion	60

---

<b>4 Ergebnisse</b>	63
4.1 Primärkultur humaner Astrozyten und Endothelzellen	63
4.2 Charakterisierung humaner induziert pluripotenter Stammzellen	63
4.3 3D Kultivierung der humanen induziert pluripotenten Stammzellen in einem Rührreaktorsystem	65
4.4 Differenzierung und Charakterisierung von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen	68
4.5 Neuronale Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen und Isolation fetaler neuraler Stammzellen	72
4.5.1 <i>In vitro</i> Charakterisierung neuraler Stammzellen	73
4.5.2 <i>In vitro</i> Charakterisierung humaner differenzierter Astrozyten und Perizyten	74
4.6 Etablierung und Qualifizierung humaner Blut-Hirn-Schranken-Modelle	76
<b>5 Diskussion</b>	88
5.1 Vorteile induziert pluripotenter Stammzellen für die Entwicklung humaner Blut-Hirn-Schranken-Modelle	88
5.2 Auswahl geeigneter Stammzelllinien zum Aufbau von humanen Blut-Hirnschranken-Modellen und Nachweis der Pluripotenz	90
5.3 Standardisierte Expansion humaner induziert pluripotenter Stammzellen im Hochdurchsatz	91
5.4 Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke	93
5.5 Neurale Differenzierung pluripotenter und multipotenter Stammzellen	96
5.6 Etablierung und Qualifizierung humaner <i>in vitro</i> Blut-Hirn-Schranken-Modelle	98
<b>6 Ausblick</b>	108
<b>Literatur</b>	XX
<b>Anhang</b>	XXXVI
Datenträger	XXXVII
Eidesstattliche Erklärung	XXXVIII
Danksagung	XXXIX

## Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung der Barriersysteme des Gehirns	1
2	Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit	3
3	Differenzierung der Blut-Hirn-Schranke in der Embryonalentwicklung	6
4	Molekularer Aufbau der Tight Junctions an der Blut-Hirn-Schranke	8
5	Schematische Darstellung der Transportmechanismen der Blut-Hirn-Schranke	9
6	Stammzellhierarchie	16
7	Übersicht über die Subpopulationen neuraler Stammzellen	17
8	Nutzung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen zur Medikamentenentwicklung	18
9	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke	47
10	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in neurale Stammzellen	48
11	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Differenzierung von neuralen Stammzellen in Astrozyten	49
12	Primäre humane Gehirnzellen	63
13	<i>In vitro</i> Charakterisierung humaner induziert pluripotenter Stammzellen	65
14	Suspensionskultur humaner induziert pluripotenter Stammzellen	66
15	Morphologische Veränderungen der Zellen im Verlauf der Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen zu Endothelzellen	68
16	Immunfluoreszenzfärbung der aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen differenzierten Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen	69
17	Quantitative durchflusszytometrische Analyse der aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen differenzierten Endothelzellen	70
18	Funktionelle Charakterisierung der Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen mittels Testung der Aufnahme von FITC Ac-LDL im Vergleich zu HUVEC	71
19	Funktionelle Charakterisierung der Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen mittels VEGF-induzierter Anregung zur Gefäßbildung und durchflusszytometrischer Nachweis des VEGFR2 im Vergleich zu HUVEC	71
20	<i>In vitro</i> Charakterisierung humaner neuraler Stammzellen	73
21	<i>In vitro</i> Charakterisierung humaner differenzierter Astrozyten und Perizyten	74
22	Quantitative durchflusszytometrische Analyse der differenzierten Astrozyten und Perizyten	75
23	Aufbau von Blut-Hirn-Schranken-Modellen in Transwellsystemen und Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands	77
24	Analyse der Blut-Hirn-Schranken-Modelle mittels quantitativer Realtime-Polymerase Kettenreaktion und Western Blot	79
25	Immunfluoreszenzfärbung von Blut-Hirn-Schranken-Modellen	80
26	Zeitabhängiger parazellulärer Transport durch die Blut-Hirn-Schranken-Modelle	82
27	Zeitabhängiger transzellulärer Transport durch die Blut-Hirn-Schranken-Modelle	84

28 Vergleich der Transportkinetik von Propofol als Reinsubstanz sowie als Cyclodextrin-Wirkstoff-Komplex gebunden an HPBCD mit Hilfe der Blut-Hirn-Schranken-Modelle	85
29 Ultrastrukturelle Analyse der Blut-Hirn-Schranken-Modelle	86

## Tabellenverzeichnis

1	Übersicht über die verwendeten Zellen und Biopsien zur Zellisolation.	20
2	Übersicht über die Gehirnbiospien, die zur Isolation humaner primärer Zellen zum Einsatz kamen mit zugehörigen Spenderdaten.	21
3	Zusammenstellung der verwendeten Kits.	22
4	Übersicht über die verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie.	23
5	Übersicht über die Antikörper, welche für die Immunfluoreszenzfärbung genutzt wurden.	24
6	Übersicht über die Antikörper, welche für die Western Blot Analyse genutzt wurden.	24
7	Übersicht über die eingesetzten Primer.	25
8	Übersicht über die verwendeten Chemikalien.	26
9	Übersicht über die verwendeten Medien.	29
10	Zusammenstellung der verwendeten Puffer.	31
11	Zusammenstellung der verwendeten Lösungen.	33
12	Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.	37
13	Übersicht über die verwendeten Labormaterialien.	38
14	Zusammenstellung der verwendeten Laborgeräte.	39
15	Übersicht über die verwendete Software.	40
16	Übersicht über die verschiedenen Kulturansätze für das Up-Scaling der Kultur der humanen induziert pluripotenten Stammzellen, deren Kulturbedingungen und das Kulturvolumen.	45
17	Übersicht über die zum Blut-Hirn-Schranken-Modell-Aufbau genutzten Kulturarten, die Aussaatdichten der basolateral kultivierten Zellen und verwendeten Beschichtungen.	50
18	Übersicht über die für die Transporttestungen verwendeten Substanzen, deren Einsatzkonzentrationen und die Herstellung der Stocklösungen.	51
19	Übersicht über die Messparameter bei der Analyse von fluoreszenzmarkierten Substanzen am TECAN-Reader.	52
20	Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung.	55
21	Protokoll zur Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie.	55
22	Übersicht über die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Proteinbestimmung in Vorbereitung auf die Western Blot-Analyse.	57
23	Übersicht über die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese.	59
24	Temperaturprotokoll über die Reaktion der cDNA-Synthese im Thermocycler.	59
25	Zusammensetzung der Reagenzien der quantitativen Realtime-Polymerase Kettenreaktion pro Well der 96-Wellplatte.	60
26	Übersicht über die mittlere Expressionsstabilität $M$ der Housekeepinggene.	61
27	Temperaturverlaufsprotokoll für die quantitative Realtime-Polymerase Kettenreaktion.	61
28	Übersicht über die quantitativen Ergebnisse der Durchflusszytometrie von humanen induziert pluripotenten Stammzellen.	64
29	Nachweis der Expression der Pluripotenzmarker von humanen induziert pluripotenten Stammzellen nach sechstägiger Kultur.	67

30	Nachweis der Pluripotenzgene von humanen induziert pluripotenten Stammzellen nach sechstägiger Kultur.	67
31	Übersicht über die absoluten transendothelialen elektrischen Widerstände an Tag zwei nach der Aussaat der aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen differenzierten Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen.	78
32	Übersicht über die Ergebnisse der Permeabilitätsstudien mit parazellulären Markermolekülen.	81
33	Übersicht über die Ergebnisse der Transportstudien.	83

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ABCB1	Gen, welches das Protein <i>multidrug resistance protein 1</i> (PGP) kodiert
ABCC5	Gen, welches das Protein <i>multidrug resistance-associated protein 5</i> kodiert
ABCG2	Gen, welches das <i>breast cancer resistance protein</i> (BCRP) kodiert
Ac-LDL	<i>acetylated-low density lipoprotein</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AGS	<i>astrocyte growth supplement</i>
AJ	Adhärenzverbindung
AK	Antikörper
AKN	Akustikusneurinom
alk.	alkalisch
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AM	Astrozytenmedium
AMP	Adenosinmonophosphat
AQP	Aquaporin
arach	Arachnoidea-Membran
ASC	Transportsystem des Types ASC für kleine neutrale Aminosäuren
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AVE	adsorptionsvermittelte Endozytose
BCRP	Brustkrebs-Resistenz-Protein
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	Fibroblastenwachstumsfaktor 2
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BHS-EC	Endothelzelle der Blut-Hirn-Schranke
BL	Basallamina
BP	basale Progenitoren
BSA	<i>bovin serum albumin</i>
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid (chemische Formel)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
PE	Phycocerythrin
CD31	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1)
APC	Allophycocyanin
CDH5	Cadherin 5, Typ 2 (VE-Cadherin)
cDNA	komplementäre DNS
CHIR99021	GSK3-Inhibitor
CLDN	Claudin
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
cpe	Plexus choroideus Epithel
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, $C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$
dbcAMP	(N6,2'-O-dibutyryl)-adenosin-3',5'-mono-phosphat, $C_{18}H_{23}N_5O_8PNa$
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser (chemische Formel)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTI	<i>defined trypsin inhibitor</i>
dura	<i>Dura mater</i>
E-face/EF	exoplasmatische Phase
EAAT	<i>excitatory acidic acid amino acid transporter</i>
EB	<i>embryoid body</i>
EC	Endothelzelle
EZM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEF1A1	Gen, welches das Protein <i>elongation factor 1-<math>\alpha</math> 1</i> (EF1 $\alpha$ ) kodiert
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EM	Elektronenmikroskopie
ESC	embryonale Stammzelle
ESAM	<i>endothelial selective adhesion molecule</i>
EtOH	Ethanol (chemische Formel)
Exp.-med.	Expansionsmedium
FACS	<i>fluorescence associated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	fötales Kälberserum
Fib.	Fibronectin
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fNSC	fetale neurale Stammzelle
FPE	Flüssigphase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GLUT1	Glukosetransporter 1
H	Wasserstoff (chemische Formel)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Carbonat-Ion (chemische Formel)
hiPSC	humane induziert pluripotente Stammzelle
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
HPRT1	Gen, welches Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 kodiert
hPSC	humane pluripotente Stammzelle



HRG $\beta$ 1	Heregulin $\beta$ 1
HRP	Meerrettichperoxidase
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HUVEC	<i>human umbilical endothelial cell</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-6	Interleukin-6
iPS-A	aus hiPSCs differenzierte Astrozyten
iPS-EC	aus hiPSCs differenzierte Endothelzelle
iPS-NSC	aus hiPSCs differenzierte neurale Stammzelle
IZM	innere Zellmasse
JAM	junktionales Adhäsionsmolekül
K	Kalium (chemische Formel)
k. A.	keine Angabe
KO	<i>knock out</i>
Klf4	Gen, welches das Protein <i>kruppel-like factor 4</i> kodiert
Kol.	Kollagen
L-DOPA	Levodopa, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
L-Glu	L-Glutamat
Lam	Laminin
LAT	<i>large neutral amino acid transporter</i>
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
LIN28	Gen, welches das Protein Lin-28 homolog A kodiert
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
lt-hESNSC	<i>SOX1-positive self-renewing hESC-derived NEP</i>
LY	Lucifer Yellow
M	mittlere Expressionsstabilität
MAGUK	membranassoziierte Guanylatkinase
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
Med.	Medium
MEM NEAA	<i>minimum essential medium non-essential amino acids</i>
mESC	murine embryonale Stammzelle
MG	Matrigel
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid (chemische Formel)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug resistance-related proteine</i>
MS	Multiple Sklerose
MSC	mesenchymale Stammzelle
MW	Mittelwert
N	Neuron
Na	Natrium (chemische Formel)

---

NaCl	Natriumchlorid (chemische Formel)
NANOG	Gen, welches das Homöoboxprotein NANOG kodiert
NB	Neuroblasten
NEP	neuroepithelialer Progenitor
NF	Neurofibromatose
NG2	<i>neural/glial antigen 2</i>
NO	Stickstoffmonoxid (chemische Formel)
NSC	neurale Stammzelle
OAT	<i>organic anion transporter</i>
OCLN	Gen, welches das Protein Occludin kodiert
OCT	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor
P-face/PF	protoplasmatische Phase
PGP	P-Glykoprotein
PAX6	Gen, welches das <i>paired box protein 6</i> kodiert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR $\beta$	<i>platelet-derived growth factor receptor 2</i>
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PET	Polyethyleneterephthalat
pg-120	Glykoprotein 120
PGS	<i>pericyte growth supplement</i>
pia	<i>Pia mater</i>
PK	Permeationskoeffizient
PKZ	primordiale Keimzelle
PLGA	poly(D,L-lactide-co-glycolide)
PLL	Poly-L-Lysin
PLO	Poly-L-Ornithin
PM	Perizytenmedium
PNVP	perineutraler vaskulärer Plexus
POU5F1	Gen, welches den Oktamer-bindenden Transkriptionsfaktor (OCT) kodiert
PTFE	Polytetrafluorethylen
P	Perizyt
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
R-NSC	rosettenförmige neurale Stammzelle
RA	Retinsäure
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
RG	radiale Gliazelle
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RPL4/RPL6	Gen, welches das <i>ribosomal protein</i> L4 bzw. L6 kodiert
RPS29	Gen, welches das <i>ribosomal protein</i> S29 kodiert

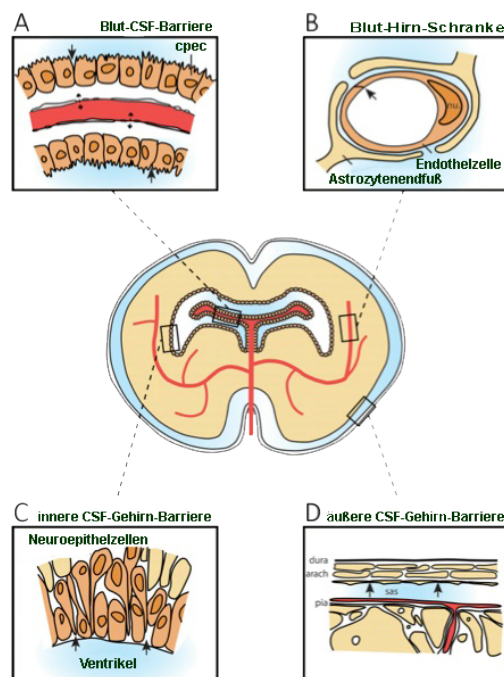
---

RVE	rezeptorvermittelte Endozytose
S100 $\beta$	<i>S100 calcium-binding protein B</i>
sar	Subarachnoidalraum
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Shh	<i>sonic hedgehog</i>
SIS	<i>small intestine submucosa</i>
SKIP-Argumente	Spezies-, Kontinuums-, Identitäts-, Potentialitäts-Argument
SLC	<i>solute carrier</i>
SLC1A1	Gen, welches den Glutamatttransporter kodiert
SLC2A1	Gen, welches den Glukosetransporter-1 (GLUT1) kodiert
SMA	spinale Muskelatrophie
SOX	<i>sex determining region Y-box</i>
sPEO	<i>star shaped poly(ethylene oxide)</i>
SSEA	<i>stage specific embryonic antigen</i>
STABW	Standardabweichung
TAMP	<i>tight junction associated marvel protein</i>
TBST	mit Tween versetztes PBS
TEER	transendothelialer elektrischer Widerstand
TEK	Gen, welches den Tyrosinkinase-Rezeptor TIE2 kodiert
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TJ	<i>tight junction</i>
TRA1-60/-81	<i>keratan sulfate antigen 1-60 bzw. . 1-81</i>
TrkB	Tyrosinkinase Rezeptor B
unkond.	unkonditioniert
VE-Cadherin	<i>vascular endothelial cadherin</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VEGF	vaskularer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZNS	Zentralnervensystem
ZO	<i>zonula occludens</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Barriersysteme des Gehirns

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt eine der wichtigsten und größten Barrieren zwischen der Blutzirkulation und dem Zentralnervensystem (ZNS) dar. Neben der BHS existieren weitere Barrieren, die für die physiologische Funktion des ZNS von Bedeutung sind. Diese sind z. B. die Blut-Cerebrospinalflüssigkeits-Barriere (Blut-CSF-Barriere), bekannt als Blut-Liquor-Schranke, die Blut-Retina-Barriere, die Blut-Nerv- und die Blut-Labyrinth-Barriere (Neuwelt et al. 2011; Liddelow 2011).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Barriersysteme des Gehirns**

Zu den Barriersystemen im adulten Gehirn gehören die Blut-CSF-Barriere (A) und die Blut-Hirn-Schranke (B), welche eine Barriere zwischen den zerebralen Kapillaren und dem Gehirnparenchym bildet. Luminalen TJs (Pfeil) sind Bestandteil der physikalischen Barriere, Astrozytenendfüße und Perizyten sind ebenfalls Bestandteile der neurovaskulären Einheit. Eine dritte Gruppe stellen die CSF-Gehirn-Barrieren dar. Es wird zwischen der inneren CSF-Gehirn-Barriere (C), welche nur während der frühen Embryonalentwicklung existiert, und der äußeren CSF-Gehirn-Barriere (D) unterschieden. Adaptiert und modifiziert nach (Saunders et al. 2000; Liddelow 2011).

Die Blut-CSF-Barriere wird sowohl durch das Plexus choroideus-Epithel (cpe) als auch durch die Arachnoidea-Membran (arach) gebildet (Laterra et al. 1999). Letztere wird auch als äußere CSF-Gehirn-Barriere benannt und durch die äußeren Zellen der Arachnoidea-Membran zwischen Subarachnoidalraum (sar) und darüber liegenden Strukturen gebildet. Im Gegensatz zu den Kapillaren der BHS sind die des Plexus choroideus fenestriert (gepunktete Pfeile in Abbildung 1A) und bilden keine Barriere, die vor dem Übertritt von kleinen Molekülen schützt. Die Epithelzellen und auch die äußeren Zellen der Arachnoidea-Membran werden durch Tight Junctions (Pfeile in Abbildung 1A und D) miteinander verbunden (Laterra et al. 1999; Liddelow 2011). Die Epithelzellen des

Plexus choroideus sind durch das Vorhandensein von Mikrovilli an der CSF-Seite gekennzeichnet, durch diese Oberflächenvergrößerung der apikalen Membran kommt es zur erleichterten Sekretion der CSF und Erhöhung der Transportaktivitäten. Eine weitere Gehirnbarriere, die innere CSF-Gehirn-Barriere, existiert nur während der frühen embryonalen Entwicklung und wird zwischen der CSF und dem Gehirnparenchym ausgebildet. Hierdurch wird das Ventrikularsystem von der extrazellulären Flüssigkeit des Gehirns getrennt (Liddelow 2011). Die Neuroepithelzellen, welche die ventrikuläre Wand umsäumen, weisen Strap Junctions auf, welche den Austausch großer Moleküle, wie Proteine, zwischen der CSF und dem Gehirn verhindern (Whish et al. 2015). Im adulten Gehirn trennen Ependymzellen, die durch Gap Junctions verbunden sind, das Gehirn von der CSF, sie bilden allerdings keine Barriere aus. Der Verlust der Strap Junctions im adulten Gehirn geht mit dem Verlust der inneren CSF-Barriere einher.

Die BHS ist die bekannteste Schnittstelle zwischen dem ZNS und dem Blut. Auf diese Barriere wird in den folgenden Abschnitten detaillierter eingegangen.

## 1.2 Die Blut-Hirn-Schranke

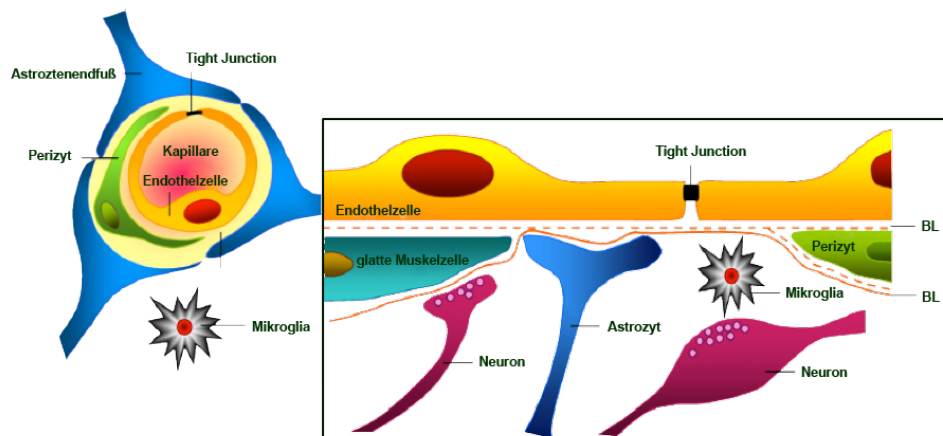
Im Jahr 1885 ist es Paul Ehrlich gelungen, erstmalig das Vorhandensein einer BHS zu beweisen. In experimentellen Studien mit wasserlöslichen Farbstoffen, welche er in den Blutkreislauf von Tieren injizierte, erkannte er, dass diese Farbstoffe zur Färbung aller Organe, mit Ausnahme des Gehirns und des Rückenmarks, führten (Ehrlich 1885). Diese Erkenntnis interpretierte er mit der niedrigen Bindungsaffinität des Farbstoffes zu Nervengewebe (Ehrlich 1904). Goldmann widerlegte diese These im Jahr 1913, indem er Trypanblau sub-arachnoidal applizierte, was zu einer Färbung des Gehirns, nicht aber des Plexus choroideus sowie der peripheren Blut-Zirkulation führte (Goldmann 1913). Er schlussfolgerte daraufhin, dass das Plexusepithel die Barriere darstellt, die das Gehirn vor dem Eindringen des Farbstoffes schützte und prägte mit seinen Arbeiten den Begriff "Blut-Hirn-Schranke". Pharmakologische Studien von Biedl und Kraus sowie Lewandowsky stützten die Meinung über das Vorhandensein einer BHS (Biedl und Kraus 1898; Lewandowsky 1900). Erst mit der Entwicklung der Elektronenmikroskopie konnte die genaue strukturelle Lokalisation der BHS, einschließlich der Barrierefunktion der Endothelzellen innerhalb der Gehirnkapillaren sowie die Ausbildung von TJs nachgewiesen werden (Reese und Karnovsky 1967).

### 1.2.1 Anatomie der Blut-Hirn-Schranke

#### 1.2.1.1 Endothelzellen der Kapillaren

Die Hauptbarrierefunktion der BHS wird den mikrovaskulären Endothelzellen der Gehirnkapillaren zugerechnet. Diese durchziehen das menschliche Gehirn mit einer geschätzten Gesamtlänge von 600 km, besitzen eine Oberfläche von ca.  $20 \text{ m}^2$ , einen durchschnittlichen Durchmesser von 4 bis  $8 \mu\text{m}$  und weisen eine mittlere Distanz von etwa  $40 \mu\text{m}$  zueinander auf (Fricker 2014; Fagerholm 2007). Die BHS stellt eine der dichtesten Barrieren des menschlichen Körpers dar. Der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER), der als Maß für die Dichtigkeit einer Barriere angesehen wird, wurde in verschiedenen Studien gemessen, Mikrogefäße von Fröschen wiesen einen durchschnittlichen TEER von  $1870 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Crone und Olesen 1982) und Arterien der Piaoberfläche

adulter Ratten einen gemessenen TEER von ca.  $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Butt et al. 1990) auf. Im Vergleich dazu besitzt das undichte Epithel des Plexus choroideus nur einen TEER von  $20 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Zeuthen und Wright 1981). Die Endothelzellen, welche die Kapillaren der BHS auskleiden, unterscheiden sich an Hand einiger Eigenschaften von den Endothelzellen der Peripherie. BHS-Endothelzellen sind mit 0,3 bis 0,5  $\mu\text{m}$  sehr flach (Fagerholm 2007), sie sind durch das Fehlen von Fenestrae (Fenstermacher et al. 1988) sowie das Vorhandensein von TJs (Kniesel und Wolburg 2000), einen fünf- bis zehnfach erhöhten Mitochondriengehalt (Oldendorf und Brown 1975; Fricker 2014) und eine minimale Pinozytoseaktivität (Sedlakova et al. 1999) gekennzeichnet (Joo 1996).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit**

Die neurovaskuläre Einheit besteht aus Endothelzellen, welche die Gehirnkapillaren auskleiden und durch TJs miteinander verbunden sind sowie Perizyten, die eingelagert in die Basalmembran der Kapillare partiell die Endothelzellen umhüllen. Auf der Gehirnparenchymseite gehören die Astrozytenendfüße, die die Kapillaren umhüllen und die Neurone zu dieser Einheit. Mikrogliazellen repräsentieren die immunkompetenten Zellen im Gehirn. Adaptiert und modifiziert nach (Abbott et al. 2010).

Die Integrität der BHS-Endothelzellen wird durch die Interaktion mit neuronalen Bestandteilen des ZNS reguliert. Zu dieser neurovaskulären Einheit zählt die Mikroumgebung der Gehirnkapillarendothelzellen samt Perizyten, Astrozytenendfüße, Mikroglia, Neurone und die Basallamina (BL) sowie deren Regulation der BHS (Fricker 2014; Hawkins und Davis 2005).

### 1.2.1.2 Perizyten

Die Perizyten sind abluminal in die Basalmembran der Gehirnkapillaren eingelagert und durch diese von den Endothelzellen sowie Astrozytenendfüßen getrennt. Seit ihrer Entdeckung 1870 durch den französischen Wissenschaftler Charles Marie Benjamin Rouget, werden sie auch als Rouget-Zellen bezeichnet (Balabanov und Dore-Duffy 1998). Auf Grund der Schwierigkeit, Perizyten *in vivo* zu untersuchen, reine Perizytenkulturen zu isolieren und durch das Fehlen von perizyten-spezifischen Markern, ist die Funktion dieser Zellen noch nicht vollständig geklärt (Dore-Duffy 2008). Sie bedecken ca. 20 bis 30 % der Gefäßoberfläche und im Verhältnis zu zwei bis vier Endothelzellen kommt an der BHS ein Perizyt vor (Balabanov und Dore-Duffy 1998; Pardridge 2005). Die Dichtigkeit von Endothelzellen ist direkt proportional zum prozentualen Anteil der Bedeckung der Gefäßwände mit Perizytenausläufern. Je höher also die Zahl an Perizyten oder je mehr Ausläufer sie bilden, mit denen sie die Basalmembran der Endothelzellen umhüllen, desto dichter die Barriere (Frank

et al. 1990). Die absolute Abdeckung der Kapillaren durch die Perizyten bestimmt demzufolge deren relative vaskuläre Permeabilität. Es konnte gezeigt werden, dass durch Perizyten funktionale Aspekte der BHS, wie die Ausbildung von TJs und der Vesikeltransport in den Endothelzellen des ZNS reguliert werden. Perizyten selbst induzieren aber nicht die Expression BHS-spezifischer Gene, sondern inhibieren die Expression von Molekülen, die die vaskuläre Permeabilität sowie die ZNS-Immunezellinfiltration erhöhen (Daneman et al. 2010). Weiterhin spielt auch die Dicke der Basalmembran eine entscheidende Rolle. Frank et al. haben durch Messungen an elektronenmikroskopischen Aufnahmen herausfinden können, dass die Dicke der kapillaren Basalmembranen regionale Schwankungen zeigt. Je dünner die Basalmembran, desto besser bzw. einfacher ist die Interaktion zwischen beiden Zelltypen möglich (Frank et al. 1990). Perizyten scheinen kontraktile Eigenschaften, ähnlich der von vaskulären glatten Muskelzellen, zu besitzen und somit zur Regulation des Blutflusses in den Gehirnkapillaren beitragen zu können (Bandopadhyay et al. 2001). Zudem regulieren sie die Permeabilität und stabilisieren die Integrität der BHS-Endothelzellen durch Produktion von Wachstumsfaktoren und Angiogenesemolekülen, wie dem Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) und dem Transformierenden Wachstumsfaktor (TGF, *transforming growth factor*) (Rucker et al. 2000). Sie sind nicht nur während der embryonalen Gefäßentwicklung, sondern auch bei Wundheilungsprozessen beteiligt. Weiterhin weisen sie eine Makrophagen-Aktivität sowie das Vorhandensein einer hohen Zahl an Lysosomen auf und sind somit an der Immunantwort des ZNS beteiligt (Rucker et al. 2000; Fricker 2014). Außerdem erfolgt eine Zuordnung der entwicklungsstechnisch mesodermalen Perizyten zu den Zell-Progenitoren mit erheblichem mesenchymalen Potential (Diaz-Flores et al. 1991; Rucker et al. 2000). Perizyten wirken nicht nur regulierend auf Endothelzellen, sondern führen ebenfalls zur Polarisation der Astrozytenendfüße (Armulik et al. 2010). Neben der Funktion der Perizyten in Bezug auf die Angiogenese und BHS-Entwicklung, nehmen sie auch in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle ein (Lai und Kuo 2005; Fricker 2014).

### 1.2.1.3 Astrozyten

Astrozyten bedecken mit ihren Endfüßen etwa 99% der Oberfläche der Kapillargefäße im Gehirn (Pardridge 2005). Sie sind an der Entwicklung des BHS-Phänotyps von Endothelzellen, wie der Ausbildung von komplexeren TJs, spezifischen Transporter- und Enzymsystemen, beteiligt (Abbott 2002; Raub et al. 1992). Neben der Stabilisierung und Erhaltung der Barriere sind sie auch innerhalb kürzester Zeit dazu in der Lage, die Permeabilität der Endothelzellen zu regulieren (Abbott 2002). Die genauen chemischen Signalvorgänge, die von Gliazellen induziert werden, sind zur Zeit noch weitgehend unbekannt. Als BHS regulierende Substanzen werden aber TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), GDNF (*glial cell-derived neurotrophic factor*), bFGF, IL-6 (Interleukin-6) und Hydrokortison beschrieben (Abbott 2002; Tran et al. 1999; Utsumi et al. 2000). Der Wachstumsfaktor GDNF z. B. scheint in der postnatalen Reifung der Mikrogefäße im Gehirn eine Rolle zu spielen (Fricker 2014). Endothelzellen sind umgekehrt aber auch dazu in der Lage, die Differenzierung von Astrozyten durch LIF (*leukaemia inhibitory factor*) zu beeinflussen und führen zur erhöhten Aquaporin-4-Expression an den Astrozytenendfüßen (Rash et al. 1998). Astrozyten und Endothelzellen beeinflussen weiterhin eine gegenseitige Hochregulierung von antioxidativen Enzy-

men, um sich vor oxidativem Stress, z. B. im Fall einer Hypoxie, zu schützen (Schroeter et al. 1999). Die Hauptaufgabe der Astrozyten ist jedoch die Versorgung der Neuronen mit Nährstoffen und Energie. Zudem regulieren sie die extrazellulären Ionenkonzentrationen und bilden einen Großteil des Cholesterols, welches als Bestandteil des Myelins die Axone der Neuronen ummantelt (Abbott 2002; Bjorkhem und Meaney 2004). Eine gestörte Kommunikation zwischen Endothelzellen und Astrozyten wurde bei neuropathologischen Erkrankungen, wie Tumorentwicklung und Multiple Sklerose beobachtet (Abbott 2002). Es ist allerdings bisher noch nicht geklärt, ob diese Beobachtungen ein Symptom darstellen oder in der Ätiologie von neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen. Es kann ein kausaler Zusammenhang zwischen BHS-Dysfunktionen und dem Verlauf von neurodegenerativen Krankheiten bestehen.

#### **1.2.1.4 Neurone**

Es konnte bisher noch nicht gezeigt werden, ob Neurone mitentscheidend für die Ausbildung des BHS-Phänotyps verantwortlich sind, jedoch regulieren sie entscheidende Funktionen der BHS (Hawkins und Davis 2005). Neuronales Gewebe ist metabolisch von der Versorgung mit Glukose und Sauerstoff durch den Blutfluss im Gehirn abhängig (Buxton und Frank 1997). Mikrovaskuläre Endothelzellen und auch Astrozytenendfußausläufer sind direkt, durch Neuronen unterschiedlicher Typen, innerviert (Hawkins und Davis 2005; Vaucher et al. 2000; Cohen et al. 1996; Cohen et al. 1997). Der Einsatz von Neuronen oder neuralen Progenitoren führt in *in vitro*-Kulturen zur Ausbildung einer erhöhten Expression von Occludin und P-Glykoprotein (PGP) (Savettieri et al. 2000; Lim et al. 2007). Weiterhin wird Morbus Alzheimer mit dem Verlust der cholinergen Innervation von kortikalen Mikrogefäßen in Verbindung gebracht, was auch die gestörte cerebrovaskuläre Funktion, die mit dieser Erkrankung einhergeht, erklären könnte (Tong und Hamel 1999).

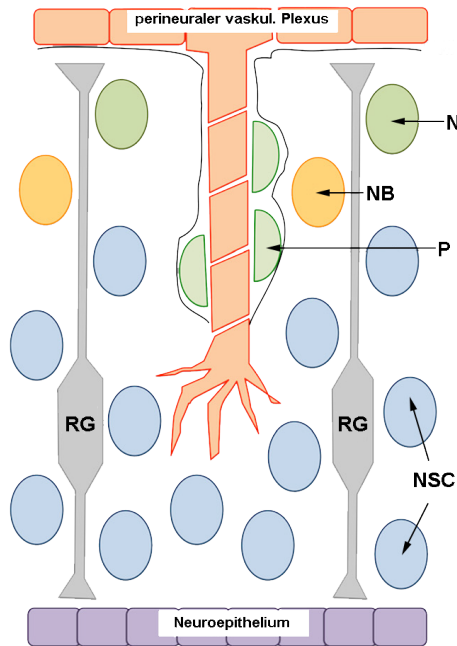
#### **1.2.1.5 Extrazelluläre Matrix**

Neben der Zell-Zell-Interaktionen an der BHS spielt auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) eine entscheidende funktionelle Rolle (Hawkins und Davis 2005). Perizyten sind in die Basalmembran eingelagert und teilen sich diese mit Endothelzellen und Astrozyten. Die Basalmembran besteht hauptsächlich aus Laminin, Kollagen IV, Proteoglykanen, Heparinsulfat, Fibronectin und anderen extrazellulären Proteinen und weist eine Stärke von 30 bis 40 nm auf (Fricker 2014). In Kultur werden diese Proteine auch von den Endothelzellen sekretiert (Tilling et al. 1998). Die Integrinrezeptor-vermittelte Verankerung der Endothelzellen über Laminin und andere Matrixproteine sowie die Expression von TJ-Proteinen und die damit verbundene Beeinflussung der parazellulären Diffusion, sind einige Beispiele für den Einfluss der Basalmembran auf die BHS-Eigenschaften (Hawkins und Davis 2005; Fricker 2014; Savettieri et al. 2000).

### **1.2.2 Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke**

In der Evolution nahm mit gesteigerter Größe und Komplexität des ZNS auch dessen Bedeutung zur Koordination von Körperfunktionen immer weiter zu.





### Abbildung 3: Differenzierung der Blut-Hirn-Schranke in der Embryonalentwicklung

Während der Embryogenese migrieren Endothelzellen des perineuralen vaskulären Plexus in Richtung Neuroepithelium. Perizyten (P) stabilisieren hierbei die neu gebildeten Gefäße. Parallel zur Angiogenese erfolgt auch die Migration neuronaler Stammzellen (NSCs) in die oberen Schichten des zerebralen Kortex, radiale Gliazellen (RG) dienen dabei zur Orientierung. Die NSCs reifen über Neuroblasten (NB) zu reifen Neuronen (N) heran. Adaptiert und modifiziert nach (Lippmann et al. 2013).

Hierdurch musste der gesteigerte Bedarf der Neurone an Nährstoffen sichergestellt werden, was ebenfalls zu einer gesteigerten Komplexität des Kapillarnetzes im Gehirn führte. Einen weiteren Selektionsvorteil brachte die Ausbildung verschiedener Schutzmechanismen der empfindlichen Neurone mit sich (Bundgaard und Abbott 2008), die Entwicklung der BHS wurde beschleunigt. Viele wirbellose Tiere besitzen entweder keine BHS, das Endothel ist lückenhaft oder sie weisen eine durch die perivaskulären Astrozyten ausgebildete gliale BHS, wie sie bei den Insekten, Krebsen und Kopffüßern, aber auch einigen Wirbeltierklassen, wie den Lattenkiemern und Stören vorhanden ist, auf. Alle anderen Wirbeltiere besitzen eine endotheliale BHS. Deren Entwicklung bot aufgrund der funktionellen Trennung von Astrozyten und Endothelzellen einen Selektionsvorteil. Es liegt die Vermutung nahe, dass vor 400 bis 500 Millionen Jahren alle Wirbeltiere eine gliale BHS besaßen (Bundgaard und Abbott 2008).

Während der Embryonalentwicklung der BHS spielen Astrozyten, die ektodermalen Ursprungs sind, keine Rolle, sie sind aber für deren Reifung und Erhalt entscheidend. Angioblasten mesodermalen Ursprungs dringen hierbei in die Kopfregion ein, vereinigen sich und bilden den perineuralen vaskulären Plexus (PNVP), ein primitives vaskuläres Netzwerk, welches die Oberfläche des Neuralrohrs bedeckt. Durch das Binden des angiogenen Faktors VEGF und weiterer Moleküle, wie Angiopoetin-1 und Sonic Hedgehog (Shh), an das Endothel des PNVP kommt es zur Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen. Diese ermöglichen eine Migration der Endothelzellen durch Abbau der Basallamina und extrazellulären Matrix. Hochmigrative und invasive Endothelzellen wandern in das Neuralrohr, welches dem Neuroektoderm zuzuordnen ist, in Richtung Neuroepithelium. In der

Embryonalentwicklung von Mäusen wird der PNVP zwischen Tag 7,5 und 8,5 (E7,5-8,5) ausgebildet, ab E9,5 beginnt das Einsprießen der Gefäße in das Neuralrohr (Engelhardt und Liebner 2014). Angiopoetin-1 bindet an den Tie-2-Rezeptor der Endothelzellen, wodurch Perizyten-Vorläufer zur Stabilisierung der neu gebildeten Gefäße rekrutiert werden und eine embryonale Basalmembran gebildet wird. Durch die Sezernierung von PDGF- $\beta$  (*Platelet-derived growth factor- $\beta$* ) kommt es zum Assoziieren der Progenitoren mit den Endothelzellen und zur Differenzierung in Perizyten (P) (Lippmann et al. 2013; Raab 2005). Perizyten regulieren funktionale Aspekte der BHS, wie die Bildung von TJs. Mesodermale Perizyten induzieren zwar nicht die BHS-spezifische Genexpression von Endothelzellen der Gehirnkapillaren, inhibieren jedoch die Expression von Molekülen, die die vaskuläre Permeabilität erhöhen sowie die Infiltration von ZNS-Immunzellen (Daneman et al. 2010). Parallel zur Angiogenese migrieren neuronale Stammzellen (NSCs, *neural stem cells*) vom Neuroepithelium in die oberen Schichten des zerebralen Kortex. Auf diesem Weg nutzen sie radiale Gliazellen (RG) zur Orientierung. Die NSCs differenzieren in Neuroblasten (NB) und reifen später zu Neuronen (N) heran (Lippmann et al. 2013).

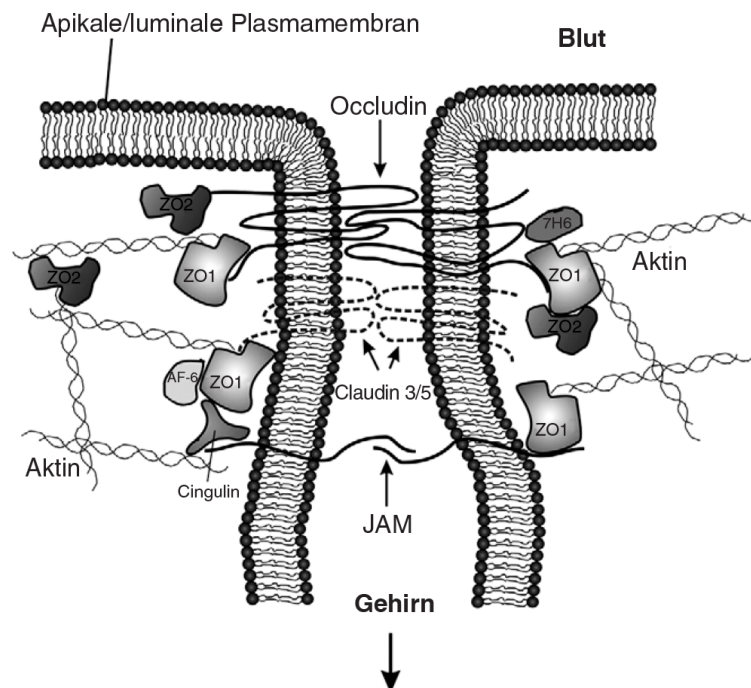
### 1.2.3 Funktionen der Blut-Hirn-Schranke

Die BHS stellt die wichtigste, bei allen Landwirbeltieren im Gehirn vorkommende, Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS dar. Das ZNS stellt das sensitivste System im humanen Körper dar. Um die korrekte neuronale Funktion sicherzustellen, sind konstante Bedingungen der extrazellulären Umgebung zu gewährleisten (Hawkins und Davis 2005). Zu den Hauptaufgaben der BHS zählen die Aufrechterhaltung der Homöostase, d. h. das Konstanthalten der Ionenkonzentrationen im ZNS, weiterhin schützt sie vor dem Eindringen neurotoxischer Substanzen und Pathogene, wie Bakterien und Viren. Die BHS sorgt auch für die Eliminierung von Stoffwechselprodukten (Hawkins und Davis 2005). Außerdem stellt sie den hohen metabolischen Bedarf des Nervengewebes sicher. Das Gehirn verbraucht ca. 18 % der Gesamtmenge an Energie, obwohl es bei einem durchschnittlichen Erwachsenen nur etwa 2 % des Körpergewichts ausmacht (Ohtsuki 2004). Anhand der vielfältigen Aufgaben der BHS wird deutlich, dass diese nicht nur als physikalische Barriere, sondern auch als Transport- und metabolische Barriere agiert.

#### 1.2.3.1 Physikalische Barriere

Die Hauptbarrierefunktion der Endothelzellen kommt den dichten Zell-Zell-Verbindungen, den so genannten Tight Junctions, zu. Sie sind verantwortlich für die geringe parazelluläre Permeabilität und den hohen elektrischen Widerstand des BHS-Endothels (Hawkins und Davis 2005). Die TJs dichten den interzellulären Raum zwischen den Endothelzellen ab. Somit führen sie durch Ineinandergreifen von Proteinketten zur Ausbildung der apikalen, zum Gefäßlumen gerichteten, und basolateralen, vom Gefäßlumen abgewandten, Zellmembran (Hawkins und Davis 2005) und somit zur Polarisierung des Endothels. Die TJs verlaufen im apikalen Bereich der lateralen Zellmembranen. Zu der Gruppe der an der BHS vorkommenden TJ-Proteine gehören die Claudine, die Occludine, welche zu den TAMP (*TJ-associated marvel proteins*) zählen (Luissint et al. 2012), sowie die zur Immunglobulin-Familie gehörenden junctionalen Adhäsionsmolekülen (JAM, *junctional adhesion molecule*). Auch die zur JAM-Familie gehörenden ESAM (*endothelial selective adhesion molecule*)

wurden an der BHS detektiert (Pardridge 2005; Deli 2009). Die membranassoziierten Zytoplasmaproteine ZO (*zonula occludens*), die zu den MAGUK (membran-assoziierte Guanylatkinase) gehören, verbinden die TJ-Proteine mit dem Zytoskelett der Zelle (Georgieva et al. 2014). An der BHS wurde die Präsenz von Claudin 1, 3, 5, 12 und 18 beschrieben (Krause et al. 2008). Hierbei haben Claudin 1 und Claudin 5 eine besondere Bedeutung (Wolburg und Lippoldt 2002a), letzteres wird nur von Endothelzellen, nicht aber von Epithelzellen exprimiert. Nach selektivem Claudin-5-Knock-Out bei Mäusen, war die Permeabilität der BHS gegenüber Molekülen eines Molekulargewichtes unter 800 Da erhöht und der Tod der Tiere war kurz nach der Geburt zu beobachten (Nitta et al. 2003). Auch das Vorhandensein der Claudine 4 und 16 an der BHS, im sich entwickelnden und adulten Gehirn von Säugern, wurde durch Studien bestätigt (Kratzer et al. 2012).



**Abbildung 4: Molekularer Aufbau der Tight Junctions an der Blut-Hirn-Schranke**

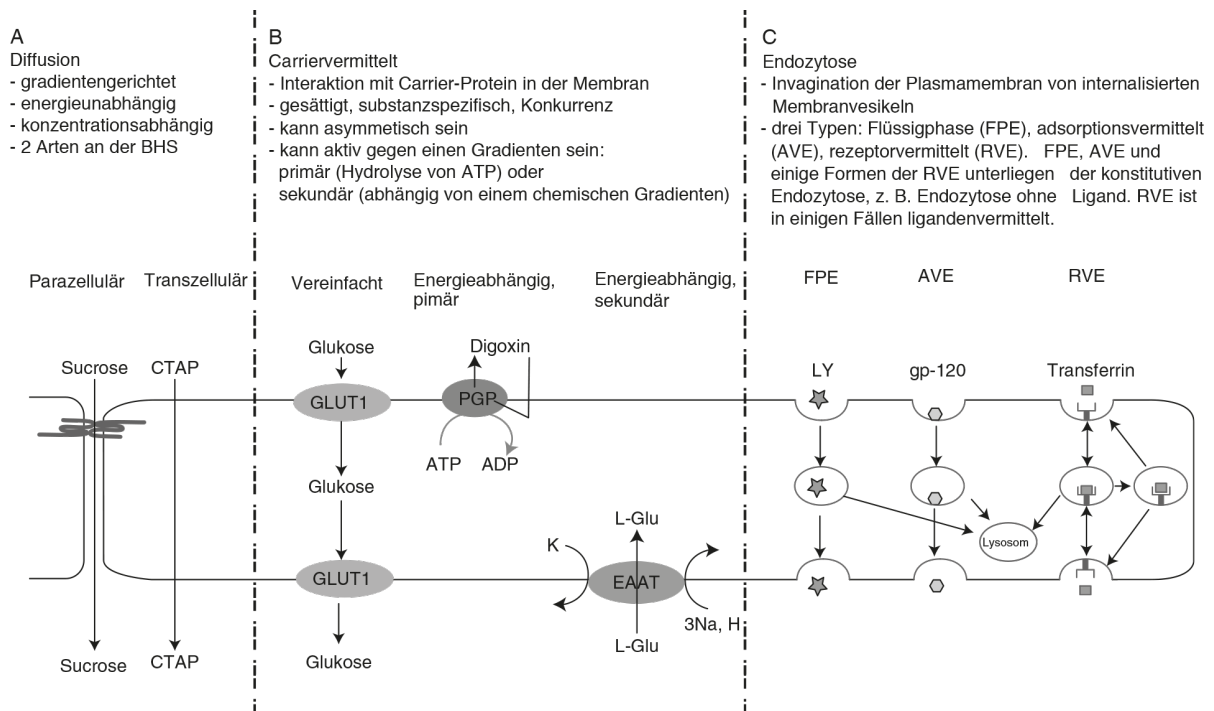
Die TJs bestehen aus den Transmembranproteinen JAM, Occludin und den Claudinen. Membranassoziierte Zytoplasmaproteine, wie ZO1 und ZO2 verbinden die TJ-Proteine mit dem Zytoskelett der Zelle. Andere Proteine, wie Cingulin, AF-6 und 7H6 sind ebenfalls an der TJ-Bildung beteiligt. Adaptiert und modifiziert nach (Hawkins und Davis 2005).

Neben den TJs zählen auch die Adhärenzverbindungen (AJs, *adherens junctions*) zu den wichtigen Zell-Zell-Verbindungen an der BHS. AJs initiieren die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und vermitteln deren Reifung sowie Erhalt (Hartsock und Nelson 2008). Zu den hauptsächlich an der BHS vorkommenden AJs zählen das VE-Cadherin (*vascular endothelial cadherin*) und PECAM1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*) (Deli 2009; Luissint et al. 2012).

### 1.2.3.2 Transportbarriere

Die BHS schützt das Gehirn vor dem zufälligen Eintritt von Molekülen, ist aber auch für die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen und regulierenden Faktoren zuständig. Aus diesem Grund

ermöglichen die Endothelzellen der BHS sowohl einen passiven und einen gradientenabhängigen, als auch einen aktiven Transport unter Energieverbrauch (Georgieva et al. 2014).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Transportmechanismen der Blut-Hirn-Schranke**

An der BHS finden sowohl Diffusionsvorgänge (A), welche in parazelluläre und transzelluläre Diffusion unterteilt werden können, als auch aktive carriervermittelte Transporte (B) sowie Endozytose (C) statt. Die Endozytosevorgänge schließen die Endozytose der Flüssigphase (FPE), die adsorptionsvermittelte Endozytose (AVE) sowie die rezeptorvermittelte Endozytose (RVE) ein.

Abkürzungen: Glukosetransporter-1 (GLUT1), Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Kalium (K), Natrium (Na), Wasserstoff (H), L-Glutamat (L-Glu), excitatory amino acid transporter (EAAT), P-Glykoprotein (PGP), Lucifer Yellow (LY), Glykoprotein 120 (gp-120), CTAP (zyklisches, penicillaminenthaltendes Oktapeptid). Adaptiert und modifiziert nach (Hawkins und Egleton 2008).

Unter physiologischen Bedingungen ist der passive, parazelluläre Transport kleiner hydrophiler Moleküle durch kleine Poren in den TJs vernachlässigbar gering. Ein weiterer passiver Transportvorgang ist die freie Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. Hierbei werden hauptsächlich kleine hydrophobe Moleküle (< 500 Da) transzellulär transportiert. Die meisten Therapeutika gelangen über diesen Mechanismus in das Gehirn (Georgieva et al. 2014). Der Transport kleiner polarer Moleküle, wie Wasser, erfolgt ebenfalls über Diffusion, allerdings werden hierfür hydrophile Aquaporinkanäle (AQP) in der Endothelzellmembran und den Astrozytenendfüßen exprimiert, im Gehirn sind es hauptsächlich AQP4 und AQP9 (Badaut et al. 2007).

Der Transport von Nährstoffen und größeren Molekülen hingegen ist an der BHS streng reguliert. Er wird durch spezialisierte Transporter mittels carriervermitteltem Transport oder erleichterter Diffusion gefördert. So werden Glukose, Aminosäuren und Nukleoside mit Hilfe von Transportern über die BHS transportiert. Der Transport von Glukose erfolgt beispielsweise über den Glukosetransporter 1 (GLUT1), welcher asymmetrisch in der Plasmamembran der Endothelzellen verteilt ist. Verglichen zur luminalen Seite wird GLUT1 abluminal ca. viermal häufiger exprimiert (Farrell und Pardridge 1991). An der luminalen Membran des BHS-Endothels findet nicht nur eine passive

Diffusion von Natrium durch Ionenkanäle, sondern auch dessen carriervermittelter Transport statt. In Verbindung mit dem Abtransport von  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , kommt es zur Aufnahme von  $\text{NaCl}$  und dem resultierenden Wassertransport in das Gehirn (Ennis et al. 1996). Weitere Transporter, die zur Familie der SLC (*solute carrier*) gehören, sind die Monocarboxylat-Transporter MCT1 und MCT2, welche Monocarbonsäuren (z. B. Laktat, Pyruvat und Butyrate) transportieren (Cornford und Hyman 1999). Außerdem zählt LAT1 (*large neutral amino acid transporter*), für den Transport von Aminosäuren, aber auch Medikamenten, wie L-DOPA, Gabapentin und Baclofen (Georgieva et al. 2014), zur SLC-Gruppe. Weiterhin zu nennen ist SLC7, welcher für den Transport kationischer Aminosäuren, wie Arginin, Lysin und Ornithin verantwortlich ist.

Aktive ABC-Transporter vollführen unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) den Influx (Einstrom) bzw. Efflux (Abfluss) auch entgegen eines Konzentrationsgradienten. Wegen der Fähigkeit ATP zu binden, werden sie auch als ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) bezeichnet. Zu den bekanntesten Effluxtransportern, welche Metabolite, neurotoxische Substanzen und Arzneistoffe aus dem Gehirn heraus transportieren, zählen an der BHS P-Glykoprotein (PGP, MDR1), *Multidrug Resistance-Related Proteine* (MRP) und das Brustkrebs-Resistenz-Protein (BCRP, *breast cancer resistance protein*) (Begley 2004; Abbott und Friedman 2012; Ohtsuki und Terasaki 2007). Andere Transportformen an der BHS sind die rezeptorvermittelte Transzytose. Für deren Initiierung ist die Bindung der zu transportierenden Substanzen an spezielle Rezeptoren nötig. Der Transport von regulatorischen Molekülen, wie Insulin, Leptin und Interleukinen sowie Nährstoffen, wie Eisen und LDL (*low density lipoprotein*), welches für die Cholesterollbildung essentiell ist, wird auf diese Weise vermittelt (Georgieva et al. 2014). Bei der adsorbativen Transzytose hingegen werden z. B. Serumproteine auf Grund ihrer positiven Ladung durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Glykoproteinen der Zellmembran auf unspezifische Weise transportiert (Georgieva et al. 2014).

### 1.2.3.3 Metabolische Barriere

Die dritte Form der Barriere, die die BHS darstellt, ist die metabolische Barriere. Im Vergleich zu Endothelzellen der Peripherie weisen BHS-Endothelzellen einen fünf- bis zehnfach erhöhten Mitochondriengehalt auf (Oldendorf und Brown 1975), was ein Indiz für eine erhöhte metabolische Aktivität ist (Bradbury 1985). Durch enzymatische Umsetzung von Substanzen wird deren chemische Struktur verändert, womit auch die Änderung der Permeabilitätseigenschaften verbunden ist. Einerseits kann die metabolische Umsetzung von Substanzen dazu führen, dass der Efflux von Neurotransmittern und Neurohormonen in die Zirkulation gehemmt wird oder das Überwinden der BHS von Toxinen, Medikamenten und peripheren, neuroaktiven Substanzen und zirkulierenden Neurotransmittern verhindert wird (Gherzi-Egea et al. 1995). Genau diese Metabolisierung durch BHS-Enzyme kann aber auch zur Bildung von pharmakologisch aktiven oder neurotoxischen Komponenten aus körperfremden Substanzen führen (Bacha und Minn 1999). Einige Enzyme, die an der BHS für diese Umsetzungen verantwortlich sind, sind das Angiotensin-umsetzende Enzym,  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, Monoaminoxidase A und B, Cholinesterase, Carboanhydrase, Aminopeptidase (A und M), Enkephalinase und einige Phase I und II Enzyme (DeBault und Cancilla 1980; Guillot und Audus 1990; Neuhaus und Noe 2010).

### 1.2.4 Blut-Hirn-Schranke und neurodegenerative Erkrankungen

Eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer, Schlaganfall, Gehirntumore und Epilepsie werden mit Störungen der BHS in Verbindung gebracht und tragen ebenfalls zur Pathologie dieser Erkrankungen bei (Neuwelt et al. 2011). Das bedeutet, dass nicht nur Störungen der BHS zur Entstehung von neurologischen Erkrankungen führen können, sondern auch diese Erkrankungen selbst als Ausgangspunkt für eine gestörte Barriere der BHS diskutiert werden. In diesem Zusammenhang wird von den Komplikationen neurodegenerativer Erkrankungen und Gehirnverletzungen gesprochen (Hawkins und Egleton 2008). Die BHS ist nur bei sehr seltenen genetischen Krankheiten Auslöser für Erkrankungen. Zu diesen zählen u. a. das GLUT1-Defizit-Syndrom, bei dem ein Mangel des GLUT1-Transporters an den Endothelzellen der BHS auftritt (Klepper et al. 2001) und die Biotinansprechende-Basalganglien-Erkrankung, die einen Biotinmangel verursacht (Zeng et al. 2005).

Nicht nur neurodegenerative Erkrankungen und Gehirnverletzungen, wie ischämischer Schlaganfall, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer führen zur geschädigten Funktion der BHS, sondern auch periphere Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Entzündungen (Hawkins und Egleton 2008). Diabetes mellitus wird mit strukturellen und funktionalen Veränderungen des ZNS, wie Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften der Endothelzellmembranen und TJs sowie einer erhöhten BHS-Permeabilität, in Verbindung gebracht (Huber et al. 2006; Horani und Mooradian 2003).

Zudem führen auch bakterielle Infektionen zu BHS-Schäden, welche z. B. durch Infektionen mit *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Escherichia coli K1* (Weiss et al. 2009) sowie virale Infektionen, wie HIV, West-Nile-Virus und Chikungunia Viren ausgelöst werden (Weiss et al. 2009). Gehirntumore, wie das Glioblastom, führen zum kompletten Zusammenbruch der BHS und peritumoralen Ödemen (Coomber et al. 1987; Long 1970). Ursächlich hierfür sind das Verlorengelassen des TJ-Proteins Claudin 1 sowie die verringerte Expression von Claudin 5 und Occludin (Liebner et al. 2000a). Außerdem werden große Mengen VEGF produziert, wodurch die Endozytose über VE-Cadherin und damit die Permeabilität des Endothels erhöht wird (Gavard und Gutkind 2006).

Die Alzheimer Krankheit geht mit der Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten durch das  $\beta$ -Amyloid-Protein und ähnliche Oligopeptide einher, was wiederum zu einer Reihe von Signaltransduktionen führt, in denen neurotoxische Moleküle produziert werden und schließlich neurologische Schäden sowie synaptische Dysfunktionen verursacht werden (Giulian et al. 1995; Ballabh et al. 2004).

Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der T-Lymphozyten für die Zerstörung der Myelinscheiden und das Angreifen der Axone der Neurone verantwortlich sind (Wekerle und Hohlfeld 2003). Außerdem ist MS mit einer verminderten Expression der TJs verbunden (McQuaid et al. 2009).

Bislang existieren für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, wie MS, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson auf Grund der noch weitgehend ungeklärten zugrundeliegenden Entstehungsmechanismen noch keine geeigneten kurativen Therapien, es werden lediglich symptomatische Therapie angeboten. Mit Hilfe geeigneter BHS-Modelle könnten pathophysiologische Mechanismen aufgeklärt und geeignete Therapieformen entwickelt werden.

### 1.2.5 Blut-Hirn-Schranken Modelle

Es existiert ein diverses Spektrum an BHS-Modellen, welches von *in silico*-Modellen, über *in vitro*-Modelle mit artifiziellen Membranen und Zellkulturmodellen bis hin zu *in vivo*-Modellen reicht. Die Herausforderung bei der Entwicklung von *in vitro* BHS-Modellen ist das Reproduzieren der *in vivo*-Eigenschaften unter möglichst genauer Rekonstruktion der BHS-Funktionalität (Avdeef et al. 2015). Durch den hohen Bedarf an geeigneten BHS-Modellen in der Grundlagen- sowie präklinischen Forschung im Bereich der Medikamentenentwicklung und Infektionsstudien, ist eine Vielzahl von *in vitro*-Zellkulturmodellen der BHS entwickelt worden, welche im Folgenden näher betrachtet werden sollen. In der Medikamentenentwicklung werden Modelle benötigt, um die Permeabilität der BHS gegenüber peripher wirkenden Substanzen einzuschätzen, um unerwünschte Nebenwirkungen im ZNS zu verhindern, aber auch um die BHS-Gängigkeit von Medikamenten zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus-Alzheimer, Multiple Sklerose, Morbus Parkinson oder Epilepsie und Gehirntumoren zu erhöhen.

Als *in vitro*-Modelle zur Beurteilung der Permeabilität von Substanzen werden aufgrund ihrer dichten parazellulären Barriere und der hohen Aktivität der Effluxpumpen oft Ersatzmodelle anstatt Gehirndothelzellen eingesetzt (Wilhelm et al. 2011; Avdeef et al. 2015). Zum Einsatz kommen hierbei sowohl Epithelzellen, wie Caco-2-Zellen (humane Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie) und MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) (Hellinger et al. 2012), aber auch nicht-zerebrale Endothelzellen, wie HUVEC (*human umbilical endothelial cells*). Bei der Verwendung von Caco-2-Zellen lässt sich die passive Diffusion von Substanzen gut mit der durch die BHS korrelieren, aber die Expression von Efflux-Transportern, wie PGP unterscheidet sich stark zu der in den Gehirnkapillaren (Garberg et al. 2005). Durch die Behandlung der Zellen mit dem Mitosehemmer Vinblastin (Chemotherapeutikum) erhalten die Zellen eine einheitlichere Morphologie und die Expression von PGP kann erhöht werden (Hellinger et al. 2010). Auch MDCK-Zellen weisen Unterschiede im Vergleich zum Endothel der Gehirnkapillaren auf, so exprimieren sie hauptsächlich das TJ-Protein Claudin 1 anstatt Claudin 5, welches an der BHS stark exprimiert wird. Durch Transfektion mit dem humanen MDR1-Gen konnte die PGP-Funktionalität an die von Gehirndothelzellen und *in vivo*-Daten angeglichen werden (Garberg et al. 2005; Vastag und Keseru 2009). In Bezug auf diese Daten scheint es, man könne auf komplexe BHS-Modelle im Hinblick auf die Permeabilität und Verteilung von Medikamenten im Gehirn verzichten (Vastag und Keseru 2009). Allerdings ist immer nur die Funktionalität einzelner Transporter untersucht worden. Im Transport von lipophilen Molekülen mit flusslimitierter Penetration ins Gehirn und Substraten der SLC-Transporter, werden die Limitationen der Ersatzmodelle deutlich (Avdeef et al. 2015). Weiterhin sind morphologische Unterschiede zwischen Endothel- und Epithelzellen vorhanden. Die luminale Oberfläche von Gehirndothelzellen ist glatt und zeigt keine Mikrovillistrukturen (Hellinger et al. 2012). Verglichen zu Caco-2- und MDCK-Zellen sind Gehirndothelzellen 10- bis 20-fach dünner. Diese Eigenschaft beeinflusst auch die Penetration von Substanzen. Der Permeabilitätskoeffizient von Caco-2-Zellen für den passiven Transport von Molekülen ist 1,3- bis 1,5-fach höher als der von BHS-Endothelzellen (Avdeef et al. 2015).

Des Weiteren existiert, entsprechend der jeweiligen Anforderungen und Einsatzgebiete, auch eine Vielzahl diverser BHS-Modelle basierend auf Endothelzellen zerebralen Ursprungs. Diese werden als Monokulturen oder in Kombination mit Astrozyten und/oder Perizyten und/oder Neuronen

als Ko- oder Tripelkulturmodelle aufgebaut. Dabei haben die Zellen entweder direkten Kontakt zueinander, d. h. sie werden an gegenüberliegenden Seiten einer porösen Membran kultiviert oder werden ohne direkten Kontakt in unterschiedliche Kompartimente ausgesät. Weiterhin werden konditionierte Medien zur Stimulation der Endothelzellen und Verbesserung der BHS-Eigenschaften oder auch nur einzelne Mediensupplemente, wie cAMP und Glukokortikoide, eingesetzt (Vastag und Keseru 2009; Korte et al. 2000). Eine weitere Klassifizierung der Modelle ist hinsichtlich ihrer Kulturart in statische und dynamische BHS-Modelle möglich. Die Hauptanforderung an BHS-*in vitro*-Modelle ist die Ausbildung einer ausreichend hohen physikalischen Barrierefunktion. Diese Barriereintegrität wird entweder durch Messung des TEER, unter Einbezug der Kulturoberfläche in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  angegeben, oder es erfolgt die Messung der Permeabilität bekannter Testsubstanzen. Natriumfluoreszein und FITC-Dextran sind solche parazellulär transportierten Stoffe, deren Permeabilität in der Größenordnung von 10 bis 6 cm/s angegeben wird (Wilhelm et al. 2011). Der Einsatz von Kokulturmodellen zeigte die meisten Übereinstimmungen mit der BHS *in vivo*, z. B. ähnelten sich die Zellmembranen in ihrer Lipidzusammensetzung, in der Komplexität der TJs und auch in der Expression von BHS-Enzymen (Vastag und Keseru 2009).

Zerebrale Endothelzellen verschiedener Spezies wurden bereits isoliert und charakterisiert, allerdings zeigten porcine, bovine und Nager-Endothelzellen die beste Funktionalität, die dichtesten Barrieren und die niedrigsten Permeabilitäten (Vastag und Keseru 2009). Mit Hilfe von primären, kapillaren Endothelzellen aus der Ratte konnten TEER-Werte von bis zu  $800 \Omega \cdot \text{cm}^2$  gemessen werden (Watson et al. 2013). Ähnlich hohe Werte konnten durch Verwendung von murinen (Coisne et al. 2005), bovinen (Cecchelli et al. 1999) und porcinen (Patabendige et al. 2013) primären BHS-Endothelzellen erzielt werden (Helms et al. 2016). Nachteile bei der Nutzung primärer Zellen sind unter anderem die zeit- und kostenintensiven Isolationsprozesse, die donorabhängigen Variabilitäten sowie der hohe Bedarf an Tieren für jede neue Isolation. Auch die Reinheit der isolierten Zellen ist sehr variabel und durch Verunreinigungen von Endothelzellen mit anderen Zelltypen, z. B. Perizyten, Fibroblasten und Zellen der glatten Muskulatur, entstehen isolationsbedingte Variabilitäten in der Dichtigkeit der mit diesen Zellen aufgebauten Modelle (Szabo et al. 1997). Um dieses Problem zu lösen werden verschiedene Methoden eingesetzt: Einerseits kann das Wachstum der Endothelzellen im Vergleich zu den anderen Zellen angeregt werden, hierbei wird beispielsweise in Primärkulturen aus der Ratte die Zytolyse von Perizyten und Astrozyten durch anti-Thy 1.1-Antikörper induziert oder plasma-derived Serum mit geringen Konzentrationen an PDGF anstatt FCS genutzt (Szabo et al. 1997). Andererseits ist auch der Einsatz von Puromycin, einem Antibiotikum, welches auch Substrat für den Effluxtransporter PGP ist, möglich. Durch die hohe Expression von PGP überleben die BHS-Endothelzellen die Puromycinbehandlung im Gegensatz zu anderen Zellen (Perriere et al. 2005). Die altersabhängige Permeabilität gegenüber von Medikamenten ist bei der Verwendung von Versuchstieren zu beachten. In vergleichenden Studien zwischen Endothelzellen aus zwei bzw. acht Wochen alten Mäusen konnten erhebliche Unterschiede zwischen den Eigenschaften einer neonatalen und adulten BHS gezeigt werden (Takata et al. 2013).

Aufgrund der genannten Nachteile bei der Verwendung von primären BHS-Zellen wächst die Bedeutung der immortalisierten BHS-Endothelzellen, sodass diese immer häufiger für den Aufbau von Modellen genutzt werden. Vorteile bei der Verwendung der Zelllinien sind die hohe Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Gewebemodelle und der erhaltenen Ergebnisse. Zelllinien weisen zudem langzeitstabile Eigenschaften auf und sind über mehrere Passagen verwendbar. Auch



hier existieren Gehirndothelzelllinien verschiedener Spezies, wie die murinen Zelllinien MBEC4, bEnd.3, bEnd5 (Watanabe et al. 2013), cEND (Forster et al. 2005) und cerebEND (Neuhaus et al. 2014), sowie Linien aus der Ratte, z. B. RBE4 (Roux et al. 1994; Blasig et al. 2002), SV-ARBEC (Garberg et al. 2005) und GPNT (Romero et al. 2003). Bovine Endothelzellen, z. B. t-BBEC-117 (Sobue et al. 1999), porcine Zelllinien, wie PBMEC/C1-2 (Lauer et al. 2004) und humane Linien, wie hCMEC/D3, hBMEC, TY10 und BB19 (Eigenmann et al. 2013) werden ebenfalls eingesetzt (Avdeef et al. 2015). Obwohl zelllinienbasierte Modelle in der Forschung genutzt werden können und deren Eigenschaften sowie die BHS-Differenzierung durch Variation der extrazellulären Matrices und der Medienzusammensetzung verbessert werden können, fehlen diesen Modellen wichtige Eigenschaften, welche Voraussetzung für die Modellierung der BHS-Permeabilität sind (Vastag und Keseru 2009; Avdeef et al. 2015). Ein Beispiel hierfür ist der Verlust der parazellulären Dichtigkeit, die mit der inhomogenen TJ-Expression verbunden ist und zur Bildung undichter Monolayer führt (Vastag und Keseru 2009). Die Gründe und Mechanismen hierfür sind nicht geklärt, aber es ist bekannt, dass eine dichte Barriere nur von sich nicht teilenden, ruhenden Endothelzellen ausgebildet wird, während der Angiogenese sind die interzellulären Verbindungen schwächer. Das TJ-assoziierte Protein ZO2 wurde als ein Signalgeber im Nukleus identifiziert, welcher während der Angiogenese exprimiert wird und auch in konfluenten, kontaktinhibierten Zellkulturen im Bereich der Zellverbindungen nachgewiesen werden konnte (Gonzalez-Mariscal et al. 2012). Der TEER-Wert, welcher mit diesen Linien erzielt wird, liegt zwischen 150 bis 200  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Deli et al. 2005) und somit deutlich unter den *in vivo* gemessenen Werten von bis zu 2000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Crone und Olesen 1982).

Ein weiterer Aspekt, der bei der Verwendung von BHS-Modellen für die Forschung und Präklinik, besonders im Hinblick auf die Korrelation der Daten mit der humanen *in vivo*-Situation, eine entscheidende Rolle spielt, sind die Speziesunterschiede zwischen humanen und nicht-humanen Säugern. Besonders in der Expression von Transportern und damit einhergehend deren Funktionalität treten Unterschiede auf. Ein Beispiel hierfür stellt der Effluxtransporter PGP dar, der in einer vergleichenden Studie aus Mäusen, Ratten, Affen und Hunden in die Zelllinie LLC-PK1 kloniert worden ist. Es konnten Speziesunterschiede zwischen Mensch und Maus bzw. Hund in der Funktionalität des Transporters beobachtet werden (Takeuchi et al. 2006). Außerdem konnte eine geringere ABCG2-Expression (BCRP) in humanen BHS-Endothelzellen, als in denen von Mäusen, Ratten, Kühen oder Schweinen belegt werden (Warren et al. 2009).

Das Generieren humaner primärer BHS-Modelle gestaltet sich im Hinblick auf die limitierte Zugänglichkeit humaner Gehirnbiosien sehr schwierig. Gehirngewebe von Patienten mit Epilepsie oder Gehirntumoren kann verwendet werden, wobei hier einerseits ethische Aspekte eine Rolle spielen und andererseits das Material auch mit krankheitsbedingt veränderten Zellen kontaminiert sein kann. Zudem ist die mit Hilfe humaner primärer Zellen aufgebaute Endothelzellbarriere durch niedrige TEER-Werte von lediglich ca. 400  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  geprägt (Rubin et al. 1991). Die meist genutzte humane BHS-Endothelzelllinie ist die Linie hCMEC/D3. Deren Eigenschaften, wie die Verstärkung der physikalischen Barriere und erhöhte Expression von ABC- und SLC-Transportern, sind durch die Kultivierung der hCMEC/D3 unter dynamischen Flussbedingungen und Einfluss von Scherstress in Hohlfaserkapillar- und Mikrofluidikmodellen verbessert und den physiologischen *in vivo*-Werten angepasst worden (Cucullo et al. 2008; Griep et al. 2013).

Durch das gesteigerte Wissen über die BHS-Physiologie und die Verbesserung der Zellkulturtechniken, werden immer komplexere Modelle mit dem Ziel entwickelt, eine möglichst verlässliche Aussage

über die Permeabilität von Medikamenten zu gewinnen. Da bisher aber noch kein Standardmodell etabliert worden ist, sind die Hauptfaktoren, die über die Wahl des Modells entscheiden, die Kosten und die Zeit, die für dessen Aufbau benötigt werden, die Qualität der Ergebnisse, die erzielt werden können und die Analyseziele, die verfolgt werden sollen (Vastag und Keseru 2009).

In neuen vielversprechenden Studien werden zum Aufbau von humanen *in vitro*-BHS-Modellen Stammzellen eingesetzt. Zum Beispiel werden humane induziert pluripotente Stammzellen (hiPSCs) und adulte Stammzellen, wie hämatopoetischen Stammzellen (Cecchelli et al. 2014) genutzt, um BHS-Zellen daraus zu differenzieren und BHS-Modelle für Hochdurchsatzuntersuchungen bereitzustellen. Durch den Einsatz von Stammzellen soll auch die Standardisierbarkeit der humanen BHS-Modelle erhöht werden. Im Gegensatz zum Einsatz von embryonalen Stammzellen ist das Arbeiten mit hiPSCs auch ethisch bedenkenlos. Endothelzellen mit BHS-Eigenschaften, *in vivo*-ähnlichen TEER-Werten von bis zu  $4500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und hohen *in vivo*-Korrelationen der Medikamentenpenetration können ebenso aus Stammzellen generiert werden, wie alle anderen Zelltypen der neurovaskulären Einheit (Lippmann et al. 2012; Lippmann et al. 2013; Lippmann et al. 2014; Wilson et al. 2015).

### 1.3 Stammzellen

Der Einsatz von Stammzellen zur Regeneration von Zellen und Geweben im Bereich der regenerativen Therapien eröffnet ein riesiges therapeutisches Potential. Die Behandlung von Rückenmarksverletzungen, Herzinfarkt, Diabetes, Amyotropher Lateralsklerose (ALS), Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und MS, sind nur einige Beispiele (Fortier 2005; Feng und Gao 2012).

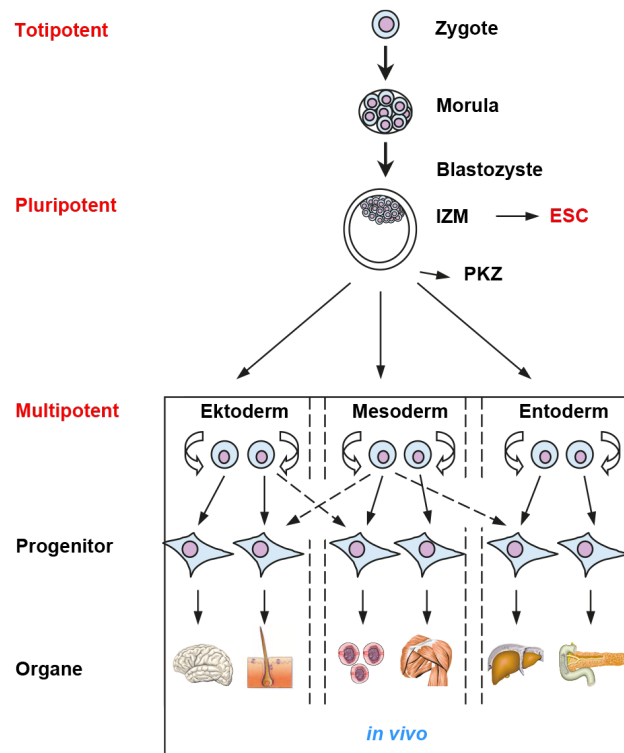
Stammzellen sind definiert als undifferenzierte Zellen mit der Kapazität zur Selbsterneuerung durch obligatorische asymmetrische Replikation, bei der sich eine zur Originalstammzelle identische Mutterzelle und eine differenzierte Tochterzelle bei der Stammzellteilung bildet, oder stochastische Differenzierung. Hier entstehen bei der Teilung einer Stammzelle zwei differenzierte Tochterzellen und eine andere Stammzellen produziert durch Mitose zwei dem Original identische Stammzellen. Weiterhin besitzen Stammzellen das Potential, in gewebespezifische, spezialisierte Zelltypen zu differenzieren (Fortier 2005).

Die Klassifikation von Stammzellen kann anhand ihres Potentials erfolgen. So werden drei Klassen von Stammzellen voneinander unterschieden: Totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen.

Eine totipotente Stammzelle ist dazu in der Lage, einen gesamten Organismus zu generieren. Die Zygote und sehr frühe Zellteilungsstadien des Blastomers, bis hin zum 8-Zellstadium der Morula sind durch Totipotenz charakterisiert (Wobus und Boheler 2005).

Pluripotente Stammzellen hingegen haben die Kapazität, alle Gewebe der embryonalen Keimblätter zu bilden, hierzu zählen das Ento-, Ekto- und Mesoderm. Außerdem können sie die primordialen Keimzellen (PKZ) bilden. Im Blastozystenstadium haben nur die Zellen der inneren Zellmasse diese Fähigkeit. *In vitro* kultivierte embryonale Stammzellen, isoliert aus der inneren Zellmasse der Blastozyste, besitzen ebenfalls die Fähigkeit in alle somatischen Zellarten und in die Zellen der Keimbahn zu differenzieren (Wobus und Boheler 2005).

Multipotente Stammzellen sind hingegen nur noch in der Lage eine begrenzte Untergruppe von



**Abbildung 6: Stammzellhierarchie**

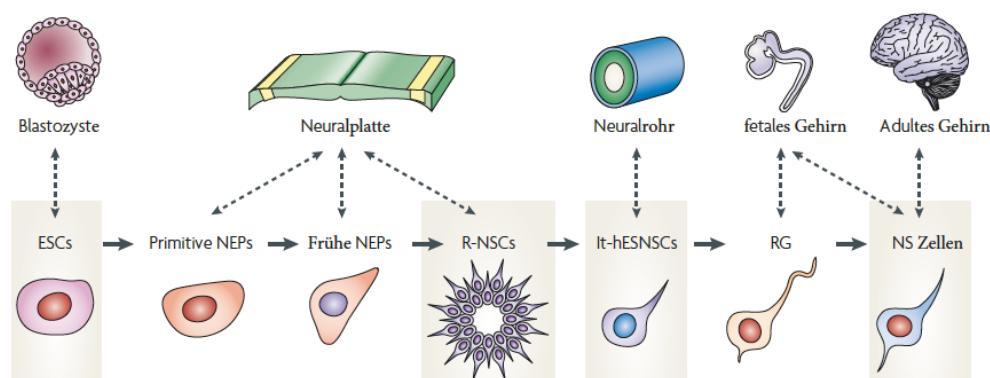
Hinsichtlich des Potentials werden Stammzellen in totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen klassifiziert. Die Embryonalen Stammzellen (ESCs) der inneren Zellmasse (IZM) des Blastozystenstadiums sind in der Lage alle drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm), sowie die primordialen Keimzellen (PKZ) zu bilden. Im adulten Gewebe existieren multipotente Stammzellen und Progenitorzellen, die zur Erhaltung der Organe und Gewebe beitragen. Adaptiert und modifiziert nach (Wobus und Boheler 2005).

Zellen unterschiedlicher Abstammungen hervorzubringen (Fortier 2005). Im adulten Organismus existieren neben den multipotenten Stammzellen auch Progenitorzellen, um das Gewebe zu erhalten und so verloren gegangene sowie verletzte Zellen zu ersetzen (Wobus und Boheler 2005).

Abhängig vom Entwicklungsstadium, in dem sie generiert werden, lassen sich Stammzellen auch allgemeiner in embryonale und adulte Stammzellen unterteilen.

Zu den adulten Stammzellen zählen alle Stammzellen, die nicht embryonalen, sondern postnatalen Ursprungs sind (Fortier 2005). Die unter Plastizität der Stammzellen definierte Fähigkeit von adulten Stammzellen in Zellen anderer Linien zu transdifferenzieren ist in ihrer genauen Funktion noch nicht geklärt (Wobus und Boheler 2005). Jedoch scheint die Funktion von Stammzellen dynamischer und plastischer zu sein, als bisher angenommen. Adulte Stammzellen sind nicht nur dazu in der Lage linienspezifisch Gewebe zu regenerieren, sie migrieren auch über die Zirkulation in andere Organe und bilden dort je nach Bedarf und Mikroumgebung organspezifische, differenzierte Zellen aus oder unterstützen die dort existierende Stammzellenpopulation (Blau et al. 2001). Die bestcharakterisierten adulten Stammzellen sind die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Sie sind mesodermalen Ursprungs, regenerieren Blutzellen (Narasipura et al. 2008) und sind Grundlage für Knochenmarkstransplantationen, die in der Klinik seit Jahren routinemäßig durchgeführt werden (Bellantuono 2004). Weiterhin treten in vielen anderen adulten Organen und Geweben Stammzellen auf, es werden z. B. mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark, Stammzellen

in der Haut, hepatische Stammzellen, Skelettmuskelstammzellen, Stammzellen im Herzmuskel und neurale Stammzellen (NSCs) beschrieben. NSCs sind dazu in der Lage, extensiv Zellteilung und Selbsterneuerung zu betreiben (Gage 2000). Zudem migrieren sie in geschädigte Gehirnbereiche zu deren Regeneration (Blau et al. 2001). Das Differenzierungspotential neuraler Stammzellen in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten konnte *in vitro* und auch *in vivo* nach der Transplantation von NSCs in das Gehirn demonstriert werden (Gage 2000; Yan et al. 2013; Reinhardt et al. 2013). Im adulten Gehirn von Säugern existieren zwei spezialisierte Nischen, in denen multipotente NSCs generiert werden. Diese sind die subventrikuläre Zone der Seitenventrikelwand und die Subgranularzone des Gyrus dentatus (Conti und Cattaneo 2010). NSCs stammen von Radialen Gliazellen ab und im postnatalen Gehirn werden sie in astrozytenähnliche NSCs umgewandelt. Im embryonalen Gehirn hingegen treten je nach Entwicklungsstadium verschiedene Arten von NSCs auf. Zu diesen zählen die neuroepithelialen Progenitoren (NEPs) der Neuralplatte, welche aus dem Neuroektoderm gebildet werden und für die erste Phase der Neurogenese im Neuralrohr verantwortlich sind. Im weiteren Verlauf entwickeln sich aus ihnen die RG und die basalen Progenitoren (BP). RG stellen den Hauptzelltyp im sich entwickelnden Gehirn dar und sind nicht nur neurale Progenitoren, sondern stehen ebenfalls als Gerüst zur Migration von neu entwickelten Neuronen zur Verfügung. RG weisen ein kleineres Differenzierungspotential als NEPs auf, nur Teilgruppen sind tripotent und somit in der Lage Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu generieren. BP werden in frühen Entwicklungsstadien aus NEPs und in späteren aus RG generiert. *In vitro* können die frühen NEPs nicht kultiviert werden, sie bilden spontan rosettenähnliche Strukturen aus und stellen somit eine Population im späten Stadium der NEPs dar (R-NSC). Unter EGF- und bFGF-Stimulation können *in vitro* über eine lange Kulturzeit selbsterneuerbare und stabile NSCs kultiviert werden, sie werden als lt-hESNSCs (engl. *SOX1-positive self-renewing hESC-derived NEPs*) bezeichnet (Conti und Cattaneo 2010).



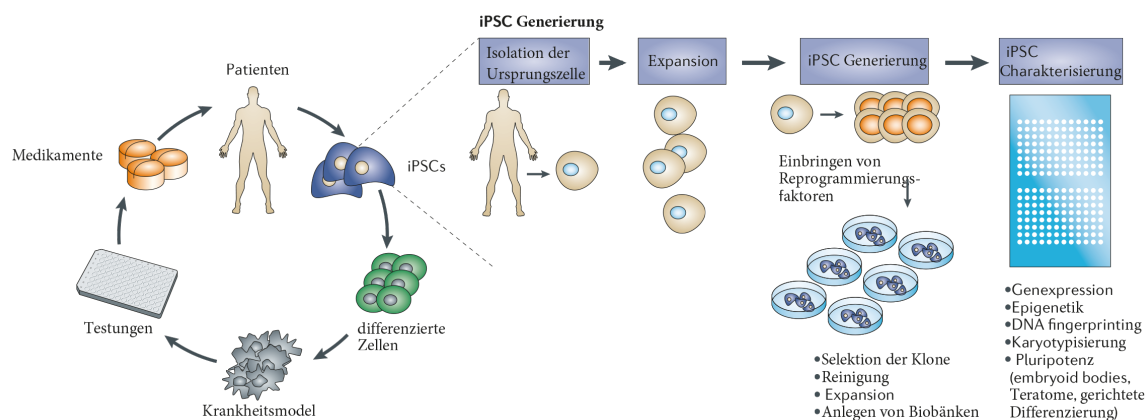
**Abbildung 7: Übersicht über die Subpopulationen neuraler Stammzellen**

Neurale Stammzellen können ausgehend von den unterschiedlichen Entwicklungsstadien im sich entwickelnden Embryo aus der Neuralplatte (NEPs) oder dem Neuralrohr (lt-hESNSCs) isoliert werden. Auch aus dem fetalen und adulten Gehirn lassen sich NSCs isolieren und unter *in vitro*-Bedingungen kultivieren. Die schattierten Boxen markieren NSC-Typen, welche *in vitro* expandiert werden können. Adaptiert und modifiziert nach (Conti und Cattaneo 2010).

Humane Embryonen erreichen das Blastozystenstadium, in dem sie aus 50 bis 150 Zellen bestehen, etwa vier bis fünf Tage nach der Fertilisation. In dieser frühen Embryonalentwicklung können embryonale Stammzellen (ESCs) aus der inneren Zellmasse der Blastozyte isoliert werden. Merkmale

humaner ESCs sind die Expression von Transkriptionsfaktoren, wie OCT3/4, NANOG und SOX2 (Boyer et al. 2005), die Telomeraseaktivität und die Teratombildung, inklusive der Ausbildung von Zellen aller drei Keimblätter, in immungeschwächten Mäusen (Wobus und Boheler 2005). Weiterhin kann ihr proliferatives Potential über mehrere Passagen erhalten werden und sie behalten ihren normalen Karyotyp auch nach dem Klonieren (Amit et al. 2000). Im Vergleich zu murinen ESCs exprimieren sie auch Proteoglykane, wie TRA1-60 (*keratan sulfate antigen*) und TRA1-81, sowie unterschiedliche Subtypen phasenabhängiger Antigene, wie SSEA3 (*stage specific embryonic antigen*) und SSEA4 (Wobus und Boheler 2005). hESCs werden auf Feederzellen kultiviert, zum Einsatz kommen sowohl murine als auch humane Fibroblasten. Im Vergleich zu mESCs haben sie eine niedrigere mittlere Verdopplungszeit von 12 bis 15 h. mESCs benötigen im Mittel 30 bis 35 h (Amit et al. 2000).

Mit der Verwendung von ESCs in der Therapie und Transplantation gehen einige Probleme einher, wie deren zufällige Differenzierung, Tumorbildung *in vivo* und ungewollte Immunreaktionen auf Gewebetransplantate aus ESCs (Wu et al. 2007). Des Weiteren sind mit der Verwendung von hESCs weitreichende ethische Debatten verbunden. Eine Alternative stellt in diesem Zusammenhang die Verwendung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) dar.



### Abbildung 8: Nutzung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen zur Medikamentenentwicklung

Aus einem Patienten gewonnene Zellen werden zur Generierung von hiPSCs genutzt. Diese Zellen werden nach deren Charakterisierung und Expansion in Zellen differenziert, die eine entscheidende Rolle für die zu untersuchende Krankheit spielen. Entscheidende Aspekte der Krankheit werden *in vitro* simuliert und führen zur Entstehung eines Krankheitsmodells, an dem die Medikamententestungen und -optimierungen erfolgen können. Diese neu entwickelten oder optimierten Medikamente können nun zur Therapie von Patienten eingesetzt werden. Adaptiert und modifiziert nach (Grskovic et al. 2011).

Im Jahr 2012 erhielt Shinya Yamanaka den Nobelpreis für seine Entwicklung, dass reife Zellen durch Reprogrammierung wieder die Pluripotenz erlangen können. Zusammen mit Kazutoshi Takahashi gelang es ihm 2006 erstmalig mit Hilfe von vier pluripotenzassoziierten Genen, den Yamanaka Faktoren Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4, murine Fibroblasten zu reprogrammieren (Takahashi und Yamanaka 2006). Unabhängig voneinander konnten in mehreren Laboren 2007 stabile miPSCs durch retrovirale Reprogrammierung generiert werden, die Nanog als selektiven Pluripotenzmarker zur Selektion der reprogrammierten Zellen eingesetzt hatten (Okita et al. 2007; Wernig et al. 2007; Maherli et al. 2007). Ein Nachteil, den auch die Verwendung von hiPSCs bei der Transplantation

hervorrufen können, ist die Tumorentstehung, denn c-Myc und auch Klf4 sind onkogen. Durch das Ersetzen der beiden Onkogene, z. B. mit Hilfe von NANOG und LIN28 sowie die Verwendung von Lentiviren kann die Tumorbildung eingeschränkt werden (Yu et al. 2007).

Neben der viralen Genübertragung durch Retro- oder Lentiviren ist es weiterhin möglich nichtvirale Methoden, wie Plasmide oder Transposon-basierte Systeme, einzusetzen. Verglichen mit den viralen Methoden ist deren Transduktionseffizienz allerdings sehr niedrig. Mit Hilfe von nicht-integrativen Adenoviren konnten auch schon erste erfolgreiche Experimente durchgeführt werden. Die Integration von Genen in das Genom der Wirtszellen ist allerdings mit dem Risiko von Insertionsmutagenesen und Tumorentwicklung verbunden. Um diese Probleme zu umgehen wurden transgenfreie Reprogrammierungsmethoden basierend auf Sendai Viren oder der direkten Übertragung von mRNA bzw. Proteinen, entwickelt (Bayart und Cohen-Haguenaer 2013).

hiPSCs können genutzt werden, um den Phänotyp verschiedener genetischer Krankheiten zu untersuchen, zu denen unter anderem auch Morbus Parkinson, Chorea Huntington, spinale Muskelatrophie (SMA), Schizophrenie und das Rett-Syndrom zählen (Grskovic et al. 2011). Durch Isolation von Zellen eines betroffenen Patienten und Generation von patientenspezifischen hiPSCs können z. B. Krankheitsmodelle *in vitro* aufgebaut werden. Hierzu werden die hiPSCs in die Zellen differenziert, welche von der Krankheit betroffen sind und anschließend genutzt, um neue Medikamente zu testen und zu entwickeln.

Auf dem Weg zur Zulassung von Medikamenten scheitern die meisten Substanzen in klinischen Untersuchungen aufgrund von Toxizität und Wirksamkeitsdefiziten (Kola und Landis 2004), obwohl sie zuvor an Tieren oder Zelllinien getestet worden sind (Lippmann et al. 2013). Einer der Gründe liegt in den unzureichend qualifizierten Modellen, die momentan in der präklinischen Forschung eingesetzt werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Zellen sowie Zelllinien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene hiPSC-Linien, der Klon IMR90-4 der Firma WiCell und die Linie ARiPS, welche von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Edenhofer der Universität Würzburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie zur Verfügung gestellt wurde, zum Einsatz. IMR90 ist eine

**Tabelle 1:** Übersicht über die verwendeten Zellen und Biopsien zur Zellisolation.

Biopsie, Zellen	Hersteller/Lieferant, Bestellnummer	Referenznummer Ethikantrag J.-M.-Universität Würzburg
IMR90-4	WiCell (USA), iPS(IMR90 (Klon (4)), Lot: iPS(IMR90)-4-DL-01	—
ARiPS	Universität Würzburg (D), Institut für Anatomie und Zellbiologie, AG Prof. Dr. Edenhofer	—
HUVEC	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH (D), FC-0003	—
humane fetale Astrozyten	Pelobiotech GmbH (D), PB-TSC-1800-5	—
humane fetale Perizyten	Pelobiotech GmbH (D), PB-TSC-1200	—
humane Tumorbiopsien	Universitätsklinikum Würzburg (D), Neurochirurgie, Prof. Dr. med. C. Matthies	182/10
fetale Gehirnbopsien	Universitätsklinikum Würzburg (D), Frauenklinik, Dr. med. Tanja Stüber	151/14

Lungenfibroblastenzelllinie, welche aus einem 16 Wochen alten weiblichen, kaukasischen Fötus isoliert wurde und u. a. auch bei ATCC (*american type culture collection*) erhältlich ist. Diese fetalen Lungenfibroblasten wurden 2007 an der Universität von Wisconsin in der Arbeitsgruppe von J. A. Thomson durch lentivirale Transduktion zu hiPSC reprogrammiert. Hierbei wurden die humanen ES-Gene OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 in das Genom der Zielzellen eingebracht. Klon 4 weist allerdings keine Integration des Gens LIN28 auf (Yu et al. 2007). IMR90-4-Zellen haben eine Populationsverdopplungszeit von  $17,1 \pm 2,4$  h (Yu et al. 2007) und wurden ab einer Passagenzahl von p18+34(9) verwendet. Diese Passagenzahl bedeutet, dass die Linie IMR90 für 18 Passagen bis zur Reprogrammierung kultiviert wurde, dann wurden die Zellen für 33 Passagen nach der Transformation kultiviert, wobei sie hierbei für 9 Passagen unter feederfreien Bedingungen in mTeSR<sup>TM</sup>1 und Matrigel<sup>TM</sup> gezüchtet wurden. WiCell addierte noch +1 dazu, somit entspricht die Passagenzahl auf den gekauften Kryoröhrchen genau der Passage der Zellen nach dem Auftauen.

Die zweite hiPSC-Linie ARiPS wurde durch Kadari et al. aus humanen Fibroblasten einer Hautbiopsie eines 24-jährigen männlichen Patienten generiert, deren Transduktion unter Verwendung eines Cre-exzidierbaren konstitutiven polycistronischen Lentivirus als Vektor mit anschließender

TAT-Cre Behandlung und PCR zur Entfernung der eingesetzten Transgene erfolgte (Kadari et al. 2014).

Weiterhin kamen primäre, fetale Astrozyten und Perizyten der Firma PELOBiotech sowie die humane Endothelzelllinie HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) als Kontrolllinie zum Einsatz.

In ersten Pilotstudien erfolgte die Isolation primärer BHS-Zellen aus tumorösen Gehirnbiospien. Die Biospien wurden nach schriftlicher Einwilligung der Patienten sowie der Zustimmung zur Studie nach den Anforderungen der zuständigen Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Referenznummer 182/10) von Prof. Dr. med. Matthies, Neurochirurgie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht über die für die Untersuchungen verwendeten Gehirnbiospien ist in Tabelle 2 dargestellt. Neurale Stammzellen wurden aus humanen fetalen Ge-

**Tabelle 2:** Übersicht über die Gehirnbiospien, die zur Isolation humaner primärer Zellen zum Einsatz kamen mit zugehörigen Spenderdaten (Abkürzungen: AKN - Akustikusneurinom, NF1 - Neurofibromatose Typ 1, NF2 - Neurofibromatose Typ 2, VIII. Hirnnerv - Nervus vestibulocochlearis, k. A. - keine Angaben).

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
Biopsienummer	W1	W2	W3	W4
Gehirnregion	VIII. Hirnnerv	k. A.	VIII. Hirnnerv	Kleinhirn
Pathologie	AKN	NF1	AKN	NF2 Schwanom
Spenderalter [a]	56	25	58	37
Geschlecht [w/m]	w	m	m	w
Versuchsdatum	31.07.2012	09.08.2012	04.10.2012	27.02.2013

hirnen nach Interruptionen in der 11. oder 12. Schwangerschaftswoche isoliert. Die Präparation erfolgte nach schriftlicher Einwilligung sowie der Zustimmung zur Studie nach den Anforderungen der zuständigen Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Referenznummer 151/14) und wurden von Dr. med. Stüber zur Verfügung gestellt.



## 2.2 Kits

**Tabelle 3:** Zusammenstellung der verwendeten Kits.

Kit (Verwendung)	Bestandteile	Hersteller/Lieferant, Bestellnr.
Alkalischer Phosphatase Detektionskit (Pluripotenz von hiPSC, Vorhandensein von alk. Phosphatase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Fast Red Violet-Lösung (0,8 g/l)</li> <li>– Naphthol AS-BI Phosphat-Lösung (4 mg/ml) in AMP-Puffer (2 mol/l), pH 9,5</li> </ul>	Merck Millipore (D), SCR004
BD Cytofix/ Cytoperm Fixation/ Permeabilization Kit (FACS-Färbung)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– BD Perm/Wash™ Buffer (100 ml)</li> <li>– Fixation/Permeabilization solution (125 ml)</li> </ul>	BD Biosciences (D), 554714
cDNA-iScript Kit (cDNA-Synthese)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– 5 × Reaktionsmix für die Reverse Transkription</li> <li>– iScript reverse Transkriptase</li> <li>– nukleasefreies Wasser</li> </ul>	Bio-Rad Laboratories GmbH (D), 170-8891
DC Protein Assay (Western Blot)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Reagenz A (250 ml)</li> <li>– Reagenz B (200 ml)</li> <li>– Reagenz S (5 ml)</li> <li>– Proteinstandard</li> </ul>	Bio-Rad Laboratories GmbH (D), 500-0116
RNeasy Micro Kit (mRNA-Isolation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Auffanggefäße (1,5 ml)</li> <li>– Auffanggefäße (2,0 ml)</li> <li>– Carrier RNA, poly-A</li> <li>– RDD-Puffer</li> <li>– RLT-Puffer</li> <li>– RNase-freie DNase I (lyophilisiert)</li> <li>– RNase-freies Wasser</li> <li>– RNeasy MinElute® Spin Columns (je in einem 2,0 ml Collection Tube)</li> <li>– RPE-Puffer (Konzentrat)</li> <li>– RW1-Puffer</li> </ul>	QUIAGEN (D), 74004
SsoFast EvaGreen Supermix (RT-qPCR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– 2 × Realtime PCR-Mix enthält:</li> <li>– dNTPs</li> <li>– EvaGreen Farbstoff</li> <li>– MgCl<sub>2</sub></li> <li>– Sso7d fusion Polymerase</li> <li>– Stabilisatoren</li> </ul>	Bio-Rad Laboratories GmbH (D), 172-5202
WesternBright Chemiluminescence substrat Quantum (Western Blot)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Detection-Reagenz 1</li> <li>– Detection-Reagenz 2</li> </ul>	Biozym (D), 541015

## 2.3 Antikörper

**Tabelle 4:** Übersicht über die verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Lieferant, Bestellnr.	Isotyp
<b>Primärantikörper - extrazellulär</b>				
CD105-PE	Maus	1:10	Beckman Coulter (D), A07414	IgG3,k
CD31-APC	Maus	1:20	eBioscience (D), 17-0319-41	IgG1,k
PDGFR $\beta$ -PE (CD140b)	Maus	1:10	BD Pharmingen (D), 558821	IgG2a
SSEA4-PE	Maus	1:25	BD Pharmingen (D), 560128	IgG3,k
TIE2	Maus	1:100	Abcam (UK), ab24859	IgG1 (III)
TRA1-60-PE	Maus	1:25	BD Pharmingen (D), 560193	IgM
TRA1-81-PE	Maus	1:25	BD Pharmingen (D), 560161	IgM
<b>Primärantikörper - intrazellulär</b>				
GFAP-PE	Maus	1:10	BD Pharmingen (D), 561483	IgG2b
GLUT1	Maus	1:50	ThermoFisher Scientific GmbH (D), MA1-37783	Sekundärantikörper (III)
NANOG	Kaninchen	1:25	Abcam (UK), ab80892	Sekundärantikörper (I)
OCT3/4-PE	Maus	1:25	BD Pharmingen (D), 560186	IgG1
SOX2-FITC	Ratte	1:25	eBioscience (D), 53-9811-82	IgG2a
VEGFR2	Kaninchen	1:100	Abcam (UK), ab2349	Sekundärantikörper
vWF	Kaninchen	1:100	Abcam (UK), ab9378	Sekundärantikörper (II)
<b>Sekundärantikörper</b>				
anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Esel	1:100 (I)	ThermoFisher Scientific GmbH (D), A-21206	
anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Esel	1:400 (II)	ThermoFisher Scientific GmbH (D), A-21206	
anti-Maus Alexa Fluor 647	Esel	1:25 (III)	ThermoFisher Scientific GmbH (D), A-31571	
<b>Isotypkontrollen</b>				
IgG1-PE	Maus	1:25	Beckman Coulter (D), A07796	
IgG2a-FITC	Ratte	1:25	eBioscience (D), 53-4321-80	
IgG3,k-PE	Maus	1:25	BD Pharmingen (D), 559926	
IgM-PE	Maus	1:25	BD Pharmingen (D), 555584	
IgG2b-PE	Maus	1:25	BD Pharmingen (D), 555058	
IgG2a-PE	Maus	1:10	Miltenyi Biotec GmbH (D), 130-091-835	
IgG1,k-APC	Maus	1:20	eBioscience (D), 17-4714-42	
IgG1	Maus	1:100	Dako Deutschland GmbH (D), X0931	

**Tabelle 5:** Übersicht über die Antikörper, welche für die Immunfluoreszenzfärbung genutzt wurden.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller, Bestellnummer
<b>Primärantikörper</b>			
$\alpha$ SMA	Maus	1:100	Abcam (UK), ab139382
CD31	Kaninchen	1:50	Abcam (UK), ab24590
CDH5-FITC	Maus	1:50	eBioscience (D), 53-1449
GFAP	Kaninchen	1:100	Dako Deutschland GmbH (D), Z 0334
GLUT1	Maus	1:200	Abcam (UK), ab40084
NANOG	Kaninchen	1:150	Abcam (UK), ab80892
NESTIN	Maus	1:400	Merck Millipore (D), MAB5326
NG2	Maus	1:200	Abcam (UK), ab83508
OCT3/4	Ziege	1:100	Abcam (UK), ab27985
PAX6	Kaninchen	1:50	Abcam (UK), ab5790
PDGFR $\beta$	Kaninchen	1:100	Abcam (UK), ab32570
S100 $\beta$	Maus	1:100	Abcam (UK), ab66028
SOX1	Kaninchen	1:200	Abcam (UK), ab109290
SOX2	Kaninchen	1:50	Abcam (UK), ab137385
SSEA4	Maus	1:100	STEMCELL Technologies (D), 60062
TIE2	Maus	1:25	Abcam (UK), ab24859
TRA1-60	Maus	1:250	Abcam (UK), ab16288
TRA1-81	Maus	1:33	STEMCELL Technologies (D), 60065
vWF	Kaninchen	1:100	Abcam (UK), ab9378
ZO1	Kaninchen	1:100	Proteintech (UK), 21773-1-AP
<b>Sekundärantikörper</b>			
anti-Kaninchen Alexa Fluor 555	Esel	1:400	ThermoFisher Scientific GmbH (D), A-31572
anti-Kaninchen Alexa Fluor 647	Esel	1:400	ThermoFisher Scientific GmbH (D), A-31573
anti-Maus Alexa Fluor 555	Esel	1:400	ThermoFisher Scientific GmbH (D), A-31570
anti-Maus Alexa Fluor 647	Esel	1:400	ThermoFisher Scientific GmbH (D), A-31571
anti-Ziege Alexa Fluor Cy <sup>TM</sup> 3	Esel	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories (UK), 705-165-147

**Tabelle 6:** Übersicht über die Antikörper, welche für die Western Blot Analyse genutzt wurden.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller, Bestellnummer
<b>Primärantikörper</b>			
$\beta$ -Aktin	Maus	1:1000	New England Biolabs GmbH (D), 3700P
Claudin 1	Kaninchen	1:1000	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 71-7800
Claudin 3	Kaninchen	1:100	Merck Millipore (D), ABT43
Claudin 4	Maus	1:100	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 32-9400
Claudin 5	Kaninchen	1:500	Abcam (UK), ab15106
Occludin	Maus	1:1000	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 33-150
<b>Sekundärantikörper</b>			
Peroxidase anti-Maus	Ziege	1:10000	Jackson ImmunoResearch (USA), 115-035-146
Peroxidase anti-Maus	Schaf	1:5000	GE Healthcare Europe GmbH (D), NA9310-1ml
Peroxidase anti-Kaninchen	Ziege	1:10000	Jackson ImmunoResearch (USA), 111-035-144

## 2.4 Primer

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Primer wurden mit Hilfe der Primer Depot Software (<https://primerdepot.nci.nih.gov>) entworfen und über die Firmen ThermoFisher Scientific GmbH (D) sowie Eurofins Genomics (D) bezogen.

**Tabelle 7:** Übersicht über die eingesetzten Primer.

Primer	NCBI-Nummer	Primersequenz	Effizienz [%]
ABCB1	NM_000927.4	F: TGA ATC TGG AGG AAG ACA TGA C R: CCA GGC ACC AAA ATG AAA CC	124,8
CDH5	NM_001130861.1 NM_003277.3	F: CAT CTT CCC AGG AGG AAC AG R: AGA GCT CCA CTC ACG CTC AG	100,5
CLDN1	NM_021101.4	F: CCG TTG GCA TGA AGT GTA TG R: AAG GCA GAG AGA AGC AGC AG	100,0
CLDN3	NM_001306.3	F: AAG GTG TAC GAC TCG CTG CT R: AGT CCC GGA TAA TGG TGT TG	110,4
CLDN4	NM_001305.4	F: CGC ATC AGG ACT GGC TTT ATC TC R: CAG CGC GAT GCC CAT TA	97,7
CLDN5	NM_001130861.1 NM_003277.3	F: GAG GCG TGC TCT ACC TGT TT R: GTA CTT CAC GGG GAA GCT GA	97,5
EEF1A1	NM_001402-5	F: AGG TGA TTA TCC TGA ACC ATC C R: AAA GGT GGA TAG TCT GAG AAG C	95,2
GAPDH	NM_002046	F: TGA CGC TGG GGC TGG CAT TG R: GCT CTT GCT GGG GCT GGT GG	94,3
NANOG	NM_024865	F: ATG GAG GAG GGA AGA GGA GA R: GAT TTG TGG GCC TGA AGA AA	101,5
OCLN	NM_001205255.1 NM_001205254.1 NM_002538.3	F: TAC ACA ACT GGC GGC GAG TCC R: AAT CTG CAG ATC CCT TCA CTT GC	103,7
PECAM1	NM_000442.4	F: GAG TAT TAC TGC ACA GCC TTC A R: AAC CAC TGC AAT AAG TCC TTT C	103,7
POU5F1	NM_203289	F: GGT TCT CGA TAC TGG TTC GC R: GTG GAG GAA GCT GAC AAC AA	99,2
RPL4	NM_000968	F: GCC TGC TGT ATT CAA GGC TC R: GGT TGG TGC AAA CAT TCG GC	103,0
RPL6	NM_000970.3 NM_001024662.1	F: ATT CCC GAT CTG CCA TGT ATT C R: TAC CGC CGT TCT TGT CAC C	99,4
SCL1A1	NM_004170.5	F: GTT ATT CTA GGT ATT GTG CTG G R: CTG ATG AGA TCT AAC ATG GC	112,2
SCL2A1	NM_006516	F: GGC ATT GAT GAC TCC AGT GTT R: ATG GAG CCC AGC AGC AA	96,9
SOX2	NM_003106	F: GCT TAG CCT CGT CGA TGA AC R: AAC CCC AAG ATG CAC AAC TC	103,4
TEK	NM_001290078.1 NM_001290077.1 NM_000459.4	F: CCT ACT GCG GGA TGA CTT GT R: GCA AAT GAT GGC CTC TCA TAA	100,9

## 2.5 Chemikalien

**Tabelle 8:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller/Lieferant, Bestellnummer
Accutase	Sigma-Aldrich (D), A6964-100ML
Aceton	Carl Roth (D), 5025.5
Advanced DMEM/F-12	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 12634
Agarose	Biozym (D), 840004
AM Basalmedium	Pelobiotech GmbH (D), PB-TCS-1801
Antikörper-Verdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (D), ALI20R500
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich(D), M3148-25ML
B-27-Supplement	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 17504-044
B-27-Supplement ohne Vitamin A	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 12587010
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth (D), A512.1
BSA	Carl Roth (D), 8076.3
Calibrator A Bio	Roche Diagnostics (D), 06 682 189 001
Celecoxib	AGES (A), -
CHIR99021	Biomol GmbH (D), Cay13122-5
CNTF	R & D Systems GmbH (D), 257-NT-050
Control A Level 1 Bio	Roche Diagnostics (D), 06 682 197 001
Control A Level 2 Bio	Roche Diagnostics (D), 06 682 227 001
Control A Level 3 Bio	Roche Diagnostics (D), 06 682 545 001
Cytofix/Cytoperm™ solution	BD Bioscience (D), 554722
D-Glukose	Sigma-Aldrich (D), G8270
DAPI	Sigma-Aldrich(D), D8417-5MG
Dapi-Fluoromount G	Biozol Diagnostica (D), 0100-20
dbcAMP	Sigma-Aldrich (D), D0260-25MG
ddH <sub>2</sub> O	Biochrom GmbH (D), L 0020
Descosept AF	nerbe plus GmbH (D), 142984
Diazempam	AGES (A), -
Diclofenac	Fährhaus Pharma (D), Ch-B: FD00124D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (D), D2438-50ML
Dispase	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 17105-041
DMEM/F-12 + Glutamax	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 31331-028
DMEM/F12 ohne L-Glutamin	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 11330-057
DNA Exitus Plus	A. Hartenstein GmbH (D), CD10
DNA-Leiter Plus, 100 bp, inkl. 6x Ladepuffer	VWR (D), PEQL25-2020
DTI (Defined Trypsin Inhibitor)	ThermoFisher Scientific GmbH (D), R-007-100
EDTA	Sigma-Aldrich (D), E5134-1kg
EDTA, pH8, 0,5 M	AppliChem GmbH (D), A4892,0100
EGF	PeproTech (D), AF-100-15
Endothelial-SFM	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 11111-044
Entellan	Merck Millipore (D), 107960
Eserserum	Biozol Diagnostica (D), ECL-ECS0217D
Essigsäure, 100 %	Sigma-Aldrich (D), A6283-100ML-D
Ethanol, 100 %	Sigma-Aldrich (D), 32205-4X2.5L-GL
Ethanol, 96 %	Carl Roth (D), K928.4
FcR Blocking Reagenz, anti human	Miltenyi Biotec GmbH (D), 130-059-901
FCS	Bio & SELL GmbH (D), FCS.ADD.0500
Fibronektin	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 33016-015

**Tabelle 8:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien. (*Fortsetzung*)

Chemikalie	Hersteller/Lieferant, Bestellnummer
Fibronektin, murin	Sigma-Aldrich (D), L2020-1MG
FITC Ac-LDL	ThermoFisher Scientific GmbH (D), L-23380
FITC-Dextran 4 kDa	Sigma-Aldrich(D), 46944-100MG-F
FITC-Dextran 40 kDa	Sigma-Aldrich(D), FD40S-100MG
Fluoreszein-Na	Sigma-Aldrich(D), F6377-100G
Fungizone	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 15240-062
GelRed™	Genaxxon bioscience GmbH (D), M3199.0500
Glutaraldehydlösung, 25 %	Sigma-Aldrich(D), G5882-100ML
Glycerol	Sigma-Aldrich(D), M6145-25ML
Glycin	Sigma-Aldrich(D), 3908.3
hbFGF	PeptoTech (D), 100-18B
humanes Serum	—
Ibuprofen-Na	Sigma-Aldrich(D), I1892
Incidin Plus	Ecolab Deutschland GmbH (D), 30 115 20
KnockOut™ Serum Replacement (KO-Serum)	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 10828-028
Koffeine	Acros (Fisher Scientific GmbH (D)), 10816500
Kollagen IV	Sigma-Aldrich (D), C5533-5MG
Kollagenase NB4	SERVA Electrophoresis GmbH (D), 17454.01
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (D), G7513-100ML
Laminin	Sigma-Aldrich (D), L6274
Loratadine	Apin Chemicals (UK), 31979d
Lucifer Yellow	Sigma-Aldrich(D), L0259-25MG
Matrigel, hESC-qualifiziert	BD Bioscience (D), 354277
Matrigel, wachstumsfaktorreduziert	BD Bioscience (D), 354230
MEM NEAA	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 11140-035
Methanol	Sigma-Aldrich (D), 32213-2,5L
Mini-Protean TGX Gel, 4 bis 16 % SDS	Bio-Rad, 456-1083
Milchpulver	Carl Roth (D), T145.3
mTeSR™ 1 Complemente Kit	STEMCELL Technologies (D), 05850
N-2 Supplement	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 17502-048
NaCl	Carl Roth (D), HN00.3
Na-Propofolat-HPBCD	CycloLab Ltd. (H), —
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich(D), D6750-25G
NaF	Sigma-Aldrich(D), S7920-100G
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich(D), S6508-10G
NucBlue Live ReadyProbes	ThermoFisher Scientific GmbH (D), R37605
Pefabloc SC PLUS	Sigma-Aldrich(D), 11873601001
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 15140122
Platelet-Poor Plasma Derived Serum, bovin	Alfa Aesar (ThermoFisher (Kandel) GmbH (D)), J64483
PM Basalmedium	Pelobiotech GmbH (D), PB-TSC-1201
Poly-L-Ornithin, 0,01 %	Sigma-Aldrich (D), P4957-50ML
Poly-L-Lysine-Beschichtung, 10 mg/ml	Pelobiotech GmbH (D), PB-TSC-0413
Propofol® Lipuro 10 mg/ml	Fresenius Kabi Austria GmbH (A), —
Propofol-HPBCD	CycloLab Ltd. (H), —
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich (D), 5892791001
PSC-Neurales-Induktions-Medium	ThermoFisher Scientific GmbH (D), A1647801
Puromycin	ThermoFisher Scientific GmbH (D), ANT-PR-1

**Tabelle 8:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien. (*Fortsetzung*)

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller/Lieferant, Bestellnummer</b>
Reinstwasser	Universitätsklinikum Würzburg, LS für Tissue Engineering & Regenerative Medizin
Retinsäure	Sigma-Aldrich (D), R2625-500MG
Rhodamin 123	Sigma-Aldrich(D), 83702-10MG
RNase Exitus Plus	A. Hartenstein GmbH (D), CR10
Roti-Histofix 4 %	Carl Roth (D), P087.2
Saponin	Carl Roth (D), 9622.1
SDS	Carl Roth (D), CN30.3
Supplementmix für AM-Medium	Pelobiotech GmbH (D), PB-TCS-1852
Supplementmix für PM-Medium	Pelobiotech GmbH (D), PB-TCS-1252
Theophyllin	Acros (Fisher Scientific GmbH (D)), 250312500
Tissue-Tec O.C.T.	LabArt UG & Co. KG (D), 4583
TRIS base	Sigma-Aldrich (D), 6066-5KG
TRIS-HCl	Carl Roth (D), 9090.1
Triton-X 100	Carl Roth (D), 3051.2
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich (D), T8154-100ML
Trypsin-EDTA 10x	Sigma-Aldrich (D), 59418C-100ML
Tween 20	VWR (D), 8.221.840.500
VascuLife VEGF-Mv Endothelial Complete Kit	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH (D), LL-0005
VE-Wasser	Universitätsklinikum Würzburg, LS für Tissue Engineering & Regenerative Medizin
VEGF	New England Biolabs GmbH (D), 8065
Y27632 (ROCK-Inhibitor)	Sigma-Aldrich (D), Y0503-1MG

## 2.6 Medien, Puffer und Lösungen

**Tabelle 9:** Übersicht über die verwendeten Medien.

Medium	Komponenten	Mixtur	Bemerkungen
Astrozytenmedium	– AM Basalmedium	500 ml	Komponenten mischen, bei 4°C lagern
	– AGS (astrocyte growth supplement)	5 ml	
	– FBS	10 ml	
	– PenStrep	5 ml	
EC-Medium	– Endothelial-SFM	99 %	Komponenten mischen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
	– Platelet-Poor Plasma Derived Serum, bovin	1 %	
	– hbFGF (optional)	20 ng/ml	Stocklösung 1:5000 verdünnen
	– RA (optional)	10 µM	Stocklösung 1:1000 verdünnen
Einfriermedium Astrozyten, Perizyten	– zellspezifisches Kulturmedium	80 %	
	– FCS	10 %	
	– DMSO	10 %	
Einfriermedium (hiPS-ECs, hiPSCs)	– KO-Serum	90 %	
	– DMSO	10 %	
Einfriermedium NSCs	– KO-Serum	65 %	
	– NSC-Medium	25 %	
	– DMSO	10 %	
Medium für humane, adulte Astrozyten (Tumorbiopsien)	– DMEM/F-12 + Glutamax	88 %	Komponenten mischen, bei 4°C lagern
	– FCS	10 %	
	– PenStrep	1 %	
	– Fungizone	1 %	
	– EGF	20 ng/ml	frisch zugeben
mTeSR <sup>TM</sup> 1	– mTeSR <sup>TM</sup> 1-Basalmedium	80 %	Supplement aliquotiert bei -20 °C lagern, gemischt 2 Tage verwendbar
	– mTeSR <sup>TM</sup> 1-Supplement	20 %	
N2-Medium	– DMEM/F-12 + Glutamax		
	– N-2 Supplement	1 %	
	– PenStrep	1 %	
	– FCS	4 %	optional
	– CNTF	10 ng/ml	optional
	– EGF	10 ng/ml	optional
	– dbcAMP	500 µM	optional
N2B27-Medium	– DMEM/F-12	50 %	Basalmedien 1:2 mischen Supplemente zugeben
	– Neurobasalmedium	50 %	
	– N-2 Supplement	1:200	
	– B-27-Supplement ohne Vitamin A	1:100	
	– PenStrep	1 %	
	– L-Glutamin	2 mM	
	– hbFGF	10 ng/ml	
	– EGF	10 ng/ml	



**Tabelle 9:** Übersicht über die verwendeten Medien. (*Fortsetzung*)

Medium	Komponenten	Mixtur	Bemerkungen
NSC- Expansionsmedium	– Neurobasalmedium	49 %	Komponenten mischen, bei 4°C lagern
	– Advanced DMEM/F-12	49 %	
	– Neuralinduction-Supplement	2 %	
NSC-Medium	– DMEM/F-12 + Glutamax		Komponenten frisch mischen
	– CHIR99021	0,8 µM	
	– D-Glukose	1 %	
	– hbFGF	10 ng/ml	
	– EGF	10 ng/ml	
	– B-27-Supplement	0,1 %	
	– N-2 Supplement	1 %	
Perizytenmedium	– PM Basalmedium	500 ml	Komponenten mischen, bei 4°C lagern
	– PGS (pericyte growth supplement)	5 ml	
	– FBS	10 ml	
	– PenStrep	5 ml	
PSC-Neurales- Induktions-Medium	– Neurobasalmedium	500 ml	Supplement aliquotiert bei -20 °C lagern, frisch gemischt verwenden
	– Neuralinduction-Supplement	10 ml	
unkonditioniertes Medium	– DMEM/F12 ohne L-Glutamin	78,5 %	Komponenten mischen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
	– KO-Serum	20 %	
	– MEM NEAA	1 %	
	– L-Glutamin	1 mM	
	– β-Mercaptoethanol	0,1 mM	
VascuLife	– VascuLife Basalmedium	475 ml	Komponenten mischen, bei 4°C lagern
	– rh bFGF	5 ng/ml	
	– Ascorbinsäure	50 µg/ml	
	– Hydrocortison Hemisuccinat	1 µg/ml	
	– L-Glutamin	10 mM	
	– rh IGF-1	15 ng/ml	
	– rh EGF	5 ng/ml	
	– rh VEGF	5 ng/ml	
	– Heparinsulfat	0,75 U/ml	
	– FBS	5 %	

Tabelle 10: Zusammenstellung der verwendeten Puffer.

Puffer	Komponenten	Mixtur	Hersteller/Lieferant, Bestellnummer	Bemerkungen
10 × BD Perm/Wash-Puffer	—	—	BD Bioscience (D), 554723	in VE-Wasser 1:10 verdünnen
FACS-Puffer	PBS FCS EDTA	500 ml 1 % 2 mM	— — —	Komponenten mischen, bei 4 °C lagern
Glutaraldehydlösung, gepuffert, 0,1 %	Glutaraldehyd 25 % PBS	40 µl 9,96 ml	— —	Glutaraldehyd lichtgeschützt bei Raumtemperatur auftauen
Glutaraldehydlösung, gepuffert, 2,5 %	Glutaraldehyd, 25 % PBS	1 ml 9 ml	— —	Glutaraldehyd lichtgeschützt bei Raumtemperatur auftauen
Ladepuffer, 5 ×	TRIS base SDS Glycerol Bromphenolblau Na-Salz β-Mercaptoethanol	1,5 M 2 % 10 % 0,01 % 5 %	— — — — —	—
Lyse-Puffer (Western Blot)	TRIS-HCl, pH6,8 NaCl EDTA Glycerol Triton-X 100 SDS Natriumdeoxycholat Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> NaF Pefabloc Proteaseinhibitor	10 mM 100 mM 1 mM 10 % 1 % 0,1 % 0,5 % 2 mM 50 mM 50 µg/ml 1 Tabl/ml	— — — — — — — — — —	mischen, kalt verwenden
Lyse-Puffer (PCR)	RLT-Puffer β-Mercaptoethanol	1 ml 10 µl	— —	Komponenten mischen, frisch verwenden
PBS (pH = 7,2)	—	—	ThermoFisher Scientific GmbH (D), 20012-019	—
PBS mit MgCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub>	—	—	Sigma-Aldrich (D), D8662	—

Tabelle 10: Zusammenstellung der verwendeten Puffer. (Fortsetzung)

Puffer	Komponenten	Mixtur	Hersteller/Lieferant, Bestellnummer	Bemerkungen
PBS/EDTA 0,54 mM	PBS	500 ml	—	—
	EDTA, 0,54 M	500 µl	—	—
SDS-Laufpuffer, 10x	TRIS base	250 mM	—	—
	Glycin	1,9 M	—	—
	SDS	1,5 %	—	—
TBS-Puffer	TRIS base	50 mM	—	—
	NaCl	150 mM	—	—
TBST-Puffer	TBS-Puffer	99,9 %	—	—
	Tween-X 100	0,1 %	—	—
TEA-Puffer, 50x	TRIS base	242 g	—	vor Gebrauch 1:50 mit VE-Wasser verdünnen
	Essigsäure, 100 %	57,1 ml	—	
	EDTA, pH8, 0,5 M	100 ml	—	
Transferpuffer, 10x	Glycin	192 mM	—	in 1x Transferpuffer 20 % Methanol zugeben
	TRIS base	25 mM	—	
Waschpuffer (Immunfluoreszenz)	PBS	—	—	—
	Tween 20	0,5 %	—	—

Tabelle 11: Zusammenstellung der verwendeten Lösungen.

Lösung	Komponenten	Mixtur	Bemerkungen
Blocklösung (FACS, intrazellulär)	1 × BD Perm/Wash-Puffer Eselserum	95 % 5 %	—
Blocklösung (FACS, Oberflächenantigene)	FcR-BLOCK FACS-Puffer	1 µl 80 µl	—
Blocklösung (Immunfluoreszenz)	Eselserum Triton-X 100 Sapinin PBS	5 % 0,10 % 0,02 % 94,88 %	—
Celecoxib, 50 mM	Celecoxib Ethanol	19,07 mg/ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 100 µM verwenden (1:500 in Endothelial-SFM)
CHIR99021, 10 mM	CHIR99021 DMSO	5 mg 1,075 ml	lösen, bei -20 °C lagern, in einer finalen Konzentration von 0,8 µM im Medium verwenden (1:12500)
CNTF, 10 µg/ml	CNTF PBS + 0,1 % BSA	10 µg 1 ml	lösen, aliquetieren, bei -80 °C lagern, in einer finalen Konzentration von 10 ng/ml (1:1000) im Medium einsetzen
D-Glukose-Lösung	D-Glukose DMEM/F-12 + Glutamax	160 mg/ml	lösen, sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
DAPI, 10 mg/ml	DAPI Reinstwasser	10 mg 1 ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 2 µg/ml verwenden (1:5000 in PBS)
dbcAMP, 500 mM	dbcAMP Reinstwasser	100 mg 407,332 µl	lösen, aliquetieren, bei -80 °C lagern, in einer finalen Konzentration von 500 µM (1:1000) im Medium einsetzen
Diazepam, 100 mM	Diazepam DMSO	28,5 mg/ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 100 µM verwenden (1:1000 in Endothelial-SFM)
Diclofenac, 100 mM	Diclofenac DMSO	31,81 mg/ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 100 µM verwenden (1:1000 in Endothelial-SFM)
Dispase-Lösung	Dispase-2 DMEM/F-12 ohne L-Glutamin	2 mg/ml	lösen, sterilfiltrieren, frisch verwenden

Tabelle 11: Zusammenstellung der verwendeten Lösungen. (Fortsetzung)

Lösung	Komponenten	Mixtur	Bemerkungen
DNA-Leiter, 100 bp	DNA-Leiter Plus Loading buffer, 6 × ddH <sub>2</sub> O	100 µl 150 µl 750 µl	mischen, 100 µl Aliquots bei -20 °C lagern, 10 µl pro Spur verwenden
EGF, 100 µg/ml	EGF PBS + 0,1 % BSA	100 µg 1 ml	lösen, aliquotieren, bei -20 °C lagern
Essigsäure, 50 mM	100 % Essigsäure VE-Wasser	1,429 ml 498,571 ml	—
70 %-Ethanol zum Sterilisieren der TEER-Elektrode	96 % EtOH VE-Wasser	73 % 27 %	—
70 %-Ethanol zur RNA-Isolation	100 % EtOH ddH <sub>2</sub> O	70 % 30 %	—
80 %-Ethanol zur RNA-Isolation	100 % EtOH ddH <sub>2</sub> O	80 % 20 %	—
Fibronektin-Lösung, 0,5 mg/ml	Fibronektin Reinstwasser	5 mg 10 ml	lösen, bei -20 °C lagern
FITC Ac-LDL, 10 µg/ml	FITC Ac-LDL, 1 mg/ml zellspezifisches Medium	1:100	—
FITC-Dextran 4 kDa, 10 µM	Endothelial-SFM FITC-Dextran 4 kDa	15 ml 0,6 mg	lösen, über Amicon Ultra-15, 3K-Filter aufreinigen (30 min, 4000 × g), Überstand auf 15 ml auffüllen
FITC-Dextran 40 kDa, 10 µM	Endothelial-SFM FITC-Dextran 40 kDa	15 ml 6 mg	lösen, über Amicon Ultra-15, 3K-Filter aufreinigen (30 min, 4000 × g), Überstand auf 15 ml auffüllen
Fluoreszein-Na, 1 mM	Endothelial-SFM Fluoreszein-Na	0,377 mg/ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 10 µM verwenden (1:100 in Endothelial-SFM)
hbFGF, 100 µg/ml	hbFGF PBS + 0,1 % BSA	25 µg 250 µl	lösen, aliquotieren, bei -20 °C lagern
Ibuprofen-Na, 100 mM	Ibuprofen-Na Reinstwasser		lösen, in einer finalen Konzentration von 100 µM verwenden (1:1000 in Endothelial-SFM)

Tabelle 11: Zusammenstellung der verwendeten Lösungen. (Fortsetzung)

Lösung	Komponenten	Mixtur	Bemerkungen
Koffeine, 100 mM	Koffeine Reinstwasser	19,4 mg/ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 100 $\mu$ M verwenden (1:1000 in Endothelial-SFM)
Kollagen IV-Lösung, 1 mg/ml	Essigsäure, 50 mM Kollagen IV	5 ml 5 mg	lösen, bei $-20^{\circ}\text{C}$ lagern
Kollagen IV/ Fibronektin-Beschichtung	Fibronektin-Lösung (0,5 mg/ml) Kollagen IV-Lösung (1 mg/ml) Reinstwasser	20 % 40 % 40 %	sterilfiltrieren, über Nacht bei $37^{\circ}\text{C}$ beschichten, 1x mit PBS waschen
Kollagenase/Dispase-Lösung	Dispase Kollagenase NB4	0,5 mg/ml 0,5 mg/ml	beides in PBS mit $\text{MgCl}_2$ , $\text{CaCl}_2$ lösen, mischen, bei $-20^{\circ}\text{C}$ lagern
Lagerlösung für TEER-Elektrode	Fungizone PBS PenStrep	1 % 98 % 1 %	1 Woche verwendbar
Loratadine, 100 mM	Ethanol Loratadine	38,3 mg/ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 100 $\mu$ M verwenden (1:1000 in Endothelial-SFM)
Lucifer Yellow, 1 mM	Endothelial-SFM Lucifer Yellow	0,457 mg/ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 10 $\mu$ M verwenden (1:100 in Endothelial-SFM)
Matrigel-Beschichtung (ARIPS)	DMEM/F-12 ohne L-Glutamin Matrigel, hESC-qualifiziert	25 ml 272 $\mu$ l	alle Lösungen eiskalt verwenden, auf 4x 6 well-Platten verteilen, 1 h bei Raumtemperatur beschichten, mit 1 ml DMEM/F-12 ohne L-Glutamin überschichten, bei $4^{\circ}\text{C}$ max. 10 Tage lagern
Matrigel-Beschichtung (Astrozytendifferenzierung)	DMEM/F-12 ohne L-Glutamin Matrigel, wachstumsfaktorreduziert	1:100	1 h bei Raumtemperatur beschichten, mit 1 ml DMEM/F-12 ohne L-Glutamin überschichten, bei $4^{\circ}\text{C}$ max. 10 Tage lagern
Matrigel-Beschichtung (IMR90-4)	DMEM/F-12 ohne L-Glutamin Matrigel, wachstumsfaktorreduziert	12 ml 0,5 mg	alle Lösungen eiskalt verwenden, auf 2x 6 well-Platten verteilen, 1 h bei Raumtemperatur beschichten, jedes Well mit 1 ml DMEM/F-12 ohne L-Glutamin überschichten, bei $4^{\circ}\text{C}$ max. 10 Tage lagern
Permeabilisierungslösung (Immunfluoreszenz)	PBS Triton-X 100	99,80 % 0,20 %	—

Tabelle 11: Zusammenstellung der verwendeten Lösungen. (Fortsetzung)

Lösung	Komponenten	Mixtur	Bemerkungen
Poly-L-Lysin-Beschichtung, 10 µg/ml	Poly-L-Lysine-Beschichtung, Reinstwasser	10 mg/ml 1:1000	1 h bei 37 °C beschichten, absaugen
Poly-L-Ornithin/ Fibronectin-Beschichtung	Fibronectin, 2 µg/cm <sup>2</sup> Poly-L-Ornithin, 0,01 %	1:50	1 ml PLO und 20 µl Fibronectin (1 mg/ml) mischen, 1 h bei 37 °C beschichten, absaugen
Poly-L-Ornithin/ Laminin-Beschichtung	Laminin PBS Poly-L-Ornithin	1 15 µg/ml µg/ml	beides in PBS verdünnen/lösen, sterilfiltrieren, getrennt voneinander für jeweils 2 h beschichten, zwischendurch je 3 × mit PBS waschen, Platten mit PBS überschichten, bei 4 °C lagern
Retinsäure, 10 mM (RA)	DMSO Retinsäure	30 ml 1 mg	lösen, sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern
Rhodamin 123, 100 mM	Endothelial-SFM Rhodamin 123	0,0381 mg/ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 100 µM verwenden (1:1000 in Endothelial-SFM)
Saponin, 10 %	Reinstwasser Saponin	1 ml 0,1 g	lösen, aliquetieren, bei -20 °C lagern, in einer finalen Konzentration von 0,02 % (1:500) einsetzen
Theophyllin, 100 mM	DMSO Theophyllin	18,02 mg/ml	lösen, in einer finalen Konzentration von 100 µM verwenden (1:1000 in Endothelial-SFM)
Trypsin-EDTA	PBS/EDTA 0,54 mM Trypsin-EDTA 10 ×	90 ml 10 ml	mischen, bei 4 °C lagern
VEGF, 100 µg/ml	PBS + 5 % FCS VEGF	100 µl 10 µg	in einer finalen Konzentration von 40 ng/ml Medium einsetzen (1:2500)
Y27632, ROCK-Inhibitor, 5 µM	Reinstwasser Y27632, ROCK-Inhibitor	625 µl 1 mg	lösen, bei -20 °C lagern
Y27632, ROCK-Inhibitor, 10 µM	Reinstwasser Y27632, ROCK-Inhibitor	312,5 µl 1 mg	lösen, bei -20 °C lagern

## 2.7 Verbrauchs- und Labormaterialien

**Tabelle 12:** Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
Alufolie	Carl Roth (D)
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device 3K	Merck Millipore (D)
Autoklavierbeutel	A. Hartenstein GmbH (D)
Blotting-Membran (Polyvinylidene Difluoride)	ROCHE Deutschland Holding GmbH (D), 03010040001
Cryo-Einbetttschälchen	A. Hartenstein GmbH (D)
Cryostatmesser	SLEE medical GmbH (D)
Deckgläser	Menzel-Gläser (D)
Descosept	Dr. Schumacher GmbH (D)
Einmalpipetten, Polystyrol	Greiner Bio-One (D)
FACS-Röhrchen	A. Hartenstein GmbH (D)
Fettstift	Dako Deutschland GmbH (D)
Fusselfreie Tücher	A. Hartenstein GmbH (D)
Glasblättchen (12-Well)	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (D)
Handschuhe Nitril	Medline International Germany GmbH (D)
Kryoröhrchen (1,5 ml)	ThermoFisher Scientific (D)
Luftfilter	Sartorius Stedim Biotech GmbH (D)
Mikropartikel CultiSphere	Sigma-Aldrich (D)
Multiwellplatten für Fluoreszenz, schwarz, flacher Boden	Greiner Bio-One (D)
Objektträger (Polysine)	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik (D)
Objektträger Histo-Bond	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik (D)
Parafilm	Sigma-Aldrich (D)
Pasteurpipetten, Glas	BRAND GMBH + CO KG (D)
PCR-Tubes	A. Hartenstein GmbH (D)
Petrischalen, unbeschichtet	Greiner Bio-One (D)
Pipettenspitzen, steril	Eppendorf AG (D)
QIAshredder Mini Spin Column	QUIAGEN (D)
qRT-PCR Folien	BioRad (D)
qRT-PCR Platten	BioRad (D)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG (D)
Reaktionsgefäße (5 ml)	Eppendorf AG (D)
Skalpellklingen	A. Hartenstein GmbH (D)
Spitzen (5 ml, 10 ml)	BD Biosciences (D)
Sterilfilter	ThermoFisher Scientific (D)
Transwell Polyester-Membran- Zellkultur-Inserts (Corning)	Sigma-Aldrich (D)
Whatmanpapier	Sigma-Aldrich (D)
Zellkultur-Multiwellplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well), (TPP)	Faust Lab Science (D)
Zellkultur-Multiwellplatten Nunclon Delta Surface	ThermoFisher Scientific (D)
Zellkulturflaschen, T75 (TPP)	Faust Lab Science (D)
Zellkulturschalen mit Glasboden (TC, 35 mm)	Greiner Bio-One (D)
Zellsieb, 40 µm	Greiner Bio-One (D)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	nerbe plus GmbH (D)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	nerbe plus GmbH (D)



**Tabelle 13:** Übersicht über die verwendeten Labormaterialien.

Labormaterial	Hersteller/Lieferant
Einfrühilfe Mr. Frosty	ThermoFisher Scientific (D)
Elektrode STX3	Merck Millipore (D)
Erlenmeyerkolben, Glas	VWR (D)
Gelgießvorrichtung und -tablett	VWR (D)
Gestell für FACS-Röhrchen	A. Hartenstein GmbH (D)
Gestell für Reaktionsgefäße	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (D)
Gestell für Zentrifugenröhrchen	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (D)
Impeller-Rührwelle	Bohlender GmbH (D)
Kühlblock für qRT-PCR, Iso Freeze <sup>®</sup>	A. Hartenstein GmbH (D)
Laborstativ	A. Hartenstein GmbH (D)
Metallwanne mit Deckel	Carl Roth (D)
Nanodrop-Messplatte	Tecan Deutschland GmbH (D)
Neubauer-Zählkammer	A. Hartenstein GmbH (D)
Petrischale, 5 cm, Glas	Mercateo AG (D)
Pinzetten	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG (D)
Rührfisch	A. Hartenstein GmbH (D)
Sensospots PSt3	preSens - Precision Sensing GmbH (D)
Skalpell	A. Hartenstein GmbH (D)
Standardkamm, 1 mm, 14 Zähne	VWR (D)
Stativklemmen	A. Hartenstein GmbH (D)

## 2.8 Laborgeräte

**Tabelle 14:** Zusammenstellung der verwendeten Laborgeräte.

<b>Laborgerät</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Absaugsystem Vacusafe	NTEGRA Biosciences Deutschland GmbH (D)
Abzug	Prutscher Laboratory Systems GmbH (A)
Biometra (Blottingkammer)	Analytik Jena AG (D)
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH (D)
Centrifuge 5424	Eppendorf AG (D)
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG (D)
CFX96 (RT-PCR)	BioRad (D)
Cryostat	Leica Biosystems Nussloch GmbH (D)
Durchflusszytometer (BD FACS Calibur)	BD Biosciences (D)
Eismaschine AF-80 (Scotsman)	HIBU Eismaschinen GmbH & Co.KG (D)
ERS-2	Merck Millipore (D)
Feinwaage	KERN & SOHN GmbH (D)
Fluor-Chem Q Imaging-Gerät	CellBiosciences (D)
Gefrierschrank $-20^{\circ}\text{C}$	Liebherr-International Deutschland GmbH (D)
Gefrierschrank $-80^{\circ}\text{C}$ (HERAFreeze)	ThermoFisher Scientific (D)
Glaspipetten-Reinigungsautomat (Hözel)	GEWO Feinmechanik GmbH (D)
Handzählgerät	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (D)
Heißluftsterilisator	Memmert GmbH + Co. KG (D)
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf AG (D)
Heraeus Pico 17 Centrifuge	ThermoFisher Scientific (D)
Inkubator	Universitätsklinikum Würzburg, LS für Tissue Engineering und Regenerative Medizin (D)
Kühlraum	Genheimer Kälte-Klima-Technik GmbH & Co.KG (D)
Laser-Scanning-Mikroskope TCS-SP8	Leica Microsystems GmbH (D)
Magnetrührer	VWR (D)
Mikroplattenleser Infinite M200	Tecan Deutschland GmbH (D)
Mikrowelle NN-E205W	Panasonic Deutschland (D)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (D)
Mikroskop BZ-9000 BIOREVO System	KEYENCE Deutschland GmbH (D)
Mini-PROTEAN Tetra Systems	BioRad (D)
Minizentrifugen	VWR (D)
Multifuge X1R	ThermoFisher Scientific (D)
Orbitalschüttler KM-2 AKKU	Edmund Bühler GmbH (D)
PCR Thermocycler, SensQuest	BioRad (D)
PCR-Abzug Captair bio	erlab (D)
Pipetten	Eppendorf AG (D)
Pipettierhilfe	BRAND GMBH + CO KG (D)
Reinstwasseranlage	Merck Millipore (D)
Rotationsschüttler	VWR (D)
PefectBlue Gelsystem Mini M	VWR (D)
Power Supply Electrophoresis EC 100	VWR (D)
Rührreaktor	Universitätsklinikum Würzburg, LS für Tissue Engineering und Regenerative Medizin (D)
Septophag	Hesse Thermoformung GmbH (D)
Sicherheitswerkbank, Klasse II	ThermoFisher Scientific (D)
Spülmaschinen	Miele & Cie. KG (D)
Stickstofftank: MV 815 P-190 ( $-180^{\circ}\text{C}$ )	Jutta Ohst german-cryo GmbH (D)

**Tabelle 14:** Zusammenstellung der verwendeten Laborgeräte. (*Fortsetzung*)

<b>Laborgerät</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Tecnoklav	biomedis Laborservice GmbH (D)
Thermocycler 48	SensoQuest GmbH (D)
Thermocycler SensQuest	BioRad (D)
Tischautoklav	Systec GmbH (D)
Transilluminator	Vilber Lourmat Deutschland GmbH (D)
Varioklav	HP Medizintechnik GmbH (D)
Vortexer	Carl Roth (D)
Wärmeschrank	Medite GmbH (D)
Wasserbad	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG (D)
Wippschüttler KM-2 AKKU	Edmund Bühler GmbH (D)

## 2.9 Software

**Tabelle 15:** Übersicht über die verwendete Software.

<b>Software</b>	<b>Version</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
BioRad CFX Manager	3.0	qRT-PCR (CFX96)	BioRad (D)
Faulhaber Motion Manager	05.02.00	Ansteuerung des Motors am Rührreaktor	Faulhaber (D)
FlowJo	vX.0.7	Auswertung der FACS-Messungen	FlowJo (USA)
Fluor-Chem Q	V3.2.2.2.0	Bildaufnahme der Western Blot Gele	CellBiosciences (D)
geNorm	V3.5	Untersuchung der Expressionsstabilität der Housekeepinggene	Center for Medical Genetics, Ghent University (BEL)
GraphPad Prism 6	6.07	Erstellung von Diagrammen	GraphPad Software, Inc. (D)
Keyence BZ II Analyzer	2.1	Bildbearbeitung	Keyence (D)
Keyence BZ II Viewer	2.1	Bildbearbeitung	Keyence (D)
LAS X	—	Bildbearbeitung	Leica Microsystems GmbH (D)
Photoshop	CS6 Extended	Bildbearbeitung, Maßstabsbalken in Bilder einfügen	Adobe (D)
R	3.2.2	Statistik	Comprehensive R Archive Network (CRAN) (A)
Tecan iconcontrol	2.11	Lumineszenz (Tecan infinite 200)	Tecan Deutschland GmbH (D)

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkulturtechniken

Die Durchführung aller in dieser Dissertation angewandten sterilen Arbeiten erfolgte in Sicherheitswerkbänken der Klasse II. Zudem wurden vor deren Gebrauch alle insterilen Lösungen sterilfiltriert sowie alle mehrfach verwendeten Materialien autoklaviert oder heißluftsterilisiert. Soweit nicht anders angegeben, diente ein Wasserbad zum Erwärmen aller Zellkulturmedien und -reagenzien auf 37 °C vor deren Verwendung. Die Kultivierung der Zellen fand in Brutschränken statt, welche eine relative Luftfeuchte von 95 %, eine konstante Temperatur von 37 °C sowie einen Kohlendioxidgehalt von 5 % gewährleisteten.

#### 3.1.1 Primärkultur humaner adulter Astrozyten und Endothelzellen

Vor der Isolation humaner Astrozyten erfolgte das Waschen der Gehirnbiospien in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*) mit 1 % Fungizone. Daraufhin wurde das Gewebe mit Hilfe eines Skalpells in sehr kleine Stücke mit einer Größe von ca. 1 × 1 cm geschnitten und anschließend durch ein Enzymgemisch, bestehend aus 0,5 mg/ml Kollagenase NB4 und 0,5 mg/ml Dispase, für 25 min bei 37 °C verdaut. Mechanisches Resuspendieren der Lösung mit Hilfe einer 1000 µl-Pipette unterstützte die Enzymbehandlung. Unter Verwendung eines 40 µm-Zellsiebes erfolgte die Trennung der enzymatisch gewonnenen Einzelzellen von den verbliebenen Gewebestücken. Beide wurden getrennt voneinander gewaschen und nach dem Zentrifugieren bei 200 × *g* in DMEM/F-12 + 10 % FCS + 1 % PenStrep + 1 % Fungizone + 20 ng/ml EGF auf Poly-L-Ornithin und Fibronectin beschichteten Zellkulturplatten ausgesät und kultiviert. Mit dem Ziel, Endothelzellen aus dem Gemisch der isolierten Gehirnzellen heraus zu reinigen, wurden ein Teil der isolierten Zellen in einer Zelldichte von 4·10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und über Nacht mit 4 µg/ml Puromycin in Vasculife® behandelt. Ein kompletter Medienwechsel erfolgte 24 h nach der Isolation der Zellen, um die toten Zellen aus der Kultur zu entfernen. In der weiterführenden Kultur der Zellen wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt, wobei hier darauf zu achten war, Gewebestücke, aus denen Zellen auswachsen sollten, nicht aus der Kulturflasche zu entfernen.

#### 3.1.2 Primärkultur von humanen fetalen Astrozyten und Perizyten

Humane fetale primäre Gehirn-Astrozyten und -Perizyten der Firma PELOBiotech dienten bis zu Passage 6 für die Versuche. Die Erhaltungskultur der Zellen erfolgte in mit 10 µg/ml Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturflaschen, welche vor der Verwendung für mindestens 1 h bei 37 °C beschichtet wurden. Entsprechend der Zellart fand Astrozytenwachstumsmedium oder Perizytenwachstumsmedium mit Supplementen in der Zellkultur Einsatz. Das Passagieren der Zellen erfolgte mit Hilfe von Accutase®, welche für 7 min inkubiert. Die Zellen wurden in einer Aussaatdichte von 6,7·10<sup>3</sup> bis 13,3·10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und alle zwei bis drei Tage mit frischem Medium versorgt.

### 3.1.3 Isolation humaner fetaler neuraler Stammzellen

Neurale Stammzellen wurden aus humanen fetalen Gehirnen (fNSCs) nach Interruptionen in der 11. oder 12. Schwangerschaftswoche isoliert. Nach dem Waschen des Gehirngewebes mit DMEM/F-12 + Glutamax<sup>TM</sup>-I mit 1 % Penicillin/Streptomycin (PenStrep) folgte die mechanische Zerkleinerung mit Hilfe eines sterilen Skalpells. Zur Gewinnung von Einzelzellen erfolgte der Enzymverdau des Gewebes für 10 bis 20 min mit Hilfe von Accutase<sup>®</sup> bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Das Homogenisieren mit Hilfe einer 1000 µl-Pipette alle 5 min, unterstützte die Gewebedissoziation mechanisch. Im Anschluss an das Zentrifugieren der Zelllösung für 5 min bei 200 × *g*, fand die Aussaat der Zellen in einer Dichte von 1·10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in neuralem Stammzellmedium auf Poly-L-Ornithin/Laminin-beschichteten Platten statt. Die Zellkulturplatten wurden vor der Verwendung getrennt voneinander mit 15 µg/ml Poly-L-Ornithin und 1 µg/ml Laminin in PBS für jeweils 2 h bei 37 °C beschichtet. Nach der Beschichtung erfolgte das 3-fache Spülen der Wells mit PBS sowie das Lagern der mit PBS überschichteten und mit Parafilm<sup>®</sup> verschlossenen Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlraum. Eine Behandlung der Zellen mit 10 µM Y27632 ROCK-Inhibitor in den ersten 24 h verhinderte die Apoptose der Zellen. Ein im zweitägigen Turnus durchgeführter Medienwechsel sorgte für die kontinuierliche Versorgung der Zellen mit Nährstoffen.

### 3.1.4 Kultivierung der Zelllinie HUVEC

Die Endothelzelllinie HUVEC wurde zur Charakterisierung der aus hiPSCs differenzierten Endothelzellen als Positivkontrolle herangezogen und adhärent wachsend in unbeschichteten Zellkulturflaschen kultiviert und mit VascuLife<sup>®</sup> versorgt. Ein Medienwechsel fand alle 2 bis 3 Tage statt und das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80 % wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben.

### 3.1.5 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Neubauerzählkammer und Trypanblaufärbung dienten zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität von Zellen nach der Isolation, vor dem Passagieren, Differenzieren oder Einfrieren. Die fetalen NSCs wurden hierfür mit Hilfe einer 5-minütigen Trypsininkubation bei 37 °C von den Zellkulturplatten abgelöst und vereinzelt. Zum Abstoppen der Enzymreaktion diente definierter Trypsininhibitor. Die primären humanen fetalen Astrozyten, Perizyten und HUVEC wurden unter Verwendung von Accutase<sup>®</sup> und einer Inkubationszeit von 5 min vereinzelt. Nach dem Zentrifugieren der Zellen bei 200 × *g* für 5 min und deren Aufnahme in zellspezifischem Medium erfolgte die Zellzählung. Hierzu wurde ein Aliquot von 20 µl der Zellsuspension entnommen und mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 gemischt. Es folgte das Überführen von 10 µl dieser Suspension in die vorbereitete Neubauerzählkammer und das Auszählen der Zellen aller Großquadrate einer Kammer. Durch die Färbung mit Trypanblau erscheinen tote Zellen im Mikroskop blau, während lebende Zellen weiß zu sehen sind, da ihre intakte Zellmembran sie vor dem Eindringen des Farbstoffes schützt. Da Trypanblau bei längerem Kontakt toxisch auf Zellen wirkt, war auf zügiges

Arbeiten zu achten. Folgende Formeln dienen zur Bestimmung der Zellzahlen:

$$\begin{aligned}\text{Lebendzellzahl} &= \bar{n}_l \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot V_{Susp} \\ \text{Gesamtzellzahl} &= (\bar{n}_l + \bar{n}_t) \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot V_{Susp}.\end{aligned}$$

Dabei ist  $\bar{n}_l$  das arithmetische Mittel der Lebendzellzahlen und  $\bar{n}_t$  das arithmetische Mittel der toten Zellen aller vier ausgezählten Großquadrate, der Faktor 2 berücksichtigt das Verdünnungsverhältnis durch das Trypanblau und der Faktor  $10^4$  stellt das Volumen der Zählkammer dar, weiterhin gibt  $V_{Susp}$  das Volumen der Zellsuspension an.

Die Vitalität ist das Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl, ausgedrückt in Prozent:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \cdot 100\%.$$

### 3.1.6 Einfrieren und Auftauen von primären Zellen

#### 3.1.6.1 Einfrieren primärer Zellen

Zum Einfrieren der primären Zellen wurden diese wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben abgelöst, gezählt und in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert sowie anschließend jeweils in 1 ml auf beschriftete Kryoröhrchen verteilt. Das Einfriermedium für die fetalen Astrozyten und Perizyten bestand zu 80 % aus zellspezifischem Kulturmedium, 10 % FCS und 10 % DMSO. Beim Einfrieren der NSCs hingegen wurden die Zellen aus jeweils einem Well einer 6-Wellplatte in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 65 % KO-Serum, 25 % NSC-Medium und 10 % DMSO, in ein Kryoröhrchen gegeben. Die mit Zellen gefüllten Kryoröhrchen lagerten für 24 h bei  $-80^\circ\text{C}$  in einer Einfrierhilfe. Die Temperaturabsenkung erfolgte hierbei definiert um 1 K/min, für die anschließende Langzeitlagerung der Zellen wurde ein Flüssigstickstofflagertank genutzt.

#### 3.1.6.2 Auftauen primärer Zellen

Zum Auftauen der primären Zellen lagerten die Kryoröhrchen unter leichtem Schwenken im  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad, bis nur noch ein kleiner Eiskristall zu erkennen war. Daraufhin wurde das Kryoröhrchen gründlich von außen desinfiziert, an der Luft getrocknet, die aufgetaute Zellsuspension mit Hilfe einer 1000  $\mu\text{l}$ -Pipette entnommen und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, welches mit 10 ml zellspezifischem Medium gefüllt war. Die Zellsuspension zentrifugierte bei  $200 \times g$  für 5 min, gefolgt vom Absaugen des Überstands und dem Resuspendieren der Zellen im gewünschten Volumen Zellkulturmedium. Die Aussaat der Astrozyten bzw. Perizyten eines Kryoröhrchens erfolgte in einer beschichteten T75-Zellkulturflasche. Die NSCs eines Kryoröhrchens wurden auf maximal zwei Wells einer 6-Wellplatte verteilt. Nach der homogenen Verteilung der Zellen durch leichtes Schwenken der Zellkulturgefäße erfolgte deren Kultivierung im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ .

### 3.1.7 Adhärenz Kultivierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen

Im folgenden Abschnitt wird die feederfreie, adhärenz Kultivierung der humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) der Linie IMR 90-4 beschrieben.

### 3.1.7.1 Matrigel™-Beschichtung

Zur Gewährleistung eines optimalen Adhäsions- und Kulturverhaltens der hiPSCs erfolgte die Beschichtung der Multiwellplatten (Nunc™ delta Surface) mit Hilfe von 0,5 mg Matrigel™ pro 6-Wellplatte. Alle Arbeiten mussten zügig durchgeführt werden, weil Matrigel™ bei Raumtemperatur geliert. Hierzu wurden 0,5 mg Matrigel™ auf Eis aufgetaut, mit 12 ml kaltem DMEM/F-12 ohne L-Glutamin in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen gemischt und jeweils in einem Volumen von 1 ml pro Well verteilt. Anschließend inkubierten die auf diese Weise beschichteten Platten mit geschlossenem Deckel für 1 h bei Raumtemperatur unter der Sicherheitswerkbank. Ein Austrocknen der Matrigel™-Beschichtung wurde vermieden, indem nach Ablauf der Inkubationszeit jedes Well der Multiwellplatte mit einem weiteren Milliliter DMEM/F-12 ohne L-Glutamin überschichtet und die Platte mit Parafilm® verschlossen bis zu deren Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt wurde. Die maximale Lagerzeit der so vorbereiteten Multiwellplatten betrug zehn Tage.

### 3.1.7.2 Medienwechsel der humanen induziert pluripotenten Stammzellen

Das zur Versorgung der hiPSCs eingesetzte Maximalmedium mTeSR™1 wurde immer frisch vor dem Gebrauch mit Supplementen versetzt und nach der Herstellung maximal für zwei Tage verwendet.

Nach der mikroskopischen Kontrolle der Zellen, zum Ausschluss der Notwendigkeit des Passagierens und der Dedifferenzierung der Zellen, erfolgte das Absaugen des verbrauchten Mediums mit einer Pasteurpipette. Hierbei war darauf zu achten, dass immer nur eine Pipette pro 6-Wellplatte zum Einsatz kam, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Danach wurden die Zellen jedes Wells mit 2 ml frischem mTeSR™1 Medium versorgt und die Inkubation im Brutschrank fortgesetzt.

Der Medienwechsel von hiPSCs erfolgte täglich im selben Zeitfenster von  $\pm 1$  h.

### 3.1.7.3 Enzymatisches Passagieren von humanen induziert pluripotenten Stammzellen

Das Passagieren der hiPSCs war nötig, um deren Zelldichte und Koloniegröße zu begrenzen. Bis zu einem Anteil von 10 % differenzierten Zellen in der Erhaltungszucht der hiPSCs war deren Selektion nicht nötig, was ein enzymatisches Passagieren erlaubte. Allerdings bestand bei Überschreitung dieses Richtwertes die Notwendigkeit, manuelle Methoden zu nutzen, um die differenzierten Zellen zu entfernen, wie das Entfernen durch Absaugen, Picken oder Auskratzen mit einer Tungsten-Nadel. Auch ein manuelles Passagieren der undifferenzierten Zellen konnte durchgeführt werden. Da diese manuellen Methoden in der Kultur der hiPSC-Linie IMR90-4 nicht erforderlich waren, wird im Folgenden auf deren Beschreibung verzichtet.

Zum enzymatischen Passagieren der hiPSCs wurde eine mit DMEM/F-12 ohne L-Glutamin frisch hergestellte Dispase-Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml verwendet, welche auf Raumtemperatur vorgewärmt war. Nach dem Absaugen des mTeSR™1 Mediums und dem Überschichten der Zellen mit 2 ml/Well Dispase-Lösung inkubierten diese für 7 min im Brutschrank. Im Anschluss wurden die Zellen mikroskopisch hinsichtlich ihres Ablöseverhaltens kontrolliert. Sobald sich die Kolonien an ihren Rändern vom Wellboden zu lösen begannen, der Rest der Kolonie aber noch adhärent war, konnte die Enzyminkubation durch Absaugen der Dispase-Lösung und dreimaliges vorsichtiges Spülen mit DMEM/F-12 ohne L-Glutamin gestoppt werden. Durch kräftiges Spülen der Zellen, unter Zuhilfenahme einer 1000  $\mu$ l-Pipette, mit jeweils 1 ml mTeSR™1 Medium pro Well

lösten sich diese vom Wellboden ab. Hierbei war darauf zu achten, dass je Well nicht öfter als fünfmal mit dem gleichen Medium gespült wurde, um ein zu starkes Vereinzeln der Kolonien oder gänzlichliches Vereinzeln der Zellen zu vermeiden. Die Kolonien lösten sich bei diesem Vorgang makroskopisch sichtbar vom Wellboden ab und wurden in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen gepoolt. Dieser Vorgang konnte ein- bis zweimal mit neuem mTeSR<sup>TM</sup>1 Medium wiederholt werden, bis alle Zellen geerntet waren. Die Aussaat der Zellen erfolgte in einem Splittverhältnis von 1:6 bis 1:12 auf neue mit Matrigel<sup>TM</sup> beschichtete 6-Wellplatten in jeweils 2 ml/Well mTeSR<sup>TM</sup>1 Medium. Der ROCK-Inhibitor Y27632 diente als Apoptoseinhibitor und kam für 24 h in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zum Einsatz. Eine homogene Verteilung und Adhäsion der Zellen im Well gewährleiste mehrfaches schnelles Bewegen der Platte zu jeder Seite. Weiterhin sollten Erschütterungen während des Adhärenzens der hiPSCs, z. B. durch unvorsichtiges Öffnen und Schließen der Inkubatortür, vermieden werden.

### 3.1.8 Suspensionskultur von humanen induziert pluripotenten Stammzellen

Für die Kultivierung der hiPSCs unter Suspensionsbedingungen fand die Zelllinie ARiPS Verwendung. Mit Hilfe einer 5-minütigen Accutase<sup>®</sup>-Behandlung wurden die Zellen aus der adhärennten Erhaltungszucht abgelöst, um anschließend in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml in die entsprechenden Suspensionsansätze eingebracht zu werden. Zum Einsatz kamen Suspensionsansätze in der Petrischale, im Erlenmeyerkolben und im Rührreaktor, welche mit der adhärennten Standardkultur in der 6-Wellplatte verglichen wurden. Die Kultivierung der Zellen im Rührreaktor fand bei 70 rpm in einem Inkubator ohne Feuchtigkeitsregelung statt. Ein homogenes Durchmischen der Suspensionen in den anderen, nicht adhärennten, Ansätzen gewährleiste deren Kultivierung auf einem Orbitalschüttler im Brutschrank bei 95 % Luftfeuchtigkeit. Der Gasaustausch im Rührreaktor erfolgte passiv über zwei am Deckel befindliche Luftfilter. Die Deckel der anderen Ansätze waren im Gegensatz zum Rührreaktor nicht dicht verschlossen, sondern nur aufgelegt, wodurch auch hier ein Gasaustausch möglich war. In Tabelle 16 sind die unterschiedlichen Kulturarten zusammengefasst und hinsichtlich des Reaktionsvolumens und der Umdrehungszahlen miteinander verglichen. Nach

**Tabelle 16:** Übersicht über die verschiedenen Kulturansätze für das Up-Scaling der Kultur der humanen induziert pluripotenten Stammzellen, deren Kulturbedingungen und das Kulturvolumen.

Ansatz	Kulturbedingung	Volumen	Umdrehungen
		[ml]	[rpm]
6-Wellplatte, adhärennt	statisch	2	0
Petrischale	dynamisch, Orbitalschüttler	8	75
Erlenmeyerkolben	dynamisch, Orbitalschüttler	50	120
Rührreaktor	dynamisch, Impeller-Rührer	200	70

der Aussaat der Zellen wurden diese für 24 h mit 10  $\mu$ M Y27632 ROCK-Inhibitor versorgt. Der Medienwechsel erfolgte erstmalig nach 24-stündiger Kultur der Zellen und im weiteren Verlauf der 6-tägigen Kultivierung der Zellen alle zwei Tage. Eine 10-minütige Sedimentation der Zellen bei 37 °C diente zur Vermeidung des versehentlichen Absaugens von Zellaggregaten. Die Suspension



aus der Petrischale und dem Erlenmeyerkolben wurden hierfür in Zentrifugenröhrchen überführt, der Motor des Rührreaktors hingegen ausgeschaltet und die Sedimentation setzte direkt im Glasgefäß des Reaktors ein. Anschließend erfolgte bei allen Suspensionsansätzen das Ersetzen von  $\frac{7}{8}$  des Medienvolumens.

### **3.1.9 Einfrieren und Auftauen von humanen induziert pluripotenten Stammzellen**

#### **3.1.9.1 Einfrieren von humanen induziert pluripotenten Stammzellen**

Der Einfriervorgang der hiPSCs begann, wie in Abschnitt 3.1.7.3 beschrieben, mit dem Ablösen und 5-minütigen Zentrifugieren bei  $200 \times g$ . Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet vorsichtig in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 90 % KO-Serum und 10 % DMSO, je abgelöstem Well resuspendiert, um ein zu starkes Vereinzeln und Zerkleinern der Stammzellkolonien zu vermeiden. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein vorbereitetes und beschriftetes Kryoröhrchen pipettiert und lagerten für 24 h bei  $-80^\circ\text{C}$  in einer Einfrierhilfe. Die Temperaturabsenkung erfolgte hierbei definiert um 1 K/min, zur anschließenden Langzeitlagerung der Zellen diente ein Flüssigstickstofflagertank.

#### **3.1.9.2 Auftauen von humanen induziert pluripotenten Stammzellen**

Die hiPSCs die Kryoröhrchen tauten unter leichtem Schwenken im  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad auf, bis nur noch ein kleiner Eiskristall zu erkennen war. Nach der folgenden gründlichen Desinfektion der Kryoröhrchen von außen, trockneten diese kurz an der Luft. Die aufgetaute Zellsuspension wurde mit Hilfe einer 1000  $\mu\text{l}$ -Pipette entnommen und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt sowie langsam und tropfenweise mit 10 ml mTeSR<sup>TM</sup>1 Medium verdünnt, um den osmotischen Schock auf die Zellen zu reduzieren. Die Zellsuspension zentrifugierte bei  $200 \times g$  für 5 min, gefolgt vom Absaugen des Überstandes und dem Resuspendieren der Zellen im gewünschten Volumen mTeSR<sup>TM</sup>1 Medium mit 10  $\mu\text{M}$  Y27632 ROCK-Inhibitor. Je nach Pelletgröße und gewünschter Aussaatdichte, wurde ein Verteilen der hiPSCs aus einem Kryoröhrchen auf 4 Wells einer Matrigel<sup>TM</sup>-beschichteten 6-Wellplatte als geeignete Aussaatdichte identifiziert. Das Endvolumen nach der Aussaat betrug 2 ml/Well und die Zellen verteilten sich durch vorsichtiges Kippen der Platte in alle Richtungen gleichmäßig im Well. Hierbei sollten das Rotieren der Platte, welches ein Ansammeln der Zellen in der Wellmitte begünstigt, und starke Erschütterungen vermieden werden. Die Zellen inkubierten im Brutschrank für 24 h bis zum nächsten Medienwechsel und dem Entfernen des Apoptoseinhibitors.

## **3.2 Differenzierung humaner induziert pluripotenter und multipotenter Stammzellen**

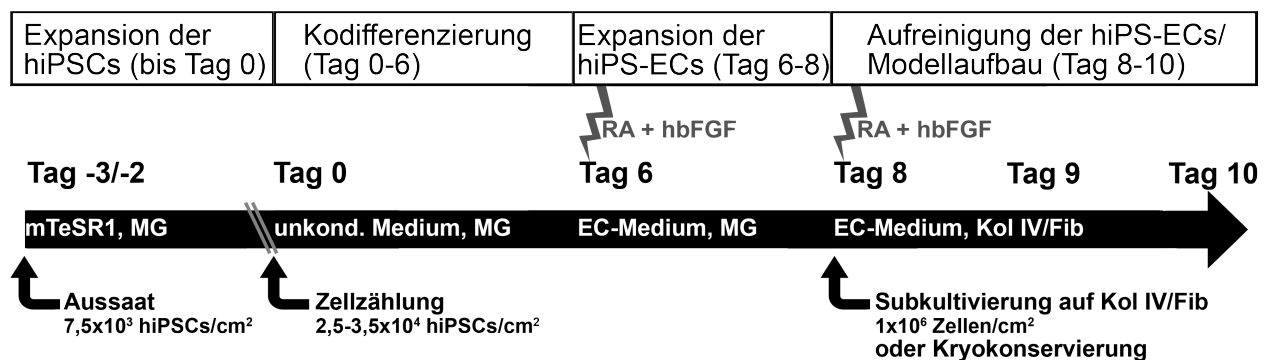
### **3.2.1 Ablösen und Vereinzeln der adhärennten humanen induziert pluripotenten Stammzellen und neuralen Stammzellen**

Zur Differenzierung der pluripotenten Stammzellen kamen Einzelzellen in einer definierten Zelldichte zum Einsatz. Hierfür erfolgte das enzymatische Ablösen der Zellen von der Kulturoberfläche und das Vereinzeln der Zellen mit Hilfe einer Accutase<sup>®</sup>-Lösung. Die Inkubation dauerte maximal 7 min im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen durch Resuspendieren mit einer 1000  $\mu\text{l}$ -Pipette

vereinzelte, zentrifugiert und in einem entsprechendem Volumen mTeSR™1 Medium zum Zählen aufgenommen. Das enzymatische Vereinzeln der NSCs erfolgte unter Verwendung des Enzyms Trypsin, welches für maximal 5 min im Brutschrank inkubiert und dann mit Hilfe eines definierten Trypsininhibitors abgestoppt wurde. Zum Vereinzeln der NSCs kam ebenfalls eine 1000 µl-Pipette zur Verwendung, nach dem Zentrifugieren erfolgte ein Resuspendieren in NSC-Medium.

### 3.2.2 Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in Gehirndothelzellen

Die Differenzierung der hiPSC-Linie IMR90-4 erfolgte, wie von Lippmann et al. und Wilson et al. beschrieben (Lippmann et al. 2014; Wilson et al. 2015). Eine definierte Zahl von  $7,5 \cdot 10^3$  hiPSCs/cm<sup>2</sup> wurde auf Matrigel®-beschichteten 6-Wellplatten ausgesät und mit mTeSR™1 Medium bis zum Erreichen einer optimalen Zelldichte von  $2,5 \cdot 10^4$  bis  $3,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> proliferiert. Hierbei erfolgte



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke

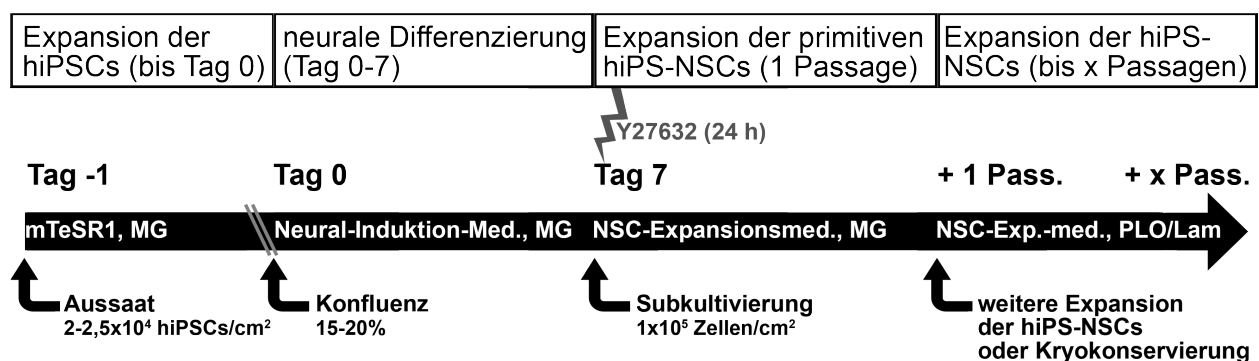
Die zehntägige Differenzierung der hiPSCs in Endothelzellen (hiPS-ECs) der BHS begann ausgehend von einer optimalen Zelldichte von  $2,5 \cdot 10^4$  bis  $3,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Nach sechstägiger Kodifferenzierung der hiPSCs in hiPS-ECs und neurale Progenitoren in einem unkonditionierten Medium (unkond. Medium), erfolgte die gezielte Expansion der hiPS-ECs unter Einfluss von RA und hbFGF für zwei Tage. Durch Subkultivierung der Mischkultur auf eine Kollagen IV/Fibronectin (Kol IV/Fib)-beschichtete Zellkulturoberfläche an Tag acht der Differenzierung wurde eine gezielte Selektion der hiPS-ECs induziert. Die genauen Zellzahlen sowie die zum Einsatz gekommenen Medien, Beschichtungen und Wachstumsfaktoren sind dem Schema zu entnehmen. Abkürzung: Matrigel (MG).

die Behandlung der Zellen in den ersten 24 h mit 10 µM Y27632 ROCK-Inhibitor. Anschließend wurde das Kulturmedium umgestellt und die Zellkolonien über einen Zeitraum von sechs Tagen täglich mit 2 ml/Well unkonditioniertem Medium behandelt, um eine Kodifferenzierung neuraler und endothelialer Zellen zu induzieren. Für weitere zwei Tage diente EC-Medium mit 20 ng/ml hbFGF und 10 µM RA (Retinsäure, *retinoic acid*) für die Kultur der Zellen. Die Versorgung der Zellen erfolgte mit 4 ml/Well, auf einen Medienwechsel innerhalb der zweitägigen Kulturzeit wurde verzichtet. Zur Aufreinigung der BHS-Endothelzellen aus der differenzierten Mischkultur diente erneutes Vereinzeln der Zellen unter Verwendung von Accutase® und deren Aussaat auf einer Kollagen IV/Fibronectin-Matrix. Die verwendeten Corning® Transwell® Polyester-Membran-Zellkultur-Inserts oder 24-Wellplatten wurden hierfür mit einer Lösung von 400 µg/ml Kollagen IV

und 100 µg/ml Fibronectin in Reinstwasser beschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Vor der Aussaat der Zellen in einer Dichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> in EC-Medium mit 20 ng/ml hbFGF und 10 µM RA erfolgte das Spülen der beschichteten Kulturoberflächen mit PBS. Nach 24 h wurde das Medium auf EC-Medium ohne hbFGF und RA umgestellt.

### 3.2.3 Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in neurale Stammzellen

Die NSCs wurden aus der hiPSC-Linie ARiPS (Kadari et al. 2014) in Passage 41 differenziert und von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Edenhofer (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die Differenzierung erfolgte mit kleinen Änderungen wie bei Yan



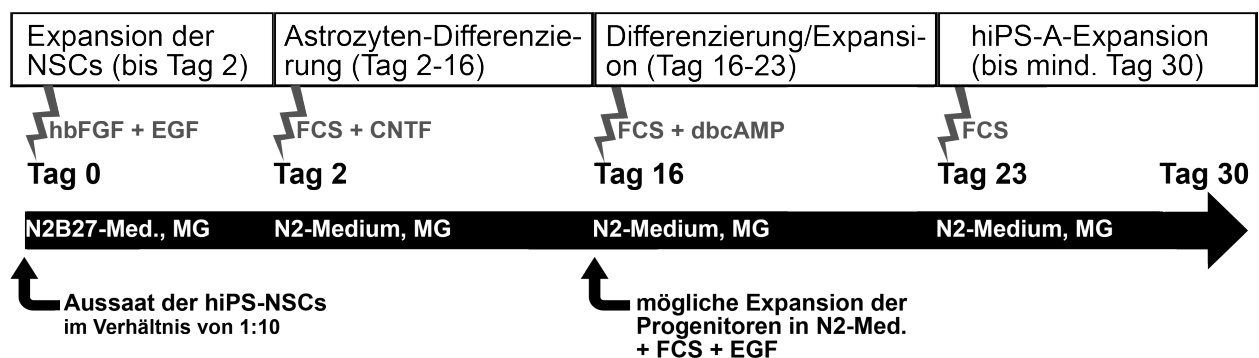
**Abbildung 10: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in neurale Stammzellen**

Die hiPSCs werden in einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^4$  bis  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 15 bis 20 % expandiert. Die neurale Differenzierung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Neuralen-Induktions-Mediums innerhalb von sieben Tagen zu primitiven NSCs. Durch die Expansion der primitiven NSCs in NSC-Expansionsmedium wurden diese zu NSCs ausgereift und konnten auf einer Beschichtung aus Poly-L-Ornithin und Laminin (PLO/Lam) beliebig lange expandiert werden. Die genauen Zellzahlen sowie die zum Einsatz gekommenen Medien, Beschichtungen und Faktoren sind dem Schema zu entnehmen. Abkürzung: Matrigel (MG).

et al. (Yan et al. 2013) beschrieben, wobei die hiPSCs mit Hilfe von Accutase<sup>®</sup> abzulösen und in einer Dichte von  $2 \cdot 10^4$  bis  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf mit Matrigel<sup>®</sup>-beschichteten 6-Wellplatten auszusäen waren. Zuerst wurden die Zellen für ca. 24 h in mTeSR<sup>TM</sup>1 Medium, bis zu einer 15 bis 20 %igen Konfluenz expandiert. Dann erfolgte der Wechsel des Mediums zu PSC-Neuralem-Induktions-Medium (Tag 0). Der Medienwechsel war bis Tag vier im zweitägigen Rhythmus durchzuführen, von Tag vier bis sieben wurde das Medium auf Grund der hohen Konfluenz der Zellen täglich gewechselt. Nach siebentägiger neuraler Induktion wurden die primitiven NSCs mit Hilfe von Accutase<sup>®</sup> abgelöst, als Einzelzellen in einer Dichte von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf Matrigel<sup>®</sup>-beschichteten 6-Wellplatten subkultiviert und alle 2 Tage mit NSC Expansionsmedium versorgt. Nach dem Passagieren der Zellen diente eine Behandlung für 24 h mit 5 µM Y27632 zur Apoptoseinhibition. Zur Erhaltung der auf diese Weise differenzierten hiPS-NSCs erfolgte die Kultur ab Passage sechs in neuralem Stammzellmedium auf Poly-L-Ornithin-Laminin-beschichteten Platten.

### 3.2.4 Differenzierung neuraler Stammzellen zu Astrozyten

Die direkte Differenzierung von hiPS-NSCs in Astrozyten (hiPS-A) verlief gemäß Protokollen von Reinhardt et al. (Reinhardt et al. 2013). Zur Verwendung kamen Matrigel<sup>®</sup>-beschichtete 6-Wellplatten mit einer Verdünnung von 1:100 in DMEM/F-12. Dazu wurden die NSCs zuerst in einem Verhältnis von 1:10 auf die 6-Wellplatten ausgesät und für zwei Tage in einem Medium, bestehend aus 50 % DMEM/F-12 und 50 % Neurobasal<sup>®</sup>-Medium, supplementiert mit 1:200 N-2 Supplement, 1:100 B-27<sup>®</sup>-Supplement ohne Vitamin A, 1 % PenStrep, 2 mM L-Glutamin, 10 ng/ml hbFGF und 10 ng/ml EGF, kultiviert. Dann erfolgte die Umstellung des Mediums auf N2-Medium (DMEM/F-12 + Glutamax<sup>™</sup>-I + 1 % N-2 Supplement + 1 % PenStrep) mit 4 % FCS und 10 ng/ml CNTF für mindestens 2 Wochen. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit Accutase<sup>®</sup> abgelöst und in einem Splittverhältnis von 1:3 auf neue Platten verteilt. Nach der 2-wöchigen Behandlung folgte entweder die weitere Expansion der Zellen in N2-Medium mit 4 % FCS und 10 ng/ml EGF bis zu mehreren Wochen oder die 1-wöchige Behandlung der Zellen in N2-Medium mit 4 % FCS und 500  $\mu$ M dbcAMP. An die Behandlung mit dbcAMP schloss sich die weitere Kultur der Zellen für mindestens eine Woche in N2-Medium mit 4 % FCS an.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Differenzierung von neuralen Stammzellen in Astrozyten**

Die NSCs wurden innerhalb von 30 Tagen in reife Astrozyten (hiPS-A) differenziert. Auf einer Beschichtung aus Matrigel, erfolgte die Differenzierung der NSCs unter Verwendung von 4 %. Die gezielte Expansion der Astrozyten wurde durch den Einsatz von CNTF und dbcAMP induziert. Die genauen Aussaatdichten sowie die zum Einsatz gekommenen Medien, Beschichtungen und Wachstumsfaktoren sind dem Schema zu entnehmen. Abkürzung: Matrigel (MG).

## 3.3 Aufbau und Qualifizierung von Blut-Hirn-Schranken-Modellen

### 3.3.1 Aufbau von Blut-Hirn-Schranken-Modellen auf Basis von Transwellssystemen

Zur Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Zellarten auf die Barriereintegrität der hiPS-ECs, wurden unterschiedliche Kulturarten in Transwellssystemen im 24-Well-Format aufgebaut. Dafür erfolgte die Aussaat der basolateral kultivierten Zellen 24 h vor Aussaat der hiPS-ECs auf den mit Kollagen IV/Fibronectin-beschichteten Transwellinserts. In Tabelle 17 ist eine Übersicht der in den verschiedenen Kulturarten zum Einsatz gekommenen Zellarten des basolateralen Kompartiments, deren Aussaatdichten und verwendeten Beschichtungen dargestellt.

**Tabelle 17:** Übersicht über die zum Blut-Hirn-Schranken-Modell-Aufbau genutzten Kulturarten, die Aussaatdichten der basolateral kultivierten Zellen und verwendeten Beschichtungen.

<b>Zellkombination</b>	<b>Zelldichte</b> 10 <sup>4</sup> Zellen/cm <sup>2</sup>	<b>Beschichtung</b>
<b>Kokultur</b>		
Astrozyten	5,00	PLL
hiPS-A	5,00	MG
Perizyten	5,00	PLL
hiPS-NSCs	5,00	PLO/Lam
fNSCs	5,00	PLO/Lam
<b>Tripel-Kultur</b>		
Astrozyten; Perizyten	2,50; 2,50	PLL
hiPS-NSCs; Astrozyten	3,75; 1,25	PLO/Lam
hiPS-NSCs; Perizyten	3,75; 1,25	PLO/Lam
<b>Quadrupel-Kultur</b>		
hiPS-NSCs; Astrozyten; Perizyten	3,75; 1,25; 1,25	PLO/Lam

Nach der 24-stündigen Vorkultur der Ko-Kulturzellen, erfolgte die Subkultivierung der BHS-Endothelzellen auf Kollagen IV/Fibronectin-beschichteten Transwellinserts. Die Aussaatdichte der BHS-Endothelzellen betrug 1·10<sup>6</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>. Alle Modelle wurden apikal mit 200 µl und basolateral mit 800 µl Medium versorgt, wobei die Kultivierung in den ersten 24 h nach Aussaat der Endothelzellen in EC-Medium mit 20 ng/ml hbFGF und 10 µM RA erfolgte. Danach wurde das Medium auf EC-Medium ohne hbFGF und RA umgestellt.

### 3.3.2 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes

Die Messung des TEER erfolgte mit Hilfe des Messgerätes Millicell ERS-2 und einer Elektrode vom Typ STX3 bei 12,5 Hz. Zur Lagerung der Elektrode diente sterile PBS-Lösung mit 1 % PenStrep und 1 % Fungizone. Vor der Verwendung der Elektrode wurde diese mit Hilfe von 70 %igem Ethanol für 15 min sterilisiert und für weitere 15 min bei Raumtemperatur in EC-Medium äquilibriert. Die TEER-Messung der Endothelzellen der verschiedenen BHS-Modelle erfolgte immer in EC-Medium, welches zuvor auf 37 °C erwärmt wurde. Hierzu war sowohl nach 24-stündiger als auch nach 48-stündiger Mono- bzw. Kokultur ein kompletter Medienwechsel auf der apikalen und basolateralen Seite der Transwellmodelle durchzuführen. Die TEER-Messung wurde sofort nach dem Medienwechsel durchgeführt. Zur Bestimmung des TEER-Wertes [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ] der BHS-Endothelzellen, war der gemessene Wert mit der Kulturfläche der Inserts zu multiplizieren und der TEER eines leeren, nicht mit Zellen besiedelten, aber mit Kollagen IV/Fibronectin beschichteten Inserts zu subtrahieren. Die TEER-Bestimmung erfolgte an drei verschiedenen Stellen jedes Inserts. Es wurden vier unabhängige Versuche mit neu differenzierten hiPS-ECs durchgeführt und dabei der TEER von Duplikaten jeder Kulturbedingung gemessen.

### 3.3.3 Transporttestungen und Bestimmung des Permeationskoeffizienten

Die Transportuntersuchungen wurden an den Quadrupelkulturmodellen bestehend aus hiPS-ECs, Astrozyten, Perizyten und hiPS-NSCs vergleichend zu den EC-Monokulturen durchgeführt. Für die Dauer der Transportversuche erfolgte das Eliminieren der Zellen auf der basolateralen Seite, um eventuelle Substanzaufnahmen durch diese Zellen und damit verbundene Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden. Vergleichend zu den Versuchen mit Zellen wurden auch bei jedem Transportversuch leere Inserts, die mit Kollagen IV/Fibronectin beschichtet waren mitgeführt. Die Inkubation der Modelle erfolgte während des Versuches auf Orbitalschüttlern bei 100 rpm im Brutschrank. In Tabelle 18 sind die verwendeten Substanzen und deren Einsatzkonzentrationen sowie die Herstellung der Stocklösungen beschrieben. Die Einsatzkonzentrationen der Substanzen wurden durch Verdünnen der Stocklösungen in humanem serumfreiem Wachstumsmedium Endothelial-SFM hergestellt und in 200  $\mu$ l auf die apikale Seite der Modelle appliziert. Vor der Verwendung von FITC-Dextran (4 kDa und 40 kDa) erfolgte dessen Aufreinigung durch eine 30-minütige Zentrifugation bei  $4000 \times g$  mit Hilfe von Amicon Ultra-15 Zentrifugalfiltereinheiten. Ziel war es, die freien FITC-Moleküle in der Lösung zu eliminieren, die eine mögliche Verfälschung der Permeationsergebnisse hervorgerufen hätten.

**Tabelle 18:** Übersicht über die für die Transporttestungen verwendeten Substanzen, deren Einsatzkonzentrationen und die Herstellung der Stocklösungen.

Testsubstanz	Einsatzkonzentration [ $\mu$ M]	Stocklösung
<b>schnelle Transportgeschwindigkeit</b>		
Diazepam	100	100 mM in DMSO
Theophyllin	100	100 mM in DMSO
Koffein	100	100 mM in Wasser
<b>mittlere Transportgeschwindigkeit</b>		
Ibuprofen-Na	100	100 mM in Wasser
Diclofenac	100	100 mM in DMSO
<b>langsame Transportgeschwindigkeit</b>		
Celecoxib	100	50 mM in Ethanol
Rhodamin 123	100	direkt in Endothelial-SFM gelöst
Loratadin	100	100 mM in Ethanol
<b>parazellulärer Transport</b>		
Lucifer Yellow	10	1 mM in Endothelial-SFM
Fluoreszein-Na	10	1 mM in Endothelial-SFM
FITC-Dextran 4 kDa	10	direkt in Endothelial-SFM gelöst
FITC-Dextran 40 kDa	10	direkt in Endothelial-SFM gelöst

Auf der basolateralen Seite waren während des Versuches 800  $\mu$ l Endothelial-SFM vorhanden. Bei der Durchführung eines Transporttestes ist es wichtig darauf zu achten, dass auf der basolateralen Seite die gleiche Menge an Lösungsmitteln wie apikal (0,1 % DMSO bzw. Wasser oder 0,1 bis 0,2 %

Ethanol) vorhanden ist. Zudem muss der Medienspiegel auf der apikalen und basolateralen Seite exakt gleich hoch sein, um Effekte durch Konzentrationsgefälle und den hydrostatischen Druck auf die Zellen zu vermeiden. Alle 15 min wurden die Inserts mit Hilfe einer Pinzette in neue, mit 800  $\mu\text{l}$  Endothelial-SFM gefüllte und vorgewärmte Wells umgesetzt. Die Transferzeiten beim Transport von FITC-Dextran unterschieden sich wie folgt: Ein Umsetzen der Inserts erfolgte nach 0,5 h, 1,5 h, 3,5 h und 7,5 h. Nach 1 h, bzw. 30,5 h im Fall von FITC-Dextran, wurde der Versuch abgebrochen, alle Proben der basolateralen und apikalen Seite in Reaktionsgefäße überführt und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Analyse gelagert. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Substanzen erfolgte direkt nach der Probenentnahme. Hierfür war ein Probenvolumen von jeweils 200  $\mu\text{l}$  in jedes Well einer schwarzen 96-Wellplatte mit flachem Boden zu überführen und im Tecan-Reader zu vermessen. In Tabelle 19 sind die Messparameter für die durchgeführten Versuchsreihen dargestellt. Folgende Randbedin-

**Tabelle 19:** Übersicht über die Messparameter bei der Analyse von fluoreszenzmarkierten Substanzen am TECAN-Reader.

Testsubstanz	Exzitationswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]	Verstärkung —
Rhodamin 123	485	535	52
Lucifer Yellow	428	540	100
Fluoreszein	490	525	57
FITC-Dextran 4 kDa	490	525	81
FITC-Dextran 40 kDa	490	525	59

gungen blieben bei den Messungen konstant:  $2 \times 2$  Mehrfachmessungen (Kreis) pro Well, Rahmen 500  $\mu\text{m}$ , Exzitationsbandbreite 9 nm, Emissionsbandbreite 20 nm, Anzahl der Blitze 25, Integrationszeit 20  $\mu\text{s}$ , Verzögerungs- und Ruhezeit 0  $\mu\text{s}$ .

Die Analyse aller nicht-fluoreszenzmarkierten Substanzen erfolgte mit Hilfe einer HPLC-MS durch PD Dr. Winfried Neuhaus vom Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien. Die Proben wurden hierzu bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zu deren Vermessung gelagert.

Die Permeabilitätsstudien fanden an Duplikaten in drei voneinander unabhängigen Versuchen statt, wobei in jedem Versuch frisch differenzierte BHS-Endothelzellen Einsatz fanden.

Auf Grund von TEER-Schwankungen wurde Diazepam als Referenzsubstanz für alle nicht parzellulär transportierten Stoffe verwendet. Dies half, die Transportgeschwindigkeiten der Duplikate eines Versuches und der Triplikate der Versuchswiederholungen untereinander zu normalisieren.

Am Ende der Transportversuche waren die Überstände der Inserts vorsichtig, ohne den Zelllayer oder das Insert zu beschädigen, abzunehmen und ebenfalls zu analysieren, um die Wiederfindungsraten der Substanzen zu bestimmen.

Die Berechnung des Permeationskoeffizienten (PK) erfolgte analog Neuhaus et al. nach dem Durchtrittsprinzip unter Einbezug der Ergebnisse der Leerwertexperimente (Novakova et al. 2014; Neuhaus et al. 2006). Die reziproke Korrelation wird in folgender Formel verdeutlicht:

$$1/PK(\text{Zelle}) = 1/PK(\text{gesamt}) - 1/PK(\text{leer}).$$

Hierbei gibt PK(Zelle) den PK, der ausschließlich vom Zelllayer ausgeht an, PK(gesamt) reprä-

sentiert den PK durch die Membran des Inserts und die Zellschicht. PK(leer) steht für den PK der Leerwerte ohne Zelllayer, welcher von der Insertmembran einschließlich deren Beschichtung ausgeht.

Für den Transport des Anästhetikums Propofol-<sup>®</sup>Lipuro als Reinsubstanz und als Cyclodextrin-Wirkstoff-Komplex wurden stammzellbasierte BHS-Modelle als Kokulturen aus hiPS-ECs und primären fetalen Perizyten eingesetzt. Basolateral im Akzeptorkompartiment fanden 800 µl Transportmedium, versetzt mit 10 % humanem Serum, Einsatz. Für jeden Versuch wurden zwei verschiedene Konzentration, 5 µg/ml und 50 µg/ml Propofol-Wirkstoff eingesetzt, um eine konzentrationsabhängige Transportkinetik aufnehmen zu können. Auf der apikalen Seite der Modelle erfolgte die Applikation von 200 µl (= 1 µg bzw. 10 µg) Wirkstoff. Über eine Versuchszeit von insgesamt 30 min wurden nach jeweils 5 min, 15 min und 30 min auf der basolateralen Seite 100 µl-Probe gezogen und durch frisches Medium mit 10 % humanem Serum ersetzt. Dr. Katalin Pápai-Herçzeg von der Firma Sapiotec bereitete die Proben auf und analysierte sie mittels LC-MS/MS.

### **3.4 Charakterisierung von Zellen und Blut-Hirn-Schranken-Modellen**

#### **3.4.1 Bestimmung der Funktionalität der Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen**

##### **3.4.1.1 Testung der Gefäßbildung in 3D-Umgebung**

Für die Testung der Gefäßbildungskapazität der hiPS-ECs in einer 3D Umgebung wurden 320 µl eisgekühltes Matrigel<sup>®</sup> in jedes Well eines 4-Well-Chamberslides ( $A = 2 \text{ cm}^2$ ) pipettiert und zum Gelieren für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als nächstes erfolgte das Aufbringen der hiPS-ECs in einer Aussaatdichte von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in EC-Medium mit 40 ng/ml VEGF auf das Matrigel. Als Negativkontrolle diente EC-Medium ohne VEGF. Nach der 48-stündigen Kultur der Zellen schloss sich die mikroskopische Auswertung der Gefäßbildung an. Als Positivkontrolle dienten in diesem Versuch HUVEC.

##### **3.4.1.2 Testung der Ac-LDL-Aufnahme**

Ein weiterer funktioneller Test für Endothelzellen stellt die Untersuchung der Ac-LDL-Aufnahmefähigkeit dar. Die ausdifferenzierten BHS-Endothelzellen und HUVEC als Kontrollzellen wurden hierfür mit 10 µg/ml FITC-gekoppeltem acetyliertem Low Density Lipoprotein (Lipoprotein niedriger Dichte), gelöst in EC-Medium bzw. Vasculife<sup>®</sup>, für 4 h bei 37 °C im Brutschrank behandelt. 25 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zum Visualisieren der Zellkerne mit NucBlue<sup>®</sup> Live ReadyProbes<sup>®</sup> Reagenz, in einer Konzentration von zwei Tropfen pro Milliliter Medium, bei Raumtemperatur behandelt. Danach erfolgte das vorsichtige Waschen der Zellen mit PBS sowie die mikroskopische Auswertung mit Hilfe des BZ-9000 BIOREVO Systems und integrierter Software oder die Quantifizierung der positiven Zellen am FACSCalibur<sup>™</sup> der Firma BD.



### 3.4.2 Alkalische Phosphatasefärbung

Zum Nachweis von alkalischer Phosphatase wurden die hiPSCs auf Matrigel<sup>®</sup>-beschichteten Glasplättchen kultiviert und die Kolonien vor der Färbung mit 4%iger Paraformaldehydlösung für 1 min leicht vorfixiert. Ein längeres Fixieren war zu vermeiden, um die Inaktivierung des Enzyms zu verhindern. Nach dem Fixieren folgte das Spülen der Zellen mit PBS und die 15-minütige Inkubation mit der Naphtol-Fast-Red-Violett-Wasser-Färbelösung in einem Mischungsverhältnis von 2 : 1 : 1. Die Enzymreaktion fand bei Raumtemperatur im Dunkeln statt. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Waschen der Zellen mit PBS abgestoppt und die Zellen mit Hilfe von 4%iger Paraformaldehydlösung für 10 min vollständig fixiert. Vor der mikroskopischen Auswertung der Färbung am BZ-9000 BIOREVO System und integrierter Software erfolgte das Eindecken der Zellen unter Verwendung von Entellan.

### 3.4.3 Immunhistologische Charakterisierung

#### 3.4.3.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Für das Anfertigen von Kryoschnitten wurden die Insertmembranen mit einem Skalpell aus den Transwellhalterungen ausgeschnitten und in der Mitte halbiert. Die Insertmembranhälften mussten zur besseren Orientierung mit den Schnittflächen bündig an den Rand eines mit Tissue-Tec<sup>®</sup>O.C.T.<sup>™</sup> gefüllten Blockförmchens gelegt und mit einer weiteren Schicht Tissue-Tec<sup>®</sup>O.C.T.<sup>™</sup> überschichtet werden, so dass die Membranen und Zellen komplett in Tissue-Tec<sup>®</sup>O.C.T.<sup>™</sup> eingebettet waren. Es war beim Einbetten der Membranen auf deren planare Ausrichtung zu achten. Sofort nach dem Einbetten wurden die Gewebelöcke auf Trockeneis schockgefroren und bis zur Anfertigung der Kryoschnitte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Kurz vor dem Schneiden erfolgte das Herauslösen der Gewebelöcke aus den Formen und ein Aufblocken auf die Blockstempel, so dass Querschnitte von den Membranen und Zellen angefertigt werden konnten. Die Dicke der Schnitte betrug 10 bis 12  $\mu\text{m}$ . Beim langsamen Überführen der Objektträger auf Raumtemperatur war darauf zu achten, dass sich kein Kondenswasser auf den Präparaten bildete. Die Schnitte lagerten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zu deren Färbung.

#### 3.4.3.2 Immunfluoreszenzfärbung

Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden alle Präparate fixiert. Die Fixierung von Zellen auf Kulturoberflächen, wie Wellplatten, Glasplättchen oder Insertmembranen erfolgte mit Hilfe einer 4%igen Paraformaldehydlösung für 10 min bei Raumtemperatur. Die Kryoschnitte der Zellen auf den Insertmembranen fixierten für 10 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Aceton. Nach dem Entfernen der Fixiermittelrückstände wurde die Immunfluoreszenzfärbung wie in Tabelle 20 beschrieben durchgeführt und sofern nicht anders vermerkt, alle Schritte auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur vollzogen. Weiterhin war zu beachten, dass die Proben immer vollständig mit Flüssigkeit benetzt waren, um deren Austrocknen zu vermeiden.

Nach der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte das Eindecken der geschnittenen Präparate oder fixierten Zellen mit DAPI-Fluoromount-G bzw. das Überschichten der in Wells fixierten und gefärbten Zellen mit einer 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DAPI-Lösung, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Die Fluoreszenz-

**Tabelle 20:** Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung.

Schritt	Reagenz/Lösung	Zeit/Bedingungen
Permeabilisieren	0,2 % Triton-X 100 in PBS	5 min
Waschen	Waschpuffer	3-mal 5 min
Blocken	Blocklösung	5 min
Primärantikörper	Antikörper verdünnt in Blocklösung	über Nacht, 4 °C
Waschen	Waschpuffer	3-mal 5 min
Sekundärantikörper	Antikörper verdünnt in PBS	60 min
Waschen	Waschpuffer	3-mal 5 min

aufnahmen wurden mit Hilfe des BZ-9000 BIOREVO Systems und integrierter Software oder des Laser-Scanning-Mikroskopes TCS-SP8 von Leica gemacht.

### 3.4.3.3 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse, *fluorescence associated cell sorting*) erfolgte zuerst das Vereinzeln der Zellen mit Hilfe von Accutase<sup>®</sup>. Jeweils  $1 \cdot 10^5$  Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und nach dem in Tabelle 21 aufgeführten Protokoll gefärbt. Die Inkubati-

**Tabelle 21:** Protokoll zur Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie.

Schritt	Reagenz/Lösung	Zeit/Bedingungen
Waschen	FACS-Puffer	1-mal, 1 ml
Zellen in 80 µl FACS-Puffer aufnehmen		
Blocken	1 µl FcR-Block	20 min
Waschen	FACS-Puffer	1-mal, 1 ml
<b>Färbung von Oberflächenproteinen</b>		
Zellen in 50 µl FACS-Puffer aufnehmen		
Primärantikörper	5 µl AK	30 min
Waschen	FACS-Puffer	3-mal, 1 ml
<b>Färbung von intrazellulären Proteinen</b>		
Fixieren und Permeabilisieren	250 µl Fixierlösung	20 min
Waschen	1 × Perm/Wash	2-mal, 1 ml
Zellen in 50 µl 1 × Perm/Wash aufnehmen		
Primärantikörper	5 µl AK	30 min
Waschen	1 × Perm/Wash	3-mal, 1 ml

onsschritte erfolgten bei 4 °C, die Zentrifugation zwischen den einzelnen Waschsritten und vor dem Wechsel der Lösungen bei  $250 \times g$  für jeweils 5 min.

Bei der Verwendung von nicht fluoreszenzmarkierten Primärantikörpern war nach dem Fixieren und Permeabilisieren der Zellen, bei der Markierung von intrazellulären Proteinen, ein erneuter Blockschritt mit 5 % Eselserum in Perm/Wash (30 min) nötig. Nach der Inkubation des Erstantiköpers

schloss sich ein gründliches Waschen und die 30-minütige Inkubation des sekundären Antikörpers an. Nach Abschluss der Färbung wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert, um diese mit Hilfe des FACSCalibur™ (BD) zu quantifizieren.

### 3.4.4 Ultrastrukturelle Analyse

#### 3.4.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die BHS-Endothelzellen der Monokulturen mit denen der Quadrupelkulturmodelle verglichen. Hierfür war zuerst das Medium abzusaugen und die Inserts in neue, leere Wells zu überführen. Das Fixieren der Zellen und deren Lagerung bis zur weiteren Probenaufarbeitung in der Abteilung für Elektronenmikroskopie, im Biozentrum der Universität Würzburg (Prof. Dr. Krohne) erfolgte bei 4 °C in einer 2,5 %igen gepufferten Glutaraldehydlösung. Die weitere Probenvorbereitung analog Prüfert et al. war wie folgt: Die Proben wurden für weitere 2 h bei 4 °C mit einer 2 %igen gepufferten Osmiumtetroxidlösung fixiert, dann in Wasser gewaschen und über Nacht bei 4 °C in einer 0,5 % Uranylacetat-Lösung gelagert (Prüfert et al. 2004). Dann erfolgte das Dehydrieren der Proben, das Einbetten in Epon812 sowie das Anfertigen von Ultradünnschnitten. Die Bilder wurden an einem Mikroskop des Typs JEOL JEM-2100 bei 200 kV mit einer TVIPS F416 4kx4k Kamera aufgenommen.

#### 3.4.4.2 Gefrierbruchelektronenmikroskopie

In Vorbereitung für die Anfertigung von Gefrierbruchschnitten wurden die BHS-Modelle mit PBS mit MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> gewaschen und anschließend zum Fixieren mit 2,5 %iger Glutaraldehydlösung (in PBS) in neue Wells überführt. Die Fixierung erfolgte lichtgeschützt für 2 h bei Raumtemperatur. Danach waren die hiPS-ECs vorsichtig mit PBS zu waschen und in 0,1 % gepufferter Glutaraldehydlösung bei 4 °C zu lagern. Die weitere Probenvorbereitung und -analyse geschah durch Herrn Dr. Piontek vom Institut für Klinische Physiologie der Charité Berlin.

Die Elektronenmikroskopie (EM) wurde analog der Beschreibungen von Zeissig et al. durchgeführt (Zeissig et al. 2007). Die Inkubation der Proben erfolgte nacheinander zuerst in 10 %, dann in 30 % Glycerol und final unter Verwendung von Flüssig-Stickstoff gekühltem Freon 22 eingefroren. Die Zellen wurden bei –100 °C gebrochen und in einem Vakuumverdampfer (Denton DV-502) mit Platin und Carbon beschattet. Die Replikat konnten mit Hilfe von Natriumhypochlorid gebleicht, auf Gitter aufgebracht (Ted Pella Inc.) und an einem mit Videokamera ausgestatteten Zeiss 902A Elektronenmikroskop (Carl Zeiss AG, Olympus iTEM Veleta) analysiert werden.

Zur morphometrischen Analyse der TJ-Netze (Kaufmann 2012) erfolgte das Zählen der Maschen in einem Netzwerk von TJ-Strängen und die Quantifizierung aller Rechteckflächen, in welchen sich die Stränge befanden. Innerhalb eines EM-Bildes wurden Länge und Breite der Rechtecke vermessen und die Maschendichte durch Division der Anzahl der Maschen durch deren Fläche ermittelt. Mindestens 20 Netzwerke pro EM-Aufnahme waren auf diese Weise sowohl für die Mono- als auch Quadrupel-Kulturen zu quantifizieren.

### 3.4.5 Western Blot

Für die Proteinanalytik mittels Western Blot wurden die Endothelzellen der BHS-Modelle direkt in den Inserts lysiert, ohne zuvor abgelöst zu werden. Hierfür erfolgte ein Umsetzen der Inserts in neue Wellplatten ohne Kokulturzellen, einmaliges Waschen mit PBS und das Einfrieren der trockenen Platten samt Zellen bis zur Zellyse und der Durchführung des Western Blots bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pro Insert kam  $50\ \mu\text{l}$  kalter Lysepuffer zum Einsatz, in welchem die Zellen resuspendiert wurden. Die Lyse erfolgte auf Eis für 30 min und konnte durch ein Resuspendieren alle 10 min unterstützt werden. Nach dem Überführen des Zellysats in ein Reaktionsgefäß erfolgte eine Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $12000 \times g$  für 20 min. Der Überstand mit dem Protein war in ein neues Reaktionsgefäß zu überführen und für die Auftrennung in einem SDS-Gel zu verwenden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde mit Hilfe des DC Protein Assays durchgeführt und mittels TECAN Infinite M200 unter Bestimmung der Absorption mit folgenden Geräteeinstellungen quantifiziert: 750 nm, Bandbreite 9 nm, 25 Blitze. Hierfür kam ein BSA-Proteinstandard (*bovine serum albumin*) zum Einsatz. Die genauen Volumina der in jedem Well der 96-Wellplatte vorhandenen Reagenzien sind in Tabelle 22 dargestellt. Vor der Messung des Proteingehaltes der Proben schloss sich nach dem Pipettieren aller Reagenzien in die 96-Wellplatte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln an. Ein 4 bis 16 %iges Gradientengel

**Tabelle 22:** Übersicht über die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Proteinbestimmung in Vorbereitung auf die Western Blot-Analyse.

Lösung/Reagenz	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Bemerkungen/Vorbereitung
Probe/Standard	5	
alkalische Pufferlösung	25	Reagenz A: Reagenz S (1:50)
Folinlösung	200	Reagenz B

wurde in eine Gelwanne eingehängt, welche mit einfach konzentriertem SDS-Laufpuffer gefüllt war. Pro Geltasche waren  $10\ \mu\text{g}$  Proteinprobe in einem Gesamtvolumen von  $30\ \mu\text{l}$  Ladepuffer einzubringen, wobei die Proben zuvor im Verhältnis 1:5 mit Ladepuffer verdünnt, für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  in einem Heizblock erhitzt und anschließend abzentrifugiert wurden. Bei einer für ca. 1 h angelegten Stromstärke von 25 mA ( $U = 400\ \text{V}$ ,  $P = 50\ \text{W}$ ) erfolgte das Auftrennen der Proben. Die Apparatur konnte daraufhin von der Stromquelle getrennt, das Gel aus der Apparatur genommen und das Sammelgel entfernt werden.

Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte nun deren Transfer mit Hilfe des Mini-PROTEAN Tetra Systems (BioRad) auf eine Blotting Membran (Polyvinylidene Difluoride). Auf dieser wurde später die immunhistologische Färbung mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt. Hierfür mussten die Blotkammer sowie deren Deckel mit Transferpuffer angefeuchtet und alle Bestandteile, die in diese Kammer überführt wurden, in Transferpuffer getränkt werden. Das Gel mit darunterliegendem Blottingpapier lagerte luftblasenfrei in der Mitte zwischen sechs Whatmanpapieren. Der Blotting-Vorgang erfolgte bei einer Stromstärke von  $1,5\ \text{mA}/\text{cm}^2$  Gel (ca.  $150\ \text{mA}$ /kleines Gel) für 1,5 h. Der Blot-Prozess war erfolgreich, wenn sich die Marker auf die Membran übertragen hatten. Die auf die Blotting-Membran übertragenen Proteine konnten jetzt mit Hilfe einer Antikörper-

färbung detektiert werden. Hierfür wurde die Blotting-Membran in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in einer 5 %-igen Milchpulverlösung, verdünnt in TBST, für 1 h geblockt. Die Primärantikörper inkubierten, verdünnt in Blocklösung, über Nacht bei 4 °C auf einem Rotationschüttler. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST folgte die einstündige Inkubation des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur, welcher ebenfalls in Blocklösung verdünnt war. Dann folgte erneutes dreimaliges Waschen in TBST-Puffer und das Entwickeln des Blots sowie die Aufnahme der Reaktion. Die Entwicklerlösung, bestehend aus 1 ml Detection-Reagenz 1 (Peroxidlösung) und 1 ml Detection-Reagenz 2 (Luminol-Enhancer-Lösung), wurde gemischt und der Blot mit der Oberseite nach unten für 1 bis 3 min in diese eingelegt. Die Aufnahme des entwickelten Blots erfolgte mit Hilfe des Fluor-Chem Q Imaging-Gerätes (CellBiosciences) und integrierter Software.

### 3.4.6 Genexpressionsanalyse

Zur Untersuchung des Genexpressionsstatus der Zellen erfolgte die Isolation der mRNA. Diese wurde mittels Reverser Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben, mit Hilfe der qRT-PCR vervielfältigt und analysiert. Einer Kontamination der Proben, Reagenzien und Materialien mit Fremd-RNA und DNA wurde durch das Arbeiten unter speziellen Abzügen, das Tragen von Handschuhen bei allen Arbeitsschritten und das Reinigen aller Flächen mit Hilfe des RNase-ExitusPlus™ bzw. DNase ExitusPlus™ vorgebeugt. Alle Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht abweichend beschrieben, für 1 min bei 10 000 rcf (*relative centrifugal field*) durchgeführt.

#### 3.4.6.1 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA der Proben erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Micro Kits der Firma Qiagen. Maximal  $5 \cdot 10^5$  Zellen konnten durch Resuspendieren in 350 µl RLT-Puffer mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert werden. Zum Lysieren der hiPS-ECs der BHS-Modelle wurden die Insertmembranen mit Hilfe eines Skalpells aus den Transwellhalterungen getrennt und direkt in ein mit 350 µl RLT-Puffer und 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol gefülltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Resuspendieren der Zellen mit Hilfe einer 1000 µl-Pipette und Vortexen unterstützte auch hier deren Lyse. Die Lysate lagerten, falls nötig, bis zur Isolation der RNA bei -20 °C. Zum weiteren Homogenisieren der Lysate wurden diese auf eine QIAshredder Mini Spin Column pipettiert, welche in einem 2 ml-Auffanggefäß platziert war. Die Proben zentrifugierten für 2 min bei 20 238 rcf.

Nach dem Verwerfen der Säule, erfolgte die Zugabe von 350 µl 70 %igem Ethanol zu dem Lysat im Auffanggefäß und gründliches Resuspendieren der beiden Lösungen. Die gesamte Probe wurde dann auf eine RNeasy® MinElute® Spin Column mit Auffanggefäß pipettiert und zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Eluats, war erneutes Waschen und Zentrifugieren der Membran durch Zugabe von 350 µl RW1-Puffer nötig.

Zum Entfernen von Verunreinigungen mit DNA diente ein DNase-Verdau direkt auf der Säulenmembran. Hierzu wurden 10 µl DNase I-Stocklösung mit 70 µl RDD-Puffer gemischt und vorsichtig mittig auf die Membran der Säule pipettiert. Die Inkubation der DNase-Reaktion dauerte 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte das erneute Waschen der Membran mit Hilfe von 350 µl RW1-Puffer und Zentrifugation.

Die RNeasy® MinElute® Spin Column war nun in ein neues Auffanggefäß zu überführen. Die an der Membran gebundene RNA wurde zuerst mit Hilfe von 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach erneutem Leeren des Auffanggefäßes erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 500 µl 80 %igem Ethanol und die Zentrifugation für 2 min. Die Säule zentrifugierte nun zum Trocknen mit geöffnetem Deckel für 5 min bei 20 238 rcf in einem frischen Auffanggefäß.

Zum Herauslösen der aufgereinigten RNA aus der Säule wurde diese in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß umgesetzt, 20 µl RNase-freies Wasser mittig auf die Membran gegeben und die RNA durch Zentrifugieren bei 20 238 rcf für 1 min aus der Säule gelöst. Die RNA lagerte bis zur cDNA-Synthese bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.6.2 cDNA-Synthese

Vor der cDNA-Synthese war die Messung des RNA-Gehaltes der Proben mit Hilfe des TECAN Infinite M200 und einer speziellen Nanodrop-Messplatte nötig. Hierzu erfolgte zuerst das Reinigen

**Tabelle 23:** Übersicht über die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese.

Lösung/Reagenz	Volumen [µl]
5 × iScript™ Reaction Mix	4
iScript™ Reverse Transcriptase	1
RNase-freies Wasser	<i>x</i>
RNA-Probe	<i>y</i>
<b>Endvolumen</b>	<b>20</b>

der Platte mit Hilfe von Reinstwasser und fusselfreien Tüchern und das sogenannte Blanking der 16 Messpunkte auf der Platte unter Verwendung von je 2 µl RNase-freiem Wasser. Dann wurden die Messpunkte auf der Platte mit einem fusselfreien Tuch getrocknet und pro Messpunkt 2 µl RNA-Probe aufgetragen. Die Messung des RNA-Gehaltes bei 260 nm und 280 nm, erlaubte das Abschätzen des Grades eventueller Verunreinigungen der Probe mit Proteinen und DNA.

Für die cDNA-Synthese kamen maximal 1000 ng RNA in einem Volumen von 15 µl zum Einsatz. Zu jeder Probe wurden außerdem 4 µl 5 × iScript™ Reaction Mix und 1 µl iScript™ Reverse

**Tabelle 24:** Temperaturprotokoll über die Reaktion der cDNA-Synthese im Thermocycler.

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Prozess
25	5	Anlagerung der Primer
42	30	Elongation der cDNA
85	5	Trennung der Doppelstränge
4	∞	Lagerung der cDNA (optional)

Transcriptase hinzugegeben, um ein Endvolumen von 20 µl zu erhalten. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese ist in Tabelle 23 dargestellt. Als

Negativkontrolle diente RNase-freies Wasser anstatt der RNA-Probe.

Die cDNA-Synthese erfolgte in dünnwandigen Reaktionsgefäßen im Thermocycler nach dem in Tabelle 24 aufgeführten Protokoll. Die cDNA-Proben lagerten bis zur Durchführung der qRT-PCR bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.6.3 Quantitative Realtime-Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe der quantitativen Realtime-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde die zu analysierende Gensequenz auf der cDNA vervielfältigt und durch Fluoreszenzmessung quantifiziert. Speziell entwickelte Primer banden spezifisch an die Stellen des cDNA-Einzelstrangs an, welche vor

**Tabelle 25:** Zusammensetzung der Reagenzien der quantitativen Realtime-Polymerase Kettenreaktion pro Well der 96-Wellplatte.

Reagenz	Einsatzkonzentration	Vorverdünnung	Volumen
Forwardprimer	4 pmol/ $\mu\text{l}$	1:25	2 $\mu\text{l}$
Reverseprimer	4 pmol/ $\mu\text{l}$	1:25	2 $\mu\text{l}$
cDNA	—	1:2 bis 1:5	1 $\mu\text{l}$
DNase-freies Wasser	—	—	5 $\mu\text{l}$
BioRad-SuperMix	—	—	10 $\mu\text{l}$

der zu analysierenden Sequenz lagen. Mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase wurden, ausgehend von den Primern durch Einsetzen von korrespondierenden Nukleotidsequenzen, entlang des cDNA-Einzelstranges, Doppelstränge ausgebildet. Eine exponentielle Vervielfältigung des Genabschnittes entstand durch zyklisches Wiederholen der thermischen Trennung des Doppelstranges und deren erneuter Generierung.

Für die qRT-PCR wurde der EvaGreen/SYBRGreen Supermix (BioRad) verwendet. Dieser Reagenzmix war aufgrund von enthaltenen Fluorophoren lichtempfindlich und lagerte bis zu dessen Gebrauch lichtgeschützt auf Eis. Alle verwendeten Reagenzien tauten vor Gebrauch auf Eis auf und waren vor ihrem Einsatz, mit Ausnahme der Enzyme, mit Hilfe des Vortexers zu mischen und zu zentrifugieren. Zur Reinigung des Arbeitsplatzes vor Beginn der Arbeiten diente DNase-ExitusPlus<sup>TM</sup>.

Sowohl die Forward- als auch die Reverseprimer waren in einer Konzentration von 4 pmol/ $\mu\text{l}$  einzusetzen, wobei die Stockkonzentrationen mit Reinstwasser im Verhältnis von 1:25 vorzuverdünnen waren. Die cDNA wurde je nach Expressionsstärke des Zielgens im Verhältnis 1:2 bis 1:5 mit Reinstwasser vorverdünnt. Als Orientierungswert hierfür sollte ein Gehalt von 5 bis 10 ng der vor der cDNA-Synthese quantifizierten RNA pro PCR-Reaktion vorhanden sein. Als Negativkontrolle diente Reinstwasser anstelle von cDNA für die qRT-PCR. Alle Proben kamen in Form von Duplikaten zum Einsatz. In Tabelle 25 sind alle verwendeten Reagenzien der qRT-PCR inklusive der genauen Volumina aufgeführt. Pro Reaktionsgefäß der 96-Wellplatte umfasste das Gesamtvolumen 20  $\mu\text{l}$ .

**Tabelle 26:** Übersicht über die mittlere Expressionsstabilität  $M$  der Housekeepinggene.

Gen	RPL6	EF1 $\alpha$	HPRT1	RPS29	RPL4	GAPDH
Differenzierung IMR90-4	<b>0,328</b>	<b>0,380</b>	0,422	0,468	0,475	0,507
Upscaling ARIPS	0,331	0,415	0,707	0,425	<b>0,317</b>	<b>0,299</b>

Zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse wurden die Housekeepinggene EF1- $\alpha$  und RPTL6 bzw. GAPDH und RPL4 eingesetzt, welche zuvor auf ihre Expressionsstabilität während der Differenzierungen der hiPSCs bzw. der Kulturart innerhalb der Upscalingversuche untersucht wurden (Auswertung mittels Programm geNorm durch Andrea Niklaus, AG Prof. Dr. Müller, MSZ im ZEMM, Stem Cell Biology, Würzburg). Die mittlere Expressionsstabilität ( $M$ ) der untersuchten Primer, welche unter einem Wert von 1,5 liegen sollte, ist in Tabelle 26 zusammengefasst.

**Tabelle 27:** Temperaturverlaufsprotokoll für die quantitative Realtime-Polymerase Kettenreaktion.

Temperatur [°C]	Laufzeit [s]	Wiederholungen —	Schritt —
95	180	1 $\times$	Aufspaltung der Doppelstränge
95	10	40 $\times$	Aufspaltung der Doppelstränge Aktivierung der Polymerase
60	30	40 $\times$	Annealing der Primer
72	30	40 $\times$	Stabilisierung, Elongation, Fluoreszenzdetektion
95	10	1 $\times$	
65 - 95	5	1 $\times$	Schmelzkurvenanalyse, Temperaturerhöhung um 0,5 K/5 s

Die Effizienzbestimmungen aller Primer wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen der Original-cDNA, welche auch in den Versuchen Einsatz fand, bestimmt. Hierfür war ein Verdünnen der cDNA zum Einsatz in der qRT-PCR je nach Expressionsstärke des Zielgens von 1:3 bis 1:4 über bis zu 8 Verdünnungsschritte hinweg notwendig.

Alle in Tabelle 25 aufgeführten Reagenzien wurden unter Verwendung eines Kühlblocks in die 96-Well-PCR-Platte pipettiert und danach mit einer Microseal<sup>®</sup>-Klebefolie versiegelt. Die Analyse erfolgte im PCR-Thermocycler der Firma BioRad mit dem in Tabelle 27 dargestellten Temperaturverlaufsprotokoll.

Eine Gelelektrophorese der PCR-Produkte wurde in einem 2%-igen Agarosegel durchgeführt. Für ein kleines Gel erfolgte das Aufkochen von 1,4 g Agarose und 70 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle. Nach dem kurzen Abkühlen der homogenen Lösung folgte die Zugabe von 4  $\mu$ l GelRed<sup>™</sup> und dessen homogene Verteilung durch leichtes Schwenken des Glaskolbens. Das Gel war luftblasenfrei in die Gelgießvorrichtung mit eingehangenen Kamm zu gießen. Nach dem Aushärten des Agarosegels und dem Entfernen des Kammes, wurde dieses in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoreseeinheit überführt und mit jeweils 12  $\mu$ l Probe ( $\frac{5}{6}$  mit 6  $\times$  Ladepuffer gemischt) oder DNA-Ladder

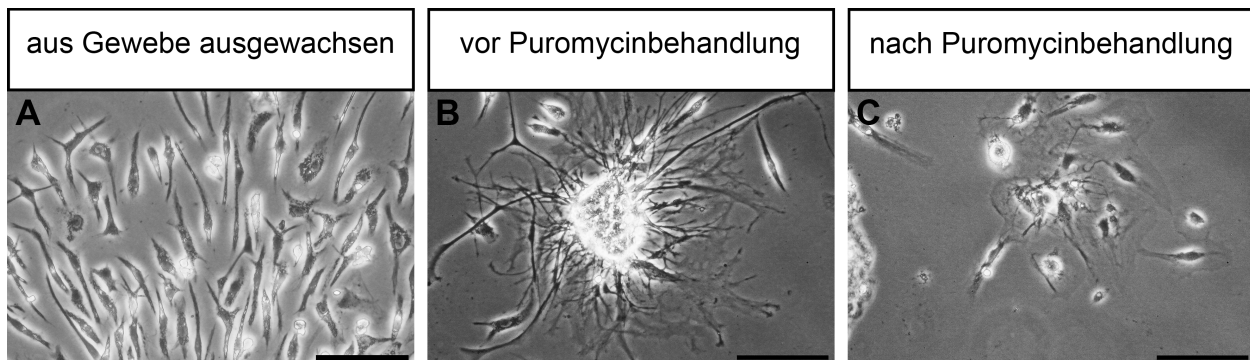


beladen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgte bei 120 V, 50 W und 300 mA für ca. 1 h. Zur Visualisierung der DNA diente ein Transluminator (Vilber Lourmat Deutschland GmbH).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Primärkultur humaner Astrozyten und Endothelzellen

Zum Aufbau primärer BHS-Modelle sollten in ersten Pilotstudien Zellen aus adulten Gehirnbiospien als Ausgangsgewebe eingesetzt werden. Wie in Tabelle 2 dargestellt, konnten durch enzymatische Behandlung, ausgehend von vier Tumorbiopsien aus dem adulten humanen Gehirn, Zellen isoliert werden. In Abbildung 12 wurden beispielhaft hellfeldmikroskopische Aufnahmen von Gehirnzellen vor und nach der Puromycin-Behandlung dargestellt. Weiterhin sind Zellen zu sehen, welche aus Gehirngewebe ausgewachsen sind und eine eher spindelförmige Morphologie, ähnlich zu Fibroblasten aufweisen (Abbildung 12A). Die nach der enzymatischen Einzelzellisolation ausgesäten Zellen bildeten schon nach ca. 12 h Kultur kleine adhärenente Kolonien aus. Nach 2-tägiger Kultur war die Morphologie der Zellen sehr heterogen und eine sphärenähnliche Abschnürung kleiner Zellaggregate begann ausgehend von den zuvor adhärenent gewachsenen Zellkolonien (Abbildung 12B). Die in



**Abbildung 12: Primäre humane Gehirnzellen**

(A-C) Hellfeldmikroskopische Aufnahmen von primären humanen Gehirnzellen, die aus adulten Tumorbiopsien isoliert wurden, nach 2-tägiger Kultur. Hierbei konnten die Zellen sowohl durch Auswachsen aus Biopsiestücken isoliert werden (A), als auch durch enzymatischen Verdau der Gewebsbiopsien und Aussaat von gewonnenen Einzelzellen (B). Durch Puromycinbehandlung der Zellen sollten Endothelzellen aus dem isolierten Zellgemisch aufgereinigt werden (C). Der Maßstab entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 12B dargestellten Zellen hatten einen neuronalen oder astrozytären Charakter, denn sie bildeten lange, weitverzweigte Zellausläufer aus. In Folge der Puromycinbehandlung der isolierten Einzelzellen waren nur noch kleine Zellkolonien bestehend aus spindelförmigen bis runden Endothelzellen in den Kulturen enthalten. Alle anderen Zellen wurden durch dieses Antibiotikum abgetötet. Die aus humanen Tumorbiopsien des adulten Gehirns erfolgreich isolierten Zellen konnten allerdings nicht in ausreichender Menge in weiterführenden Kulturen proliferiert werden, um diese für Analysen oder sogar den Aufbau von BHS-Modellen einzusetzen. Im Laufe der Kultivierung stoppten die Zellen außerdem ihre Proliferation und starben zum Teil ab.

### 4.2 Charakterisierung humaner induziert pluripotenter Stammzellen

Als Alternative zu dem heterogenen adulten Spendergewebe wurden nachfolgend humane pluripotente und multipotente Stammzellen für den Aufbau der BHS-Modelle verwendet.

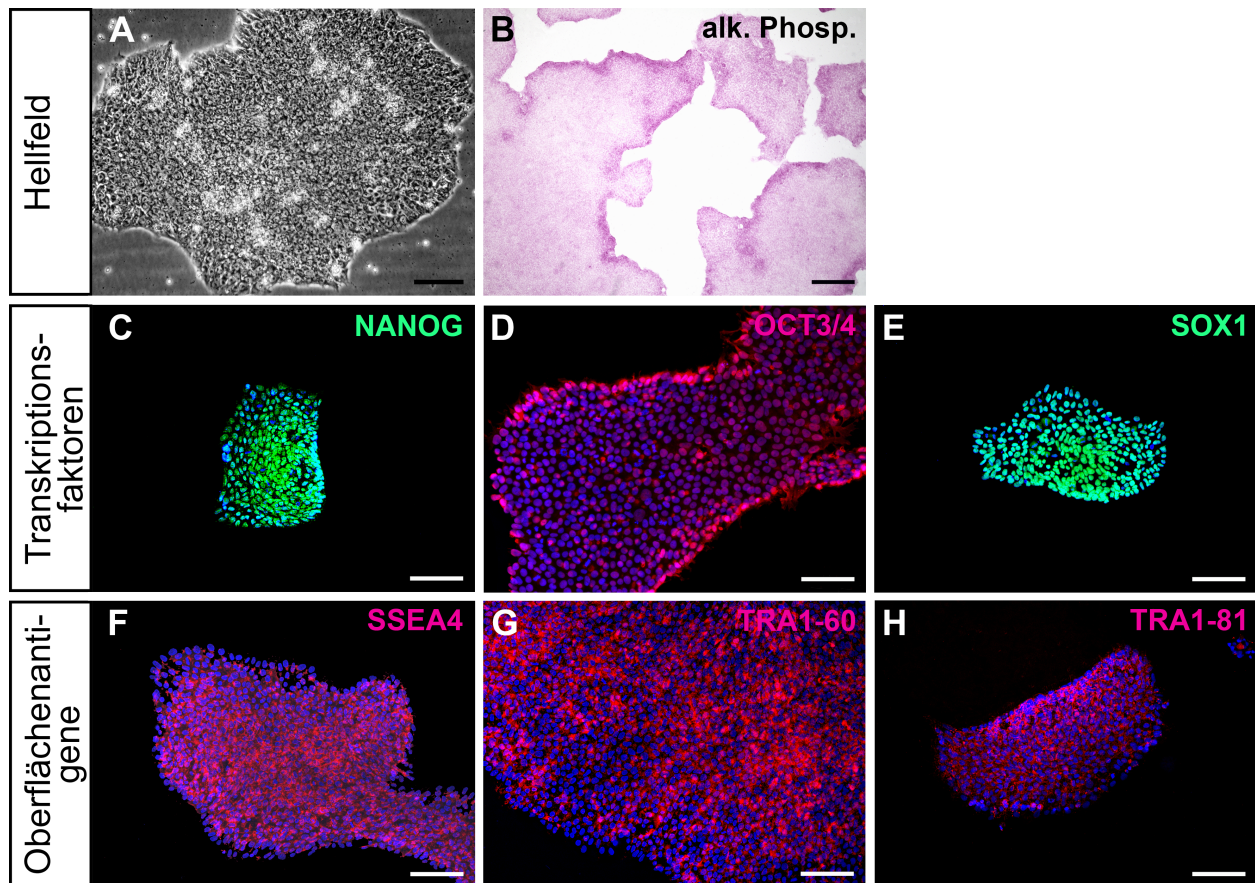
Speziell hiPSCs kamen zum Einsatz, welche in die entsprechenden Zelltypen der BHS differenziert werden sollten. Zielsetzung war es, die Standardisierbarkeit der *in vitro*-Modelle durch Verwendung des gleichen genetischen Ausgangsmaterials für alle Experimente zu erhöhen. Der Zellklon IMR90-4 wurde von WiCell bezogen und feederfrei auf Matrigel™ kultiviert. hiPSC-Kolonien und humane embryonale Stammzellen (hESCs) besitzen eine ähnliche Morphologie. Die Zellen sind sehr klein, haben adhärent einen Durchmesser von ca. 10 bis 15 µm. Der Zellkern nimmt innerhalb der Zellen den größten Platz ein, im Vergleich zu anderen Zellarten ist der Zytoplasmaanteil klein. Die Zellen lagern sich backsteinförmig zu sehr dicht gepackten, kompakten Kolonien zusammen, wobei innerhalb dieser interzellulär keine Zellzwischenräume zu sehen sind. Die Koloniegrenzen sind glatt und

**Tabelle 28:** Übersicht über die quantitativen Ergebnisse der Durchflusszytometrie von humanen induziert pluripotenten Stammzellen.

Antigen	positive hiPSC [%]			MW [%]	STABW [%]
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3		
<b>Transkriptionsfaktoren</b>					
NANOG	96,10	98,00	98,47	97,52	1,25
OCT3/4	95,70	98,20	98,60	97,50	1,57
SOX2	99,90	99,20	99,80	99,63	0,38
<b>Membranantigene</b>					
SSEA4	100,00	99,90	99,70	99,87	0,15
TRA1-60	97,20	95,40	96,30	96,30	0,90
TRA1-81	92,60	83,70	91,40	89,23	4,83

gerade, ohne Zellausläufer und erscheinen im Phasenkontrastmikroskop betrachtet hell leuchtend (vgl. Abbildung 13A). Die Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker der verwendeten hiPSCs wurde vor deren Verwendung zur Differenzierung mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen und durch FACS-Analysen quantifiziert. Hierbei wurden sowohl die Transkriptionsfaktoren NANOG, OCT3/4 und SOX1 untersucht, als auch die Transmembran-Glykoproteine TRA1-60 und TRA1-81 sowie das Carbohydratepitop SSEA4 nachgewiesen. In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren im Zellkern lokalisiert ist. Durchschnittlich exprimieren 99,6 % der Zellen SOX2, 97,5 % der Zellen weisen das Antigen für Nanog auf und 97,5 % der hiPSCs sind positiv für OCT3/4 (vgl. Tabelle 28). Aus Tabelle 28 ist weiterhin ersichtlich, dass die hiPSCs IMR90-4 im Mittel zu 96,3 % TRA1-60-positiv, zu 89,2 % TRA1-81-positiv und zu 99,9 % positiv für SSEA4 waren. Diese Antigene werden membranständig exprimiert, was auch in den Immunfluoreszenzfärbungen in Abbildung 13 zu erkennen ist.

Als Negativkontrollen, die hier nicht dargestellt sind, wurden die entsprechenden Sekundärantikörper ohne Primärantikörper eingesetzt, es war keine unspezifische Färbung der Zellen zu beobachten. Auch die entsprechenden Pluripotenzgene konnten mit Hilfe der qRT-PCR nachgewiesen werden. Ein weiteres Merkmal pluripotenter Stammzellen ist die starke Expression des Enzyms alkalische Phosphatase im Zytoplasma der Stammzellen. Die Phosphatgruppen von Indolylphosphat werden unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert, es entstehen 5-Brom-4-chlorindolyl und Phosphat, wo-



**Abbildung 13: *In vitro* Charakterisierung humaner induziert pluripotenter Stammzellen**

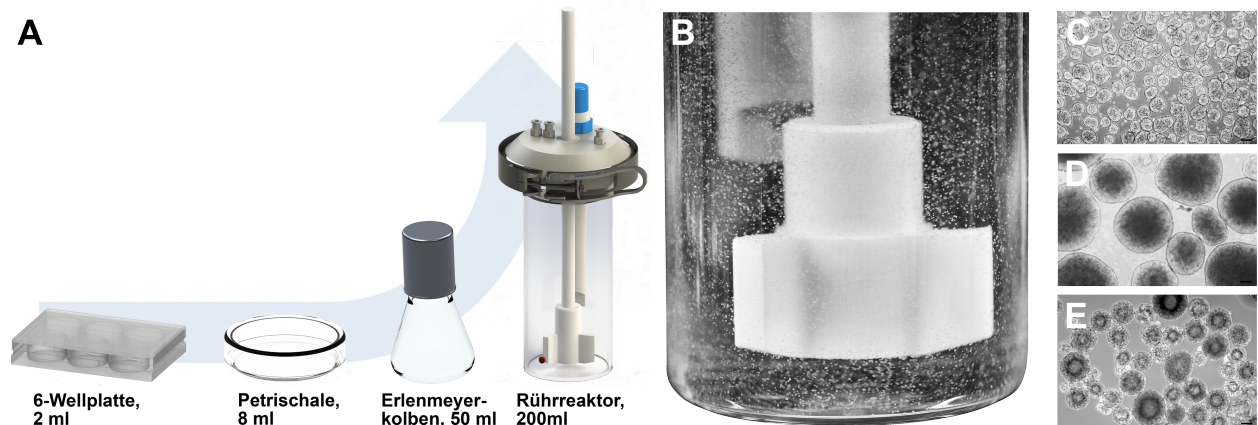
(A) Hellfeldmikroskopische Aufnahme von feederfrei kultivierten hiPSCs. (B) Alkalischer Phosphatase-Test, pluripotente hiPSCs sind violett gefärbt. (C-H) Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis der Expression von Pluripotenz-assoziierten Proteinen in hiPSCs. Die Zellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren (C-E) NANOG (C), OCT3/4 (D), SOX1 (E) sowie die Membranantigene SSEA4 (F), TRA1-60 (G) und TRA1-81 (H). Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Der Maßstab entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

bei das Indoxyl vom Sauerstoff der Luft zu einem blau-violetten Indigo, dem Di-Formazanfarbstoff, oxidiert wird und die pluripotenten Stammzellen färbt (13B).

### 4.3 3D Kultivierung der humanen induziert pluripotenten Stammzellen in einem Rührreaktorsystem

Neben der adhärennten Kultivierung ist auch die Kultur von hiPSCs in Suspension möglich und besonders für die Entwicklung eines späteren Scale-up-Verfahrens von Interesse. Für die Suspensionskultur wurde ein eigens dafür konstruierter Rührreaktor am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin entwickelt, wodurch eine vollautomatische und standardisierte Kultur der hiPSCs ermöglicht werden sollte (Kühn 2014). Dessen Funktionsweise sollte auch im Hinblick auf mögliche Upscaling-Prozesse der hiPSC-Kultur untersucht werden, die bei einem High-Throughput-Screening von Substanzbanken in der Wirkstoff- oder Medikamentenentwicklung sowie der Differenzierung von hiPSCs zu somatischen Zellen für die Transplantatentwicklung nötig sind (Abbildung 14). Hierbei wurden die hiPSCs als Einzelzellen in einer Dichte von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml

in die entsprechenden Suspensionsgefäße ausgesät. Als Referenzen zum selbst konstruierten Rühr-



**Abbildung 14: Suspensionskultur humaner induziert pluripotenter Stammzellen**

(A) Darstellung des Versuchsaufbaus und der zur Verwendung gekommenen Reaktionsgefäße. (B) Homogene Sphärenverteilung im Rührreaktor bei 70 rpm Drehgeschwindigkeit des Rührers. Zur Simulation der hiPSC-Sphären wurden Mikrosphären eingesetzt, welche eine ähnliche Größe aufwiesen, wie die hiPSC-Sphären. (C-E) hiPSCs in Suspensionskultur nach eintägiger (C) und sechstägiger (D) Kultur im Rührreaktor. (E) Größenvergleich der Mikrosphären, welche zu Simulationszwecken anstatt von hiPSCs genutzt wurden. Diese können alternativ auch verwendet werden, um als Carrier zum Adhären von hiPSCs in einer Suspensionskulturumgebung zu dienen. Der Maßstab entspricht 100 µm.

reaktorsystem wurden ebenfalls Suspensionskulturen in kleineren Glasgefäßen angelegt; eingesetzt wurden eine Petrischale und ein Erlenmeyerkolben. Vergleichend zur adhären Standardkultur mit einem Volumen von 2 ml/Well sollte ein kontinuierliches Upscaling der Stammzellkultur in folgenden Volumina untersucht werden: 8 ml Kulturvolumen in der Petrischale, 50 ml im Erlenmeyerkolben und 200 ml im Rührreaktor (Abbildung 14A).

Schon innerhalb der ersten 24 h bildeten sich in allen Suspensionsansätzen kleine Aggregate (Abbildung 14C). Deren durchschnittlicher Durchmesser betrug im Rührreaktor und der Petrischale ca. 120 µm (Abbildung 14C), im Erlenmeyerkolben ca. 160 µm. Im Verlauf der sechstägigen Kultivierung vermehrten sich die hiPSCs durch Zellteilung, wodurch sich der Durchmesser der Aggregate im Rührreaktor und Erlenmeyerkolben auf ca. 260 µm erhöhte (Abbildung 14D). Sie wiesen eine homogene, runde Morphologie mit glatter, gleichmäßiger Kontur auf.

Der Rührreaktor zeichnet sich durch einen speziell konstruierten Rührer aus, welcher mit einer Drehzahl von 70 rpm eine homogene Durchmischung der Zellaggregate (Abbildung 14B), welche durch den Einsatz von Mikrosphären simuliert wurden, und eine gradientenfreie Medienumgebung gewährleistete. Dies sollte mit Hilfe eines Orbitalschüttlers in den anderen Suspensionskulturen ebenfalls simuliert werden. Der pH-Wert und Sauerstoffgehalt im Medium wurden im Rührreaktor in Echtzeit kontinuierlich kontrolliert.

Die Kulturen sollten in ersten Versuchen hinsichtlich der Erhaltung der Pluripotenz der hiPSCs verglichen werden. Anhand von Tabelle 29 wird deutlich, dass die Expression von Pluripotenz-assoziierten Markern der hiPSCs nicht nur durch deren adhären Kultur, sondern auch mit Hilfe der Suspensionskultur erhalten werden kann. Der Vergleich der hiPSCs, welche über sechs Tage im Rührreaktor kultiviert wurde, mit denen der adhären Kontrollkultur sowie den hiPSCs aus der Petrischalen- oder Erlenmeyerkolben-Suspensionskultur zeigte keinen signifikanten Unterschied in

der Expression der Pluripotenzproteine NANOG, SOX2 und SSEA4. Im Durchschnitt waren 95,4 % der hiPSCs nach der sechstägigen Kultur im Rührreaktor positiv für NANOG, 99,9 % SOX2-positiv und 99,8 % der hiPSC weisen SSEA4 auf. Diese Werte waren identisch zu denen der adhärenen Ausgangskultur und der adhärenen Vergleichskultur nach sechs Tagen Kulturdauer. Auch die hiPSCs der Suspensionskulturen aus Petrischale und Erlenmeyerkolben enthielten im Durchschnitt über 98 % pluripotente hiPSCs.

**Tabelle 29:** Nachweis der Expression der Pluripotenzmarker von humanen induziert pluripotenten Stammzellen nach sechstägiger Kultur, Vergleich zwischen adhärenter Standardkultur und 3D Suspensionskultur mittels Durchflusszytometrie,  $n = 3$ .

Kulturart	FACS MW $\pm$ STABW [%]		
	NANOG	SOX2	SSEA4
Ausgangskultur d0	97,77 $\pm$ 2,54	99,93 $\pm$ 0,06	99,73 $\pm$ 0,15
adhärent d6	99,63 $\pm$ 0,15	99,97 $\pm$ 0,06	99,83 $\pm$ 0,21
Petrischale	99,30 $\pm$ 0,56	99,90 $\pm$ 0,00	99,50 $\pm$ 0,61
Erlenmeyerkolben	99,80 $\pm$ 0,17	99,93 $\pm$ 0,06	98,80 $\pm$ 1,35
Rührreaktor	95,40 $\pm$ 6,53	99,87 $\pm$ 0,15	99,83 $\pm$ 0,06

Die Pluripotenz der hiPSCs wurde auch auf Genebene untersucht. In Tabelle 30 sind die relativen Genexpressionen von NANOG, SOX2 und OCT3/4 im Vergleich zwischen den Suspensionsansätzen aus Petrischale, Erlenmeyerkolben und Rührreaktor sowie der adhärenen Kultur nach jeweils sechstägiger Kulturzeit dargestellt. Die Abweichungen in der Genexpression der hiPSCs aus der

**Tabelle 30:** Nachweis der Pluripotenzgene von humanen induziert pluripotenten Stammzellen nach sechstägiger Kultur, Vergleich zwischen adhärenter Standardkultur und 3D Suspensionskultur mittels quantitativer Realtime-Polymerase Kettenreaktion,  $n = 3$ .

Kulturart	relative Genexpression MW $\pm$ STABW		
	NANOG	OCT3/4	SOX2
adhärent d6	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
Petrischale	0,66 $\pm$ 0,14	0,79 $\pm$ 0,19	1,40 $\pm$ 0,75
Erlenmeyerkolben	0,55 $\pm$ 0,22	0,82 $\pm$ 0,18	1,59 $\pm$ 1,32
Rührreaktor	1,17 $\pm$ 0,77	0,76 $\pm$ 0,30	0,73 $\pm$ 0,66

Rührreaktorkultur, verglichen mit adhärent kultivierten hiPSCs an Tag sechs, waren kleiner als  $\pm 27\%$  und somit nicht von biologischer Relevanz. Die Expression von NANOG war sogar um ca. 17% erhöht, die von SOX2 und OCT3/4 hingegen um etwa 27% verringert. Die hiPSC-Expression von NANOG war nach der sechstägigen Kultur in der Petrischale, mit ca. 66%, und im Erlenmeyerkolben, mit ca. 55%, verglichen mit der adhärenen Standardkultur, deutlich erniedrigt. Dies entsprach einer um  $1/3$  verringerten Expression von NANOG nach der Kultur von hiPSCs in der Petrischale und einer sogar um fast die Hälfte reduzierten Expression von NANOG nach der Kultur im Erlenmeyerkolben. Die Expression von OCT3/4 hingegen war in beiden Kulturvarianten nur leicht verringert und mit der, der hiPSCs nach der Rührreaktorkultur vergleichbar. Die Stamm-

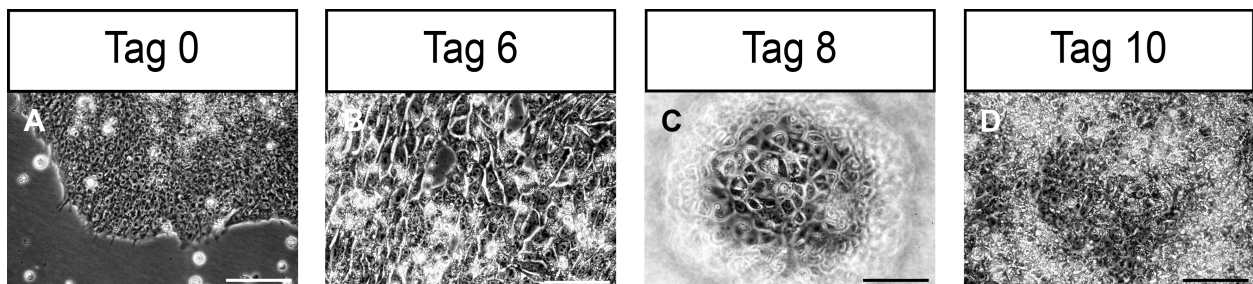


zellen, welche im Rührreaktor kultiviert wurden, wiesen eine im Vergleich zur adhärenenten Kultur geringere Expression von SOX2 auf. Im Unterschied dazu konnte nach der Kultur in der Petrischale eine Steigerung der SOX2-Expression um ca. 40 % und nach der Erlenmeyerkultur sogar um ca. 60 % festgestellt werden.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass mit Hilfe des selbst konstruierten Rührreaktorsystems eine standardisierte Kultivierung undifferenzierter hiPSCs in Form von homogen geformten Aggregaten möglich war. Der Erhalt der Pluripotenz der Zellen nach der Suspensionskultur wurde auf Protein- und Genebene nachgewiesen. Auf Grund des großen Reaktionsvolumens von 200 ml war im Rührreaktor unter den genannten Kulturbedingungen eine Anzucht von bis zu  $1,5 \cdot 10^8$  hiPSCs möglich, wohingegen die Betreuung von 13 bis 25 6-Wellplatten für die gleiche Zellausbeute nötig gewesen wäre, unter der Annahme, eine durchschnittliche Zellausbeute von  $1 \cdot 10^5$  bis  $2 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> bei der adhärenenten Kultur zu erhalten.

#### 4.4 Differenzierung und Charakterisierung von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen

Die kapillaren Endothelzellen stellen als barrierebildende Zellen die wichtigste Komponente der BHS dar. Die Differenzierung der hiPSCs in hiPS-ECs erfolgte analog Protokollen von Lippmann et al. und Wilson et al. (Lippmann et al. 2014; Wilson et al. 2015). Eine homogenere Verteilung und optimale Differenzierung der Zellen wurde durch die Aussaat von  $7,5 \cdot 10^3$  hiPSCs/cm<sup>2</sup> in Form von Einzelzellen gewährleistet. Diese konnten innerhalb der Vorkultur mit mTeSR™1 Medium zu kleinen Kolonien mit einheitlicher Koloniegroße heranwachsen. Vor Beginn des Differenzierungsprozesses wurde die Zellzahl der hiPSCs in einem Referenzwell bestimmt. Nur nach dem Erreichen



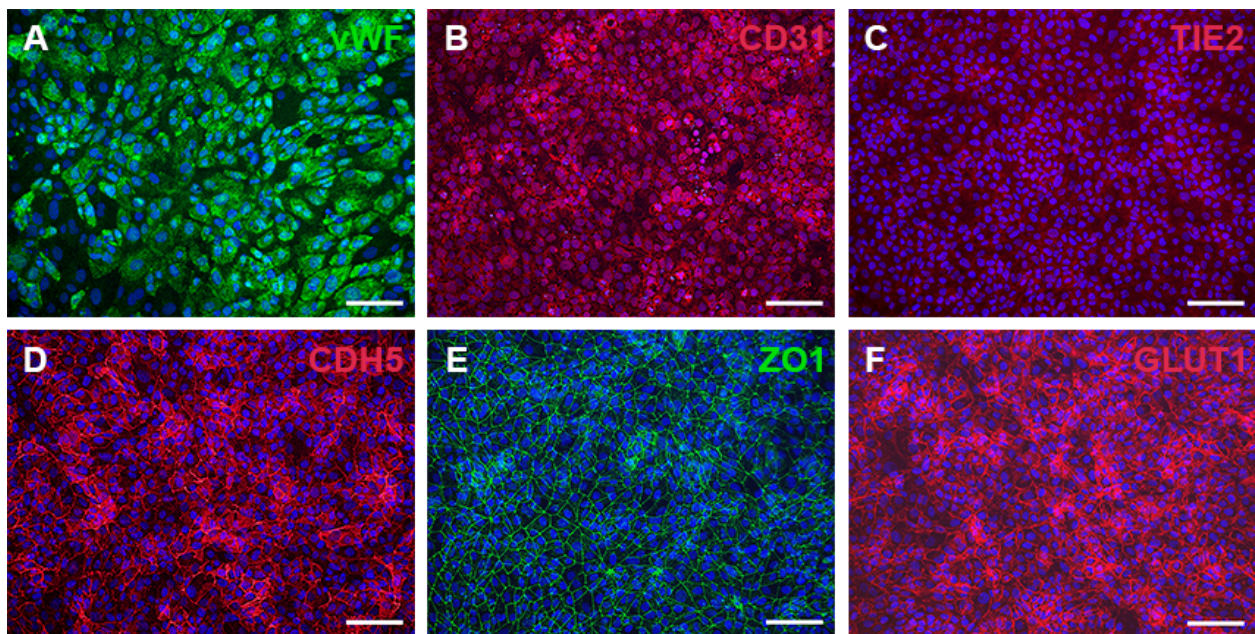
**Abbildung 15: Morphologische Veränderungen der Zellen im Verlauf der Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen zu Endothelzellen**

Hellfeldmikroskopische Aufnahmen im Verlauf der Differenzierung von hiPSCs (A) zu Endothelzellen des Gehirns (D). Morphologische Veränderungen der Zellen, ausgehend von der undifferenzierten Ausgangspopulation vor Beginn der Differenzierung (Tag 0, A), nach sechstägiger Behandlung mit unconditioniertem Medium (B), sowie an Tag 8 (C) und Tag 10 (D) der Differenzierung. Der Maßstab entspricht 100 µm.

einer optimalen Zelldichte von  $2,5 \cdot 10^5$  bis  $3,5 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> wurde die Differenzierung eingeleitet. Somit konnte gewährleistet werden, dass trotz anfänglicher unterschiedlicher Proliferationsraten der hiPSCs auf Grund von Passagenzahl oder anderen Einflussfaktoren homogene Ausgangspopulationen für jede Differenzierung zur Verfügung standen. Die Vorkultur der hiPSCs dauerte durchschnittlich zwei bis drei Tage.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, veränderten sich die hiPSCs im Laufe der endothelialen Diffe-

renzung sehr schnell. Durch die Behandlung der hiPSCs mit unkonditioniertem Medium wurde die Kodifferenzierung neuraler und endothelialer Zellen induziert, was die Ausbildung eines BHS-Phänotyps der Endothelzellen (hiPS-ECs) fördern sollte. Nach sechstägiger Behandlung der Zellen mit unkonditioniertem Medium waren die Zellen, verglichen mit der undifferenzierten hiPSC-Ausgangskultur an Tag 0, deutlich größer und wiesen Zellen sowohl mit langgestreckter, als auch mit endothelzellähnlicher, runder und flacher Morphologie auf. Die endothelialen Zellen, die an Tag 6 der Differenzierung nun ca. 30 % der Zellpopulation ausmachten, sollten im weiteren Differenzierungsverlauf expandiert und selektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt der Differenzierung waren die Zellen meist schon konfluent.



**Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung der aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen differenzierten Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen**

Immunfluoreszenzfärbungen der Endothelzellen des Gehirns, welche aus hiPSCs innerhalb von zehn Tagen differenziert wurden. Die Zellen exprimieren endotheliale Proteine, wie den vWF (A). CD31 (B) und TIE2 (C) werden nur sehr schwach zytoplasmatisch exprimiert. Die Adhärenzverbindung VE-Cadherin (CDH5, D), das TJ-assoziierte Protein ZO1 (E) und der Glukosetransporter 1 (GLUT1, F) konnten ebenfalls mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Der Maßstab entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

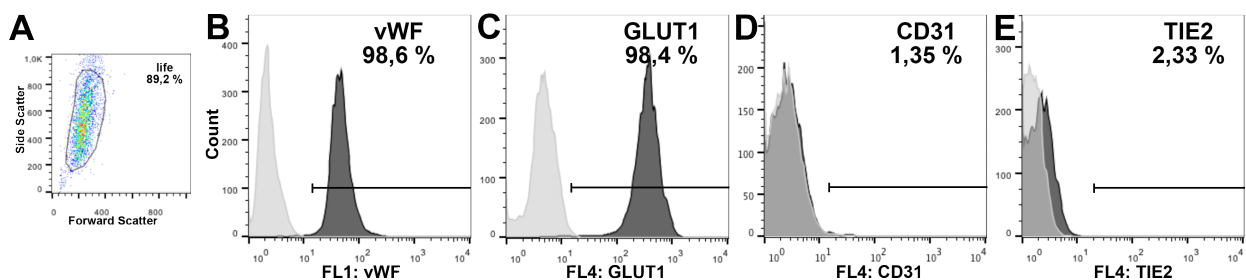
Durch zweitägige Kultivierung der Zellen mit einem Endothelzellmedium, welches neben Platelet-Poor Plasma Derived Serum ebenfalls Wachstumsfaktoren, wie RA und hbFGF enthielt, wurde selektiv die Vermehrung der hiPS-ECs in der Mischkultur stimuliert. An Tag 8 der Differenzierung konnten großflächige Endothelzellkolonien innerhalb des heterogenen, dicht besiedelten Zellrasens beobachtet werden. Außerdem waren die Zellen zu diesem Zeitpunkt oft schon so dicht, dass sie begannen an mehreren Stellen dreidimensional übereinander zu wachsen. Hierbei war auffällig, dass besonders die flachen backsteinförmigen Endothelzellkolonien von solchen Multilayern umkapselt wurden.

Durch eine Subkultivierung auf einer Kollagen/Fibronectin-beschichteten Zellkulturoberfläche erfolgte eine Selektion der hiPS-ECs aus der Mischkultur sowie deren Ausbildung eines konfluenten



Monolayers mit sehr dicht gepackten hiPS-ECs ohne interzelluläre Zwischenräume. Beim Ablösen der Zellen an Tag 8 der Differenzierung von der Matrigel<sup>®</sup>-beschichteten Zellkulturoberfläche war auffällig, dass die Zellen über sehr starke Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte verfügten, die deren Vereinzelung nur mit Hilfe einer 30-minütigen Accutase<sup>®</sup>-Inkubation und mechanischer Hilfe durch starkes Resuspendieren ermöglichten.

Nach der insgesamt zehntägigen Differenzierung konnten die Endothelzellen vor deren Verwendung für weiterführende Versuche und dem Aufbau von BHS-Modellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert werden (Abbildung 16). Die Expression der Proteine wurde ebenfalls mittels durchflusszytometrischer Analyse quantifiziert. 98,6 % der Zellen waren positiv für das endotheliale Protein vWF (Abbildung 17B), auch zwei weitere endothelzellspezifische Proteine, CD31 und TIE2, konnten in den Immunfluoreszenzfärbungen detektiert werden (Abbildung 16B und C). Allerdings war die spezifische Färbung dieser Proteine an der Membran der Zellen sehr schwach und wurde durch diffuse Färbungen im Zytoplasmabereich der Zellen überstrahlt. Ein Nachweis der Proteine CD31 und TIE2 war trotz Verwendung mehrerer verschiedener Antikörper und Färbeprotokolle mittels Durchflusszytometrie nicht möglich (Abbildung 17D und E). Weiterhin wurden endothelzellspezifische Adhärenzverbindungen in Form von VE-Cadherin (Cadherin 5) zwischen den differenzierten Zellen nachgewiesen (Abbildung 16D). Auch das TJ-assoziierte Protein ZO1 wurde exprimiert (Abbildung 16E), wobei dieses sehr kontinuierlich an den Zellgrenzen der Endo-



**Abbildung 17: Quantitative durchflusszytometrische Analyse der aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen differenzierten Endothelzellen**

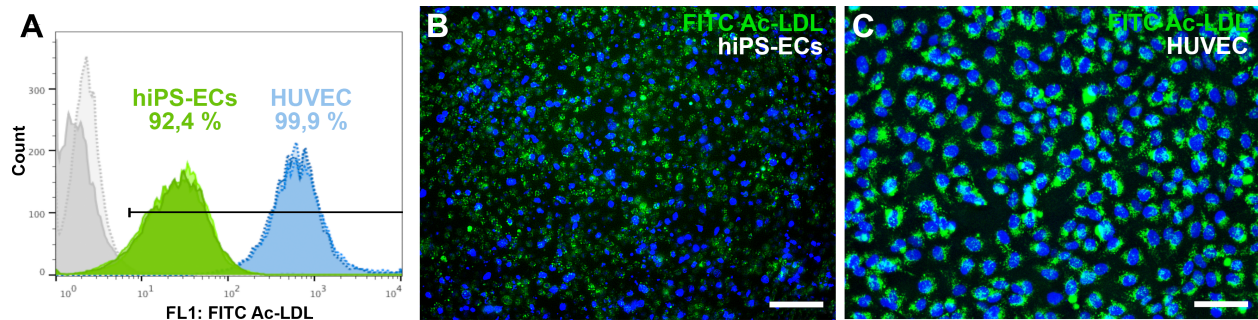
(A) Darstellung des life gates der Endothelzellen in Dot Plot nach Auftrennung durch den Side und Forward Scatter. Histogrammbasierte quantitative Analyse der Zellen. Nach der Färbung der Zellen mit FACS-Antikörpern, waren innerhalb der zu analysierenden Populationen 98,6 % der Zellen positiv für vWF, 98,4 % positiv für GLUT1, lediglich bei 1,35 % der Zellen konnte CD31 und bei 2,33 % der analysierten Zellen TIE2 detektiert werden.

thelzellen über den gesamten Zellrasen hinweg gebildet wurde. Unterbrechungen dieser netzartig ausgebildeten Formationen waren nicht zu erkennen.

Ein für das BHS-Endothel sehr wichtiges Transporterprotein wurde ebenfalls sehr stark exprimiert. Etwa 98 % GLUT1 positive Zellen wurden quantifiziert (Abbildung 17C). Dieser Transporter wurde ebenfalls in der Membran der Endothelzellen exprimiert (Abbildung 16F).

Auch eine funktionelle Charakterisierung der hiPS-ECs wurde durchgeführt. Hierbei wurde deren Fähigkeit zur Aufnahme von Ac-LDL und zur Tube-Bildung auf Matrigel beurteilt.

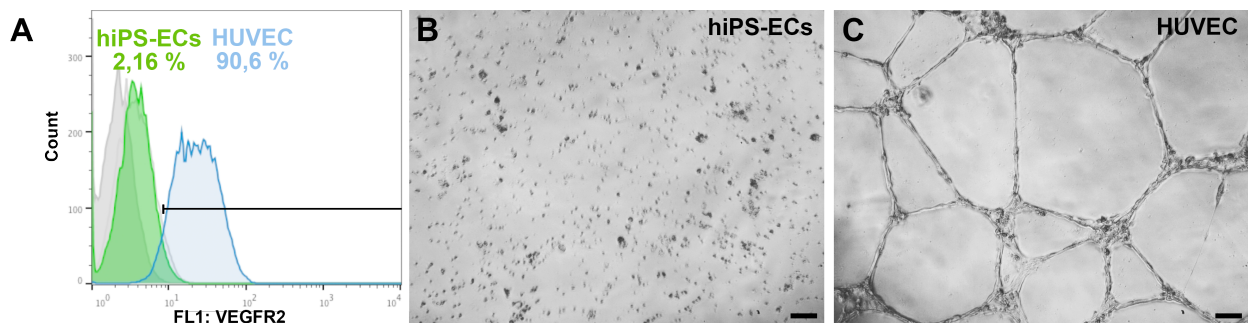
Ein Merkmal funktioneller Endothelzellen ist es, acetyliertes LDL metabolisieren zu können. Wie in Abbildung 18 zu sehen, waren die aus hiPSCs differenzierten BHS-Endothelzellen in der Lage, das FITC-gekoppelte Ac-LDL innerhalb von 4 h aufzunehmen (Abbildung 18B). Doch im Vergleich zur



**Abbildung 18: Funktionelle Charakterisierung der Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen mittels Testung der Aufnahme von FITC Ac-LDL im Vergleich zu HUVEC**

(A) Beispielhafte Quantifizierung der hiPS-ECs und HUVEC, welche FITC Ac-LDL aufgenommen hatten, mittels Durchflusszytometrie. (B-C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von hiPS-ECs (B) und HUVEC (C) nach der FITC Ac-LDL-Aufnahme. Der Maßstab entspricht 100 µm.

Kontrollzelllinie HUVEC (Abbildung 18C), war die Fluoreszenzintensität der Zellen nach mikroskopischer Kontrolle deutlich schwächer und nicht alle differenzierten Zellen hatten die LDL-Moleküle innerhalb der vierstündigen Inkubationszeit aufgenommen. Anhand einer beispielhaften Quantifizierung der Zellen einer Versuchsreihe mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 18A) konnten diese Beobachtungen belegt werden. 92,4% der hiPS-ECs hatten das FITC-Ac-LDL aufgenommen, wobei die Fluoreszenzintensität dieser Zellen bei lediglich  $2 \cdot 10^1$  relativen Einheiten lag. Vergleichend dazu hatten in diesem Versuch 99,9% der HUVEC das LDL metabolisiert und wiesen mit einer mittleren Intensität von ca.  $6 \cdot 10^2$  relativen Einheiten eine stärkere FITC-Ac-LDL-Aufnahmerate auf. Im Durchschnitt konnten innerhalb von drei unabhängigen Versuchen  $88,8 \pm 9$  % der BHS-EC und  $99,6 \pm 0,4$  % der HUVEC das modifizierte LDL aufnehmen.



**Abbildung 19: Funktionelle Charakterisierung der Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen mittels VEGF-induzierter Anregung zur Gefäßbildung und durchflusszytometrischer Nachweis des VEGFR2 im Vergleich zu HUVEC**

(A) Quantifizierung nach durchflusszytometrischer Analyse der hiPS-ECs und HUVEC für die Expression des VEGFR2, welcher für die Fähigkeit zur Gefäßbildung essentiell ist. (B-C) Hellfeldmikroskopische Aufnahmen von hiPS-ECs (B) und HUVEC (C) nach 48-stündiger Behandlung mit VEGF. Im Gegensatz zu den HUVEC, war bei den hiPS-ECs keine Gefäßbildung zu beobachten. Der Maßstab entspricht 100 µm.

Nach Stimulation mit VEGF waren die differenzierten hiPS-ECs jedoch nicht in der Lage auf Matrigel gefäßartige Strukturen auszubilden (Abbildung 19B). Die Zellen starben im Verlauf der 48-stündigen Behandlung ab. Im Vergleich dazu bildeten die Kontrollzellen HUVEC auf Matrigel ein weitverzweigtes Gefäßsystem aus (Abbildung 19C). Um die Ursache für die fehlende Fähig-

keit der Gefäßbildung zu begründen, wurden durchflusszytometrische Färbungen zum Nachweis des VEGFR2 gemacht. Die Quantifizierung ergab, dass 90,6 % der HUVEC den VEGFR2 besaßen, aber nur 2,16 % der hiPS-ECs waren positiv für dieses Protein.

#### **4.5 Neuronale Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen und Isolation fetaler neuraler Stammzellen**

Ein ca. 12 Wochen langer Differenzierungsprozess ist unter Verwendung von Standardprotokollen nötig, um *in vitro* aus pluripotenten Stammzellen, wie hiPSCs, reife Astrozyten zu generieren. Hierbei werden die Entwicklungsschritte der Embryogenese imitiert und die Differenzierung pluripotenter Stammzellen erfolgt schrittweise über die Bildung vom primitiven Neuroepithel bis hin zu neuronalen Progenitoren, welche tripotent sind und innerhalb einer drei- bis vier-monatigen Differenzierung zu GFAP-exprimierenden Astrozyten heranreifen (Liu und Zhang 2011). Diese Differenzierung sind nicht nur zeit-, sondern auch arbeitsaufwändig, da hier die Stammzellen, ausgehend von Feederkulturen, meist unspezifisch in Form von Aggregaten oder Embryoid Bodies (EBs) differenziert werden. Diese wachsen dann auf speziellen Beschichtungen aus und bilden neuronale Rosetten, welche gepickt werden müssen, um diese weiter differenzieren zu können (Hu und Zhang 2009). Yan et al. entwickelte 2013 allerdings eine effiziente und schnelle Methode, mit Hilfe derer hiPSCs in adhärenter Kultur in frühe neurale Stammzellen (NSCs) differenziert werden können (Yan et al. 2013). Diese Methode wurde in den hier durchgeführten Experimenten etabliert. Ausgehend von feederfreien hiPSC-Kulturen erfolgte eine Einschrittdifferenzierung mit Hilfe eines PSC-Neuralen-Induktions-Mediums. Nach einer Differenzierungszeit von lediglich sieben Tagen und anschließender fünftägiger Expansion hatten sich hiPS-NSCs gebildet.

Die NSCs, welche aus hiPSCs differenziert wurden, wiesen ein hohes Prolifertionspotential auf. Alle zwei bis drei Tage hatte sich deren Zellzahl verdreifacht. Im Laufe der neuralen Differenzierung veränderten sich die hiPSCs morphologisch stark. Besonders innerhalb der ersten zwei Tage wurden die Zellen innerhalb der Kolonien deutlich größer im Durchmesser und bekamen eine rundere Morphologie. Nach der siebentägigen neuralen Induktion waren die Zellen zu einem konfluenten Monolayer mit uniformer Morphologie herangewachsen. Nach der Expansion und EGF/FGF-Stimulation lagerten sich die hiPS-NSCs in Form neuronaler rosetten-ähnlicher Strukturen zusammen.

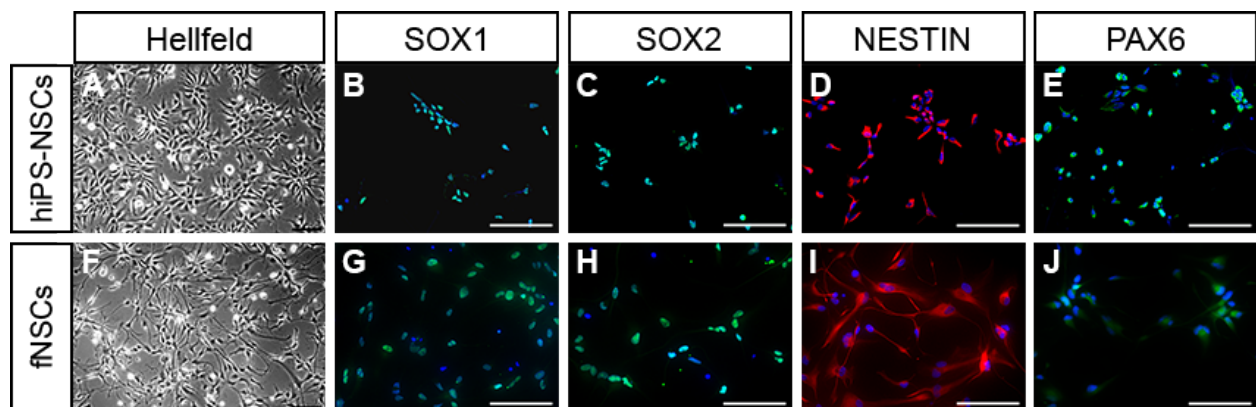
Neben den hiPS-NSCs wurden auch multipotente neurale Stammzellen für die Versuche verwendet, welche aus fetalen Gehirnen isoliert wurden (fNSCs).

Es konnten zweimal erfolgreich neuronale Gewebeteile nach Interruptionen in der 11. (Versuch 1) und 12. (Versuch 2) Schwangerschaftswoche präpariert werden. Allerdings war das Gewebe nicht mehr intakt und konnte somit keinem Gehirnareal zugeordnet werden. In der ersten Präparation konnten  $2,1 \cdot 10^5$  Zellen isoliert werden, in der zweiten Präparation wurde mehr neuronales Gewebe identifiziert und die Zellausbeute nach der Isolation betrug  $5 \cdot 10^6$  Zellen. Nach 13-tägiger Kultur der fNSCs aus der zweiten Präparation wiesen diese eine Konfluenz von 80 % auf und wurden das erste Mal passagiert. Die Anzahl der lebenden Zellen hatte sich nun um das 2,4-fache im Vergleich zur ausgesäten Zellzahl gesteigert, wobei darauf hinzuweisen ist, dass die isolierten neuronalen Zellen durch die gewählten Kulturbedingungen apoptotisch wurden und nur die fNSCs überleben konnten.

Auch in der darauffolgenden Passage konnte die Zellzahl der fNSCs innerhalb von 10 Tagen um das 2,4-fache gesteigert werden.

#### 4.5.1 *In vitro* Charakterisierung neuronaler Stammzellen

Verglichen mit der rosettenähnlichen Koloniebildung der hiPS-NSCs, welche sich in der adhärenenten Kultur kegelartig zusammenlagerten und keine Zellausläufer bildeten, war die Morphologie der aus dem fetalen Gehirngewebe isolierten fNSCs auch nach mehrmaligem Passagieren heterogen. Einige Zellen wiesen eine langgestreckte Form mit großen Zellausläufern auf, die neuronalen Zellen oder Radialglia ähnelten. Durch die Kultivierung der NSCs in neuralem Stammzellmedium, unter dem Einfluss von hbFGF und EGF, wurden die frühen neuronalen Stammzellen weiter expandiert, differenzierte Zellen sind durch die Passagiervorgänge eliminiert worden. NSCs sind zur Langzeitexpansion in der Lage, das bedeutet, dass mindestens 100 Passagen dieser Zellen *in vitro* möglich sind (Conti und Cattaneo 2010). Für die im Folgenden dargestellten Experimente wurden die hiPS-NSCs bis zu einer Passagenzahl von 27, die fNSCs bis Passage 5 verwendet.



**Abbildung 20: *In vitro* Charakterisierung humaner neuronaler Stammzellen**

(A, F) Hellfeldmikroskopische Aufnahmen von hiPS-NSCs (A) in Passage 20 und fNSCs isoliert aus fetalen Gehirnbiospien nach Interruption in der 11. Schwangerschaftswoche, Passage 3. (B-E, G-J) Immunfluoreszenzaufnahmen neuronaler Proteine. In beiden Arten neuronaler Zellen wurden die Transkriptionsfaktoren SOX1 (B, G), SOX2 (C, H) und PAX6 (E, J) exprimiert. Auch das Intermediärfilament NESTIN (D, I) konnte detektiert werden. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Der Maßstab entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

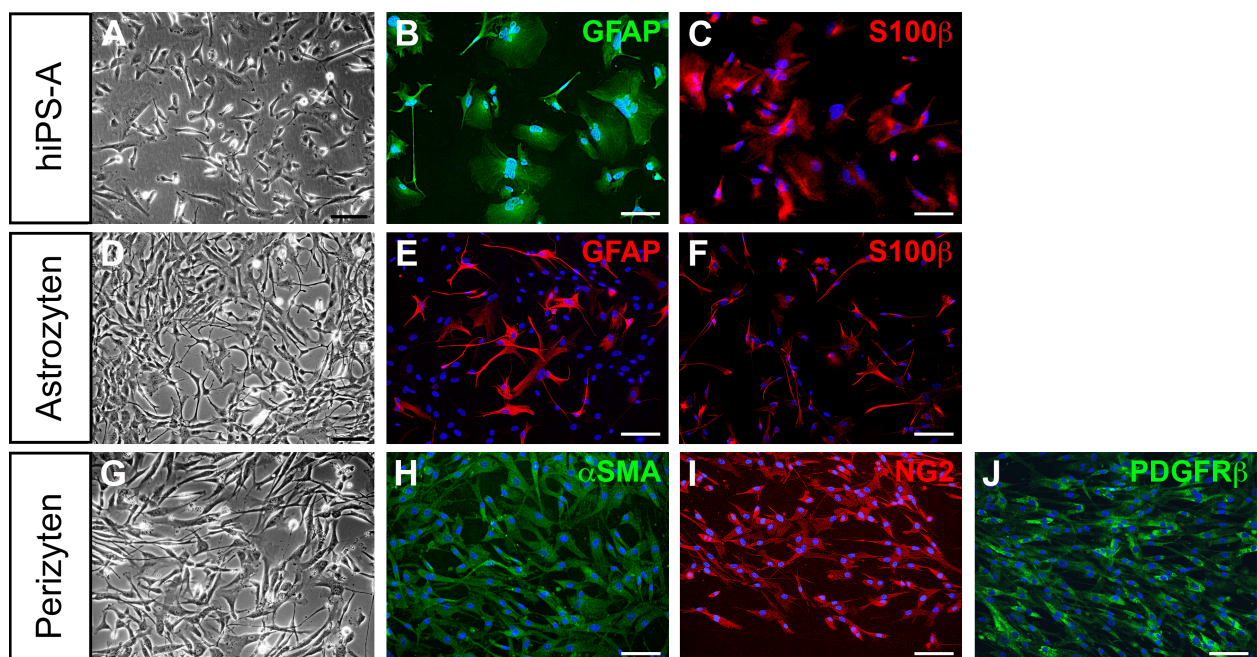
Beide Zellarten konnten durch das Vorhandensein von neuronalen Stammzellproteinen, wie den Transkriptionsfaktoren SOX1, SOX2, PAX6 und dem Intermediärfilament NESTIN charakterisiert werden. Pluripotenzmarker, wie SSEA4 oder TRA1-81, oder gliale Proteine, wie GFAP und S100 $\beta$ , hingegen wurden nicht identifiziert. Hierbei ist in Abbildung 20 zu erkennen, dass ca. 90% der Zellen SOX1 und SOX2 positiv waren, NESTIN wurde von nahezu allen Zellen exprimiert und PAX6-positiv waren ca. 50 bis 70% der NSCs. Die Färbung mit Hilfe des PAX6-Antikörpers war, im Vergleich zu SOX1 und SOX2, nicht nur spezifisch auf den Zellkern begrenzt, auch Zellausläufer in Form von Membran- oder Zytoplasmabestandteilen waren durch diesen Antikörper schwach angefärbt. Sowohl die Zellen, welche aus hiPSCs differenziert wurden, als auch die fetalen Zellen



konnten trotz ihrer starken morphologischen Unterschiede mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen als NSCs charakterisiert werden.

#### 4.5.2 *In vitro* Charakterisierung humaner differenzierter Astrozyten und Perizyten

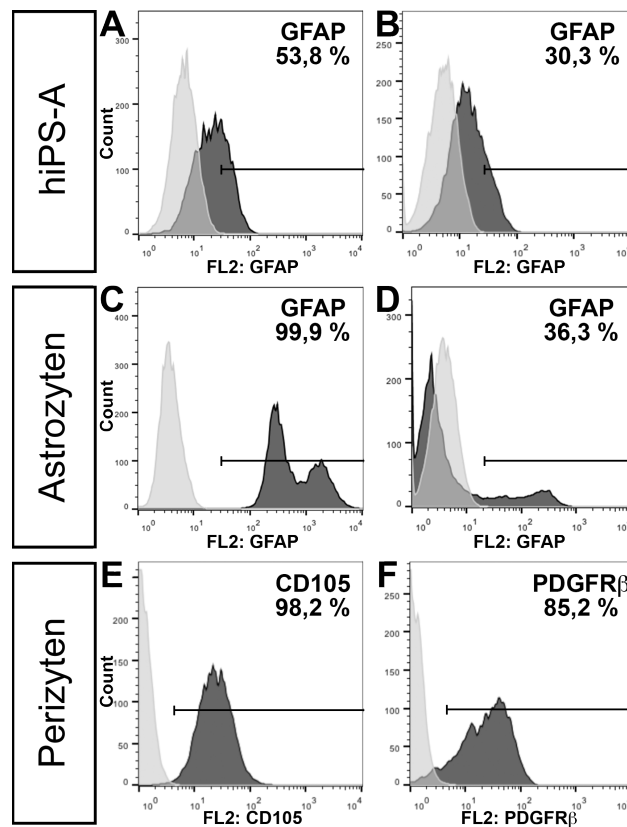
Die hiPS-NSCs konnten mit Hilfe eines Protokolls nach Reinhardt et al. in Astrozyten differenziert werden (Reinhardt et al. 2013). Durch die Verwendung spezifischer Wachstumsfaktoren, wie hbFGF, EGF und CNTF wird die direkte Astrozytendifferenzierung stimuliert. Im Vergleich zu spontanen Differenzierungen, durch die alleinige Verwendung von FCS in diversen Konzentrationen, werden schnellere und spezifischere Reifungsprozesse induziert. Innerhalb von nur 30 Tagen wurden GFAP-exprimierende Astrozyten aus NSCs differenziert. Mit Hilfe herkömmlicher Proto-



**Abbildung 21: *In vitro* Charakterisierung humaner differenzierter Astrozyten und Perizyten** (A, D, G) Hellfeldmikroskopische Aufnahmen humaner Astrozyten, welche aus hiPSCs differenziert wurden (hiPS-A), in Passage 2 nach der Differenzierung (A), fetaler primärer Astrozyten, Passage 1 (D) und fetaler primärer Perizyten, Passage 4 (G). (B-C, E-F, H-J) Immunfluoreszenzfärbungen typischer Proteine für reife Astrozyten (A-F) und Perizyten (G-J). Sowohl die hiPSC-A, als auch die fetalen Astrozyten exprimierten das Intermediärfilamentprotein GFAP (B, E) und das kalziumbindende Protein S100 $\beta$  (C, F). Fetale primäre Perizyten konnten mit Hilfe positiver Färbungen gegen  $\alpha$ SMA (H), NG2 (I) und PDGFR $\beta$  (J) charakterisiert werden. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m.

kolle werden hierfür neun bis zehn Wochen benötigt.

Während der Differenzierung verändern sich die hiPS-NSCs schon innerhalb der ersten zwei Tage morphologisch sehr stark. Durch die Behandlung mit N-2 Supplement, B-27<sup>®</sup>-Supplement, sowie hbFGF und EGF entstand innerhalb von zwei Tagen ein konfluenter Zellmonolayer, der sich morphologisch sehr stark von der Ausgangspopulation unterschied. Die Zellen waren nun eher flach und backsteinförmig aneinander gelagert. Im N2-Medium unter dem Einfluss von CNTF bildeten sich erste kurze Zellausläufer aus, wobei die meisten Zellen nun tripolar waren. Vereinzelt konnten auch



**Abbildung 22: Quantitative durchflusszytometrische Analyse der differenzierten Astrozyten und Perizyten**

Direkt nach der Differenzierung waren 53,8 % der hiPS-A GFAP positiv (A), nach 14-tägiger *in vitro* Kultur der ausdifferenzierten Zellen ging die Präsenz von GFAP auf 30,3 % (B) zurück. Auch die primären fetalen Astrozyten verloren im Verlauf der Kultivierung das Protein GFAP, es ging von 99,9 % (C) auf 36,3 % (D) zurück. Die humanen primären fetalen Perizyten waren zu 98,2 % positiv für CD105 und 85,2 % der Zellen waren PDGFR $\beta$ -positiv.

sehr große, runde und flache Zellen identifiziert werden. Die Heterogenität bezüglich der Zellmorphologie stieg. Die Wachstumsfaktoren CNTF und dbcAMP führten zur Reifung der Astrozyten und der Ausbildung einer *in vivo*-ähnlichen Morphologie sowie Funktionalität.

In Abbildung 21A und D sind hellfeldmikroskopische Aufnahmen von hiPS-A und fetalen primären Astrozyten dargestellt. Morphologisch ließen sich Unterschiede erkennen. Die Astrozyten (Abbildung 21D) wiesen größtenteils eine längliche, spindelförmige Morphologie auf, welche mit Fibroblasten zu vergleichen war. Einige Zellen besaßen auch lange Ausläufer, welche typisch für Astrozyten, in alle Richtungen ragten. Wiederum andere Zellen in der heterogenen Population waren flach und groß, ohne jegliche Ausläuferbildung.

Im Vergleich dazu wirkten die hiPS-A gedrungener, sie bildeten meist nur zwei bis drei kurze Ausläufer pro Zelle aus. Besonders in den Immunfluoreszenzfärbungen waren auch hier sehr breite, eher runde Zellmorphologien zu betrachten. Mit Hilfe von Antikörperfärbungen konnten beide Astrozytenarten charakterisiert werden. Die Zellen waren positiv für S100 $\beta$ , auch GFAP konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen (Abbildung 21B-C, E-F) detektiert werden.

Die genaue Quantifizierung der GFAP-positiven Zellen innerhalb beider Populationen wurde mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt. Direkt nach der Differenzierung betrug

der Anteil GFAP-positiver hiPS-A 53,8 %, nach 14-tägiger *in vitro*-Kultivierung allerdings konnte ein Abfall der GFAP-positiven hiPS-A auf 30,3 % beobachtet werden (vgl. Abbildung 22A-B). Ähnlich verhielten sich die fetalen, primären Astrozyten (Abbildung 22C-D), auch hier war ein Abfall des Anteils GFAP-exprimierender Astrozyten mit zunehmender Kulturzeit zu verzeichnen.

Für die Versuche sollten zudem auch Perizyten zum Einsatz kommen, welche für die Barriereintegrität der BHS neben den Astrozyten und neuronalen Zellen ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. Auch diese Zellen bildeten *in vitro* eine morphologisch eher heterogene Population aus. Zumeist waren spindelförmige, langgestreckte Zellen zu erkennen (Abbildung 21G).

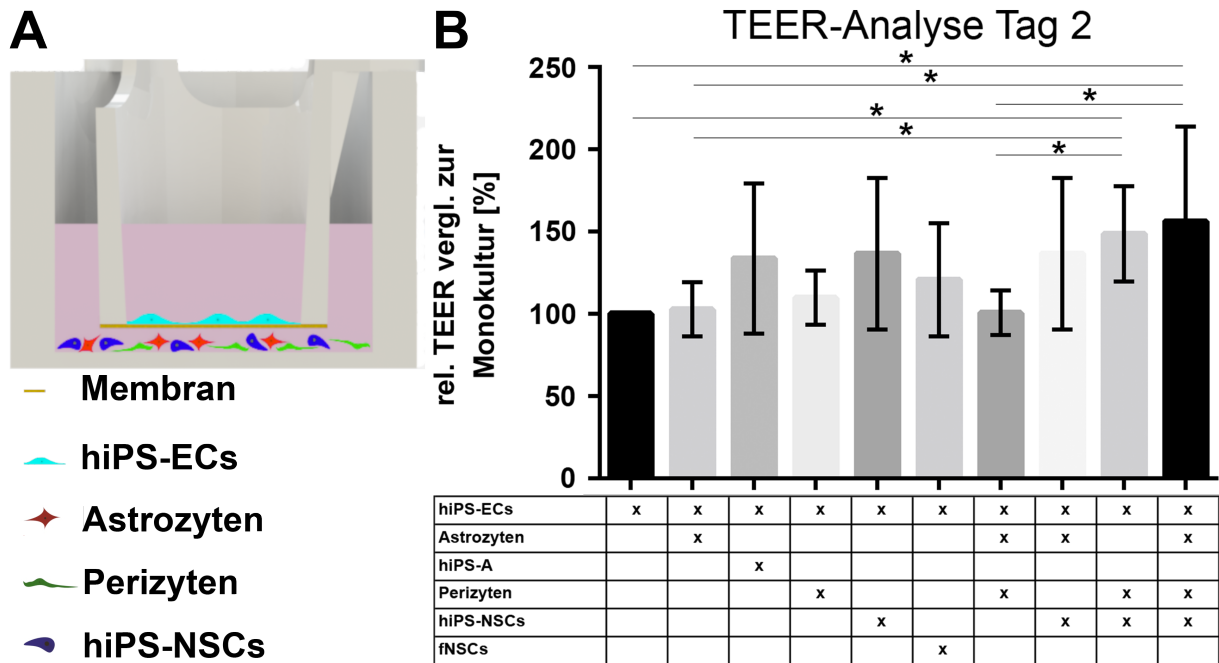
Da die Identität von Perizyten bis heute noch nicht vollständig geklärt ist, existieren auch keine spezifischen Marker zur Charakterisierung dieser Zellen. Allerdings ist, ähnlich wie bei mesenchymalen Stammzellen, eine Palette an Proteinen beschrieben, die zur Identifikation der Perizyten eingesetzt werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Perizyten waren positiv für  $\alpha$ SMA und NG2, was anhand der Immunfluoreszenzaufnahmen in Abbildung 21H-I zu erkennen ist. Zudem wurden mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen (Abbildung 22E-F) 98,2 % CD105-positive Zellen sowie 85,2 % PDGF $\beta$ -positive Zellen als Perizyten quantifiziert.

#### 4.6 Etablierung und Qualifizierung humaner Blut-Hirn-Schranken-Modelle

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Zellarten auf die Barriereintegrität des BHS-Endothels, wurden unterschiedliche BHS *in vitro*-Modelle auf Basis der zuvor beschriebenen Zelltypen aufgebaut. Wie in Abbildung 23A schematisch dargestellt, wurden die hiPS-ECs auf einem mit Kollagen IV und Fibronectin beschichteten Transwellinsert ausgesät und mit den Kokulturzellen zusammengebracht. Die Endothelzellen im apikalen Kompartiment der Modelle und die auf der basolateralen Seite, also am Boden der Wellplatte, adhärierenden Kokulturzellen wurden durch die semipermeable Membran der Transwellinserts voneinander getrennt. Die Kokulturzellen hatten keinen direkten Kontakt zu den Endothelzellen. Im basolateralen Kompartiment wurden unabhängig von der Zellart immer exakt die gleiche Gesamtzellzahl eingebracht und für 24 h ohne hiPS-ECs vor-kultiviert, um eine Konfluenz von ca. 70 % zu erreichen. Es wurden Kokulturen, Tripelkulturen und Quadrupelkulturen aufgebaut sowie mit den Monokulturen, welche nur aus hiPS-ECs bestanden, in ihren Eigenschaften verglichen. Im Folgenden wird die Zusammensetzung der einzelnen Kulturarten genauer beschrieben: Kokulturen wurden bestehend aus hiPS-ECs und Astrozyten, hiPS-ECs und hiPS-A, hiPS-ECs und Perizyten, hiPS-ECs und hiPS-NSCs sowie hiPS-ECs und fNSCs aufgebaut. Für die Tripelkulturen wurden hiPS-ECs mit Astrozyten und Perizyten, Astrozyten und hiPS-NSCs oder Perizyten und hiPS-NSCs kombiniert. Final wurde auch eine Quadrupelkultur bestehend aus hiPS-ECs, Astrozyten, Perizyten und hiPS-NSCs etabliert (vgl. Tabelle 17).

Der TEER-Wert wurde unter konstanten Versuchsbedingungen immer direkt nach dem Medienwechsel in auf 37 °C vorgewärmten EC-Medium durchgeführt. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich der Ergebnisse. Die Messungen des TEER erfolgten in jedem Versuch 24 h und 48 h nach Aussaat der Endothelzellen auf die beschichteten Insertmembranen. Die gemessenen Werte nach 24-stündiger Kultivierung lagen durchschnittlich meist ca. 30 bis 50 % unter den nach 48-stündiger Kultur gemessenen Werten.

Es konnten zudem Beobachtungen hinsichtlich des Materials, auf dem die hiPS-ECs adhärieren soll-



**Abbildung 23: Aufbau von Blut-Hirn-Schranken-Modellen in Transwellssystemen und Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands**

(A) Schematische Darstellung des Aufbaus der *in vitro* BHS-Modelle mit Hilfe von Transwellssystemen. Die Endothelzellen im apikalen Bereich sind durch eine semipermeable Membran von den Kokulturzellen im basolateralen Kompartiment getrennt. (B) Messungen des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) der Endothelzellen unter Einfluss der Kokulturzellen in relativen Änderungen verglichen zur Endothelzellmonokultur [%]. Hierbei wurden zehn verschiedene Modellsituationen miteinander verglichen. Die Messung des TEER erfolgte am zweiten Tag nach der Aussaat der Endothelzellen auf der Insertmembran. Die TEER-Werte wurden als  $MW \pm STABW$  dargestellt,  $n = 4$ , wobei jedes biologische Replikat eine neue Differenzierung darstellt, innerhalb eines biologischen Replikates wurden Duplikate der Modelle aufgebaut. Die statistische Signifikanz wurde durch eine ANOVA nach manueller, blockweiser Mittelwertkorrektur sowie einen anschließenden Mehrfachvergleich der Mittelwerte durch einen Tukey-H-SD-Test beurteilt ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ).

ten, gemacht werden: Trotz der speziellen Kollagen IV/Fibronectin-Beschichtung adhärten die hiPS-ECs lediglich auf Standardzellkulturoberflächen aus Polystyrol oder den speziellen Corning® Transwell® Zellkulturinserts mit Polyethyleneterephthalat (PET)-Membran von Sigma-Aldrich. Die Insertmembranen wurden laut Hersteller einer CT-Oberflächenbehandlung unterzogen, was eine verbesserte Adhärenz der Zellen gewährleistet. Auf Glasoberflächen und anderen Transwellmembranmaterialien diverser Hersteller, wie Greiner oder Millipore, adhärten die Zellen nicht. Es wurden unterschiedliche Porendurchmesser ( $1 \mu\text{m}$  und  $0,4 \mu\text{m}$ ) und Membranmaterialien, wie PET und Polytetrafluorethylen (PTFE), getestet. Die TEER-Werte waren bei Verwendung dieser Insertmembranen allerdings überaus niedrig, sie lagen bei 0 bis  $20 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , die Zellen waren also kaum oder gar nicht adhärnt.

Im Diagramm in Abbildung 23B ist der relative TEER als Vergleich zwischen der hiPS-EC-Monokultur (TEER = 100 %) und den Endothelzellen der Kokulturen an Tag 2 dargestellt. Eine signifikante TEER-Erhöhung konnte durch die Stimulation der hiPS-ECs in der Tripelkultur mit Perizyten, Astrozyten und hiPS-NSCs sowie der Quadrupelkultur in Kombination mit Astrozyten,



Perizyten sowie hiPS-NSCs erzielt werden. In Tabelle 31 wird ersichtlich, das in den Versuchen

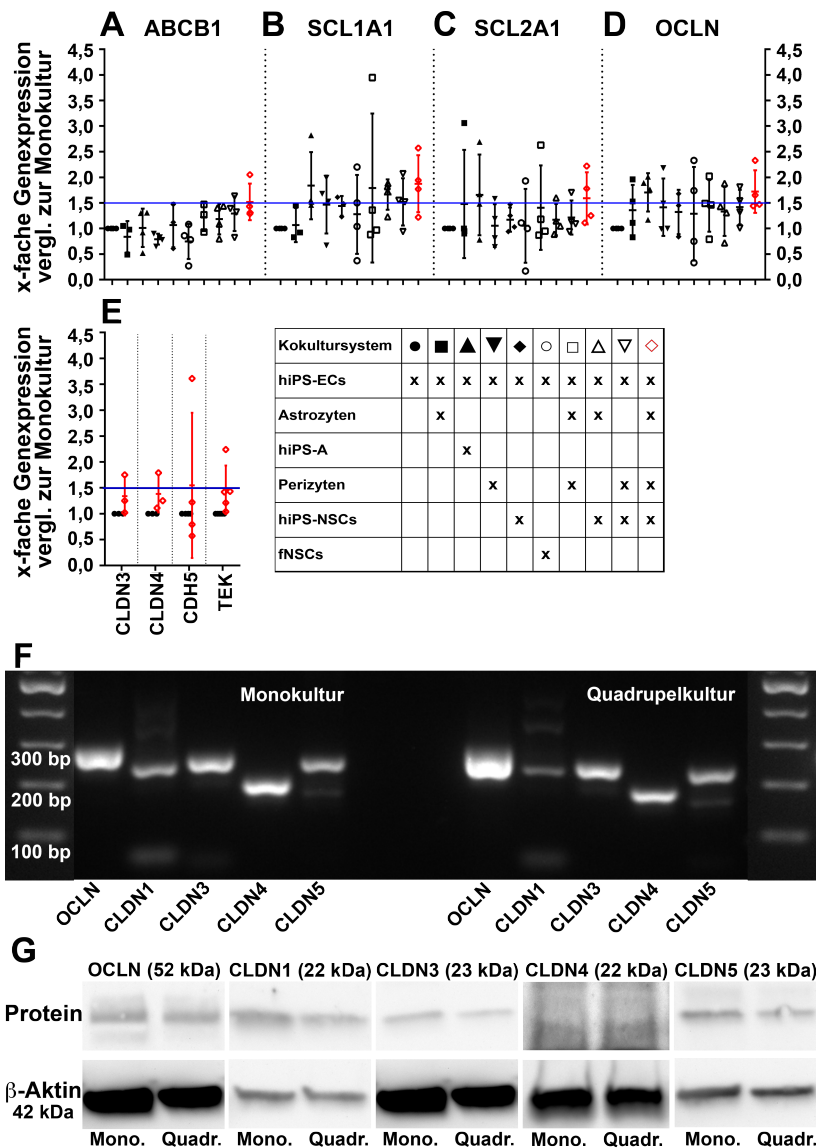
**Tabelle 31:** Übersicht über die absoluten transendothelialen elektrischen Widerstände an Tag zwei nach der Aussaat der aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen differenzierten Blut-Hirn-Schranken-Endothelzellen.

<b>Kulturart</b>	<b>mittlerer TEER</b> MW $\pm$ STABW [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]	<b>maximaler TEER</b> MW $\pm$ STABW [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]
<b>Monokultur</b>		
hiPS-ECs	1198,08 $\pm$ 622,71	2073,23 $\pm$ 271,47
<b>Kokultur</b>		
Astrozyten	1206,30 $\pm$ 649,52	2024,28 $\pm$ 99,64
hiPS-A	1530,09 $\pm$ 869,32	2485,45 $\pm$ 204,51
Perizyten	1283,24 $\pm$ 647,57	2106,50 $\pm$ 104,88
hiPS-NSCs	1554,03 $\pm$ 797,78	2171,13 $\pm$ 129,7
fNSCs	1394,37 $\pm$ 890,35	2481,60 $\pm$ 77,83
<b>Tripelkultur</b>		
Astrozyten + Perizyten	1188,53 $\pm$ 717,87	2104,85 $\pm$ 156,50
Astrozyten + hiPS-NSCs	1596,30 $\pm$ 674,25	2292,68 $\pm$ 108,08
Perizyten + hiPS-NSCs	1722,62 $\pm$ 687,67	2555,85 $\pm$ 112,25
<b>Quadrupelkultur</b>		
Astrozyten + Perizyten + hiPS-NSCs	1756,99 $\pm$ 923,64	2488,75 $\pm$ 153,42

maximale TEER-Werte (Mittelwert aus Duplikaten mit jeweils 3 Messungen pro Modell) von über  $2500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  erreicht wurden. Die größten gemessenen maximalen und auch mittleren TEER-Werte wurden unter dem Einfluss von Perizyten in Kombination mit hiPS-NSCs, sowohl in Tripel- als auch in Quadrupelkultur, erzielt.

Weiterhin kann aus der Tabelle 31 abgelesen werden, dass sich der mittlere TEER-Wert zwischen den Kokulturen der Endothelzellen mit den Perizyten und den Astrozyten sowie der Tripelkultur, in welcher Astrozyten und Perizyten kombiniert wurden, nicht unterschied. Auch im Vergleich zum TEER der Monokultur waren diese Werte identisch hoch. Der TEER der Kokulturen mit hiPS-NSCs lag im Mittel über dem der fNSCs, allerdings war der maximale TEER der fNSCs mit  $2481,60 \pm 77,83 \Omega \cdot \text{cm}^2$  im Vergleich zu den hiPS-NSCs im Mittel um rund  $310 \Omega \cdot \text{cm}^2$  höher. hiPS-A beeinflussten die Dichtigkeit der hiPS-ECs stärker als fetale, primäre Astrozyten. Der mittlere TEER-Wert unter Einfluss der hiPS-A-Kokultur und der Tripelkultur mit Astrozyten und hiPS-NSCs war ähnlich hoch.

Weiterhin wurden hiPS-ECs, welche unter Einfluss der zuvor beschriebenen Ko-, Tripel- oder Quadrupelkulturbedingungen kultiviert wurden, auf Genebene mittels qRT-PCR analysiert und mit den hiPS-ECs der Monokultur verglichen. Es wurde die Expression des Effluxtransporters ABCB1 (A), des Glutamattransporters SLC1A1 (B), des Glukosetransporters SCL2A1 (C), der TJ-Komponenten OCLN (D), sowie CLDN3, CLDN4 und die Gene, welche Cadherin 5 und das



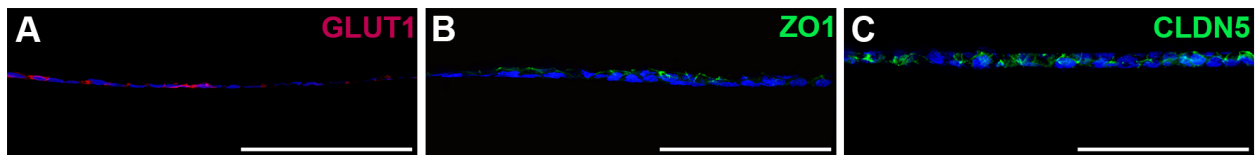
**Abbildung 24: Analyse der Blut-Hirn-Schranken-Modelle mittels quantitativer Realtime-Polymerase Kettenreaktion und Western Blot**

(A-E) Analyse der Endothelzell-Genexpression des Effluxtransporter ABCB1 (A), Glutamattransporters SLC1A1 (B), Glukosetransporters SLC2A1 (C) und Occludin (D) mittels qRT-PCR vergleichend zwischen Monokultur und unter Einfluss der verschiedenen Ko-, Tripel- und Quadrupelkulturen. (E) Analyse der Expression der Gene Claudin 3, Claudin 4, Cadherin 5 und TEK der Endothelzellen aus der Quadrupelkultur im Vergleich zur Monokultur. Die Änderungen der Genexpression ( $\Delta\Delta Ct$ ) wurden als MW  $\pm$  STABW angegeben.  $n = 3 - 4$ , jedes biologische Replikat repräsentiert ein neues Differenzierungs- und Kokulturrexperiment. Zur Normalisierung wurden die Housekeeping-Gene EF1a und RPTL6 eingesetzt. Der Schwellenwert des 1,5-fachen Anstiegs (blaue Linie) wurde als biologisch relevant deklariert.

(F) Gelelektrophoreseaufnahme der PCR-Produkte aus der qRT-PCR der Monokultur (links) und Quadrupelkultur (rechts), v.l.n.r.: OCLN (274 bp), CLDN1 (233 bp), CLDN3 (247 bp), CLDN4 (187 bp) und CLDN5 (239 bp)

(G) Western Blot-Analyse der TJ-Proteine (obere Zeile) OCLN (52 kDa), CLDN1 (22 kDa), CLDN3 (23 kDa), CLDN4 (22 kDa) und CLDN5 (23 kDa) vergleichend zwischen Mono- (linke Spur) und Quadrupelkultur (rechte Spur).  $\beta$ -Aktin 42 kDa (untere Zeile) wurde in allen Blots als Ladekontrolle genutzt.

Endothelzellprotein TIE2 kodieren, CDH5 und TEK (E) untersucht. Aus Abbildung 24A-E wird erkenntlich, dass die größten Unterschiede in der Expression der betrachteten Gene zwischen den hiPS-ECs der Monokultur und denen der Quadrupelkultur erzielt werden konnten. Die Expression von ABCB1 (A) der hiPS-ECs aus der Quadrupelkultur war, gegenüber hiPS-ECs der Monokultur, im Mittel 1,5-fach hochreguliert. Weiterhin konnten eine um das 1,8-fach stärkere Expression des Gens SLC1A1 (B), eine um das 1,5-fach erhöhte Expression von SLC2A1 (C) und eine im Mittel 1,7-fach gesteigerte OCLN-Expression (D) beobachtet werden. Eine 1,5-fache Erhöhung der Genexpression im Vergleich zur Monokultur galt als biologisch relevant und konnte im Hinblick auf die Gene in Abbildung 24A-D nur von den hiPS-ECs, welche in der Quadrupelkultur mit Astrozyten, Perizyten und hiPS-NSCs kultiviert wurden, erreicht oder überschritten werden. Zudem waren hier die niedrigsten Standardabweichungen innerhalb der vier Versuchsreplikate zu verzeichnen. Die Tripelkultur, in der die hiPS-ECs mit Perizyten und hiPS-NSCs kultiviert wurden, zeigten hingegen nur moderate Erhöhungen der Genexpression, die Mittelwerte lagen für ABCB1 bei einer 1,3-fachen Erhöhung, für SLC1A1 lag diese bei 1,5, für SLC2A1 bei 1,2 und für OCLN bei 1,4. Durch die Kokultur von hiPS-ECs mit hiPS-A konnten auch teilweise Erhöhungen der Expressionen der Gene festgestellt werden, allerdings waren hier die Schwankungen innerhalb der einzelnen Versuche und somit die Standardabweichungen höher. Auch in der Expression von CDH5 sowie TEK konnte im Versuchsmittel der Schwellenwert von 1,5 durch die Endothelzellen der Quadrupelkultur erzielt bzw. überschritten werden. Die Unterschiede der Genexpression von CLDN3 und CLDN4 sind im Vergleich der Endothelzellen der Quadrupel- und Monokultur geringer. CLDN3 wurde 1,3-



**Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung von Blut-Hirn-Schranken-Modellen**

(A-C) Beispielhafte Immunfluoreszenzfärbungen von Querschnitten der BHS-Monokulturmodelle. Mit Hilfe von antikörperbasierten Nachweismethoden konnten im Endothel der GLUT1 (A), das TJ-assoziierte Protein ZO1 (B) sowie das TJ-Protein Claudin-5 (C) detektiert werden. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Der Maßstab entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

fach und CLDN4 1,4-fach hochreguliert. Anhand der Banden in Abbildung 24F ist weiterhin zu erkennen, dass auch CLDN1 und CLDN5, welche als zwei der für die BHS wichtigsten TJ Proteine beschrieben werden, sowohl in der Mono- als auch in der Quadrupelkultur exprimiert wurden. Allerdings sind bei der PCR unerwünschte Nebenprodukte amplifiziert worden, welche eine Auswertung der qRT-PCR nicht möglich machten und in folgenden Experimenten durch Anpassungen der PCR-Bedingungen eliminiert werden müssen. PECAM1 wurde von den Endothelzellen, welche aus hiPSCs differenziert wurden nicht exprimiert.

Auf Proteinebene wurden die TJ-Proteine Occludin, Claudin-1, -3, -4 (sehr schwach) und -5 mittels Western Blot-Analyse ebenfalls in beiden BHS-Modellvarianten nachgewiesen (Abbildung 24G).

Anhand von Querschnitten durch die Endothelbarriere, welche sich auf den Insertmembranen ausgebildet hatte, konnten mit Hilfe von immunfluoreszenzbasierten Antikörperfärbungen beispielhaft der GLUT1, das TJ-assoziierte Protein ZO1 sowie das TJ-Protein Claudin-5 detektiert werden (Abbildung 25).

Zusammenfassend betrachtet zeichnete sich die Quadrupelkultur aus hiPS-ECs, Astrozyten, Perizyten und hiPS-NSCs als das BHS-Modell mit den besten Eigenschaften aus. Verglichen mit den neun anderen Modellarten, die etabliert wurden, wies die Quadrupelkultur signifikant höhere TEER-Werte und eine um mindestens 1,5-fache Steigerung der Genexpression relevanter BHS-Gene gegenüber den Monokulturen auf. Da die Expression von TJ-Molekülen, v. a. der Claudine, funktionell mit der parazellulären Permeabilität gekoppelt ist, sollte diese in weiterführenden Experimenten über den Transport von Markermolekülen bestimmt werden.

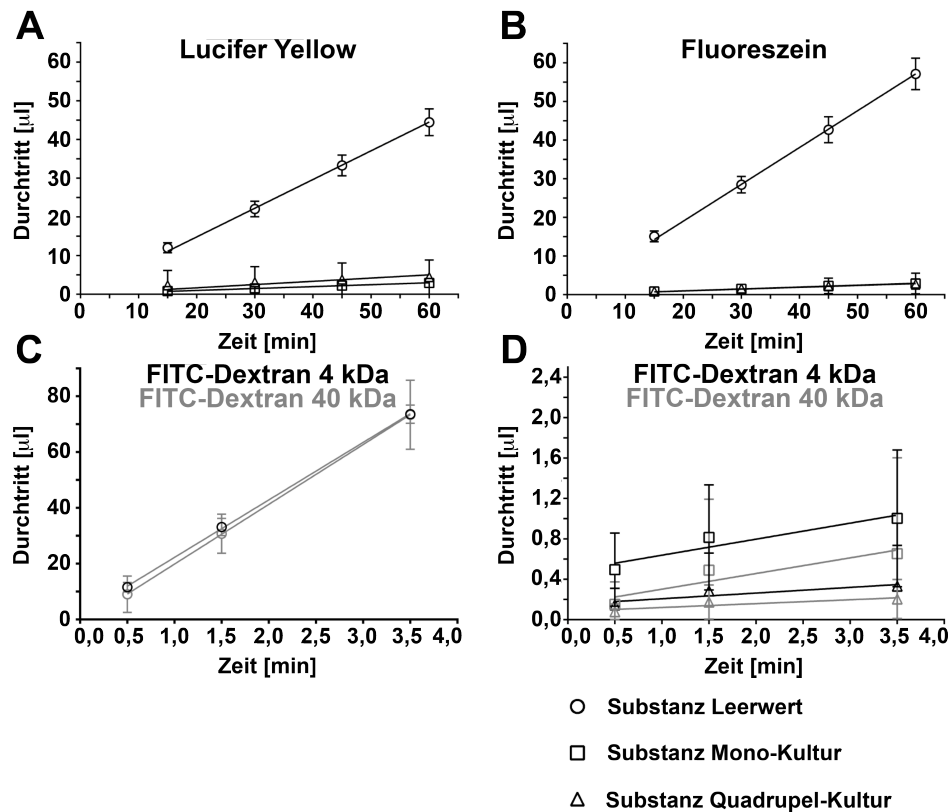
Die BHS-Quadrupelkulturen wiesen die stärksten Verbesserungen der BHS-Eigenschaften auf. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Analysen fokussiert im Vergleich zwischen Mono- und Quadrupelkulturen durchgeführt. Obwohl der TEER-Wert ein Maß für die Dichtigkeit der biologischen Barriere ist, basiert dieser Wert nur auf der Permeabilität von Ionen. Die parazelluläre Permeabilität der BHS-Endothelzellen wurde weiterhin durch den Transport der parazellulären Markermoleküle, Lucifer Yellow (ca. 0,44 kDa), Fluoreszein (ca. 0,33 kDa) und FITC-Dextran (4 kDa und 40 kDa) bestimmt (Tabelle 32). Bei der Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten (PK) wurde lediglich die durch die Zellen verursachte Barriere (PK(Zelle)) beschrieben. Hierzu war eine Korrektur um die durch die Transwellmembran verursachte Barriere notwendig, wodurch eine signifikante Steigerung der PK erzielt werden konnte. Anhand der PK(Zelle) wurde ein Transportranking der parazellulär transportierten Substanzen festgelegt. Auf Grund der ähnlichen Molekulargewichte von Lucifer

**Tabelle 32:** Übersicht über die Ergebnisse der Permeabilitätsstudien mit parazellulären Markermolekülen. Permeationskoeffizienten (PK) und Transport-Rankings sind vergleichend zwischen Mono- und Quadrupel-Kulturmodellen dargestellt.

	PK(gesamt) [µm/min]	PK(Zelle) [µm/min]	Transport- Ranking
<b>Monokultur</b>			
Lucifer Yellow	1,41 ± 0,25	1,52 ± 0,29	1
Fluoreszein	1,39 ± 0,59	1,53 ± 0,67	1
FITC-Dextran 4 kDa	0,0166 ± 0,0037	0,0166 ± 0,0037	3
FITC-Dextran 40 kDa	0,0051 ± 0,0009	0,0051 ± 0,0009	4
<b>Quadrupelkultur</b>			
Lucifer Yellow	1,44 ± 0,34	1,58 ± 0,40	1
Fluoreszein	1,26 ± 0,27	1,33 ± 0,29	2
FITC-Dextran 4 kDa	0,0106 ± 0,0016	0,0106 ± 0,0016	3
FITC-Dextran 40 kDa	0,0039 ± 0,0007	0,0039 ± 0,0007	4

Die Daten wurden als MW ± SEM dargestellt,  $n = 6$  von drei unabhängigen Experimenten.

Yellow und Fluoreszein, permeierten beide Substanzen mit ca. 1,5 µm/min ähnlich schnell durch den Endothellzellmonolayer (PK(Zelle)). Im Vergleich dazu wurde 4 kDa FITC-Dextran 100-fach langsamer transportiert als die kleinen parazellulären Marker. Der PK(Zelle) von FITC-Dextran 40 kDa betrug 0,0039 bis 0,0051 µm/min. Ähnlich wie bei der Messung des TEER, wiesen die Quadrupelkulturen im Vergleich zu den Monokulturen einen niedrigeren PK(Zelle) für FITC-Dextran



**Abbildung 26: Zeitabhängiger parazellulärer Transport durch die Blut-Hirn-Schranken-Modelle**

(A-D) Durchgetretenes Volumen von parazellulär permeierenden Substanzen durch die Mono-, Quadrupel- und Leerwert-Modelle gemessen über die Zeit. Vergleichend sind die Substanzen Lucifer Yellow (A), Fluoreszein (B), FITC-Dextran 4 kDa (C und D) sowie FITC-Dextran 40 kDa (C und D) dargestellt. Die Daten wurden als MW  $\pm$  STABW dargestellt,  $n = 6$  von 3 unabhängigen Versuchen.

auf, wobei hier keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren.

Die BHS stellt ebenfalls eine Barriere für den transzellulären Transport von Substanzen dar. Um diese wichtige Eigenschaft näher zu beschreiben und die Qualifikation der Modelle für den Einsatz in Transportstudien zu beurteilen, wurde die Permeation von Referenzmedikamenten über die Mono- und Quadrupelkulturmodelle bestimmt. Auch hier erfolgte die Berechnung des PK(Zelle). Weiterhin wurde die Variabilität der Zelloyere für die Beurteilung der Permeabilität berücksichtigt. Zusätzlich zu den Testmedikamenten wurde in jedem Experiment der Transport von Diazepam als interner Standard simultan untersucht. Resultierend war eine Normalisierung der PK(Zelle)-Werte der Testsubstanzen zum PK(Zelle) der entsprechenden Diazepamdaten möglich. Anhand dieses Rankings konnte gezeigt werden, dass Diazepam am schnellsten durch die Monokulturmodelle permeierte, es folgten Koffein, Ibuprofen, Celecoxib, Diclofenac, Loratadin und Rhodamin 123 (Tabelle 33). Diese Reihenfolge stimmt mit der Klassifikation basierend auf Literaturdaten überein: Diazepam und Koffein gelten hier als schnell permeierende Substanzen; Ibuprofen, Celecoxib sowie Diclofenac liegen im Mittelfeld und Loratadin sowie Rhodamin 123 werden als langsam permeierende Substanzen beschrieben (Nakazono et al. 1992; Neuhaus et al. 2012; Novakova et al. 2014). In den Quadrupelkulturen war für Koffein das Verhältnis der PK(Zelle) zu denen von Diazepam im Mittel signifikant kleiner als in den Monokulturen (vergleich: 0,251 zu 0,499). Demzufolge war

ein Wechsel der Rankingposition von Koffein von Platz zwei in der Monokultur zu Platz vier in der Quadrupelkultur zu verzeichnen. Alle anderen Transportgeschwindigkeiten unterschieden sich zwischen beiden Modellarten nicht signifikant voneinander.

**Tabelle 33:** Übersicht über die Ergebnisse der Transportstudien. Permeationskoeffizienten (PK), Verhältnis zu Diazepam und Transport-Rankings sind vergleichend zwischen Mono- und Quadrupel-Kulturmodellen dargestellt.

	Substanz		Diazepam		Verhältnis zu Diazepam	Transport-Ranking
	PK(gesamt) [µm/min]	PK(Zelle) [µm/min]	PK(gesamt) [µm/min]	PK(Zelle) [µm/min]		
<b>Monokultur</b>						
Diazepam	21,58 ± 0,56*	250,06 ± 31,31*			1	1
Koffein	15,15 ± 1,73	51,06 ± 9,90	20,52 ± 1,42	103,36 ± 19,83	0,499 ± 0,043	2
Ibuprofen	17,19 ± 0,89	90,33 ± 14,51	22,25 ± 0,76	377,44 ± 91,69	0,281 ± 0,043	3
Celecoxib	16,21 ± 0,26	42,15 ± 1,82	19,73 ± 0,61	201,81 ± 36,34	0,259 ± 0,060	4
Diclofenac	13,17 ± 0,34	39,98 ± 4,33	22,21 ± 0,45	199,49 ± 39,14	0,224 ± 0,026	5
Loratadin	3,44 ± 0,46	5,78 ± 0,83	18,12 ± 0,83	259,56 ± 118,36	0,036 ± 0,010	6
Rhodamin 123	7,11 ± 2,38	7,44 ± 2,57	26,94 ± 1,09	354,38 ± 84,66	0,024 ± 0,009	7
<b>Quadrupelkultur</b>						
Diazepam	21,56 ± 0,57*	229,57 ± 24,74*			1	1
Koffein	13,32 ± 1,31	34,44 ± 4,40	22,16 ± 1,90	146,74 ± 27,03	0,251 ± 0,046**	4
Ibuprofen	17,20 ± 0,73	86,30 ± 10,18	22,28 ± 0,50	303,67 ± 42,84	0,295 ± 0,032	3
Celecoxib	15,51 ± 0,72	38,98 ± 4,33	18,96 ± 0,93	190,59 ± 60,12	0,296 ± 0,064	2
Diclofenac	13,22 ± 0,39	41,23 ± 5,67	22,17 ± 0,63	227,99 ± 70,30	0,227 ± 0,036	5
Loratadin	3,80 ± 0,52	6,83 ± 0,94	18,28 ± 0,62	202,72 ± 60,81	0,040 ± 0,008	6
Rhodamin 123	4,83 ± 1,47	4,97 ± 1,55	26,17 ± 1,17	288,91 ± 82,16	0,022 ± 0,007	7

Die Daten wurden als MW ± SEM dargestellt,  $n = 4 - 6$ .

\* Die Transportstudien wurden zeitgleich mit der untersuchten Substanz und dem internen Standard Diazepam durchgeführt. Zum Vergleich wurden die PK von Diazepam als Mittelwert von allen Mono- und Quadrupel-Kulturstudien angegeben ( $n = 30$ ).

Verhältnis zu Diazepam: Für jede Testsubstanz wurden die PK(Zelle)-Werte durch die zugehörigen PK(Zelle)-Werte von Diazepam geteilt. Dieses Vorgehen kann zu Unterschieden im Vergleich zum bloßen Teilen der durchschnittlichen PK(Zelle)-Werte der Substanz durch die von Diazepam führen.

\*\* Statistisch signifikanter Unterschied,  $p < 0,05$  im Vergleich zum Verhältnis im Monokultur-Setup.

In den Diagrammen in Abbildung 26 sowie Abbildung 27 sind die Transportkinetiken der transzellulär und parazellulär transportierten Substanzen dargestellt. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse der Transportgeschwindigkeiten der untersuchten Referenzsubstanzen sollen an Hand dieser Darstellung noch einmal veranschaulicht werden. Es ist erkenntlich, dass der schnellste Transport durch die leeren Inserts auf Grund der fehlenden zellulären Barriere erzielt werden konnte. Weiterhin ist zu sehen, dass die Referenzsubstanz Diazepam immer schneller als die zu analysierende Testsubstanz transportiert wurde (Abbildung 27). Die Transportkinetiken zwischen Mono- und Quadrupelkulturen unterschieden sich nicht signifikant. Auffällig war der deutlich erhöhte Transport von Rhodamin 123 durch die Leerinserts (Abbildung 27G). Die Transportgeschwindigkeit von Rhodamin 123 überschritt hier deutlich die der Referenzsubstanz Diazepam und ist auf Grund der

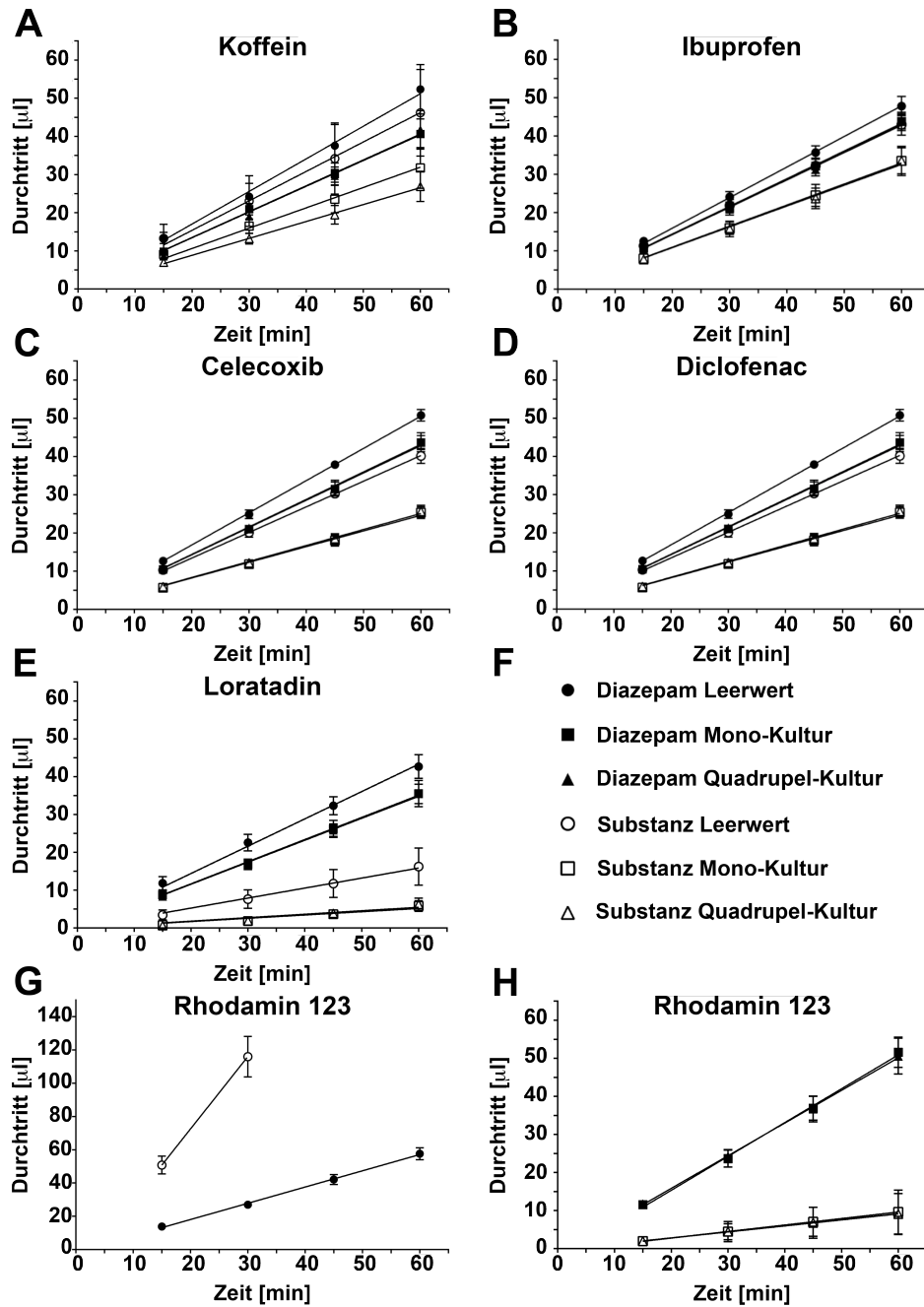


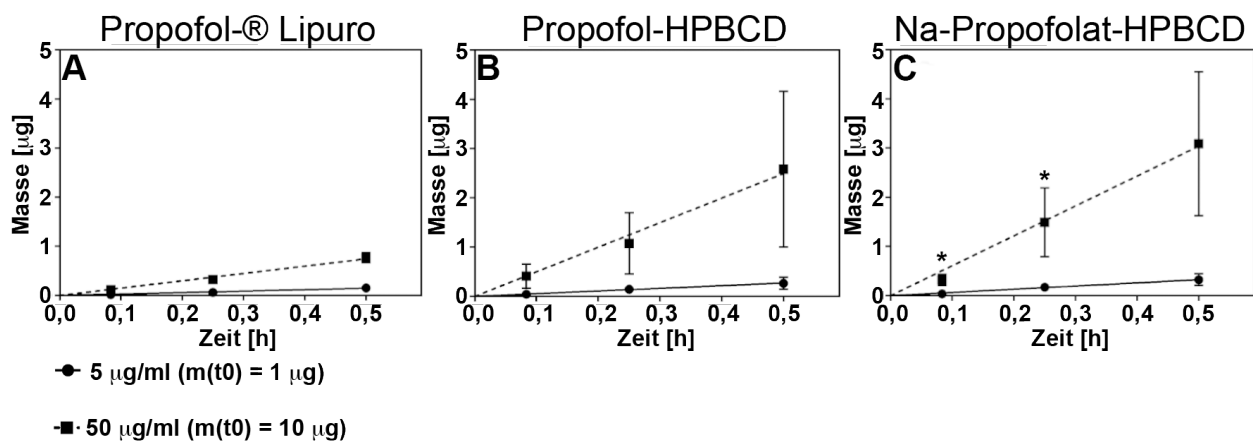
Abbildung 27: Zeitabhängiger transzellulärer Transport durch die Blut-Hirn-Schranken-Modelle

(A-G) Durchgetretenes Volumen von transzellulär transportierten Substanzen durch die Mono-, Quadrupel- und Leerwert-Modelle gemessen über die Zeit im Vergleich zum Durchtritt der internen Standardsubstanz Diazepam. Vergleichend sind die Substanzen Koffein (A), Ibuprofen (B), Celecoxib (C), Diclofenac (D), Loratadin (E) sowie Rhodamin 123 (F und G) dargestellt. Die Daten wurden als MW  $\pm$  STABW dargestellt,  $n = 4 - 6$  von 2 bis 3 unabhängigen Versuchen.

Substanzeigenschaften nicht zu erklären.

Als weiteres Anwendungsbeispiel für den Einsatz der BHS-Modelle wurde der Transport des Anästhetikums Propofol untersucht. Im Rahmen des Verbundprojektes LipoTrans "Cyclodextrin-Komplexe zur Beschleunigung des Transportes lipophiler Wirkstoffe" wurden lipophile, wirkstoff-

haltige Cyclodextrin-Propofol-Komplexe aus neu entworfenen Cyclodextrin-Derivaten hergestellt. Diese sollen in Zukunft eine orale Applikation und einen beschleunigten Wirkstofftransport von schwer resorbierbaren, lipophilen Arzneimitteln, wie Propofol, z. B. durch die Barrieremembranen des BHS-Endothels ermöglichen. Propofol-®Lipuro wird als Standardanästhetikum in der Klinik eingesetzt, als Vergleichssubstanzen für den Transport dienten die neu entwickelten Derivate Propofol-HPBCD sowie Na-Propofolat-HPBCD. Die Komplexierung des Wirkstoffs diente zu dessen verbesserter Wasserlöslichkeit, der Wirkstoff wird zum Transport durch die Zellmembran aus dem Cyclodextrinkomplex entlassen, sodass das Cyclodextrin selbst nicht in die Zellen gelangt. Anhand der Diagramme (Abbildung 28) ist zu erkennen, dass mit Hilfe des Cyclodextrins HPBCD (Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin) eine bis zu dreifache Steigerung der Transportgeschwindigkeit von Propofol erzielt werden konnte. Verglichen mit der Reinsubstanz (Abbildung 28A) wurde Propofol im Na-Propofolat-HPBCD-Komplex (Abbildung 28C) schon nach 5- bzw. 15-minütigem Transport signifikant schneller über das BHS-Endothel transportiert. Diese Beobachtungen konnten allerdings nur bei der höheren Einsatzkonzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  gemacht werden, bei einer Propofolkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  ergaben sich keine signifikanten Transportunterschiede.

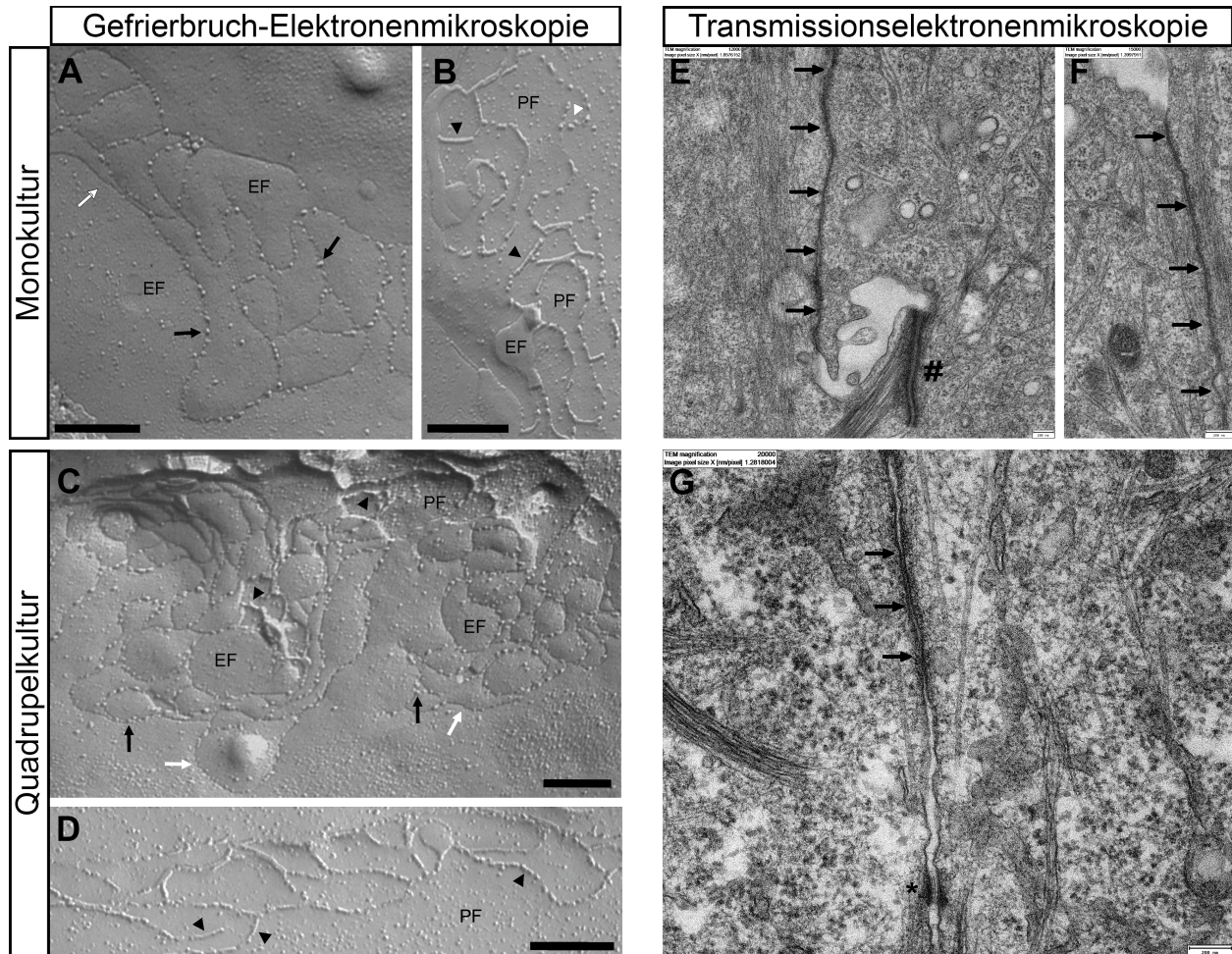


**Abbildung 28: Vergleich der Transportkinetik von Propofol als Reinsubstanz sowie als Cyclodextrin-Wirkstoff-Komplex gebunden an HPBCD mit Hilfe der Blut-Hirn-Schranken-Modelle**

(A-C) Vergleich der transportierten Masse [µg] Propofol, welche innerhalb von 30 min durch die stammzellbasierten BHS-Modelle transportiert wurde. Es kamen zwei verschiedene Konzentrationen (5  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$ ) zum Einsatz. Der Transport des Wirkstoffs Propofol-®Lipuro als Reinsubstanz (A) wurde mit dem der Wirkstoff-Cyclodextrin-Komplexe Propofol-HPBCD (B) und Na-Propofolat-HPBCD (C) verglichen. Die Daten wurden als MW  $\pm$  STABW dargestellt,  $n = 9$  von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch einen T-Test im Vergleich zur Propofol-®Lipuro-Kontrolle in der jeweiligen Konzentration beurteilt  $*p < 0,05$ .

Die parazelluläre Barriere wurde über Messung des TEER und des Durchflusses von Substanzen, wie FITC-Dextran, Fluoreszein und Luzifer Yellow, funktionell detektiert. Die Charakterisierung auf ultrastruktureller Ebene erfolgte mittels Elektronenmikroskopie an Gefrierbrüchen (Abbildung 29A-D) und Transmissionselektronenmikroskopie (Abbildung 29E-G). Sowohl bei den Monokultur-, als auch bei den Quadrupelkultur-BHS-Modellen konnten eindeutig Netzwerke aus TJ-Strängen detektiert werden. Intramembran-TJ-Partikel wurden in der protoplasmatischen Phase (P-face, PF)





**Abbildung 29: Ultrastrukturelle Analyse der Blut-Hirn-Schranken-Modelle**

(A-D) Gefrierbruch-Elektronenmikroskopische Analyse der Ultrastruktur der TJs der hiPS-ECs aus der Monokultur (A-B) oder Quadrupelkultur (C-D). Ähnlich zu Mikrokapillaren des Gehirns *in vivo*, wurden Intramembran-TJ-Partikel in der PF und EF der Plasmamembran gefunden. Auf der EF traten TJ-Stränge als Partikel (schwarze Pfeile in (A) und (C)) und partikelfreie Furchen (weiße Pfeile in (A) und (C)) auf. Auf der PF hingegen waren die TJs als kontinuierliche Stränge (schwarze Pfeilköpfe in (B) und (D)) und aneinandergereihte Partikel (weiße Pfeilköpfe in (B)) zu erkennen. Der Maßstab entspricht 200 nm.

(E-G) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der BHS-Modelle. Benachbarte Endothelzellen der Mono- (E-F) und Kokulturen (G) sind durch dichte TJ-Stränge (schwarze Pfeile), die den parazellulären Spalt verengen, verbunden. Weiterhin wurden lange Desmosomen (Macula adherens, schwarze Raute in (E)), welche mit Intermediärfilamenten verbunden sind, sowie Adhäsionspunkte (Punctum adherens, schwarzer Stern in (G)), verankert im Aktinfilamentnetzwerk, detektiert. Der Maßstab entspricht 200 nm.

und exoplasmatischen Phase (E-face, EF) der Plasmamembran gefunden. An der EF traten die TJ-Stränge in Form von Partikeln (Abbildung 29A und C, schwarze Pfeile) und partikelfreien Furchen (Abbildung 29A und C, weiße Pfeile) auf. In der PF hingegen waren es teils kontinuierliche Stränge (Abbildung 29B und D, schwarze Pfeilköpfe), teils aneinandergereihte Partikel (Abbildung 29B, weiße Pfeilköpfe). Die Mono- und Quadrupelkulturen zeigten variable, allerdings vergleichbar komplexe Netzwerke aus verzweigten Strängen mit gemischter P/E-Phasen-Assoziation. Eine tendenziell etwas höhere Komplexität der TJ-Netzwerke war in den Quadrupelkulturen zu finden. Die morphometrische Analyse ergab folgende Resultate: Die mittlere Zahl der Maschen in den

Strangnetzwerken betrug in den Quadrupelkulturen  $33,0 \pm 5,0$ , in den Monokulturen hingegen nur  $26,1 \pm 2,8$ . Die rechteckige Strangfläche betrug bei den Quadrupelkulturen  $1,05 \pm 0,14 \mu\text{m}^2$ , bei der Monokultur aus hiPS-ECs  $0,91 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$ . Auch die Maschendichte war in der Quadrupelkultur mit  $33,4 \pm 2,7 \mu\text{m}^{-2}$  höher als die der Monokulturen (vgl.  $30,6 \pm 2,8 \mu\text{m}^{-2}$ ). Allerdings konnten hinsichtlich dieser morphometrischen Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kulturarten festgestellt werden. Die Angabe der Werte erfolgte als MW  $\pm$ SEM. Die statistische Auswertung wurde mittels GraphPad Prism durchgeführt und beinhaltete die Kolmogorow-Smirnow-Bestimmung der Normalität sowie einen einseitigen T-Test,  $n > 20$ . Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TJs der hiPS-ECs in ihrer Ultrastruktur ähnlich zu denen sind, welche im Endothel der BHS-Kapillaren *in vivo* gefunden wurden (Wolburg et al. 1994). Neben den TJs, die die dichtesten Zell-Zell-Verbindungen an der BHS darstellen, wurden mit Hilfe der transmissionselektronenmikroskopischen Analyse auch Adhärenzverbindungen, wie lange Desmosomen (Macula adherens, schwarze Raute in Abbildung 29E), welche mit Intermediärfilamenten verbunden sind sowie Adhäsionspunkte (Punctum adherens, schwarzer Stern in Abbildung 29G), verankert im Aktinfilamentnetzwerk, detektiert.

## 5 Diskussion

Die BHS stellt die wichtigste biologische Barriere zwischen der Blutzirkulation und dem ZNS dar. Hauptsächlich dient sie zur Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS und dem Schutz vor neurotoxischen Substanzen und Pathogenen, wie Bakterien und Viren.

Für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und MS oder Gehirntumoren, stellt die Dichtigkeit der BHS gegenüber Substanzen und die hohe metabolische Aktivität der Endothelzellen aber ein großes Problem dar. Viele Medikamente sind nicht in der Lage, die BHS in ausreichender Konzentration zu überwinden, um an ihren Wirkort zu gelangen. Oder sie werden vor dem Transport metabolisiert und verlieren somit ihre Wirksamkeit. Auf Grund des hohen Bedarfs an geeigneten Testsystemen in der Grundlagen- sowie präklinischen Forschung für Medikamentenentwicklung und Infektionsstudien wurden eine Vielzahl unterschiedlicher BHS-Modelle entwickelt. Neben *in silico*-, azellulären *in vitro*- und *in vivo*-Modellen sind auch zahlreiche zellbasierte Modelle der BHS entwickelt worden. Standardisierte Modelle auf Basis immortalisierter Zelllinien jedoch weisen nur eine inhomogene TJ-Expression auf und verfügen meist über eine geringe Barriereintegrität mit TEER-Werten unter  $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Deli et al. 2005). Im Vergleich dazu wurden in Tierexperimenten TEER-Werte von mehr als  $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  an der BHS gemessen (Butt et al. 1990; Crone und Olesen 1982). Die Verfügbarkeit humaner primärer BHS-Zellen ist sehr limitiert und ihr Einsatz nicht nur im Hinblick auf ethische Aspekte bedenklich. Humane Gehirnzellen können z. B. aus Biopsie- oder Autopsiematerial von Patienten mit Epilepsie oder Gehirntumoren isoliert werden (Lippmann et al. 2012). Allerdings besteht hier das Risiko, dass die isolierten Zellen mit krankheitsbedingt veränderten Zellen kontaminiert sind, wodurch die Eigenschaften der BHS-Modelle beeinflusst werden können.

Eine Alternative, die eine Lösung dieser Probleme schafft, ist die Verwendung von Stammzellen, wie hiPSCs, um standardisierte humane BHS-Modelle bereitzustellen. Ziel dieser Arbeit war es, unter reproduzierbaren Bedingungen hiPSCs *in vitro* nach etablierten und reproduzierbaren Methoden in Endothelzellen der BHS, NSCs und Astrozyten zu differenzieren. Mit Hilfe der beschriebenen differenzierten Zellen und primären fetalen Zellen wurden systematisch verschiedene Arten von Kokulturmodellen aufgebaut. Der Einfluss der unterschiedlichen Zellarten (Astrozyten, Perizyten, NSCs) und -kombinationen auf die Barriereintegrität und Funktion der hiPS-ECs wurde mit Hilfe verschiedener Analysemethoden untersucht.

### 5.1 Vorteile induziert pluripotenter Stammzellen für die Entwicklung humaner Blut-Hirn-Schranken-Modelle

Zum Aufbau humaner BHS-Modelle auf Basis primärer Zellen unter reproduzierbaren und standardisierten Bedingungen, wurden hiPSCs für die Versuche eingesetzt. Der Vorteil in der Verwendung von pluripotenten Stammzellen ist, dass sie in jegliche somatischen Zellen des menschlichen Körpers differenziert werden können (Wobus und Boheler 2005). Zudem wird bei der Verwendung eines Zellklones ähnlich wie bei der Verwendung von Zelllinien, immer das gleiche genetische Ausgangsmaterial für die Versuchsdurchführung verwendet, was das Potential der Standardisierbarkeit erheblich erhöht (Helms et al. 2016). Anders als beim Arbeiten mit primären Zellen, welche aus

humanen oder tierischen Biopsien isoliert werden, gibt es keine Spendervariabilitäten, die kosten- und zeitintensiven Isolationsprozesse entfallen. Auch das Problem, dass die Zellen kurz nach der Isolation auf Grund nicht optimaler Kulturbedingungen dedifferenzieren bzw. nur über wenige Passagen *in vitro* in Kultur gehalten werden können und dann erneut isoliert werden müssen, konnte umgangen werden. Zu jeder Zeit standen hiPSCs in ausreichender Menge zur Verfügung, um erneut eine Differenzierung durchzuführen. Im Unterschied zum Arbeiten mit embryonalen Stammzellen werden in Deutschland auch keine Sondergenehmigungen benötigt, denn nach §4.2.1 ist die Einfuhr sowie Verwendung embryonaler Stammzellen nur erlaubt, wenn diese vor dem 1. Mai 2007 gewonnen wurden. Weiter heißt es in §5.1: “Forschungsarbeiten an embryonalen Stammzellen dürfen nur durchgeführt werden, wenn wissenschaftlich begründet dargelegt ist, dass sie hochrangigen Forschungszielen für den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn im Rahmen der Grundlagenforschung oder für die Erweiterung medizinischer Kenntnisse bei der Entwicklung diagnostischer, präventiver oder therapeutischer Verfahren zur Anwendung bei Menschen dienen [...]” (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 28.06.2002). Auch die ethischen Bedenken, die beim Arbeiten mit embryonalen Stammzellen auftreten, konnten durch den Einsatz der hiPSCs in den hier beschriebenen Studien vermieden werden. In Bezug auf diese Debatten werden oft die SKIP-Argumente eingesetzt. SKIP steht in diesem Zusammenhang für Speziesargument, Kontinuumsargument, Identitätsargument und Potentialitätsargument. Mit Hilfe dieser Argumente wird begründet, dass auch der menschliche Embryo Würde besitzt und auf Grund seiner Personenrechte vor verbrauchender Forschung, die die Gewinnung von ESCs einschließt, geschützt werden muss. Im Einzelnen wird die Würde des Embryonen darin begründet, dass er zur Spezies Mensch zugeordnet werden kann, dass er das Potential hat, sich kontinuierlich zu einem menschlichen Wesen zu entwickeln, dass jeder Mensch aus einem Embryo hervorgegangen ist und diesem somit moralisch identisch ist und dass jeder Embryo das Potential besitzt, sich zu einem Menschen zu entwickeln, dem Würde zugesprochen wird (Damschen und Schönecker 2003).

Humane primäre Gehirnzellen können z. B. aus Biopsie- oder Autopsiematerial von Spendern mit Epilepsie oder Tumorerkrankungen gewonnen werden. In den hier beschriebenen Studien war der Zugang zu solchen Zellquellen aber streng limitiert, innerhalb des Forschungszeitraumes von einem Jahr standen vier Tumorbiopsien zur Verfügung, welche lediglich eine Größe von ca.  $0,5 \text{ cm}^3$  besaßen. Die Gewebe waren zu klein, um eine ausreichend große Anzahl an vitalen Zellen daraus isolieren zu können und diese für weitere Forschungsarbeiten, einschließlich Charakterisierung und Aufbau von BHS-Modellen, zu nutzen. Außerdem erfolgte die Isolation der Zellen aus logistischen Gründen z. T. erst einige Stunden nach der Entnahme des Gewebes. Hierdurch besteht die Gefahr, durch den beginnenden autolytischen Zerfall des empfindlichen Nervengewebes, Zellen zu verlieren. Zudem wurden nur Tumorbiopsien eingesetzt, welche eine sehr harte bis knorpelige Struktur aufwiesen und im Gegensatz zu weichem gesundem Gehirngewebe schwer aufzuarbeiten und enzymatisch zu verdauen waren.

Bei neurochirurgischen Eingriffen wird nur das tumoröse Gewebe entfernt, um umliegende Gehirnareale nicht zu schädigen. Somit bestand die Gefahr, dass die aus den Tumorbiopsien isolierten Zellen ebenfalls krankheitsbedingt verändert sind und ein Aufbau gesunder, nicht pathologisch beeinflusster BHS-Modelle damit nicht mehr gewährleistet werden konnte. Tumorinduzierte Angiogenese führt sowohl zu strukturellen, als auch funktionellen Veränderung der BHS (Weiss et al.

2009). Durch Tumore, wie das Glioblastom wird z. B. die Ultrastruktur der Blutgefäßwände zerstört, was wiederum deren Permeabilität erhöht und die Ausbildung zerebraler Ödeme zur Folge hat (Coomber et al. 1987). Zudem belegen zahlreiche Studien, dass Endothelzellen durch Bildung vasculärer Faktoren, wie BDNF und VEGF-C (*vascular endothelial growth factor C*) zur Regulation neuraler Stammzellen beitragen, welche auch für die Versorgung von Tumorstammzellen essentiell sein könnten (Gilbertson und Rich 2007). Endothelzellen führen also durch Interaktion mit Tumorstammzellen zur Erhaltung der Stammzeleigenschaften (Folkins et al. 2007). Die Blutgefäße in Gehirntumoren sind stärker gewunden als die im gesunden Gehirn, die Zusammensetzung der Basalmembran ist verändert und die TJ-Proteine Claudin-3 und Occludin gehen verloren (Weiss et al. 2009). Weiterhin führt die tumorinduzierte VEGF-Expression zur Endozytose des Adhäsionsmoleküls VE-Cadherin und somit zur erhöhten Permeabilität und Zerstörung der Barrierefunktion des Endothels (Gavard und Gutkind 2006).

Ein weiteres Problem stellte die schnelle Abnahme der Proliferationsfähigkeit der in der vorliegenden Arbeit aus Tumorbiopsien isolierten Astrozyten in der *in vitro*-Kultur dar. Zusätzlich zu den in dieser Doktorarbeit verwendeten proliferationsfördernden Faktoren FCS und EGF können auch BDNF, CTNF, TGF- $\alpha$ , HRG $\beta$ 1 (*Heregulin  $\beta$  1*) und dbcAMP zur Stimulation der Astrozytenproliferation und *in vitro*-Kultivierbarkeit genutzt werden (Foo et al. 2011; Sharif und Prevot 2012; Gibbons et al. 2007). Laut Foo et al. sind allerdings HBEGF (*Heparin-binding EGF-like growth factor*) und Wnt7a besonders geeignet, um die Überlebensrate isolierter Astrozyten *in vitro* zu erhöhen (Foo et al. 2011). Auf Grund der mangelnden Verfügbarkeit der humanen Gehirnbiospien und daraus resultierenden zu geringen initialen Zellzahlen war es nicht möglich, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, den Einfluss der genannten Faktoren zu untersuchen.

Eine Alternative zur Zellisolation aus primärem humanem Gewebe stellen pluripotente Stammzellen dar, denn sie erlauben den theoretisch unlimitierten Zugang zu differenzierten humanen Zellen (Lippmann et al. 2013).

## 5.2 Auswahl geeigneter Stammzelllinien zum Aufbau von humanen Blut-Hirnschranken-Modellen und Nachweis der Pluripotenz

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene hiPSC-Linien verwendet. Es kamen die Klone IMR90-4 der Firma WiCell und die Linie ARiPS, welche von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Edenhofer der Universität Würzburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie zur Verfügung gestellt wurde, zum Einsatz. Die hiPSC-Linie IMR90-4 wurde in Studien von Lippmann et al. sowohl gegen die humane ES-Zellen H9, als auch gegen weitere hiPSC-Linien verglichen. Sie zeichnete sich gegenüber den anderen Stammzelllinien durch das größte Differenzierungspotential und die höchste Zellausbeute aus. Weiterhin waren die Eigenschaften der BHS-Endothelzellen, wie beispielsweise die Ausbildung hoher TEER-Werte vergleichbar mit *in vivo*-Daten und die Permeabilität von Qualifizierungssubstanzen korrelierte stark mit *in vivo*-Daten von Nagern (Lippmann et al. 2012). Basierend auf den beschriebenen Vorarbeiten wurde die Linie IMR90-4 ebenfalls für die Differenzierung in Endothelzellen der BHS und den Modellaufbau in der vorliegenden Studie ausgewählt.

Die zweite hiPSC-Linie ARiPS wurde durch Kadari et al. aus humanen Hautfibroblasten generiert (Kadari et al. 2014). Auf Grund des großen Erfahrungsschatzes der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.

Edenhofer wurde diese in seiner Gruppe generierte hiPSC-Linie ARiPS für alle neuronalen Differenzierungsprozesse eingesetzt.

Im Verlauf der Kultivierung der hiPSCs kam es sehr selten zur spontanen Differenzierung einzelner Zellen innerhalb der pluripotenten Kolonien. Eine Selektion dieser Zellen ist laut WiCell erst ab einer geschätzten Zahl differenzierter Zellen, die 10 % überschreitet, nötig. Beide Zelllinien wurden unter feederfreien Kulturbedingungen auf Matrigel™ und unter Verwendung des mTeSR™1 Mediums gezüchtet. Nicht nur morphologisch, sondern auch durch Immunfluoreszenzfärbungen und durchflusszytometrische Analysen konnte die Pluripotenz der beiden hiPSC-Linien bestätigt werden. Die Transkriptionsfaktoren, wie NANOG, OCT3/4 und SOX2, konnten in über 97 % der Zellen detektiert werden. Auch für die Oberflächenmarker, wie die Keratansulfat-Antigene TRA1-60 und TRA1-81, sowie das Glykolipid-Antigen SSEA4 waren ca. 90 bis 99,9 % der hiPSCs positiv. Diese Pluripotenz-assoziierten Marker werden routinemäßig zur Charakterisierung von hiPSC-Linien genutzt (Yu et al. 2007; Chen et al. 2015; Kadari et al. 2014; Takahashi und Yamanaka 2006). Die erzielten Quantitäten sind mit Literaturwerten vergleichbar, wobei in einigen Studien v. a. die Zellmembranmarker TRA1-60 und TRA1-81 bei lediglich ca. 50 bis 70 % der Zellen detektiert werden konnten (Chen et al. 2015). Neben der starken Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker ist ebenfalls die Aktivität des Enzyms alkalische Phosphatase in pluripotenten Stammzellen stark erhöht (Stefkova et al. 2015). Dessen Expression konnte mit Hilfe von Färbungen der hiPSC-Linien nachgewiesen werden. Das Vorhandensein der alkalischen Phosphatase ist allerdings nicht nur auf pluripotente Stammzellen beschränkt, dieses Enzym wird auch in neuralen Zellen der Subventrikularzone, somatischen Stammzellen, wie den mesenchymalen Stammzellen oder Zellen des Zahnwurzelgewebes, der Knochen, des Darms, der Leber sowie der Niere exprimiert (Stefkova et al. 2015). Der Nachweis der Pluripotenz der in dieser Arbeit für Differenzierungen eingesetzten hiPSCs konnte mit Hilfe umfangreicher Analysemethoden auf Protein- und Genebene erbracht werden. Eine auf Grund von suboptimalen Kulturbedingungen hervorgerufene ungewollte spontane Differenzierung und damit verbundene verminderte Differenzierungseffizienz der Stammzellen wurde dadurch ausgeschlossen.

Der Pluripotenzstatus von reprogrammierten Zellen kann weiterhin mit Hilfe von Mikroarray-Analysen, die die Genexpression der untersuchten Zellen in Datenbanken mit bereits publizierten bioinformatischen Datensätzen vergleichen, untersucht werden. Das Potential zur Differenzierung der Zellen in Zelltypen aller drei Keimblattursprünge Entoderm, Ektoderm und Mesoderm kann *in vitro* oder auch *in vivo* mit Hilfe einer Teratomanalyse bestimmt werden. Auf diese Analysen wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet, da beide hiPSC-Linien bereits ausführlich charakterisiert wurden (Yu et al. 2007; Kadari et al. 2014).

### 5.3 Standardisierte Expansion humaner induziert pluripotenter Stammzellen im Hochdurchsatz

Sowohl die Expansion, als auch die Differenzierung von hiPSCs wird normalerweise auf einer Matrix in adhärenter 2D-Kultur durchgeführt (Kempf et al. 2016). Diese Art der Kultivierung ist in den meisten Zellkulturlaboren etabliert. Die Kultur der hiPSCs in Form homogener Monolayer erlaubt eine gradientenfreie Versorgung der Zellen mit Wachstumsfaktoren oder Small Molecules,



was wiederum zu einer erhöhten Reproduzierbarkeit der Versuche führt (Mummery et al. 2012). Um möglichst viele Zellen für die Anwendung bereitzustellen, werden zur Simultankultivierung mehrere Zellkulturgefäße parallel oder Multilayerflaschen verwendet. Diese als Scale-out bezeichnete Kulturvariante ist allerdings mit einem immensen Zeit- bzw. Kostenaufwand und Platzbedarf verbunden. Auch die Überwachung und Messung wichtiger Prozessparameter, wie die Echtzeitmessung des pH-Wertes, des Sauerstoffgehaltes im Medium, des Glukoseverbrauchs sowie der Laktatbildung, sind in den Standardkulturgefäßen nur schwer zu integrieren (Kempf et al. 2016).

Durch die Verwendung von 3D-Kultursystemen zur Züchtung der hiPSCs als frei schwebende Aggregate in einer Suspensionskultur können diese Limitierungen der 2D-Kultur überwunden werden. Zur Gewährleistung einer besseren Standardisierung der hiPSC-Kultur, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Rührreaktorsystem entwickelt und für die Kultivierung von hiPSCs getestet. Der am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin entwickelt Rührreaktor entstand im Verlauf der Bachelorarbeit von Herrn Fabian Kühn innerhalb einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr.-Ing. Jan Hansmann. Für biologische Suspensionskulturen sind bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren, Reaktoren und Prozesse sowohl im Labor- als auch im großindustriellen Maßstab entwickelt und etabliert worden. Die Produktion von Therapeutika gegen Krebserkrankungen, Asthma oder Arthritis (Li et al. 2010) in *Eschericia Coli* (Jaffe et al. 2014) oder *Chinese Hamster Ovary*-Zellen (Song et al. 2013) ist nur ein Beispiel für den aktuellen Stand der Technik. Einige Firmen bieten ihre Rührreaktorsysteme bereits auf dem Markt an, es kommen Einwegsysteme, wie der Reaktor Mobius™ 3 L von Millipore oder die DASbox™ Systeme von Eppendorf mit einem Arbeitsvolumen von 60 bis 250 ml zum Einsatz. Diese Systeme können zudem bis zu einer Stückzahl von 24 Bioreaktoren parallelisiert werden.

Gerade in der Regenerativen Medizin, im Tissue Engineering oder für Hochdurchsatz-Testungen im Medikamentenscreening werden robuste, reproduzierbare und ökonomische Produktionsprozesse zur Herstellung von Milliarden von hiPSCs benötigt (Kempf et al. 2016). Hohe Zellzahlen und eine standardisierte hohe Stammzellqualität sind Voraussetzung.

Teilziel der präsentierten Arbeiten war es, das entwickelte Rührreaktorsystem für die *in vitro*-Expansion von hiPSCs zu testen. Die Kultur von hiPSCs ist sehr zeitaufwendig und kostenintensiv, denn die Zellen müssen täglich mit den teuren Kulturmedien versorgt werden. In einem stufenweise aufgebauten Scale-Up-Prozess sollten unterschiedliche Kultursysteme hinsichtlich der Erhaltung der Pluripotenz der hiPSCs und des Reaktionsvolumens miteinander verglichen werden. Zum Einsatz kamen die adhärente Kontrollkultur, sowie die Suspensionskulturen in der Petrischale, dem Erlenmeyerkolben und dem neu entwickelten Rührreaktorsystem. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten konnten zeigen, dass mit Hilfe des Rührreaktorsystems ein 100-facher Scale-Up des Kulturvolumens im Vergleich zur adhärennten Kontrollkultur erzielt wurde. Es ist gelungen, innerhalb der 6-tägigen Kulturzeit bis zu  $1,5 \cdot 10^8$  hiPSCs im Rührreaktor zu kultivieren. Im Vergleich dazu wäre in der adhärennten Standardkultur die Betreuung von 13 bis 25 6-Wellplatten nötig gewesen, was mit einem hohen Zeit- und Platzaufwand verbunden ist. Auch im Hinblick auf den Medienverbrauch konnte mit Hilfe unseres Rührreaktorsystems gespart werden: Während die adhärennte Kultur auf Grund des kleinen Kulturvolumens von 2 ml einen täglichen Medienwechsel nötig machte, war auf Grund der großen Medienkapazität im Rührreaktor lediglich das Wechseln des Mediums im Zwei-Tagesrhythmus erforderlich. Daraus ergab sich innerhalb von sechs Tagen ein Gesamtverbrauch von 725 ml mTeSR™1 Medium im Rührreaktorsystem und theoretisch zwischen

936 bis 1800 ml während der adhärennten hiPSC-Kultur, um die gleiche Zellausbeute zu erzielen. Die Qualität der hiPSCs, welche in Suspension spontan Aggregate ausbildeten, war auch nach der Kultur im Rührreaktor vergleichbar mit der der Kontrollkulturen. Sowohl mittels durchflusszytometrischer Analysen basierend auf antikörperbasierten Nachweismethoden sowie im Hinblick auf die Genexpression konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Zudem wurde eine kontinuierliche Sensorik, welche die Prozessparameter Sauerstoffgehalt und pH-Wert online bestimmte in das Rührreaktorsystem integriert, die Aufschluss über das Proliferationsverhalten der hiPSCs liefern sollten. Dieses Onlinemonitoring der Kultur- und Vitalitätsparameter ist bei der adhärennten Standardkultur sowie innerhalb der Suspensionsansätze in Petrischale und Erlenmeyerkolben nicht oder nur sehr schwer integrierbar. Zu erwarten sind das Absinken des Sauerstoff- und Glukosegehaltes sowie des pH-Wertes in der Suspensionskultur. Der Laktatwert allerdings steigt mit fortschreitender Kulturdauer. Zu den Zeitpunkten des Medienwechsels erreichen diese Parameter wieder ihr Ausgangsniveau, sinken aber denn schnell und kontinuierlich auf tiefere Werte als zuvor (Wang et al. 2013).

Die Sauerstoffversorgung der Zellen wurde durch den Anschluss von Luftfiltern am Deckel des Reaktors gewährleistet, auch eine definierte Begasung sowie eine Hypoxiekultur der hiPSCs sind leicht umzusetzen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der entwickelte Rührreaktor im angegebenen Volumenbereich von 125 bis 200 ml arbeitsfähig ist. Die Pluripotenz der kultivierten Stammzellen konnte erhalten werden. Ein weiterer Vorteil war, dass das komplette System autoklavierbar war und somit ein Arbeiten unter sterilen Kulturbedingungen gewährleistet werden konnte. Durch die Verwendung eines Glasgefäßes, wurde die optische Kontrolle der Suspensionskultur und der Aggregatbildung ermöglicht, auch eine kontaktfreie Sauerstoffmessung über optische Messspots konnte durchgeführt werden. Die Benutzerfreundlichkeit des entwickelten Systems wurde durch die geringe Anzahl an Bauteilen und dessen Handlichkeit begünstigt. Hierdurch wurde zudem eine schnelle Inbetriebnahme ermöglicht.

#### **5.4 Differenzierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke**

Die Differenzierung von hiPSCs in Endothelzellen der BHS erfolgte analog bereits publizierter Protokolle von Lippmann et al. (Lippmann et al. 2014) und Wilson et al. 2015 (Wilson et al. 2015). Während der Embryonalentwicklung stellen die Zellen des sich entwickelnden Gehirns Faktoren, wie Wnt7a und Wnt7b zur Verfügung, welche über den kanonischen Wnt-Signalweg die spezifische BHS-Entwicklung der Endothelzellen fördern (Daneman et al. 2010; Stenman et al. 2008). Somit wurde eine Differenzierungsstrategie verwendet, welche simultan zur Bildung neuraler und endothelialer Zellen beiträgt. Den Endothelzellen wird während der Differenzierung eine Mikroumgebung zur Verfügung gestellt, die der im sich entwickelnden embryonalen Gehirn sehr ähnlich ist (Lippmann et al. 2012). Die Protokolle wurden in unseren Laboren etabliert und die Daten von Lippmann et al. konnten reproduziert werden. Die resultierenden hiPS-ECs wiesen typische BHS-Merkmale auf. Die zweidimensionale Differenzierung der hiPSCs auf Matrigel<sup>®</sup> startete mit einer sechstägigen Behandlung der hiPSCs unter Verwendung eines unkonditionierten Mediums, wodurch sich eine



Mischpopulation aus neuronalen Zellen und unreifen Endothelzellen der BHS entwickelte (Lippmann et al. 2012). Danach erfolgte in den Protokollen von Lippmann et al. die Behandlung der Zellen mit einem Endothelzellmedium, welches RA und hbFGF enthielt, um deren Proliferation anzuregen. In einem konzentrationsabhängigen Effekt konnten Lippmann et al. durch die Gabe von 10  $\mu$ M RA die Expression der Adhärenzverbindung VE-Cadherin deutlich erhöhen. Auch eine gesteigerte Expression des TJ-Proteins Occludin war zu erkennen und Claudin-5 wurde kontinuierlicher exprimiert. Neben der gesteigerten Barrierefunktion der differenzierten Zellen, steigerte RA ebenfalls die Aktivität des Effluxtransporters MRP. Weiterhin konnten Lippmann et al. durch Retinsäure-Stimulation der Zellen eine ca. zweifach erhöhte Zellausbeute generiert werden, auf die Differenzierungseffizienz allerdings hatte RA keinen Einfluss (Lippmann et al. 2014). Der positive Einfluss von RA auf die BHS-Eigenschaften wurde auch von anderen Arbeitsgruppen speziesübergreifend durch Versuche an immortalisierten Zelllinien von Nagern und der humanen Linie hCMEC/D3 bestätigt (El Hafny et al. 1997; Lechardeur et al. 1995; Mizze et al. 2013). Die Expression des Retinol-bindenden Proteins und seines Membranrezeptors STRA6 wurde *in vivo* an BHS-Endothelzellen gezeigt (Kawaguchi et al. 2007). Dieses Ergebnis konnte durch Studien von Lippmann et al. *in vitro* an den in dieser Arbeitsgruppe entwickelten aus hiPSCs generierten BHS-ECs bestätigt werden (Lippmann et al. 2012).

Die Aufreinigung der hiPS-ECs aus dem heterogenen Zellgemisch erfolgte lediglich durch Subkultivierung der Zellen auf einer Kollagen IV/Fibronectin-beschichteten Matrix. Dieser von Lippmann et al. etablierte Prozess stellt eine erhebliche Arbeitserleichterung dar, denn herkömmliche Protokolle zur Aufreinigung von differenzierten Endothelzellen nutzen z. B. Antikörper-basierte Techniken, die nicht nur zeit- und kostenintensiv sind, sondern auch Zellstress induzieren. Beim Passagieren der differenzierten Zellen war eine sehr lange, 30-minütige Accutase<sup>®</sup>-Behandlung und starkes mechanisches Vereinzeln der Zellen durch Resuspendieren nötig, um die ausgebildeten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte der Endothelzellen zu lösen. Diese Beobachtung konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen belegt werden, denn Lippmann et al. zeigten, dass die differenzierten endothelialen Zellen bereits nach fünf- bis sechstägiger Behandlung mit unkonditioniertem Medium die TJ-Proteine Occludin und Claudin 5 exprimierten.

Nicht nur die Zusammensetzung der Differenzierungsmedien und Abstimmung der Wachstumsfaktorkonzentrationen sind entscheidend für die Effizienz einer Differenzierung, sondern auch die Zelldichte zum Start des Prozesses. Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten BHS-Endothelzellendifferenzierung war die definierte Aussaat der hiPSCs als Einzelzellen zu Beginn und bei der Subkultivierung der bereits differenzierten Zellen. Hierfür wurde eine von Wilson et al. empfohlene optimale Zelldichte von  $2,5 \cdot 10^4$  bis  $3,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> als Startpunkt für die anschließende Behandlung mit unkonditioniertem Medium genutzt (Wilson et al. 2015). Diese Methode erlaubte es, einheitliche und reproduzierbare Differenzierungsvoraussetzungen zu schaffen, die innerhalb der verschiedenen Ansätze zu konstanten Versuchsbedingungen beitragen. Die Optimierung der Ausgangszelldichte durch Wilson et al. führte zu einer bis zu 30 % gesteigerten Zellausbeute sowie einer deutlichen Erhöhung der Barrieredichtigkeit der aus hPSCs generierten BHS-Endothelzellen (Wilson et al. 2015). Vergleichend dazu werden in vielen Differenzierungsprotokollen die hiPSCs allerdings nicht als Einzelzellen, sondern als kleine Kolonien ausgesät, die in ihrer Größe und Verteilung heterogen und schwer zu kontrollieren sind.

Die hiPS-ECs wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe immunhistologischer Färbun-

gen und Durchflusszytometrie analysiert. Die Proteine vWF und VE-Cadherin konnten mit Hilfe dieser Methoden detektiert werden, ein klarer spezifischer Nachweis des Proteins CD31 (PECAM1) war allerdings, trotz Testung verschiedener Antikörper und Färbeprotokolle, nicht möglich. Gleiches galt für den frühen Endothelzellmarker TIE2. Im Gegensatz dazu konnten Lippmann et al. die Expression von PECAM1 durch die aus hiPSCs differenzierten BHS-ECs zeigen (Lippmann et al. 2012). Neben CD34 gehören auch CD31 und TIE2 zu den Markern für endotheliale Progenitoren. CD31 wird sogar zu den frühesten Adhäsionsmolekülen während der Embryonalentwicklung gezählt (Baldwin et al. 1994). Auf Grund unterschiedlicher Splicemuster, können allerdings verschiedene Isoformen und daraus resultierende unterschiedliche Sensitivitäten der zytoplasmatischen Domänen für die verwendeten Antikörper resultieren (DeLisser et al. 1994). Die Expression des TJ-Proteins ZO1 sowie des für das BHS-Endothel essentiellen Glukosetransporters GLUT1 hingegen konnten in den differenzierten Zellen innerhalb der vorliegenden Dissertation nachgewiesen werden.

Weiterhin ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen, die Fähigkeit der hiPS-ECs zur Aufnahme von Ac-LDL und damit den Nachweis zur Funktionalität zu erbringen. Ein zusätzliches Merkmal funktioneller Endothelzellen stellt deren Fähigkeit dar, unter Stimulation von VEGF 3D-Gefäßstrukturen auf Matrigel™ auszubilden. Die im Rahmen dieser Arbeit differenzierten hiPS-ECs besaßen, im Gegensatz zu den Endothelzellen, die im Rahmen der ursprünglichen Protokolle von Lippmann et al. generiert wurden, diese Fähigkeit nicht. Es ist gelungen einen möglichen Grund dafür zu detektieren: Die fehlende Expression des VEGFR2 konnte nachgewiesen werden.

Im Rahmen von Kooperationsprojekten mit der Universität in Wien wurden endotheliale Progenitoren ausgetauscht. Durch deren Kryokonservierung war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals möglich, die vordifferenzierten Stammzellen über lange Zeit zu erhalten und Kooperationspartnern zur Verfügung zu stellen. Die hiPS-ECs wurden hierfür vor deren Subkultivierung auf der Kollagen IV/Fibronectin-Matrix mit Hilfe eines Kryomediums bestehend aus EC-Medium mit 10 % KO-Serum und 10 % DMSO eingefroren. Ohne größeren Arbeitsaufwand und Vorkenntnisse gelang es anhand der zur Verfügung gestellten Protokolle, deren Kultur in den externen Laboren zu etablieren und die hiPS-ECs final zu differenzieren. Sogar mit den kryokonservierten hiPS-ECs, welche direkt nach dem Auftauen für den Modellaufbau eingesetzt wurden, konnten TEER-Werte von mehr als  $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  erreicht werden. Zukünftig kann nun erstmalig auf diese kryokonservierten Zellklone zum Modellaufbau in standardisierter Weise zurückgegriffen werden.

Ein Problem, welches bei der Differenzierung bzw. Reprogrammierung von hiPSCs immer wieder auftritt, ist das so genannte epigenetische Gedächtnis der Zellen. Der Begriff Epigenetik ist aus dem altgriechischen Wort *epi* und Genetik zusammengesetzt. Untersucht werden in diesem Forschungszweig die Faktoren, die die Aktivität von Genen beeinflussen, aber nicht auf Mutationen beruhen. Trotzdem werden diese vererbt und beeinflussen somit die Entwicklung und Differenzierung der Zellen. Durch DNA-Methylierungen oder Modifikationen der Histone lassen sich beispielsweise Veränderungen des Phänotyps hervorrufen (Brix et al. 2015), die DNA-Sequenz der Zellen bleibt hingegen unverändert. Bezogen auf iPSCs sind viele Genomregionen und deren assoziierte Histone gefunden worden, die sich von ESCs unterscheiden. Diese Unterschiede werden als epigenetisches Gedächtnis bezeichnet, wenn sie von der Elternzellen “vererbt” worden sind, als anormale epigenetische Modifikation gelten sie, wenn sie einmalig bzw. erstmalig bei den iPSCs auftreten (Brix et al. 2015). Die Genexpression kann durch epigenetische Veränderungen reguliert werden, die auch zum

Teil erhalten bleiben, wenn die Originalzellen in hiPSCs reprogrammiert werden (Kim et al. 2010; Polo et al. 2010; Nukaya et al. 2015). Nicht nur die Reprogrammierung somatischer Zellen in iPSCs, auch die Pluripotenz und Differenzierungskapazität der Stammzellen können durch epigenetische Modifikationen beeinflusst werden (Brix et al. 2015). Aus dieser Erkenntnis lässt sich schließen, dass hiPSCs aus fetalen Zellen schwer in adulte ausgereifte somatische Zellen zu differenzieren sind und einige der Endothelzellmarker, wie z. B. VEGFR2, in den hier präsentierten Daten nicht detektiert werden konnten. In zukünftigen Studien sind die Versuche mit hiPSCs aus adulten Ursprungszellen zu wiederholen, um diese Fehlerquelle ausschließen zu können und die Vergleichbarkeit des Modells bzw. die Übertragbarkeit der Differenzierungsprotokolle auf andere Zelllinien beurteilen zu können.

## 5.5 Neurale Differenzierung pluripotenter und multipotenter Stammzellen

Die neuronale Differenzierung pluripotenter Stammzellen in reife Astrozyten erfolgt *in vitro* unter Verwendung der Standardmethoden innerhalb von ca. 12 Wochen. Astrozyten stellen den am häufigsten vorkommenden Zelltyp im Gehirn und Rückenmark dar (Liu und Zhang 2011). Ausgehend von den tripotenten NSCs, können neben Astrozyten auch Neurone und Oligodendrozyten generiert werden. Nach der Isolation oder Differenzierung von NSCs bilden diese durch die Expansion *in vitro* oft unspezifisch Astrozyten aus (Liu und Zhang 2011). Allerdings ist die gezielte Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu reifen Astrozyten nicht so einfach wie bisher angenommen wurde (Liu und Zhang 2011). Gründe hierfür sind, dass die Spezifizierung der Astrozyten inklusive astroglialer Progenitoren bisher noch ungeklärt ist und individuelle Marker zu deren Charakterisierung fehlen (Zhang 2001). Außerdem ist eine Langzeitkultur der Astrozyten nötig, um diese auszureifen. Die Expression von GFAP tritt erst nach dreimonatiger Differenzierung auf, S100 $\beta$  hingegen wird schon nach 2 Monaten gebildet (Liu und Zhang 2011). Diese sehr zeitaufwendigen Protokolle umfassen die Bildung von EBs, in welchen die Stammzellen zur unspezifischen Differenzierung angeregt werden. Spezielle Beschichtungen begünstigen dann das Auswachsen der differenzierten Zellen. Die im adhärenen Zellgemisch auftretenden neuronalen Rosetten müssen aufwendig gepickt werden, um diese zu selektionieren und spezifisch in die gewünschten Zielzellen zu differenzieren.

Neben diesen arbeits- und zeitaufwendigen Schritten existiert ein weiteres Problem bei der Durchführung der Differenzierung. Ausgehend von den Standardkulturen, die in den meisten Laboren etabliert sind und eine feederfreie Kultur von pluripotenten Stammzellen in mTeSR<sup>TM</sup>1 Medium ermöglichen, ist die Bildung von EBs nicht so leicht möglich (Mummery et al. 2012). Die direkte Differenzierung der Zellen in Monolayerkulturen stellt eine geeignete Lösung für dieses Probleme dar.

In den hier präsentierten Arbeiten wurden bereits publizierte Protokolle etabliert, welche eine Einzschrittdifferenzierung von hiPSCs in NSCs innerhalb einer Woche ermöglichten (Yan et al. 2013). Im Vergleich zu herkömmlichen Methoden, bei denen eine EB-Bildung induziert wird, gelang es mir mit Hilfe eines neurogenen Mediums in adhärenter Kultur frühe primitive NSCs zu differenzieren. Bei diesem Prozess wurden bis zu zwei Wochen Differenzierungszeit eingespart. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Zellen im weiteren Kulturverlauf ab der 6. Passage erstmalig unter EGF/FGF-Einfluss auf Poly-L-Ornithin/Laminin-Beschichtungen kultiviert, um ein späteres Stadium glialer hiPS-NSCs zu generieren. Diese hiPS-NSC-Population ist auf Grund ihrer Morphologie, die durch

eine rosettenähnliche Zusammenlagerung der Zellen geprägt war, und der Expression der charakteristischen Proteine PAX6, SOX1, SOX2 und NESTIN als lt-hESNSCs einzuordnen (Koch et al. 2009). lt-hESNSCs sind in der Lage, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu generieren sowie sich selbst zu erneuern. Unter dem Einfluss von hbFGF und EGF konnten sie für mehrere Passagen *in vitro* kultiviert werden, die mögliche Langzeitexpansion dieser Zellen bis zu 100 Passagen wurde auch von Conti und Cattaneo beschrieben (Conti und Cattaneo 2010).

Auf Grund der Verwendung des Fertigmediums der Firma Life Technologies zur neuronalen Differenzierung von hiPSCs, kann über dessen Bestandteile nur spekuliert werden. Zur Differenzierung von hESCs in eine sehr frühe Form der NSCs, welche zur Generierung von ZNS- und Neuralleistenzellen im Stande sind, werden sowohl WNT, zur Spezifizierung der Zellen der lateralen Kante der Neuralplatte, und sein Antagonist Shh eingesetzt. Shh fördert wiederum die Ausbildung ventraler Neuralrohrzellen (Conti und Cattaneo 2010). In der *In vivo*-Embryogenese haben die Zellen des Neuroepithels an der Grenze zwischen Neuralplatte und Neuralleiste dieses Potential, Neuralrohr-abgeleitete Zellen des ZNS oder periphere neuronale Zellen auszubilden (Patthey et al. 2008; Patthey et al. 2009). Diese frühen NSCs können allerdings nicht *in vitro* expandiert werden (Reinhardt et al. 2013). Unter dem Einfluss von EGF und hbFGF bilden sie rosettenähnliche Strukturen aus, welche in der Embryogenese Zellen des Neuralplattenstadiums entsprechen (Conti und Cattaneo 2010).

Weiterhin erfolgte die Isolation neuraler Stammzellen aus fetalem Gehirngewebe. Diese Zellen werden in den Literatur als RG beschrieben und sind morphologisch heterogener und langgesteckter als die hiPS-NSCs. Kultiviert man die RG unter dem Einfluss von hbFGF und EGF in adhären-ter Kultur, wird die neuronale Differenzierung der Zellen unterdrückt. Eine Langzeitkultivierung der fetalen NSCs durch kontinuierliche symmetrische Teilung, Selbsterneuerung und stabile NSC-Markerexpression sind die Folge (Conti et al. 2005). Die Expression der für RG typischen Proteine, wie Vimentin und GFAP konnte in meinen Arbeiten demzufolge nicht detektiert werden. RG sind *in vitro* auch nicht zur Langzeitproliferation geeignet (Conti und Cattaneo 2010). Zellen im exakt gleichen Stadium wie lt-hESNSCs sind nur aus dem Neuralrohr von Föten zu isolieren. Beide Arten neuraler Stammzellen konnten trotz phänotypischer Unterschiede mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert werden und wiesen die frühen neuralen Stammzellproteine SOX1, SOX2, PAX6 und NESTIN auf.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, NSCs in Form freischwimmender Neurosphären oder als adhären-te Monolayerkulturen zu züchten. Innerhalb der 3D-Konstrukte sind die Zellen allerdings suboptimalen Kulturbedingungen ausgesetzt und neigen vor allem in der Mitte der Sphären zur spontanen Differenzierung (Campos 2004). Aus der Interaktion zwischen differenzierten Zellen und Vorläufern resultiert, dass die tripotenten NSCs parakrinen Faktoren ausgesetzt sind, die deren Differenzierung fördern (Conti und Cattaneo 2010). Auf mit Poly-Ornithin/Laminin- oder Fibronectin-beschichteten Oberflächen adhäreren NSCs sehr gut und bilden homogene Monolayer aus. Unter optimalen adhären-ten Kulturbedingungen teilen sich die NSCs symmetrisch und behalten ihre tri-potente Differenzierungskapazität bei. Reine NSC-Kulturen mit einem sehr geringen Prozentsatz dedifferenzierter Zellen können erhalten werden (Conti und Cattaneo 2010).

Die Differenzierung der hiPS-NSCs erfolgte gemäß Protokollen von Reinhardt et al. (Reinhardt et al. 2013), die eine direkte Differenzierung der NSCs in GFAP-exprimierende Astrozyten innerhalb von nur 30 Tagen ermöglichte. Herkömmliche Protokolle benötigen für diesen Prozess neun bis

zehn Wochen, dies entspricht einer Zeitersparnis von knapp fünf bis sechs Wochen. Durch Stimulation mit FCS wurde eine unspezifische Differenzierung eingeleitet, durch Verwendung von CNTF und dbcAMP wurden die Astrozyten zur Reifung angeregt sowie deren Proliferationspotential stimuliert.

Die ausgereiften Astrozyten exprimierten nach der Differenzierung aus hiPSCs die astroglialen Proteine GFAP und S100 $\beta$ . Die Expression von GFAP allerdings verringerte sich im Verlauf der in meiner Arbeit präsentierten *in vitro*-Kultur der Astrozyten. Dieses Phänomen war sowohl bei den aus hiPSCs differenzierten Zellen, als auch bei den primären Astrozyten zu beobachten und entspricht dem Expressionsmuster von Astrozyten im nativen Gehirn. Sofroniew und Vinters konnten zeigen, dass Populationen reifer Astrozyten im gesunden Gehirn keine detektierbaren Level an GFAP aufweisen oder durch die fehlende Stimulation nicht reaktiv sind (Sofroniew und Vinters 2010). Durch die Stimulation der Astrozyten mit Hilfe von CNTF, Forskolin oder TGF- $\beta$  ist es möglich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* deren GFAP-Expression zu steigern (Gomes et al. 1999; Shafit-Zagardo et al. 1988; Zenker et al. 2003).

## 5.6 Etablierung und Qualifizierung humaner *in vitro* Blut-Hirn-Schranken-Modelle

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden funktionale BHS hiPS-ECs, hiPS-NSCs und reife Astrozyten (hiPS-A) aus hiPSCs differenziert und für den systematischen Aufbau von zehn unterschiedlichen Kokulturmodellen der BHS verwendet. Basierend auf den unterschiedlichen Kokultur-Zusammenstellungen wurden die Barriereigenschaften sowie die Expression von TJ- und Transportergenen der BHS untersucht. Neben den aus hiPSCs differenzierten Astrozyten wurden hierfür auch primäre fetale Astrozyten und Perizyten sowie fNSCs verwendet.

*In vitro*-Modelle der BHS sind wichtige Testsysteme in der Medikamentenentwicklung und zur Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen. Mit dem Ziel, die *in vivo*-BHS so nah wie möglich zu simulieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von unterschiedlichen BHS-Modellen entwickelt und analysiert. Diese Modelle basierten auf den zuvor beschriebenen aus hiPSCs differenzierten Zellen (hiPS-ECs, hiPS-NSCs und hiPS-A) sowie primären fetalen Zellen (Astrozyten, Perizyten, fNSCs). hiPSCs stellen eine effektive Zellquelle dar, um funktionale Gehirnzellen zu generieren und zeichnen sich durch den Vorteil aus, dass komplett unabhängig von postnatalen Gehirnbiopsien und ohne Limitierung der Zielzellen gearbeitet werden kann (Lippmann et al. 2012; Lippmann et al. 2013). Die Verwendung von hiPSCs erlaubt eine standardisierte und reproduzierbare Entwicklung von BHS-Modellen.

Verglichen mit den bereits existierenden BHS-Modellen, die auf humanen Zelllinien und isolierten primären Zellen basieren, gelang es der Gruppe um Lippmann 2012 erstmalig, mit Hilfe der aus hiPSCs differenzierten BHS-ECs *in vivo*-ähnliche TEER-Werte von etwa 1500 bis 3600  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  zu erreichen (Lippmann et al. 2012; Lippmann et al. 2014). Die hiPSC-Linie IMR90-4 wurde von Lippmann et al. als die Stammzelllinie mit der größten Differenzierungseffizienz in BHS-ECs beschrieben (Lippmann et al. 2012) und aus diesem Grund auch in den hier präsentierten Studien eingesetzt. Mit der humanen BHS-Zelllinie hCMEC/D3 konnten in Versuchen lediglich nur geringe TEER-Werte von unter 40  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  erzielt werden (Weksler et al. 2005), die allerdings durch deren dynamische Kultivierung, stimuliert durch einen Medienfluss, signifikant gesteigert werden konnten (Cucullo

et al. 2008). Allerdings sind auch diese elektrischen Widerstände der EC-Barriere noch weit von den geschätzten *in vivo*-Werten von über  $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Crone und Olesen 1982; Butt et al. 1990) entfernt. Ähnliche Beobachtungen wie Cucullo et al. konnten auch durch den Einsatz von chip-basierten Mikrofluidik-Systemen erzielt werden (Griep et al. 2013). Endothelzellen sind in ihrer *in vivo*-Umgebung kontinuierlich dem Scherstress durch den intraluminalen Blutfluss ausgesetzt (Santaguida et al. 2006). Durch die Kultivierung der Zellen unter dynamischen Flussbedingungen konnte die physiologische Permeabilität der *in situ*-BHS imitiert, die Differenzierung der Endothelzellen beeinflusst und der BHS-Phänotyp der Zellen erhalten werden (Santaguida et al. 2006; Cucullo et al. 2008; Desai et al. 2002). Weiterhin beeinflusst der Scherstress die physiologische Ausbildung der TJs und die Expression von Transportern (Cucullo et al. 2011). Das Fehlen des physiologischen Scherstress in den auf Transwellssystemen aufgebauten BHS-Modellen ist deren größter Nachteil (Santaguida et al. 2006). *In vivo* wurden durch Messungen in Kapillaren der Netzhaut und Extrapolation ein Scherstress von 5 bis 23 dyne/cm<sup>2</sup> und ein Blutdruck von 25 mmHg für die BHS bestimmt (Cucullo et al. 2013; Koutsiaris et al. 2007).

In den bisher veröffentlichten Studien wurden aus hiPSCs ECs differenziert, welche spezifische BHS-Charakteristika aufwiesen. Beispiele hierfür sind die Expression von BHS-relevanten TJ Proteinen, wie Claudin 5 und Occludin, und Transportermolekülen, z. B. Glukosetransporter 1 und PGP (Lippmann et al. 2012). Durch Kokulturen mit aus NSCs differenzierten Neuronen und Astrozyten, welche in einem Verhältnis von 1:3 vorlagen, konnten Lippmann et al. die BHS-Eigenschaften der ECs weiter verbessern. Die Barriereintegrität der Modelle wurde signifikant erhöht und die Expression der Gene, die den ABC-Transporter ABCC5 und den LDL-Rezeptor LRP1 kodieren, konnte detektiert werden. In der Monokultur der BHS-ECs wurden diese zwei Gene nicht exprimiert (Lippmann et al. 2012).

Die wechselseitige Stimulation neuronaler und endothelialer Zellen wurde nicht nur in *in vitro*-Versuchen beschrieben. In speziellen Bereichen des adulten Gehirns, wie der Subventrikular- und Subgranularzone, sind neurale Stammzellen zu finden, welche sehr eng mit den sich dort befindlichen Mikrogefäßen, der neurovaskulären Nische, verbunden sind. Lösliche Faktoren, die von den Endothelzellen abgegeben werden, beeinflussen die Selbsterneuerung der NSCs, aber auch deren Differenzierung (Li et al. 2006). Die Studien von Li et al. belegen aber auch die umgekehrte Stimulation der ECs durch NSCs. Mit Hilfe von *in vitro*-Versuchen konnten durch Kokulturen mit NSCs die BHS-ECs zur vaskulären Gefäßbildung und -erhaltung angeregt werden. Weiterhin exprimierten die NSCs die Wachstumsfaktoren VEGF und BDNF und produzierten Stickstoffmonoxid (NO), welches zur endothelialen Aktivierung des VEGFR2 sowie TrkB (Tyrosinkinase Rezeptor B) führte (Li et al. 2006; Gilbertson und Rich 2007). Diese Erkenntnisse konnten sowohl in Modelle, in denen die Zellen direkten Kontakt zueinander hatten, als auch in Studien reproduziert werden, in denen beide Zellarten durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt waren (Li et al. 2006). Neben den Nischenzellen NSCs, wurden in meiner Arbeit auch Astrozyten und Perizyten zur Kokultivierung der hiPS-ECs eingesetzt, welche zur Erhöhung der Barriereintegrität führten. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls in einer Vielzahl unterschiedlicher *in vitro*-Experimente von anderen Wissenschaftlern bestätigt (Weksler et al. 2005; Lim et al. 2007; Al Ahmad et al. 2011). Aus der Behandlung der humanen Zelllinie hCMEC/D3 mit konditioniertem Medium humaner Astrozyten beispielsweise, resultierte die Senkung deren Permeabilität und Erhöhung des TEER (Weksler et al. 2005). Experimente mit primären Endothelzellen der Ratte zeigten die Hochregulation der PGP-

Expression durch Kokultivierung mit NSCs, wohingegen durch Astrozyten oder ein Gemisch von Astrozyten und Neuronen, welche aus NSCs differenziert wurden, die TJ-Bildung verstärkt werden konnte (Lim et al. 2007).

Neben Astrozyten haben auch Perizyten einen positiven Einfluss auf die Eigenschaften des BHS-Endothels, Lippmann et al. konnten in vergleichenden Studien zeigen, dass bei BHS-ECs, welche für 24 Stunden mit Perizyten ohne direkten Kontakt kokultiviert wurden, ein signifikant erhöhter TEER gemessen wurde (Lippmann et al. 2014). Perizyten spielen zudem bei der Reifung und dem Bestand von ECs eine entscheidende Rolle (Winkler et al. 2011). Auch während der Embryonalentwicklung des Gehirns tragen Perizyten, als erste Einflusszellen, zur Ausbildung der BHS-Eigenschaften des Endothels bei, noch bevor Astrozyten sich in dieser Mikroumgebung überhaupt etablieren konnten (Daneman et al. 2010).

Im Gegensatz zu vorherigen stammzellbasierten Studien war es in meinen Experimenten das Ziel, erstmalig die verschiedenen beschriebenen Zelltypen systematisch und simultan miteinander zu kombinieren und verschiedene komplexe Kokulturen aufzubauen, um deren Einfluss auf die hiPS-ECs in den stammzellbasierten BHS-Modellen zu untersuchen. Speziell die Ausbildung des TEER, die Expression relevanter BHS-Gene sowie der Transport von Referenzsubstanzen sollte untersucht werden, um die aufgebauten Modelle zu qualifizieren.

In den in dieser Arbeit präsentierten Studien erwiesen sich sowohl die Tripel-Kultur-Modelle, in denen die hiPS-ECs mit hiPS-NSCs und Perizyten kokultiviert wurden, als auch die Quadrupel-Kulturen aus hiPS-ECs, hiPS-NSCs, Perizyten und Astrozyten als diejenigen BHS-Modelle, welche sich durch signifikante TEER-Erhöhungen im Vergleich zur hiPS-EC-Monokultur auszeichneten. Der TEER, den die Endothelzellen unter den unterschiedlichen Kokulturbedingungen ausbildeten, wurde einheitlich nach zweitägiger Kultur der Modelle gemessen und verglichen, denn zu diesem Zeitpunkt war der maximale Widerstandswert erreicht. Die Endothelzellen wurden in einer sehr hohen Aussaatdichte auf die Transwellinserts aufgebracht, so dass diese schon nach dem Adhärenz einen konfluenten Monolayer ausgebildet hatten. Nach 24-stündiger Kokultur wurden die Zellen für weitere 24 h unter reduzierten Wachstumsfakturbedingungen kultiviert. Durch den Entzug von hbFGF und RA konnte eine signifikante TEER-Erhöpfung induziert werden. Im Vergleich zu den Widerständen, die sich unter proliferativen Bedingungen ausgebildet hatten, konnte dieser unter wachstumsfaktorreduzierten Bedingungen etwa verdoppelt werden. Routinemäßig werden zur Kultivierung und Proliferation von BHS-Endothelzelllinien und auch primären isolierten Zellen Medien mit einem hohen FCS-Gehalt von 10 % eingesetzt. Dieser wird beim Aufbau von BHS-Modellen dann auf 2 bis 0 % reduziert. Zudem können Hydrokortison und Insulin eingesetzt werden, um die Barriereintegrität der ECs zu steigern und deren Transportereigenschaften zu verbessern (Hoheisel et al. 1998; Forster et al. 2005). Beispielsweise konnte durch eine physiologische Hydrokortisonbehandlung (110 nM) von murinen cEND-Zellen eine gesteigerte Occludinexpression, sowie eine signifikante Erhöhung des TEER erzielt werden (Forster et al. 2005).

Weiterhin waren die TEER-Werte der zuvor genannten im Rahmen dieser Dissertation entwickelten BHS-Modelle im Mittel auch höher als die der Kokulturen aus hiPS-ECs und Astrozyten sowie Tripelkulturen aus hiPS-ECs, Astrozyten und Perizyten. Mit Hilfe der hier etablierten Quadrupelkultur konnten maximale TEER-Werte von knapp  $2500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  nach zweitägiger Kokultur erreicht werden, der TEER der Tripelkultur, die keine Astrozyten enthielt, war fast identisch. Diese Werte

liegen im für die BHS physiologischen Bereich. Zudem decken sich die Ergebnisse mit den zuvor beschriebenen Literaturdaten des individuellen Einflusses von Perizyten, Astrozyten und neuronalen Zellen auf die BHS-Eigenschaften von aus Stammzellen generierten ECs (Lippmann et al. 2013; Lippmann et al. 2014; Cecchelli et al. 2014). Beispielsweise wurden durch die initiale Expansion der BHS-ECs unter dem Einfluss von Perizyten und deren anschließende Kokultur mit differenzierten NSCs, höhere messbare TEER von ca.  $3600 \Omega \cdot \text{cm}^2$  erreicht (Lippmann et al. 2014). Die von mir gewonnenen Beobachtungen, dass der simultane Einfluss unterschiedlicher Kokulturzellen größer ist, als der Einfluss dieser Zellarten allein, konnten auch in Untersuchungen anderer Wissenschaftler, mit primären ECs, Perizyten und Astrozyten, welche aus drei Wochen alten Ratten isoliert wurden, bestätigt werden. Nakagawa et al. zeigten, dass die simultane Kokultur aller drei Zellarten zu einer deutlichen Steigerung der Proteinexpression in Bezug auf die TJ-Proteine Occludin, Claudin 5 und ZO1 führte. Im Vergleich dazu war der Einfluss auf die Endothelzellbarriere bei Betrachtung der einzelnen Kokulturzellen getrennt voneinander viel kleiner (Nakagawa et al. 2007; Nakagawa et al. 2009).

Eine weitere Beobachtung, die im Rahmen meiner Arbeit gemacht wurde, war, dass hiPS-A einen höheren TEER der ECs hervorriefen als fetale Astrozyten. Dieser Unterschied war nach viermaliger Versuchswiederholung jedoch nicht signifikant. Eine mögliche Begründung für diese Ergebnisse können Studien von Lippmann et al. liefern, die belegten, dass auch nach der Differenzierung in GFAP-positive Astrozyten immer noch unreife Zellen in den Kulturen vorhanden waren (Lippmann et al. 2012). Unreife Astrozyten exprimieren z. B. den NSC-Marker NESTIN, welcher durch immunhistologische Färbungen detektiert werden konnte. Gestützt wird diese These zudem dadurch, dass in unseren Arbeiten vergleichbare TEER-Werte ebenfalls mit Hilfe einer Tripelkultur mit hiPS-NSCs und Astrozyten erzielt werden konnten. Nach der Astrozytendifferenzierung aus hiPSCs war eine antikörperbasierte Aufreinigung der vitalen GFAP-positiven Zellen, welche deren Reinkultur erzielt hätte, nicht möglich, da GFAP ein zytoplasmatisches Protein darstellt.

Weiterhin ist anzumerken, dass alle in dieser Arbeit präsentierten Widerstandsergebnisse nach 48-stündiger Kokultur erzielt wurden, da zu diesem Zeitpunkt der TEER der Endothelzellen seinen Maximalwert erreicht hatte. Unsere Daten bestätigen die Ergebnisse von Lippmann et al., die ab einer Kokulturdauer von mehr als 24 h ein schnelles und signifikantes Absinken der TEER-Werte unter den Ausgangswert beobachten konnten (Lippmann et al. 2012). Die Kultivierung der BHS-Modelle unter dynamischen Flussbedingungen kann die Möglichkeit bieten Langzeitkulturen durchzuführen. Neuhaus et al. gelang die Langzeitkultur von BHS-Modellen basierend auf der porcinen mikrovaskulären Gehirndothel-Zelllinie PBMEC/C1-2 mit Hilfe von Hohlfaserreaktoren für bis zu 130 Tage. Nach statischer Kultur der Zellen auf Inserts hingegen, konnte schon nach 5 Tagen ein erstes Ablösen der Zellen beobachtet werden (Neuhaus et al. 2006).

Ein weiterer Unterschied zur Studie von Lippmann et al. 2014 ist darin zu sehen, dass dort unterschiedliche Kokulturzusammensetzungen gegeneinander verglichen wurden, die direkte Vergleichbarkeit der Aussaatdichten der Zellen wurde aber nicht beachtet. Somit wäre es theoretisch möglich, dass die beobachteten Effekte nicht nur auf die verwendeten Zellarten, sondern auch auf die unterschiedlichen und zum Teil nicht definierten Zelldichten zurückzuführen sind.

Im Gegensatz dazu wurden in unserer Studie erstmalig stammzellbasierte BHS-Modelle aufgebaut, welche sich durch konstante Gesamtzellzahlen der ausgesäten Kokulturzellen auszeichneten. Der



Einfluss der Kokulturzellen auf die Endothelzellen war somit nicht zellzahlabhängig und führte zu einer direkten Vergleichbarkeit des biologischen Effektes auf die hiPS-ECs. Außerdem waren die hier erstmalig präsentierten BHS-Modelle keine sequenziellen Kokulturen, sondern es erfolgte die Untersuchung des Einflusses simultaner Kokultureffekte, welche sich durch zum Teil komplexe Zell-Zell-Interaktionen auszeichneten. Den Aufbau von sequenziellen Kokulturen wählten Lippmann et al., um die Embryonalentwicklung der BHS zu simulieren, bei der die Endothelzellen zuerst mit Perizyten in Kontakt kommen und erst später durch Astrozyten stimuliert werden (Lippmann et al. 2013). Im Hinblick auf eine hohe Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit der BHS-Modelle allerdings ist unserer Meinung nach der Einsatz von definierten Zellzahlen und eine simultane Kokultur einfacher zu realisieren.

Die Ausbildung und der Erhalt der BHS-Eigenschaften der mikrovaskulären Endothelzellen werden sowohl durch den Crosstalk mit anderen Zellen als auch durch Zell-Matrixkontakte mit der EZM der neurovaskulären Einheit beeinflusst (Nakagawa et al. 2009).

Die Frage nach der Art der Kokultivierung der Zellen wird sehr kontrovers diskutiert. Viele Wissenschaftler konnten durch direkte Kokultivierung der Zellen an gegenüberliegenden Seiten der Transwellmembran gesteigerte Barriereigenschaften des BHS-Endothels beobachten (Nakagawa et al. 2007; Nakagawa et al. 2009; Demeuse et al. 2002). Andere Wissenschaftler wiederum beschrieben gegenteilige Beobachtungen und konnten eine gesteigerte Zellfunktion nur durch indirekte Kokulturen, bei denen die ECs auf der Transwellmembran und die anderen Zellen auf dem Boden der Wellplatten kultiviert werden, hervorrufen (Shayan et al. 2011). Ein direkter Kontakt der Kokulturzellen zu den ECs ist also nicht notwendig. Shayan et al. konnten zudem anhand von Fluoreszenzfärbungen der Zytoplasmamembran der Astrozyten zeigen, dass diese zwar mit ihren Ausläufern in die Membranporen eindringen, aber auf Grund der Membranstärke von  $10\ \mu\text{m}$  diese nicht vollständig durchdringen können (Shayan et al. 2011). Studien von Demeuse et al. widerlegen dieses Erkenntnis mit Hilfe von transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen. Um einen Kontakt zwischen BHS-ECs und Kokulturzellen, wie Astrozyten, zu gewährleisten, aber deren vollständige Migration durch die Membranporen zu verhindern, sind Porengrößen von  $0,4\ \mu\text{m}$  für Versuche zu verwenden (Demeuse et al. 2002). Die in meiner Arbeit durchgeführten Studien belegen aber, dass lösliche Faktoren, die von den Zellen ins Medium abgegeben werden, auch ohne direkten Zell-Zell-Kontakt zur Stimulation des BHS-Endothels führen können.

Die Transwellinserts der Firma Corning, die laut Lippmann et al. für den BHS-Modellaufbau verwendet werden sollten (Lippmann et al. 2012), besaßen eine PET-Membran (Polyethylenterephthalat), welche nach Herstellerangaben durch eine spezielle Behandlung der Zellkulturoberfläche verbesserte Adhärenzbedingungen aufweisen sollte. Durch ionisierende Strahlung kommt es zu einer Vernetzung von Carboxyl- und Aminogruppen auf der Membranoberfläche, wodurch diese eine negative Ladung erhält und die Zellen über positive Ionen aus dem Medium besser mit den Integrinen adhärieren. Diese speziellen Membranen wurden nur von der Firma Corning hergestellt und waren nicht mit größeren Porendurchmessern zu erhalten.

Auch im Hinblick auf die Expression BHS-relevanter Gene zeichnete sich die Quadrupelkultur durch eine im Mittel um mindestens 1,5-fache Steigerung der Genexpression des Effluxtransporters ABCB1, Glutamattransporters SLC1A1 und Glukosetransporters SCL2A1 sowie OCLN, welches das TJ-Protein Occludin kodiert, aus. Auch die Expression der Gene für Claudin 3, Claudin 4 und

VE-Cadherin waren im Vergleich zur Monokultur leicht erhöht. Weiterhin konnten ebenfalls die Claudine 1 und 5 mittels qRT-PCR in den hiPS-ECs der Mono- und Quadrupelkulturen identifiziert werden. Diese Daten weisen auf ein komplexes Netzwerk von TJ-Strängen hin, welches zu den funktionell sehr dichten TJs der Zellen passt. Die wesentlichen Transmembranmoleküle, welche den zellulären Kontakt zwischen den Endothelzellen der BHS vermitteln, sind Occludin, Claudin 1, Claudin 3 und Claudin 5 (Wolburg und Lippoldt 2002b). Das Vorhandensein von Claudin 1 und Claudin 5 an der BHS ist in der Fachliteratur weit verbreitet (Liebner et al. 2000a; Morita et al. 1999), wobei die Expression von Claudin 5 auf das Endothel beschränkt zu sein scheint (Morita et al. 1999). Claudin 1 hingegen wurde zuerst in Hepatozyten der Leber, also Epithelzellen detektiert (Furuse et al. 1998). Weiterhin scheint das Vorhandensein von Claudin 1 in der BHS variabel und speziesabhängig zu sein und wird noch nicht flächendeckend in der Wissenschaft anerkannt (Wolburg und Lippoldt 2002b). Fest steht, dass die BHS-Endothelzellen des adulten Gehirns durch TJs verbunden sind, welche über eine extrem niedrige Permeabilität verfügen und mehr denen der epithelialen Barrieren entsprechen (Reese und Karnovsky 1967). In neueren Studien, ist auch das Vorhandensein von Claudin 3 und 4 an der BSH bewiesen worden (Wolburg et al. 2003; Kratzer et al. 2012). Auch auf Proteinlevel wurden in den an dieser Stelle vorgestellten Daten das Vorhandensein der TJ-Proteine Occludin, Claudin 1, 3, 4 und 5 mit Hilfe von Western Blot-Analysen nachgewiesen.

Auf Grund der hohen Barriereigenschaften und erhöhten Expressionslevel charakteristischer BHS-Transporter und TJ-Moleküle der Quadrupelkulturmodelle, erfolgte deren weitere Qualifizierung auf Basis ultrastruktureller Analysemethoden und der Untersuchung der Permeabilität gegenüber ausgewählten Referenzsubstanzen.

Die TJ-Proteine Claudin 1 und 3 sind bei Gefrierbruchaufnahmen stärker mit der P-Phase, Claudin 5 hingegen stärker mit der E-Phase assoziiert (Wolburg et al. 1994; Morita et al. 1999). Durch die *in vitro*-Kultur von isolierten BHS-Endothelzellen und Gefäßfragmenten wird die TJ-Zusammensetzung allerdings verändert. Die Expression von CLDN1 geht zurück und die E-Phasenassoziation der TJs wird verstärkt (Liebner et al. 2000b). Unter pathologischen Bedingungen, wie der Ausbildung maligner Gliome, wurden gleiche Beobachtungen gemacht (Liebner et al. 2000a).

Die parazelluläre Barriere gegenüber kleinen Ionen und Molekülen, die die BHS-Endothelzellen durch TJs in den Mono- und Quadrupelkulturen ausgebildet hatten, wurde funktionell durch Messung des hohen TEER und des niedrigen Durchflusses von parazellulären Markermolekülen charakterisiert. Durch Analyse der Ultrastruktur der Zellen mittels Gefrierbruch-EM und Transmissionselektronenmikroskopie konnte das Vorhandensein der TJs in unseren etablierten Modellen deutlich gezeigt werden. Die TJs ähnelten strukturell denen, welche zuvor auch schon von anderen hiPSC-generierten BHS-Endothelzellen gezeigt wurden (Lippmann et al. 2012). Allerdings haben Lippmann et al. die Ultrastruktur der TJs nicht detailliert untersucht.

Die in meiner Arbeit untersuchten hiPS-ECs wiesen Netzwerke aus verzweigten TJ-Strängen auf. Die Komplexität der Netzwerke, die zumindest teilweise mit den Barriereigenschaften korreliert (Claude 1978), war mit denen in den Arbeiten von Wolburg et al. und Kniesel et al. präsentierten Gehirndothelzellen *in vivo* vergleichbar (Wolburg et al. 1994; Kniesel et al. 1996). Ebenfalls ähnlich zur BHS *in vivo* war, dass die Intramembran-TJ-Partikel stark mit der P-Phase assoziierten.

Dieser Parameter korreliert laut Fachliteratur mit der Dichtigkeit der Barriere (Kniesel et al. 1996). Generell werden die TJ-Partikel sehr dichter Epithelien in den Kämmen der P-Phase gefunden. Die TJ-Partikel der undichten endothelialen Gefäße außerhalb des Gehirns hingegen sind größtenteils in den Furchen der E-Phase angesiedelt (Wolburg und Lippoldt 2002a). Im Gegensatz dazu bilden die dichten Endothelzellen der Gehirnkapillaren TJs aus, welche durch eine gemischte P-/E-Phasen-Assoziation charakterisiert sind, mehr als 50 % der TJ-Partikel sind auf der P-Phase zu finden (Wolburg et al. 1994; Kniesel et al. 1996). Die TJs der Endothelzellen des BHS von Säugern weisen die höchste P-Phasen-Assoziation auf, welche je in einem Gefäß des Körpers gefunden wurde (Wolburg und Lippoldt 2002a).

Das Verhältnis der Verteilung der Partikel zwischen P- und E-Phase, welches mit der Barrierefunktion korreliert, steigt im Laufe der Entwicklung der BHS an, sinkt aber durch *in vitro*-Kultivierung von BHS-Endothelzellen (Kniesel et al. 1996). Wolburg et al. konnten zeigen, dass die Morphologie der TJs von *in vitro* kultivierten BHS-Endothelzellen ähnlich zu der von Nicht-BHS-Endothelzellen ist (Wolburg et al. 1994). Es wurde bewiesen, dass die Ultrastruktur der TJs, einschließlich der P-/E-Phasen-Assoziation, teilweise abhängig von der Claudinzusammensetzung der TJs (Liebner et al. 2000a) und der subtyp-spezifischen Interaktion zwischen den Claudinen (Rossa et al. 2014) ist. Wiederhergestellte homopolymere TJ-Stränge, bestehend z. B. aus Claudin 1 oder 3, werden auf der P-Phase gefunden (Furuse et al. 1998; Furuse et al. 1999). Claudin 5 hingegen ist mit der E-Phase assoziiert (Morita et al. 1999; Piontek et al. 2008). Gemischte P-/E-Phasen-Assoziation zeigen Claudin-Heteropolymere, welche aus Claudin 1 und 2 oder Claudin 3 und 5 bestehen (Furuse et al. 1999; Piontek et al. 2011). Die von uns erstmalig genau charakterisierte gemischte P-/E-Phasen-Assoziation der TJs der hiPS-ECs, die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Gefrierbruch-EM analysiert wurde, entspricht demzufolge der Expression von Claudin 5 zusammen mit Claudin 1, 3 oder 4. Die Daten zur Expression und Lokalisation von Claudinen an den TJs der BHS von Säugern sind zur Zeit noch nicht eindeutig. Allerdings scheinen diejenigen Claudine, die von den hiPS-ECs exprimiert wurden, potenziell auch an der *in vivo* BHS vorzukommen (Haseloff et al. 2015; Kratzer et al. 2012). Die in meiner Studie präsentierten Daten der Ultrastruktur weisen darauf hin, dass die etablierten *in vitro* Quadrupelmodelle der BHS *in vivo*-ähnliche TJ-Eigenschaften aufweisen.

Zusätzlich zur Charakterisierung der parazellulären Barriere der BHS-Modelle, wurden Transportstudien mit Referenzsubstanzen durchgeführt, die über die transzelluläre Route transportiert werden. In Übereinstimmung mit der Literatur permeierte Diazepam am schnellsten durch die BHS-Monokulturen, gefolgt von Koffein, Ibuprofen, Celecoxib, Diclofenac, Loratadin und Rhodamin 123. Diazepam ist eine lipophile Substanz, welche oft als transzellulärer, schnell migrierender Marker eingesetzt wird. Es sind bis jetzt keine Interaktionen von Diazepam mit aktiven Effluxtransportern, wie PGP, BCRP und MRPs, bekannt (Zhao und Pollack 2009; Mealey et al. 2010).

In *in vitro* Testungen konnte gezeigt werden, dass Koffein, eine hydrophilere Substanz, ein ähnliches Permeationsverhalten wie Diazepam zeigt. Im Unterschied dazu belegten *in vivo* Versuche, dass Koffein signifikant langsamer über die BHS transportiert wurde als Diazepam. Eine mögliche Erklärung hierfür können Interaktionen mit aktiven Transportern sein (McCall et al. 1982; Nakazono et al. 1992; Abbott et al. 2010; Yusof et al. 2014). Diese *in vivo* Beobachtungen konnten mit Hilfe unserer Modelle erstmals bestätigt werden. Die Transportgeschwindigkeit von Koffein war

außerdem in der Quadrupelkultur signifikant niedriger als in der Monokultur, was auf einen *in vivo*-ähnlicheren Phänotyp der Quadrupelkulturmodelle der BHS hinweist.

In Übereinstimmung mit den Daten, die in dieser Arbeit generiert werden konnten, wurde in *in vitro* BHS-Modellen, basierend auf primären Zellen der Ratte gezeigt, dass Ibuprofen eine schnellere Transportgeschwindigkeit als Diclofenac aufweist (Novakova et al. 2014). In diesem Zusammenhang wurden von Novakova et al. Verhältnisse zu Diazepam zwischen 0,6 und 0,8 gemessen. In den Versuchen mit unseren humanen hiPSC-abgeleiteten BHS-Modellen wurden lediglich Verhältnisse von 0,2 bis 0,3 erzielt. Diese genannten Unterschiede beschreiben den großen dynamischen Bereich, der mit Hilfe der etablierten BHS-Modelle genutzt werden kann, um zwischen unterschiedlichen Substanzen zu unterscheiden.

Für Ibuprofen und Diclofenac wird die Interaktion mit verschiedenen aktiven Transportsystemen beschrieben, welche zu deren verminderter Permeabilität gegenüber von Diazepam beitragen (Parepally et al. 2006; El-Sheikh et al. 2007; Nozaki et al. 2007; Angelini et al. 2008).

Loratadin und Rhodamin 123 sind Substrate des Effluxtransporters PGP und permeieren signifikant langsamer als Diazepam (Obradovic et al. 2007; Yang und Liu 2008; Neuhaus et al. 2012). Diese Beobachtung konnte mit Hilfe der von uns entwickelten stammzellbasierten BHS-Modelle bestätigt werden, es wurden sehr niedrige Verhältnisse des PK zu dem von Diazepam zwischen 0,02 und 0,04 gemessen. In einem parazellulär undichteren Modell, basierend auf der porcinen Zelllinie PBMEC/C1-2, wurde für den PK von Loratadin ein Verhältnis von 0,22 zu dem von Diazepam erzielt (Neuhaus et al. 2012).

Weiterhin war mit Hilfe der entwickelten BHS-Modelle zu beobachten, dass die Transportgeschwindigkeiten der langsamsten Substanzen Loratadin und Rhodamin 123 ( $PK(\text{Zelle}) = 5$  bis  $8 \mu\text{m}/\text{min}$ ) immer noch signifikant höher als die der parazellulären Marker Fluoreszein und Lucifer Yellow ( $PK(\text{Zelle}) \approx 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$ ) waren.

Lippmann et al. publizierten für ihre hiPSC-abgeleiteten BHS-Modelle einen dynamischen Bereich, der einen über 40-fachen Unterschied der PK zwischen Diazepam und Sucrose beschreibt (Lippmann et al. 2012). Mit Hilfe der in meiner Arbeit etablierten Modelle konnte eine 150-fache Differenz beim Vergleich der  $PK(\text{Zelle})$ -Werte zwischen Diazepam und Fluoreszein erzielt werden. In diesem Zusammenhang ist allerdings anzumerken, dass Lippmann et al. keine Leerwerte in deren Kalkulation berücksichtigt haben, zudem wurde ebenfalls ein anderes Design zur Durchführung der Transportstudie verwendet, in dem der Transfer der Modelle durch das Ziehen von Proben ersetzt wurde, und die Zusammensetzung des Transportpuffers unterschiedlich von dem, welcher in unseren Studien eingesetzt wurde. Ein möglicher weiterer Unterschied zwischen beiden Transportstudien liegt in der Verwendung unterschiedlicher Einsatzkonzentrationen der verwendeten Referenzsubstanzen. Unter Berücksichtigung der genannten Variablen, lagen die publizierten PK von Diazepam in den Studien von Lippmann et al. mit  $11 \mu\text{m}/\text{min}$  in einem ähnlichen Bereich, wie die hier beschriebenen  $PK(\text{gesamt})$ -Werte von 18 bis  $27 \mu\text{m}/\text{min}$ .

Im Hinblick auf die parazelluläre Dichtigkeit, lagen die PK für Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht, wie beispielsweise Sucrose (0,342 kDa), welche mit Hilfe von hoch aussagekräftigen *in vitro*-Modellen erzielt werden konnten, zwischen  $0,1$  bis  $1 \mu\text{m}/\text{min}$  (Perriere et al. 2007; Malina et al. 2009). Auch mit Hilfe der im Rahmen meiner Arbeit etablierten BHS-Modelle konnten in Bezug auf die parazelluläre Barriere Werte in einem ähnlichen Bereich erzielt werden. Weiterhin lag der PK für FITC-Dextran 4 kDa bei  $0,0106 \mu\text{m}/\text{min}$  und für FITC-Dextran mit einem Molekularge-

wicht von 40 kDa bei 0,0039  $\mu\text{m}/\text{min}$ , gemessen in den Quadrupelkulturen. Mit Hilfe von humanen Standardmodellen auf Basis der Zelllinie hCMEC/D3 wurden signifikant höhere PK-Werte von 55  $\mu\text{m}/\text{min}$  für Fluoreszein und 8,3  $\mu\text{m}/\text{min}$  für 4 kDa FITC-Dextran beschrieben, die auf parazellulär undichtere Modelle hinweisen (Forster et al. 2008; Novakova et al. 2014).

Das in dieser Arbeit neu entwickelte und qualifizierte BHS-Modell wurde erstmalig im Rahmen des Verbundprojektes LipoTrans in der pharmazeutischen Forschung für neu entwickelte Propofolformulierungen eingesetzt. Propofol wird als kurz wirkendes Anästhetikum hauptsächlich zur Einleitung und Aufrechterhaltung von Narkosen verwendet und intravenös appliziert (Vasile et al. 2003). In ersten präliminären Versuchen war es hier möglich das Transportverhalten von neu entwickelten Propofol-Derivaten, welche im Rahmen unseres Verbundprojektes synthetisiert wurden, an den stammzellbasierten humanen BHS-Modellen zu untersuchen. Ein beschleunigter Transport des Wirkstoffes Propofol konnte durch dessen Komplexierung in Form von Propofol-HPBCD sowie Na-Propofolat-HPBCD im Vergleich zur klinischen Anwendung genutzten Kontrollsubstanz Propofol<sup>®</sup>-Lipuro erzielt werden. Zur genaueren Einschätzung des veränderten Transportverhaltens der Propofol-Komplexe sind allerdings noch weitere detailliertere Untersuchungen sowie der Vergleich zu in Tierexperimenten gewonnenen Daten nötig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, ein funktionales stammzellbasiertes *in vitro*-Modell der humanen BHS zu entwickeln, welches die Anforderungen, die an reproduzierbare, standardisierte und physiologische Modelle gestellt werden, erfüllt. Die ausgewählten, bereits publizierten Protokolle von Lippmann et al., Yan et al. und Reinhardt et al. auf Grundlage von adhärennten Monolayerkulturen ermöglichten eine zeiteffiziente, standardisierte und reproduzierbare Differenzierung der hiPSCs mit hoher Zellausbeute.

Die hier entwickelten stammzellbasierten *in vitro* Quadrupel-Kultur-Modelle der humanen BHS zeichneten sich durch folgende Merkmale aus:

Erstmalig wurde in den hier vorgestellten Daten die Möglichkeit aufgezeigt, hiPS-EC-Progenitoren zu kryokonservieren. Damit wurde eine zeitliche und räumliche Flexibilität bei der Versuchsdurchführung geschaffen, die den Einsatz der stammzellbasierten Modelle zeitnah auch in Laboren ermöglicht, die für die intensive Betreuung einer hiPS-Zellkultur nicht ausgestattet sind. Die finale Differenzierung bzw. Aufreinigung des kryokonservierten Zellgemisches erfolgt innerhalb von zwei Tagen und ist ohne großen Aufwand durchzuführen. Ein Anlegen von hiPS-EC-Banken kann in Zukunft den standardisierten Aufbau der humanen BHS-Modelle ermöglichen und helfen, deren Anwendung auch in der Industrie zu etablieren.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, eine detaillierte Charakterisierung der aus hiPSCs differenzierten Zellen sowie die Qualifizierung mit Hilfe von Referenzsubstanzen zur Beurteilung der Permeabilität der etablierten BHS-Modelle wurden durchgeführt. Die Expression von BHS-relevanten Transportern und TJ-Molekülen sowie der BHS-Integrität konnte im Vergleich zur Monokultur durch den gezielten Einsatz der BHS-relevanten Nischenzellen Perizyten, NSCs und Astrozyten stark verbessert werden. Physiologische BHS-Eigenschaften konnten erzielt und auf Protein- sowie Genebene nachgewiesen werden.

Mit Hilfe von ersten Permeabilitätsstudien wurde die physiologische para- und transzelluläre hiPS-EC-Barriere validiert und die stammzellbasierten Quadrupelmodelle für einen möglichen Einsatz in der pharmazeutischen Forschung qualifiziert. Es gelang, den signifikant langsameren Transport von

Koffein im Vergleich zu Diazepam erstmalig in *in vitro*-Studien zu reproduzieren. Auch eine erste Pilotstudie zur funktionellen Testung von innovativen Propofol-Cyclodextrin-Komplexen konnte unter Verwendung der entwickelten stammzellbasierten BHS-Modelle unterstützt werden.

Neben den funktionellen Anforderungen, die möglichst der *in vivo*-Situation ähneln sollten, spielen auch die Kosten- und Zeiteffizienz für eine potentielle Anwendung der BHS-Modelle eine entscheidende Rolle. Durch die Inhouse-Entwicklung eines kosteneffizienten Rührreaktorsystems, welches ein Up-Scaling der Kultur von pluripotenten Stammzellen ermöglichte, konnten hiPSCs unter Erhalt der Qualität in Bezug auf die Pluripotenz in Suspension kultiviert werden.

## 6 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten stammzellbasierten *in vitro* BHS-Modelle können zukünftig z. B. in der Pharmaindustrie für die Entwicklung von Medikamenten eingesetzt werden. Ausreichend qualifizierte Modelle können hier in der präklinischen Forschung genutzt werden, um Toxizitäts- und Wirksamkeitsstudien an neu entwickelten Substanzen durchzuführen und eine bessere *in vitro-in vivo*-Korrelation der Ergebnisse zu ermöglichen. Die physiologische BHS stellt ein entscheidendes Hindernis für die Behandlung von neurologischen Erkrankungen dar, denn durch ihre strukturelle und funktionelle Integrität wird die Aufnahme von vielen Medikamenten in das Gehirn verhindert. Der gezielte Rücktransport von Wirkstoffen in das Blut mit Hilfe aktiver Transporterproteine oder deren frühzeitige Metabolisierung und damit verbundene Effizienzreduzierung vor dem Transport führen dazu, dass Wirkstoffe nicht in ausreichender Konzentration an den Wirkort gelangen können.

Weiterhin ist auch ein Einsatz in der Grundlagenforschung zur Untersuchung von physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen an der BHS sowie die Durchführung von Infektionsstudien mit Bakterien, wie *Neisseria meningitidis*, denkbar. Diese streng humanpathogenen Erreger, können z. B. Meningitis und einen septischen Schock verursachen. Mit Hilfe geeigneter humaner *in vitro* BHS-Modelle, wäre es möglich die bakterielle Infektion sowie die genauen Aufnahmemechanismen über den dichten endothelialen Monolayer zu studieren und dann für gezielte Anwendungen nutzbar zu machen.

In weiterführenden Untersuchungen ist das Generieren aller Zellen der neurovaskulären Einheit aus hiPSCs denkbar. Differenzierungsprotokolle zur gezielten Differenzierung von hiPSCs in Perizyten und Neurone unterschiedlicher Gehirnareale und Funktionen wurden bereits beschrieben. Eine komplette Unabhängigkeit von externen Zellquellen für den Aufbau von humanen BHS-Modellen wäre demzufolge denkbar.

Außerdem ist bekannt, dass durch die mechanische Stimulation die Differenzierung und Funktionalität von Zellen beeinflusst werden können. In zukünftigen Studien soll untersucht werden, ob durch die Verbesserung der Kulturbedingungen der BHS-Modelle auch deren Barriereigenschaften über längere Zeit stabilisiert werden können. Im Hinblick auf eine weitere Modelloptimierung wäre es sinnvoll, die Kulturbedingungen der Kokulturzellen in solch einem System anzupassen. Auch eine Optimierung der Aussaatzellichten könnte zu einer verlängerten Lebensdauer der Zellen in den Modellen führen.

Eine Langzeitkultur von BHS-Modellen ist Voraussetzung für die Untersuchung von chronischen, neurodegenerative Erkrankungen, bei denen Defekte der BHS entscheidend die Pathogenese beeinflussen. Neurologische Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer, Schlaganfall, Gehirntumore und Epilepsie werden mit Störungen der BHS in Verbindung gebracht und können mit Hilfe der stammzellbasierten BHS-Modelle erforscht werden.

Die hiPSC-Technologie eröffnet zudem die Möglichkeit, patienten- oder gewebespezifische Krankheitsmodelle *in vitro* zu entwickeln. Durch die Verwendung von patientenspezifischen Zellen könnten effektivere personalisierte Therapien oder neue Medikamente entwickelt werden. In dieser Hinsicht wäre es möglich, iPSCs von Patienten mit Entwicklungsstörungen einzusetzen, um die Fehlbildungen während der Differenzierung in frühen Stadien der Entwicklung durch *in vitro*-Versuche zu

identifizieren. Weiterhin ist es denkbar, Stammzellen gezielt zu verändern und einen pathologischen Phänotyp hervorzurufen oder somatische Patientenzellen mit genetischen Defekten zu reprogrammieren und mit deren Hilfe Krankheitsmodelle aufzubauen. Die hierdurch generierten Ergebnisse können mit den in dieser Arbeit publizierten Daten der physiologischen BHS verglichen werden. Da der Gewebersprung die Effizienz der Reprogrammierung, aber auch die Differenzierungseffizienz beeinflusst, wäre es für zukünftige Studien denkbar, hiPSCs aus patientenspezifischen neuronalen Zellen oder BHS-ECs zu generieren und diese gezielt für den Aufbau von BHS-Modellen einzusetzen. Dies könnte nicht nur deren Differenzierungseffizienz erhöhen, sondern auch die Reprogrammierung der Zellen mit Hilfe eines Minimums an Transkriptionsfaktoren ermöglichen. Neben dem Scherstress beeinflusst auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix die Funktionalität der BHS entscheidend. Die Komponenten der Basalmembran wurden zwar mit Hilfe der verwendeten Kollagen IV/Fibronectin-Beschichtung versucht zu imitieren, aber durch Verwendung von dezellularisierten biologischen Matrices, wie der porcinen SIS (*small intestine submucosa*), welche eine intakte Basalmembran aufweist (Mertsching et al. 2005; Stratmann et al. 2014), könnten die Kulturbedingungen weiter verbessert werden. Weiterhin ist der Einsatz von elektrogenesponnenen synthetisch hergestellten Basalmembranen möglich. Beispielsweise wurden im Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde unter Leitung von Prof. Dr. Jürgen Groll eine Elektrosponningmatrix auf Basis des Polymers PLGA (poly(D,L-lactide-co-glycolide)) und des Makromoleküls sPEO (star shaped poly(ethylene oxide)) entwickelt (Grafahrend et al. 2011). Diese Fasern können kovalent an bioaktive Peptidsequenzen von Kollagen IV (RGD (Arg-Gly-Asp)), Laminin und Fibronectin binden und somit eine selektive Bindung bestimmter Zelltypen hervorrufen. Auch eine Kombination der BHS-Modelle mit weiteren Organen oder Geweben, z. B. auf sogenannten Mikrofluidikchips, wäre interessant. Mit Hilfe von neuronalen Zellen, die aus hiPSCs differenziert werden können, kann die Wirkung von neurotoxischen Substanzen untersucht werden, die die BHS passieren. Auch mögliche resultierende Rückkopplungsprozesse der Neuronen auf die BHS und daraus abgeleitete pathologische Veränderungen könnten studiert werden. Durch die Kombination von Lebersphäroiden hingegen ist es denkbar, Rückschlüsse darauf zu ziehen, ob peripher wirkende Substanzen neurotoxische Metabolite bilden, welche wiederum dazu in der Lage sind die BHS zu überwinden.



## Literatur

- Abbott, N. J. (2002). „Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability“. In: *J Anat* 200.6, S. 629–38.
- Abbott, N. J. und A. Friedman (2012). „Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease“. In: *Epilepsia* 53 Suppl 6, S. 1–6.
- Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof und D. J. Begley (2010). „Structure and function of the blood-brain barrier“. In: *Neurobiol Dis* 37.1, S. 13–25.
- Al Ahmad, A., C. B. Taboada, M. Gassmann und O. O. Ogunshola (2011). „Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult“. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 31.2, S. 693–705.
- Amit, M., M. K. Carpenter, M. S. Inokuma, C. P. Chiu, C. P. Harris, M. A. Waknitz, J. Itskovitz-Eldor und J. A. Thomson (2000). „Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture“. In: *Dev Biol* 227.2, S. 271–8.
- Angelini, A., M. Iezzi, C. Di Febbo, C. Di Ilio, F. Cuccurullo und E. Porreca (2008). „Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human sarcoma MES-SA/Dx-5 cells by nonsteroidal anti-inflammatory drugs“. In: *Oncol Rep* 20.4, S. 731–5.
- Armulik, A., G. Genove, M. Mae, M. H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B. R. Johansson und C. Betsholtz (2010). „Pericytes regulate the blood-brain barrier“. In: *Nature* 468.7323, S. 557–61.
- Avdeef, Alex, Mária A. Deli und Winfried Neuhaus (2015). „In Vitro Assays for Assessing BBB Permeability“. In: *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery*. John Wiley Sons, Inc, S. 188–237.
- Bacha, R. S. el und A. Minn (1999). „Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain“. In: *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45.1, S. 15–23.
- Badaut, J., J. F. Brunet und L. Regli (2007). „Aquaporins in the brain: from aqueduct to "multi-duct"“. In: *Metab Brain Dis* 22.3-4, S. 251–63.
- Balabanov, R. und P. Dore-Duffy (1998). „Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier“. In: *Journal of Neuroscience Research* 53.6, S. 637–644.
- Baldwin, H. S., H. M. Shen, H. C. Yan, H. M. DeLisser, A. Chung, C. Mickanin, T. Trask, N. E. Kirschbaum, P. J. Newman, S. M. Albelda und et al. (1994). „Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development“. In: *Development* 120.9, S. 2539–53.
- Ballabh, P., A. Braun und M. Nedergaard (2004). „The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications“. In: *Neurobiol Dis* 16.1, S. 1–13.
- Bandopadhyay, R., C. Orte, J. G. Lawrenson, A. R. Reid, S. De Silva und G. Allt (2001). „Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers“. In: *Journal of Neurocytology* 30.1, S. 35–44.
- Bayart, E. und O. Cohen-Haguenaer (2013). „Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells“. In: *Curr Gene Ther* 13.2, S. 73–92.

- Begley, D. J. (2004). „ABC transporters and the blood-brain barrier“. In: *Curr Pharm Des* 10.12, S. 1295–312.
- Bellantuono, Ilaria (2004). „Haemopoietic stem cells“. In: *The International Journal of Biochemistry Cell Biology* 36.4, S. 607–620.
- Biedl, A. und R. Kraus (1898). „Über eine bisher unbekannte toxische Wirkung der Gallensäuren auf das zentrale Nervensystem“. In: *Zentralblatt Innere Medizin* 19, S. 1185–1200.
- Bjorkhem, I. und S. Meaney (2004). „Brain cholesterol: long secret life behind a barrier“. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24.5, S. 806–15.
- Blasig, I. E., K. Mertsch und R. F. Haseloff (2002). „Nitronyl nitroxides, a novel group of protective agents against oxidative stress in endothelial cells forming the blood-brain barrier“. In: *Neuropharmacology* 43.6, S. 1006–14.
- Blau, H. M., T. R. Brazelton und J. M. Weimann (2001). „The evolving concept of a stem cell: entity or function?“. In: *Cell* 105.7, S. 829–41.
- Boyer, L. A., T. I. Lee, M. F. Cole, S. E. Johnstone, S. S. Levine, J. P. Zucker, M. G. Guenther, R. M. Kumar, H. L. Murray, R. G. Jenner, D. K. Gifford, D. A. Melton, R. Jaenisch und R. A. Young (2005). „Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells“. In: *Cell* 122.6, S. 947–56.
- Bradbury, M. W. (1985). „The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium“. In: *Circ Res* 57.2, S. 213–22.
- Brix, J., Y. Zhou und Y. Luo (2015). „The Epigenetic Reprogramming Roadmap in Generation of iPSCs from Somatic Cells“. In: *J Genet Genomics* 42.12, S. 661–70.
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (28.06.2002). *Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz - StZG); Vollzitat: „Stammzellgesetz vom 28. Juni 2002 (BGBl. I S. 2277), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 29 u. Artikel 4 Absatz 16 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist“; Stand: Zuletzt geändert durch Art. 2 Abs. 29 u. Art. 4 Abs. 16 G v. 7.8.2013 I 3154; <http://www.gesetze-im-internet.de/stzg/BJNR227700002.html> (04.12.2015, 8.47 Uhr).*
- Bundgaard, M. und N. J. Abbott (2008). „All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4-500 million years ago“. In: *Glia* 56.7, S. 699–708.
- Butt, A. M., H. C. Jones und N. J. Abbott (1990). „Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study“. In: *J Physiol* 429, S. 47–62.
- Buxton, R. B. und L. R. Frank (1997). „A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation“. In: *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17.1, S. 64–72.
- Campos, L. S. (2004). „Neurospheres: insights into neural stem cell biology“. In: *J Neurosci Res* 78.6, S. 761–9.
- Cecchelli, R., B. Dehouck, L. Descamps, L. Fenart, V. V. Buee-Scherrer, C. Duhem, S. Lundquist, M. Rentfel, G. Torpier und M. P. Dehouck (1999). „In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier“. In: *Adv Drug Deliv Rev* 36.2-3, S. 165–178.
- Cecchelli, R., S. Aday, E. Sevin, C. Almeida, M. Culot, L. Dehouck, C. Coisne, B. Engelhardt, M. P. Dehouck und L. Ferreira (2014). „A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells“. In: *PLoS One* 9.6, e99733.

- Chen, W., J. Huang, X. Yu, X. Lin und Y. Dai (2015). „Generation of induced pluripotent stem cells from renal tubular cells of a patient with Alport syndrome“. In: *Int J Nephrol Renovasc Dis* 8, S. 101–9.
- Claude, P. (1978). „Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens“. In: *J Membr Biol* 39.2-3, S. 219–32.
- Cohen, Z., G. Bonvento, P. Lacombe und E. Hamel (1996). „Serotonin in the regulation of brain microcirculation“. In: *Progress in Neurobiology* 50.4, 335–.
- Cohen, Z., G. Molinatti und E. Hamel (1997). „Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex“. In: *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17.8, S. 894–904.
- Coisne, C., L. Dehouck, C. Faveeuw, Y. Delplace, F. Miller, C. Landry, C. Morissette, L. Fenart, R. Cecchelli, P. Tremblay und B. Dehouck (2005). „Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium“. In: *Lab Invest* 85.6, S. 734–46.
- Conti, L. und E. Cattaneo (2010). „Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities?“ In: *Nat Rev Neurosci* 11.3, S. 176–87.
- Conti, L., S. M. Pollard, T. Gorba, E. Reitano, M. Toselli, G. Biella, Y. R. Sun, S. Sanzone, Q. L. Ying, E. Cattaneo und A. Smith (2005). „Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell“. In: *Plos Biology* 3.9, S. 1594–1606.
- Coomber, B. L., P. A. Stewart, K. Hayakawa, C. L. Farrell und R. F. Del Maestro (1987). „Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels: structural basis of blood-brain barrier defect“. In: *J Neurooncol* 5.4, S. 299–307.
- Cornford, E. M. und S. Hyman (1999). „Blood-brain barrier permeability to small and large molecules“. In: *Adv Drug Deliv Rev* 36.2-3, S. 145–163.
- Crone, C. und S. P. Olesen (1982). „Electrical resistance of brain microvascular endothelium“. In: *Brain Res* 241.1, S. 49–55.
- Cucullo, L., P. O. Couraud, B. Weksler, I. A. Romero, M. Hossain, E. Rapp und D. Janigro (2008). „Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies“. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 28.2, S. 312–28.
- Cucullo, L., M. Hossain, V. Puvenna, N. Marchi und D. Janigro (2011). „The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology“. In: *BMC Neurosci* 12, S. 40.
- Cucullo, L., M. Hossain, W. Tierney und D. Janigro (2013). „A new dynamic in vitro modular capillaries-venules modular system: cerebrovascular physiology in a box“. In: *BMC Neurosci* 14, S. 18.
- Damschen, G. und D. Schönecker (2003). *Der moralische Status menschlicher Embryonen: Pro und contra Spezies-, Kontinuums-, Identitäts- und Potentialitätsargument*. De Gruyter.
- Daneman, R., L. Zhou, A. A. Kebede und B. A. Barres (2010). „Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis“. In: *Nature* 468.7323, S. 562–6.
- DeBault, L. E. und P. A. Cancilla (1980). „gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro“. In: *Science* 207.4431, S. 653–5.
- Deli, M. A. (2009). „Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery“. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1788.4, S. 892–910.

- Deli, M. A., C. S. Abraham, Y. Kataoka und M. Niwa (2005). „Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology“. In: *Cell Mol Neurobiol* 25.1, S. 59–127.
- DeLisser, H. M., J. Chilkotowsky, H. C. Yan, M. L. Daise, C. A. Buck und S. M. Albelda (1994). „Deletions in the cytoplasmic domain of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) result in changes in ligand binding properties“. In: *J Cell Biol* 124.1-2, S. 195–203.
- Demeuse, P., A. Kerkhofs, C. Struys-Ponsar, B. Knoops, C. Remacle und P. van den Bosch de Aguilar (2002). „Compartmentalized coculture of rat brain endothelial cells and astrocytes: a syngenic model to study the blood-brain barrier“. In: *J Neurosci Methods* 121.1, S. 21–31.
- Desai, S. Y., M. Marroni, L. Cucullo, L. Krizanac-Bengez, M. R. Mayberg, M. T. Hossain, G. G. Grant und D. Janigro (2002). „Mechanisms of endothelial survival under shear stress“. In: *Endothelium* 9.2, S. 89–102.
- Diaz-Flores, L., R. Gutierrez, H. Varela, N. Rancel und F. Valladares (1991). „Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics“. In: *Histol Histopathol* 6.2, S. 269–86.
- Dore-Duffy, P. (2008). „Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier“. In: *Curr Pharm Des* 14.16, S. 1581–93.
- Ehrlich, P. (1885). *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie. Habilitationsschrift*. Berlin: University Berlin, August Hirschwald.
- (1904). „Ueber die Beziehungen von chemischer Constitution, Verteilung und pharmakologischer Wirkung“. In: *Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung*. Berlin: Hirschwald, S. 574.
- Eigenmann, D. E., G. Xue, K. S. Kim, A. V. Moses, M. Hamburger und M. Oufir (2013). „Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies“. In: *Fluids Barriers CNS* 10.1, S. 33.
- El Hafny, B., O. Chappey, M. Piciotti, M. Debray, B. Boval und F. Roux (1997). „Modulation of P-glycoprotein activity by glial factors and retinoic acid in an immortalized rat brain microvessel endothelial cell line“. In: *Neurosci Lett* 236.2, S. 107–11.
- El-Sheikh, A. A., J. J. van den Heuvel, J. B. Koenderink und F. G. Russel (2007). „Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport“. In: *J Pharmacol Exp Ther* 320.1, S. 229–35.
- Engelhardt, B. und S. Liebner (2014). „Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier“. In: *Cell and Tissue Research* 355.3, S. 687–699.
- Ennis, S. R., X. D. Ren und A. L. Betz (1996). „Mechanisms of sodium transport at the blood-brain barrier studied with in situ perfusion of rat brain“. In: *J Neurochem* 66.2, S. 756–63.
- Fagerholm, U. (2007). „The highly permeable blood-brain barrier: an evaluation of current opinions about brain uptake capacity“. In: *Drug Discovery Today* 12.23-24, S. 1076–1082.
- Farrell, C. L. und W. M. Pardridge (1991). „Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88.13, S. 5779–83.
- Feng, Z. und F. Gao (2012). „Stem cell challenges in the treatment of neurodegenerative disease“. In: *CNS Neurosci Ther* 18.2, S. 142–8.

- Fenstermacher, J., P. Gross, N. Sposito, V. Acuff, S. Pettersen und K. Gruber (1988). „Structural and functional variations in capillary systems within the brain“. In: *Ann N Y Acad Sci* 529, S. 21–30.
- Folkens, C., S. Man, P. Xu, Y. Shaked, D. J. Hicklin und R. S. Kerbel (2007). „Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors“. In: *Cancer Res* 67.8, S. 3560–4.
- Foo, L. C., N. J. Allen, E. A. Bushong, P. B. Ventura, W. S. Chung, L. Zhou, J. D. Cahoy, R. Daneman, H. Zong, M. H. Ellisman und B. A. Barres (2011). „Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes“. In: *Neuron* 71.5, S. 799–811.
- Forster, C., C. Silwedel, N. Golenhofen, M. Burek, S. Kietz, J. Mankertz und D. Drenckhahn (2005). „Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system“. In: *Journal of Physiology-London* 565.2, S. 475–486.
- Forster, C., M. Burek, I. A. Romero, B. Weksler, P. O. Couraud und D. Drenckhahn (2008). „Differential effects of hydrocortisone and TNF alpha on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier“. In: *Journal of Physiology-London* 586.7, S. 1937–1949.
- Fortier, L. A. (2005). „Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications“. In: *Vet Surg* 34.5, S. 415–23.
- Frank, R. N., T. J. Turczyn und A. Das (1990). „Pericyte coverage of retinal and cerebral capillaries“. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31.6, S. 999–1007.
- Fricker G.; Ott, M.; Mahringer A. (2014). *The Blood Brain Barrier (BBB)*. VII. Springer.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiragi, K. Fujimoto und S. Tsukita (1998). „Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin“. In: *J Cell Biol* 141.7, S. 1539–50.
- Furuse, M., H. Sasaki und S. Tsukita (1999). „Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands“. In: *J Cell Biol* 147.4, S. 891–903.
- Gage, F. H. (2000). „Mammalian neural stem cells“. In: *Science* 287.5457, S. 1433–8.
- Garberg, P., M. Ball, N. Borg, R. Cecchelli, L. Fenart, R. D. Hurst, T. Lindmark, A. Mabondzo, J. E. Nilsson, T. J. Raub, D. Stanimirovic, T. Terasaki, J. O. Oberg und T. Osterberg (2005). „In vitro models for the blood-brain barrier“. In: *Toxicol In Vitro* 19.3, S. 299–334.
- Gavard, J. und J. S. Gutkind (2006). „VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin“. In: *Nat Cell Biol* 8.11, S. 1223–34.
- Georgieva, J. V., D. Hoekstra und I. S. Zuhorn (2014). „Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood–Brain Barrier“. In: *Pharmaceutics* 6.4, S. 557–83.
- Gherzi-Egea, J. F., B. Leininger-Muller, R. Cecchelli und J. D. Fenstermacher (1995). „Blood-brain interfaces: relevance to cerebral drug metabolism“. In: *Toxicol Lett* 82-83, S. 645–53.
- Gibbons, H. M., S. M. Hughes, W. Van Roon-Mom, J. M. Greenwood, P. J. Narayan, H. H. Teoh, P. M. Bergin, E. W. Mee, P. C. Wood, R. L. Faull und M. Dragunow (2007). „Cellular composition of human glial cultures from adult biopsy brain tissue“. In: *J Neurosci Methods* 166.1, S. 89–98.
- Gilbertson, R. J. und J. N. Rich (2007). „Making a tumour’s bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche“. In: *Nature Reviews Cancer* 7.10, S. 733–736.

- Giulian, D., L. J. Haverkamp, J. Li, W. L. Karshin, J. Yu, D. Tom, X. Li und J. B. Kirkpatrick (1995). „Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain“. In: *Neurochem Int* 27.1, S. 119–37.
- Goldmann, E. (1913). „Vitalfarbung am zentralnervensystem“. In: *Abhandl Konigl preuss Akad Wiss* 1, S. 1–60.
- Gomes, F. C., D. Paulin und V. Moura Neto (1999). „Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation“. In: *Braz J Med Biol Res* 32.5, S. 619–31.
- Gonzalez-Mariscal, L., P. Bautista, S. Lechuga und M. Quiros (2012). „ZO-2, a tight junction scaffold protein involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis“. In: *Ann N Y Acad Sci* 1257, S. 133–41.
- Grafahrend, D., K. H. Heffels, M. V. Beer, P. Gasteier, M. Moller, G. Boehm, P. D. Dalton und J. Groll (2011). „Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation“. In: *Nat Mater* 10.1, S. 67–73.
- Griep, L. M., F. Wolbers, B. de Wagenaar, P. M. ter Braak, B. B. Weksler, I. A. Romero, P. O. Couraud, I. Vermes, A. D. van der Meer und A. van den Berg (2013). „BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function“. In: *Biomed Microdevices* 15.1, S. 145–50.
- Grskovic, M., A. Javaherian, B. Strulovici und G. Q. Daley (2011). „Induced pluripotent stem cells—opportunities for disease modelling and drug discovery“. In: *Nat Rev Drug Discov* 10.12, S. 915–29.
- Guillot, F. L. und K. L. Audus (1990). „Angiotensin peptide regulation of fluid-phase endocytosis in brain microvessel endothelial cell monolayers“. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 10.6, S. 827–34.
- Hartsock, A. und W. J. Nelson (2008). „Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton“. In: *Biochim Biophys Acta* 1778.3, S. 660–9.
- Haseloff, R. F., S. Dithmer, L. Winkler, H. Wolburg und I. E. Blasig (2015). „Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects“. In: *Semin Cell Dev Biol* 38, S. 16–25.
- Hawkins, B. T. und T. P. Davis (2005). „The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease“. In: *Pharmacological Reviews* 57.2, S. 173–185.
- Hawkins, B. T. und R. D. Egleton (2008). „Pathophysiology of the blood-brain barrier: animal models and methods“. In: *Curr Top Dev Biol* 80, S. 277–309.
- Hellinger, E., M. L. Bakk, P. Pocza, K. Tihanyi und M. Vastag (2010). „Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures“. In: *Eur J Pharm Sci* 41.1, S. 96–106.
- Hellinger, Éva, Szilvia Veszélka, Andrea E. Tóth, Fruzsina Walter, Ágnes Kittel, Mónika Laura Bakk, Károly Tihanyi, Viktor Háda, Shinsuke Nakagawa, Thuy Dinh Ha Duy, Masami Niwa, Mária A. Deli und Monika Vastag (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* 82.2, S. 340–351.
- Helms, H. C., N. J. Abbott, M. Burek, R. Cecchelli, P. O. Couraud, M. A. Deli, C. Forster, H. J. Galla, I. A. Romero, E. V. Shusta, M. J. Stebbins, E. Vandenhoute, B. Weksler und B.

- Brodin (2016). „In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use“. In: *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Hoheisel, D., T. Nitz, H. Franke, J. Wegener, A. Hakvoort, T. Tilling und H. J. Galla (1998). „Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 244.1, S. 312–6.
- Horani, M. H. und A. D. Mooradian (2003). „Effect of diabetes on the blood brain barrier“. In: *Curr Pharm Des* 9.10, S. 833–40.
- Hu, B. Y. und S. C. Zhang (2009). „Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells“. In: *Nat Protoc* 4.9, S. 1295–304.
- Huber, J. D., R. L. VanGilder und K. A. Houser (2006). „Streptozotocin-induced diabetes progressively increases blood-brain barrier permeability in specific brain regions in rats“. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291.6, H2660–8.
- Jaffe, S. R. P., B. Strutton, Z. Levarski, J. Pandhal und P. C. Wright (2014). „Escherichia coli as a glycoprotein production host: recent developments and challenges“. In: *Current Opinion in Biotechnology* 30, S. 205–210.
- Joo, F. (1996). „Endothelial cells of the brain and other organ systems: Some similarities and differences“. In: *Progress in Neurobiology* 48.3, 255–.
- Kadari, A., M. Lu, M. Li, T. Sekaran, R. P. Thummer, N. Guyette, V. Chu und F. Edenhofer (2014). „Excision of viral reprogramming cassettes by Cre protein transduction enables rapid, robust and efficient derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells“. In: *Stem Cell Res Ther* 5.2, S. 47.
- Kawaguchi, R., J. Yu, J. Honda, J. Hu, J. Whitelegge, P. Ping, P. Wiita, D. Bok und H. Sun (2007). „A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A“. In: *Science* 315.5813, S. 820–5.
- Kempf, H., B. Andree und R. Zweigerdt (2016). „Large-scale production of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes“. In: *Adv Drug Deliv Rev* 96, S. 18–30.
- Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M. J. Aryee, H. Ji, L. I. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K. C. Cunniff, H. Hongguang, S. McKinney-Freeman, O. Naveiras, T. J. Yoon, R. A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S. H. Orkin, I. L. Weissman, A. P. Feinberg und G. Q. Daley (2010). „Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells“. In: *Nature* 467.7313, S. 285–90.
- Klepper, J., M. Willemsen, A. Verrips, E. Guertsen, R. Herrmann, C. Kutzick, A. Florcken und T. Voit (2001). „Autosomal dominant transmission of GLUT1 deficiency“. In: *Hum Mol Genet* 10.1, S. 63–8.
- Kniesel, U. und H. Wolburg (2000). „Tight junctions of the blood-brain barrier“. In: *Cellular and Molecular Neurobiology* 20.1, S. 57–76.
- Kniesel, U., W. Risau und H. Wolburg (1996). „Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex“. In: *Brain Res Dev Brain Res* 96.1-2, S. 229–40.
- Koch, P., T. Opitz, J. A. Steinbeck, J. Ladewig und O. Brustle (2009). „A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106.9, S. 3225–30.
- Kola, I. und J. Landis (2004). „Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?“ In: *Nat Rev Drug Discov* 3.8, S. 711–5.

- Korte, D., H. Franke, J. Wegener, M. Haselbach, H.-J. Galla, T. Nitz und C. Engelbertz (2000). „The Development of In Vitro Models for the Blood-Brain and Blood-CSF Barriers“. In: *The Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS*. CRC Press.
- Koutsiaris, A. G., S. V. Tachmitzi, N. Batis, M. G. Kotoula, C. H. Karabatsas, E. Tsironi und D. Z. Chatzoulis (2007). „Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo“. In: *Biorheology* 44.5-6, S. 375–86.
- Kratzer, I., A. Vasiljevic, C. Rey, M. Fevre-Montange, N. Saunders, N. Strazielle und J. F. Ghersi-Egea (2012). „Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier“. In: *Histochem Cell Biol* 138.6, S. 861–79.
- Krause, G., L. Winkler, S. L. Mueller, R. F. Haseloff, J. Piontek und I. E. Blasig (2008). „Structure and function of claudins“. In: *Biochim Biophys Acta* 1778.3, S. 631–45.
- Kühn, F. (2014). *Entwicklung eines Rührreaktorsystems zur optimierten Kultivierung von humanen induziert pluripotenten stammzellen (hiPSC)*. \_IGB-Thesis.
- Lai, C. H. und K. H. Kuo (2005). „The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte“. In: *Brain Res Brain Res Rev* 50.2, S. 258–65.
- Laterra, J., R. Keep, L. Aa Betz und et al. (1999). „Blood—Cerebrospinal Fluid Barrier“. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Hrsg. von G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R.W. Albers und et al. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Lauer, R., R. Bauer, B. Linz, F. Pittner, G. A. Peschek, G. Ecker, P. Friedl und C. R. Noe (2004). „Development of an in vitro blood-brain barrier model based on immortalized porcine brain microvascular endothelial cells“. In: *Farmacology* 59.2, S. 133–7.
- Lechardeur, D., B. Schwartz, D. Paulin und D. Scherman (1995). „Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain-derived endothelial cell line“. In: *Exp Cell Res* 220.1, S. 161–70.
- Lewandowsky, M. (1900). „Zur Lehre von der Cerebrospinal Flüssigkeit“. In: *Zentralblatt Klinische Medizin* 40, S. 480–494.
- Li, F., N. Vijayasankaran, A. Y. Shen, R. Kiss und A. Amanullah (2010). „Cell culture processes for monoclonal antibody production“. In: *MAbs* 2.5, S. 466–79.
- Li, Q., M. C. Ford, E. B. Lavik und J. A. Madri (2006). „Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study“. In: *J Neurosci Res* 84.8, S. 1656–68.
- Liddel, S. A. (2011). „Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint“. In: *Fluids Barriers CNS* 8.1, S. 2.
- Liebner, S., U. Kniesel, H. Kalbacher und H. Wolburg (2000b). „Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells“. In: *Eur J Cell Biol* 79.10, S. 707–17.
- Liebner, S., A. Fischmann, G. Rascher, F. Duffner, E. H. Grote, H. Kalbacher und H. Wolburg (2000a). „Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme“. In: *Acta Neuropathol* 100.3, S. 323–31.
- Lim, J. C., A. J. Wolpaw, M. A. Caldwell, S. B. Hladky und M. A. Barrand (2007). „Neural precursor cell influences on blood-brain barrier characteristics in rat brain endothelial cells“. In: *Brain Res* 1159, S. 67–76.



- Lippmann, E. S., S. M. Azarin, J. E. Kay, R. A. Nessler, H. K. Wilson, A. Al-Ahmad, S. P. Palecek und E. V. Shusta (2012). „Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells“. In: *Nat Biotechnol* 30.8, S. 783–91.
- Lippmann, E. S., A. Al-Ahmad, S. P. Palecek und E. V. Shusta (2013). „Modeling the blood-brain barrier using stem cell sources“. In: *Fluids Barriers CNS* 10.1, S. 2.
- Lippmann, E. S., A. Al-Ahmad, S. M. Azarin, S. P. Palecek und E. V. Shusta (2014). „A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources“. In: *Sci Rep* 4, S. 4160.
- Liu, H. und S. C. Zhang (2011). „Specification of neuronal and glial subtypes from human pluripotent stem cells“. In: *Cell Mol Life Sci* 68.24, S. 3995–4008.
- Long, D. M. (1970). „Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors“. In: *J Neurosurg* 32.2, S. 127–44.
- Luissint, A. C., C. Artus, F. Glacial, K. Ganeshamoorthy und P. O. Couraud (2012). „Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation“. In: *Fluids Barriers CNS* 9.1, S. 23.
- Maherali, N., R. Sridharan, W. Xie, J. Utikal, S. Eminli, K. Arnold, M. Stadtfeld, R. Yachechko, J. Tchieu, R. Jaenisch, K. Plath und K. Hochedlinger (2007). „Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution“. In: *Cell Stem Cell* 1.1, S. 55–70.
- Malina, K. C. K., I. Cooper und V. I. Teichberg (2009). „Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness“. In: *Brain Research* 1284, S. 12–21.
- McCall, A. L., W. R. Millington und R. J. Wurtman (1982). „Blood-brain barrier transport of caffeine: dose-related restriction of adenine transport“. In: *Life Sci* 31.24, S. 2709–15.
- McQuaid, S., P. Cunnea, J. McMahan und U. Fitzgerald (2009). „The effects of blood-brain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis“. In: *Biochem Soc Trans* 37.Pt 1, S. 329–31.
- Mealey, K. L., D. Waiting, D. L. Raunig, K. R. Schmidt und F. R. Nelson (2010). „Oral bioavailability of P-glycoprotein substrate drugs do not differ between ABCB1-1Delta and ABCB1 wild type dogs“. In: *J Vet Pharmacol Ther* 33.5, S. 453–60.
- Mertsching, H., T. Walles, M. Hofmann, J. Schanz und W. H. Knapp (2005). „Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation“. In: *Biomaterials* 26.33, S. 6610–7.
- Mizee, M. R., D. Wooldrik, K. A. Lakeman, B. van het Hof, J. A. Drexhage, D. Geerts, M. Bugiani, E. Aronica, R. E. Mebius, A. Prat, H. E. de Vries und A. Reijerkerk (2013). „Retinoic acid induces blood-brain barrier development“. In: *J Neurosci* 33.4, S. 1660–71.
- Morita, K., H. Sasaki, M. Furuse und S. Tsukita (1999). „Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells“. In: *J Cell Biol* 147.1, S. 185–94.
- Mummery, C. L., J. Zhang, E. S. Ng, D. A. Elliott, A. G. Elefanty und T. J. Kamp (2012). „Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview“. In: *Circ Res* 111.3, S. 344–58.
- Nakagawa, S., M. A. Deli, S. Nakao, M. Honda, K. Hayashi, R. Nakaoke, Y. Kataoka und M. Niwa (2007). „Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells“. In: *Cell Mol Neurobiol* 27.6, S. 687–94.

- Nakagawa, S., M. A. Deli, H. Kawaguchi, T. Shimizudani, T. Shimono, A. Kittel, K. Tanaka und M. Niwa (2009). „A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes“. In: *Neurochem Int* 54.3-4, S. 253–63.
- Nakazono, T., T. Murakami, S. Sakai, Y. Higashi und N. Yata (1992). „Application of microdialysis for study of caffeine distribution into brain and cerebrospinal fluid in rats“. In: *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 40.9, S. 2510–5.
- Narasipura, S. D., J. C. Wojciechowski, N. Charles, J. L. Liesveld und M. R. King (2008). „P-Selectin coated microtube for enrichment of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells from human bone marrow“. In: *Clin Chem* 54.1, S. 77–85.
- Neuhaus, W., R. Lauer, S. Oelzant, U. P. Fringeli, G. F. Ecker und C. R. Noe (2006). „A novel flow based hollow-fiber blood-brain barrier in vitro model with immortalised cell line PBMEC/C1-2“. In: *J Biotechnol* 125.1, S. 127–41.
- Neuhaus, W., J. Mandikova, R. Pawlowitsch, B. Linz, B. Bennani-Baiti, R. Lauer, B. Lachmann und C. R. Noe (2012). „Blood-brain barrier in vitro models as tools in drug discovery: assessment of the transport ranking of antihistaminic drugs“. In: *Pharmazie* 67.5, S. 432–9.
- Neuhaus, W., F. Gaiser, A. Mahringer, J. Franz, C. Riethmuller und C. Forster (2014). „The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier“. In: *Front Cell Neurosci* 8, S. 352.
- Neuhaus, Winfried und Christian R. Noe (2010). „Transport at the Blood–Brain Barrier“. In: *Transporters as Drug Carriers*. Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, S. 263–298.
- Neuwelt, E. A., B. Bauer, C. Fahlke, G. Fricker, C. Iadecola, D. Janigro, L. Leybaert, Z. Molnar, M. E. O’Donnell, J. T. Povlishock, N. R. Saunders, F. Sharp, D. Stanimirovic, R. J. Watts und L. R. Drewes (2011). „Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology“. In: *Nat Rev Neurosci* 12.3, S. 169–82.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse und S. Tsukita (2003). „Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice“. In: *J Cell Biol* 161.3, S. 653–60.
- Novakova, I., E. A. Subileau, S. Toegel, D. Gruber, B. Lachmann, E. Urban, C. Chesne, C. R. Noe und W. Neuhaus (2014). „Transport rankings of non-steroidal antiinflammatory drugs across blood-brain barrier in vitro models“. In: *PLoS One* 9.1, e86806.
- Nozaki, Y., H. Kusuhara, T. Kondo, M. Iwaki, Y. Shiroyanagi, H. Nakayama, S. Horita, H. Nakazawa, T. Okano und Y. Sugiyama (2007). „Species difference in the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of methotrexate by human kidney slices“. In: *J Pharmacol Exp Ther* 322.3, S. 1162–70.
- Nukaya, D., K. Minami, R. Hoshikawa, N. Yokoi und S. Seino (2015). „Preferential gene expression and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse pancreas“. In: *Genes Cells* 20.5, S. 367–81.
- Obradovic, T., G. G. Dobson, T. Shingaki, T. Kungu und I. J. Hidalgo (2007). „Assessment of the first and second generation antihistamines brain penetration and role of P-glycoprotein“. In: *Pharm Res* 24.2, S. 318–27.
- Ohtsuki, S. (2004). „New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system“. In: *Biol Pharm Bull* 27.10, S. 1489–96.

- Ohtsuki, S. und T. Terasaki (2007). „Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development“. In: *Pharm Res* 24.9, S. 1745–58.
- Okita, K., T. Ichisaka und S. Yamanaka (2007). „Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells“. In: *Nature* 448.7151, S. 313–7.
- Oldendorf, W. H. und W. J. Brown (1975). „Greater Number of Capillary Endothelial Cell Mitochondria in Brain Than in Muscle“. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 149.3, S. 736–738.
- Pardridge, W. M. (2005). „Molecular biology of the blood-brain barrier“. In: *Mol Biotechnol* 30.1, S. 57–70.
- Parepally, J. M., H. Mandula und Q. R. Smith (2006). „Brain uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin“. In: *Pharm Res* 23.5, S. 873–81.
- Patabendige, A., R. A. Skinner, L. Morgan und N. J. Abbott (2013). „A detailed method for preparation of a functional and flexible blood-brain barrier model using porcine brain endothelial cells“. In: *Brain Res* 1521, S. 16–30.
- Patthey, C., L. Gunhaga und T. Edlund (2008). „Early development of the central and peripheral nervous systems is coordinated by Wnt and BMP signals“. In: *PLoS One* 3.2, e1625.
- Patthey, C., T. Edlund und L. Gunhaga (2009). „Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate“. In: *Development* 136.1, S. 73–83.
- Perriere, N., P. Demeuse, E. Garcia, A. Regina, M. Debray, J. P. Andreux, P. Couvreur, J. M. Scherrmann, J. Tamsamani, P. O. Couraud, M. A. Deli und F. Roux (2005). „Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties“. In: *J Neurochem* 93.2, S. 279–89.
- Perriere, N., S. Yousif, S. Cazaubon, N. Chaverot, F. Bourasset, S. Cisternino, X. Decleves, S. Hori, T. Terasaki, M. Deli, J. M. Scherrmann, J. Tamsamani, F. Roux und P. O. Couraud (2007). „A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters“. In: *Brain Res* 1150, S. 1–13.
- Piontek, J., L. Winkler, H. Wolburg, S. L. Muller, N. Zuleger, C. Piehl, B. Wiesner, G. Krause und I. E. Blasig (2008). „Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins“. In: *FASEB J* 22.1, S. 146–58.
- Piontek, J., S. Fritzsche, J. Cording, S. Richter, J. Hartwig, M. Walter, D. Yu, J. R. Turner, C. Gehring, H. P. Rahn, H. Wolburg und I. E. Blasig (2011). „Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands“. In: *Cell Mol Life Sci* 68.23, S. 3903–18.
- Polo, J. M., S. Liu, M. E. Figueroa, W. Kulalart, S. Eminli, K. Y. Tan, E. Apostolou, M. Stadtfeld, Y. Li, T. Shioda, S. Natesan, A. J. Wagers, A. Melnick, T. Evans und K. Hochedlinger (2010). „Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells“. In: *Nat Biotechnol* 28.8, S. 848–55.
- Prüfert, K., A. Vogel und G. Krohne (2004). „The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth“. In: *Journal of Cell Science* 117.25, S. 6105–6116.

- Raab, S. (2005). „Motor für Wachstum und Entwicklung : wie sich Blutgefäße im Gehirn bilden“. In: *Forschung Frankfurt* 23.1, S. 66–68.
- Rash, J. E., T. Yasumura, C. S. Hudson, P. Agre und S. Nielsen (1998). „Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.20, S. 11981–6.
- Raub, T. J., S. L. Kuentzel und G. A. Sawada (1992). „Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells“. In: *Exp Cell Res* 199.2, S. 330–40.
- Reese, T. S. und M. J. Karnovsky (1967). „Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase“. In: *J Cell Biol* 34.1, S. 207–17.
- Reinhardt, P., M. Glatza, K. Hemmer, Y. Tsytsyura, C. S. Thiel, S. Hoing, S. Moritz, J. A. Parga, L. Wagner, J. M. Bruder, G. Wu, B. Schmid, A. Ropke, J. Klingauf, J. C. Schwamborn, T. Gasser, H. R. Scholer und J. Sternecker (2013). „Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling“. In: *PLoS One* 8.3, e59252.
- Romero, I. A., K. Radewicz, E. Jubin, C. C. Michel, J. Greenwood, P. O. Couraud und P. Adamson (2003). „Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells“. In: *Neurosci Lett* 344.2, S. 112–6.
- Rossa, J., C. Ploeger, F. Vorreiter, T. Saleh, J. Protze, D. Gunzel, H. Wolburg, G. Krause und J. Piontek (2014). „Claudin-3 and claudin-5 protein folding and assembly into the tight junction are controlled by non-conserved residues in the transmembrane 3 (TM3) and extracellular loop 2 (ECL2) segments“. In: *J Biol Chem* 289.11, S. 7641–53.
- Roux, F., O. Durieu-Trautmann, N. Chaverot, M. Claire, P. Mailly, J. M. Bourre, A. D. Strosberg und P. O. Couraud (1994). „Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells“. In: *J Cell Physiol* 159.1, S. 101–13.
- Rubin, L. L., D. E. Hall, S. Porter, K. Barbu, C. Cannon, H. C. Horner, M. Janatpour, C. W. Liaw, K. Manning, J. Morales und et al. (1991). „A cell culture model of the blood-brain barrier“. In: *J Cell Biol* 115.6, S. 1725–35.
- Rucker, H. K., H. J. Wynder und W. E. Thomas (2000). „Cellular mechanisms of CNS pericytes“. In: *Brain Research Bulletin* 51.5, S. 363–369.
- Santaguida, S., D. Janigro, M. Hossain, E. Oby, E. Rapp und L. Cucullo (2006). „Side by side comparison between dynamic versus static models of blood-brain barrier in vitro: A permeability study“. In: *Brain Research* 1109, S. 1–13.
- Saunders, N. R., G. W. Knott und K. M. Dziegielewska (2000). „Barriers in the immature brain“. In: *Cell Mol Neurobiol* 20.1, S. 29–40.
- Savettieri, G., I. Di Liegro, C. Catania, L. Licata, G. L. Pitarresi, S. D’Agostino, G. Schiera, V. De Caro, G. Giandalia, L. I. Giannola und A. Cestelli (2000). „Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells“. In: *Neuroreport* 11.5, S. 1081–4.
- Schroeter, M. L., K. Mertsch, H. Giese, S. Muller, A. Sporbert, B. Hickel und I. E. Blasig (1999). „Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier“. In: *FEBS Lett* 449.2-3, S. 241–4.

- Sedlakova, R., R. R. Shivers und R. F. Del Maestro (1999). „Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit“. In: *J Submicrosc Cytol Pathol* 31.1, S. 149–61.
- Shafit-Zagardo, B., C. Peterson und J. E. Goldman (1988). „Rapid increases in glial fibrillary acidic protein mRNA and protein levels in the copper-deficient, brindled mouse“. In: *J Neurochem* 51.4, S. 1258–66.
- Sharif, A. und V. Prevot (2012). „Isolation and culture of human astrocytes“. In: *Methods Mol Biol* 814, S. 137–51.
- Shayan, G., Y. S. Choi, E. V. Shusta, M. L. Shuler und K. H. Lee (2011). „Murine in vitro model of the blood-brain barrier for evaluating drug transport“. In: *Eur J Pharm Sci* 42.1-2, S. 148–55.
- Sobue, K., N. Yamamoto, K. Yoneda, M. E. Hodgson, K. Yamashiro, N. Tsuruoka, T. Tsuda, H. Katsuya, Y. Miura, K. Asai und T. Kato (1999). „Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors“. In: *Neurosci Res* 35.2, S. 155–64.
- Sofroniew, M. V. und H. V. Vinters (2010). „Astrocytes: biology and pathology“. In: *Acta Neuropathol* 119.1, S. 7–35.
- Song, S. W., S. J. Lee, C. Y. Kim, J. K. Song, E. J. Jung, Y. B. Choi, S. W. Min und J. W. Oh (2013). „Inhibition of Tumor Growth in a Mouse Xenograft Model by the Humanized Anti-HGF Monoclonal Antibody YYB-101 Produced in a Large-Scale CHO Cell Culture“. In: *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23.9, S. 1327–1338.
- Stefkova, K., J. Prochazkova und J. Pachernik (2015). „Alkaline phosphatase in stem cells“. In: *Stem Cells Int* 2015, S. 628368.
- Stenman, J. M., J. Rajagopal, T. J. Carroll, M. Ishibashi, J. McMahon und A. P. McMahon (2008). „Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature“. In: *Science* 322.5905, S. 1247–50.
- Stratmann, A. T., D. Fecher, G. Wangorsch, C. Gottlich, T. Walles, H. Walles, T. Dandekar, G. Dandekar und S. L. Nietzer (2014). „Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model“. In: *Mol Oncol* 8.2, S. 351–65.
- Szabo, C. A., M. A. Deli, T. K. Ngo und F. Joo (1997). „Production of pure primary rat cerebral endothelial cell culture: a comparison of different methods“. In: *Neurobiology (Bp)* 5.1, S. 1–16.
- Takahashi, K. und S. Yamanaka (2006). „Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors“. In: *Cell* 126.4, S. 663–76.
- Takata, F., S. Dohgu, A. Yamauchi, J. Matsumoto, T. Machida, K. Fujishita, K. Shibata, Y. Shinozaki, K. Sato, Y. Kataoka und S. Koizumi (2013). „In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from neonatal and adult rats retain age-related barrier properties“. In: *PLoS One* 8.1, e55166.
- Takeuchi, T., S. Yoshitomi, T. Higuchi, K. Ikemoto, S. Niwa, T. Ebihara, M. Katoh, T. Yokoi und S. Asahi (2006). „Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1“. In: *Pharm Res* 23.7, S. 1460–72.
- Tilling, T., D. Korte, D. Hoheisel und H. J. Galla (1998). „Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro“. In: *J Neurochem* 71.3, S. 1151–7.
- Tong, X. K. und E. Hamel (1999). „Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer’s disease“. In: *Neuroscience* 92.1, S. 163–75.

- Tran, N. D., J. Correale, S. S. Schreiber und M. Fisher (1999). „Transforming growth factor-beta mediates astrocyte-specific regulation of brain endothelial anticoagulant factors“. In: *Stroke* 30.8, S. 1671–1677.
- Utsumi, H., H. Chiba, Y. Kamimura, M. Osanai, Y. Igarashi, H. Tobioka, M. Mori und N. Sawada (2000). „Expression of GFRalpha-1, receptor for GDNF, in rat brain capillary during postnatal development of the BBB“. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 279.2, S. C361–8.
- Vasile, B., F. Rasulo, A. Candiani und N. Latronico (2003). „The pathophysiology of propofol infusion syndrome: a simple name for a complex syndrome“. In: *Intensive Care Med* 29.9, S. 1417–25.
- Vastag, M. und G. M. Keseru (2009). „Current in vitro and in silico models of blood-brain barrier penetration: a practical view“. In: *Curr Opin Drug Discov Devel* 12.1, S. 115–24.
- Vaucher, E., X. K. Tong, N. Cholet, S. Lantin und E. Hamel (2000). „GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow“. In: *J Comp Neurol* 421.2, S. 161–71.
- Wang, Y., B. K. Chou, S. Dowey, C. He, S. Gerecht und L. Cheng (2013). „Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions“. In: *Stem Cell Res* 11.3, S. 1103–16.
- Warren, M. S., N. Zerangue, K. Woodford, L. M. Roberts, E. H. Tate, B. Feng, C. Li, T. J. Feuerstein, J. Gibbs, B. Smith, S. M. de Moraes, W. J. Dower und K. J. Koller (2009). „Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human“. In: *Pharmacol Res* 59.6, S. 404–13.
- Watanabe, T., S. Dohgu, F. Takata, T. Nishioku, A. Nakashima, K. Futagami, A. Yamauchi und Y. Kataoka (2013). „Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4“. In: *Biol Pharm Bull* 36.3, S. 492–5.
- Watson, P. M., J. C. Paterson, G. Thom, U. Ginman, S. Lundquist und C. I. Webster (2013). „Modelling the endothelial blood-CNS barriers: a method for the production of robust in vitro models of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier“. In: *BMC Neurosci* 14, S. 59.
- Weiss, N., F. Miller, S. Cazaubon und P. O. Couraud (2009). „The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases“. In: *Biochim Biophys Acta* 1788.4, S. 842–57.
- Wekerle, H. und R. Hohlfeld (2003). „Molecular mimicry in multiple sclerosis“. In: *N Engl J Med* 349.2, S. 185–6.
- Weksler, B. B., E. A. Subileau, N. Perriere, P. Charneau, K. Holloway, M. Leveque, H. Tricoire-Leignel, A. Nicotra, S. Bourdoulous, P. Turowski, D. K. Male, F. Roux, J. Greenwood, I. A. Romero und P. O. Couraud (2005). „Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line“. In: *FASEB J* 19.13, S. 1872–4.
- Wernig, M., A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B. E. Bernstein und R. Jaenisch (2007). „In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state“. In: *Nature* 448.7151, S. 318–24.
- Whish, S., K. M. Dziegielewska, K. Mollgard, N. M. Noor, S. A. Liddelow, M. D. Habgood, S. J. Richardson und N. R. Saunders (2015). „The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions“. In: *Front Neurosci* 9, S. 16.

- Wilhelm, I., C. Fazakas und I. A. Krizbai (2011). „In vitro models of the blood-brain barrier“. In: *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71.1, S. 113–28.
- Wilson, H. K., S. G. Canfield, M. K. Hjortness, S. P. Palecek und E. V. Shusta (2015). „Exploring the effects of cell seeding density on the differentiation of human pluripotent stem cells to brain microvascular endothelial cells“. In: *Fluids Barriers CNS* 12, S. 13.
- Winkler, E. A., R. D. Bell und B. V. Zlokovic (2011). „Central nervous system pericytes in health and disease“. In: *Nat Neurosci* 14.11, S. 1398–405.
- Wobus, A. M. und K. R. Boheler (2005). „Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy“. In: *Physiol Rev* 85.2, S. 635–78.
- Wolburg, H. und A. Lippoldt (2002a). „Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation“. In: *Vascul Pharmacol* 38.6, S. 323–37.
- (2002b). „Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation“. In: *Vascul Pharmacol* 38.6, S. 323–37.
- Wolburg, H., J. Neuhaus, U. Kniesel, B. Krauss, E. M. Schmid, M. Ocalan, C. Farrell und W. Risau (1994). „Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes“. In: *J Cell Sci* 107 ( Pt 5), S. 1347–57.
- Wolburg, H., S. Liebner und A. Lippoldt (2003). „Freeze-fracture studies of cerebral endothelial tight junctions“. In: *Methods Mol Med* 89, S. 51–66.
- Wu, D. C., A. S. Boyd und K. J. Wood (2007). „Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine“. In: *Front Biosci* 12, S. 4525–35.
- Yan, Y., S. Shin, B. S. Jha, Q. Liu, J. Sheng, F. Li, M. Zhan, J. Davis, K. Bharti, X. Zeng, M. Rao, N. Malik und M. C. Vemuri (2013). „Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells“. In: *Stem Cells Transl Med* 2.11, S. 862–70.
- Yang, Z. H. und X. D. Liu (2008). „P-glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital at the blood-brain barrier evidence from transport experiments in vitro“. In: *Epilepsy Res* 78.1, S. 40–9.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, II Slukvin und J. A. Thomson (2007). „Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells“. In: *Science* 318.5858, S. 1917–20.
- Yusof, S. R., A. Avdeef und N. J. Abbott (2014). „In vitro porcine blood-brain barrier model for permeability studies: pCEL-X software pKa(FLUX) method for aqueous boundary layer correction and detailed data analysis“. In: *Eur J Pharm Sci* 65, S. 98–111.
- Zeissig, S., N. Burgel, D. Gunzel, J. Richter, J. Mankertz, U. Wahnschaffe, A. J. Kroesen, M. Zeitz, M. Fromm und J. D. Schulzke (2007). „Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn’s disease“. In: *Gut* 56.1, S. 61–72.
- Zeng, W. Q., E. Al-Yamani, Jr. Acierio J. S., S. Slaugenhaupt, T. Gillis, M. E. MacDonald, P. T. Ozand und J. F. Gusella (2005). „Biotin-responsive basal ganglia disease maps to 2q36.3 and is due to mutations in SLC19A3“. In: *Am J Hum Genet* 77.1, S. 16–26.

- Zenker, D., D. Begley, H. Bratzke, H. Rubsamen-Waigmann und H. von Briesen (2003). „Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells“. In: *J Physiol* 551.Pt 3, S. 1023–32.
- Zeuthen, T. und E. M. Wright (1981). „Epithelial potassium transport: tracer and electrophysiological studies in choroid plexus“. In: *J Membr Biol* 60.2, S. 105–28.
- Zhang, S. C. (2001). „Defining glial cells during CNS development“. In: *Nat Rev Neurosci* 2.11, S. 840–3.
- Zhao, R. und G. M. Pollack (2009). „Regional differences in capillary density, perfusion rate, and P-glycoprotein activity: a quantitative analysis of regional drug exposure in the brain“. In: *Biochem Pharmacol* 78.8, S. 1052–9.



# Anhang

## Datenträger

Name: Appelt-Menzel, Antje

Straße:

PLZ und Ort:

Telefon:

E-Mail:

## **Erklärungen nach § 4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie**

### **Affidavit**

I hereby declare that my thesis entitled: „*Etablierung und Qualifizierung eines humanen Blut-Hirn-Schranken-Modells unter Verwendung von induziert pluripotenten und multipotenten Stammzellen*“ is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „*Etablierung und Qualifizierung eines humanen Blut-Hirn-Schranken-Modells unter Verwendung von induziert pluripotenten und multipotenten Stammzellen*“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Veitshöchheim, den 02.05.2016

.....  
Unterschrift

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Heike Walles** für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg anfertigen zu dürfen, bedanken. Ich danke dir besonders für die Betreuung in diesem Projekt und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ich habe in meiner bisherigen Zeit in Würzburg sehr viel lernen dürfen, danke dafür!

**Prof. Dr. Dandekar** danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit als Zweitgutachter.

**Dr. Marco Metzger** gilt mein besonderer Dank für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit. Durch deine fachliche Kompetenz, ständiges Interesse, uneingeschränkte Unterstützung und wertvollen Anregungen hast du maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ich danke dem **Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)** für die Förderung des Projekts „BioTransporter - Effizienter Wirkstofftransport in biologischen Systemen: Cyclodextrin-Komplexe zur Beschleunigung des Transportes lipophiler Wirkstoffe (LipoTrans)“, Förderkennzeichen 13N11803.

**Alevtina Cubukova** möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken! Vielen Dank für deine uneingeschränkte Hilfe im Labor! Ich kann mich immer auf dich verlassen, du bist wirklich toll!!! Ich freue mich schon auf die kommende Zeit, in der ich nach dem vielen Schreiben nun wieder aufs Labor losgelassen werde, denn mit dir macht das Arbeiten Spaß!

Bei **Dr. Winfried Neuhaus** bedanke ich mich recht herzlich für den fachlichen Austausch. Danke, dass ich von deiner Blut-Hirn-Schranken-Erfahrung profitieren durfte! Vielen Dank auch für die methodische Hilfe bei den Transportversuchen, die Analyse der Proben und deine Anregungen während des Schreibens meiner Arbeit, du hast mir sehr damit weitergeholfen!

**Sabine Wilhelm** danke ich für die Durchführung der Western Blot-Analysen. Außerdem möchte ich auch dir dafür danken, dass du dir immer Zeit für mich genommen hast, wenn ich Unterstützung brauchte. Besonders bei den ersten Differenzierungen war es sehr hilfreich, im Labor einen erfahrenen Ansprechpartner zu haben!

**Dr. Daniela Zdzieblo** danke ich dafür, dass sie bei Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem danke ich dir für dein offenes Ohr bei Sorgen. Du bereicherst unser Team!

Dem übrigen Stammzellteam, bestehend aus **Martina Werner, Carolin Beck, Markus Mühlemann, Sebastian Schürlein und David Fecher** danke ich dafür, dass meine Zellen jedes Wochenende und auch die Feiertage (fast) unbeschadet überstanden haben. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht machbar gewesen, danke für eure Hilfe!!!

**Dr. Sarah Nietzer** möchte ich für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen danken. **Heide Häfner** danke ich für die unendliche Hilfe und Erfahrung in der PCR.

**Dr. Jan Hansmann** und **Ivo Schwedhelm** danke ich für die produktive Kooperation bei der Herstellung des Rührreaktorsystems und dessen Etablierung. Bei **Thomas Schwarz** möchte ich mich für die fachliche Hilfe bei allen Fragen rund um das Thema Bioreaktoren bedanken.

**Dr. Maria Steinke** und **Dr. Joachim Nickel** danke ich für die vielen aufmunternden Worte und die Ablenkung während der Mittagspausen. Ihr seid die BESTEN...

Bei **allen TERM-Mitarbeitern** bedanke ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Labor. Es ist schön, Mitglied eines solchen Teams zu sein!

**Dr. Katalin Pápai-Herzegg** danke ich für die Analyse der Propofolproben mittels LC-MS/MS.

**Dr. Jörg Piontec** danke ich für die Durchführung der Gefrierbruch-Analysen, **Prof. Dr. Krohne** für die Analyse meiner Modelle mittels TEM und **Dr. Tanja Stüber** für die Bereitstellung der fetalen Gewebe.

**Prof. Dr. Frank Edenhofer** danke ich dafür, dass ich mit der hiPS-Linie ARiPS und den daraus generierten NSCs arbeiten durfte. **Katharina Günther** möchte ich besonders für den Austausch aller Informationen und Literatur danken, die sie mir über NSCs weitergegeben hat. Ohne dich hätte ich mich nicht so schnell in dieses Thema hineingefunden!

**Meinen Eltern** und **Großeltern** danke ich an dieser Stelle aus ganzem Herzen für die liebevolle Unterstützung. Ich weiß es wirklich zu schätzen, dass ihr mich immer ausnahmslos unterstützt, mich aufmuntert und mir immer vertraut. Von euch habe ich gelernt mich zu beweisen, durch euch bin ich zu der Person geworden, die ich heute bin!

Meinem Ehemann **Alexander Menzel** danke ich ganz besonders für seine unendliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit, die unermüdliche Hilfe und das Einlernen in L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X. Aus vollem Herzen möchte ich mich aber an dieser Stelle ganz besonders für die unendliche Geduld, Liebe und Kraft, die du mir jeden Tag schenkst, bedanken! Ich freue mich auf die nun kommenden ruhigeren Zeiten mit dir. Du bist der wichtigste Mensch in meinem Leben!