

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. N. Roewer**

**Expression von Transportern, Rezeptoren und Zell-Zell-Kontakt Proteinen
an der Blut-Hirn-Schranke: Vergleich zwischen immortalisierten und
primären Hirnendothelzellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Angelina Koch

aus Wertheim

Würzburg, September 2019



Referentin: Prof. Dr. Carola Förster

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Barbara M. Braunger

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Für meine liebe Familie.

Inhaltsverzeichnis S-3

1. EINLEITUNG	1
1.1. Blut-Hirn-Schranke	1
1.2. Proteine in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke	3
1.2.1. Tight Junctions und Adherens Junctions.....	3
1.2.2. Proteine mit Transportfunktion	5
1.3. cEND und cerebEND	13
1.4. Zielsetzung.....	14
2. MATERIALIEN UND METHODEN	16
2.1. Materialien.....	16
2.1.1. Verwendete Substanzen/Materialien.....	16
2.1.2. Sonden für die Real Time PCR.....	17
2.1.3. Verwendete primäre Antikörper für WB.....	18
2.1.4. Verwendete sekundäre Antikörper für WB	19
2.1.5. Verwendete Geräte	19
2.2. Methoden	19
2.2.1. Transkription und Translation.....	19
2.2.2. <i>β-Actin</i> als Kontrollprotein	20
2.2.3. Kultivierung, Teilung und Lagerung von cEND, cerebEND und primären Zellen	21
2.2.4. Real Time PCR	24
2.2.5. Proteinbestimmung	25
2.2.6. Western Blot	27
2.3. Auswertung der Ergebnisse von PCR und Western Blot.....	32
3. ERGEBNISSE	33
3.1. Expression der Tight Junctions und des Adherens Junction	33
3.1.1. mRNA Expression der Tight Junctions und des Adherens Junction	33
3.1.2. Proteinexpression der Tight Junctions	40

3.2. Expression der Effluxpumpen	46
3.2.1. mRNA Expression der Effluxpumpen.....	46
3.2.2. Proteinexpression der Effluxpumpen	50
3.3. Expression der Proteine der SLC-Familie	55
3.3.1. mRNA Expression der Proteine der SLC-Familie	55
3.3.2. Proteinexpression der Proteine der SLC-Familie	58
3.4. Expression zellulärer Rezeptoren.....	63
3.4.1. mRNA Expression zellulärer Rezeptoren.....	63
3.4.2. Proteinexpression zellulärer Rezeptoren	66
4. DISKUSSION	68
4.1. Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene zwischen cEND und primären Zellen	69
4.2. Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene zwischen cerebEND und primären Zellen	73
4.3. Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene in cEND zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium	77
4.4. Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene in cerebEND zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium	78
4.5. Bewertung der Ergebnisse	79
4.6. Wachstums- und Differenzierungsunterschiede zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium.....	80
4.7. Vergleich der Auswirkung verschiedener Konzentrationen von FCS Nährmedium auf cEND/cerebEND	80
4.8. Unterschiede zwischen den mRNA-Expressionsleveln und Proteinleveln im Vergleich zu primären Zellen.....	81
4.9. Vergleich der Transkriptions- und Expressionslevel in den <i>in-vitro</i> Modellsystemen	82
4.10. Vergleich verschiedener in-vitro Modellsysteme	84
4.11. Aussichten für die Medikamentenforschung mit dem cEND/cerebEND Modellsystem	87

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	90
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	92
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	94
8. TABELLENVERZEICHNIS	96
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	97
9.2. Fachbücher	97
9.1. Papers.....	97
10. DANKSAGUNG	1
11. LEBENSLAUF	2

1. EINLEITUNG

1.1. Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn stellt das komplizierteste Organ des menschlichen Körpers dar. Es wiegt ungefähr 1300g und macht damit nur ca. 2% des Körpergewichts aus. Es verbraucht aber rund 20% der Gesamtenergie des Stoffwechsels. Es besteht sowohl ein hoher Bedarf an Glucose, als auch an Sauerstoff, dessen Mangel sehr schnell zu einer Schädigung des Hirngewebes führt. Im Falle einer unterbrochenen Sauerstoffzufuhr können irreparable Schäden des Zentralnervensystems (ZNS) bereits nach wenigen Minuten auftreten (Hladky and Barrand, 2018). Nicht nur Sauerstoffmangel führt zu Schäden des ZNS, sondern auch Abweichungen von der strikt geregelten Nährstoff- und Elektrolythomöostase. Ebenso kann der Übertritt von Noxen aus dem Blutkreislauf in das Hirngewebe schwere Folgen haben. Die sogenannte Blut-Hirn-Schranke (BHS) trennt den größten Teil der Hirnmasse von Substanzen, die mit dem Blut transportiert werden.

Lebensnotwendige Metabolite, wie z.B. Glucose und bestimmte Aminosäuren, werden über spezielle Transportproteine in die Endothelzellen und weiter in das Gehirngewebe geschleust, wohingegen mögliche Noxen auf der luminalen Seite der Blutgefäße verbleiben. Somit wird verhindert, dass toxische Stoffe Zugang zum ZNS erhalten und dieses hochsensible Organ schädigen. Außerdem hält die BHS das physiologische Milieu, beispielsweise hinsichtlich des pH-Werts oder der Elektrolytkonzentration, konstant (Helms et al., 2016).

Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus zwei Komponenten. Zum einen wird eine physische Schranke durch die Endothelzellen gebildet. Die Hauptrolle hierbei spielen die Tight Junctions (Zonula occludens), die eine interzelluläre Barriere zwischen den Endothelzellen der Hirnkapillaren bilden. Dabei wird der gesamte Zellumfang, ohne Unterbrechung, in regelmäßigen Abständen umfasst, wobei zwei nebeneinander liegende Endothelzellen im Bereich der Zellmembran an dieser Stelle verschmelzen. Das bedeutet, dass es im Bereich der BHS keine Fenestrierungen gibt. Auf diese Weise wird verhindert, dass große Proteine,

Neurotransmitter und andere Stoffe unkontrolliert aus dem Blut in das ZNS gelangen können. Die zweite Komponente der Schranke bilden die verschiedenen Transportmechanismen der Endothelzellen. Da der Transport nicht parazellulär erfolgen kann, wird er streng transzellulär über spezielle Carrier, Ionenkanäle und andere Mechanismen geregelt. Kleine lipophile Substanzen, wie z.B. Sauerstoff, Kohlendioxid, Alkohol etc., können hingegen ohne Einschränkungen durch die Zellmembran diffundieren (Abbott, 2013).

Da diese Vorgänge sehr viel Energie verbrauchen, verfügen Endothelzellen über eine hohe Mitochondriendichte (Sage, 1982).

Unterstützt wird die Blut-Hirn-Schranke durch Mikroglia, Perizyten und die Pseudopodien der Astrozyten (Abbott, 2013).

Mikroglia sind ortsständige Makrophagen und bilden somit einen Teil der Immunabwehr des ZNS. Perizyten sitzen den Endothelzellen abluminal auf und bedecken ca. 20% der Kapillaroberflächen, wobei sie vor allem an den Kontaktstellen zwischen zwei Endothelzellen zu finden sind. Sowohl die Endothelzellen, als auch die Perizyten besitzen je eine Basalmembran, die teilweise miteinander verschmelzen (Abbott, 2013).

Die Kapillaren, mit den sie umgebenden Perizyten, werden wiederum fast vollständig von den Füßchen der Astrozyten umschlossen. Die Bildung der Tight Junctions wird durch die Pseudopodien induziert, was ihre Rolle in der Barrierenfunktion verdeutlicht (Abbott, 2013).

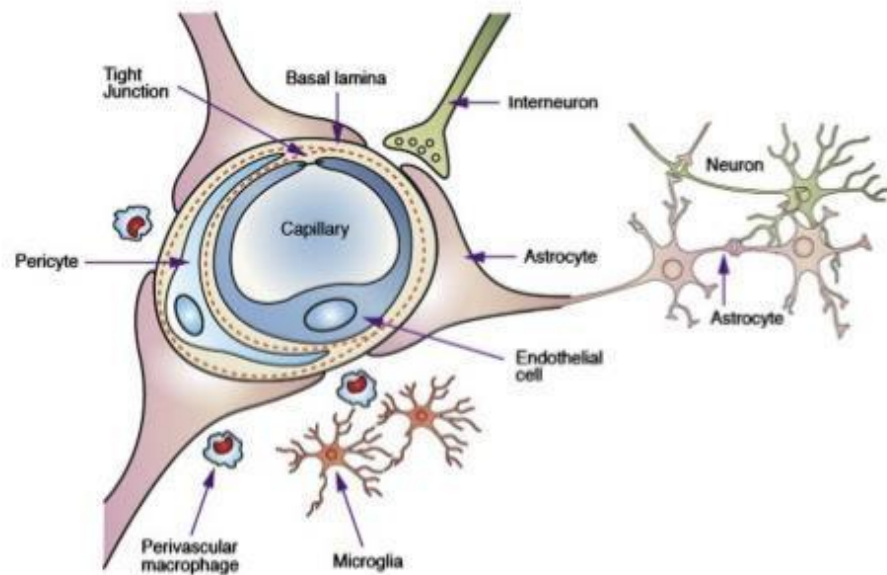


Abbildung 1: Schematische Darstellung der BHS: Querschnitt durch eine Hirnkapillare, mit den sie umgebenden Anteilen der BHS: Kapillarendothel mit Tight Junctions, Basallamina, Perizyten und Astrozyten. Außerdem sind weitere Bestandteile der Umgebung von Hirnkapillaren gezeigt: Mikrogliazellen und Neurone. (Abbott, et al., 2006) (Die Erlaubnis, diese Abbildung zu benutzen, wurde eingeholt)

1.2. Proteine in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke

1.2.1. Tight Junctions und Adherens Junctions

Claudine (Cldn): *Cldn* sind die wichtigsten Tight Junctions. Dabei handelt es sich um Transmembranproteine, die aus vier transmembranären Domänen mit zwei extrazellulär verlaufenden β -Schleifen bestehen. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. *Cldn* regulieren den elektrischen Widerstand und bestimmen mit welcher Größe und Ladung Ionen noch parazellulär passieren können (Furuse et al., 1998a; Furuse et al., 1998b; Haseloff et al., 2015).

Occludin (Ocln): *Ocln* war das erste Tight Junction (TJ) Protein, das entdeckt wurde. Es besteht aus vier transmembranären Domänen, zwei extrazellulären

und einer intrazellulären Schleife (Furuse et al., 1993; Haseloff et al., 2015). Phosphorylierung von *Ocln* reguliert die parazelluläre Permeabilität der Tight Junctions, sowohl G-Protein-abhängig als auch G-Protein-unabhängig, je nachdem, welcher Rezeptor involviert ist. Hierbei reguliert das N-terminale-Ende von *Ocln*, das im Zytoplasma lokalisiert ist, die transepitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten und somit das Ausmaß einer intrazerebralen Entzündungsreaktion (Haseloff et al., 2015).

Zonula occludens-1 (ZO-1): ZO-1 ist ein intrazellulär gelegenes, mit Tight Junctions assoziiertes Protein. ZO-1 aber auch (ZO-2 und -3) gehören zu der Familie der Membran-assoziierten Gyanulatkinasen (MAGUK) (Lue et al., 1994; Tietz and Engelhardt, 2015). ZO-1 interagiert mit *Claudinen* und *Occludin* der Zelle einerseits und mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts dieser Zelle andererseits und sorgt damit für eine stabile mechanische Verbindung und für die Weiterleitung regulatorischer Signale (Heiskala et al., 2001; Tietz and Engelhardt, 2015).

Junctionales Adhäsionsmolekül (Junctional adhesion molecules (Jam)): Es handelt sich um Tight Junction-Proteine, die beispielsweise mit ZO-1 assoziieren und eine Rolle bei Entzündungsreaktionen spielen. Sie gehören zu einer Immunglobulin-Superfamilie und werden auch von Leukozyten exprimiert (Ebnet et al., 2004; Tietz and Engelhardt, 2015). *Jam1-3* inhibieren Entzündungsreaktionen, indem sie die parazelluläre Migration von Lymphozyten in das ZNS regulieren (Haseloff et al., 2015; Palmeri et al., 2000).

Gefäßendothelkadherin (Vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin)): VE-Cadherin ist ein endothel-spezifisches Mitglied der *Cadherin*-Familie, welches den Hauptteil der Adherens Junctions bildet. Auf zytoplasmatischer Seite bindet es an verschiedene Proteine, wie etwa *β-Catenin* oder *Plakoglobin*. Durch vascular endothelial growth factor (VEGF) vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin wird die parazelluläre Permeabilität zwischen Endothelzellen der BHS vergrößert, was unter anderem die Leukozytendiapedese und damit intrazerebrale Entzündungsreaktionen beeinflusst (Dejana et al., 2008; Tietz and Engelhardt, 2015).

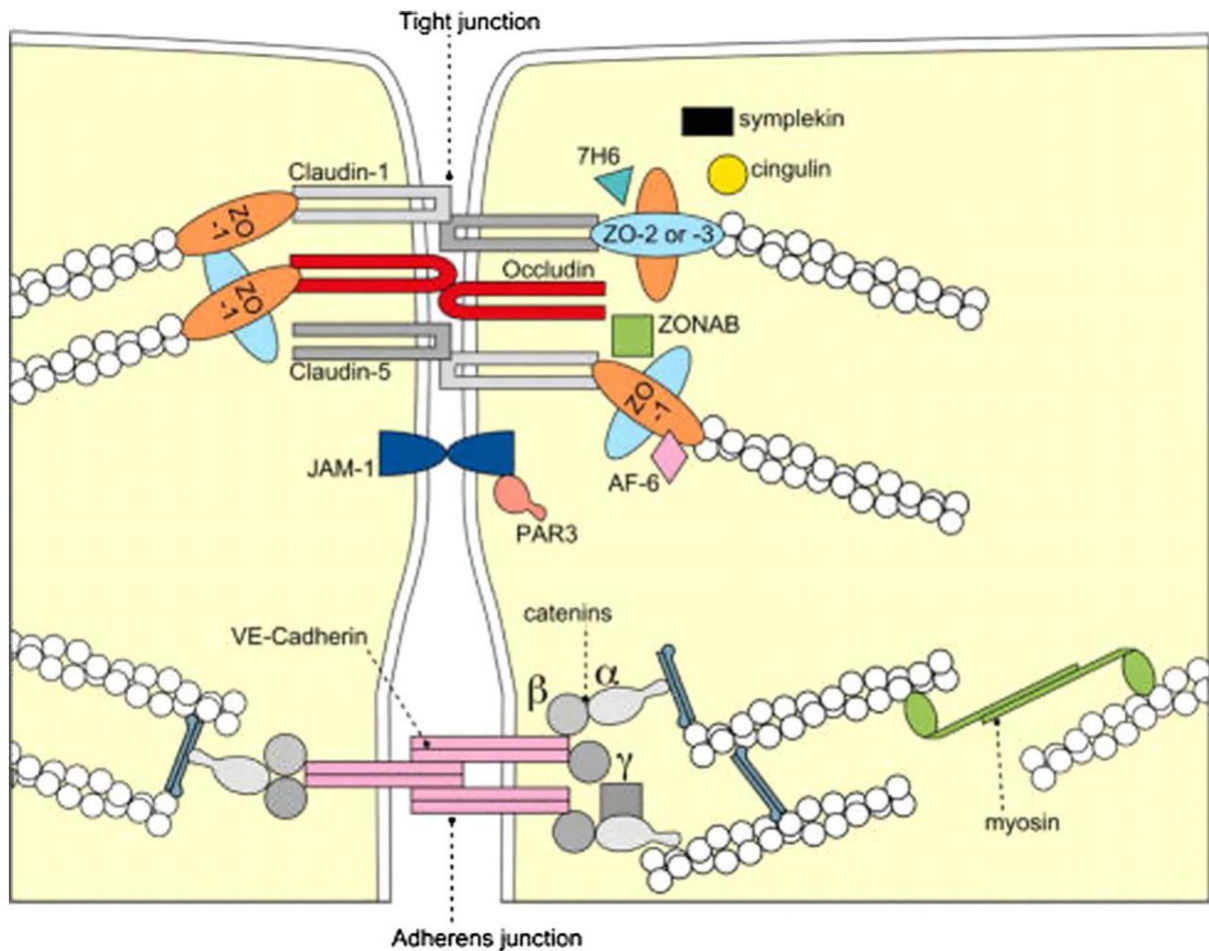


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tight Junctions (TJ) und Adherens Junctions (AJ): Zwischen zwei benachbarten Hirndendothelzellen bilden sich Tight Junctions aus. In der Grafik gezeigt sind Claudin-1, Claudin-5, Occludin, Jam-1, ZO-1 und AJ: VE-Cadherin. Aktinfilamente verbinden das Zytoskelett der Zellen durch ZO-1 und Cateninen mit den TJ und AJ., (Förster, et al., 2008)

1.2.2. Proteine mit Transportfunktion

Biologische Membranen stellen semipermeable Barrieren dar, die aus einer Lipiddoppelschicht, mit darin ein- und aufgelagerten Proteinen und Zuckerketten, bestehen. Einige Stoffe können die Membran frei passieren und somit in Zellen hinein oder auch wieder hinaus diffundieren. Für andere Stoffe stellen biologische Membranen unüberwindbare Hindernisse dar und sie sind auf bestimmte Proteine angewiesen, die ihnen den Durchtritt erleichtern oder sie aktiv, unter Verbrauch von Energie in Form von Adenosin-Triphosphat

(ATP), in die Zelle hinein oder heraus befördern. Frei diffundieren können kleine unpolare Moleküle wie z.B. Sauerstoff, Kohlendioxid oder auch Stickstoffmonoxid. Aber auch lipophile Substanzen, wie z.B. Steroidhormone, können diese Barrieren frei passieren. Da dieser Transport ohne zusätzliche Proteine auskommt, spricht man von einfacher oder auch passiver Diffusion. Sie erfolgt immer entlang ihres Konzentrations- oder elektrochemischen Gradienten. Mit Hilfe der einfachen Diffusion können z.B. alle Gewebe schnell und nach Bedarf mit Sauerstoff versorgt werden, was für das Überleben eines Organismus essenziell ist.

Eine weitere Transportmöglichkeit entlang des Konzentrations- oder elektrochemischen Gradienten stellt die erleichterte Diffusion dar. Die auf diese Art und Weise transportierten Substanzen erfüllen dabei nicht mehr die Kriterien, die ihnen eine einfache Diffusion durch die Lipiddoppelschicht einer Membran erlauben. Sie sind zu groß, oder polar oder beides. Damit diese Stoffe durch die Membran gelangen können, sind in die Membran Proteine eingelassen, die ihnen den Durchtritt erleichtern. Dabei unterscheidet man Kanäle, wobei die zu transportierende Substanz durch eine Pore von einer Seite der Membran auf die andere wandert, von Carriern, bei denen die zu transportierende Substanz spezifisch gebunden und durch eine Konformationsänderung des Carriers im Sinne eines Flip-Flop-Mechanismus auf der anderen Seite der Membran wieder frei gelassen wird. Kanäle erreichen eine große Transportrate, sind aber weniger spezifisch als Carrier. Sowohl die Kanäle, als auch die Carrier können, müssen aber nicht immer offen bzw. aktiv sein. Es kommt immer auf den Bedarf der jeweiligen Zelle und das Gewebe an. Dieser Transportmechanismus findet sich unter anderem in Nervenzellen und dient hierbei dem Informationsfluss entlang ihres Axons. Es werden durch ein ankommendes Aktionspotential, die Information, dass eine Nervenzelle erregt wurde, *spannungsabhängige Natriumkanäle* geöffnet und die Membran an dieser Stelle durch den Natriumeinstrom depolarisiert. Dadurch öffnen sich weitere *spannungsabhängige Natriumkanäle* und die Information kann schnell von einem Ende der Nervenzelle zum anderen Ende fließen.

Um die beschriebene Funktion und viele weitere aufrecht erhalten zu können, ist der Organismus auf Konzentrationsgradienten von Ionen und anderen Substanzen angewiesen. Diese können allerdings nur mit Hilfe von Energieverbrauch im Sinne des aktiven Transports aufrechterhalten werden. Man unterscheidet primär-aktiven von sekundär-aktivem Transport. Primär-aktive Transporter bezeichnet man auch als Adenosin-Triphosphatasen (ATPasen), weil sie immer mit einer Spaltung von ATP in Adenosindiphosphat (ADP) und einen Phosphatrest verbunden sind. Die Energie, die bei dieser energiereichen Bindung gespeichert ist und bei der Spaltung frei wird, wird direkt genutzt, um den betreffenden Stoff gegen einen Konzentrations- oder elektrochemischen Gradienten von einer Seite der Membran auf die andere Seite zu befördern. Ein wichtiges Beispiel für einen primär-aktiven Transporter ist die *Natrium-Kalium-ATPase*. Dabei handelt es sich um ein Protein, das ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommt und dafür zuständig ist, die intrazelluläre Natriumkonzentration niedrig und die Kaliumkonzentration hoch zu halten, indem es in einem Reaktionszyklus drei Natriumionen aus der Zelle hinaus und zwei Kaliumionen in die Zelle hinein befördert. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Antiport. Ein Beispiel für Uniport einer ATPase stellt die *Calcium-ATPase* dar, die im Muskel nach einer Kontraktion das angefallene Calcium aus dem Zytoplasma, unter Verbrauch von ATP, wieder in das sarkoplasmatische Retikulum pumpt.

Primär-aktive Transporter bilden die Voraussetzung, damit sekundär-aktiver Transport überhaupt möglich wird. Hierbei wird der durch primär-aktiven Transport aufgebaute Konzentrationsgradient bestimmter Ionen genutzt, um andere Ionen oder Substanzen gegen ihren Konzentrations- oder elektrochemischen Gradienten über Membranen zu befördern. Das bedeutet, dass im Zuge des sekundär-aktiven Transports kein ATP gespalten wird, jedoch im Vorfeld zur Bildung des Konzentrationsgradienten benötigt wurde. Sekundär-aktive Transporter finden sich, so wie die anderen vorgestellten Transportarten, ubiquitär im menschlichen Organismus. Ein Beispiel stellt der *Sodium Glucose Transporter 1 (SGLT1)* dar, der z.B. in der Plasmamembran der Enterozyten im Darm vorkommt und hier die Aufnahme von Glucose und Galactose aus dem

Darm in die Zellen vermittelt. Es handelt sich um einen Symport, wobei der jeweilige Zucker zusammen mit zwei Natriumionen, unter Ausnutzung des Natriumgradienten, importiert wird.

Die vorgestellten Transportarten mittels Transmembranproteinen bilden jedoch nicht die einzige Möglichkeit des Transportes an Membranen. Transport mit Hilfe von Membranvesikeln stellt ebenfalls eine vom Körper oft genutzte Variante dar. Endozytose bedeutet dabei die Aufnahmen von Material aus dem Extrazellularraum durch Bildung eines Vesikels nach Intrazellulär und Abschnürung dieses Vesikels im Zytoplasma. Das aufgenommene Material wird anschließend entweder in Lysosomen abgebaut, z.B. im Falle von Bakterien, Zelldetritus etc. das von Makrophagen, den Fresszellen des menschlichen Immunsystems, endozytiert wurde, oder durch Transzytose komplett durch die Zelle geschleust und an der anderen Seite wieder freigesetzt, z.B. an der Darmwand aufgenommene Nährstoffe, die auf der apikalen Seite der Enterozyten aus dem Darmlumen aufgenommen und auf der basolateralen Seite an das Blut abgegeben werden. Endozytose findet oftmals rezeptorvermittelt statt. Das bedeutet, dass das Substrat, das mittels eines Membranvesikels in die Zelle aufgenommen werden soll, an den passenden Rezeptor bindet. Dieser löst eine Signalkaskade aus, die letztendlich zur Bildung und zur Abschnürung des Vesikels führt. Solche Rezeptoren werden dann wieder recyclet, indem sie in einem Vesikel zur Plasmamembran zurückgebracht und durch Exozytose wieder in diese eingegliedert werden. Ein Beispiel für rezeptorvermittelte Endozytose stellt der *low density lipoprotein Rezeptor (LDL-Rezeptor)* dar. Er vermittelt die Endozytose des gesamten low density lipoprotein (LDL) Partikels. Dieses wird anschließend in der Zelle in Lysosomen abgebaut, wodurch unter anderem Cholesterin freigesetzt wird. Exozytose ist das Gegenteil der Endozytose. Dabei verschmilzt ein im Zellinneren gebildetes Vesikel mit der Plasmamembran und schüttet seinen Inhalt in den Extrazellularraum aus. Exozytose wird oft dazu verwendet die Plasmamembranbestandteile zu erneuern, wohingegen alte Plasmamembranbestandteile durch Endozytose entfernt und in der Zelle abgebaut werden (Hladky and Barrand, 2018).

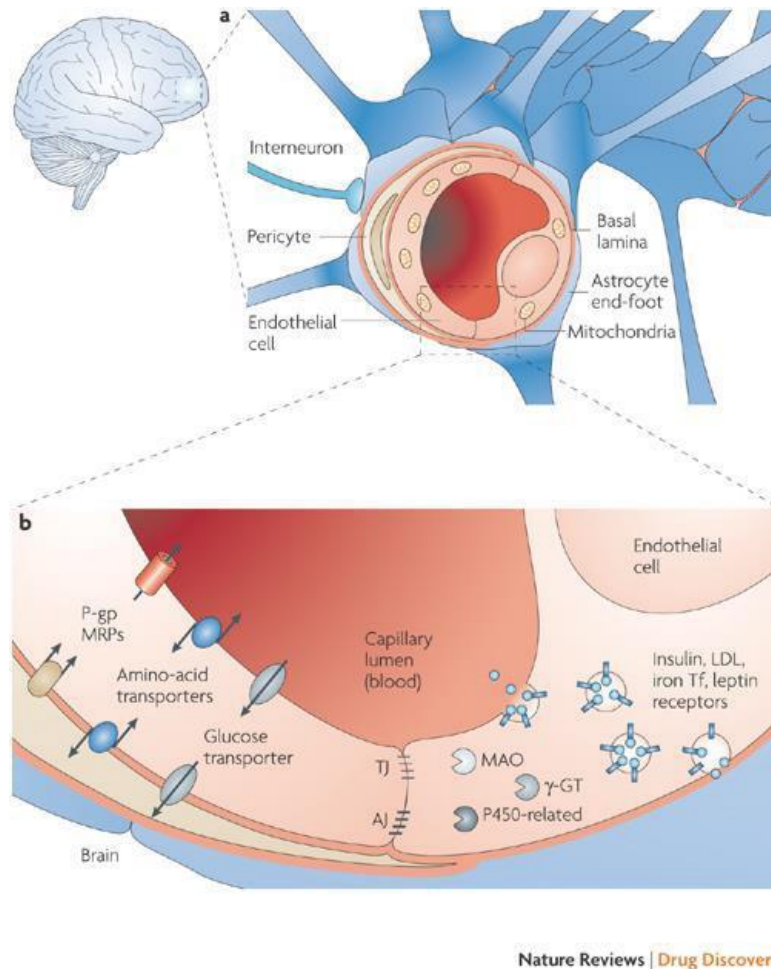


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Transportern und Rezeptoren der BHS: a) Schematische Seitenansicht des Gehirns und der vergrößerte Querschnitt einer Hirnkapillare mit den sie umgebenden Strukturen: Basallamina, Perizyten, Astrozyten und Neuronen. **b)** Weitere Vergrößerung macht die verschiedenen Transporter und Rezeptoren der Hirnendothelzelle sichtbar. Außerdem sind Carrier: MAO-, P450-abhängiger- und gamma-GT-Carrier im Zytosol und TJ und AJ zwischen den Endothelzellen gezeigt. (Ceccheli, et al., 2007) (Die Erlaubnis, diese Abbildung zu benutzen wurde eingeholt)

1.2.2.1. Effluxpumpen

Brustkrebsresistenz-Protein (Breast cancer resistance protein (Bcrp)): Gen: Abcg2. *Bcrp* gehört zu der Familie der ATP binding cassette-transporter (ABC-Transporter) und ist ein Homodimer. Er ist ein aktiver Effluxtransporter, der in mehreren Gewebetypen des menschlichen Organismus exprimiert wird und Giftstoffe aus der Zelle befördert, beziehungsweise die Aufnahme dieser Substanzen hemmt. *Bcrp* wird in Mamma-Karzinomen häufig überexprimiert.

Das führt dazu, dass medikamentöse Therapie bei dieser Art von Tumor schlecht anschlägt, da Medikamente wieder aus dem Tumorgewebe exportiert werden (de Gooijer et al., 2018; Doyle and Ross, 2003). Ähnliches gilt auch fürs Gehirn. Es ist schwierig Medikamente über die BHS zu bringen, da diese wieder heraus gepumpt werden.

Mehrfachresistenz-assoziiertes Protein (Multidrug resistance-associated proteins (Mrp)): Gen: AbccX. Sie bilden die Klasse C der Familie der ABC-Transporter. *Mrp1* und *Mrp5* werden in nahezu allen Geweben exprimiert, wohingegen *Mrp4* nur in wenigen Gewebetypen vorkommt. *Mrps* befördern durch primär aktiven Transport zelleigene aber auch zellfremde Substanzen in den extrazellulären Raum. *Mrp4* ist in den Fokus der Forschung gerückt, weil es viele antiretrovirale Medikamente aus den Zellen exportiert und damit die Behandlung von z.B. HIV erschwert. Ähnlich wie *Bcrp* bei Mamma-Karzinomen können *Mrp4* und *Mrp5* die medikamentöse Behandlung von lymphatischen Leukämien durch den Export der Medikamente aus den Zellinneren erschweren. *Mrp4* und *Mrp5* besitzen die Fähigkeit 3,5-zyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und 3,5-zyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) zu transportieren. Deswegen wird angenommen, dass sie auch in Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen (Sampath et al., 2002). *Mrp1*, *Mrp4* und *Mrp5* befinden sich alle an der luminalen Seite der Endothelzellen, wobei *Mrp4* und *Mrp5* auch in Astrozyten in der weißen Hirnsubstanz zu finden sind. Die Substrate von *Mrp4* und *Mrp5* sind hauptsächlich zyklische Nukleotide. *Mrp1* wird *in-vivo* in geringem Maße exprimiert und wird hauptsächlich in *in-vitro* Modellsystemen hochreguliert. *Mrp1* transportiert vorwiegend endogenes anionisches Glutathion und Glucuronatkonjugate (Hladky and Barrand, 2018; Nies et al., 2004).

P-Glycoprotein (P-gp, Mdr1): Gen: Abcb1. *P-gp* gehört zu der Familie der ABC-Transporter und ist das bekannteste und am besten charakterisierte Protein aus dieser Familie. Es handelt sich um ein ATP-abhängiges Transportprotein, das an der apikalen Seite von Endothelzellen lokalisiert ist. Es besitzt zwei ATP-Bindungsdomänen, die im Zellinneren lokalisiert sind. *P-gp* verhindert den

Eintritt von amphiphilen Substanzen in die Zelle und exportiert solche Substanzen aktiv in den extrazellulären Raum. Somit ist *P-gp* unter anderem dafür verantwortlich, dass große hydrophobe Medikamente die BHS, wo *P-gp* in hohem Maße exprimiert wird, nicht passieren können (Hladky and Barrand, 2018; Schinkel, 1999).

1.2.2.2. Proteine der SLC-Familie

Transporter für kationische Aminosäuren (Cationic amino acid transporter 1 (Cat1)): Gen: Slc7a1. Die *Cat*-Proteine gehören zu den ersten Aminosäuretransportern, die bei Säugetieren auf molekularer Ebene identifiziert wurden und scheinen die Hauptimporteure für positiv geladene Aminosäuren zu sein. Unter bestimmten Umständen sind sie außerdem in der Lage positiv geladene L-Aminosäuren zu exportieren (Closs et al., 2006; Watson et al., 2016). Es gibt viele verschiedene *Cat*-Proteine und es wird vermutet, dass viele noch nicht entdeckt wurden.

Glucose Transporter-1 (Glut-1): Gen: Slc2a1. *Glut-1* ist ein Glucosetransporter, der Glucose mit dem Konzentrationsgradienten insulinunabhängig transportiert. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Glucosetransporter der *Glut*-Familie in ihrer Substratspezifität, den kinetischen Eigenschaften und der Anzahl exprimierter Transporter in verschiedenen Geweben. *Glut-1* besteht aus 12 transmembranären Regionen. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich intrazellulär. Er wird vor allem im Gehirn und in Erythrozyten exprimiert (Hladky and Barrand, 2018; Wood and Trayhurn, 2003).

Transporter für L-Typ Aminosäuren (L-type amino acid transporter 1 (Lat1)): *Lat1* ist ein dimeres Transmembranprotein-Transporter, der sich aus den beiden Genen Slc7a5 und Slc3a2 zusammensetzt. *Lat1* transportiert verzweigt-kettige aber auch aromatische Aminosäuren (AS). Er spielt eine wichtige Rolle im Zellwachstum und der Zellproliferation (Chien et al., 2018; Yanagida et al., 2001).

Monocarboxylate Transporter 1 (Mct1): Gen: Slc16a1. *Mct1* katalysiert den Transport vieler metabolisch wichtiger Monocarbonsäuren aus der Zelle hinaus und verhindert dadurch eine Übersäuerung des intrazellulären Raums (Halestrap and Meredith, 2004; Lee and Kang, 2016).

1.2.2.3. Zelluläre Rezeptoren

Insulinrezeptor (Insr): *Insr* ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor mit Insulin als Ligand. Er löst die Transkription von Genen des Glucosstoffwechsels aus und bewirkt eine Translokation von Glucosetransportern aus, im Zytosol gespeicherten, Vesikeln in die Plasmamembran. Damit kann die Zelle, die den *Insulinrezeptor* exprimiert, auf Veränderungen des Blutzuckerspiegels reagieren und eine vermehrte Glucoseaufnahme in die Zelle veranlassen. Die Anzahl der *Insulinrezeptoren* pro Zelloberfläche hängt von verschiedenen physiologischen Faktoren, wie dem Plasmainsulinspiegel, Ernährungsbedingungen und hormonellen Einflüssen ab, und kann stark schwanken (Czech, 1985; Folch et al., 2018).

Low Density Lipoprotein Rezeptor verwandtes Protein (Low density lipoprotein receptor related protein 1 (Lrp1)): *Lrp1* regelt unter anderem die Endozytose und damit die Permeabilität der BHS für verschiedene Metabolite wie Triglyceride und Cholesterin. Außerdem spielt er eine Rolle im Lipoproteinmetabolismus und Zellwachstum. Die Endozytoseaktivität wird durch Stimulation mittels Insulin gesteigert (Hladky and Barrand, 2018; Masson et al., 2009).

Rezeptor für fortgeschrittene Glykosylierungsendprodukte (Receptor for advanced glycosylation end products (RAGE)): *RAGE* bindet advanced glycosylation end products (AGEs) als Liganden und führt zu einer vermehrten Aktivierung von *NF- κ B* und damit zur vermehrten Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen und induziert oxidativen Stress.

Tierexperimentelle Daten belegen die Relevanz der Liganden-*RAGE*-Interaktion für die akzelerierte Atherosklerose und die vermehrte Neointimabildung im Rahmen eines Diabetes mellitus (Bierhaus and Nawroth, 2009; Hladky and Barrand, 2018).

Transferrin Rezeptor (Tfrc): *Tfrc* ist ein dimerer Rezeptor aus zwei identischen Untereinheiten (ca. 95 kDa). *Tfrc* vermittelt die Aufnahme von Transferrin und damit Eisen in die Zellen, wobei durch extrazelluläre Interaktion von Transferrin und *Tfrc* zuerst ein *Tfrc*-Transferrin-Komplex entsteht. Die Aufnahme von Transferrin erfolgt durch Abschnürung eines Endozytosevesikels in die Zelle. Daraufhin wird das Eisen entweder intrazellulär aus dem *Tfrc*-Transferrin-Komplex gelöst und das Vesikel kann zurück zu der luminalen Plasmamembran wandern; das Eisen steht somit der Endothelzelle zur Verfügung; oder Transferrin wird durch Transzytose durch die Zelle geleitet und an der basalen Seite in das Gehirngewebe exozytiert. Durch Verschmelzung des Vesikels mit der Plasmamembran wird der *Tfrc* recycelt und steht für eine erneute Interaktion mit Transferrin zur Verfügung (Haseloff et al., 2015; Punnonen et al., 1997).

1.3. cEND und cerebEND

cEND steht für immortalized mouse cerebral capillary endothelial cells. Es handelt sich dabei um eine homogene Zelllinie, die aus Maushirnendothelzellen neugeborener, drei bis fünf Tage alter, Mäuse innerhalb von vier bis fünf Wochen hergestellt wurde. Die Zellen werden in diesem BHS-Modell mit Hilfe des Polynoma large T Antigens immortalisiert. CerebEND steht für immortalized mouse cerebellar capillary endothelial cells. Diese Zelllinie unterscheidet sich von der cEND Zelllinie dahingehend, dass die Endothelzellen aus dem Kleinhirn neugeborener Mäuse und nicht, wie in cEND, aus dem Großhirn entnommen werden. Diese *in-vitro* Modellsysteme der BHS wurden in der AG: Förster

erfolgreich isoliert und schon dazu benutzt, verschiedene physiologische und pathologische Prozesse in der BHS zu beschreiben und zu erklären. Beispielsweise wurde mit Hilfe dieser Systeme nachgewiesen, dass Hirnendothelzellen auf die Behandlung mit Glucocorticoiden, Östrogenen und proinflammatorischen Mediatoren, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF α), reagieren. Außerdem wurde mit diesen Zelllinien die Pathologie von Erkrankungen wie Multipler Sklerose und Hypoxie von Endothelzellen untersucht. Es wird deutlich, dass mit Hilfe von cEND und cerebEND das Studium der Struktur und Funktion der BHS erleichtert wird und weitere Untersuchungen, z.B. die Interaktion von Zellen des Immunsystems oder von Krebszellen mit Hirnendothelzellen, gefördert werden (Förster et al., 2005; Helms et al., 2016).

1.4. Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der Expression der Tight Junction Proteine: *Claudin-3 (Cldn3)*, *Claudin-5 (Cldn5)*, *Claudin-12 (Cldn12)*, *Occludin (Ocln)*, *Zonula occludens-1 (ZO-1)*, *Junctional adhesion molecule 1 (Jam1)*, *Junctional adhesion molecule 2 (Jam2)*, *Junctional adhesion molecule 3 (Jam3)*, des Adherens Junction Proteins: *Vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin)*, der Effluxpumpen: *Breast cancer resistance protein (Bcrp)*, *Multidrug resistance-associated protein1 (Mrp1)*, *Multidrug resistance-associated protein4 (Mrp4)*, *Multidrug resistance-associated protein5 (Mrp5)*, *P-Glycoprotein (P-gp)*, der Proteine der Solute Carrier Familie (SLC Familie): *Cationic amino acid transporter 1 (Cat1)*, *Glucose Transporter-1 (Glut-1)*, *L-type amino acid transporter 1 (Lat1)*, *Monocarboxylate Transporter 1 (Mct1)* und der zellulären Rezeptoren: *Insulinrezeptor (Insr)*, *Low density lipoprotein receptor related protein 1 (Lrp1)*, *Receptor for advanced glycosylation end products (RAGE)*, *Transferrinrezeptor (Tfrc)* auf mRNA und Proteinebene bei cEND und

cerebEND im Vergleich zu primären Zellen sowohl in 10% FCS als auch in 1% FCS Nährmedium.

Hintergrund dieser Aufgabenstellung ist die Frage, ob sich die Expressionslevel der genannten Markerproteine in diesen Zelllinien von denen der primären Endothelzellen unterscheiden. Da nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann, dass die Immortalisierung mit dem Polynoma Virus die Expressions- und Transkriptionslevel der primären Zellen verändert, ist die Beantwortung dieser Frage von hoher Bedeutung für die weitere Etablierung der cEND und cerebEND Linien als *in-vitro* Modellsysteme der BHS.

Wenn sich cEND und cerebEND als geeignete Modellsysteme erweisen sollten, würde weitere Forschung in diesem Gebiet mit einer Zeitersparnis und einer besseren Vergleichbarkeit der erworbenen Daten, durch homogene Zelllinien von Isolation zu Isolation einhergehen (Förster et al., 2005; Silwedel and Förster, 2006).

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Verwendete Substanzen/Materialien

Substanz/Material	Hersteller	Bestellnummer
3-Aminphthalhydrazid	Aldrich	CDS019923
4-Hydroycinnamic Acid	Sigma	476870
Aqua	Braun	145058002
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A7906
Bovine Serum Albumin PBS	Sigma Life Science	A9576
DNA, RNA and protein purification	Macherey-Nagel	740955.250
DNA-free™ Kit	Ambion	AM1906
DULBECCO's Phosphate buffered Saline	Sigma	D8537
High Capacity DNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems	4368814
Methanol	Sigma-Aldrich	UN1230
MicroAmp Splash Free 96 well Base	Applied Biosystems	4312063
Mir Vana miRNA Isolation Kit	Ambion	AM1560, AM1561
Natronlauge	Titripur	HC42631237
Notfat dried milk powder	Applichem Panreac	A0830
Nucleo Spin RNA®	Macherey-Nagel	740955.240C
NuPage 4-12% Bis-Tris Gel	Novex Life Technologies	NP0323BOX
NuPage Antioxidant	Novex Life Technologies	NP0005
NuPage LDS Sample Reducing Buffer	Novex Life Technologies	NP0007
NuPage MOPS SDS Running Buffer	Novex Life Technologies	NP0001
NuPage Sample Reducing Agent	Novex Life Technologies	NP0009
NuPage Transfer Buffer	Novex Life Technologies	NP0006-1
TaqMan universal Master Mix II no UNG	Applied Biosystems	4440040
peqGold Protein Marker V	PeqLab Biotechnologie GmbH	27-2210
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
PVDF-Membran	Bio-Rad	1620112
semi-skirted 96 well PCR Plate	Thermo Scientific	AB-0900
Tween	Sigma	P7949

Tabelle 1: Verwendete Substanzen/Materialien, deren Hersteller und Bestellnummern

2.1.2. Sonden für die Real Time PCR

Sonde	Bestellnummer
β-actin	Mm01205647_g1
Abcb1a	Mm00440761_m1
Abcc1	Mm00456156_m1
Abcc4	Mm01226380_m1
Abcc5	Mm01343626_m1
AGER	Mm01134790_g1
Bcrp	Mm00496364_m1
Cldn5	Mm01302427_m1
Cldn12	Mm01316511_m1
Glut-1/Slc2a1	Mm01192270_m1
Insr	Mm01211875_m1
Jam1	Mm00554113_m1
Jam2	Mm00470197_m1
Jam3	Mm00499214_m1
Lrp1	Mm00464608_m1
Ocln	Mm00500912_m1
Slc7a1	Mm01219060_m1
Slc7a5	Mm00441516_m1
Slc16a1	Mm00436566_m1
Tfrc	Mm00441941_m1
VE-Cadherin	Mm00486938_m1
ZO-1	Mm00493699_m1

Tabelle 2: Sonden für RT-PCR von Life Technologies, TaqMan

2.1.3. Verwendete primäre Antikörper für WB

	Hersteller	Bestellnummer	Herkunft	Größe in kDA	Verdünnung
β-actin	Sigma-Aldrich	A385	Mouse	45	1 : 15000
Bcrp	Abcam	Ab24114	Rat	70	1 : 100
Cldn3	Invitrogen	34-1700	Rabbit	22	1 : 200
Cldn5	Invitrogen	34-1600	Rabbit	22	1 : 200
Glut-1	Millipore	07-1401	Rabbit	45-55	1 : 200
Jam3	Millipore	ABT31	Rabbit	40	1 : 2000
Lat1	Santa Cruz	Sc-54229	Goat	40	1 : 200
Mct1	Santa Cruz	Sc-14917	Goat	40-48	1 : 200
Mrp1	Millipore	MAB4100	Mouse	73	1 : 200
Mrp4	Enzo Life Sciences	ALX-801-039-C100	Rat	150-170	1 : 100
Ocln	Acris	AP26410PU-N	Guineapig	65	1 : 50
P-gp	Enzo Life Sciences	ALX-801-002	Mouse	140+170	1 : 20
RAGE	Santa Cruz	Sc-8230	Goat	46	1 : 200
Tfrc	Invitrogen	13-6800	Mouse	95	1 : 500
ZO-1	Invitrogen	40-2300	Rabbit	250	1 : 100

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper für WB mit deren Herstellern, Bestellnummern, Tieren aus denen sie extrahiert wurden, Größe und Verdünnung

2.1.4. Verwendete sekundäre Antikörper für WB

	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Anti-goat	Santa Cruz	Sc-2056	1:3000
Anti-mouse	Roche	12015218001	1:400
Anti-rat	Invitrogen	Ss2874A	1:5000
Anti-rabbit	Roche	1201528001	1:1000
Anti-rabbit	GE Healthcare UK	NA934V	1:3000
Goat anti-guineapig	Santa Cruz	Sc-2438	1:5000

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper für WB mit deren Herstellern, Bestellnummern und Verdünnung

2.1.5. Verwendete Geräte

Gerät/Material	Hersteller
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems
Centrifuge 5418 R	Eppendorf
Dri-Block DB 2A	Teche
FluorChem FC 2 Multimage	Alpha Innotech
Heareus Megafuge 16 R	Thermo Scientific
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Peq powder 300	PeqLab Biotechnologie GmbH

Tabelle 5: Verwendete Geräte/Materialien und deren Hersteller

2.2. Methoden**2.2.1. Transkription und Translation**

Die Erbinformation im Zellkern jeder Zelle, mit Ausnahme der kernlosen Erythrozyten und Thrombozyten, codiert für alle Proteine des Menschen und auch aller anderer Lebewesen, die über DNA verfügen. Dabei werden in den Zellen durch bestimmte Faktoren und die Epigenetik nur die Gene transkribiert, die in dieser bestimmten Zelle benötigt werden und diese nur in einem genau

definierten Ausmaß. Das geschieht über zahlreiche Mechanismen. Dabei ist der Weg im menschlichen Organismus immer der Gleiche: von der DNA über die RNA zum Protein (Duale Reihe Biochemie, 2. Auflage, 2008).

Die DNA eines zu exprimierenden Gens wird über die RNA-Polymerase in hnRNA transkribiert und anschließend im Rahmen der Prozessierung in die mRNA umgewandelt. Dabei werden beim Splicing nicht codierende Bereiche der hnRNA, die Introns, herausgeschnitten und die codierenden Bereiche, die Exons, miteinander verbunden. Außerdem wird an das 5'Ende eine Cap-Struktur und an das 3'Ende ein poly(A)-Schwanz angehängt. Die Cap-Struktur verhindert einerseits, dass die mRNA im Zytosol viel zu schnell durch Exonukleasen abgebaut wird und ist andererseits für die Erkennung der mRNA durch Translationsfaktoren wichtig. Die Polyadenylierung, also das Anfügen des poly(A)-Schwanzes, soll ebenfalls durch Schutz vor Abbau eine Verlängerung der Halbwertszeit der mRNA bewirken. Diese Schritte laufen im Zellkern ab. Sobald die mRNA fertig ist, verlässt sie den Kern um zu einem Protein translatiert zu werden. Während der Translation wird die mRNA Matrize durch Ribosomen abgelesen und durch die tRNA passend gelieferte Aminosäuren (AS) werden über Peptidbindungen zu Polypeptiden und Proteinen verknüpft. Proteine die für das Zellinnere vorgesehen sind, beispielsweise Enzyme und Histone, werden im Zytosol translatiert. Proteine hingegen deren Bestimmungsort in der Plasmamembran der Zelle oder dem extrazellulären Raum liegt, werden am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert (Duale Reihe Biochemie, 2. Auflage, 2008).

2.2.2. *β-Actin* als Kontrollprotein

β-Actin ist ein essentielles Protein, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt. Es ist für die Struktur und die Kinetik des Zytoskeletts notwendig. In der Forschung wird es als Referenz herangezogen, wenn in wissenschaftlichen

Experimenten die Transkription und Expression bestimmter Gene/Proteine untersucht wird. Die Ergebnisse der Experimente können auf diese Weise besser ausgewertet und verglichen werden. Zum Beispiel zeigt der Nachweis von *β-Actin* in einer Probe mit gleichzeitigem Fehlen eines Markerproteins, dass das Markerprotein wirklich nicht nachzuweisen ist und dass das Experiment funktioniert hat. Wohingegen ein Fehlen von *β-Actin* einen Fehler und ein nicht verwertbares Ergebnis bedeutet (Thellin et al., 1999).

2.2.3. Kultivierung, Teilung und Lagerung von cEND, cerebEND und primären Zellen

2.2.3.1. Kultivierung von cEND, cerebEND und primären Zellen

Die zu analysierende Teilmenge der Zellen wird in einem Wasserbad aufgetaut und in ein 15 ml Flacon überführt, das 10 ml vorgewärmte Medium enthält.

Das Medium im Falle der primären Zellen setzt sich folgendermaßen zusammen: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) enthält 10% FCS, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin. Das Medium für cEND und cerebEND setzt sich folgendermaßen zusammen: 450 ml DMEM, 10% bzw. 1% FCS, 10 ml L-Glutamin, 2% MEM-Kit, 2% NEAA, 10 ml Natriumpyruvat, 50U/ml Penicillin/Streptomycin.

Die Suspension wird bei 250 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Das Medium wird entfernt und das Pellet in eine mit KollagenIV beschichtete, T₂₅ cm² Zellkulturflasche überführt, die vorgewärmtes Wachstumsmedium enthält (die Zelldichte sollte zum Pflanzen mindestens 1x10⁴ Zellen/ml betragen). Das Medium wird am nächsten Tag gewechselt. Sobald die Zellen zusammenwachsen, was normalerweise nach fünf Tagen erfolgt, werden sie geteilt (Förster et al., 2005).

2.2.3.2. Teilung von cEND, cerebEND und primären Zellen

Die Teilung sollte nur einmal pro Woche erfolgen und nicht höher als 1 : 4 betragen. Dafür wird das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. 3 ml warmer Trypsin- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung (PAA Laboratories) (T75 cm² Flasche) werden hinzugefügt und bei 37°C inkubiert. Dabei wird gewartet, bis sich die Zellschicht aufgelöst hat, was normalerweise 5-15 min dauert. Im Anschluss werden 5 ml Wachstumsmedium hinzugegeben, auf und ab pipettiert und abschließend in eine neue, mit KollagenIV beschichtete, Flasche transferiert (Förster et al., 2005).

2.2.3.3. Einfrieren von cEND, cerebEND und primären Zellen

Die Suspension wird bei 250 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss wird das Pellet (aus der T75 cm² Flasche) in 6 ml eiskaltem Medium (95% Wachstumsmedium, 5% Dimethyl sulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Die Suspension wird in vier 1,5 ml Cryo-Aliquotierungen geteilt. Dabei kann jeweils eine Cryo-Aliquotierung in einer T25 cm² Flasche ausgesät werden. Die Lagerung erfolgt bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff (Förster et al., 2005).

2.2.3.4. RNA Isolierung

Für die Isolierung wird das DNA, RNA and protein purification Kit (Macherey-Nagel) laut den Herstellerangaben verwendet. Katalognummer: 740955.250

2.2.3.5. RNA – Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels der optischen Absorptionsbanden von RNA im ultra-violeten Spektralbereich mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spectrophotometers (Thermo Scientific).

2.2.3.6. Reverse Transkription der extrahierten RNA in cDNA

Zuerst muss die RNA der Proben so verdünnt werden, dass eine endgültige Konzentration von 833,94 ng RNA/20,0 µl Lösung mit a.d. vorliegt. So wird sichergestellt, dass alle Proben die gleiche Konzentration an RNA enthalten und somit die Ergebnisse der Experimente vergleichbar sind.

Im Anschluss erfolgt die Umwandlung der RNA in cDNA unter Verwendung des High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) laut den Herstellerangaben.

Die Umwandlung von RNA in cDNA im 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) mit folgendem Protokoll vollendet:

Temperatur [°C]	25	37	85	4
Zeit [min]	10	120	5	~

Tabelle 6: Protokoll zur Umwandlung von RNA in cDNA mit dem 2720 Thermal Cycler

Die Proben werden dabei für 10 min bei 25°C gemischt. Anschließend für 120 min bei 37°C inkubiert. Diese Zeit und Temperatur sind für die reverse Transkription der RNA und damit für die Synthese von cDNA notwendig. Der Synthesevorgang wird durch 5-minütiges Erhitzen bei 85°C beendet und danach werden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Die cDNA wird auf 1 : 10,25 verdünnt.

2.2.4. Real Time PCR

2.2.4.1. Funktionsweise einer PCR/ Real Time (RT) PCR

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen durch eine in vitro durchgeführte DNA-Replikation zu vervielfältigen (= amplifizieren). Auf diese Weise lassen sich selbst kleinste DNA-Mengen eindeutig nachweisen. Erstmals veröffentlicht wurde die Methode von Saiki (Saiki et al., 1985).

Für eine in-vitro stattfindende DNA-Replikation sind folgende Werkzeuge erforderlich:

1. Eine DNA-Matrize (= Template)
2. Eine thermostabile DNA-Polymerase
3. Zwei verschiedene Primer
4. dNTPs
5. Puffer
6. MgCl₂

Es laufen drei Schritte bei unterschiedlichen Temperaturen in 20-50 Zyklen ab. Dabei wird die ursprüngliche Probe exponentiell vermehrt, da jeder Zyklus zu einer Verdoppelung der Proben des vorherigen Zyklus führt. Für die Versuche dieser Dissertation wurde das 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) mit folgenden Einstellungen: Sample Volumen 20 µl, Zyklen 50, verwendet.

Ablauf:

1. Denaturierung: Durch Erhitzung auf 95°C werden die Wasserstoffbrücken welche den DNA-Doppelstrang zusammenhalten gelöst. Es entstehen zwei DNA Einzelstränge.
2. Annealing (= Hybridisierung der Primer): Die Temperatur wird auf 52-60°C gesenkt, damit sich die Primer an die komplementäre DNA-/cDNA-Sequenz anlagern können.

3. DNA-Synthese: Die Temperatur wird auf 72°C erhöht, damit die Polymerase optimal das Strangwachstum polymerisieren kann. Dabei werden komplementäre Basen zum vorhandenen DNA-Strang in 5`- 3`-Richtung angeheftet → Elongation.

Bei der Real Time PCR wird die Anzahl der Kopien in Echtzeit gemessen. Dafür wird ein Fluoreszenzsignal verwendet (Duale Reihe Biochemie, 2. Auflage, 2008).

2.2.4.2. Durchführung RT PCR

Die Sonden aus Tabelle 2 werden verwendet. Die cDNA Proben werden 1 : 13 verdünnt und anschließend mit dem TaqMan® MasterMix (no UNG) (Applied Biosystems) laut den Herstellerangaben für die RT PCR vorbereitet. Für die RT PCR werden 96 well semi-skirted 96 well PCR Plates (Thermo Scientific) benutzt.

2.2.5. Proteinbestimmung

Die verwendete Methode zur Proteinbestimmung war die Bicinchoninsäure-Methode (BCA-Methode) nach Smith (Smith et al., 1985). Es wird die Proteinmenge in der zu untersuchenden Probe durch Kalorimetrie bestimmt. Dabei werden bestimmte Farbstoffe in die Lösungen gegeben und deren Verfärbung mit der Verfärbung von Eichlösungen mit bekannter Proteinkonzentration dadurch verglichen, dass die optische Absorption der Farbstoffe im Photometer bestimmt wird. Die Verfärbung kommt dadurch zustande, dass Peptidbindungen und einige Aminosäuren, z.B. Tyrosin, Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren können, welches dann mit BCA einen Farbkomplex bildet.

Um den Proteingehalt der cEND-, cerebEND- und primären Zellproben zu bestimmen wird der Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) verwendet.

Es wird eine unsterile 96-well-plate verwendet. Jedes Triplet sollte 25 μ l Flüssigkeit enthalten, d.h. dass Probenträger in die keine Probe gegeben wurde, mit 25 μ l a.d. befüllt werden.

Die Proben werden 1 : 8,333 verdünnt.

Zu den Proben wird 200,0 μ l einer Mischung von Pierce BCA Protein Assay A mit Pierce BCA Protein Assay Reagens B im Verhältnis 1 : 20 hinzugefügt.

Für die Auswertung wird eine Kalibrierungsreihe mit einem Proteinstandard angelegt, wobei BSA von 2,0 μ g/ml bis auf 25,0 μ g/ml verdünnt wird.

Die Platten werden anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt sind, kann die optische Absorption bei 540 nm gemessen werden. Durch Vergleich der Absorption mit der Kalibrierungsreihe kann die Konzentration ermittelt werden.

Anschließend werden 65,0 μ l der Protein-Proben mit 35,0 μ l eines Gemischs aus 25,0 μ l NuPAGE LDS Sampel Reducing Buffer 4 x und 10,0 μ l NuPAGE Sample Reducing Agent gemischt.

Die Proben werden nun soweit verdünnt, dass 30,0 μ l Probe 22,5 μ g Proteine enthalten.

Zur Verdünnung werden 162,0 μ l RIPA-Buffer, 62,4 μ l Lämmli 4x und 25,0 μ l NuPAGE Sample Reducing Agent gemischt.

Zusammensetzung der Reagentien:

Für 50,0 ml RIPA – Buffer:

1. 50 mM Tris pH 8,0: 2,5 ml (Stock 1M)
2. 150 mM NaCl: 7,5 ml (Stock 1M)
3. 0,1% SDS: 50,0 mg
4. 0,5% Na.Deoxycholate: 250,0 mg
5. 1% NP40: 500,0 µl
6. Vor Gebrauch Protease Inhibitoren hinzu geben

Für 50,0ml Lämmli 4x:

1. 8% SDS: 4,0 g
2. 40% Glycerol: 20,0 ml
3. 0,004% Bromphenol blue: 0,002 g
4. 0,250 M Tris HCl pH 6,8: 12,5 ml (Stoch 1M)
5. Vor Gebrauch 6% β – Mercapto. hinzugeben

2.2.6. Western Blot

Die Western Blot Analyse erfordert mehrere Schritte, wobei im ersten Schritt die Markerproteine mit einer Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese aufgetrennt und im nächsten Schritt, zur weiteren Analyse, auf ein Nitrocellulosepapier oder eine Nylonfolie übertragen werden. Dieser Vorgang wird Blotting (= Abklatsch) genannt. Die Übertragung vom Gel auf die Folie erfolgt normalerweise durch ein elektrisches Feld, das senkrecht zur Oberfläche angelegt wird. Anschließend können primäre Antikörper appliziert werden, die an spezifische Antigene der Markerproteine binden. Um diese Bindung sichtbar zu machen, wird ein sekundärer Antikörper aufgebracht, der enzymimmunologisch reagiert und die Antigen-Antikörper-Antikörper-Bindung

anfärbt oder fluoreszenzmarkiert. Aufgrund der Anwendung von Antikörpern sind Westerns Blots hochspezifisch und sehr empfindlich. Weil sie relativ einfach herzustellen sind, werden sie routinemäßig in wissenschaftlichen Laboratorien eingesetzt, um bekannte Proteine zu identifizieren (Löffler, et al., Biochemie und Pathobiochemie, 9. Auflage, 2014).

2.2.6.1. Gel gießen und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zuerst werden die Proben für 10 min auf 70°C mit dem Dri-Block DB 2A (Teche) erwärmt. Sechs von insgesamt acht Gelen können auf diese Weise erstellt werden. Allerdings gibt es Proteine, bei denen die Probe nur auf 37°C erwärmt werden darf, z.B. *Glut-1*. Zum Nachweis dieses Proteins werden zwei Gele erstellt, bei denen die Proben für 10 min auf 37°C erwärmt werden. In der Zeit, in der sich die Proben erwärmen, wird die Apparatur für die Gelelektrophorese vorbereitet. Es werden die NuPage 4-12% Bis-Tris Gele verwendet. Zwischen zwei befestigten Gelen wird 200 ml einer Mischung aus 100,0 ml NuPAGE MOPS SDS Running Buffer, das auf 2,0 L mit a.d. verdünnt wurde, gegeben. Dazu kommen noch 500,0 µl NuPAGE Antioxidant. Außerhalb der Gele wird mit 600,0 ml Running Buffer die Vorrichtung aufgefüllt.

Zusammensetzung Running Buffer:

1. 25 mM Tris: 60,4 g
2. 250 mM Glycerine: 376,0 g
3. 0,1% SDS: 20,0 g
4. Für 2,0 L a.d.

Nachdem der Kamm aus den Geltaschen entfernt wurde, werden die Taschen mit der Lösung, die sich zwischen den Gelen befindet, gespült.

Anschließend wird der Marker so dazugegeben, dass der Anfang und das Ende der späteren Membran eindeutig nachzuvollziehen sind. Der Marker wird deshalb asymmetrisch verteilt. Es wird der peqGold Protein Marker V (PeqLab Biotechnologie GmbH) verwendet. Pro Tasche werden 2,0µl Marker eingesetzt.

Dieser Marker zeigt folgende Proteingrößen in kDa an:

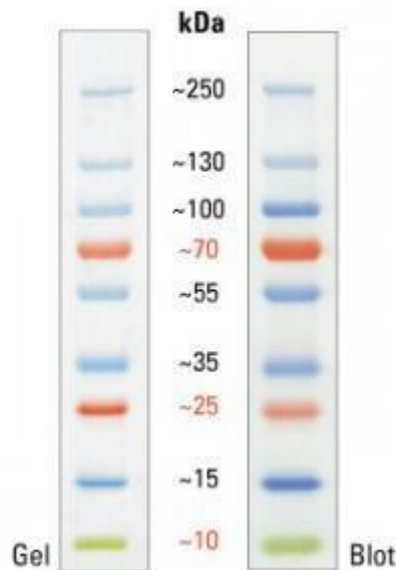


Abbildung 4: SDS-PAGE Bandenprofil: Bandenprofil für eine SDS-PAGE eines 4-20% Tris-glycine Gels. Die Banden haben zur besseren Orientierung verschiedene Farben und stehen für bestimmte kDa-Werte. (Quelle: Thermo Fisher Scientific WebSite) (Die Erlaubnis, diese Abbildung zu benutzen, wurde eingeholt)

Die restlichen Taschen werden mit den zu untersuchenden Proben befüllt. Dazu wird pro Tasche 15,0 µl Probe verwendet.

Bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 100-125 mA werden die Proben für ca. 35 min laufen gelassen. Nach dieser Zeit sind sie ungefähr bis zur Mitte des Gels vorgedrungen. Daraufhin wird die Spannung auf 80 V und die Stromstärke auf 32 mA reduziert und die Proteine werden weiter laufen gelassen, bis die Markerfront durchgelaufen ist.

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Cleveland et al., 1977) besteht darin, dass SDS ein Detergens ist und mit hoher Affinität Proteine bindet und sie denaturiert. Durch die starke negative

Eigenladung von SDS werden die Ladungen der Proteine maskiert und die Proteine können bei neutralem pH nach der Molekülgröße aufgetrennt werden. Dabei wandern kleine Moleküle schneller durch das Gel als große Proteine. Durch Vergleich der Lage der Proteine in Relation zu der Markerfront kann man die zu untersuchenden Proteine identifizieren.

2.2.6.2. Transfer Gel → Membran

Die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran wird für eine Minute in Methanol eingelegt. Die Apparatur zum Einspannen der Membran und des Gels wird in eine Wanne gelegt, die mit Transfer Buffer gefüllt ist.

Zusammensetzung für 2 L Transfer Buffer:

1. A.d.: 1,9 L
2. NuPAGE Transfer Buffer: 100,0 ml
3. NuPAGE Antioxidant: 1,0 ml

Die Filter werden in dem Transfer Buffer eingeweicht und das Gel und die Membran dazwischen geklemmt. Sie werden, vollständig vom Transfer Buffer bedeckt, in die Transfer-Apparatur gespannt. Bei einer Spannung von 40 V und einer Stromstärke von 80 mA wird der Transfer für 28 Stunden bei 4°C laufen gelassen.

2.2.6.3. Durchführung Western Blot

Die Membran wird für eine Stunde in 5% Milch/PBS blockiert.

Zusammensetzung 5% Milch/PBS:

1. Milchpulver: 7,5 g
2. PBS: 150,0 ml

Anschließend wird der primäre Antikörper laut Tabelle 3 in 0.5% BSA/PBS bzw. in 5% Milch/PBS (für Jam3) verdünnt, eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einem Rüttler einwirken gelassen.

Die Membranen werden 3 x für 10 min mit 1% Tween/PBS gewaschen. Anschließend werden sie für 25 min in 5% Milch/PBS blockiert und der sekundäre Antikörper wird entsprechend Tabelle 4 für 1 h in 1% BSA/PBS bzw. 5% Milch/PBS (für die sekundären Antikörper der Firma Roche) einwirken gelassen. Daraufhin werden die Membranen wieder 3 x für 10 min mit 1% Tween/PBS gewaschen.

Die Membranen werden für zwei Minuten in Entwicklerlösung, die zu je 5,0 ml aus ECL1 und ECL2 besteht, gegeben und vorsichtig geschüttelt.

Es werden die primären AK aus Tabelle 3 verwendet.

Zusammensetzung ECL1:

1. 1 Cap Luminol
 2. 1 Cap PCA
 3. 5,0 ml Tris 1M pH 8.8 auf 50 ml a.d. auffüllen
- Luminol 250 mM in DMSO, d.h. 0,885 g auf 20 ml DMSO, 1,0 ml aliquotieren, bei -20°C lagern (= 3 – Aminophthalhydrazide von der Firma Aldrich)
- P – Coumaric – Acid (PCA) 90 mM in DMSO, d.h. 0,296 g in 20,0 ml DMSO, 440 µl aliquotieren, bei -20°C lagern (= 4 – Hydrocinnamic Acid von der Firma Sigma)

Zusammensetzung ECL2:

1. 5,0 ml Tris 1M pH 8,8
2. 32,0 µl a.d. auf 50,0 ml a.d. auffüllen

Diese Lösungen werden bei 4°C in Alu-Folie gelagert.

Anschließend werden die Membranen im FluorChem FC 2 Multimage (Alpha Innotech) entwickelt.

2.2.6.4. Strippen der Membranen

Pro Membran können mehrere verschiedene Proteine nachgewiesen werden. Dafür müssen sie, bevor ein neuer primärer Antikörper appliziert wird, wie beschrieben auf dem Rüttler gestrippt werden.

1. A.d.: 5min
2. 0,2M NaOH: 5min
3. A.d.: 5min
4. 1% Tween/PBS: 10min

2.3. Auswertung der Ergebnisse von PCR und Western Blot

Die Auswertung erfolgte für die Ergebnisse von PCR und Western Blot mittels Excel 2010. Bei der Auswertung der Western Blot Ergebnisse wurde zusätzlich Scion Image verwendet. Für die Analyse der Daten wurden der TTEST, die univariante Varianzanalyse (ANOVA) und der Dunnett's Posthoc Test verwendet. Die Expressionslevel der primären Zellen wurden auf 1 normalisiert. Die statistische Relevanz für die Ergebnisse wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3. ERGEBNISSE

Im Folgenden sind die mRNA- und Proteinexpressionslevel von den untersuchten Tight Junctions, Adherens Junctions, Effluxpumpen, Proteinen der SLC-Familie und zellulären Rezeptoren in den beiden Medien und Zellsystemen zum Vergleich grafisch dargestellt. Die primären Zellen wurden aus dem Großhirn gewonnen.

3.1. Expression der Tight Junctions und des Adherens Junction

3.1.1. mRNA Expression der Tight Junctions und des Adherens Junction

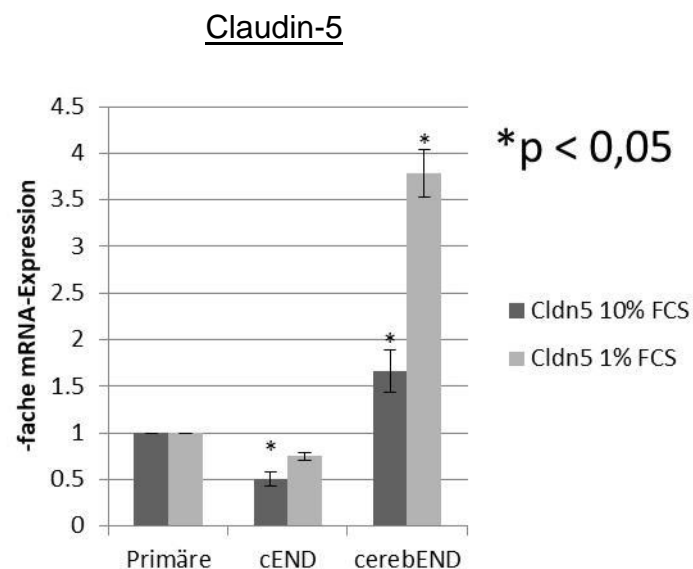


Abbildung 5: RT-PCR: mRNA Expression von Cldn5: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Claudin-5 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Stark erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS Medium sowohl im Vergleich zu primären Zellen in 1% FCS, als auch im Vergleich zu cerebEND in 10% FCS Medium. Leicht erhöhte Expression von Cldn5 in cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in 10% FCS Medium. Ähnliche Expression in cEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien. Erhöhte Expression in cEND in 1% FCS im Vergleich zu 10% FCS Medium.

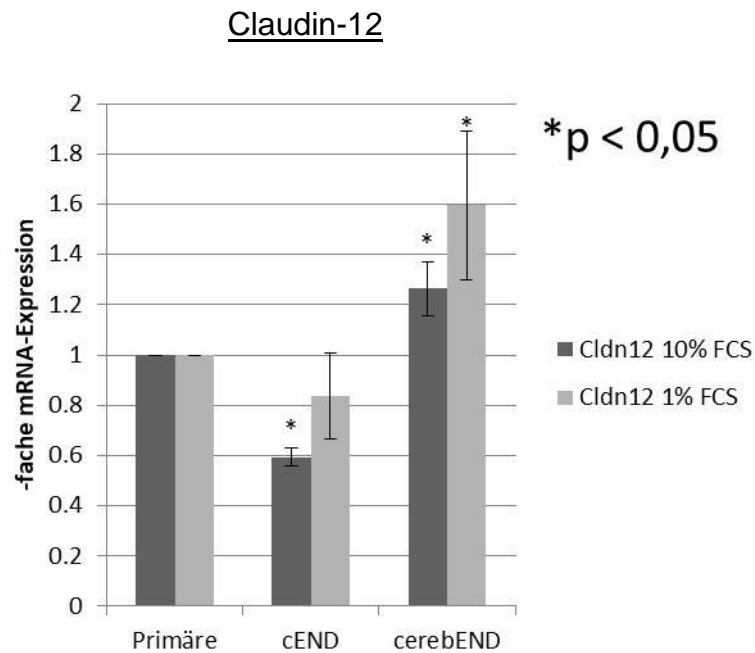


Abbildung 6: RT-PCR: mRNA Expression von Cldn12: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Claudin-12 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien. Ähnliche Expression in cerebEND im Vergleich der Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cerebEND in 10% FCS Medium im Vergleich zu primären Zellen. Leicht erhöhte Expression in cEND/cerebEND in 1% FCS Medium im Vergleich zu primären Zellen in 1% FCS Nährmedium.

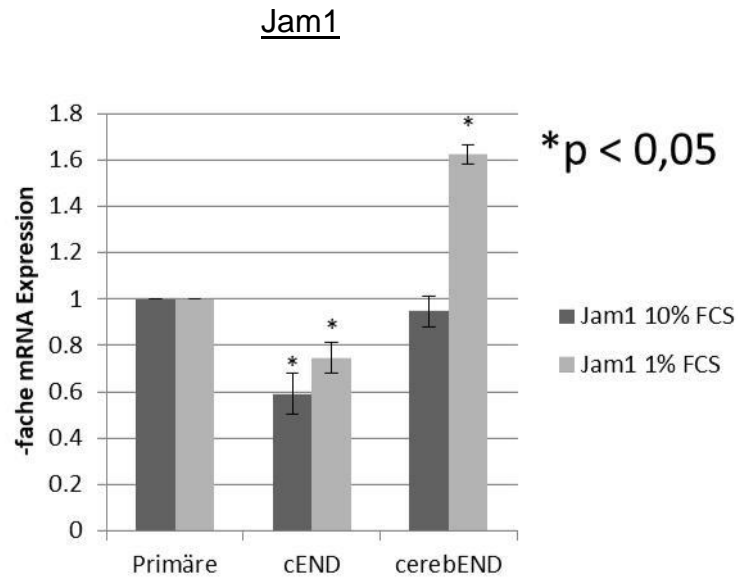


Abbildung 7: RT-PCR: mRNA Expression von Jam1: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Jam1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cerebEND in 10% FCS Medium im Vergleich zu primären Zellen. Leicht erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS Medium im Vergleich zu primären Zellen in 1% FCS Nährmedium. Erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS Medium im Vergleich zu der Expression in cerebEND in 10% FCS Medium.

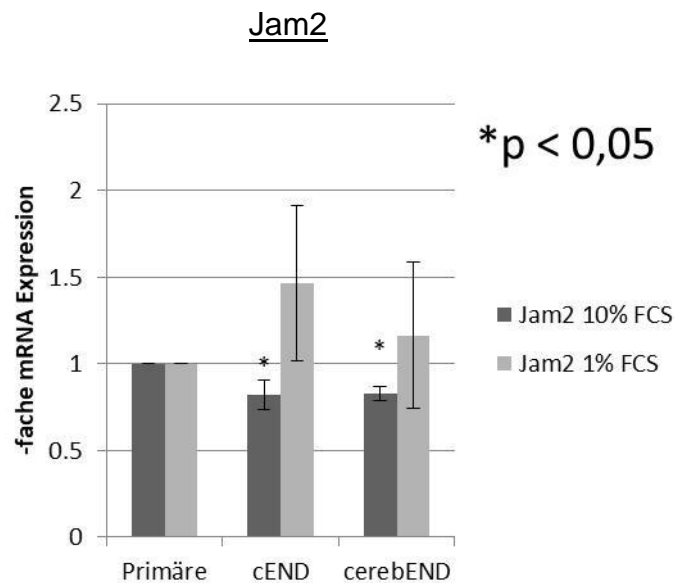


Abbildung 8: RT-PCR: mRNA Expression von Jam2: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Jam2 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien. Ähnliche Expression in cEND in beiden Medien im Vergleich zu primären Zellen. Leicht erhöhte Expression in cEND/cerebEND in 1% FCS im Vergleich zu cEND in 10% FCS Nährmedium.

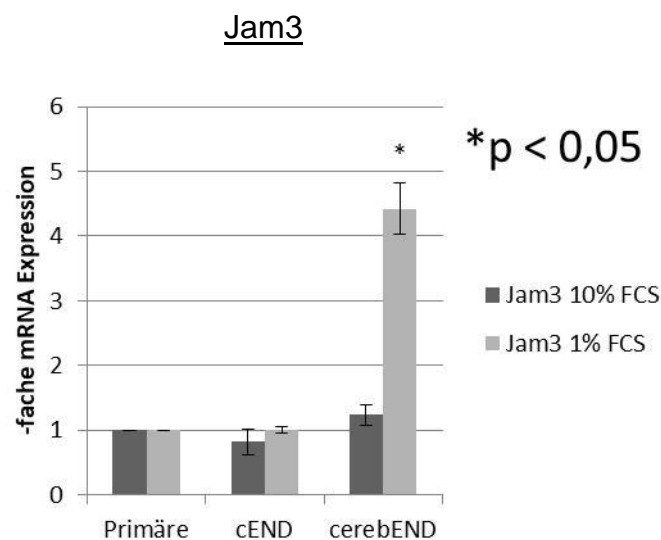


Abbildung 9: RT-PCR: mRNA Expression von Jam3: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Jam3 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cerebEND in 10% FCS Medium im Vergleich zu primären Zellen. Stark erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS Medium sowohl im Vergleich zu primären Zellen in 1% FCS, als auch im Vergleich zu cerebEND in 10% FCS Medium.

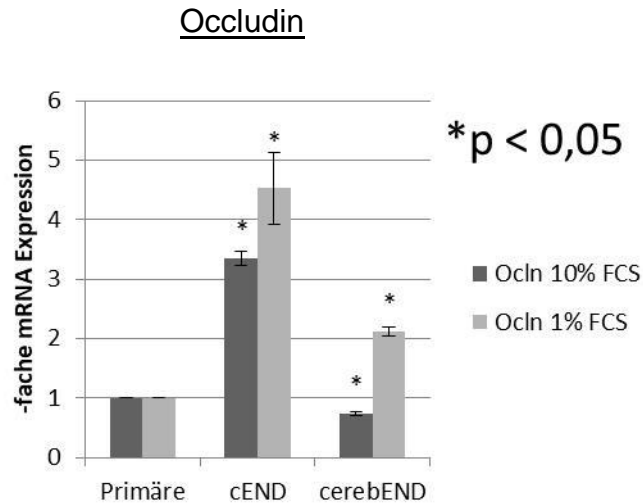


Abbildung 10: RT-PCR: mRNA Expression von Ocln: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Occludin sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Stark erhöhte Expression in cEND im Vergleich zu primären Zellen sowohl in 10% FCS als auch in 1% FCS Medium. Erhöhte Expression in cEND in 1% FCS im Vergleich zu cEND in 10% FCS Medium. Ähnliche Expression in cerebEND in 10% FCS im Vergleich zu primären Zellen. Erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS Medium sowohl im Vergleich zu primären Zellen in 1% FCS, als auch im Vergleich zu cerebEND in 10% FCS Medium.

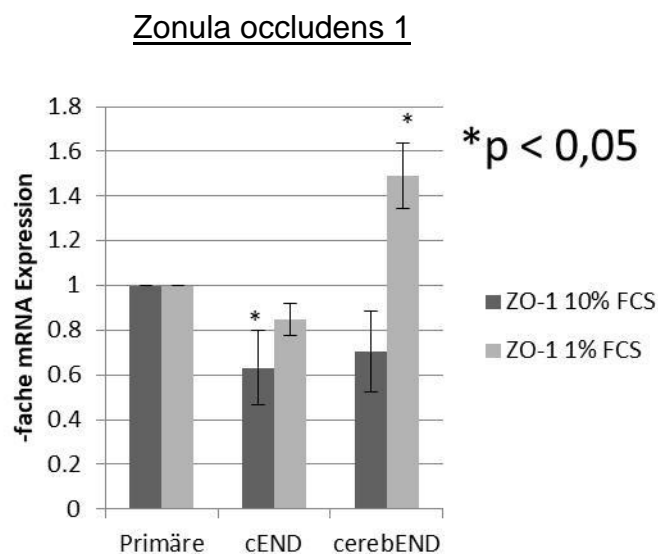


Abbildung 11: RT-PCR: mRNA Expression von ZO-1: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Zonula occludens 1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Medien. Erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS Medium im Vergleich zu cerebEND in 10% FCS Medium.

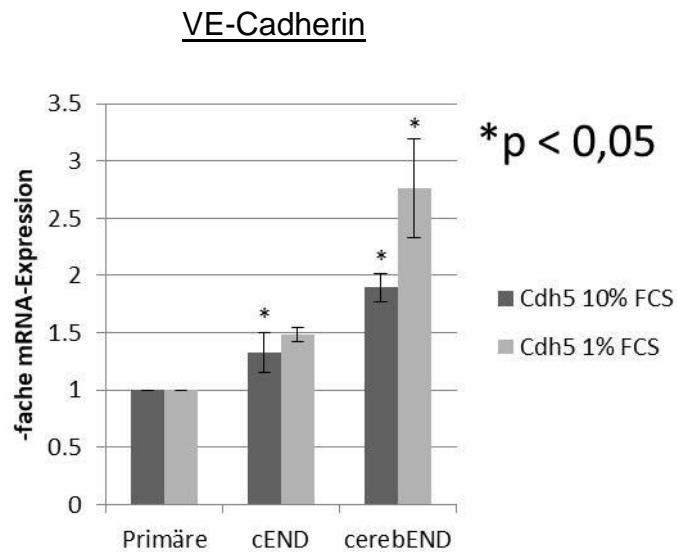


Abbildung 12: RT-PCR: mRNA Expression von Cdh5: Vergleich der Expressionsraten des Gens von VE-Cadherin sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Erhöhte Expression in cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien. Erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS Medium im Vergleich zu cerebEND in 10% FCS Medium.

Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der Tight Junctions durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen.

	cEND		cerebEND	
	10%	1%	10%	1%
Cldn5	50,33% ($\pm 7,77\%$)	74,67% ($\pm 3,79\%$)	165,67% ($\pm 22,68\%$)	379,00% ($\pm 25,53\%$)
Cldn12	59,33% ($\pm 3,51\%$)	83,67% ($\pm 17,21\%$)	126,33% ($\pm 10,79\%$)	159,67% ($\pm 29,53\%$)
Jam1	59,00% ($\pm 8,89\%$)	74,67% ($\pm 6,43\%$)	94,67% ($\pm 6,42\%$)	162,33% ($\pm 4,04\%$)
Jam2	82,33% ($\pm 8,50\%$)	146,33% ($\pm 44,78\%$)	83,00% ($\pm 4,00\%$)	116,33% ($\pm 42,02\%$)
Jam3	81,67% ($\pm 19,55\%$)	100,00% ($\pm 5,57\%$)	123,33% ($\pm 15,50\%$)	441,67% ($\pm 39,63\%$)
Ocln	334,44% ($\pm 12,34\%$)	452,67% ($\pm 60,29\%$)	73,67% ($\pm 2,89\%$)	212,67% ($\pm 7,64\%$)
ZO-1	63,00% ($\pm 16,64\%$)	84,67% ($\pm 7,02\%$)	70,33% ($\pm 18,15\%$)	149,00% ($\pm 14,80\%$)
Cdh5	132,67% ($\pm 17,01\%$)	148,33% ($\pm 5,69\%$)	189,33% ($\pm 12,06\%$)	276,33% ($\pm 43,02\%$)

Tabelle 7: Prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der Tight Junctions durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen: Ähnliche Expression in beiden Nährmedien in cEND bei *Cldn5*, *Cldn12*, *Jam1*, *Jam3*, *ZO-1* und *Cdh5*. Höhere Expression in cEND durch Mediumreduktion bei *Jam2* und *Ocln*. Höhere Expression durch Mediumreduktion in cerebEND bei *Cldn5*, *Cldn12*, *Jam1-3*, *Ocln*, *ZO-1* und *Cdh5*.

Es zeigt sich eine ähnliche mRNA Expression aller untersuchten TJs und AJ zwischen primären Zellen und cEND sowohl in 10% als auch in 1% FCS Medium. Die einzige Ausnahme bildet dabei *Occludin*, das in beiden Medien vermehrt transkribiert wird.

Die Hochregulation von *Occludin* zeigt sich auch bei cerebEND in 1% FCS Medium. Insgesamt scheint die Transkription von *Occludin*, mit Ausnahme von cerebEND in 10 % FCS Medium erhöht zu sein.

CerebEND zeigt im Gegensatz zu cEND allerdings noch weitere Hochregulationen von Markerproteinen auf mRNA Ebene. Sowohl *Claudin5*, als auch *VE-Cadherin* werden in beiden untersuchten Medien, im Vergleich zu primären Zellen, verstärkt exprimiert.

Jam3 wird, wie auch *Occludin*, bei cerebEND in 1% FCS Medium hochreguliert, wohingegen es in 10% FCS ein ähnliches Expressionslevel, wie in den primären Zellen zeigt.

Cldn12 und *Jam1* werden ebenfalls in cerebEND in 1% FCS im Vergleich zu primären Zellen hochreguliert.

Im Vergleich der Nährmedien untereinander zeigt sich, dass in cEND, mit Ausnahme von *Jam2* und *Ocln*, nur geringe Unterschiede in der Expressionsrate entstehen. *Jam2* und *Ocln* werden in 1% FCS Medium stärker exprimiert als in 10% FCS.

CerebEND zeigt im Vergleich der beiden Nährmedien untereinander deutlichere Unterschiede als cEND. Die mRNA Expression erhöht sich bei allen untersuchten Tight Junction Proteinen und *VE-Cadherin* in 1% FCS im Vergleich zu 10% FCS Medium.

3.1.2. Proteinexpression der Tight Junctions

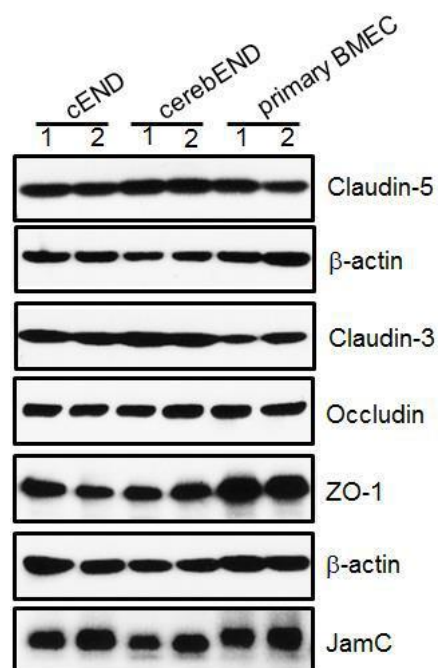


Abbildung 13: WB: Proteinexpression der Tight Junctions: Vergleich der Expression der Tight Junctions: Claudin-5, Claudin-3, Occludin, ZO-1 und JamC zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen sowohl in 10% (1), als auch in 1% Medium (2).

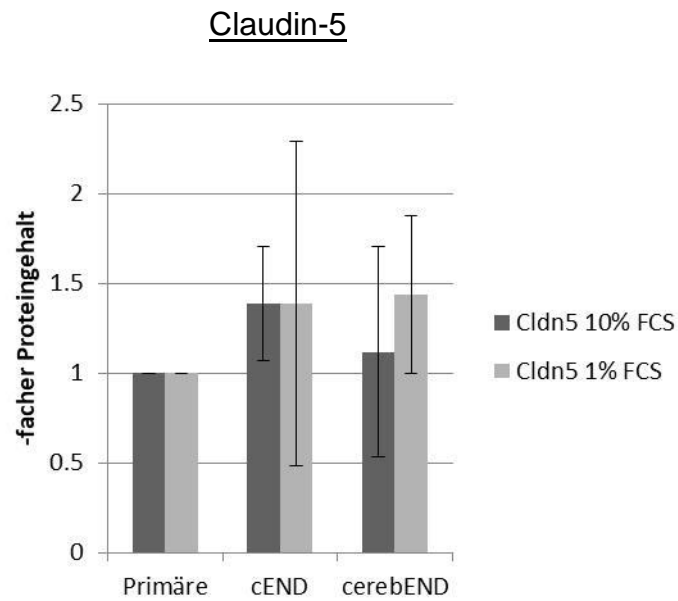


Abbildung 14: WB: Proteinexpression von Cldn5: Vergleich der Proteinexpression von Claudin-5 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

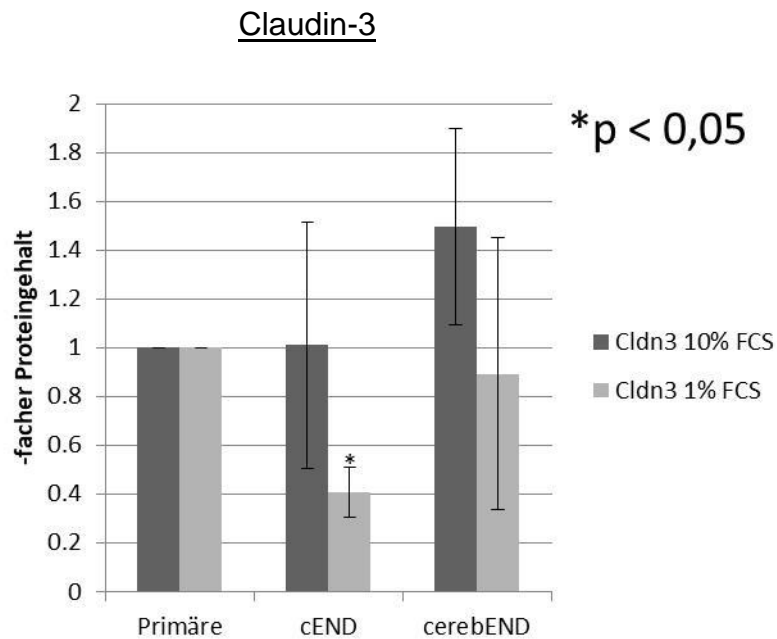


Abbildung 15: WB: Proteinexpression von Cldn3: Vergleich der Proteinexpression von Claudin-3 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND im Vergleich zu primären Zellen in 10% FCS Medium, jedoch verminderte Expression in 1% FCS Medium. Leicht verminderte Expression in cEND/cerebEND in 1% FCS im Vergleich zu 10% FCS Medium. Ähnliche Expression in cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien.

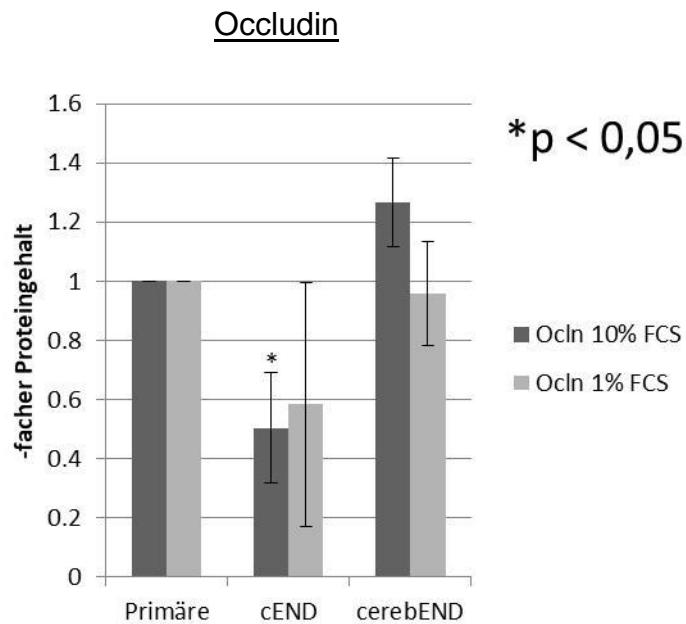


Abbildung 16: WB: Proteinexpression von Occln: Vergleich der Proteinexpression von Occludin sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

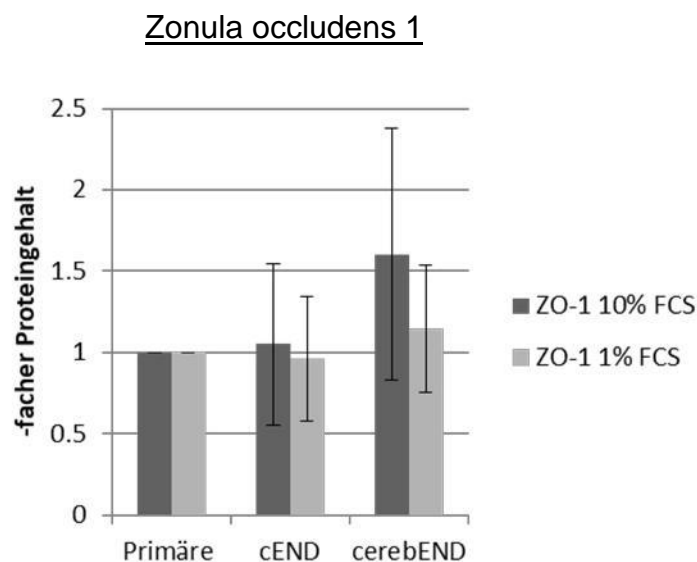


Abbildung 17: WB: Proteinexpression von ZO-1: Vergleich der Proteinexpression von Zonula occludens 1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in 1% FCS, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Leicht erhöhte Expression in cerebEND in 10% FCS Medium.

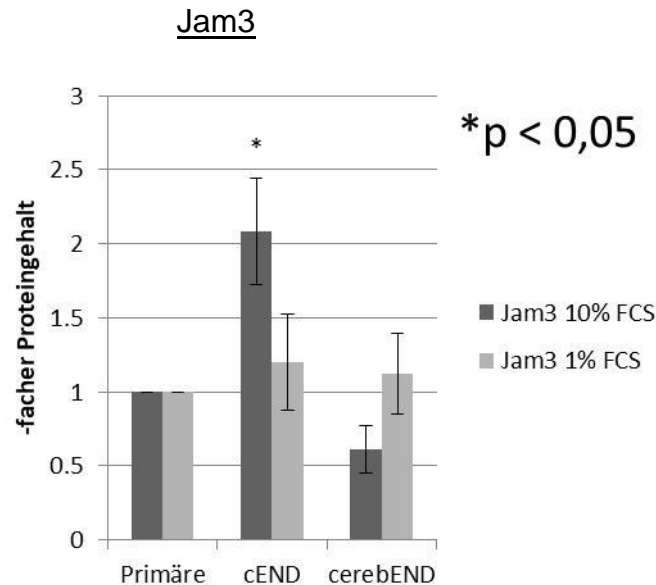


Abbildung 18: WB: Proteinexpression von Jam3: Vergleich der Proteinexpression von Jam3 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Erhöhte Expression in cEND in 10% FCS sowohl im Vergleich zu primären Zellen in 10% FCS Medium, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cEND in 1% FCS im Vergleich zu primären Zellen. Ähnliche Expression in cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien. Erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS im Vergleich zu 10% FCS.

Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Veränderung in der Proteinexpression der Tight Junctions durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen.

	cEND		cerebEND	
	10%	1%	10%	1%
Cldn3	101,00% (±50,23%)	40,67% (±10,21%)	149,67% (±40,15%)	89,33% (±55,79%)
Cldn5	138,67% (±31,53%)	138,33% (±90,40%)	111,67% (±58,45%)	143,67% (±43,66%)
Jam3	208,33% (±35,85%)	120,33% (±32,52%)	61,33% (±16,04%)	112,67% (±27,23%)
Ocln	50,33% (±18,61%)	58,33% (±41,24%)	126,67% (±14,84%)	95,67% (±17,50)
ZO-1	105,00% (±49,76%)	96,33% (±38,14%)	160,33% (±77,68%)	114,67% (±39,32%)

Tabelle 8: Prozentuale Veränderung in der Proteinexpression der Tight Junctions durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen: Ähnliche Expression in cEND bei *Cldn5*, *Ocln* und *ZO-1*. Niedrigere Expression in cEND/cerebEND durch Mediumreduktion bei *Cldn3*, in cEND bei *Jam3* und in cerebEND bei *Ocln* und *ZO-1*. Höhere Expression in cerebEND durch Mediumreduktion bei *Cldn5* und *Jam3*.

Die mRNA Expressionslevel von TJ und AJ in cerebEND sind vergleichbar mit denen der primären Zellen. Ausnahme bildet *ZO-1*, welches in 10% FCS etwas höher als in den primären Zellen exprimiert wird. Interessanterweise zeigt sich die stark erhöhte Transkriptionsrate von *Jam3* in 1% FCS auf Proteinebene nicht mehr.

Auch cEND zeigt bei der Expression der Markerproteine ähnliche Werte wie die primären Zellen. Allerdings gibt es auch einige Unterschiede. *Claudine* und *ZO-1* werden ähnlich stark exprimiert wie in den primären Zellen. Die Ausnahme bildet *Claudin3*, das in 1% FCS runterreguliert wird. *Jam3* wird in 10% FCS höher exprimiert als in primären Zellen.

Die erhöhten Expressionslevel von *Ocln*, welche auf mRNA-Ebene gefunden wurden, führen nicht zu einer Erhöhung der Expression auf Proteinebene.

Im Vergleich der beiden Nährmedien untereinander zeigen sich in cEND und cerebEND bei *Claudin-5*, *Occludin* und in cEND bei *ZO-1* nur geringe Unterschiede in der Expression. *Claudin-3* wird sowohl in cEND als auch in cerebEND in 1% FCS niedriger exprimiert als in 10% FCS Medium, *ZO-1* nur in cerebEND. *Jam3* wird in cEND in 10% höher exprimiert als in 1% FCS Medium, in cerebEND hingegen niedriger.

3.2. Expression der Effluxpumpen

3.2.1. mRNA Expression der Effluxpumpen

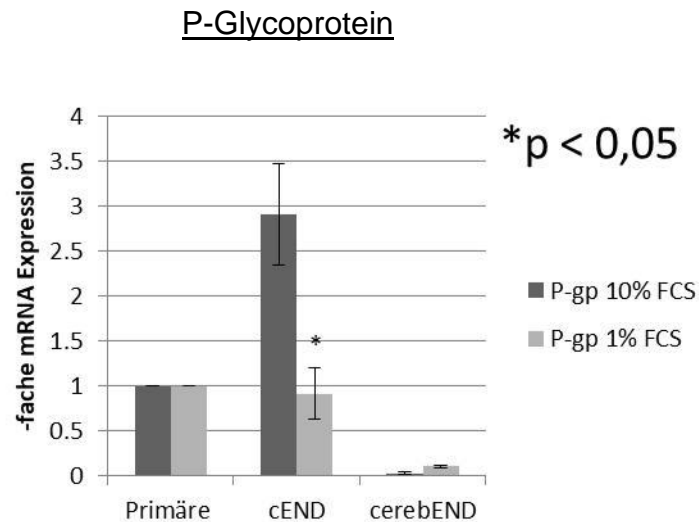


Abbildung 19: RT-PCR: mRNA Expression von P-gp: Vergleich der Expressionsraten des Gens von P-Glycoprotein sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Stark erhöhte Expression in cEND in 10% FCS sowohl im Vergleich zu primären Zellen in 10% FCS als auch im Vergleich der beiden Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cEND in 1% FCS im Vergleich zu primären Zellen. Verminderte Expression in cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Medien. Verminderte Expression in cerebEND in 10% FCS im Vergleich zu 1% FCS Medium.

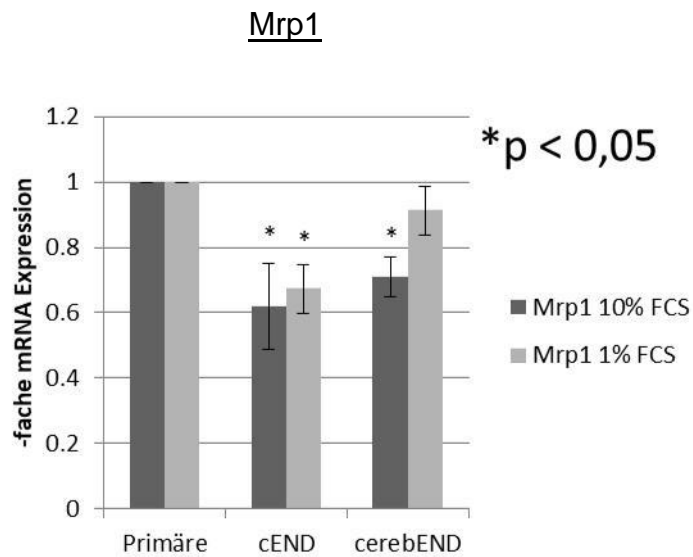


Abbildung 20: RT-PCR: mRNA Expression von Mrp1: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Mrp1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

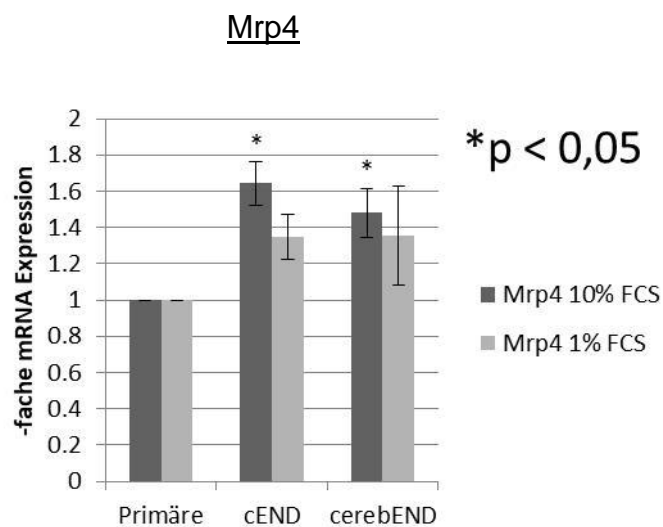


Abbildung 21: RT-PCR: mRNA Expression von Mrp4: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Mrp4 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Leicht erhöhte Expression in cEND in 10% FCS, jedoch ähnliche Expression in 1% FCS im Vergleich zu primären Zellen. Ähnliche Expression in cEND im Vergleich der Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

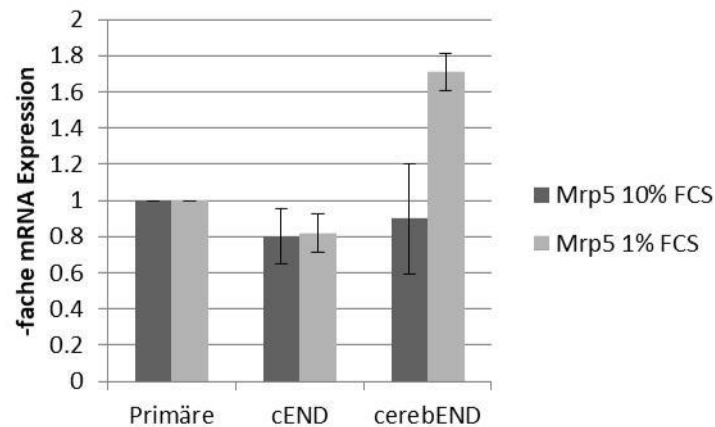
Mrp5

Abbildung 22: RT-PCR: mRNA Expression von Mrp5: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Mrp5 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Leicht erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS, jedoch ähnliche Expression in 10% FCS im Vergleich zu primären Zellen. Erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS im Vergleich zu cerebEND in 10% FCS Medium.

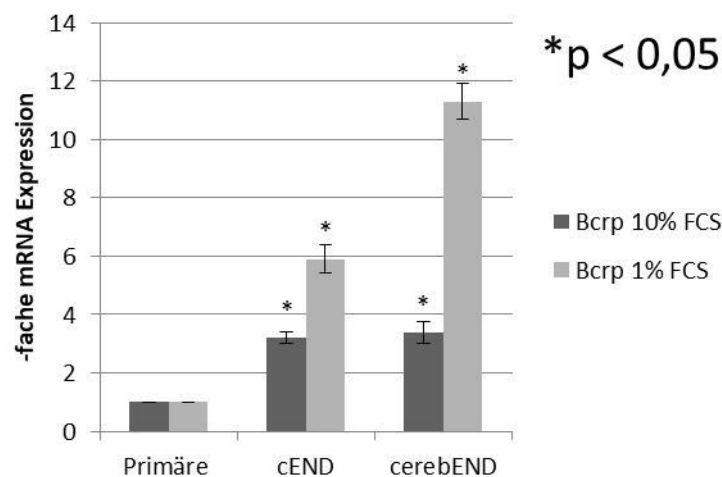
Bcrp

Abbildung 23: RT-PCR: mRNA Expression von Bcrp: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Bcrp sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Stark erhöhte Expression in cEND/cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien. Stark erhöhte Expression in cEND/cerebEND in 1% FCS im Vergleich zum 10% FCS Nährmedium.

Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der Effluxpumpen durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen.

	cEND		cerebEND	
	10%	1%	10%	1%
P-gp	290,67% ($\pm 56,19\%$)	91,67% ($\pm 28,22\%$)	3,00% ($\pm 1,73\%$)	10,67% ($\pm 1,53\%$)
Mrp1	62,00% ($\pm 13,08\%$)	67,33% ($\pm 7,51\%$)	71,00% ($\pm 6,24\%$)	91,33% ($\pm 7,51\%$)
Mrp4	164,33% ($\pm 11,93\%$)	135,00% ($\pm 12,29\%$)	148,00% ($\pm 13,75\%$)	135,67% ($\pm 27,53\%$)
Mrp5	80,00% ($\pm 15,13\%$)	82,00% ($\pm 10,44\%$)	90,00% ($\pm 30,51\%$)	171,00% ($\pm 10,44\%$)
Bcrp	321,33% ($\pm 20,82\%$)	589,67% ($\pm 48,64\%$)	338,67% ($\pm 38,30\%$)	1130,00% ($\pm 61,54\%$)

Tabelle 9: Prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der Effluxpumpen durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen: Ähnliche Expression in cEND/cerebEND bei *Mrp1* und *Mrp4* in beiden Nährmedien. Ähnliche Expression in cEND bei *Mrp5*. Verminderte Expression bei *P-gp* in cEND, jedoch ähnliche Expression in cerebEND durch Mediumreduktion. Erhöhte Expression in cEND/cerebEND bei *Bcrp* und in cerebEND bei *Mrp5* durch Mediumreduktion.

Bcrp zeigt eine deutliche Hochregulation in der Expression in cEND und cerebEND in beiden Medien gegenüber der Expression in primären Zellen. *P-gp* hingegen wird in cerebEND in beiden Medien stark herunter reguliert.

Die *Mrps* zeigen in beiden untersuchten Medien sowohl bei cEND als auch bei cerebEND ähnliche Expressionslevel wie die primären Zellen. Die beiden Ausnahmen bilden dabei *Mrp4*, das in cEND in 10% FCS, und *Mrp5*, das in cerebEND in 1% FCS Medium verstärkt exprimiert wird.

Die Effluxpumpen zeigen im Vergleich der Nährmedien untereinander einige Unterschiede. *Mrp1* und *Mrp4* werden in beiden Nährmedien ähnlich exprimiert, ebenso *Mrp5* in cEND und *P-gp* in cerebEND. *Bcrp* wird sowohl in cEND als auch in cerebEND in 1% FCS viel stärker exprimiert als in 10% FCS. *P-gp* zeigt in cEND in 10% FCS eine höhere Expression als in 1% FCS Medium. *Mrp5* wird in cerebEND in 1% FCS höher als in 10% FCS Nährmedium exprimiert.

3.2.2. Proteinexpression der Effluxpumpen

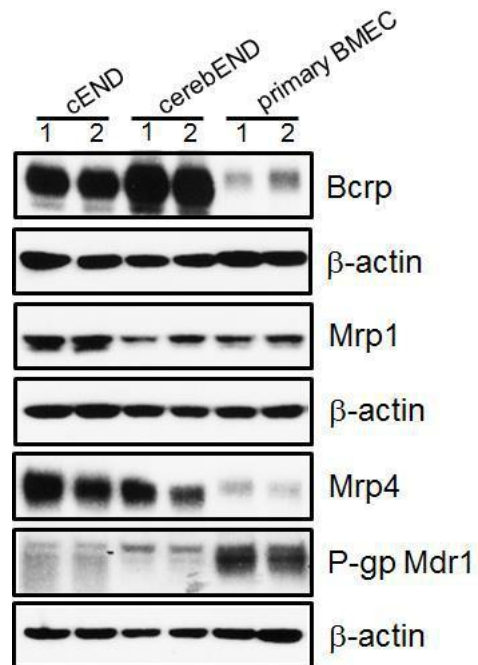


Abbildung 24: WB: Proteinexpression der Effluxpumpen: Vergleich der Expression der Effluxpumpen: Bcrp, Mrp1, Mrp4 und P-gp zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen sowohl in 10% (1) als auch in 1% FCS Medium (2).

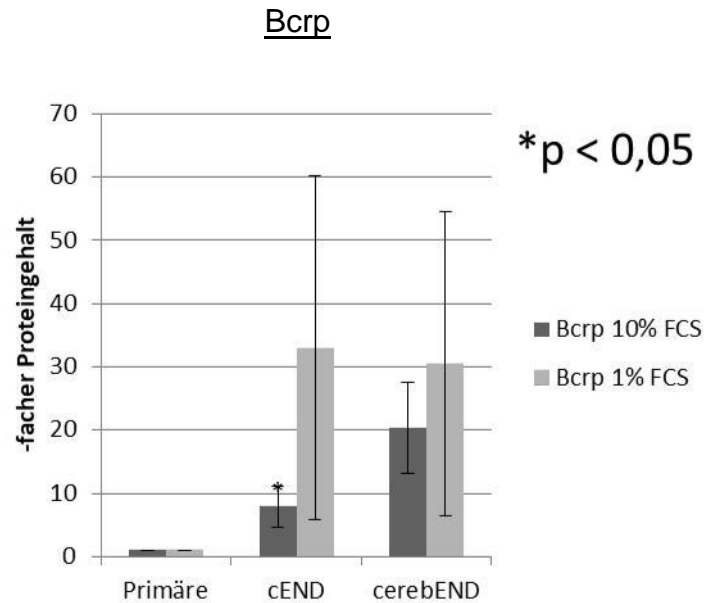


Abbildung 25: WB: Proteinexpression von Bcrp: Vergleich der Proteinexpression von Bcrp sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Stark erhöhte Expression in cEND/cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien. Stark erhöhte Expression in cEND/cerebEND in 1% FCS im Vergleich zum 10% FCS Nährmedium.

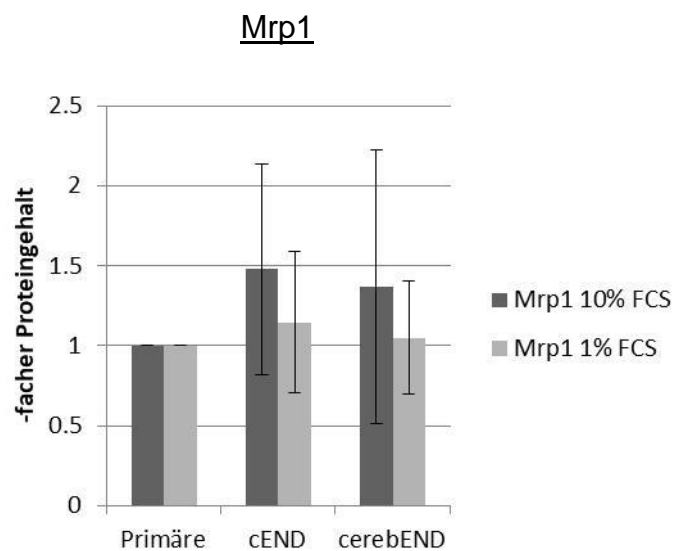


Abbildung 26: WB: Proteinexpression von Mrp1: Vergleich der Proteinexpression von Mrp1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

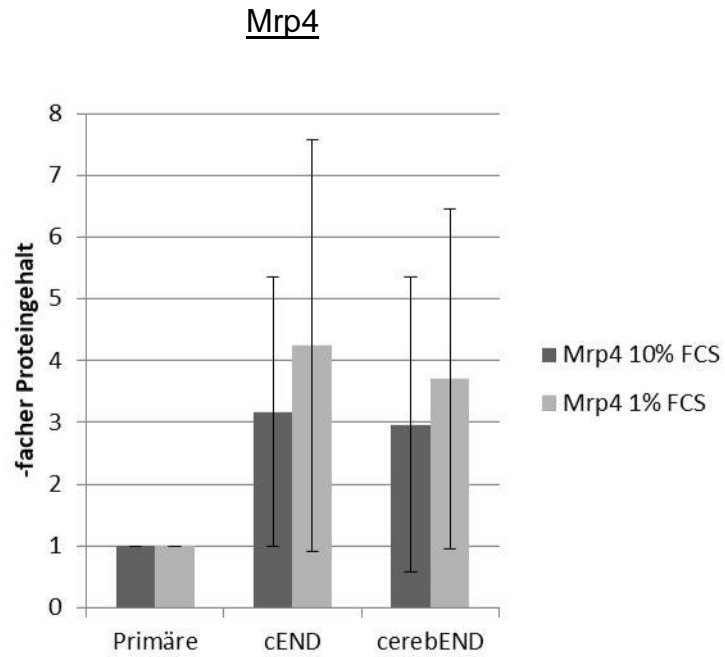


Abbildung 27: WB: Proteinexpression von Mrp4: Vergleich der Proteinexpression von Mrp4 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Stark erhöhte Expression in cEND/cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND in 1% FCS im Vergleich zum 10% FCS Nährmedium.

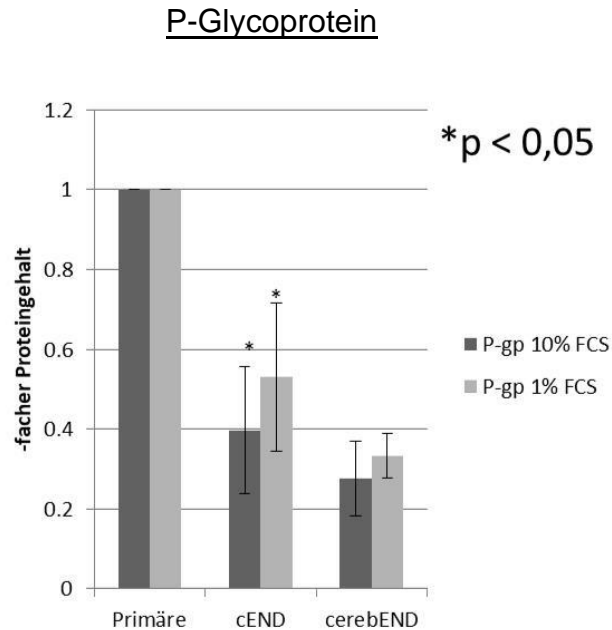


Abbildung 28: WB: Proteinexpression von P-gp: Vergleich der Proteinexpression von P-Glycoprotein sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Verminderte Expression in cEND in 10% FCS im Vergleich zu primären Zellen, jedoch ähnliche Expression in 1% FCS Nährmedium. Verminderte Expression in cerebEND im Vergleich zu primären Zellen. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND im Vergleich der Nährmedien untereinander.

Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Veränderung in der Proteinexpression der Effluxpumpen durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen.

	cEND		cerebEND	
	10%	1%	10%	1%
Bcrp	788,67% ($\pm 327,71\%$)	3296,67% ($\pm 2719,89\%$)	2044,67% ($\pm 719,12\%$)	3046,00% ($\pm 2404,15\%$)
Mrp1	147,67% ($\pm 66,15\%$)	114,67% ($\pm 44,30\%$)	137,00% ($\pm 85,51\%$)	105,00% ($\pm 35,51\%$)
Mrp4	317,00% ($\pm 218,26\%$)	424,67% ($\pm 333,24\%$)	296,67% ($\pm 239,20\%$)	370,67% ($\pm 275,35\%$)
P-gp	39,67% ($\pm 15,95\%$)	53,00% ($\pm 18,52\%$)	27,66% ($\pm 9,29\%$)	33,33% ($\pm 5,51\%$)

Tabelle 10: Prozentuale Veränderung in der Proteinexpression der Effluxpumpen durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen: Ähnliche Expression in cEND/cerebEND bei *P-gp* in beiden Nährmedien. Stark erhöhte Expression in cEND/cerebEND bei *Bcrp* und erhöhte Expression bei *Mrp4* durch Mediumreduktion. Verminderte Expression in cEND/cerebEND bei *Mrp1* in beiden Nährmedien.

Die Expression der Effluxpumpen ist auf Grund der hohen Standardabweichung in den Ergebnissen für cEND und cerebEND bis auf *P-gp* schwer zu interpretieren. Sie scheint in cEND und cerebEND bei *Bcrp* und *Mrp4* in beiden Nährmedien im Vergleich zu primären Zellen erhöht. *Bcrp* wird sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene hochreguliert, wohingegen *P-gp*, mit Ausnahme von cEND in 1% FCS auf Proteinebene, auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zu primären Zellen runterreguliert wird. Ansonsten zeigt nur *Mrp1* ähnliche Expressionslevel wie die primären Zellen in cEND und cerebEND.

Im Vergleich der beiden Nährmedien zeigen sich bis auf *P-gp* sowohl in cEND als auch in cerebEND einige Unterschiede. *Bcrp* und *Mrp4* werden sowohl in cEND als auch in cerebEND in 1% FCS höher exprimiert als in 10% FCS Medium, *Mrp1* hingegen niedriger.

3.3. Expression der Proteine der SLC-Familie

3.3.1. mRNA Expression der Proteine der SLC-Familie

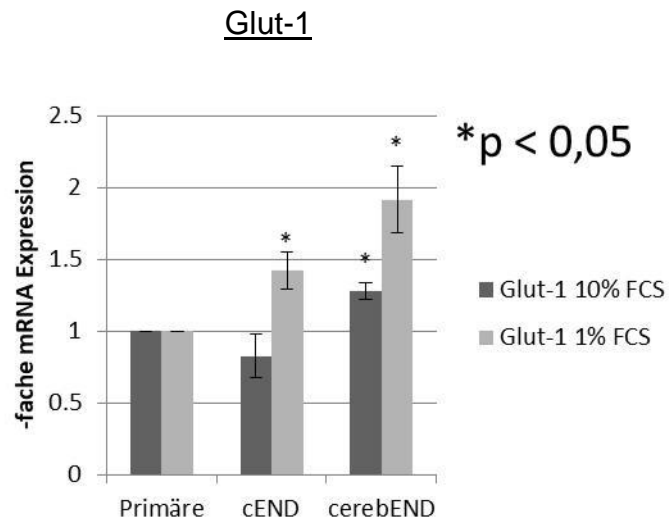


Abbildung 29: RT-PCR: mRNA Expression von Glut-1: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Glut-1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Medien. Ähnliche Expression in cerebEND in 10% FCS im Vergleich zu primären Zellen, jedoch erhöhte Expression in 1% FCS Medium. Leicht erhöhte Expression in cEND/cerebEND in 1% FCS im Vergleich zum 10% FCS Nährmedium.

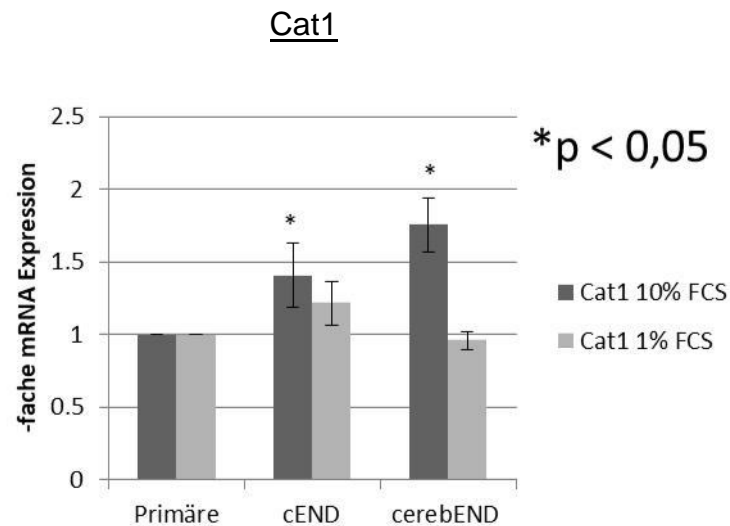


Abbildung 30: RT-PCR: mRNA Expression von Cat1: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Cat1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cerebEND in 1% FCS im Vergleich zu primären Zellen, jedoch erhöhte Expression in 10% FCS Medium. Leicht erhöhte Expression in cerebEND in 10% FCS im Vergleich zum 1% FCS Nährmedium.

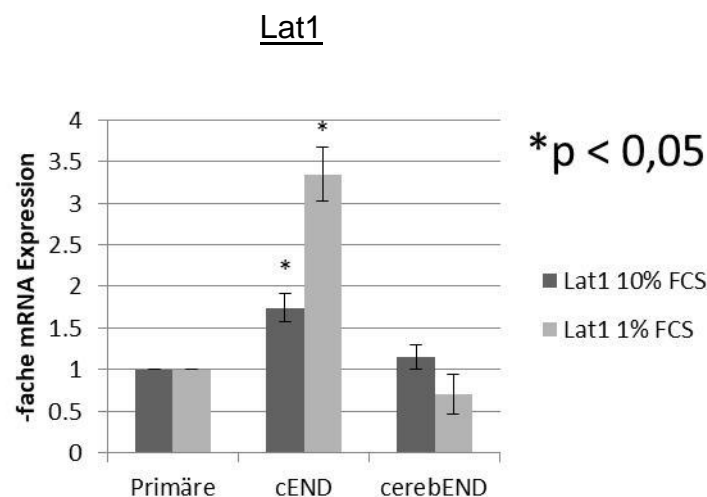


Abbildung 31: RT-PCR: mRNA Expression von Lat1: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Lat1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Erhöhte Expression in cEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Medien. Erhöhte Expression in cEND in 1% FCS im Vergleich zu cEND in 10% FCS Medium. Ähnliche Expression in cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

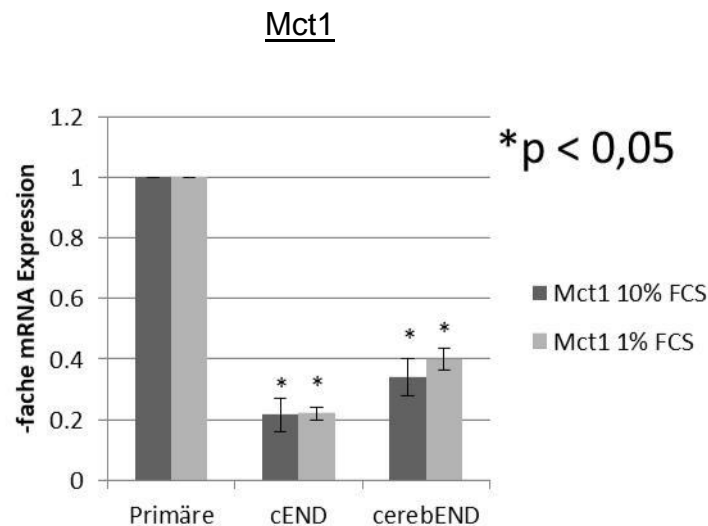


Abbildung 32: RT-PCR: mRNA Expression von Mct1: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Mct1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Verminderte Expression in cEND/cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Medien. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND im Vergleich der beiden Nährmedien untereinander.

Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der Proteine der SLC-Familie durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen.

	cEND		cerebEND	
	10%	1%	10%	1%
Glut-1	82,67% (±15,04%)	142,00% (±12,77%)	127,67% (±5,69%)	191,33% (±23,16%)
Cat1	140,67% (±22,23%)	121,33% (±14,84%)	175,33% (±18,72%)	95,67% (±5,77%)
Lat1	174,33% (±17,50%)	334,00% (±32,36%)	115,67% (±14,47%)	70,33% (±23,59%)
Mct1	21,67% (±5,51%)	22,00% (±2,00%)	34,00% (±6,24%)	40,00% (±3,46%)

Tabelle 11: Prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der Proteine der SLC-Familie durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen: Ähnliche Expression in cEND/cerebEND bei Mct1 und in cEND bei Cat1 in beiden Medien. Erhöhte Expression in cEND/cerebEND bei Glut-1 und in cEND bei Lat1 durch Mediumreduktion. Verminderte Expression in cerebEND bei Cat1 und Lat1 durch Mediumreduktion.

Die Expression von Glut-1 und Cat1 wird in dem untersuchten in-vitro Modellsystem allgemein ähnlich exprimiert wie in den primären Zellen. Die einzige Ausnahme bildet hierbei bei Glut-1 cerebEND in 1% FCS und bei Cat1

cerebEND in 10% FCS Medium, das höhere mRNA Expressionslevel als die primären Zellen zeigt.

Während die Expressionslevel von *Lat1* in cEND in beiden Nährmedien ansteigen, in 1% FCS noch deutlich stärker als in 10% FCS, wird *Lat1* bei cerebEND ähnlich stark wie in primären Zellen transkribiert.

Die Expression von *Mct1* wird in allen Versuchen im Vergleich zu primären Zellen herunterreguliert.

Im Vergleich der beiden Nährmedien untereinander zeigen sich bei *Mct1* in cEND/cerebEND und in *Cat1* in cEND nur geringe Unterschiede. Sowohl bei *Glut-1* in cEND/cerebEND als auch bei *Lat1* in cEND ist die mRNA-Expression in 1% FCS höher als in 10% FCS Medium, wohingegen bei *Cat1* und *Lat1* in cerebEND der umgekehrte Fall vorliegt.

3.3.2. Proteinexpression der Proteine der SLC-Familie

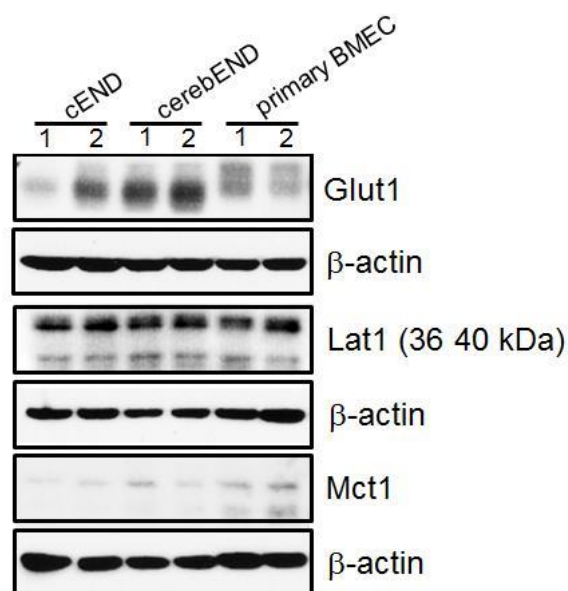


Abbildung 33: WB: Proteinexpression der Proteine der SLC-Familie: Vergleich der Expression der Proteine der SLC-Familie: Glut-1, Lat1 und Mct1 zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen sowohl in 10% FCS (1), als auch in 1% FCS Medium (2)

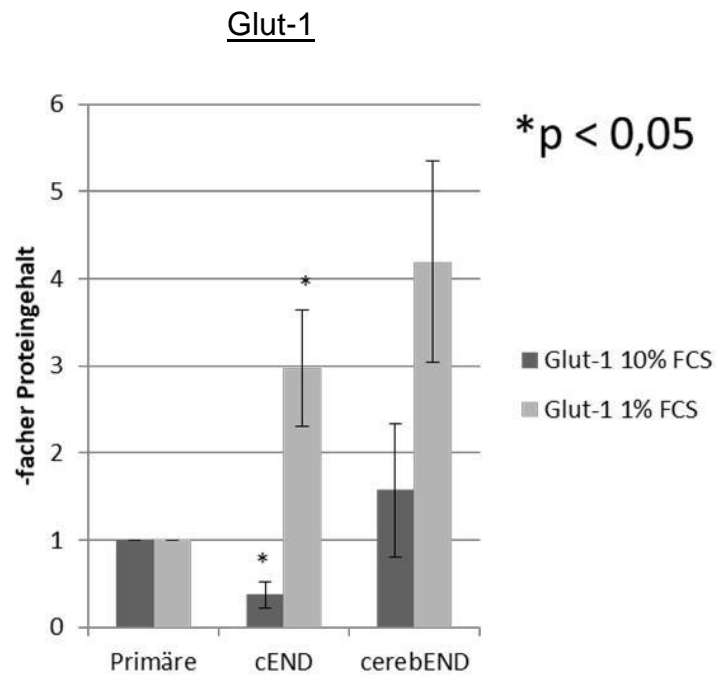


Abbildung 34: WB: Proteinexpression von Glut-1: Vergleich der Proteinexpression von Glut-1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Verminderte Expression in cEND in 10% FCS sowohl im Vergleich zu primären Zellen, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Erhöhte Expression in cEND in 1% FCS und in cerebEND in beiden Medien im Vergleich zu primären Zellen. Erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS im Vergleich zu 10% FCS Medium

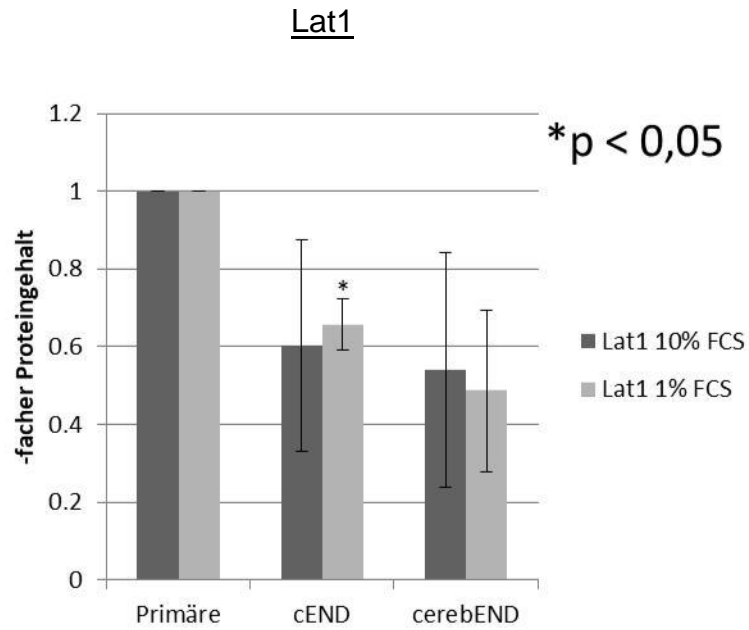


Abbildung 35: WB: Proteinexpression von Lat1: Vergleich der Proteinexpression von Lat1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

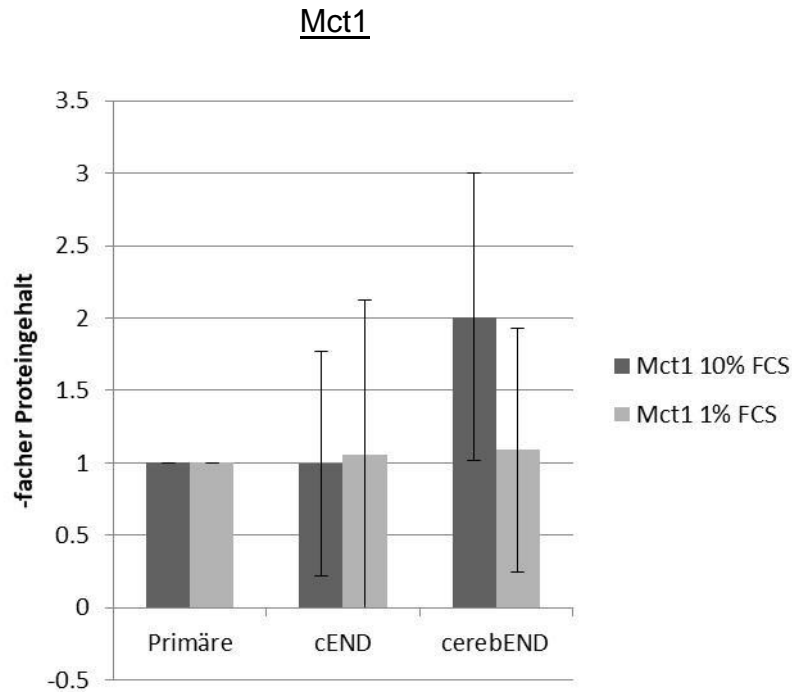


Abbildung 36: WB: Proteinexpression von Mct1: Vergleich der Proteinexpression von Mct1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Erhöhte Expression in cerebEND in 10% FCS sowohl im Vergleich zu primären Zellen als auch im Vergleich zum 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cerebEND in 1% FCS Medium im Vergleich zu primären Zellen.

Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Veränderung in der Expression der Proteine der SLC-Familie durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen.

	cEND		cerebEND	
	10%	1%	10%	1%
Glut-1	37,00% ($\pm 15,39\%$)	297,33% ($\pm 66,67\%$)	157,00% ($\pm 77,08\%$)	419,33% ($\pm 115,49\%$)
Lat1	60,33% ($\pm 27,15\%$)	65,67% ($\pm 6,67\%$)	54,00% ($\pm 30,27\%$)	48,67% ($\pm 20,82\%$)
Mct1	99,33% ($\pm 77,78\%$)	106,00% ($\pm 106,38\%$)	200,67% ($\pm 99,42\%$)	109,00% ($\pm 84,16\%$)

Tabelle 12: Prozentuale Veränderung in der Expression der Proteine der SLC-Familie durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen: Ähnliche Expression in cEND/cerebEND bei *Lat1* und in cEND bei *Mct1* in beiden Nährmedien. Stark erhöhte Expression in cEND/cerebEND bei *Glut-1* durch Mediumreduktion. Verminderte Expression in cerebEND bei *Mct1* in 1% FCS im Vergleich zu 10% FCS Medium.

Es bestehen keine Unterschiede in der Expression von *Lat1* in cEND/cerebEND in beiden Medien im Vergleich zu primären Zellen, ebenso auch bei *Mct1*, mit der Ausnahme in cerebEND in 10% FCS Medium, in dem die Expressionslevel hochreguliert werden. Somit zeigt sich die herunterregulierte mRNA-Expression auf Proteinebene nicht mehr. *Glut-1* wird allgemein höher exprimiert als in den primären Zellen, mit Ausnahme von cEND in 10% FCS Medium, wo die Expression vermindert ist. Die Ergebnisse der Proteine der SLC-Familie weisen zum Teil eine hohe Standardabweichung auf und sind nur bedingt aussagekräftig.

Lat1 zeigt in der Expression im Vergleich der beiden Nährmedien untereinander sowohl in cEND als auch in cerebEND ebenfalls keine Unterschiede. *Mct1* zeigt in diesem Vergleich in cEND keine Unterschiede, in cerebEND ist die Expression in 10% FCS höher als in 1% FCS Medium. *Glut-1* wird in cEND/cerebEND in 1% FCS höher exprimiert als in 10% FCS Nährmedium.

3.4. Expression zellulärer Rezeptoren

3.4.1. mRNA Expression zellulärer Rezeptoren

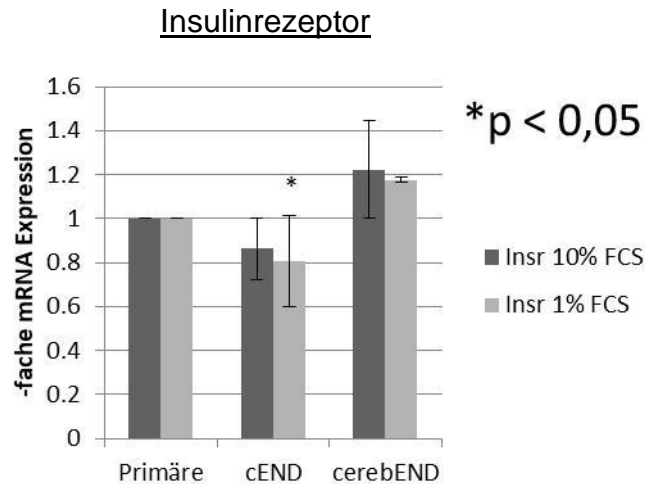


Abbildung 37: RT-PCR: mRNA Expression von Insr: Vergleich der Expressionsraten des Gens vom Insulinrezeptor sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

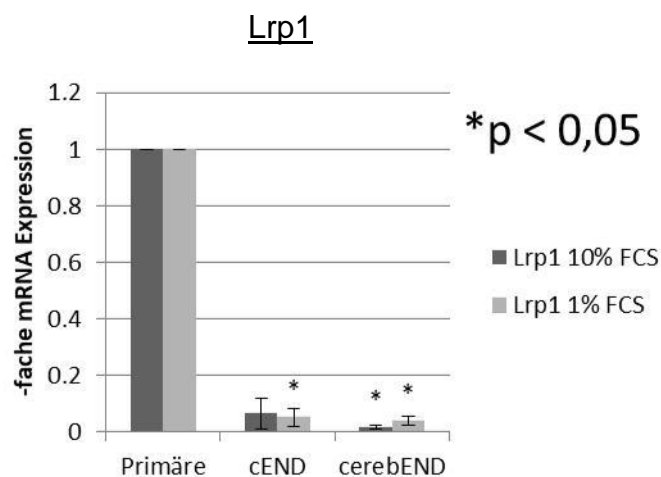


Abbildung 38: RT-PCR: mRNA Expression von Lrp1: Vergleich der Expressionsraten des Gens von Lrp1 sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Verminderte Expression in cEND/cerebEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien. Ähnliche Expression in cEND im Vergleich der Nährmedien untereinander. Verminderte Expression in cerebEND in 10% FCS im Vergleich zu cerebEND in 1% FCS Medium.

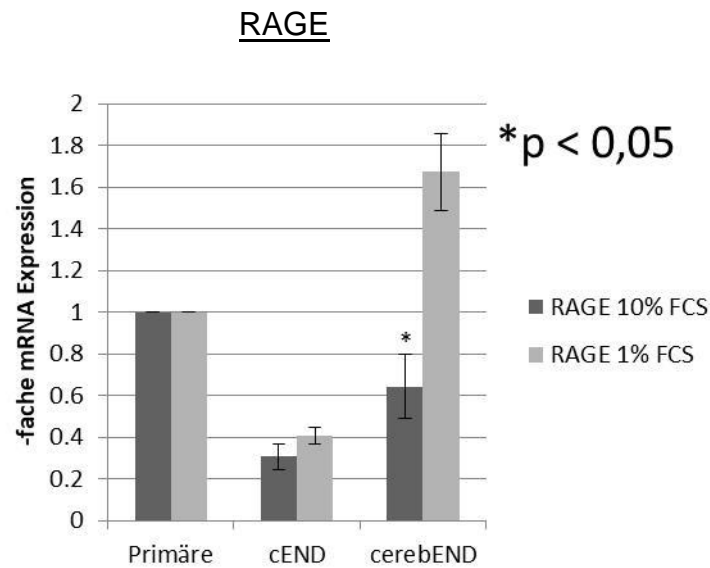


Abbildung 39: RT-PCR: mRNA Expression von RAGE: Vergleich der Expressionsraten des Gens von RAGE sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Verminderte Expression in cEND im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, jedoch ähnliche Expression im Vergleich der Nährmedien untereinander. Ähnliche Expression in cerebEND in 10% FCS Medium im Vergleich zu primären Zellen. Erhöhte Expression in cerebEND in 1% FCS sowohl im Vergleich zu primären Zellen als auch im Vergleich zu cerebEND in 10% FCS Medium.

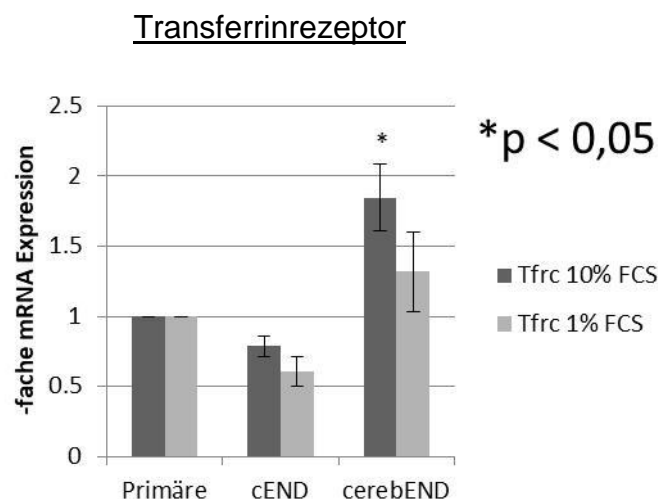


Abbildung 40: RT-PCR: mRNA Expression von Tfrc: Vergleich der Expressionsraten des Gens vom Transferrinrezeptor sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander. Erhöhte Expression in cerebEND in 10% FCS im Vergleich zu primären Zellen. Ähnliche Expression in cerebEND in 1% FCS sowohl im Vergleich zu primären Zellen, als auch im Vergleich zu cerebEND in 10% FCS Medium.

Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der zellulären Rezeptoren durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen.

	cEND		cerebEND	
	10%	1%	10%	1%
Insr	86,33% ($\pm 14,01\%$)	80,67% ($\pm 20,82\%$)	122,33% ($\pm 22,03\%$)	117,67% ($\pm 1,15\%$)
Lrp1	6,67% ($\pm 5,51\%$)	5,33% ($\pm 3,21\%$)	1,67% ($\pm 0,58\%$)	4,00% ($\pm 1,73\%$)
RAGE	30,67% ($\pm 6,11\%$)	40,67% ($\pm 4,04\%$)	64,33% ($\pm 15,18\%$)	167,33 ($\pm 18,58\%$)
Tfrc	78,67% ($\pm 7,37\%$)	61,00% ($\pm 10,44\%$)	184,33% ($\pm 23,71\%$)	132,67% ($\pm 28,74\%$)

Tabelle 13: Prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der zellulären Rezeptoren durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen: Ähnliche Expression in cEND/cerebEND bei *Insr* und *Lrp1* in beiden Medien. Ähnliche Expression in cEND bei *RAGE* und *Tfrc* in beiden Nährmedien. Erhöhte Expression in cerebEND bei *RAGE* und verminderte Expression bei *Tfrc* durch Mediumreduktion.

Alle Untersuchungen zeigen vergleichbare Level in der Expression von cEND und cerebEND im Vergleich zu primären Zellen für *Insulin-* und *Transferrinrezeptor*. Die einzige Ausnahme bildet cerebEND in 10% FCS Medium, da in diesem Fall die Expression vom *Transferrinrezeptor* erhöht ist.

Die Expression von *Lrp1* ist in cEND und cerebEND, von *RAGE* in cEND in beiden Nährmedien im Vergleich zu primären Zellen vermindert. Die mRNA-Expressionslevel von *RAGE* ähneln in cerebEND in 10% FCS denen in primären Zellen, wohingegen sie in 1% FCS Medium im Vergleich zu dem Expressionslevel in primären Zellen ansteigen.

Der Vergleich der Nährmedien untereinander zeigt bis auf zwei Ausnahmen keine Unterschiede. Dabei ist die Expression von *RAGE* in cerebEND in 1% FCS höher als in 10% FCS Medium, die Expression von *Tfrc* hingegen niedriger.

3.4.2. Proteinexpression zellulärer Rezeptoren

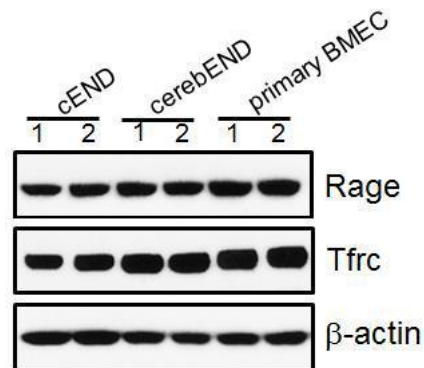


Abbildung 41: WB: Proteinexpression zellulärer Rezeptoren: Vergleich der Expression der zellulären Rezeptoren: RAGE und Tfrc zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen sowohl in 10% FCS (1), als auch in 1% FCS Medium (2).

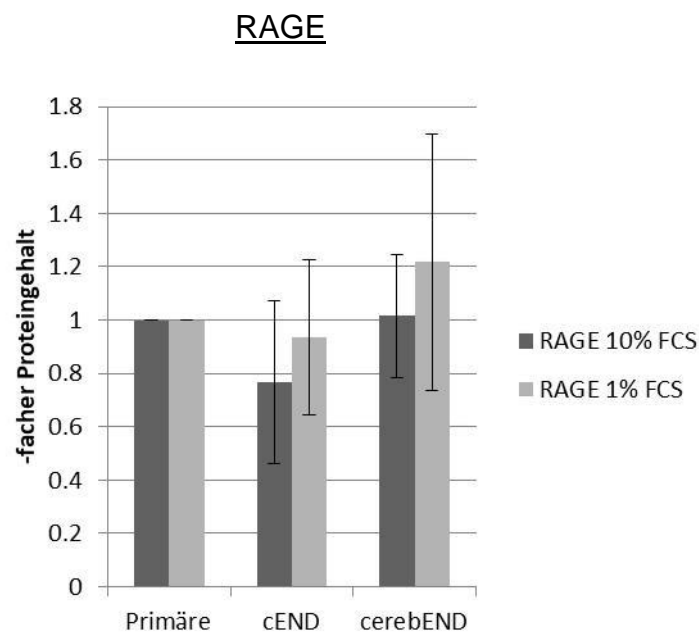


Abbildung 42: WB: Proteinexpression von RAGE: Vergleich der Proteinexpression von RAGE sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

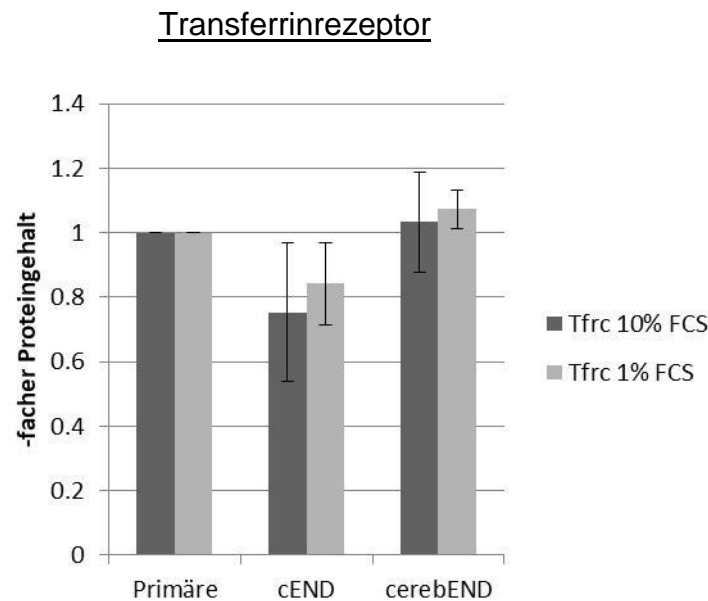


Abbildung 43: WB: Proteinexpression von Tfrc: Vergleich der Proteinexpression vom Transferrinrezeptor sowohl zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, als auch zwischen cEND/cerebEND in 10% FCS und 1% FCS Nährmedium. Ähnliche Expression in cEND/cerebEND sowohl im Vergleich zu primären Zellen in beiden Nährmedien, als auch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Veränderung in der Proteinexpression der zellulären Rezeptoren durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen.

	cEND		cerebEND	
	10%	1%	10%	1%
RAGE	76,67% ($\pm 30,55\%$)	93,67% ($\pm 29,14\%$)	101,67% ($\pm 23,07\%$)	121,67% ($\pm 48,21\%$)
Tfrc	75,33% ($\pm 21,46\%$)	84,33% ($\pm 12,74\%$)	103,33% ($\pm 15,53\%$)	107,33% ($\pm 6,03\%$)

Tabelle 14: Prozentuale Veränderung in der Proteinexpression der zellulären Rezeptoren durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS in Bezug auf primäre Zellen: Ähnliche Expression in cEND/cerebEND bei *RAGE* und *Tfrc* in beiden Nährmedien.

Es wurden keine Unterschiede in der Expression von *RAGE* und *Transferrinrezeptor* weder zwischen cEND und primären Zellen noch zwischen cerebEND und primären Zellen gefunden. Auch bei Mediumreduktion auf 1% FCS wurden keine Unterschiede in der Proteinexpression gefunden, weder im Vergleich zu primären Zellen noch im Vergleich der Nährmedien untereinander.

4. DISKUSSION

Das Ziel der Doktorarbeit war der Vergleich der mRNA Expressions- und Proteinlevel verschiedener Tight Junction-Proteine, Adherens Junctions, Effluxpumpen, Proteine der SLC-Familie und zellulärer Rezeptoren der BHS zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen sowohl in 10% FCS als auch in 1% FCS Nährmedium. Es sollte ermittelt werden, ob durch die Immortalisierung der Hirnendothelzellen eine Veränderung in der Expression der Proteine herbeigeführt wird und ob es Unterschiede in der Expression bezüglich der Mediumkonzentration gibt.

In den folgenden Tabellen werden die Ergebnisse zusammengefasst und verglichen.

4.1. Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene zwischen cEND und primären Zellen

Markerproteine in cEND	ähnliche Expressionslevel		höhere Expressionslevel		geringere Expressionslevel	
	mRNA	Proteine	mRNA	Proteine	mRNA	Proteine
Tight Junctions und Adherens Junction in 10% FCS	Cdh5, Cldn5, Cldn12, Jam1- 3, ZO-1	Cldn3, Cldn5, Ocln, ZO-1	Ocln	Jam3		
mRNA: Cdh5, Cldn5, Cldn12, Jam1-3, Ocln, ZO-1						
Proteine: Cldn3, Cldn5, Jam3, Ocln, ZO-1						
Tight Junctions und Adherens Junction in 1% FCS	Cdh5, Cldn5, Cldn12, Jam1- 3, ZO-1	Cldn5, Jam3, Ocln, ZO-1	Ocln			Cldn3
mRNA: Cdh5, Cldn5, Cldn12, Jam1-3, Ocln, ZO-1						
Proteine: Cldn3, Cldn5, Jam3, Ocln, ZO-1						
Effluxpumpen in 10% FCS	Mrp1, Mrp5	Mrp1	Bcrp, Mrp4, P-gp	Bcrp, Mrp4		P-gp
mRNA: Bcrp, Mrp1+4+5, P-gp						
Proteine: Bcrp, Mrp1+4, P-gp						
Effluxpumpen in 1% FCS	Mrp1, Mrp4, Mrp5,	Mrp1, P-gp	Bcrp	Bcrp, Mrp4		
mRNA: Bcrp,						

Mrp1+4+5, P-gp	P-gp					
Proteine: Bcrp, Mrp1+4, P-gp						
Proteine der SLC-Familie in 10% FCS	Glut-1, Cat1	Lat1, Mct1	Lat1		Mct1	Glut-1
mRNA: Cat1, Glut-1, Lat1, Mct1						
Proteine: Glut-1, Lat1, Mct1						
Proteine der SLC-Familie in 1% FCS	Glut-1, Cat1	Lat1, Mct1	Lat1	Glut-1	Mct1	
mRNA: Cat1, Glut-1, Lat1, Mct1						
Proteine: Glut-1, Lat1, Mct1						
Zelluläre Rezeptoren in 10% FCS	Insr, Tfrc	RAGE, Tfrc			Lrp1, RAGE	
mRNA: Insr, Lrp1, RAGE, Tfrc						
Proteine: RAGE, Tfrc						
Zelluläre Rezeptoren in 1% FCS	Insr, Tfrc	RAGE, Tfrc			Lrp1, RAGE	
mRNA: Insr, Lrp1, RAGE, Tfrc						
mRNA: RAGE, Tfrc						

Tabelle 15: Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene zwischen cEND und primären Zellen

Es zeigt sich eine hohe Übereinstimmung der mRNA Expressionslevel und der Proteinlevel von cEND mit den primären Zellen. Die höchsten Übereinstimmungen zeigen sich bei den Tight Junction Proteinen auf mRNA Ebene bei *Cdh5*, *Cldn5*, *Cldn12*, *Jam1-3* und *ZO-1* in beiden Nährmedien im Vergleich zu primären Zellen. Einzige Ausnahme bildet *Ocln*, das in beiden Medien auf mRNA Ebene im Vergleich zu primären Zellen hochreguliert wird. Auf Proteinebene zeigen *Cldn3*, *Cldn5*, *Ocln* und *ZO-1* ähnliche Expressionslevel in cEND in 10% FCS Medium wie die primären Zellen. Einzige Ausnahme bildet hierbei *Jam3*, dessen Expression hochreguliert wird. Mediumreduktion ändert an der Proteinexpression der Tight Junction Proteine wenig. *Cldn5*, *Jam3*, *Ocln* und *ZO-1* werden ähnlich wie in den primären Zellen exprimiert. Nur *Cldn3* wird vermindert exprimiert. Das Adherens Junction Protein: VE-Cadherin zeigt ebenfalls ähnliche mRNA Expressionslevel wie die primären Zellen in beiden Medien. Es wird deutlich, dass das untersuchte *in-vitro* Modellsystem cEND sehr gut zur Untersuchung der Barrierefunktion der BHS geeignet zu sein scheint.

Weiterhin zeigen sich viele Übereinstimmungen in der Expression der zellulären Rezeptoren in beiden Nährmedien sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene. *Insr* und *Tfrc* werden in beiden Nährmedien auf mRNA Ebene ähnlich stark exprimiert wie die primären Zellen. *Lrp1* und *RAGE* hingegen werden in der mRNA Expression herunter reguliert. Auf Proteinebene zeigen sich bei *Tfrc* und *RAGE* keine Unterschiede in der Expression im Vergleich zu primären Zellen. Mediumreduktion bewirkt keine Änderung in der Proteinexpression. cEND scheint ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung von zellulären Rezeptoren zu sein.

Mrp1 und *Mrp5* werden in 10% FCS auf mRNA Ebene ähnlich hoch exprimiert wie die primären Zellen. Mediumreduktion bringt Vorteile dahingehend, dass zusätzlich zu *Mrp1* und *Mrp5* auch *Mrp4* und *P-gp* eine ähnliche Expressionsrate im Vergleich zu primären Zellen zeigen. *Mrp4* und *P-gp* werden in cEND in 10% FCS in ihrer Expression hoch reguliert. *Bcrp* wird in beiden Nährmedien im Vergleich zu primären Zellen in der mRNA Expression

hoch reguliert. Auf Proteinebene zeigt sich eine Hochregulation in beiden Nährmedien für *Bcrp* und *Mrp4* im Vergleich zu primären Zellen. *Mrp1* wird in beiden Medien ähnlich wie in den primären Zellen exprimiert, *P-gp* nur in 1% FCS. In 10% FCS wird die Proteinexpression von *P-gp* herunter reguliert. Die Effluxpumpen *Mrp1*, *Mrp4* und *Mrp5* scheinen sich somit gut mit cEND in beiden Medien untersuchen zu lassen, *P-gp* nur in 1% FCS Medium. *P-gp* in 10% FCS und *Bcrp* in beiden Nährmedien kann man zur Untersuchung bei bestimmten Indikationen verwenden, z.B. wie sich eine verminderte Expression von *P-gp* bzw. eine erhöhte Expression von *Bcrp* bei Patienten auf die intrazerebrale Medikamentenkonzentration auswirkt.

Die größten Unterschiede in der Expression im Vergleich zu primären Zellen zeigen sich in cEND für die Proteine der SLC-Familie. Die mRNA Expression von *Glut-1* und *Cat1* stimmt in beiden Medien mit der mRNA Expression in primären Zellen überein. *Mct1* wird in beiden Medien herunter reguliert, *Lat1* hingegen hochreguliert. Im Gegensatz dazu zeigen auf Proteinebene *Lat1* und *Mct1* in beiden Nährmedien ähnliche Expressionslevel wie die primären Zellen, wohingegen *Glut-1* in 10% FCS herunter und in 1% FCS hoch reguliert wird. Die Ergebnisse für die Proteinlevel sind nur bedingt aussagekräftig, da sich eine hohe Standardabweichung zeigt.

4.2. Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene zwischen cerebEND und primären Zellen

Markerproteine in cerebEND	ähnliche Expressionslevel		höhere Expressionslevel		geringere Expressionslevel	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Tight Junctions und Adherens Junction in 10% FCS	Cldn12, Jam1-3, Ocln, ZO-1	Cldn3, Cldn5, Jam3, Ocln	Cldn5, Cdh5	ZO-1		
mRNA: Cdh5, Cldn5, Cldn12, Jam1-3, Ocln, ZO-1						
Proteine: Cldn3, Cldn5, Jam3, Ocln, ZO-1						
Tight Junctions und Adherens Junction in 1% FCS	Jam2, ZO-1	Cldn3, Cldn5, Jam3, ZO-1, Ocln	Cdh5, Cldn5, Cldn12, Jam1, Jam3, Ocln			
mRNA: Cdh5, Cldn5, Cldn12, Jam1-3, Ocln, ZO-1						
Proteine: Cldn3, Cldn5, Jam3, Ocln, ZO-1						
Effluxpumpen in 10% FCS	Mrp1, Mrp4, Mrp5	Mrp1	Bcrp	Bcrp, Mrp4	P-gp	P-gp
mRNA: Bcrp, Mrp1+4+5, P-gp						
Proteine: Bcrp, Mrp1+4, P-gp						
Effluxpumpen in 1% FCS	Mrp1, Mrp4	Mrp1	Bcrp, Mrp5	Bcrp, Mrp4	P-gp	P-gp
mRNA: Bcrp,						

Mrp1+4+5, P-gp						
Proteine: Bcrp, Mrp1+4, P-gp						
Proteine der SLC-Familie in 10% FCS	Glut-1, Lat1	Lat1	Cat1	Glut-1, Mct1	Mct1	
mRNA: Cat1, Glut-1, Lat1, Mct1						
Proteine: Glut-1, Lat1, Mct1						
Proteine der SLC-Familie in 1% FCS	Cat1, Lat1	Lat1, Mct1	Glut-1	Glut-1	Mct1	
mRNA: Cat1, Glut-1, Lat1, Mct1						
Proteine: Glut-1, Lat1, Mct1						
Zelluläre Rezeptoren in 10% FCS	Insr, RAGE	Tfrc, RAGE	Tfrc		Lrp1	
mRNA: Insr, Lrp1, RAGE, Tfrc						
Proteine: RAGE, Tfrc						
Zelluläre Rezeptoren in 1% FCS	Insr, Tfrc	Tfrc, RAGE	RAGE		Lrp1	
mRNA: Insr, Lrp1, RAGE, Tfrc						
Proteine: RAGE, Tfrc						

Tabelle 16: Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene zwischen cerebEND und primären Zellen

Im Gegensatz zum cEND Modellsystem zeigen sich im cerebEND Modellsystem größere Unterschiede in der mRNA und Proteinexpression im Vergleich zu primären Zellen bei den Tight Junction Proteinen *Chd5*, *Cldn5*, *Cldn12*, *Jam1* und den Effluxpumpen bei *P-gp*, vor allem durch Mediumreduktion. Es muss jedoch hervorgehoben werden, dass die primären Zellen aus dem Großhirn isoliert wurden und sich die Expressionsraten der Markerproteine regional unterscheiden können. Bei dem Vergleich zwischen den mRNA und Proteinexpressionsraten von cerebEND und den primären Zellen wurde diese Tatsache bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die mRNA Expressionslevel zeigen in 10% FCS bei *Cldn12*, *Jam1-3*, *Ocln* und *ZO-1* ähnliche Werte wie die primären Zellen, in 1% FCS nur noch *Jam2* und *ZO-1*. *Cldn5* und *Cdh5* werden in 10% FCS und *Cdh5*, *Cldn5*, *Cldn12*, *Jam1*, *Jam3* und *Ocln* in 1% FCS Medium hochreguliert. Auf Proteinebene hingegen normalisieren sich die Expressionslevel im Vergleich zu primären Zellen wieder. Dabei zeigen in 1% FCS alle untersuchten Proteine, also *Cldn3*, *Cldn5*, *Jam3*, *ZO-1* und *Ocln* ähnliche Expressionsraten wie die primären Zellen. In 10% FCS bildet *ZO-1* die einzige Ausnahme, in dem die Expression im Vergleich zu primären Zellen ansteigt. *Cldn3*, *Cldn5*, *Jam3* und *Ocln* zeigen ähnliche Expressionsraten wie die primären Zellen. Trotz mehr Abweichungen im Vergleich zu primären Zellen und im Vergleich zu cEND scheint auch cerebEND ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Barrierefunktion der BHS zu sein.

Der *Insr* zeigt keine Unterschiede in der mRNA Expression im Vergleich zu primären Zellen in beiden Medien. Auch *RAGE* und *Tfrc* scheinen sich sehr verlässlich mit dem Modellsystem cerebEND untersuchen zu lassen. Es zeigen sich keine Unterschiede sowohl in der mRNA, als auch in der Proteinexpression. Die einzige Ausnahme bildet die mRNA Expression bei *RAGE* in 1% FCS, wobei die Expression im Vergleich zu primären Zellen ansteigt und bei *Tfrc* in 10% FCS, wobei die Expression ebenfalls ansteigt. *Lrp1* wird auf mRNA Ebene in beiden Medien herunter reguliert. CerebEND scheint zur Untersuchung von zellulären Rezeptoren gut geeignet zu sein. Durch eine

geringe Standardabweichung bei der Untersuchung der zellulären Rezeptoren, lässt sich ein aussagekräftiger Vergleich der Proteinexpressionslevel von zellulären Rezeptoren in cerebEND und in primären Zellen machen.

Die Effluxpumpen zeigen Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Markerproteine. Während die *Mrps* *Mrp1*, *Mrp4* und *Mrp5* hohe Übereinstimmungen in der mRNA und Proteinexpression in beiden Medien im Vergleich zu primären Zellen zeigen und somit gut zur Untersuchung mit cerebEND geeignet zu sein scheinen, kommt es bei *Bcrp* und *P-gp* zu großen Abweichungen. In beiden Nährmedien zeigen *Mrp1*, *Mrp4* und *Mrp5* auf mRNA Ebene ähnliche Expressionsraten wie die primären Zellen. Einzige Ausnahme bildet *Mrp5* in 1% FCS Medium, in dem es hoch reguliert wird. Auf Proteinebene wird *Mrp1* in beiden Medien ähnlich exprimiert wie in den primären Zellen, *Mrp4* hingegen wird in der Expression hoch reguliert. *Bcrp* wird sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene, in beiden Nährmedien im Vergleich zu primären Zellen stark hoch reguliert, *P-gp* hingegen herunter reguliert. Die Abweichungen in der Expression von *Bcrp* und *P-gp* lassen sich für die Untersuchung in einigen Fragestellungen nutzen, z.B. bei genetisch bedingter Hoch- bzw. Runterregulation dieser Proteine in einigen Patientengruppen.

Lat1 zeigt hohe Übereinstimmungen in der mRNA und Proteinexpression in beiden Nährmedien im Vergleich zu primären Zellen und scheint sich sehr gut mit dem *in-vitro* Modellsystem untersuchen zu lassen. *Glut-1* wird in seiner mRNA und Proteinexpression in beiden Medien hoch reguliert, *Mct1* hingegen herunter reguliert. Einzige Ausnahme bildet die mRNA Expression in 10% FCS bei *Glut-1*, die sich ähnlich hoch wie in primären Zellen zeigt und die Proteinexpression in 1% FCS Medium bei *Mct1*, die sich ebenfalls ähnlich hoch wie in primären Zellen darstellt. Die mRNA Expression bei *Cat1* ist in 1% FCS Medium ähnlich wie in den primären Zellen, während sie in 10% FCS erhöht wird. cerebEND scheint für die Untersuchung von einzelnen Proteinen der SLC-Familie gut geeignet, z.B. *Lrp1*, während es für andere Proteine weniger geeignet, bzw. nur für bestimmte Fragestellungen geeignet zu sein scheint, z.B.

Glut-1 und *Mct1*. Eindeutige Aussagen lassen sich jedoch wegen möglicher Expressionsunterschiede zwischen Groß- und Kleinhirn nicht treffen.

4.3. Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene in cEND zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium

Marker- proteine in cEND	ähnliche Expressionslevel		höhere Expressions- level in 10% FCS Medium		höhere Expressions- level in 1% FCS Medium	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Tight Junctions und Adherens Junction	Cdh5, Jam1, Jam3, Ocln, ZO-1	Cldn5, Ocln, ZO-1		Cldn3, Jam3	Cldn5, Cldn12 Jam2	
Efflux- pumpen	Mrp1, Mrp4, Mrp5	Mrp1, Mrp4, P-gp	P-gp		Bcrp	Bcrp
Proteine der SLC- Familie	Cat1, Mct1	Lat1, Mct1			Glut-1, Lat1	Glut-1
Zelluläre Rezeptoren	Insr, Tfr, Lrp1, RAGE	Tfr, RAGE				

Tabelle 17: Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene in cEND zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium

Die Auswertung der Untersuchung, ob sich ein Unterschied in der Expression der Markerproteine durch Mediumreduktion ergibt, zeigt ebenfalls Unterschiede bezüglich der verschiedenen Proteinklassen.

Während sich eine Mediumreduktion bei den zellulären Rezeptoren nicht bemerkbar zu machen scheint, führt sie bei Effluxpumpen und Proteinen der

SLC-Familie zu höheren Expressionsraten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene.

4.4. Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene in cerebEND zwischen 10% FCS und 1% FCS

Nährmedium

Markerproteine in cerebEND	ähnliche Expressionslevel		höhere Expressionslevel in 10% FCS Medium		höhere Expressionslevel in 1% FCS Medium	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Tight Junctions und Adherens Junction	Cldn12	Cldn5, Ocln, ZO-1		Cldn3	Cdh5, Cldn5, Jam1-3, Ocln, ZO-1	Jam3
Effluxpumpen	Mrp1, Mrp4	Mrp1, Mrp4, P-gp			Bcrp, Mrp5, P-gp	Bcrp
Proteine der SLC-Familie	Lat1, Mct1	Lat1	Cat1	Mct1	Glut-1	Glut-1
Zelluläre Rezeptoren	Insr, Tfrc	Tfrc, RAGE			RAGE, Lrp1	

Tabelle 18: Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene in cerebEND zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium

Die untersuchten Markerproteine scheinen in cerebEND viel sensibler auf eine Mediumreduktion anzusprechen als in cEND. Hierbei erhöhen sich vor allem bei den Tight Junction Proteinen die Expressionsraten auf mRNA-Ebene, wohingegen auf Proteinebene, bis auf *Cldn3* und *Jam3*, keine Unterschiede erkennbar werden. Die zellulären Rezeptoren zeigen auch bei cerebEND auf Proteinebene keine Unterschiede bedingt durch Mediumreduktion.

4.5. Bewertung der Ergebnisse

cEND und cerebEND zeigen sich als sehr verlässliche Modellsysteme der Blut-Hirn-Schranke für die Untersuchung der Expression von TJs und somit der Barrierefunktion der Hirnendothelzellen. Die Proteinlevel stimmen mit denen der primären Zellen überein. Auch die stark erhöhte Transkriptionsrate von *Jam3* in cerebEND in 1% FCS zeigt sich auf Proteinebene nicht mehr. cEND liefert bei der Proteinexpression der TJ Markerproteine sehr gute Ergebnisse im Vergleich zu primären Zellen.

Die untersuchten *in-vitro* Modellsysteme eignen sich zur Untersuchung der *Mrp* Effluxpumpen. Diese zeigen in beiden untersuchten Medien sowohl bei cEND als auch bei cerebEND, mit wenigen Ausnahmen, ähnliche Expressionslevel auf mRNA- und Proteinebene wie die primären Zellen. Untersuchungen der anderen Effluxpumpen gestalten sich schwieriger, weil die Expressionsraten zum Teil erheblich runter- oder hochreguliert werden.

Die Proteine der SLC-Familie zeigen die stärksten Abweichungen in den Expressionsraten im Vergleich zu primären Zellen. Das betrifft sowohl die mRNA- als auch die Proteinebene, wobei cEND/cerebEND für *Mct1* keine repräsentativen Modellsysteme zu sein scheinen.

Es wird deutlich, dass die *in-vitro* Systeme cEND und cerebEND gut für die Untersuchung vom *Insulin-* und *Transferrinrezeptor* geeignet zu sein scheinen. Alle Untersuchungen zeigen Übereinstimmungen in der mRNA Expression von cEND/cerebEND und primären Zellen für diese beiden Proteine. Die einzige Ausnahme wird dabei von cerebEND in 10% FCS Nährmedium gebildet, da es die Expression vom *Transferrinrezeptor* auf mRNA Ebene hochreguliert. Auf Proteinebene bestätigt sich die Annahme, dass sich die untersuchten *in-vitro* Modellsysteme gut zur Untersuchung von zellulären Rezeptoren eignen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse von cerebEND im Vergleich zu primären Zellen muss berücksichtigt werden, dass die primären Zellen aus dem Großhirn isoliert wurden und sich somit nur bedingt eindeutige Schlussfolgerungen aus diesem Vergleich ziehen lassen. Regionalen Unterschiede in der Expression

der Markerproteine zwischen Groß- und Kleinhirn müssen in weiteren Studien untersucht werden.

Außerdem zeigen sich bei der Auswertung der Western Blots sehr hohe Standardabweichungen, wodurch die Ergebnisse der Proteinexpression schwer Interpretierbar werden.

4.6. Wachstums- und Differenzierungsunterschiede zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium

Es fällt auf, dass sich die Expressionslevel auf mRNA- und Proteinebene teilweise zwischen den unterschiedlich konzentrierten Nährmedien unterscheiden. Dabei ist ein deutlicher Trend zu beobachten, dass das niedriger konzentrierte Medium zu höheren mRNA-Expressions- und Proteinleveln führt. In 1% FCS Nährmedium zeigt sich in insgesamt 21 Fällen ein höheres mRNA-Expressions- und Proteinlevel als in 10% FCS, wohingegen nur in sieben Fällen in 10% FCS Medium höhere mRNA-Expressions- und Proteinlevel resultieren.

4.7. Vergleich der Auswirkung verschiedener Konzentrationen von FCS Nährmedium auf cEND/cerebEND

Wie bereits im Kapitel 4.6. angesprochen, finden sich bei der Auswertung der Experimente Unterschiede in den mRNA Expressions- und Proteinleveln zwischen cEND/cerebEND in den verschiedenen konzentrierten Nährmedien, wobei in 1% FCS häufiger höhere Expressionsraten vorlagen, als in 10% FCS. Dabei konnte allerdings kein Trend festgestellt werden, dass mit der

Konzentration von FCS auch die mRNA- und Proteinexpression im Vergleich zu primären Zellen ansteigt bzw. abfällt.

Allerdings kann man die Auswirkung verschiedener Konzentrationen von FCS auf cEND und cerebEND auf einer anderen Ebene feststellen. Dafür muss man den transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) der Zellen betrachten. Dabei bedeutet eine Erhöhung des TEER eine Erniedrigung der Durchlässigkeit der Zell-Zell-Kontakte.

Der TEER steigt mit sinkender Konzentration des FCS im Nährmedium an (Förster et al., 2005). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ein TEER von $150 \Omega\text{cm}^2$ bei cEND in 10% FCS vorliegt und auf $500 \Omega\text{cm}^2$ in 2% FCS Medium steigt. Bei 21 tägiger Kultivierung der Zellen im reduzierten Medium stieg der TEER dabei auf $900 \Omega\text{cm}^2$, was eine gute Annäherung an den TEER in-vivo von $\sim 2000-5000 \Omega\text{cm}^2$ darstellt (Maherally et al., 2018; Rubin et al., 1991). Reduktion des Serumgehalts im Medium verschließt große Poren und verhindert damit, dass große Makromoleküle die Endothelzellen parazellulär passieren können (Förster et al., 2005). Damit die Barriere auch kleine ungeladene Moleküle an der Passage hindert, müssen die Endothelzellen noch zusätzlich mit Hydrokortison behandelt werden.

4.8. Unterschiede zwischen den mRNA-Expressionsleveln und Proteinleveln im Vergleich zu primären Zellen

Zwischen den Expressionsleveln auf mRNA- und Proteinebene eines Markerproteins lassen sich zum Teil große Unterschiede feststellen. Dabei fällt auf, dass die Expressionslevel auf mRNA-Ebene nur in 15% niedriger sind, als auf Proteinebene. Das heißt, dass in 85% der Fälle, der Proteinlevel im Vergleich zum mRNA-Expressionslevel absinkt.

Interessanterweise sieht man, dass sich die Unterschiede zwischen mRNA- und Proteinexpression positiv auf den Vergleich zu der Proteinexpression in primären Zellen auswirken. Was bedeutet, dass zu niedrige oder zu hohe mRNA-Expressionslevel in cEND/cerebEND im Vergleich zu primären Zellen, auf Proteinebene auf die Expressionswerte der primären Zellen ansteigen bzw. absinken. Nur 23% der Proteine mit ähnlicher mRNA-Expressionsrate im Vergleich zu primären Zellen zeigen eine erhöhte oder verminderte Proteinexpression. Wohingegen von den ursprünglichen 31% mit erhöhter oder verminderter mRNA-Expressionsrate bei anschließend 61% dieser Proteine der Proteinlevel im Vergleich zu primären Zellen normalisiert wird.

Die Unterschiede in den mRNA- und Proteinexpressionsraten zwischen cEND und cerebEND könnten auf regionale Unterschiede in der Expression der jeweiligen Proteine hindeuten, z.B. *Jam3*, *Glut-1*.

4.9. Vergleich der Transkriptions- und Expressionslevel in den *in-vitro* Modellsystemen

Es hat sich herausgestellt, dass eine erhöhte oder verminderte mRNA Expression nicht immer mit einem erhöhten beziehungsweise verminderten Proteinlevel einhergeht. In manchen Fällen steigt der Proteinlevel im Vergleich zum mRNA-Expressionslevel, in den meisten Fällen sinkt er jedoch ab und normalisiert sich.

Warum sich Änderungen im Transkriptionslevel von Genen nicht immer auf die Expression des assoziierten Proteins durchschlagen ist noch nicht abschließend geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Es ist jedoch bekannt, dass mRNA von bestimmten micro RNAs (miRNAs) gehemmt oder von bestimmten short interfering RNAs (siRNAs) abgebaut werden kann, bevor es zur Translation kommt. Es sind mehrere hundert dieser kurzen miRNAs bzw.

siRNAs bekannt, die durchschnittlich nur etwa 20 Nukleotide lang sind. miRNAs bzw. siRNAs erkennen mRNA durch spezifische Basenpaarung. Obwohl diese Art der Regulation noch wenig erforscht ist, findet sie bereits Anwendung in der Forschung weil sich mit ihr gezielt die Genexpression unterdrücken lässt (Hladky and Barrand, 2018).

Die Aktivität dieser regulatorischen Moleküle könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass sich erhöhte mRNA-Expressionslevel in diesen *in-vitro* Modellsystemen teilweise nicht auf die Proteinexpression durchschlagen.

Auch die Tatsache, dass Hirnendothelzellen von neonatalen Mäusen verwendet werden, könnte eine Rolle spielen. Viele der Zellen sind zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht differenziert und differenzieren erst im Laufe der Kultivierung aus. Das könnte dazu führen, dass weniger differenzierte Zellen mehr oder weniger bestimmte Proteine transkribieren und exprimieren als weiter differenzierte Zellen.

Weiterhin muss untersucht werden, ob es durch eine Alterung der Zellen zu einer Abweichung zwischen mRNA- Expressions- und Proteinlevel kommen kann und ob sich die Zelleigenschaften der Endothelzellen im Laufe der Zeit verändern. Dafür sind häufige Kontrollen notwendig.

Die Immortalisierung der Zellen könnte ebenfalls Einfluss auf die Translationsrate der mRNA nehmen. Diese Überlegung muss in weiteren Studien überprüft werden.

4.10. Vergleich verschiedener in-vitro Modellsysteme

Die BHS stellt, wie schon in der Einleitung erläutert, eine wichtige Barriere für den Organismus zwischen dem Blutkreislauf und dem Zentralnervensystem dar. Nur ganz bestimmte Substanzen werden in einer ganz bestimmten Konzentration hindurchgeschleust. Das stellt die Medizin hinsichtlich der Behandlung von Krankheiten des ZNS mitunter vor schwierige Aufgaben, da die BHS für viele Medikamente nicht oder kaum passierbar ist. Die Passage von Medikamenten stellt nicht die einzige Fragestellung in Medizin und Wissenschaft dar. Während die BHS bei der Behandlung von Krankheiten oft eine unüberwindbare Barriere darstellt, gibt es andere Situationen, in denen die Barrierefunktion verloren geht und das ZNS durch den übermäßigen Eintritt von Gewebeflüssigkeit und Noxen geschädigt wird, z.B. nach einem Trauma oder Schlaganfall.

Um Lösungen für diese Probleme finden zu können, ist es notwendig die BHS und ihre Komponenten genau zu studieren. Das lässt sich am effektivsten mit *in-vitro* Modellsystemen bewerkstelligen. Aus diesem Grund haben verschiedene Laboratorien die unterschiedlichsten *in-vitro* Modellsysteme entwickelt. Das Ziel ist dabei ein System zu finden das vergleichbare Ergebnisse und schnelle Auswertung an möglichst vielen Zellen erlaubt. Dabei ist es schwierig zu quantifizieren, welches dieser Modelle am vorteilhaftesten für das Studium der BHS ist. Im Folgenden werden einige *in-vitro* Modellsysteme aus der Literatur mit den Modellsystemen cEND und cerebEND verglichen.

Ein *in-vitro* Modellsystem mit Endothelzellen, die aus Kuhgehirnen isoliert wurden lieferte 1999 Cecchelli, et. al. Bei diesem Modell werden Endothelzellen, durch einen Filter, von Astrozyten getrennt und anschließend kultiviert (Cecchelli et al., 1999; Helms et al., 2016). Dadurch können sie keinen direkten Kontakt entwickeln. Sie teilen sich jedoch ein gemeinsames Nährmedium und können über dieses humoral in Kontakt treten und auf diese Weise interagieren. Die Ergebnisse zeigen hohe Übereinstimmungen in der Expression von Tight Junctions, zellulären Rezeptoren und Transportern im Vergleich zwischen dem *in-vitro* Modellsystem dieser Arbeitsgruppe und der

Expression dieser Proteine *in-vivo*. Allerdings werden in diesem Modellsystem die Endothelzellen nicht immortalisiert. Das bedeutet langfristig einen höheren Aufwand und Zeitverlust, denn die Zellen überdauern keine langen Zeiträume und müssen immer wieder neu gewonnen werden. Dies führt ebenso zu einer verminderten Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Zellisolationen, insbesondere im Vergleich zu immortalisierten Zelllinien. Außerdem ist eine Co-Kultivierung von Zellen an sich sehr umständlich und zeitaufwändig. Z.B. werden im cEND/cerebEND Modellsystem die gewebespezifischen Eigenschaften dadurch erreicht, dass Hydrocortison in einer Konzentration von 110nM hinzugefügt wird, die auch so physiologisch *in-vivo* existiert (70-550nM) (Förster et al., 2005).

Ein anderes *in-vitro* Modellsystem, das eine Co-Kultivierung von Endothelzellen aus Mausgehirnen und Zellen, die mit der BHS assoziiert sind, vor allem Astrozyten, postuliert stammt von Abbott, et al. (Abbott et al., 2012). Es ist sehr schwer den physiologischen *in-vivo* transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) von $>200 \Omega \text{ cm}^2$ in einem Modellsystem zu erreichen. Das führt dazu, dass viele vergleichbare Modelle zu durchlässig sind. Die Arbeitsgruppe Abbott, et al., hat jedoch Werte für den transendothelialen elektrischen Widerstand ihres Modells von $>600 \Omega \text{ cm}^2$ erzielen können. Dies wird vom cEND/cerebEND Modellsystem mit einem Wert von $900 \Omega \text{ cm}^2$ sogar noch übertroffen (cEND in 2% FCS Nährmedium, für 21 Tage kultiviert) (Förster et al., 2005). Weitere positive Eigenschaften des Modells der Arbeitsgruppe Abbott, et al. sind, dass die Zellen innerhalb von zwei Wochen gewonnen werden können und vergleichbare Expressionslevel der untersuchten Proteine im Vergleich zur *in-vivo* Expression bestehen. Allerdings handelt es sich bei diesem Modellsystem ebenfalls um nicht-immortalisierte Zelllinien, was einen Nachteil im Bezug zu cEND und cerebEND darstellt.

Ein anderes *in-vitro* Modellsystem kommt von Muruganandam, et al., und basiert auf immortalisierten humanen Endothelzellen: SV-HCEC (Maherally et al., 2018; Muruganandam et al., 1997). Die Endothelzellen erhielten durch Transfektion das Plasmid pSV3-neo, das für das SV40 large T Antigen und das

Neomycin Gen codiert. Durch die Transkription und Expression dieser Gene produzieren die Zellen im Laufe von sechs bis acht Wochen immortalisierte Kolonien. Der Nachteil dieses Modellsystems ist, dass humane Zellen verwendet werden. Humane Zellen stellen im Vergleich zu Maushirnzellen eine teurere Ressource dar, auf die schwieriger zugegriffen werden kann und die nur begrenzt zugänglich ist. Außerdem stellen Mäuse das Säugetier der Wahl für genetische Modifikationen dar und eignen sich deswegen besonders gut für ein *in-vitro* Modellsystem (Förster et al., 2005). Es stellte sich heraus, dass die humanen Zellen nach der Isolation sehr schnell ihre Eigenschaften verlieren. Dagegen zeigten sich Mäuse Zellen stabiler (Helms et al., 2016; Urich et al., 2012).

Die vorgestellten Modellsysteme sind eine kleine Auswahl von insgesamt sehr vielen Modellsystemen. Unzählige Arbeitsgruppen haben *in-vitro* Modellsysteme für ihre Laboratorien etabliert. Es werden immortalisierte und nicht-immortalisierte Zelllinien von Menschen, Mäusen, Ratten, Schweinen und Rindern verwendet, wie eine Uebersichtsarbeit von Wilhelm et al. zusammenfasst (Helms et al., 2016; Wilhelm et al., 2011). Dabei haben alle Modellsysteme Vorteile aber auch Nachteile bezüglich Wirtschaftlichkeit, Zeitaufwand und nützlicher Ergebnisse.

Die in dieser Arbeit untersuchten *in-vitro* Modellsysteme cEND und cerebEND haben klare Vorteile in der schnellen und einfachen Gewinnung der Zellen. Durch die Immortalisierung sind die Zellen für langandauernde Untersuchungen einsetzbar und liefern dadurch gut vergleichbare Ergebnisse. Die gewonnenen Daten werden dadurch reproduzierbar. Außerdem stellt das Ursprungstier Maus eine nicht limitierte Ressource dar, die, im Vergleich z.B. zu humanen Zellen, leicht zugänglich ist und in der medizinischen Forschung für die Untersuchung genetischer Modifikationen seit langem eingesetzt wird.

Die Charakterisierung hat gezeigt, dass viele Markerproteine ähnliche mRNA Expressions- und Proteinlevel im Vergleich zu primären Zellen zeigen und somit gut mit cEND/cerebEND studiert werden können. Allerdings gibt es auch Proteine, für die das untersuchte Modellsystem nur bedingt geeignet ist.

Beispielsweise werden *Lrp1* und *P-gp*, in cerebEND, stark vermindert exprimiert, *Bcrp* dagegen deutlich erhöht. Diese Proteine können höchstens für bestimmte Fragestellungen mit den Modellsystemen untersucht werden, z.B. die Folgen einer Minder- oder Überexpression dieser Proteine bei bestimmten Erkrankungen. Ob das funktioniert, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.11. Aussichten für die Medikamentenforschung mit dem cEND/cerebEND Modellsystem

Die untersuchten Modellsysteme zeigen eine gute Übereinstimmung in den mRNA Expressions- und Proteinleveln der Tight Junctions, *Mrp* Effluxpumpen und den zellulären Rezeptoren: *Insulin-* und *Transferrinrezeptor*. Daraus ergeben sich Vorteile in der Erforschung von Erkrankungen und Therapie dieser.

Es wird vermutet, dass Langzeitmedikation mit Antiepileptika die Induktion von den ABC-Transportern *P-pg* und *Mrps* fördert (Wang et al., 2010; Wen et al., 2008). Die erhöhte Expression dieser Effluxpumpen führt dazu, dass die Medikamente wieder aktiv aus dem ZNS gepumpt werden und ihre Wirkung nicht entfalten können (van Vliet et al., 2014). Diese Effekte und auch die Effekte neuer Antiepileptika können mit dem cEND/cerebEND Modellsystem untersucht werden. Zusätzlich kann auch die Auswirkung einer verminderten Expression von *P-gp* erforscht werden, da es im untersuchten Modellsystem cerebEND zu einer Minderexpression dieses Transporters kommt.

Des Weiteren erschweren die ABC-Transporter *P-gp* und *Mrps* die Therapie chronischer und postoperativer Schmerzen mittels Opioidanalgetika, wie z.B. Morphin oder dessen aktive Metaboliten (Hassan et al., 2009). *P-gp* und *Mrps* pumpen auch diese Medikamente aus dem ZNS zurück ins Blutsystem. Das

cEND/cerebEND Modellsystem könnte zur Untersuchung der Hemmung dieser Transporter und dessen Auswirkungen auf die Konzentration der Medikamente im Gehirn sinnvoll sein, zumal *P-gp* in dem cerebEND Modellsystem vermindert exprimiert wird.

P-gp und *Mrps* erschweren auch die Therapie maligner Tumore mittels Chemotherapie. Zum Beispiel führen maligne Gliome zu einer Überexpression von *Mrps* und *P-gp* und damit zu einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie, durch die zuvor beschriebenen Effekte (Abe et al., 1998). Die Erforschung neuer Krebsmedikamente und deren Permeabilität durch die BHS sind Gegenstand aktueller Forschung und das cEND/cerebEND Modellsystem könnte hierzu benutzt werden.

Insulinrezeptoren sind überall im Gehirn vorhanden und kommen vor allem im Plexus choroideus, Hypothalamus, dem Hippocampus und in präfrontalen Arealen vor. Insulinresistenz führt zu Übergewicht, Diabetes und Neurodegeneration (Werther et al., 1987). Testung von Medikamenten, die gegen die Insulinresistenz anzielen und somit gravierende Folgeerkrankungen therapieren oder verhindern, ist bei der hohen Zahl an Insulinresistenzen in Deutschland und der Welt hoch aktuell. cEND und cerebEND zeigen hohe Übereinstimmungen in der mRNA Expression des *Insr* und können deswegen zu der Erforschung der Insulinresistenz beitragen.

Aktuelle Forschung findet sich auch in der Therapie von seltenen (ZNS-) Erkrankungen, z.B. lysosomalen Speicherkrankheiten, mittels Fusionsproteinen. Dabei enthält ein substituiertes Enzym monoklonale Antikörper, z.B. gegen *Insulin-* oder *Transferrinrezeptoren* und bindet an diese. Anschließend kann das Medikament mittels rezeptorvermittelter Transzytose die BHS passieren und ins ZNS gelangen. Fusionsproteine werden bereits in ersten internationalen multizentralen klinischen Phase I/II Studien getestet, z.B. bei Mukopolysaccharidose Typ I und II. Außerdem existieren präklinische Studien zur Therapie der metachromatische Leukodystrophie (Boado et al., 2014). Die Tatsache, dass die Expression vom *Insulin-* und *Transferrinrezeptor* im cEND/cerebEND Modellsystem mit der Expression dieser zellulären

Rezeptoren in primären Zellen übereinstimmt, lassen sich die Modellsysteme für diese Forschung anwenden.

Dieses Kapitel stellt nur eine kleine Auswahl an Möglichkeiten dar, die das cEND/cerebEND Modellsystem eröffnet. Insgesamt lässt sich Schlussfolgern, dass es eine gute Alternative zur Erforschung der BHS darstellt und sich mit Sicherheit weiterhin etablieren wird.

5.ZUSAMMENFASSUNG

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine wichtige Barriere zwischen dem Blutsystem und dem Gehirngewebe dar. An der Bildung dieser Barriere sind hauptsächlich die Endothelzellen der Blutkapillaren beteiligt. Dabei verschließen die Tight Junction Proteine, z.B. *Claudine (Cldn)*, *Occludin (Ocln)*, *Zonula occludens-1 (ZO-1)*, *Junctional adhesion molecules (Jams)*, und die Adherens Junction Proteine, z.B. *Vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin)*, den interzellulären Spalt zwischen zwei benachbarten Endothelzellen. Dieser Verschluss sorgt dafür, dass keine Noxen aus dem Blut in das Zentralnervensystem gelangen können. Damit jedoch der Transport wichtiger Nährstoffe in das ZNS und der Abtransport von Abfallprodukten aus dem ZNS gewährleistet sind, sind spezielle Rezeptoren und Transporter notwendig. Diese sorgen auch dafür, dass in die Endothelzellen eingedrungene schädliche Substanzen wieder zurück in das Blutsystem befördert werden. Dafür sind Effluxpumpen, z.B. *Multidrug resistance-associated proteins (Mrps)*, *Breast cancer resistance protein (Bcrp)*, *P-Glycoprotein (P-gp)*, Proteine der Solute Carrier Familie, z.B. *Cationic amino acid transporter 1 (Cat1)*, *Glucose Transporter-1 (Glut-1)*, *L-type amino acid transporter (1Lat1)*, *Monocarboxylate Transporter 1 (Mct1)* und zelluläre Rezeptoren, z.B. *Insulinrezeptor (Insr)*, *Transferrinrezeptor (Tfrc)*, *Receptor for advanced glycosylation end products (RAGE)*, *Low density lipoprotein receptor related protein (1 Lrp1)*, verantwortlich.

Die immortalized mouse cerebral/cerebellar capillary endothelial cells (cEND/cerebEND) Modellsysteme sind *in-vitro* Modellsysteme der BHS und wurden in der AG: Förster in der Anästhesiologie im Universitätsklinikum Würzburg bereits erfolgreich isoliert und schon dazu benutzt verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse in der BHS zu beschreiben und zu erklären. Die Zellen werden in diesem BHS-Modell mit Hilfe des Polynoma large T Antigens immortalisiert.

Das Ziel der Doktorarbeit war der Vergleich der mRNA Expressions- und Proteinlevel verschiedener Tight Junction-Proteine, Adherens Junctions, Effluxpumpen, Proteine der SLC-Familie und zellulärer Rezeptoren der BHS

zwischen cEND/cerebEND und primären Zellen, die aus dem Großhirn isoliert wurden, sowohl in 10% FCS als auch in 1% FCS Nährmedium. Es sollte ermittelt werden, ob durch die Immortalisierung der Hirnendothelzellen eine Veränderung in der Expression der Proteine herbeigeführt wird und ob es Unterschiede in der Expression bezüglich der Mediumkonzentration gibt.

Untersucht wurden die mRNA Expressionslevel mit Hilfe der RT-PCR und die Proteinlevel mittels Western Blot.

Im Laufe der Arbeit hat sich heraus gestellt, dass cEND und cerebEND in vielen Fällen ähnliche Mengen an ABC-Transportern, Proteinen der SLC-Familie, zellulären Rezeptoren und Tight Junction Proteinen wie primäre Zellen, sowohl in 10% FCS als auch in 1% FCS Medium exprimieren. Dabei sind die mRNA-Expressions- und Proteinlevel von Tight Junctions und der zellulären Rezeptoren *Insulin-* und *Transferrinrezeptor* im Vergleich zu primären Zellen am ähnlichsten. In diesen Fällen wird die Expression der untersuchten Proteine durch die Immortalisierung der Hirnendothelzellen nicht signifikant verändert. Somit lässt sich die Barrierefunktion der Hirnendothelzellen besonders gut mit den *in-vitro* Modellsystemen untersuchen.

Die Modellsysteme cEND und cerebEND zeigen allerdings auch einige Schwachstellen. *Bcrp*, *Mct1*, *Lrp1* und *P-gp* lassen sich nur bedingt mit diesen Modellsystemen untersuchen, da ihre Transkription und Expression sehr stark hoch, im Fall von *Bcrp*, oder runter reguliert wird, im Fall von *Mct1* und *Lrp1* in cEND/cerebEND und *P-gp* in cerebEND.

Im Hinblick auf Veränderungen in der Expression durch Mediumreduktion wird deutlich, dass sie zu höheren Expressionsraten in cEND, mehr noch in cerebEND, führt. Dies zeigt sich auf mRNA-Ebene noch deutlicher als auf Proteinebene. Diese Tatsache scheint sich allerdings nicht im Vergleich mit primären Zellen sichtbar zu machen. Es zeigt sich kein Unterschied im Vergleich zu primären Zellen zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium.

Damit stellen cEND und cerebEND in verschiedenen, jedoch nicht in allen Fragestellungen geeignete Modellsysteme dar.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC-Transporter	ATP binding cassette-transporter
ABCC	ATP binding cassette der Klasse C
a.d.	Aqua destillata
AGE	advanced glycation endproducts
AJ	Adherens Junctions
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bcrp	breast cancer resistance protein
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMEC	Brain Microvascular Endothelial Cell
BSA	Bovine serum albumin
cerebEND	immortalized mouse cerebellar capillary endothelial cells
cEND	immortalized mouse cerebral capillary endothelial cells
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid → cDNA = copy DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERZ	Extrazellulärraum
FCS	fetal calf serum
Insr	Insulin Rezeptor
IZR	Intrazellulärraum
Jam	junctional adhesion moleküle
kDa	kilo-Dalton → molare Masse eines Proteins in g/mol
Lat1	L-type amino acid transporter 1

Lrp1	low density lipoprotein receptor-related protein 1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
miRNA	mikro Ribonukleinsäure
Mct1	Monocarboxylat-Transporter 1
Mdr1	multidrug-resistance-protein 1
MRP	multidrug resistance-related proteins
NEA	non essential amino acids
Ocln	Occludin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
P-gp	permeability glycoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleic acid
hnRNA	heterogene nukleäre RNA
tRNA	transfer RNA
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RT-PCR	real time Polymerase Chain Reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate \triangleq Natriumdodecylsulfat
siRNA	short interfering Ribonukleinsäure
TEER	transendothelialer elektrischer Widerstand
Tfrc	Transferrin-Rezeptor
TJ	Tight junctions
VE-cadherin	vascular endothelial cadherin
WB	Western Blot
ZO-1	zona occludens proteins
ZNS	Zentralnervensystem

Tabelle 19: Abkürzungsverzeichnis

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der BHS	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tight Junctions (TJ) und Adherens Junctions (AJ)	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Transportern und Rezeptoren der BHS.....	9
Abbildung 4: SDS-PAGE Bandenprofil	29
Abbildung 5: RT-PCR: mRNA Expression von Cldn5.	33
Abbildung 6: RT-PCR: mRNA Expression von Cldn12.	34
Abbildung 7: RT-PCR: mRNA Expression von Jam1.	35
Abbildung 8: RT-PCR: mRNA Expression von Jam2.	36
Abbildung 9: RT-PCR: mRNA Expression von Jam3.	36
Abbildung 10: RT-PCR: mRNA Expression von Ocln.	37
Abbildung 11: RT-PCR: mRNA Expression von ZO-1.	37
Abbildung 12: RT-PCR: mRNA Expression von Cdh5	38
Abbildung 13: WB: Proteinexpression der Tight Junctions.	40
Abbildung 14: WB: Proteinexpression von Cldn5	41
Abbildung 15: WB: Proteinexpression von Cldn3.	42
Abbildung 16: WB: Proteinexpression von Ocln	43
Abbildung 17: WB: Proteinexpression von ZO-1.	43
Abbildung 18: WB: Proteinexpression von Jam3	44
Abbildung 19: RT-PCR: mRNA Expression von P-gp.	46
Abbildung 20: RT-PCR: mRNA Expression von Mrp1.	47
Abbildung 21: RT-PCR: mRNA Expression von Mrp4	47
Abbildung 22: RT-PCR: mRNA Expression von Mrp5.	48
Abbildung 23: RT-PCR: mRNA Expression von Bcrp.	48
Abbildung 24: WB: Proteinexpression der Effluxpumpen.	50
Abbildung 25: WB: Proteinexpression von Bcrp.	51
Abbildung 26: WB: Proteinexpression von Mrp1	51
Abbildung 27: WB: Proteinexpression von Mrp4	52
Abbildung 28: WB: Proteinexpression von P-gp.	53
Abbildung 29: RT-PCR: mRNA Expression von Glut-1	55

Abbildung 30: RT-PCR: mRNA Expression von Cat1	56
Abbildung 31: RT-PCR: mRNA Expression von Lat1.	56
Abbildung 32: RT-PCR: mRNA Expression von Mct1.	57
Abbildung 33: WB: Proteinexpression der Proteine der SLC-Familie.....	58
Abbildung 34: WB: Proteinexpression von Glut-1.....	59
Abbildung 35: WB: Proteinexpression von Lat1.	60
Abbildung 36: WB: Proteinexpression von Mct1.....	61
Abbildung 37: RT-PCR: mRNA Expression von Insr.....	63
Abbildung 38: RT-PCR: mRNA Expression von Lrp1.....	63
Abbildung 39: RT-PCR: mRNA Expression von RAGE.....	64
Abbildung 40: RT-PCR: mRNA Expression von Tfr.	64
Abbildung 41: WB: Proteinexpression zellulärer Rezeptoren.	66
Abbildung 42: WB: Proteinexpression von RAGE.	66
Abbildung 43: WB: Proteinexpression von Tfr.	67

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Substanzen/Materialien	16
Tabelle 2: Sonden für RT-PCR	17
Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper für WB	18
Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper für WB	19
Tabelle 5: Verwendete Geräte/Materialien	19
Tabelle 6: Protokoll zur Umwandlung von RNA in cDNA	23
Tabelle 7: Prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der Tight Junctions durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS.	39
Tabelle 8: Prozentuale Veränderung in der Proteinexpression der Tight Junctions durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS.	44
Tabelle 9: Prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der Effluxpumpen durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS.	49
Tabelle 10: Prozentuale Veränderung in der Proteinexpression der Effluxpumpen durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS	53
Tabelle 11: Prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der Proteine der SLC-Familie durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS.	57
Tabelle 12: Prozentuale Veränderung in der Expression der Proteine der SLC-Familie durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS.	61
Tabelle 13: Prozentuale Veränderung in der mRNA Expression der zellulären Rezeptoren durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS	65
Tabelle 14: Prozentuale Veränderung in der Proteinexpression der zellulären Rezeptoren durch Mediumreduktion von 10% FCS auf 1% FCS.	67
Tabelle 15: Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene zwischen cEND und primären Zellen	69
Tabelle 16: Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene zwischen cerebEND und primären Zellen	73
Tabelle 17: Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene in cEND zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium	77
Tabelle 18: Vergleich der Expression der Markerproteine auf mRNA- und Proteinebene in cerebEND zwischen 10% FCS und 1% FCS Nährmedium	78
Tabelle 19: Abkürzungsverzeichnis	93

9. LITERATURVERZEICHNIS

9.2. Fachbücher

Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spaniel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ & Zilch HG. (2006). Duale Reihe Anatomie

Löffler G & Petrides P. (2014). Biochemie und Pathobiochemie, 9. Auflage

Rassow J, Hauser K, Netzker R & Deutzmann R. (2008). Duale Reihe Biochemie, 2. Auflage

9.1. Papers

Abbott, N.J. (2013). Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis* 36, 437-449.

Abbott, N.J., Dolman, D.E., Drndarski, S., and Fredriksson, S.M. (2012). An improved in vitro blood-brain barrier model: rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes. *Methods Mol Biol* 814, 415-430.

Abe, T., Mori, T., Wakabayashi, Y., Nakagawa, M., Cole, S.P., Koike, K., Kuwano, M., and Hori, S. (1998). Expression of multidrug resistance protein gene in patients with glioma after chemotherapy. *J Neurooncol* 40, 11-18.

Bierhaus, A., and Nawroth, P.P. (2009). Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* 52, 2251-2263.

Boado, R.J., Ka-Wai Hui, E., Zhiqiang Lu, J., and Pardridge, W.M. (2014). Insulin receptor antibody-iduronate 2-sulfatase fusion protein: pharmacokinetics, anti-drug antibody, and safety pharmacology in Rhesus monkeys. *Biotechnol Bioeng* 111, 2317-2325.

Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buee-Scherrer, V.V., Duhem, C., Lundquist, S., Rentfel, M., Torpier, G., and Dehouck, M.P. (1999). In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 165-178.

Chien, H.C., Colas, C., Finke, K., Springer, S., Stoner, L., Zur, A.A., Venteicher, B., Campbell, J., Hall, C., Flint, A., *et al.* (2018). Reevaluating the Substrate Specificity of the L-Type Amino Acid Transporter (LAT1). *J Med Chem* 61, 7358-7373.

Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 252, 1102-1106.

Closs, E.I., Boissel, J.P., Habermeier, A., and Rotmann, A. (2006). Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol* 213, 67-77.

Czech, M.P. (1985). The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Annu Rev Physiol* 47, 357-381.

de Gooijer, M.C., Buil, L.C.M., Beijnen, J.H., and van Tellingen, O. (2018). ATP-binding cassette transporters limit the brain penetration of Wee1 inhibitors. *Invest New Drugs* 36, 380-387.

Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M.G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 121, 2115-2122.

Doyle, L., and Ross, D.D. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22, 7340-7358.

Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., and Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 117, 19-29.

Folch, J., Ettcheto, M., Busquets, O., Sanchez-Lopez, E., Castro-Torres, R.D., Verdaguer, E., Manzine, P.R., Poor, S.R., Garcia, M.L., Olloquequi, J., *et al.* (2018). The Implication of the Brain Insulin Receptor in Late Onset Alzheimer's Disease Dementia. *Pharmaceuticals (Basel)* 11.

Förster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J., and Drenckhahn, D. (2005). Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol* 565, 475-486.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998a). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141, 1539-1550.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123, 1777-1788.

Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998b). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143, 391-401.

Halestrap, A.P., and Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447, 619-628.

Haseloff, R.F., Dithmer, S., Winkler, L., Wolburg, H., and Blasig, I.E. (2015). Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol* 38, 16-25.

Hassan, H.E., Mercer, S.L., Cunningham, C.W., Coop, A., and Eddington, N.D. (2009). Evaluation of the P-glycoprotein (Abcb1) affinity status of a series of morphine analogs: comparative study with meperidine analogs to identify opioids with minimal P-glycoprotein interactions. *Int J Pharm* 375, 48-54.

Heiskala, M., Peterson, P.A., and Yang, Y. (2001). The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2, 93-98.

Helms, H.C., Abbott, N.J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P.O., Deli, M.A., Förster, C., Galla, H.J., Romero, I.A., Shusta, E.V., *et al.* (2016). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab* 36, 862-890.

Hladky, S.B., and Barrand, M.A. (2018). Elimination of substances from the brain parenchyma: efflux via perivascular pathways and via the blood-brain barrier. *Fluids Barriers CNS* 15, 30.

Lee, N.Y., and Kang, Y.S. (2016). In Vivo and In Vitro Evidence for Brain Uptake of 4-Phenylbutyrate by the Monocarboxylate Transporter 1 (MCT1). *Pharm Res* 33, 1711-1722.

Lue, R.A., Marfatia, S.M., Branton, D., and Chishti, A.H. (1994). Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9818-9822.

Maherally, Z., Fillmore, H.L., Tan, S.L., Tan, S.F., Jassam, S.A., Quack, F.I., Hatherell, K.E., and Pilkington, G.J. (2018). Real-time acquisition of transendothelial electrical resistance in an all-human, in vitro, 3-dimensional, blood-brain barrier model exemplifies tight-junction integrity. *FASEB J* 32, 168-182.

Masson, O., Chavey, C., Dray, C., Meulle, A., Daviaud, D., Quilliot, D., Muller, C., Valet, P., and Liaudet-Coopman, E. (2009). LRP1 receptor controls adipogenesis and is up-regulated in human and mouse obese adipose tissue. *PLoS One* 4, e7422.

Muruganandam, A., Herx, L.M., Monette, R., Durkin, J.P., and Stanimirovic, D.B. (1997). Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *FASEB J* 11, 1187-1197.

Nies, A.T., Jedlitschky, G., Konig, J., Herold-Mende, C., Steiner, H.H., Schmitt, H.P., and Keppler, D. (2004). Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 129, 349-360.

Palmeri, D., van Zante, A., Huang, C.C., Hemmerich, S., and Rosen, S.D. (2000). Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 19139-19145.

Punnonen, K., Irjala, K., and Rajamaki, A. (1997). Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 89, 1052-1057.

Rubin, L.L., Hall, D.E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H.C., Janatpour, M., Liaw, C.W., Manning, K., Morales, J., *et al.* (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 115, 1725-1735.

Sage, M.R. (1982). Blood-brain barrier: phenomenon of increasing importance to the imaging clinician. *AJR Am J Roentgenol* 138, 887-898.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Sampath, J., Adachi, M., Hatse, S., Naesens, L., Balzarini, J., Flatley, R.M., Matherly, L.H., and Schuetz, J.D. (2002). Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci* 4, E14.

Schinkel, A.H. (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 179-194.

Silwedel, C., and Förster, C. (2006). Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli. *J Neuroimmunol* 179, 37-45.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75, 291-295.

Tietz, S., and Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol* 209, 493-506.

Urich, E., Lazic, S.E., Molnos, J., Wells, I., and Freskgard, P.O. (2012). Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS One* 7, e38149.

van Vliet, E.A., Aronica, E., and Gorter, J.A. (2014). Role of blood-brain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance. *Neuroscience* 277, 455-473.

Wang, X., Sykes, D.B., and Miller, D.S. (2010). Constitutive androstane receptor-mediated up-regulation of ATP-driven xenobiotic efflux transporters at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* 78, 376-383.

Watson, C.P., Pazarentzos, E., Fidanboyly, M., Padilla, B., Brown, R., and Thomas, S.A. (2016). The transporter and permeability interactions of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and L-arginine with the human blood-brain barrier in vitro. *Brain Res* 1648, 232-242.

Wen, T., Liu, Y.C., Yang, H.W., Liu, H.Y., Liu, X.D., Wang, G.J., and Xie, L. (2008). Effect of 21-day exposure of phenobarbital, carbamazepine and phenytoin on P-glycoprotein expression and activity in the rat brain. *J Neurol Sci* 270, 99-106.

Werther, G.A., Hogg, A., Oldfield, B.J., McKinley, M.J., Figdor, R., Allen, A.M., and Mendelsohn, F.A. (1987). Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 121, 1562-1570.

Wilhelm, I., Fazakas, C., and Krizbai, I.A. (2011). In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71, 113-128.

Wood, I.S., and Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3-9.

Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., *et al.* (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514, 291-302.

10. DANKSAGUNG

Ich danke Frau Prof. Dr. Förster, dass sie mir die Chance gegeben hat, meine Doktorarbeit in Ihrem Labor zu machen. Es ist ein wundervolles Thema, dass ich bearbeiten durfte und ich bin stolz, zu Ihrem Team gehört zu haben.

Mein größter Dank gilt PD Dr. rer. nat M. Burek. Sie war meine Betreuerin und immer meine erste Ansprechpartnerin für alle Belange. Sie hat mich in der schweren Anfangszeit unterstützt und durch die komplette Doktorarbeit gelotst. Sie war für alle Fragen offen und hat sich immer Zeit genommen, auch wenn sie eigentlich keine hatte. In Statistik war ich ein absoluter Anfänger und selbst in diesem Bereich hat sie es geschafft, mich einzulernen. In diesem Bereich hat sie mir sehr viel geholfen.

Frau Wilken war die technische Assistentin, die mir im Labor immer zur Seite gestanden ist. Auf sie konnte ich mich zu jeder Zeit verlassen und sie hatte auch immer ein offenes Ohr für mich. Sie hat mir im Labor alles beigebracht, was ich wissen musste. Ich danke ihr auch vielmals für die Kultivierung der cEND, cerebEND und primären Zellen. Wenn sie einmal nicht im Labor war, war Frau Neuhoff meine zweite Ansprechpartnerin, die mir sehr gerne mit Rat und Tat zur Seite stand.

Großer Dank gebührt Dr. Richard Zeltner. Er hat sich die Zeit genommen, meine Präsentation und Doktorarbeit Korrektur zu lesen und mir wichtige Tipps gegeben.

Außerdem danke ich noch meiner Familie und meinem Mann. Sie stehen immer hinter mir, egal was ich mache und unterstützen mich, wo sie nur können.

11. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Angelina Koch

Persönlicher Werdegang

Ab April 2016	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Ab Feb. 2015	Promotion am Universitätsklinikum Würzburg: Abteilung Anästhesiologie
Jan. 2015 – April 2016	Vorbereitungsassistentin: Zahnarztpraxis Dr. Bruckner
Sep. 2009 – Dez. 2014	Studium der Zahnmedizin an der J.W. Goethe Universität in Frankfurt am Main

