

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie,  
Intensivmedizin, Notfallmedizin und Schmerztherapie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Patrick Meybohm**

Etablierung eines Zellkulturmodells der Interaktion von  
Gehirnendothel- und Nierenzellen im  
akuten Nierenversagen

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**  
Sandra Burmester  
aus Hohnstorf (Elbe)

**Würzburg, Juni 2020**



# **Referentenblatt**

**Referentin:** Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. Carola Förster

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Christoph Wanner

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 11.05.2021

**Die Promovendin ist Ärztin.**

*Wahrlich es ist nicht das Wissen, sondern das Lernen,  
nicht das Besitzen, sondern das Erwerben,  
nicht das Dasein, sondern das Hinkommen,  
was den größten Genuss gewährt.*

Carl Friedrich Gauß

Diese Arbeit ist in Liebe und Dankbarkeit  
meinem Großvater Helmut Kloss  
gewidmet.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Akutes Nierenversagen .....	1
1.1.1	Definition .....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	2
1.1.3	Ursachen und Pathophysiologie.....	2
1.1.4	Klinische Präsentation und Verlauf.....	4
1.1.5	Urämie.....	5
1.1.5.1	Indoxylsulfat .....	5
1.1.5.2	Indolessigsäure .....	6
1.1.6	Neurologische Auswirkungen .....	6
1.1.7	Prävention und Therapie .....	7
1.2	Blut-Hirn-Schranke .....	8
1.2.1	Funktion .....	8
1.2.2	Aufbau und Tight Junctions.....	9
1.2.3	Occludine .....	10
1.2.4	Claudine .....	11
1.2.5	Glukosetransporter.....	12
1.2.6	TJs und ihre Bedeutung für den menschlichen Körper.....	16
1.2.7	Hirnödem.....	17
1.3	Ziel der Arbeit .....	18
2	Material und Methoden .....	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Materialien.....	20
2.1.2	Geräte .....	21
2.1.3	Substanzen .....	22
2.1.4	Kulturmedien und Zusätze.....	23
2.1.5	Verwendete Primärantikörper.....	24
2.1.6	Verwendete Sekundärantikörper.....	25
2.1.7	Verwendete Kits .....	25
2.2	Methoden.....	26

2.2.1	Zellkultur.....	26
2.2.2	Toxizitätsmessung.....	30
2.2.3	Transendothelialer elektrischer Widerstand .....	31
2.2.4	Proteinpräparation.....	32
2.2.5	BCA-Proteinmessung.....	33
2.2.6	NuPage®-Gelelektrophorese .....	34
2.2.7	Western Blot.....	34
2.2.8	Co-Kultur .....	36
2.2.9	Oxygen-glucose deprivation .....	37
2.2.10	Statistische Analyse .....	38
3	Ergebnisse .....	39
3.1	Festlegungen von subtoxischen Toxinkonzentrationen .....	39
3.2	Einfluss von IS und IAA auf den elektrischen Widerstand der BHS.....	42
3.3	Einfluss von IS und IAA auf TJ-Proteine und Glukosetransporter .....	44
3.3.1	Claudin-5.....	44
3.3.2	Occludin .....	46
3.3.3	GLUT1.....	48
3.3.4	SGLT1.....	50
3.3.5	SGLT2.....	52
3.4	Auswertung der Ergebnisse der Co-Kultur .....	54
3.4.1	Claudin-5.....	54
3.4.2	Occludin .....	57
3.4.3	GLUT1.....	60
3.4.4	Vergleich der Normoxie mit der OGD.....	63
4	Diskussion.....	65
4.1	Festlegung von Toxinkonzentrationen.....	65
4.2	Wirkung der Toxine IS und IAA auf den elektrischen Widerstand der BHS .....	66
4.3	Wirkung der Toxine IS und IAA auf die Expression der TJ-Proteine der BHS .....	67
4.4	Wirkung der Toxine IS und IAA auf die Expression der Glukosetransporter der BHS.....	68

4.5	Etablierung eines in vitro Modells der Interaktion von Gehirndothel- und Nierenzellen.....	68
4.5.1	Expressionsverhalten der TJ-Proteine in der Co-Kultur .....	69
4.5.2	Expressionsverhalten der Glukosetransporter in der Co-Kultur.....	70
4.6	Vergleich der einfachen Inkubation mit der Co-Kultur.....	70
4.7	Betrachtung der Effekte der OGD im Vergleich mit der Normoxie in der Co-Kultur .....	71
4.8	Betrachtung der Toxine IS und IAA .....	71
4.9	Weitere Arbeitsansätze.....	71
5	Zusammenfassung .....	73
6	Abkürzungsverzeichnis .....	75
7	Abbildungsverzeichnis .....	80
7.1	Lizenzrechte der verwendeten Abbildungen.....	87
8	Tabellenverzeichnis .....	89
9	Literaturverzeichnis.....	90
10	Danksagung.....	98
11	Publikation .....	99

## 1 Einleitung

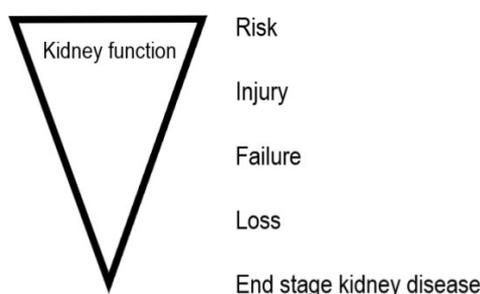
### 1.1 Akutes Nierenversagen

#### 1.1.1 Definition

Das akute Nierenversagen (ANV) beschreibt eine akute, innerhalb von 48 Stunden einsetzende, prinzipiell reversible Abnahme der Nierenfunktion.

Erste Beschreibungen des ANV lassen sich auf William Heberden im Jahre 1802 zurückverfolgen (Heberden 1802; Eknoyan 2002). Jedoch erst der Bericht von Bywaters und Beall, welche während der Bombenangriffe auf London im zweiten Weltkrieg vier Fälle von akutem Verlust der Nierenfunktion im Rahmen von Quetschverletzungen beschrieben, trug zur größeren Beachtung dieses Krankheitsbildes bei. In der Histologie der genannten Fälle zeigten sich Nekrosen der renalen Tubuli (Bywaters und Beall 1941).

2004 wurden die RIFLE-Kriterien publiziert, welche als Akronym für Risk, Injury, Failure, Loss und End-stage kidney disease (englisch (engl.) Risiko, Verletzung, Versagen, Verlust, endgradige Nierenerkrankung) ein Stagingssystem des Schweregrads des ANV bilden, das sich getrennt an dem Serumkreatinin und der Urinausscheidung orientiert. Abbildung (Abb.) 1 zeigt eine Übersicht der Einteilung mit Bezug auf die Nierenfunktion. Dieses System wurde von dem Acute Kindey Injury Network 2007 modifiziert und auf drei Kategorien reduziert (Mehta et al. 2007). 2012 hat die Gruppe des „Kidney Disease – Improving Global Outcomes“ (KDIGO) erstmals eine globale Leitlinie entwickelt, die ebenfalls die Einteilung in drei Stadien aufführt (Khwaja 2012).



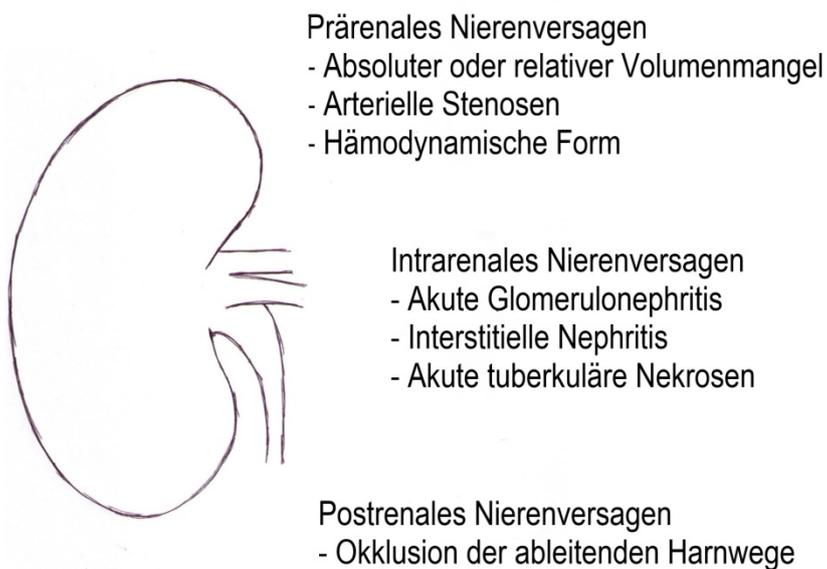
**Abbildung 1:** RIFLE Staging-System (Akronym für Risk – Injury – Failure – Loss – End stage kidney disease (engl. Risiko – Verletzung – Versagen - Verlust – endgradige Nierenerkrankung). Die Schwere des Nierenversagens wird an der Reduktion der Nierenfunktion gemessen (eigene Abbildung).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Das ANV ist aufgrund seiner uncharakteristischen Präsentation im klinischen Alltag ein häufig unterdiagnostiziertes und spät erkanntes Phänomen (Stewart 2009). Studien ergaben eine Inzidenz von ungefähr 7 % - 20 % auf Allgemeinstationen (Nash et al. 2002; Uchino et al. 2006) und bis zu 30 % auf Intensivstationen. Besondere Bedeutung bekommt das ANV im Rahmen von Multiorganversagen (Kierdorf 2006) und Sepsis, bei denen es bei bis zu 50 % aller Fälle zu finden ist (Uchino et al. 2005). Mit Einführung der Nierenersatztherapie konnte die Mortalität von 90 % auf 50 % gesenkt werden (Schrier et al. 2004).

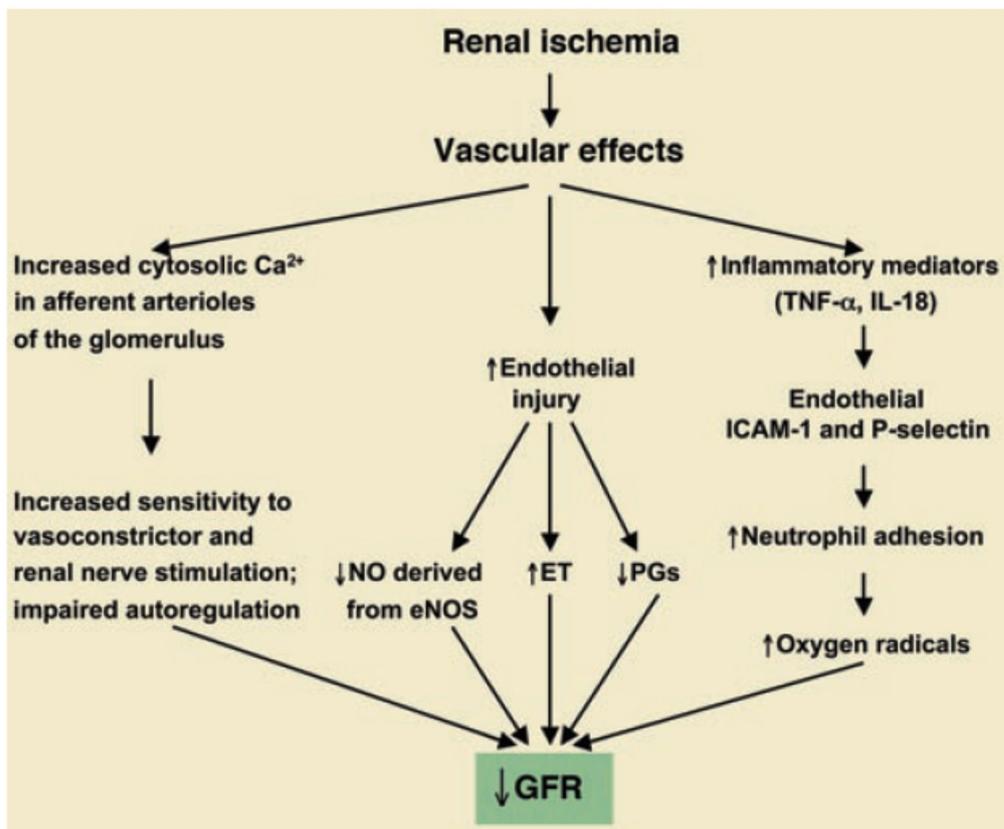
### **1.1.3 Ursachen und Pathophysiologie**

Die Ursachen eines ANV können im Allgemeinen in drei Kategorien oder Formen eingeteilt werden. Die prärenale Form lässt sich auf eine geminderte Perfusion der Niere, ausgelöst durch absoluten oder relativen systemischen Volumenmangel oder Stenosen der versorgenden Gefäße, zurückführen. Erkrankungen der Glomeruli, Tubuli, der Gefäße oder des Nierenparenchyms können ein intrarenales Nierenversagen auslösen. Schließlich bedingt eine Obstruktion der abführenden Harnwege das postrenale Nierenversagen (Lameire et al. 2005). Abbildung 2 fasst die drei unterschiedlichen Formen und ihre jeweiligen Ursachen zusammen.



**Abbildung 2:** Formen des akuten Nierenversagens in 3 Formen entsprechend der Lokalisation der Pathologie (eigene Abbildung).

Unter den beitragenden Faktoren lassen sich auf Intensivstationen vor allem septischer (47,5 %) und kardiogener Schock (26,9 %), Hypovolämie (25,6 %), medikamenten-induziertes Nierenversagen (19 %) oder auch das hepatorenale Syndrom (5,7 %) finden (Uchino et al. 2005). Im Körper des Patienten laufen eine Reihe von Mechanismen ab, die das akute Nierenversagen verstärken. So werden bei einer renalen Ischämie Zytokine und andere Mediatorstoffe ausgeschüttet und die Konzentration an Vasodilatoren sinkt, sodass es zu einer fortschreitenden Vasokonstriktion und somit zur Senkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) kommt (siehe Abb. 3).



**Abbildung 3:** Vaskuläre Faktoren, die zur Pathogenese und schließlich Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) beitragen. (Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS), Endothelin (ET), Interleukin-18 (IL-18), interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), Prostaglandin (PG), Stickstoffmonoxid (NO), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) (Schrier et al. 2004). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink® by Copyright Clearance Center eingeholt.

#### 1.1.4 Klinische Präsentation und Verlauf

Es kommt aufgrund des Funktionsverlustes der Niere sowohl zur Retention von harnpflichtigen Substanzen wie Toxinen oder Abbauprodukten, als auch zu Veränderungen charakteristischer Laborparameter. So ist mit einem erhöhten Serumkreatinin, Elektrolytstörungen, insbesondere mit Kalium-, Kalzium- und Natriumveränderungen, und einem Versagen der Urinproduktion zu rechnen (Kierdorf 2006). Das ANV kann von einer leichten Änderung der Laborparameter bis zur Dialysepflichtigkeit führen (Mehta et al. 2007).

Klinisch ist das ANV besonders durch seine systemischen Komplikationen bedeutsam. So kann es zu respiratorischem Versagen, Ödemen, Blutungen und Enzephalopathie kommen (Stewart 2009). Klassischerweise durchläuft das akute Nierenversagen vier Phasen. Die erste Phase ist die Initialphase, gefolgt

von der Phase des manifesten Nierenversagens über die polyurische Phase bis hin zur Restitutionsphase (Herold 2014).

### **1.1.5 Urämie**

Da die Niere das Blut nicht mehr reinigen kann, sammeln sich fortschreitend harnpflichtige Stoffe im Körper an. Der beschriebene Zustand wird als Urämie, die genannten Stoffe als nephrogene oder urämische Toxine bezeichnet. Im Allgemeinen werden die Toxine anhand ihrer Größe und ihrer Bindungseigenschaften in drei Gruppen eingeteilt. Es finden sich frei wasserlösliche, proteingebundene und mittelgroße Moleküle. In der Vergangenheit konnte eine große Anzahl dieser Stoffe identifiziert, klassifiziert und ihr negativer Einfluss auf den menschlichen Körper erforscht werden. Unter den weit bekannten Stoffen Ammoniak und Harnstoff (Vanholder et al. 2003a; Duranton et al. 2012) finden sich hier die Toxine Indoxylsulfat (engl. Indoxylsulfate (IS)) und Indolessigsäure (engl. indol-3-acetic acid (IAA)). Für diese Stoffe konnte ein „Dioxin-ähnlicher“ Effekt auf Endotelzellen nachgewiesen werden (Gondouin et al. 2013a).

#### **1.1.5.1 Indoxylsulfat**

Indoxylsulfat zählt zu den proteingebundenen, nephrogenen Toxinen (Duranton et al. 2012). Es ist ein organisches Anion und ein Abbauprodukt des Tryptophans. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Indoxylsulfat einen schädlichen Effekt auf unterschiedliche Zelltypen des Körpers hat und eine Rolle im Progress von renalen und kardiovaskulären Erkrankungen haben könnte, da es oxidativen Stress induzieren kann (Yu et al. 2011). IS inhibiert endotheliale Proliferation und Wundheilung (Dou et al. 2004). Es zeigte sich ebenfalls ein negativer Effekt auf die Funktion des Nervensystems bei erhöhten IS-Konzentrationen im Gehirn (Iwata et al. 2007). IS wird über mehrere „organic anion transporters“ (OAT) von den Zellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) aufgenommen (Enomoto und Niwa 2007). Die molare Masse beträgt 251 Da. Die physiologische Konzentration von IS beträgt  $0,6 \pm 5,4$  mg/L, während im ANV Konzentrationen im Mittel Konzentrationen von  $53,0 \pm 91,5$  mg/L gemessen werden können. Spitzenwerte betragen 236 mg/L

(Vanholder et al. 2003b). Im Gehirn konnten Konzentrationen von 30  $\mu\text{M}$  gemessen werden (Ohtsuki et al. 2002). Physiologisch ist die IS-Konzentration im Gehirn weniger als ein Drittel der Serumkonzentration. IS wird weiterhin mit glomerulärer Sklerose und intestinaler Fibrose assoziiert (Niwa und Ise 1994; Miyazaki et al. 1997).

### **1.1.5.2 Indolessigsäure**

Ein weiteres proteingebundenes, jedoch weniger erforschtes Molekül ist die Indolessigsäure, die ebenfalls ein Metabolit des Tryptophans ist (Gondouin et al. 2013a). Es konnte gezeigt werden, dass IAA Zellen negativ beeinflusst und zu Apoptose führen kann (Edamatsu et al. 2014). Indolessigsäure wiegt ca. 175 Da und kann im gesunden Menschen in einer Konzentration von  $17,5 \pm 17,5$   $\mu\text{g/L}$  gemessen werden. Hingegen erreichen Werte im ANV  $875,0 \pm 560,0$   $\mu\text{g/L}$  mit Spitzenwerten von 9076,9  $\mu\text{g/L}$  (Vanholder et al. 2003b). Somit werden Werte bis zu dem 500-fachen des Normwertes verzeichnet.

### **1.1.6 Neurologische Auswirkungen**

Ein bekannter Effekt des Nierenversagens ist die Beeinflussung nervöser Funktionen, insbesondere im akuten Nierenversagen zeigen Patienten neurologische Symptome. Dabei sind sowohl das zentrale als auch das periphere Nervensystem betroffen.

Die urämische Enzephalopathie (UE) zeichnet sich durch ein fluktuierendes Erscheinungsbild aus, welches Schwäche, Müdigkeit, Einschränkungen in Kognition und Erinnerung umfasst, aber auch zu Delir, Meningismus, Hyperreflexie, Krampfanfällen und Koma führen kann. Diese Symptome sind jedoch von dem Bild des Dialyse-Dysäquilibrium-Syndroms abzugrenzen, da dieses kausal auf die Effekte der Dialyse zurückzuführen ist. Die Konzentration von nephrogenen Toxinen korreliert dabei wenig mit der Ausprägung der neurologischen Symptome. Elektroenzephalographien zeigen einen allgemeinen, frontal betont verlangsamten Rhythmus. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion des Metabolismus und der Sauerstoffverbrauches kommt (Burn und Bates 1998). Diese Veränderungen ließen sich jedoch nicht auf eine Unterversorgung mit Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) oder

energiereichen Stoffen zurückführen (Mahoney et al. 1984). Beeinträchtigung von endokrinen Regelkreisen, Elektrolytstörungen und Dysregulation tragen ebenfalls zu dem Bild der UE bei (Brown und Brown 1995). Dialyse kann die Symptome bessern, aber nicht vollkommen korrigieren (Liu et al. 2008). Untersuchungen mittels Magnetresonanztomographie (MRT) ergaben vor allem eine Beteiligung der Basalganglien, der Kortikalis und der weißen Substanz (Kim et al. 2016). Weiterhin kommt es zur Akkumulation von multiplen Neurotransmittern, die direkt oder indirekt durch die Beeinträchtigung von Stoffwechselfvorgängen zu der Symptomatik der UE beitragen könnten (Ohtsuki et al. 2002).

### **1.1.7 Prävention und Therapie**

Es hat sich gezeigt, dass mittels einer sorgfältigen und an die Bedürfnisse des Patienten angepassten Volumenregulation und Vermeidung der Gabe von nephrotoxischen Substanzen wie nichtsteroidalen Antiphlogistika oder Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren das ANV vermieden werden kann (Lameire et al. 2005). Die Gabe von Diuretika, Dopamin, N-Acetylcystein oder Kalziumkanal-Blockern konnte bisher keine signifikante Besserung des Outcomes der Patienten zeigen (Ho und Sheridan 2006).

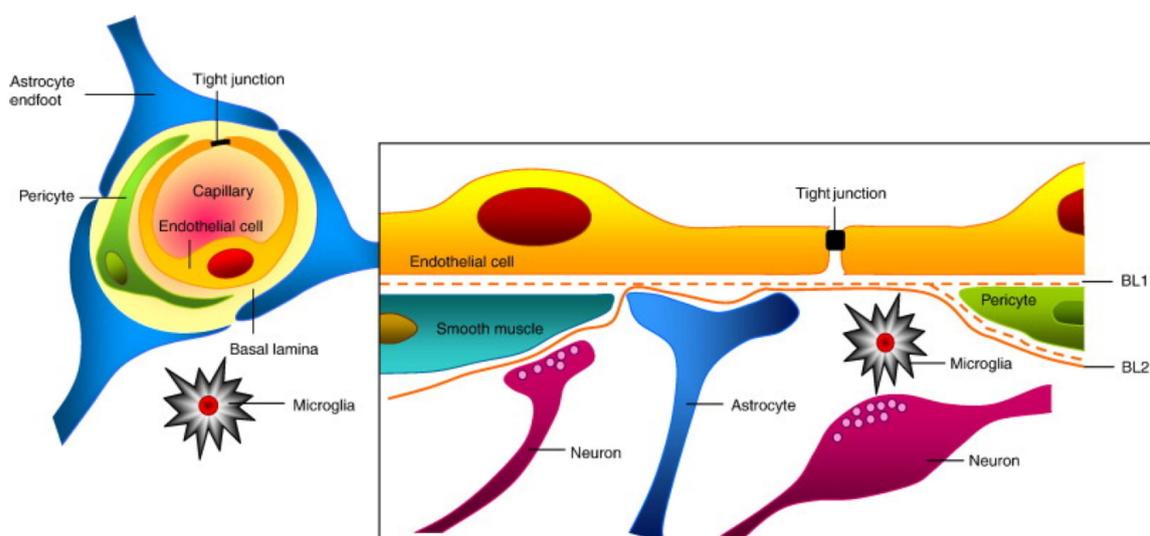
Die Therapie des ANV besteht aus der Elimination der ursächlichen Faktoren, der Vermeidung von Komplikationen und aus der Nierenersatztherapie. Eine auslösende Erkrankung sollte wenn möglich vor der Einleitung einer Therapie identifiziert werden. Die Optimierung der Hämodynamik, des Elektrolyt- und Säure-Basen-Status, der Versorgung mit Nährstoffen, die Regulation des Blutzuckers als auch der Infektionsprophylaxe sind wichtige Bestandteile der nicht invasiven Therapie (Lameire et al. 2005).

Im Mittelpunkt stehen die Verfahren der Nierenersatztherapie. Dazu werden sowohl die intermittierende Hämodialyse als auch die kontinuierliche Hämofiltration genutzt. In Studien zeigte keines der beiden Verfahren einen klaren Vorteil. Es zeichnete sich jedoch ab, dass ein möglichst früher Beginn eines Nierenersatzverfahrens sich positiv auf die Prognose auswirkt (Schrier et al. 2004).

## 1.2 Blut-Hirn-Schranke

### 1.2.1 Funktion

Die Funktionen des zentralen Nervensystems werden von elektrischen und chemischen Signalen gesteuert. Um dieses sensible Mikromilieu aufrecht zu erhalten, benötigt es einer Barriere, die das Gehirn zum einen vom restlichen Kreislauf abgrenzt, es jedoch zum anderen auch mit Nährstoffen versorgt und wichtige Signale des Körpers überträgt. Diese Barriere wird von der sogenannten Blut-Hirn-Schranke gebildet, welche unter anderem aus Endothelzellen der zerebralen Kapillaren besteht. Diese trennt das Gehirn physikalisch mittels fester Zellverbindungen, den sogenannten Tight Junctions (TJ), vom Rest des Blutkreislaufes ab, lässt jedoch aufgrund einer besonderen Ausstattung an Transportmolekülen und Enzymen den Austausch von Stoffen zwischen Gehirn und Blut zu und trägt somit zur Homöostase des Gehirns bei. Die Beschaffenheit der BHS ist dabei dynamisch und passt sich an die Bedürfnisse des Körpers an (Abbott et al. 2006). Die Entwicklung einer solchen Barriere scheint ein wichtiger Schritt in der Evolution hochfunktioneller zentraler Nervensysteme gewesen zu sein (Abbott 2005). Abbildung 4 gibt einen Überblick über den Aufbau der BHS und der beteiligten Zelltypen.



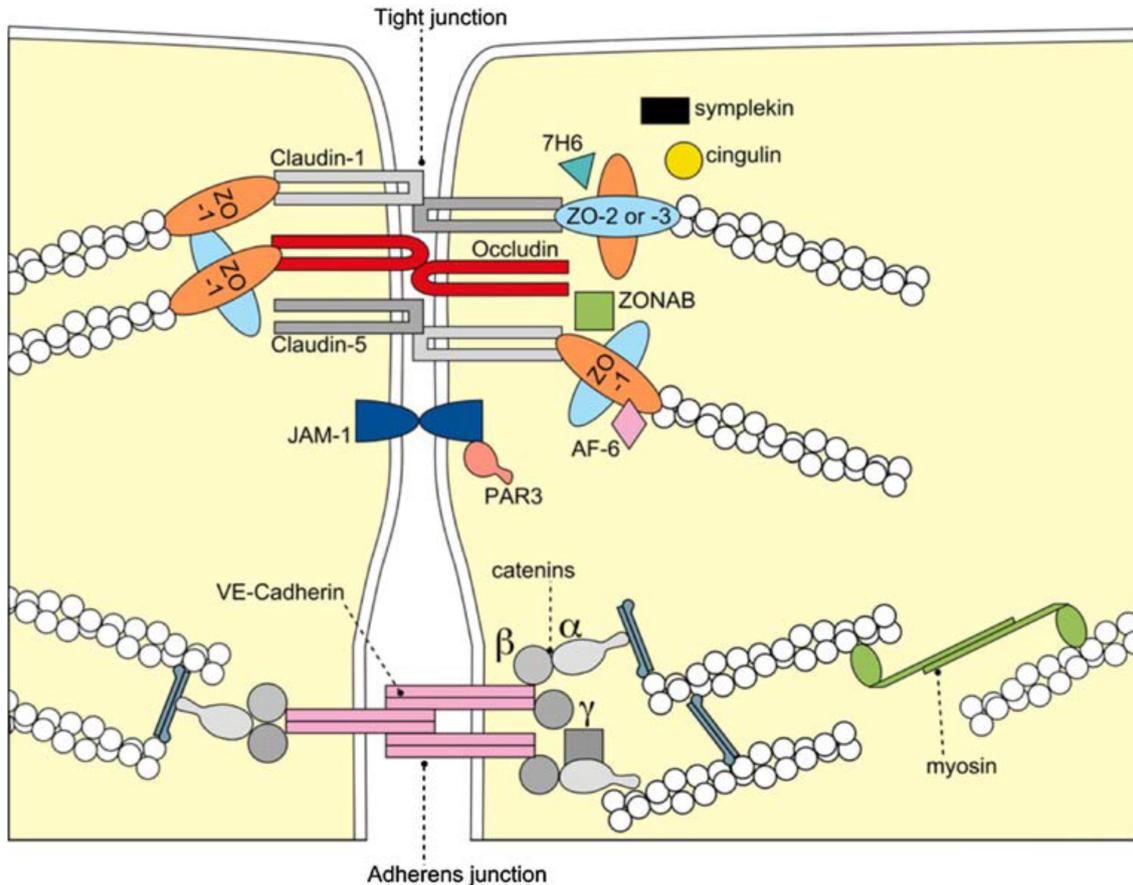
**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke mit beteiligten Zelltypen, Basallamina 1 und 2 (BL1,2) und Tight Junctions (Abbott et al. 2010). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink® by Copyright Clearance Center eingeholt.

### 1.2.2 Aufbau und Tight Junctions

Wie oben genannt, wird die BHS von Endothelzellen der zerebralen Kapillaren gebildet, die die innerste Schicht der Gefäßwand darstellen. Die Zellen sind mittels TJ, auch Zonulae occludentes genannt, miteinander verbunden (Mitic und Anderson 1998), welche sich an den cholesterinreichen Regionen der Plasmamembran finden (Nag et al. 2009). Umhüllt werden die Endothelzellen von Perizyten und Astrozyten, mit denen sie zusammen die sogenannte „neurovaskuläre Einheit“ formen. Der Begriff „neurovaskuläre Einheit“ beschreibt, wie die unterschiedlichen Zellen des Nervensystems (altgriechisch „neuron“ deutsch Nervenzelle) und die Zellen des Gefäßsystems (lat. vas deutsch Gefäß) miteinander verbunden sind. Es konnte gezeigt werden, dass kein Zelltyp des Gehirns für sich alleine arbeitet, sondern ein konstanter Informationsaustausch mit anderen Zellen für die Funktion der Zellen nötig ist. So tragen nicht nur die Endothelzellen, sondern auch Zellen des neuronalen Systems wie Astrozyten, Perizyten, Mikrogliazellen und weitere Komponenten des Gehirnparenchyms zur Integrität der BHS bei (Keaney und Campbell 2015).

TJ schließen einen Gürtel um die Zellen und trennen somit apikale von basolateralen Bereichen der Zellen ab. Elektronenmikroskopische Analysen gaben Aufschluss über die Morphologie dieser Verbindungen. Gebildet werden die TJ aus einem Gefüge von speziellen Proteinen, die entweder mit dem Zytoskelett verbunden oder mittels zytoplasmatischer Plaques in den Zellen verankert sind. Zu diesen akzessorischen Proteinen gehören unter anderem die Zonula occludens-Proteine ZO-1, ZO-2, ZO-3 und Cingulin. Neben den TJ existieren junctionale Adhärensmoleküle (JAMs), welche von Cadherin-Molekülen gebildet werden und eine Rolle für den Aufbau der TJ und die Regulation der Dichte der Kontakte spielen. Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau der TJ. TJ sind jedoch keine einfachen Verschlüsse der interzellulären Spalten, sondern wirken wie Ionen-selektive Poren. Dabei spielt die Struktur der beteiligten Proteine eine Rolle (Sawada et al. 2003; Förster 2008). Eine weitere Proteinklasse, die an der Bildung der Kontakte beteiligt zu sein scheint, sind die Tricelluline. Diese sind dort zu finden, wo drei Zellen aufeinander treffen (Anderson und van Itallie 2009). Interessanterweise ähneln

die endothelialen TJ der BHS sehr den epithelialen TJ (Kniesel und Wolburg 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Zytokine die Funktion der TJ beeinflussen können (Ahdieh et al. 2001).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke (Afadin-6 (AF-6), Anti-TJ-assoziiertes Protein 7H6 (7H6), junctionales Adäsionsmolekül (JAM), Partitionierungsdefekt 3 Homolog (PAR3), vaskuläres, endotheliales Cadherin (VE-Cadherin), Zona occludens assoziiertes Nukleinsäure bindendes Protein (ZONAB), Zonula occludens Protein-1,2,3 (ZO-1,2,3)) (Förster 2008). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung direkt über den Verlag Springer Nature eingeholt.

### 1.2.3 Occludine

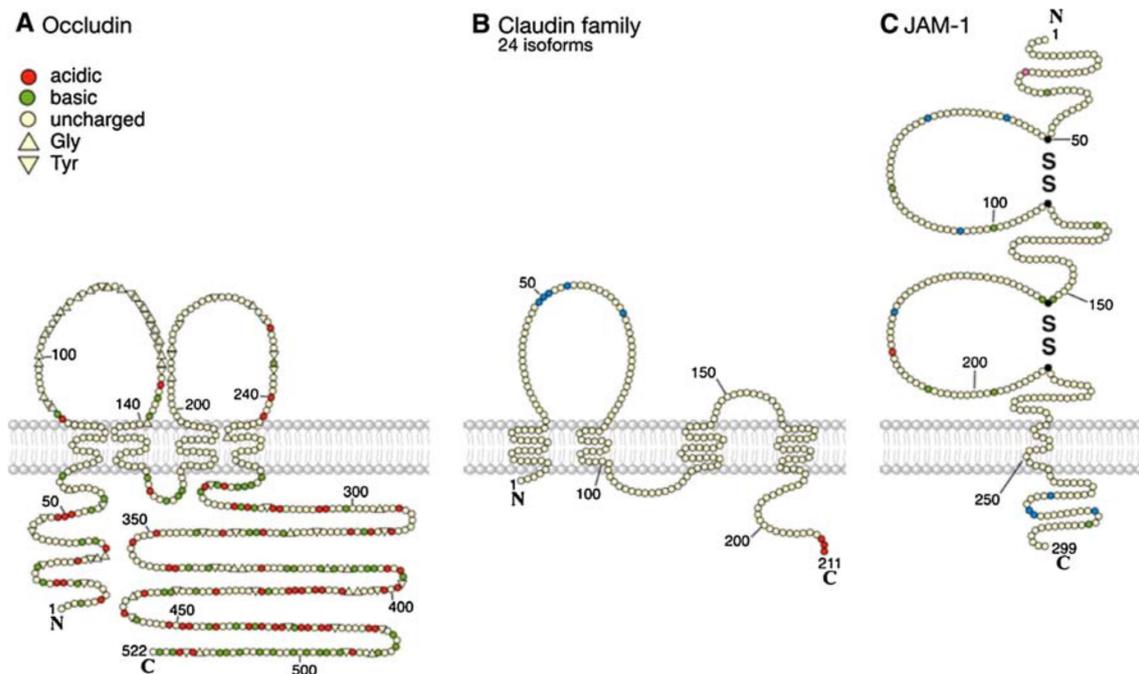
Das rund 65 kDa schwere Protein Occludin konnte 1993 von Furuse als erstes Protein der TJ identifiziert werden. Es besteht aus vier transmembranären Domänen (Furuse et al. 1993). Den Aufbau des Proteins zeigt Abbildung 6. Occludin scheint selbst kein essentieller Bestandteil der Barriere zu sein, jedoch indirekt oder direkt mit anderen Proteinen zu interagieren und somit die Dichtigkeit der TJ zu regulieren, da eine Überexpression mit einem erhöhten transendothelialen elektrischem Widerstand (engl. transendothelial electrical

resistance (TEER)) in Verbindung gebracht werden konnte (Balda et al. 1996). So konnte auch nachgewiesen werden, dass in vitro Gabe von Glukokortikoiden zu einer Hochregulierung von Occludin und erhöhtem TEER führen kann (Förster et al. 2005). Es bindet ebenfalls den TGF- $\beta$  Typ III Rezeptor und spielt eine Rolle im RAF-1-Signalweg (Anderson und van Itallie 2009).

### **1.2.4 Claudine**

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der TJ sind die ca. 23 kDa schweren Proteine der Claudin-Familie, von denen die ersten zwei Mitglieder erstmals 1998 analysiert werden konnten (Furuse et al. 1998). Die Familie umfasst bis heute 24 Untergruppen und zeigt ein gewebespezifisches Expressionsmuster (Förster 2008). Im Gegensatz zu Occludinen deuten Forschungsergebnisse darauf hin, dass Claudine einen wesentlichen Teil zur Schrankenfunktion der TJ beitragen (Furuse et al. 2001). So konnte an Claudin-5-Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass die BHS sich zwar morphologisch unauffällig entwickeln konnte, jedoch die Barrierefunktion hinsichtlich kleiner Moleküle beeinträchtigt wurde (Nitta et al. 2003a). Eine Hypoglykämie kann die Claudin-5 Expression erniedrigen (Sajja et al. 2014).

Mehrere Claudinvarianten wie Claudin-1, -3, -5 und -12 konnten an der BHS nachgewiesen werden. Bereits viel erforscht ist dabei Claudin-5, welches ubiquitär exprimiert wird und ein wichtiger Baustein für den Aufbau und Funktion der BHS ist (Nitta et al. 2003b). Claudine können neben der Einteilung nach ihrem sequenziellen Bau in klassische und nicht klassische Claudine auch nach ihrer Funktion in Barriere-bildende Claudine wie Claudin-1, -3 und -5 und Poren-bildende Claudine wie Claudin-2, -10 und -15 eingeteilt werden. Sie bestehen wie Occludin aus vier transmembranären Domänen und bilden zwei extrazelluläre Schlaufen, von denen die erste größer und die zweite weniger hydrophob als die erste ist (Krause et al. 2008). Abbildung 6 stellt drei wichtige, unterschiedliche transmembranäre TJ-Proteine nebeneinander.

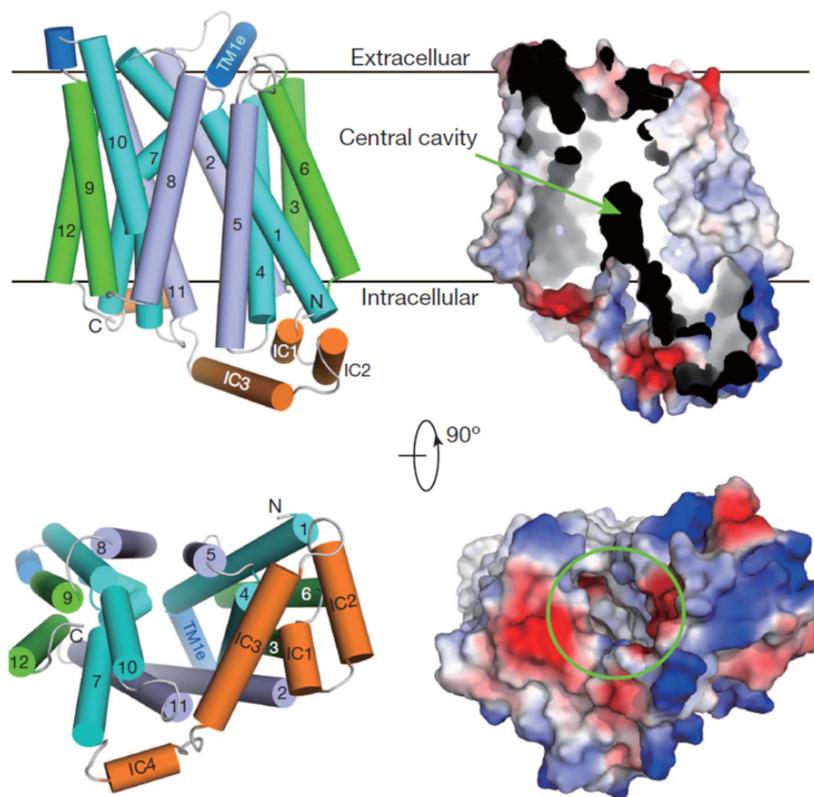


**Abbildung 6:** Schematische Darstellung transmembranärer TJ-Proteine (C-(Kohlenstoff)-Terminus (C), Glycin (Gly), junctionales Adäsionsmolekül (JAM), N-(Stickstoff)-Terminus (N), Tyrosin (Tyr)) (Förster 2008). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung direkt über den Verlag Springer Nature eingeholt.

### 1.2.5 Glukosetransporter

Glucose ist der wichtigste Energielieferant für den menschlichen Körper. Besonders das Gehirn ist auf eine ausreichende Versorgung mit dem Kohlenhydrat angewiesen, eine zu niedrige Konzentration an Glukose im Blut kann zu Krampfanfällen, Bewusstlosigkeit und irreversiblen Zellschaden führen. Im Gegensatz zu anderen Organen kann das Gehirn keine Energie über die Metabolisierung von Fettsäuren gewinnen und ist in Zuckermangelsituationen auf die Versorgung mittels Ketonen angewiesen, die ca. 2/3 des Bedarfs an Energie decken können (Laffel 1999). Ketone beeinflussen nachweislich das Gehirn, so wird eine ketogene Diät als eine Therapieform für Epilepsie genutzt (Si et al. 2017). Positive Effekte für den menschlichen Körper scheinen Ketone auch in Bezug auf chronische Entzündungen und Schmerzen zu haben (Masino und Ruskin 2013). Zwei wichtige Transporter sind bereits genauer erforscht worden: die Glukosetransporter der GLUT-Familie (Glukosetransporter) und die Natrium-abhängigen Glukosetransporter der SGLT-Familie (engl. sodium dependent glucose cotransporter) (Scheepers et al. 2004; Maher et al. 1994).

Das erste Protein der GLUT-Familie konnte 1985 aus einer humanen Hepatomzelle isoliert und klassifiziert werden (Mueckler et al. 1985). Das menschliche Erbgut kodiert für 14 bislang bekannte, unterschiedliche Varianten des Transporters, die sich in ihrem gewebespezifischen Expressionsmuster, ihrer Regulation und Funktion unterscheiden. Das ubiquitär exprimierte Protein GLUT1 ist für die Grundversorgung aller Zellen zuständig (Scheepers et al. 2004), GLUT3 ist der zweitwichtigste Vertreter der GLUT-Proteine für das zentrale Nervensystem (ZNS) (Nishizaki et al. 1995). GLUT1 kann in 2 Formen unterschiedlicher Molekularmasse detektiert werden, die vom selben Gen kodiert werden, sich aber in dem Maße ihrer Glykosilierung unterscheiden. Zerebrale Endothelzellen weisen in vivo eine hohe Konzentration an dem 55 kDa schweren GLUT1-Molekül auf, während die leichtere 45 kDa schwere Form in Astrozyten zu finden ist (Maher et al. 1994). Das Protein bildet 12 transmembranäre Segmente, die sich wiederum auf zwei Domänen aufteilen. Abbildung 7 zeigt die Struktur des Transporters. Das Funktionsprinzip des Transporters beruht auf Diffusion und ist somit ein rein passiver Prozess, der nur in Richtung eines Konzentrationsgradienten ablaufen kann. Die Aufnahme von Glukose ist an die Aufnahme von Wassermolekülen gebunden, wobei auf 40 Wassermoleküle ein Molekül Glukose transportiert werden kann (MacAulay und Zeuthen 2010). Die Dichte der abluminalen Glukosetransporter kann den Bedürfnissen des Gehirns angepasst werden, was Experimente mit Glukose unter Sauerstoff-Entzug hervorgebracht haben (Vemula et al. 2009).

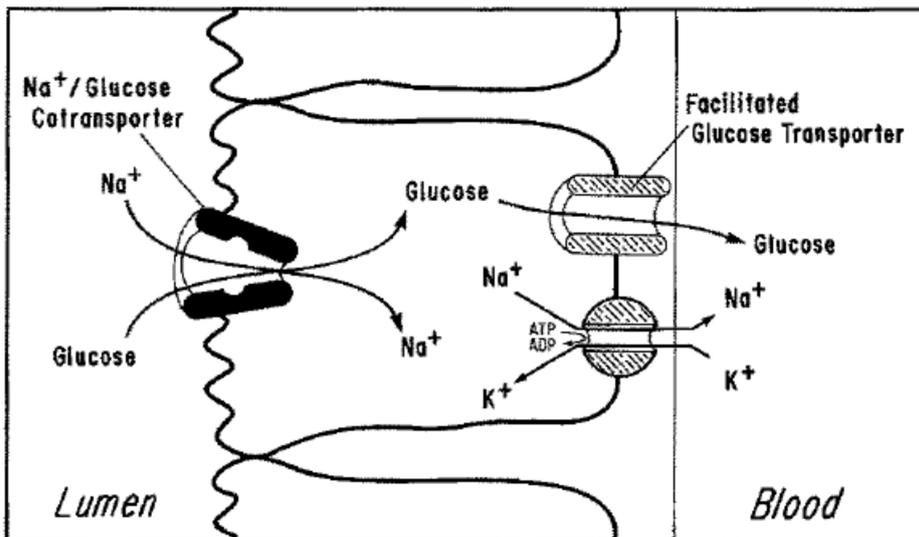


**Abbildung 7:** Struktur des humanen Glukosetransporters 1 (GLUT1) basierend auf Kristallanalysen (C-(Kohlenstoff)-Terminus (C), intrazelluläre Helix 1-12 (IC1-12), N-(Stickstoff)-Terminus (N), transmembranöse Domäne 1e (TM1e)) (Deng et al. 2014). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink® by Copyright Clearance Center eingeholt.

Welche Bedeutung GLUT1 für den menschlichen Körper spielt, lässt sich an dem Bild des GLUT1-Defizit-Syndrom zeigen. So führt bei diesem Krankheitsbild ein genetischer Defekt des Glukosetransporters zu inadäquater Versorgung des Gehirns mit dem Energieträger und folglich zu Epilepsie, Entwicklungs- und Bewegungsstörungen (Chenouard et al. 2015).

Die SGLT-Familie ist eine weitere Klasse der Glukosetransporter, deren Mechanismus jedoch auf sekundär aktivem Natrium-abhängigem Symport beruht. Aktiv bedeutet in diesem Fall, dass für den Transport Energie aufgebracht werden muss. Natrium wird an der basolateralen Membran im Austausch mit Kalium von der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-ATPase aus der Zelle gepumpt. Dem entstanden Natrium-Konzentrationsgefälle folgen die Natriumionen und transportieren Glukose passiv mit in das Zellinnere.

(Scheepers et al. 2004). In Abbildung 9 ist dieser Mechanismus beispielhaft am proximalen Tubulus der Niere dargestellt. Mittels dieses Systems können die SGLT- im Gegensatz zu den GLUT-Transportern Glukose gegen einen Konzentrationsgradienten des Zuckers befördern. Loo et al. konnten nachweisen, dass an den Glukosetransport mittels SGLT1 auch ein Wassertransport gekoppelt ist. So können pro transportiertem Glukosemolekül bis zu 260 Moleküle Wasser transportiert. Im Darm führt dies zu einer Resorption von bis zu 5 Liter Wasser am Tag (Loo et al. 1996). Die transmembranären Proteine sind ca. 662-672 Aminosäuren lang und wiegen ungefähr 73 kDa. Ein dem SGLT1-Protein ähnliches Molekül konnte an der BHS identifiziert werden (Nishizaki et al. 1995), ob es sich dabei jedoch um ein SGLT-Protein handelt, ist bisher ungeklärt (Yu et al. 2013). Ein dem SGLT2 ähnliches Molekül konnte ebenfalls an der BHS detektiert werden (Wais 2012). Untersuchungen an menschlichen Gehirnen nach Schädel-Hirn-Traumata zeigten signifikant erhöhte Konzentrationen von sowohl SGLT1 als auch SGLT2. So scheinen die Glukosetransporter der SGLT nicht nur eine bedeutende Rolle in der Niere, sondern auch an der Blut-Hirn-Schranke zu spielen. Expression der SGLT konnte sowohl auf mRNA- als auf Protein-Ebene sogar im Bereich der Pons, welche sehr früh in der Evolution des Gehirns entstand, nachgewiesen werden (Oerter et al. 2018).



**Abbildung 8:** Mechanismus des intestinalen Glukosetransports am Beispiel der Glukose-Reabsorbtion im proximalen Tubulus der Niere. Glukose wird im Symport mit Natrium entlang eines Konzentrationsgradienten mit Hilfe eines Natrium/Glukose-Cotransporters in die Zelle und passiv mittels eines Glukose-Transporters aus der Zelle transportiert. Natrium wird ATP-abhängig aus der Zelle gefördert (Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Natrium ( $\text{Na}^+$ ), Kalium ( $\text{K}^+$ )) (Hediger et al. 1989). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink<sup>®</sup> by Copyright Clearance Center eingeholt.

### 1.2.6 TJs und ihre Bedeutung für den menschlichen Körper

Wie zuvor beschrieben, bilden die TJ eine Barriere zwischen Blut und Hirngewebe. Welche Bedeutung diese Schranke in Beziehung auf die Funktionsfähigkeit des Gehirns hat, wird deutlich, wenn die BHS im Rahmen von Erkrankungen Schaden nimmt. Diesbezüglich konnte am Beispiel der Multiplen Sklerose gezeigt werden, dass Cytokine wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukine wie Interleukin 1 (IL-1) Veränderungen an der BHS hervorrufen (Weber und Rieckmann 1995). Eine Funktionsstörung an der BHS im Rahmen eines Schlaganfalls kann zu einem Gehirnödem führen (Keaney und Campbell 2015). Braniste et al. konnten in Versuchen mit Mäusen zeigen, dass die mikrobielle Ausstattung des Darms Auswirkungen auf die Claudin-5 und Occludin-Expression und somit auf die Barrierefunktion der BHS haben kann (Braniste et al. 2014).

Auch an anderen Geweben zeigt sich, wie wichtig die TJ für die Funktionalität der Organe ist. So zeigen sich unter anderem beim Morbus Crohn (Weber und Turner 2007) oder bei der diabetischen Retinopathie Abnormalitäten der TJ

(Felinski und Antonetti 2005). Besondere Bedeutung könnten die TJs als Target der Krebstherapie erlangen. Es konnte gezeigt werden, dass TJ eine entscheidende Rolle im Rahmen der Tumorgenese und Metastasierung von Krebszellen spielen (Förster et al. 2002; Salvador et al. 2016). Ebenso beeinflussen TJs die Pathogenität von bakteriellen, viralen oder autoimmunen Erkrankungen. Pathogene Stoffe können dabei entweder direkt die Funktion der TJ-Proteine oder indirekt, wie zum Beispiel über die Aktivierung von Proteinkinasen, die TJ beeinflussen (Sawada et al. 2003).

### **1.2.7 Hirnödem**

Das Hirnödem ist definiert als Zunahme des Hirnvolumens aufgrund von gesteigerter Akkumulation von Flüssigkeit im Parenchym. Neben den beiden wichtigsten Formen, dem vasogenen und zytotoxischem Hirnödem, kann es noch in weitere Formen wie dem hydrozephalischem und osmotischem Ödem eingeteilt werden, wobei in der Klinik meist ein Mischbild mehrerer Formen zu finden ist.

In Bezug auf die BHS ist vor allem das vasogene Hirnödem wichtig, welches von einem Zusammenbruch der BHS verursacht wird. Davon ist insbesondere die weiße Substanz des Gehirns aufgrund seiner hohen Dichte an Gefäßen betroffen (Nag et al. 2009).

Zu Forschungszwecken des Schädel-Hirn-Traumata wurde das sogenannte „controlled cortical impact injury“ (CCI) Modell entwickelt. Hierbei wird kraniotomierten Mäusen durch einen Bolzenschlag auf den Kopf ein externes Trauma zugefügt. Es zeigte sich, dass mit diesem Modell die Pathologie bezüglich intraparenchymalen Blutungen bei Schädel-Hirn-Traumata reproduzierbar simuliert werden kann (Thal et al. 2008).

### 1.3 Ziel der Arbeit

Das akute Nierenversagen ist ein häufiges, doch im klinischen Alltag oft spät erkanntes Krankheitsbild. Problematisch ist insbesondere das Fehlen eines charakteristischen Krankheitsbildes. Denn das ANV betrifft in der Folge eine Reihe von Organsystemen, welche sich mit unterschiedlichen Symptomen präsentieren. Unter anderem kann das ANV das Nervensystem mit dem Bild der urämischen Enzephalopathie betreffen. Tierversuche zeigten erhöhte Werte für die Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP), Von-Keratinozyten-abgeleitetes Chemokin (KC) und Granulozytenkolonien-stimulierender Faktor (G-CSF) im zerebralen Gewebe. Diese Beobachtungen deuten auf eine Entzündungsreaktion hin. Ebenfalls konnte eine erhöhte vaskuläre Permeabilität aufgezeigt werden. Die Dauer des Deliriums im ANV korreliert mit dem Maße der Hypoalbuminämie, welche ebenso ein Marker für eine hohe Letalität des chronischen Nierenversagen ist (Brown und Brown 1995).

Fraglich bleibt, ob die erhöhten Entzündungswerte auf eine intrazerebrale Produktion oder eine gestiegene Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen sind (Liu et al. 2008). Ebenfalls bleibt ungeklärt, ob das ANV ein Hirnödem induziert. Forschungsergebnisse zeigen keine einheitlichen Ergebnisse (Arieff et al. 1973; Liu et al. 2008; Kim et al. 2016).

Im Rahmen des sogenannten „cytokine induced sickness behaviour“ wird eine Relation zwischen Entzündung und Veränderungen im Gehirn, die zu abnormalen, zerebralen Werten von Zytokinen und neurologischen Auffälligkeiten führen könnten, diskutiert (Dantzer 2001). Dabei können manche Zytokine die Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke erhöhen, andere sie erniedrigen (Sawada et al. 2003).

Es wurden bereits mehrere Hypothesen publiziert, wie eine periphere Entzündung das Gehirn beeinflussen könnte (Konsman et al. 2002; Hopkins 2007). Eine Hypothese beschreibt, dass Zytokine an der BHS mit Endothelzellen und Zellen des Immunsystems interagieren und dabei die Barrierefunktion der BHS mindern könnten. Eine andere Erklärung postuliert eine durch urämische Substanzen ausgelöste Kaskade an

Entzündungsreaktionen und konsekutivem Zellschaden (Vanholder et al. 2008). In vielerlei Hinsicht sind die genauen Mechanismen, wie Immunsystem und ZNS miteinander interagieren, ungeklärt (DeLeo und Yeziarski 2001).

Für das urämische Toxin Indoxylsulfat konnte bereits eine neurotoxische Wirkung nachgewiesen werden (Iwata et al. 2007). Es fördert oxidativen Stress, da es die Konzentration von Stickstoffmonoxid reduziert, und kann so zu endothelialer Dysfunktion führen. Dabei wird der toxische Effekt von IS nicht durch Albumin, an welches IS im Serum bindet, gemindert (Stinghen et al. 2014). Ebenfalls konnte für Indolessigsäure, welche sich ebenfalls im Rahmen eines ANV im Blut ansammelt, gezeigt werden, dass sie toxischen Effekt auf Endothelzellen auslösen und zu der hohen Rate an kardiovaskulären Komplikationen im Nierenversagen beitragen könnte (Gondouin et al. 2013a).

Glukose spielt für die Gehirnfunktion eine essentielle Rolle. Es ist nicht nur der Hauptnährstoff der Zellen, sondern konnte in Verbindung mit der Entstehung von Hirnödemen in Verbindung gebracht werden (Wais 2012).

Ziel dieser Arbeit ist es, die Pathomechanismen an der BHS, die zur UE führen, genauer zu untersuchen. Es wurde dazu in unterschiedlichen in vitro Versuchen die Toxizität, die Wirkung auf die Integrität der BHS und mögliche Veränderungen an Glukosetransportern erforscht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Materialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
6-Well Platten	Falcon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Cat. No. 08-772-1B
6-Well-inserts	Greiner Bio-One, Frickenhausen Cat. No. BD 353090
6-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen Cat. No. BD 353046
96-Well Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Cat. No. 167008
Petrischalen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Cat. No. 153066
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Sarstedt, Nürnbergrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Sarstedt, Nürnbergrecht
PVDF-Membran	Bio-Rad, Hercules, USA Cat. No. 1620177
15 mL Röhrchen	Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen Cat. No. 188271
50 mL Röhrchen	Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen Cat. No. 227261
Schaber	Sarstedt, Nürnbergrecht Cat. No. 83.1832
25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen Cat. No. 690175
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen Cat. No. 658175
Gradientengele, NuPAGE® 4 – 12 % Bis- Tris, 1 mm, 15 well	Invitrogen, Carlsbad, USA Cat. No. NP0323BOX

Blotting-Paper	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK Cat. No. 10426972
----------------	--

**Tabelle 1:** Materialien

### 2.1.2 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Absorptionsmessgerät	Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Elektrophoresekammer	Xcell SureLock® Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hypoxiekammer	Hera Cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Imager	FluorChem FC2	CellBiosciences, San Leandro, USA
Inkubator	Stericult 200 Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator	C60	Labotect, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	Ikamag EO-S	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Netzgerät, Elektrophorese	Peqpower 300	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Netzgerät, Tankblot	E835	Consort, Turnhout, Belgien
Rüttelplatte	Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Rüttelplatte	IKA-VIBRAX VXR	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Sonifikator	Sonoplus UW 3080	Bandelin, Berlin, Deutschland

Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbank	HERAsafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tankblot	peqlab PerfectBlue Tank Electro Blotter Web S	VWR International, Erlangen
TEER-Messgerät	CellZscope®	nanoAnalytics, Münster, Deutschland
Thermoblock	Techne DRI- BLOCK DB 2A	Bibby Scientific Limited, Stone, UK
Volt-Ohm-Meter	EVOM	World-Precision Instruments Inc.; New Haven, CT, USA
Waage	Research R 180 D	Sartorius, Bohemia, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5418 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 2:** Geräte

### 2.1.3 Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Antioxidants	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dithiothreitol	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline	Biochrom, Terre Haute, USA
Fetal Calf Serum	Biochrom, Terre Haute, USA
Gelantine	Serva, Heidelberg
Indolessigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Indoxylsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MEM-Vitamine	Biochrom, Terre Haute, USA
Milchpulver	AppliChem, Darmstadt
MOPS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Na-Pyruvat	Biochrom, Terre Haute, USA
NEA-nonessential aminoacids	Biochrom, Terre Haute, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteinasepuffer	Roche, Basel, Schweiz
Protein-Marker V	VWR International, Erlangen
Tris/Acetat SDS Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

**Tabelle 3:** Substanzen

#### 2.1.4 Kulturmedien und Zusätze

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Cat. No. D5796
Endothel Cell Medium	CellBiologics, Chicago, USA Cat. No. M1168
Complete Endothelial Cell Medium (Glucose and Phenol Red Free)	CellBiologics, Chicago, USA Cat. No. GPF1168
Endothel Cell Medium Supplent Kit	CellBiologics, Chicago, USA Cat. No. M1168-Kit

**Tabelle 4:** Kulturmedien und Zusätze

## 2.1.5 Verwendete Primärantikörper

Zielprotein	Hersteller und Originalbezeichnung	Konzentration	Sekundärantikörper
SGLT1	Abcam, Cambridge, Großbritannien Rb pAb to SGLT1 Ab 14686 Cat. No. GR140673-7	1 : 200	anti-rabbit Ig-HRP
SGLT2	Abcam, Cambridge, Großbritannien Rb pAb to SGLT2 Ab 137207 Cat. No. GR105398-2	1 : 200	anti-rabbit Ig-HRP
GLUT1	Merck Millipore, Billerica, USA Anti-GLUT1 Polyclonal antibody Cat. No. #07-1401 #2489080	1 : 100, 1 : 3600	anti-rabbit Ig-HRP
Claudin-5	Invitrogen, Carlsbad, USA Rabbit anti Cld5 Cat. No. 34-1600	1 : 200	anti-rabbit Ig-HRP
Occludin (Inkubation)	Invitrogen, Carlsbad, USA Rabbit anti-occludin Cat. No. 71-1500	1 : 200	anti-rabbit Ig-HRP
Occludin (Co-Kultur)	Santa Cruz, Dallas, USA anti-occludin Guinea pig Ig Cat. No. 0407P0407-D	1 : 50	Goat anti-guinea pig IgG-HRP

$\beta$ -Aktin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Cat. No. A3854 111M4793	1 : 25000	
----------------	---	-----------	--

**Tabelle 5:** Verwendete Primärantikörper

### 2.1.6 Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Konzentration
Goat anti-rabbit	Invitrogen, Carlsbad, USA Cat. No. A11008	1 : 5000
Goat anti-guinea pig	Santa Cruz, Dallas, USA Goat anti-guinea pig IgG-HRP HRP conjugated Cat. No. Sc-2438	1 : 5000

**Tabelle 6:** Verwendete Sekundärantikörper

### 2.1.7 Verwendete Kits

Kit	Hersteller
BCA-Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Cat. No. 23225
EZ4U	Biomedica, Wien, Österreich Cat. No. BI-5000

**Tabelle 7:** Verwendete Kits

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### cEND-Zellen

Es wurde eine murine, zerebrale Endothelzelllinie (cEND) gewählt, welche als Monolayer kultiviert werden konnte. Diese Zelllinie wurde von C. Silwedel aus isolierten Kapillarzellen des Großhirns gewonnen. Drei bis fünf Tage alte Mäuse wurden mittels Kohlenstoffdioxid getötet, bei Raumtemperatur die Großhirne ohne Kleinhirn und Hirnstamm entnommen und die Meningen entfernt. Die Cerebri wurden anschließend in Puffer A gelöst und mit Kollagenase A versetzt und zentrifugiert, um störende tierische Fragmente wie Myelin zu eliminieren. Anschließend wurden die Zellen wie später im Text genauer beschrieben kultiviert (Förster et al. 2005; Förster et al. 2007; Burek et al. 2012). Diese Zellkultur bewährte sich bereits als zuverlässiges Model der BHS (Förster et al. 2007). So zeigen die Zellen Charakteristika wie einen transendothelialen Widerstand von  $300 - 800 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und eine hohe Expression von Occludin und Claudin-5. Zudem konnten Reaktionen auf inflammatorische Stimuli nachgewiesen werden (Helms et al. 2016).

Bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefrorene Zellen wurden zunächst im Wasserbad auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt und anschließend in mit dem dazugehörigen Supplement Kit versetzten Endothelial Cell Medium auf  $75 \text{ cm}^2$  großen Zellkulturflaschen, welche zuvor mindestens für 30 min mit 0,5 % Gelatine beschichtet wurden, bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt inkubiert. In der Folge wurde alle 2-3 Tage das Medium ausgetauscht.

Nach 7 Tagen Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline (PBS)) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 2-4 min mit Trypsin versetzt und im Inkubator warm gehalten, um die Zellen von dem Flaschenboden zu lösen. Im Mikroskop konnte das Lösen der Zellen und die Änderung der interzellulären Struktur kontrolliert werden. Durch Klopfen auf den Zellboden wurde der Lösevorgang beschleunigt. Danach wurde der Ablösevorgang durch Zugabe des Zellmediums gestoppt und die Zellen den jeweiligen Versuchen entsprechend in einem Löseverhältnis von 1 : 2 auf im

Vorfeld mit Gelantine 0,5 % oder Kollagen vorbereiteten Wells ausgesät. Anschließend wurden die Zellen in Endothelial Cell Medium kultiviert.

### Ausdifferenzierung der cEND-Zellen

Damit die Zellen ihre vollen Eigenschaften als Endothelzellen ausbilden, mussten sie vor den Versuchen ausdifferenziert sein. Dies stellt den letzten Schritt in der Ausreifung der Zellen dar. Hierfür wurden die cEND-Zellen in einem speziellen Medium kultiviert, welches nur 1 % Steroid-gestripptes, fetales Kalbsserum (engl. Steroid stripped fetal calf serum (ssFCS)) enthielt. Nach ein bis fünf Tagen konnte eine Veränderung der Zellmorphologie, welche der Ausdifferenzierung der Zellen entsprach, im Mikroskop festgestellt werden. Dieses Vorgehen konnte bereits modifiziert von der Arbeitsgruppe Förster etabliert werden (Förster et al. 2005; Förster et al. 2007).

### HK-2-Zellen

Um ein Modell des ANV simulieren zu können, wurden Nierenzellen benötigt und eine humane Nierenzelllinie (engl. human kidney 2 (HK-2)) ausgewählt. Diese Zellen entstammen aus Cortezellen einer menschlichen Niere, welche mittels eines rekombinanten Retrovirus Gen des humanen Papillomavirus (HPV) 16 E6/E7 immortalisiert werden konnte. Bei einer Immortalisierung mittels HPV 16 E6/7, welche mit den Tumorsuppressoren Protein 53 und Retinoblastom-Protein interagiert, behalten die Zellen gewisse differenzielle und wachstumsregulierende Eigenschaften bei. Die Zelllinie wurde von ATCC<sup>®</sup> (American Type Culture Collection) etabliert. Ryan et al. konnten bei HK-2 phenotypische als auch funktionelle Merkmale von humanen proximalen Nierenzellen feststellen. So zeigen HK-2 junctionale Kontakte, Mikrovilli und für den Bürstensaum typische Enzyme wie alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Glutamytransferase oder Leucin –Amino-peptidase. Desweiteren weisen sie eine Natrium abhängige Glukoseaufnahme und die Fähigkeit zur Glykolyse und Glukoneogenese auf. Ihr Wachstum ist vom endothelialen Wachstumsfaktor (engl. endothelial growth factor (EGF)) abhängig (Ryan et al. 1994).

HK-2-Zellen bewährten sich als Nierenmodell im Rahmen von Forschungsprojekten über das Nierenversagen (Lee et al. 2012).

Die Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle's Medium (DMEM), welches mit 10 % fetalem Kälberseerum (engl. fetal calf serum (FCS)) und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt und dann alle 2 – 3 Tage gewechselt wurde, bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt kultiviert. Alle 7 Tage wurden die Zellen mittels Trypsin voneinander gelöst und in dem Verdünnungsverhältnis 1 : 4 auf mit 0,5 % Gelatine frisch beschichteten 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen verteilt.

### Kulturmedien

Die verwendeten Medien wurden unter der sterilen Bank zusammengestellt. Vor jeder Nutzung wurden die Medien im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, die Flaschen desinfiziert und die Flaschenhalse abgeflammt.

#### Endothelial Cell Medium ((ECM), Kultivierungsmedium für cEND)

500 mL	Endothelial Cell Medium
0,5 mL	Vascular endothelial growth factor
0,5 mL	Endothelial cell growth supplement
0,5 mL	Endothelial growth factor
0,5 mL	Hydrocortison
5 mL	L-Glutamin
5 mL	Antibiotic-Antimycotic Solution
25 mL	Fetal bovine serum

#### Endothelial Cell Medium 1 % ssFCS (Differenzierungsmedium für cEND)

500 mL	Endothelial Cell Medium
0,5 mL	Vascular endothelial growth factor
0,5 mL	Endothelial cell growth supplement
0,5 mL	Endothelial growth factor
0,5 mL	Hydrocortison
5 mL	L-Glutamin
5 mL	Antibiotic-Antimycotic Solution
5 mL	Steroid stripped fetal calf serum

### Endothelial Cell Medium ohne Glukose (OGD-Medium)

500 mL	Endothelial Cell Medium (Glucose and Phenol Red Free)
0,5 mL	Vascular endothelial growth factor
0,5 mL	Endothelial cell growth supplement
0,5 mL	Endothelial growth factor
0,5 mL	Hydrocortison
5 mL	L-Glutamin
5 mL	Antibiotic-Antimycotic Solution
5 mL	Steroid stripped fetal calf serum

### Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM), Kultivierungsmedium für HK-2)

500 mL	Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium
10 mL	L-Glutamin
5 mL	Penicillin/Streptomycin
10 mL	Nicht essentielle Aminosäuren
10 mL	Natriumpyruvat
10 mL	Minimum essential medium
50 mL	Fetal calf serum

### Toxin- und Kontrolllösungen

Da IS ein Kaliumsalz ist, wurde als Kontrolllösung in Wasser gelöstes Kaliumchlorid (KCl) genutzt. IAA wurde aus einem in Ethanol (EtOH) gelösten Bestand entnommen, weshalb Ethanol für IAA als Kontrolllösung genutzt wurde (Gondouin et al. 2013b; Cohen et al. 2007). Toxine und Kontrolllösungen wurden in den dem Versuch entsprechenden Kulturmedien in den entsprechenden Konzentrationen gelöst und verglichen. Wurden die Zellen mit beiden Toxinen inkubiert, wurde als Kontrolle eine Lösung beider Kontrollsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen verwendet.

### Präparation für Toxizitätsmessungen

96-well-Platten wurden mit 0,5 % Gelatine beschichtet und anschließend die cEND-Zellen auf diesen aufgetragen und in ECM kultiviert. Sobald die Zellen einen ebenmäßigen Zellverbund gebildet hatten, wurden sie mit ECM + 1 % ssFCS versetzt, um eine Differenzierung zu induzieren.

### Präparation für TEER-Messungen

Die Zellen wurden auf mit Kollagen beschichteten Transwellkammern für 6-well-Platten (0,4 µm Poren) ausgesät. Die Transwells wurden mit Kollagen befüllt, für 2 h bei 37 °C inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit den Zellen bestückt. Nach 5 Tagen Inkubation bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt wurde das Medium durch ECM mit 1 % ssFCS ausgetauscht. Am 7. Tag erfolgte nach einer Messung der Ausgangswiderstände die Inkubation der Zellen mit den Toxinen, welche zuvor in ECM + 1 % ssFCS gelöst wurden.

### Präparation für Western Blot

Für die Proteinanalysen mittels Western Blots wurden 6-well-Platten mit 0,5 % Gelatine beschichtet, die Zellen hierauf ausgesät und für 5 Tage unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Am 6. Tag erfolge eine Differenzierung mit ECM + 1 % ssFCS. Am folgenden Tag wurden die Zellen den Versuchen entsprechend mit den Toxinen in ECM + 1 % ssFCS inkubiert.

## **2.2.2 Toxizitätsmessung**

### Prinzip der Methode

Der EZ4U-Test (Biomedica) dient der Bestimmung der Zytotoxizität, Zellproliferation oder –aktivierung. Er ist nicht radioaktiv und bedient sich einer Tetrazoliumreduktion. Das fast farblose Na-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat, oft nur kurz XTT genannt, wird von mehreren Dehydrogenasen in den Mitochondrien vitaler Zellen zu Formazanderivaten umgewandelt, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt. In avitalen Zellen unterbleibt die Umwandlung und es geschieht kein Farbumschlag. Die unterschiedlichen Absorbtionsstärken

zwischen den Testzellen lassen sich quantitativ mittels eines Photometers messen (Mosmann 1983; Scudiero et al. 1988).

### Inkubation mit Toxinen

Für die Toxizitätsmessungen wurden die Zellen mit den zuvor genannten Toxinen in den Konzentrationen 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM und einer Kontrolle der Konzentration 1 mM in ECM + 1 % ssFCS für 24 h inkubiert.

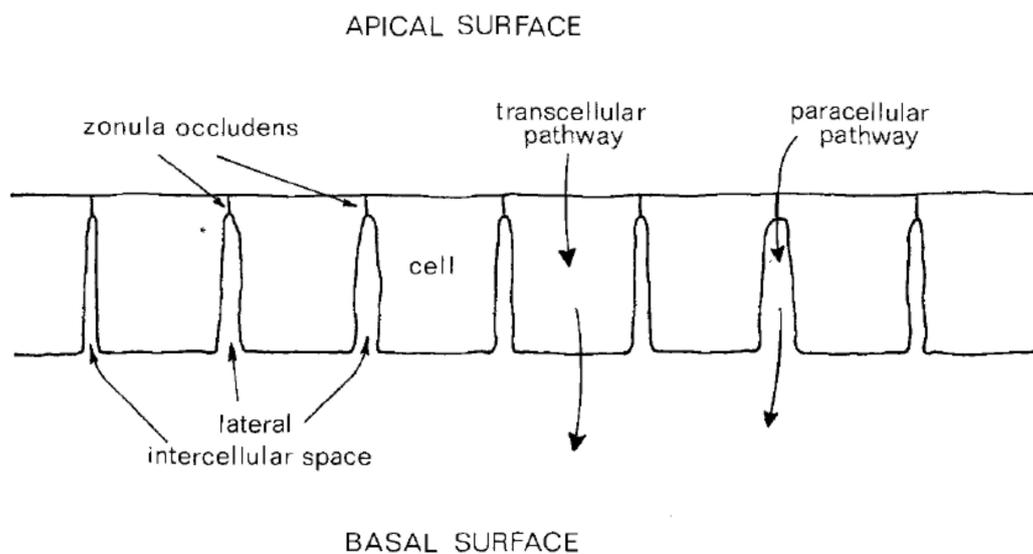
### Durchführung der Toxizitätsmessung

Die Aktivatorsubstanz wurde erwärmt und die Indikatorsubstanz mit dieser versetzt. Daraufhin wurde den Zellen 20 µL der Substanzmischung zugefügt und nach Inkubation bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt nach 30 min und 60 min die Messung der Absorption bei 450 nm gemessen.

## **2.2.3 Transendothelialer elektrischer Widerstand**

### Prinzip der Methode

Wie zuvor beschrieben verhindert die Blut-Hirn-Schranke den unkontrollierten Austausch von Stoffen zwischen Gehirnparenchym und Blut. Das bedeutet ebenfalls, dass der Austausch von Ionen und somit von elektrischer Ladung limitiert wird. Hieraus ergibt sich ein elektrischer Widerstand, welcher von der Anzahl der Occludensjunctionen abhängig ist und sich umgekehrt proportional zu der Anzahl der kleinen, durch die Zellschicht transportierten Moleküle verhält. Stoffe können die Barriere über zwei Wege überwinden: transzellulär mittels Transportern oder parazellulär durch die Verschlusskontakte der Zellen (siehe Abb. 9) (Claude 1978). Der transendotheliale Widerstand (engl. transendothelial electrical resistance (TEER)) kann zur nicht invasiven Messung der Barrieredichte genutzt werden (Czupalla et al. 2014).



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung eines einfachen Endothels mit transzellulären (durch die Zelle) und parazellulären (seitlich an den Zellen vorbei) Transportwegen (Claude 1978). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink® by Copyright Clearance Center eingeholt.

### Durchführung der TEER-Messungen

Die Transwells wurden am Tag vor der Inkubation mit den Toxinen in die Metallbox eines CellZScopes überführt. Diese Box wurde jeweils 30 min vor den Messungen unter die Sterilbank gestellt, damit sie sich der Raumtemperatur angleichen konnte. Nach Desinfektion mit 70 %-igem Alkohol wurde das verwendete Volt-Ohm-Meter vor den Messungen für jeweils 10 min in ECM kalibriert.

Als Leerwert wurde der Mittelwert dreier Transwells bestimmt, die nicht mit Zellen bestückt wurden. Zur Berechnung des transepithelialen Widerstands in [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ] wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{TEER} = (x - y) \cdot z$$

Wobei x der Messwert, y der Mittelwert der Transwells ohne Zellen und z die Filterfläche ist. In diesem Versuchssetting (6-well-Platten) betrug z  $0,33 \text{ cm}^2$ .

### **2.2.4 Proteinpräparation**

Die behandelten Zellen wurden zweimal mit zuvor gekühltem PBS gewaschen. Anschließend wurde pro well 100  $\mu\text{L}$  eiskalter RIPA-Puffer, der im Vorfeld mit Proteinase-Inhibitor versetzt wurde, aufgetragen und die Zellen mit Hilfe eines Schabers abgetragen. Die Lysate wurden im Anschluss eingefroren. Zur

weiteren Präparation wurden die Zellen aufgetaut und anschließend mittels Ultraschall zehnmal für 5 s mit 3 s Pausen homogenisiert. Danach wurden die Proben für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert und der entstandene Überstand abpipettiert. Aus diesem wurden 9 µL für die BCA-Proteinbestimmung entfernt. Dem Rest wurde im Verhältnis 13 : 5 : 2 Lämmli-Puffer und Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt. Es erfolgte eine weitere Ultraschall-Homogenisierung, woraufhin die Zellen wieder eingefroren werden konnten.

### Zusammensetzung des RIPA-Puffers:

50 mM	Tris pH 8,0
150 mM	NaCl
0,1 %	SDS
0,5 %	Sodium Deoxycholate
1 %	NP40

### **2.2.5 BCA-Proteinmessung**

Für die Proteinmengenbestimmung wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific (Produktnummer: 23225) verwendet. Die Methode bedient sich der Bicinchonin- (BCA)- Methode. Diese nutzt die Umwandlung von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  während der Biuret Reaktion (Smith et al. 1985). In der Vorbereitung wurde eine Verdünnungsreihe von 2 µg/mL bis 25 µg/mL BSA einer in dem Kit enthaltenen BCA-Lösung in destilliertem Wasser hergestellt. Aus dieser wurde in doppelter Ausführung eine Kalibrationsreihe von jeweils 25 µL Lösung auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Dann wurden in den Testwells der Platte jeweils 22 µL Wasser und 3 µL der Proben gemischt. Pro Probe wurden 3 Testwells angesetzt. Jedem Well wurde sodann 200 µL der BCA-Reaktionslösung (Substanzen A und B im Verhältnis 50:1) hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt inkubiert. Danach wurde bei 540 nm die Absorption im Photometer gemessen und die Proteinkonzentration der Proben anhand der kompatiblen Kalibrations-BSA-Standardreihe (Albumin-Standard 0 – 1500 µg/mL) bestimmt.

## **2.2.6 NuPage®-Gelelektrophorese**

### Prinzip der Methode

Im elektrischen Feld bewegen Moleküle sich abhängig von ihrer Ladung und ihres Gewichtes unterschiedlich schnell. Dieses Phänomen kann genutzt werden, um Proteine einer Probe voneinander aufzutrennen. Hierzu wird der Probe das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate (SDS)) hinzugefügt, das hochaffin an Proteine bindet. Somit wird eine gleichmäßige negative Ladung der Proteine erzielt und die Moleküle können nun ausschließlich nach ihrem Gewicht voneinander gelöst werden.

### Durchführung

Die Proteine wurden für die Analyse der Glukosetransporter bei 37 °C für einen Zeitraum von 30 min und für die Analyse der TJ-Proteine bei 70 °C für 5 min denaturiert. Es wurden die Gradientengele NuPAGE® 4 – 12 % Bis-Tris, 1 mm, der Firma Invitrogen Thermo Fischer Scientific gewählt, um eine standardisierte und gute Auftrennung der Proteine zu gewährleisten. Die Gele wurden der Verpackung entnommen, mit destilliertem Wasser gespült und in die Elektrophoresekammer eingebaut. Anschließend wurde die Kammer mit NuPage® Tris-Acetate SDS Buffer befüllt. Die Kämme wurden entfernt und die Taschen mit dem Puffer gespült. Um die Molekülgrößen identifizieren zu können, wurden pro Gel mehrere Taschen mit 4 µL des Protein-Marker V befüllt. Es erfolgte eine Beladung der Geltaschen mit 15 µL der Probe. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer an eine Stromquelle angeschlossen und die Proteine wurden bei ca. 80 V und 40 mA für mehrere Stunden in das Gel laufen gelassen, um eine saubere Auftrennung der Proteine zu erzielen.

## **2.2.7 Western Blot**

Um die Proteine weiteren Analysemethoden zugänglich zu machen, wurden sie auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) –Membran übertragen. Hierzu wurde das Verfahren des Semidry Western Blots gewählt.

Die Gele wurden in eine weitere Elektrophoresekammer, die mit NuPage® SDS Running Buffer gefüllt wurde, zusammen mit der Membran, welche in 100 % Methanol 1 min aktiviert wurde, zwischen zwei Graphitplatten und Blotting-

Paper eingebaut (siehe Abb. 10). Ein elektrisches Feld, das orthogonal zu der vorherigen Laufrichtung zeigte, ließ die Proteine vom Gel auf die Membran laufen. Der Transfer erfolgte über Nacht für min. 18 h bei 4 °C und 40 mV pro Gel und 80 V Stromstärke.



**Abbildung 10:** Schematischer Aufbau eines Semidry Western Blots (eigene Abbildung)

Um hydrophobe Bindungsstellen auf der Membran nach der Elektrophorese zu blocken, wurden die Membranen anschließend für 1 h mit 5 % Magermilch in PBS inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen mit den entsprechenden Antikörpern versetzt.

Um die gebundenen Antikörper zu detektieren wurde die Methode der Elektrochemilumineszenz (ECL) gewählt, welche die Lichtemission angeregter Moleküle bei ihrem Rückgang in ihren Grundzustand nutzt (Whitehead et al. 1979). Die Membranen wurden dreimalig mit 0,1 % Tween 20 in PBS für jeweils 10 min gewaschen, für 20 min mit 5 % Magermilch geblockt und anschließend für 2 h mit einem gegen Hasen-Proteinstrukturen gerichtetem und mit einer Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase (HRP)) markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Unspezifische Bindungen dieses Antikörpers wurden im Anschluss mit 0,1 % Tween 20 in PBS dreimalig für 10 min ausgewaschen. Darauf folgte die Behandlung der Membranen mit ECL-Lösung, die aus den ECL-Lösungen I und II zuvor im Verhältnis 1 : 1 hergestellt wurde. Pro Membran wurde je nach Membrangröße 5 – 10 mL genutzt. Die Entwicklung erfolgte am Imager und die Analyse mit der dazu gehörigen Software (AlphaView Version:1.3.0.7, Innovatech Corporation). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ.

Zusammensetzung der ECL-I-Lösung:

250 mM	Luminol
90 mM	Perchlorsäure (PCA)
1 M	Tris (pH 8,8)

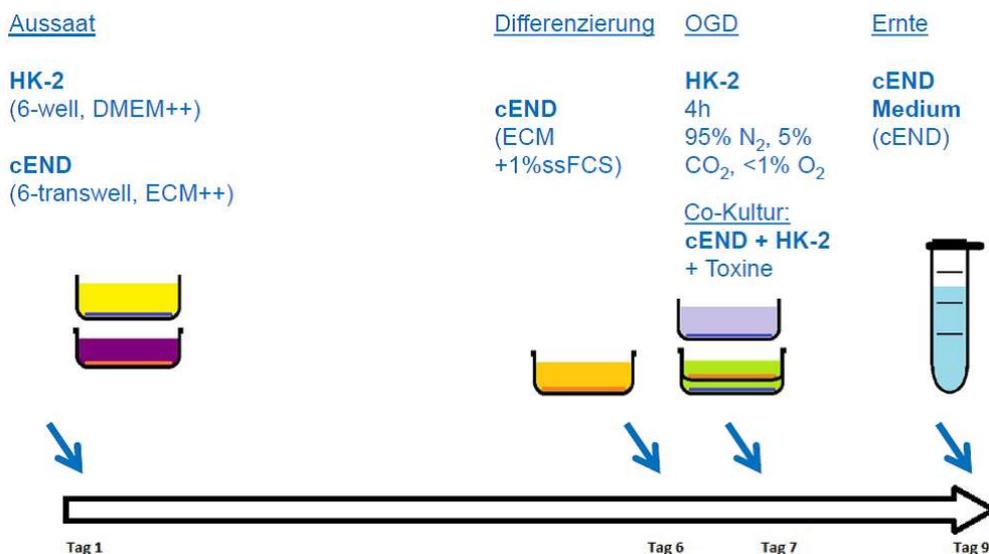
Zusammensetzung der ECL-II-Lösung:

32 µl	Wasserstoffperoxid
5 mL	Tris 1 M (pH 8,8)

### 2.2.8 Co-Kultur

Nach den ersten Untersuchungen mittels TEER und Western Blot zeigte sich, dass die Versuchsbedingungen nicht zu ausreichend validen Ergebnissen führten. Deshalb wurde ein Modell entwickelt, welches den Bedingungen in vivo ähnelt und mit dem die Interaktion zwischen geschädigten Nierenzellen und zerebralen Endothelzellen untersucht werden kann.

Dazu wurden cEND-Zellen in 6-Transwells mit einer Porengröße von 0,4 µm auf Kollagen und Nierenzellen des HK-2-Typs in 6-wells auf Gelatine ausgesät und getrennt voneinander bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt inkubiert. Am 6. Tag der Kultivierung wurden die cEND-Zellen mit ECM + 1 % ssFCS ausdifferenziert. Am Folgetag wurde an den HK-2-Zellen ein Sauerstoff-Glukose-Entzug (engl. oxygen-glucose deprivation (OGD)) durchgeführt. Im Anschluss wurden das Medium der cEND-Zellen mit Medium von HK-2-Zellen, die eine OGD erfahren hatten, ausgetauscht und die Endothelzellen auf Wells der verbliebenen Nierenzellen gesetzt. Daraufhin wurden den Zellen die Toxine entweder einzeln oder in Kombination hinzugefügt. Zudem wurde das Medium um Glukose ergänzt. In einer Versuchsreihe, welche als Standardwert diente, wurden den Zellen keine Toxine zugeführt. Zudem wurden parallel cEND-Zellen ohne HK-2-Zellen kultiviert. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt wurden die cEND-Zellen wie in 2.2.3 beschrieben geerntet. Anschließend wurden die cEND-Zellen mittels Western Blot wie in 2.2.5, 2.2.6 und 2.2.7 beschrieben analysiert (siehe Abb. 11).



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Co-Kultur von humanen Nierenzellen-2 (HK-2) und cerebrallen (murinen) Endothelzellen (cEND). HK-2- und cEND-Zellen wurden primär getrennt voneinander gezogen. Am 6. Tag wurden die cEND-Zellen differenziert und am 7. Tag wurden die HK-2-Zellen einer OGD (oxygen-glucose deprivation) zugeführt. Danach wurden die Zellen zusammen kultiviert, Glukose und Toxine hinzugeführt und am 9. Tag geerntet (1% steroidgestripptes fetale Kalbsserum (1% ssFCS), Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium (DMEM++), endotheliales Zellmedium (ECM++), Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), Sauerstoff (O<sub>2</sub>), Stickstoff (N<sub>2</sub>)) (eigene Abbildung).

### 2.2.9 Oxygen-glucose deprivation

Um einen Gewebeschaden, wie er im akuten Nierenversagen zu beobachten ist, in vitro zu simulieren, wurde das Modell des Sauerstoff-Glucose-Entzugs, auch oxygen-glucose deprivation (OGD) genannt, gewählt. Dieses Modell bewährte sich bereits als gute Simulation der renalen Ischämie (Sauvant et al. 2009). Während der Inkubation wird die Sauerstoff-Fraktion kontinuierlich unter 1 % gehalten. Dies entspricht einem Sauerstoffpartialdruck von 7,6 mmHg, das dem Bereich von experimentell abgeklemmten Nieren (Nelimarkka und Niinikoski 1984) entspricht und weit unter dem von den Nierenzellen benötigten Druck liegt (Leichtweiss et al. 1969).

Die HK-2-Zellen erhielten DMEM + Penicillin/Streptomycin ohne Glukose und wurden bei 95 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und <1 % O<sub>2</sub> für 4 h inkubiert. Das Mediumvolumen pro well betrug 1,5 mL. Daraufhin wurde wie in 2.2.3 fortfolgend beschrieben vorgegangen.

### **2.2.10 Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel<sup>®</sup>. Es werden im Folgenden Mittelwerte und jeweilige Standardabweichung für Stichproben angegeben. Zur statistischen Analyse der Kontrolle und der jeweiligen Probe wurde der t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Daten der Co-Kultur wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (analysis of variance = ANOVA) auf die Wechselwirkung mehrerer Faktoren geprüft. Bei  $P < 0,05$  wurde ein statistisch signifikanter und bei  $P < 0,01$  ein stark signifikanter Unterschied angenommen.

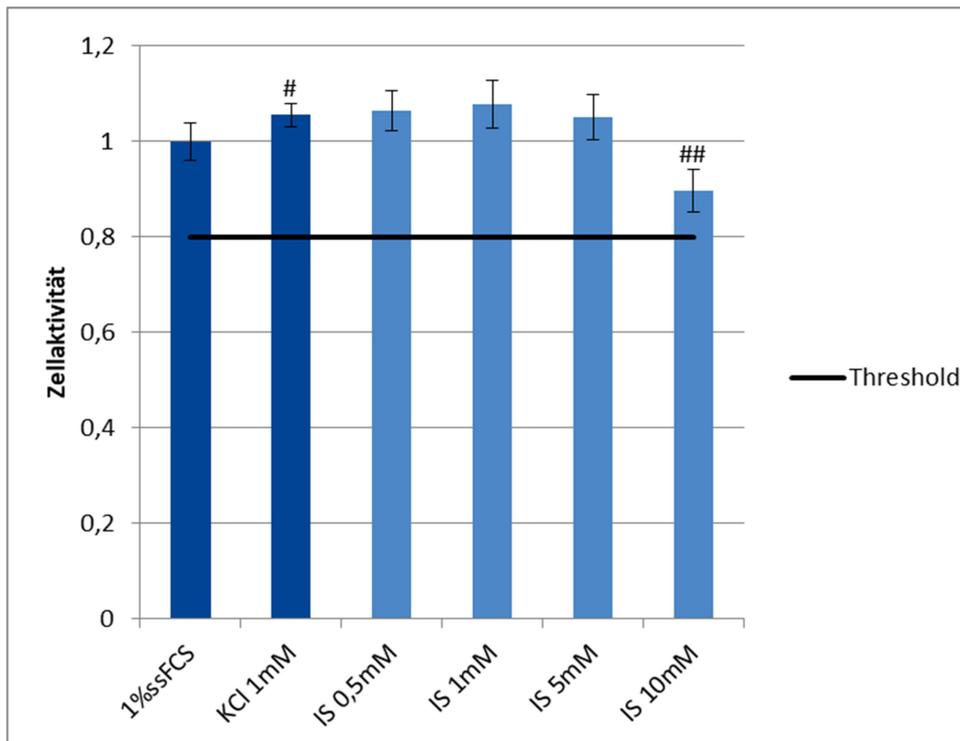
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Festlegungen von subtoxischen Toxinkonzentrationen

Zu Beginn wurden Konzentrationen gewählt, die im Bereich der im Serum von Patienten im akuten Nierenversagen gemessenen Toxinkonzentrationen lagen (Vanholder et al. 2003b). Getestet wurden Konzentrationen für IS zwischen 0,1 mM und 10 mM und für IAA zwischen 5  $\mu$ M und 10 mM. Die Inkubationsdauer betrug 24 h.

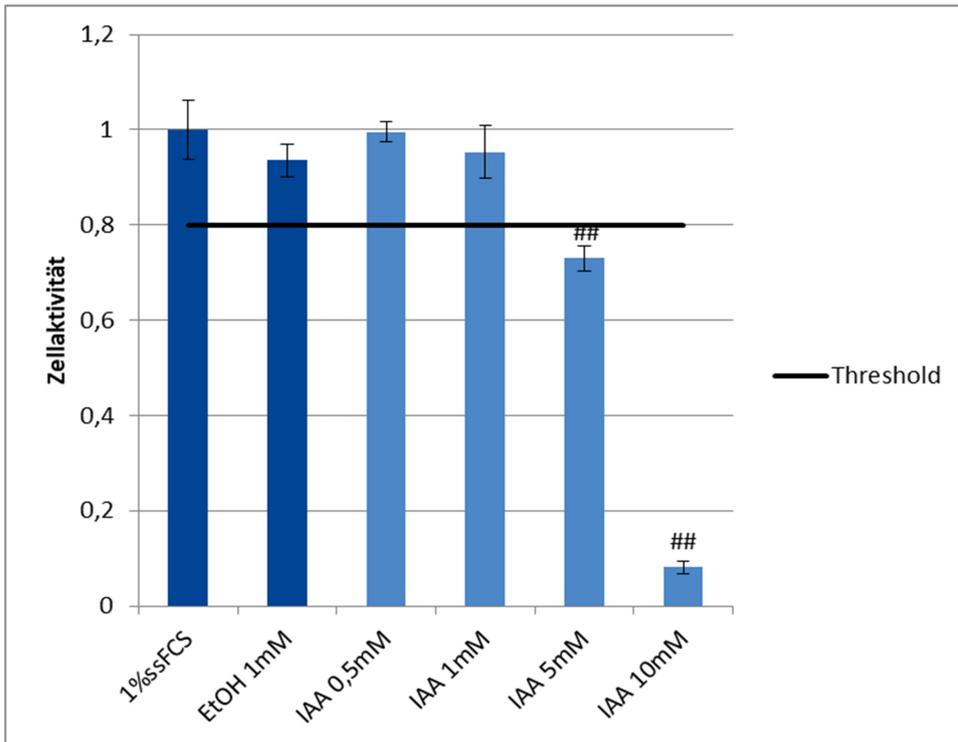
Um die Toxinkonzentrationen der Zelllinie cEND in einem subtoxischen Bereich anpassen zu können, wurden Messung mittels des EZ4U-Tests durchgeführt. Dieser Test misst den Anteil vitaler Zellen in einer Probe. Als toxischen Schwellenwert (threshold) wurde eine Zellvitalität von 80 % angenommen.

Inkubation mit der Kontrolllösung KCl 1 mM führte zu einer Erhöhung der Vitalität auf  $1,05 \pm 0,02$  im Vergleich zu mit 1 % ssFCS behandelten Zellen. Diese Beobachtung konnte mit einem Signifikanzwert von  $P < 0,05$  gesichert werden. Mit IS behandelte Zellen in den Konzentrationen 0,5 mM, 1 mM und 5 mM zeigten keine signifikanten Veränderungen der photometrisch gemessenen Mengen umgesetzter Substanz. Somit konnte auf keine signifikante Änderung der Zellaktivität geschlossen werden. Eine Konzentration von 10 mM IS zeigte eine signifikante Reduktion der Zellaktivität von  $0,9 \pm 0,04$  im Vergleich zu einer Konzentration von 5 mM mit einer Zellaktivität von  $1,05 \pm 0,05$ . Der P-Wert lag hierbei  $< 0,01$  (siehe Abb. 12).



**Abbildung 12:** XTT-Reduktionstest EZ4U: Abhängigkeit der Zellaktivität von der Konzentration von Indoxylsulfat (IS) und Kaliumchlorid (KCl) unter Inkubation für 24 h. Alle Werte wurden ins Verhältnis zu 1% Steroid-gestripptem, fetalem Kalbsserum (1 % ssFCS) gesetzt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (Kontrolle für KCl: 1 % ssFCS, Kontrolle für IS: KCl 1 mM) im t-Test wurde wie folgt markiert: # P <0,05, ## P <0,01. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellaktivität der Zellen, welche mit 1 mM KCl behandelt wurden, im Vergleich zu denjenigen, die mit 1% ssFCS behandelt wurden (P <0,05). Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellaktivität von den Zellen, welche mit 10 mM IS behandelt wurden, im Vergleich zu denjenigen, die mit 1 mM KCl behandelt wurden (P <0,01). Threshold: 80% Zellaktivität

IAA zeigte in den in vivo beobachteten Konzentrationen keinen toxischen Effekt auf die Gehirndothelzellen (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Konzentrationen wurden daraufhin auf 0,5 mM, 1 mM, 5 mM und 10 mM erhöht. Unter IAA konnten Unterschiede der Zellaktivität bei Konzentrationen von 1 mM mit einer Zellaktivität von  $0,95 \pm 0,06$  im Vergleich zu 5 mM mit einer Aktivität von  $0,73 \pm 0,03$  und im Vergleich von 5 mM zu 10 mM mit einer Aktivität von  $0,08 \pm 0,01$  aufgezeigt werden. Diese Veränderungen konnten jeweils mit einem Signifikanzwert P <0,01 gesichert werden (siehe Abb. 13).

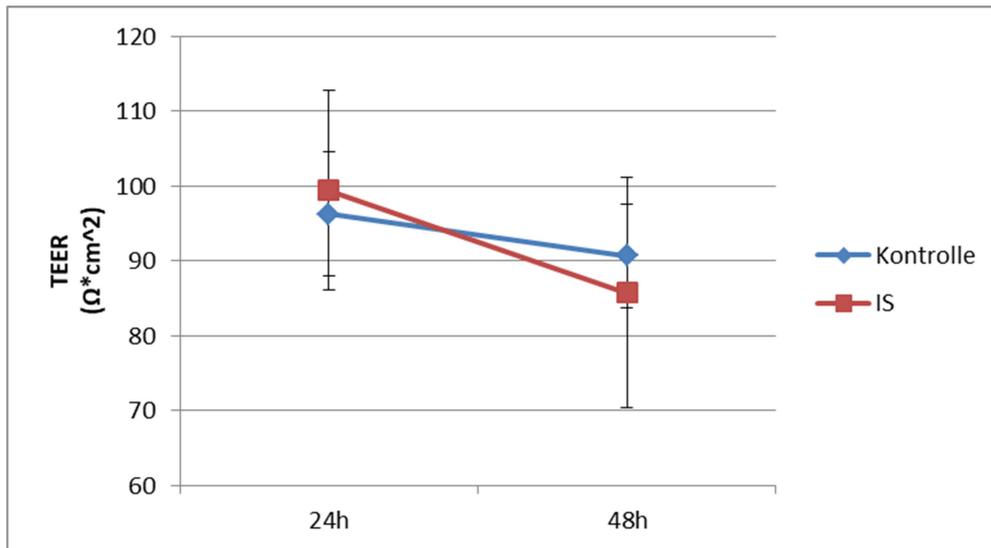


**Abbildung 13:** XTT-Reduktionstest EZ4U: Abhängigkeit der Zellaktivität von der Konzentration von Indolessigsäure (IAA) und Ethanol (EtOH) unter Inkubation für 24 h. Alle Werte wurden ins Verhältnis zu 1% Steroid-gestripptem, fetalem Kalbsserum (1 % ssFCS) gesetzt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (Kontrolle für EtOH: 1 % ssFCS, Kontrolle für IAA: EtOH 1mM) im t-Test wurde wie folgt markiert: ## P <0,01. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellaktivität der Zellen, welche mit 5 mM IAA behandelt wurden, im Vergleich zu denjenigen, die mit 1 mM EtOH behandelt wurden (P <0,01). Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellaktivität der Zellen, welche mit 10 mM IAA behandelt wurden, im Vergleich zu denjenigen, die mit 1 mM EtOH behandelt wurden (P <0,01). Threshold: 80% Zellaktivität

Da IS als auch IAA in einer Konzentration von 1 mM im sicher subtoxischen Bereich lagen, wurde diese Konzentration für alle folgenden Experimente gewählt.

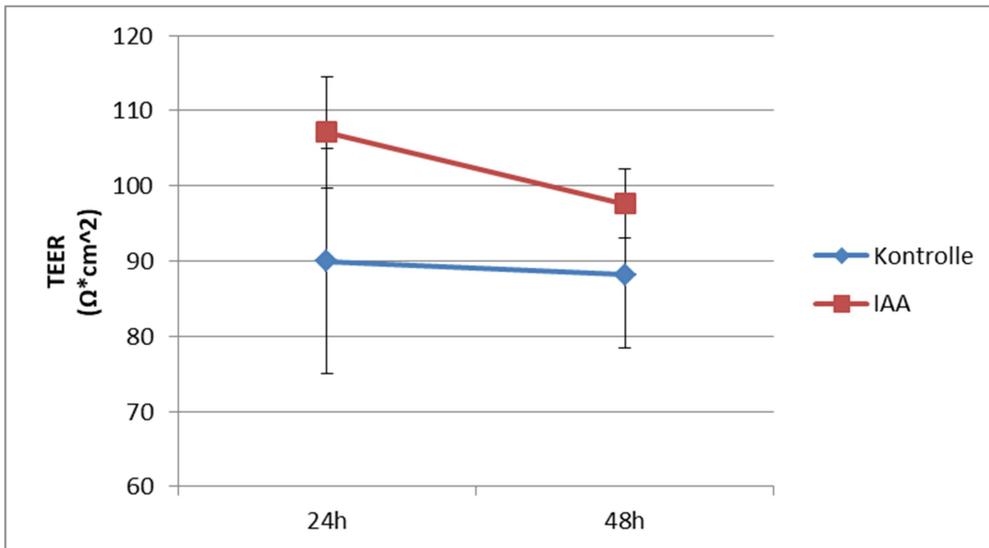
### 3.2 Einfluss von IS und IAA auf den elektrischen Widerstand der BHS

Nach Inkubation mit IS für 24 h betrug der TEER-Wert  $99,4 \pm 13,28 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei einem Kontrollwert von  $96,25 \pm 8,27 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Nach 48 h konnten Werte von  $85,75 \pm 15,38 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei einem Kontrollwert von  $90,65 \pm 6,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$  gemessen werden. Die Unterschiede erreichten keine statistische Signifikanz (siehe Abb. 14).



**Abbildung 14:** TEER-Messung: Abhängigkeit der TEER-Werte von der Dauer der Inkubation mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) für 24 h und 48 h. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der TEER-Werte der mit IS behandelten Zellen im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid).

Der TEER-Wert betrug nach 24 h Inkubation der Zellen mit IAA  $107,1 \pm 7,36 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und nach 48 h  $97,65 \pm 4,64 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei Kontrollwerten von  $89,95 \pm 14,96 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und  $88,2 \pm 9,79 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Die beschriebenen Unterschiede zeigten keine statistische Signifikanz (siehe Abb. 15).

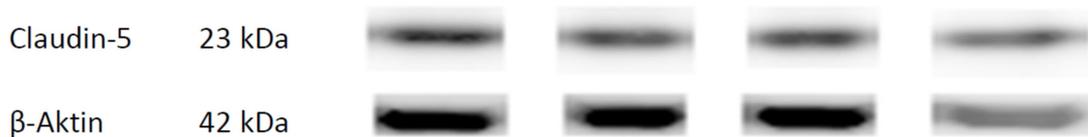
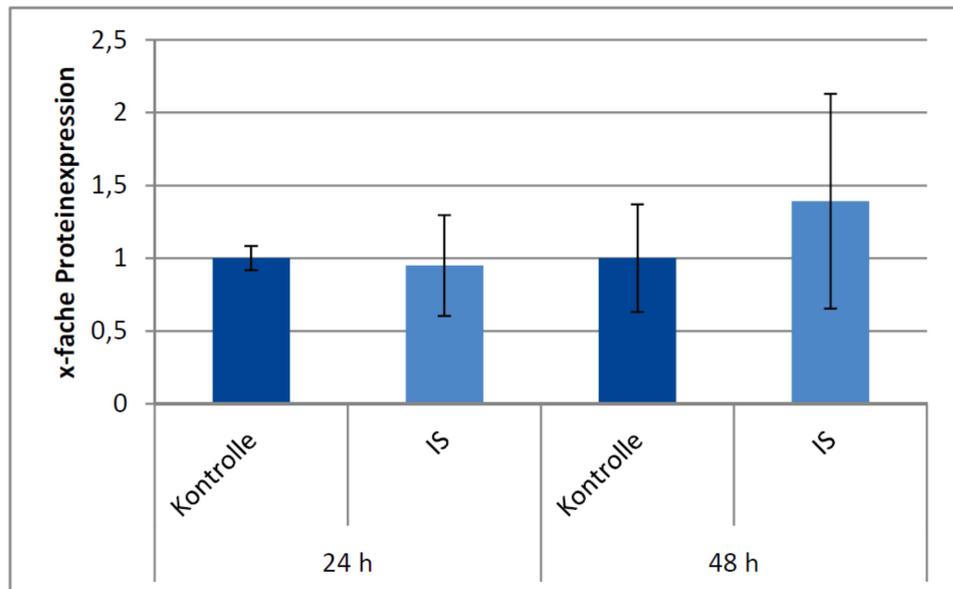


**Abbildung 15:** TEER-Messung: Abhängigkeit der TEER-Werte von der Dauer der Inkubation mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) für 24 h und 48 h. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der mit IAA behandelten Zellen im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM Ethanol).

### 3.3 Einfluss von IS und IAA auf TJ-Proteine und Glukosetransporter

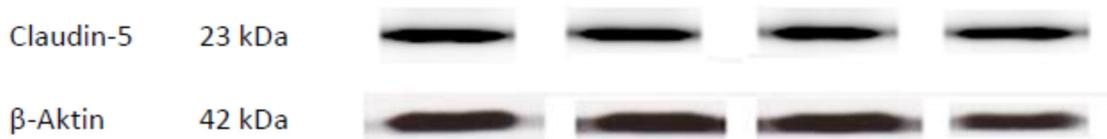
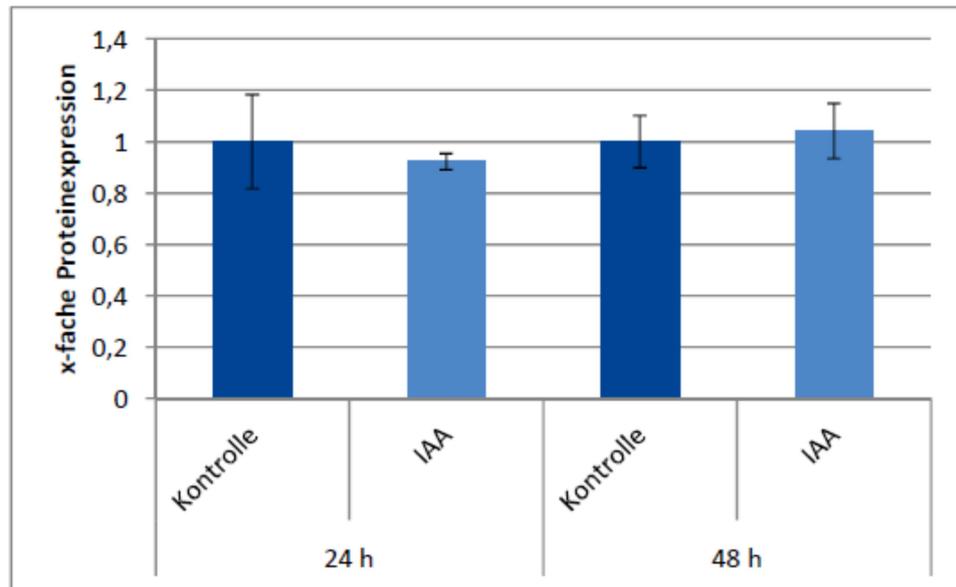
#### 3.3.1 Claudin-5

Unter Inkubation mit IS zeigte sich nach 24 h keine relevante Veränderung der Claudin-5-Protein-Expression. Nach 48 h zeigte sich eine Erhöhung der Expression um das 0,4-fache des Kontrollwerts, die keine statistische Signifikanz erreichte (siehe Abb. 16).



**Abbildung 16:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin.

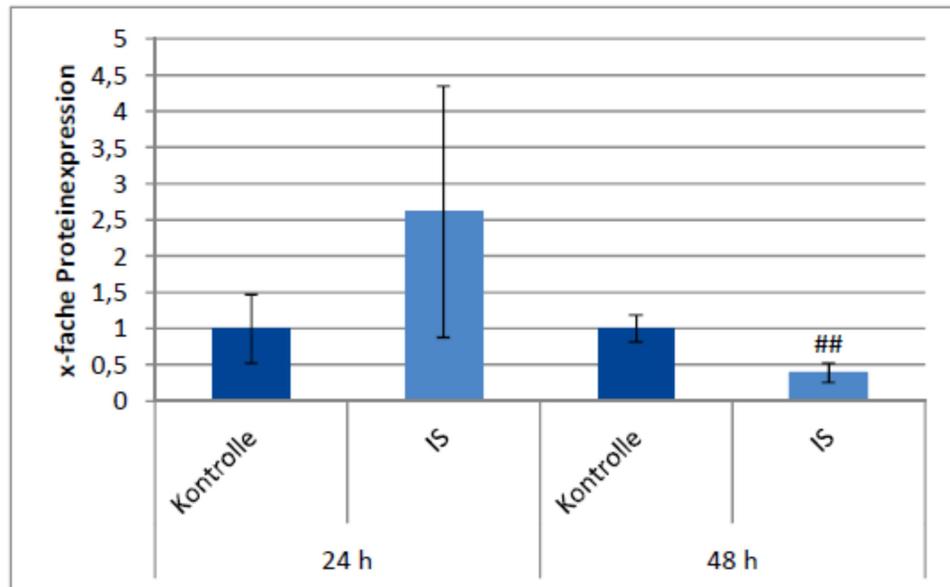
Claudin-5 betrug nach 24 h Inkubation mit IAA das 0,9-fache des Kontrollwerts ohne statistische Signifikanz zu erlangen. Nach 48 h Inkubation mit dem Toxin konnte mittels semiquantitativer Analyse keine relevante Veränderung festgestellt werden (siehe Abb. 17).



**Abbildung 17:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol). Ladekontrolle: β-Aktin.

### 3.3.2 Occludin

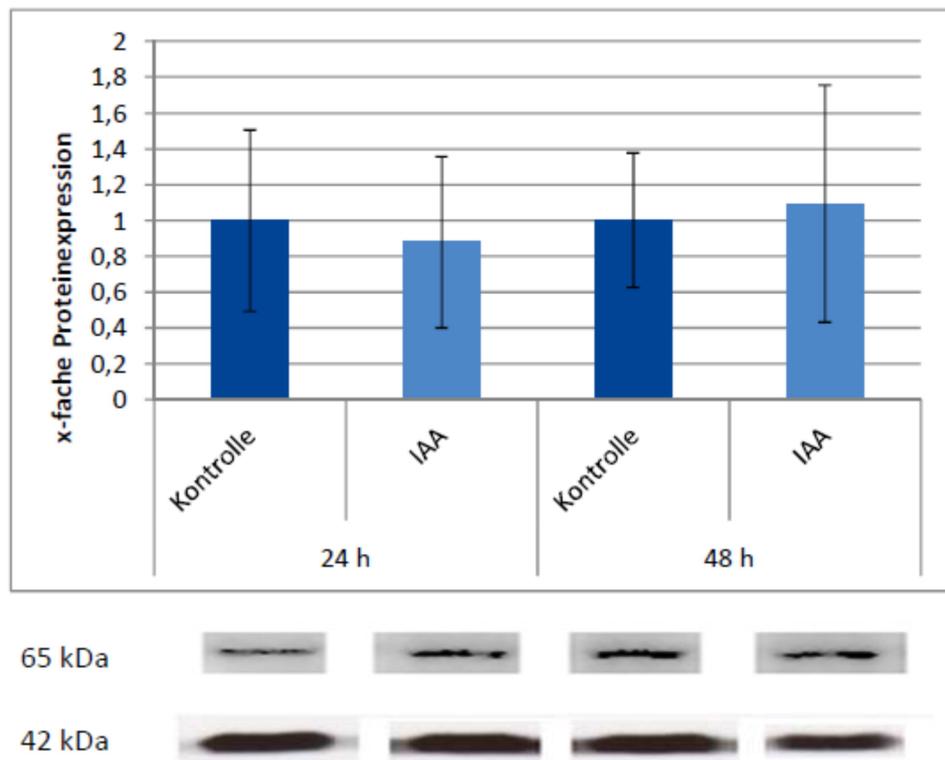
Unter IS zeigte sich nach 24 h eine Erhöhung der Proteinexpression um das 2,6-fache des Kontrollwerts, die keine statistische Signifikanz erreichte. Nach 48 h verzeichnete die Proteinkonzentration eine Senkung auf das 0,4-fache des Kontrollwertes. Mit einem P-Wert von 0,1 konnte eine starke, statistische Signifikanz festgestellt werden (siehe Abb. 18).



**Abbildung 18:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid) im t-Test wurde wie folgt markiert: ## P < 0,01. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der detektierten Occludin-Proteinmenge der Zellen, welche mit IS für 48 h behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle (P < 0,01). Ladekontrolle: β-Aktin.

## Ergebnisse

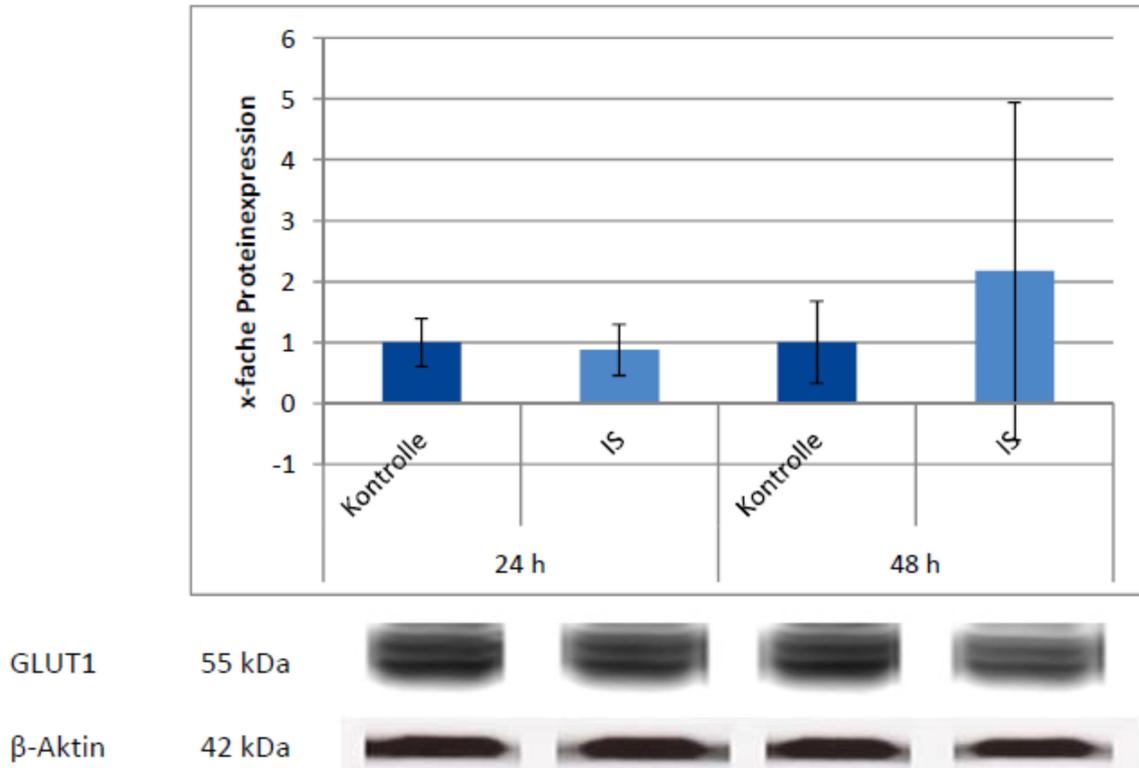
Es konnte eine erniedrigte Konzentration an Occludin nach 24 h Inkubation mit IAA um das 0,9-fache des Kontrollwertes ohne statistische Signifikanz festgestellt werden. Nach 48 h Inkubation mit dem Toxin zeigte sich eine nicht signifikant erhöhte Konzentration auf des 1,1-fache des Kontrollwertes (siehe Abb. 19).



**Abbildung 19:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin

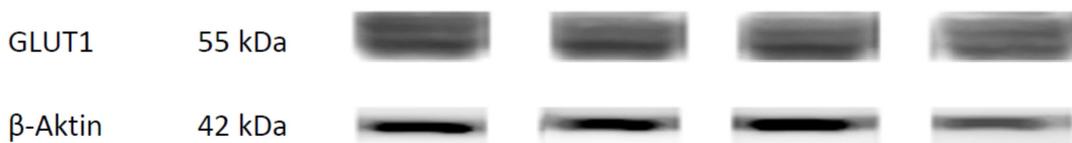
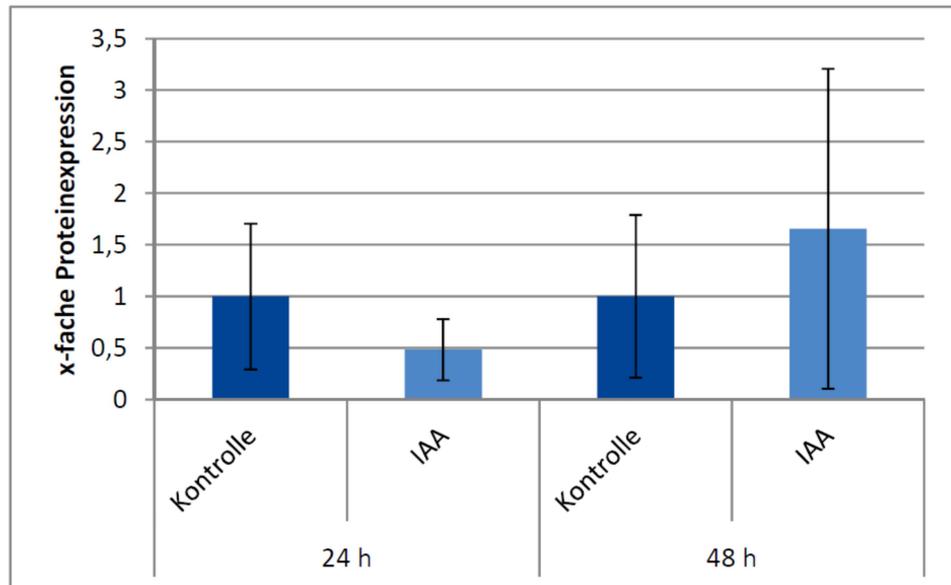
### 3.3.3 GLUT1

Die Proteinexpression von GLUT1 betrug nach Inkubation mit IS für 24 h das 0,9-fache und nach 48 h das Doppelte des jeweiligen Kontrollwertes, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erlangen (siehe Abb. 20).



**Abbildung 20:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin

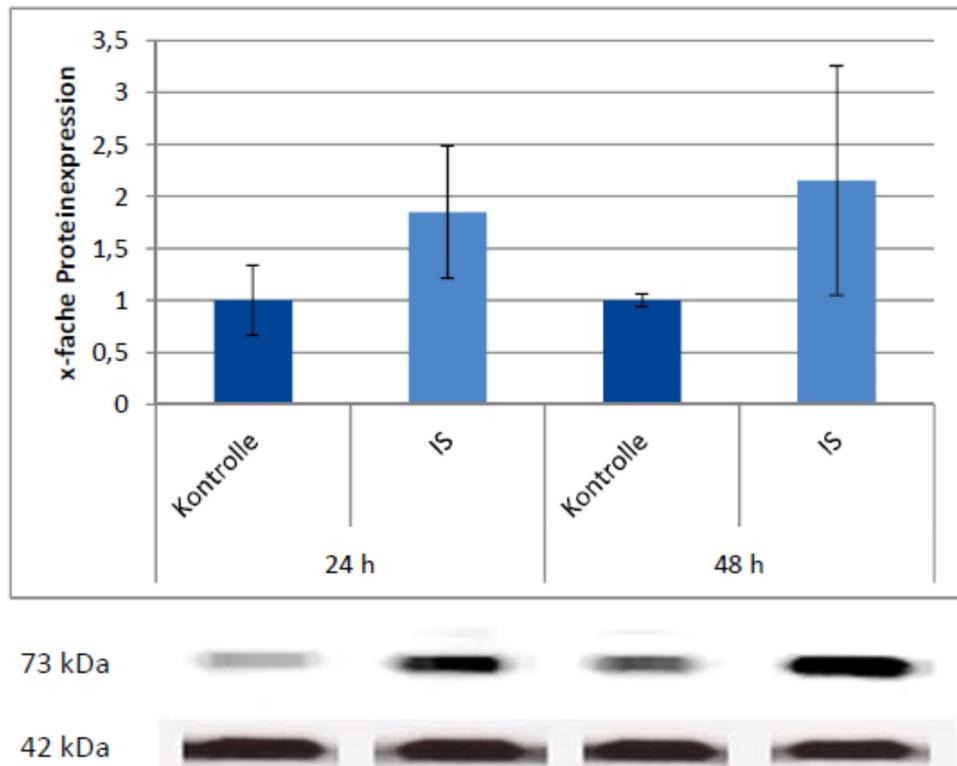
Unter IAA zeigte GLUT1 nach 24 h die 0,5-fache und 48 h die 1,7-fache Proteinexpression des jeweiligen Kontrollwertes ohne statistische Signifikanz zu erreichen (siehe Abb. 21).



**Abbildung 21:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol).  
Ladekontrolle: β-Aktin

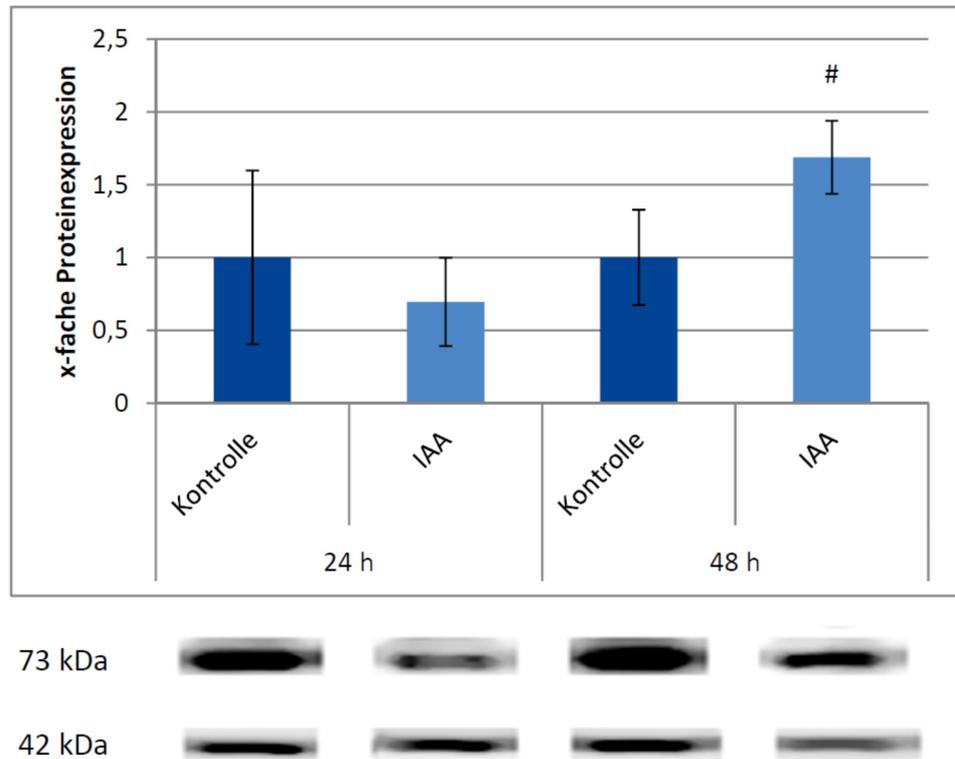
### 3.3.4 SGLT1

Die Proteinexpression des Glukosetransporters wies nach Inkubation mit IS nach 24 h das 1,9-fache und nach 48 h das 2,2-fache des jeweiligen Kontrollwertes auf, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (siehe Abb. 22).



**Abbildung 22:** Western Blot sodium dependent glucose cotransporter 1 (SGLT1): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von SGLT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin

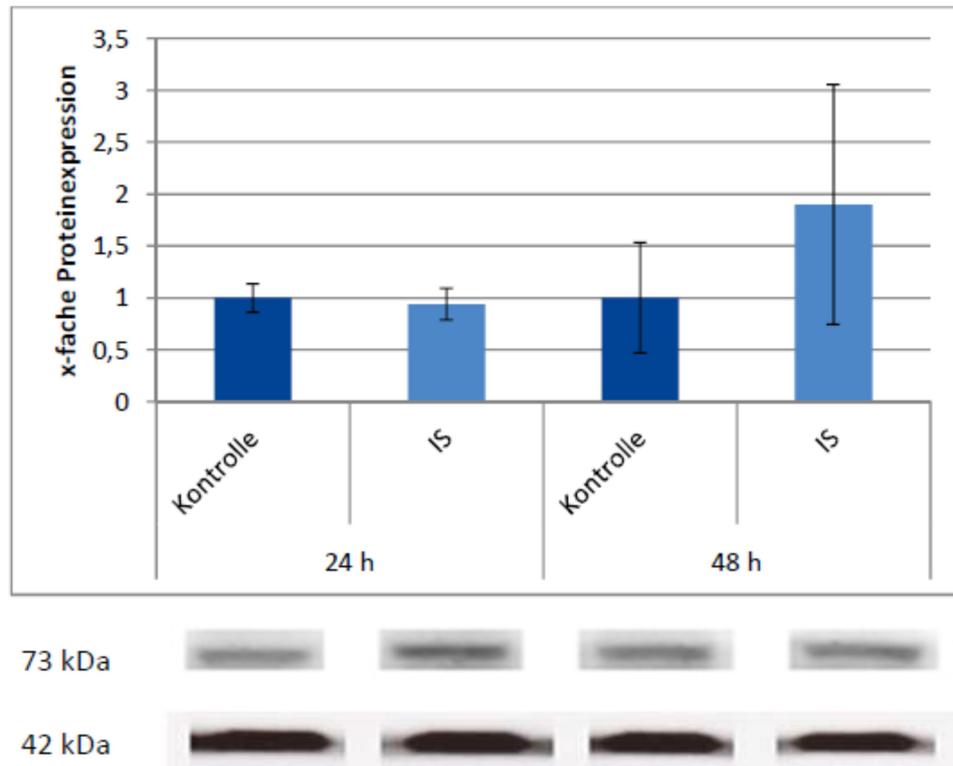
SGLT1 zeigte unter Inkubation mit IAA nach 24 h eine Senkung auf das 0,7-fache, nach 48 h eine signifikante Erhöhung um das 0,7-fache des Kontrollwertes bei einem Signifikanzwert  $P < 0,05$  (siehe Abb. 23).



**Abbildung 23:** Western Blot sodium dependent glucose cotransporter 1 (SGLT1): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von SGLT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM EtOH) im t-Test wurde wie folgt markiert: #  $P < 0,05$ . Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der detektierten SGLT1-Proteinmenge der Zellen, welche mit IAA für 48 h behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle ( $P < 0,05$ ). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin.

### 3.3.5 SGLT2

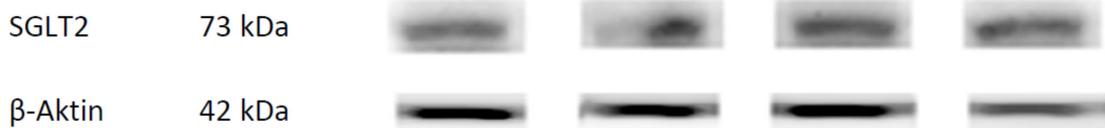
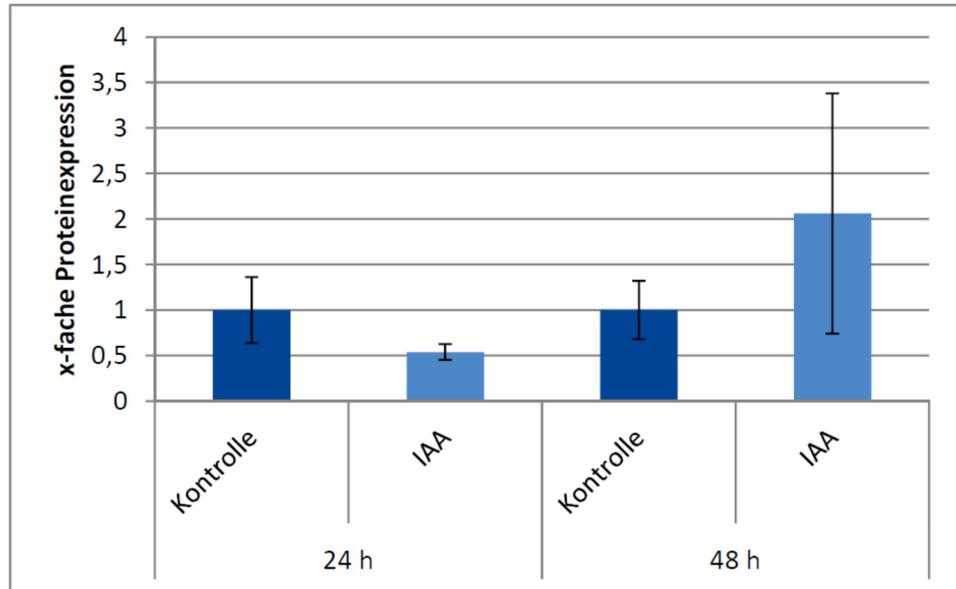
Die Proteinexpression von SGLT2 zeigte nach Inkubation mit IS nach 48 h das 1,9-fache des Kontrollwertes auf, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (siehe Abb. 24).



**Abbildung 24:** Western Blot sodium dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von SGLT2 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin

## Ergebnisse

Nach 24 h verzeichnete SGLT2 unter IAA das 0,5-fache und nach 48 h das Doppelte des jeweiligen Kontrollwertes, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erlangen (siehe Abb. 25).

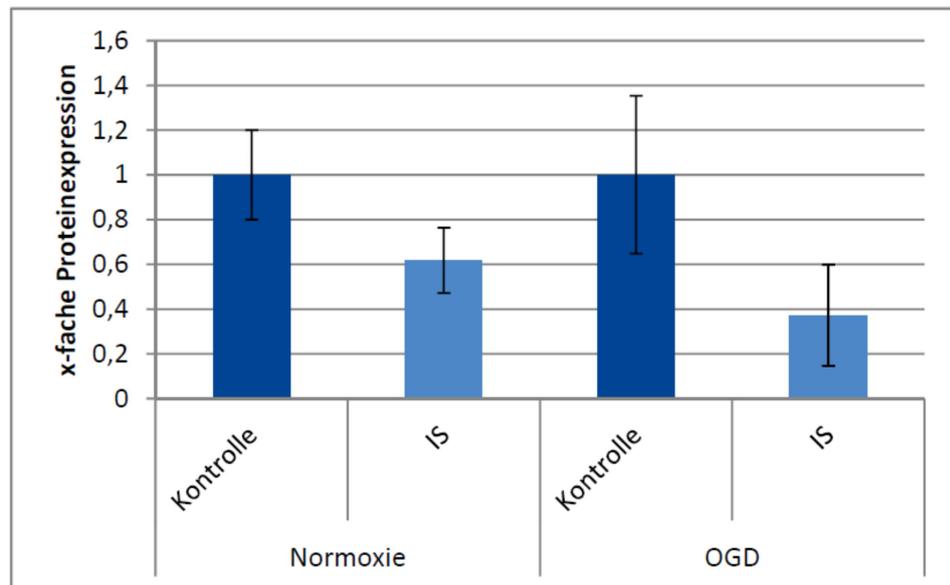


**Abbildung 25:** Western Blot sodium dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von SGLT2 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1mM Ethanol). Ladekontrolle: β-Aktin

### 3.4 Auswertung der Ergebnisse der Co-Kultur

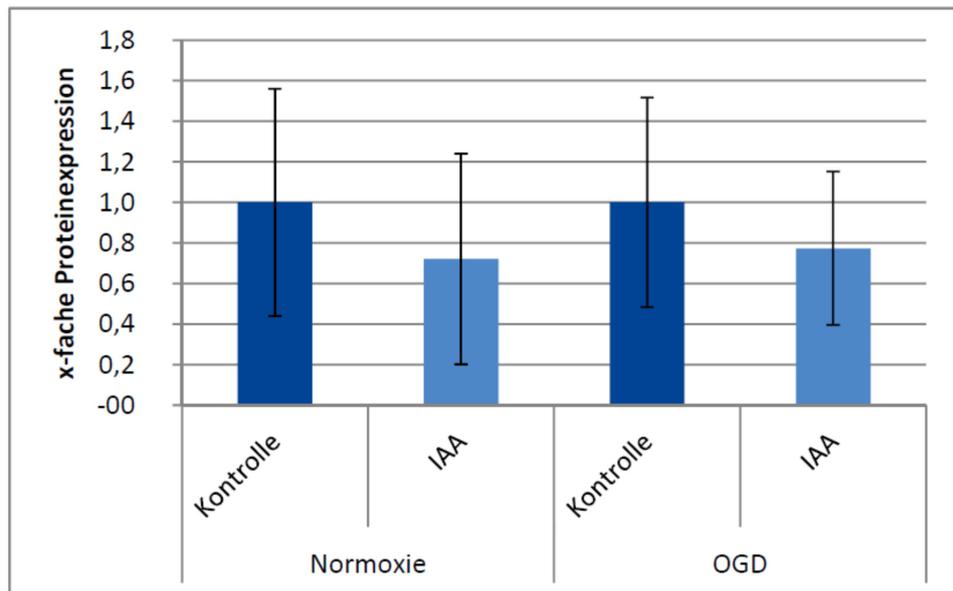
#### 3.4.1 Claudin-5

In der Co-Kultur zeigte sich unter Normoxie und Inkubation mit IS eine erniedrigte Claudin-5-Expression auf das 0,62-fache und unter OGD auf das 0,37-fache im Vergleich zu den Kontrollwerten mit den Signifikanzwerten  $P = 0,06$  und  $P = 0,07$  (siehe Abb. 26).



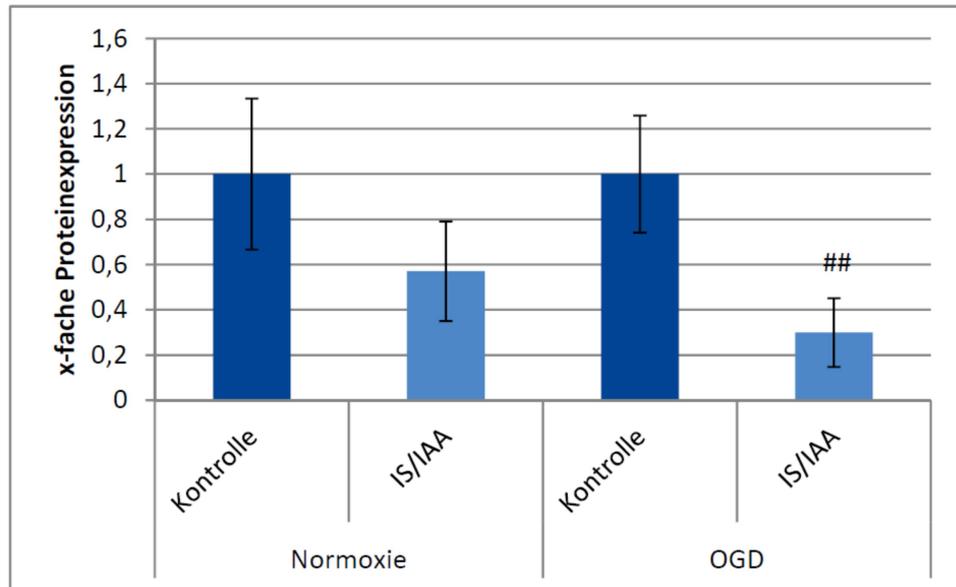
**Abbildung 26:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin

Unter Inkubation mit IAA erreichten die Proteinwerte unter Normoxie das 0,72-fache und unter OGD das 0,77-fache des Kontrollwertes (siehe Abb. 27).



**Abbildung 27:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol).  
Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin

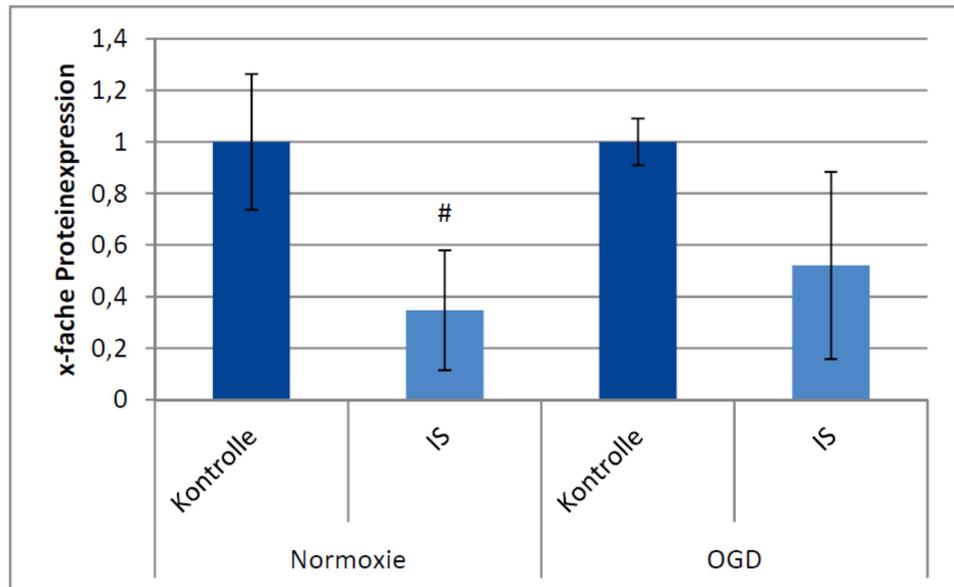
Wurden beide Toxine hinzugefügt, konnte eine Senkung der Proteinexpression unter Normoxie auf das 0,57-fache und unter OGD signifikant mit  $P = 0,01$  auf das 0,3-fache des jeweiligen Kontrollwertes festgestellt werden (siehe Abb. 28).



**Abbildung 28:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit je 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (je 1 mM Kaliumchlorid/Ethanol) im t-Test wurde wie folgt markiert: ##  $P < 0,01$ . Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der detektierten Claudin-5-Proteinmenge der Zellen, welche zusätzlich zu der Inkubation mit IS/IAA einer OGD zugeführt worden waren, im Vergleich zur Kontrolle ( $P < 0,01$ ). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin.

### 3.4.2 Occludin

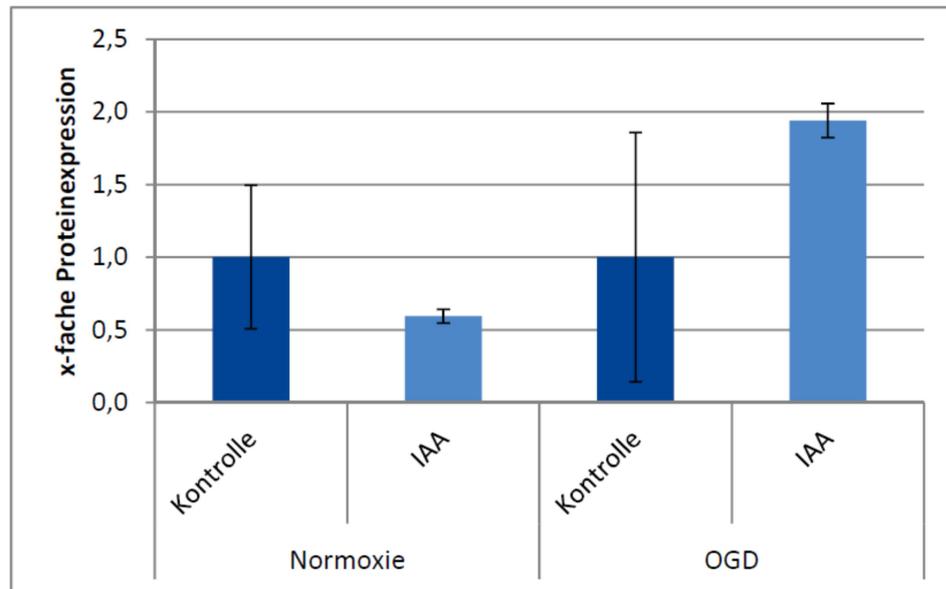
Occludin zeigte nach Inkubation mit IS unter Normoxie eine signifikante Senkung der Proteinexpression auf das 0,35-fache des Kontrollwertes bei einem P-Wert  $<0,05$ . Unter OGD-Bedingungen sank die Konzentration auf 0,52 im Vergleich zum Kontrollwert bei einer Standardabweichung von 0,36 nicht signifikant (siehe Abb. 29).



**Abbildung 29:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid) im t-Test wurde wie folgt markiert: # P  $<0,05$ . Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der detektierten Occludin-Proteinmenge der Zellen, welche unter Normoxie mit IS behandelt worden waren, im Vergleich zur Kontrolle (P  $<0,01$ ). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin.

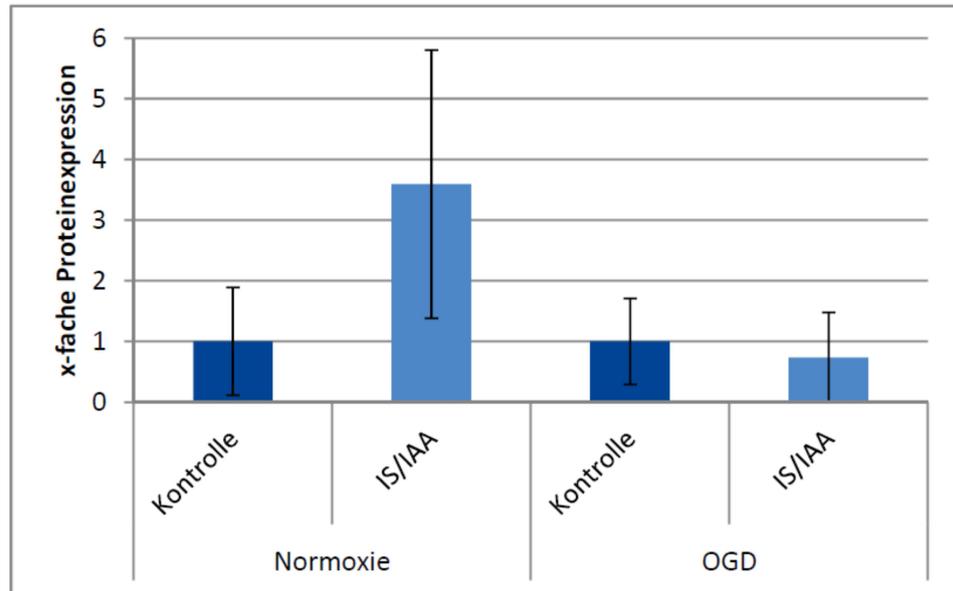
## Ergebnisse

Bei Normoxie und Inkubation mit IAA konnte eine nicht signifikante Senkung der Proteinexpression auf das 0,59-fache des Kontrollwerts festgestellt werden. In der OGD stieg der Wert im Vergleich zum Kontrollwert auf nahezu das Doppelte ohne statistische Signifikanz (siehe Abb. 30).



**Abbildung 30:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol).  
Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin

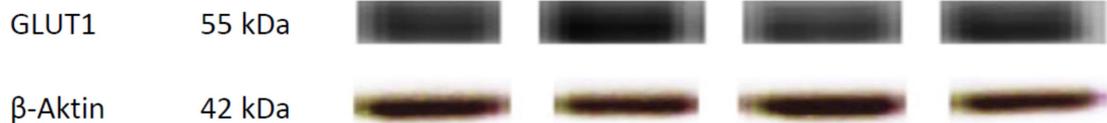
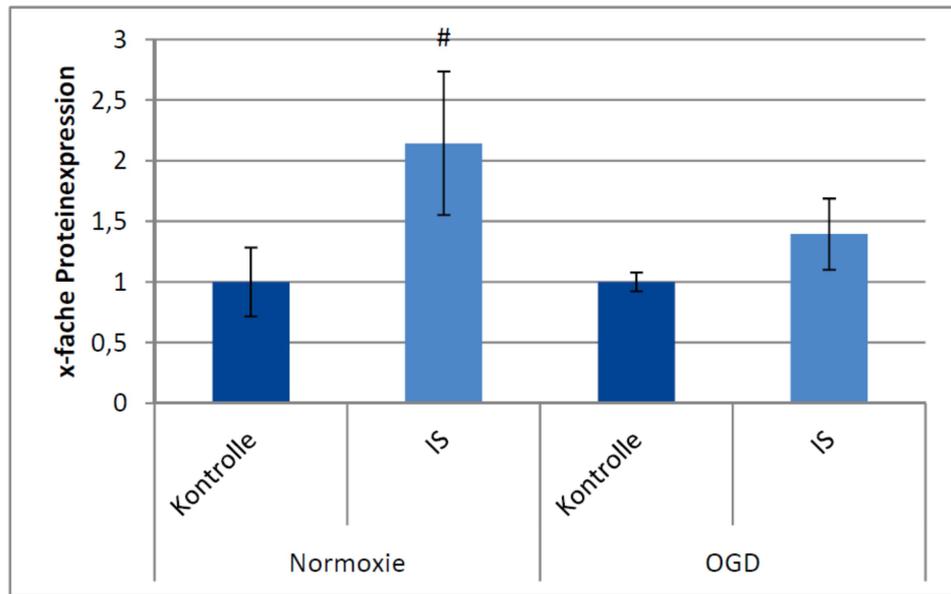
Bei Zugabe beider Toxine konnte in der Normoxie ein Anstieg der Proteinexpression auf das 3,6-fache des Kontrollwerts festgestellt werden. Die Beobachtung blieb nicht signifikant. Unter OGD-Bedingungen zeigte sich keine relevante Änderung der Occludin-Werte (siehe Abb. 31).



**Abbildung 31:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit je 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (je 1mM Kaliumchlorid/Ethanol). Ladekontrolle: β-Aktin

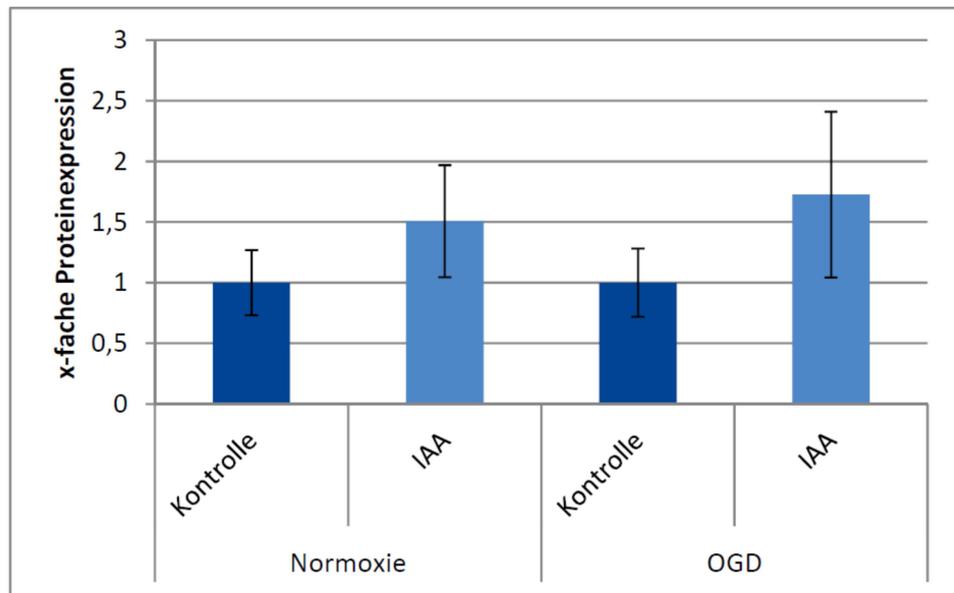
### 3.4.3 GLUT1

Die GLUT1-Proteinexpression stieg in der Normoxie und bei Inkubation mit IS mit einem P-Wert  $<0,05$  signifikant auf das 2,14-fache des Kontrollwerts. Unter OGD stieg die Proteinexpression auf das 1,39-fache des Kontrollwerts. Diese Steigerung blieb nicht signifikant (siehe Abb. 32).



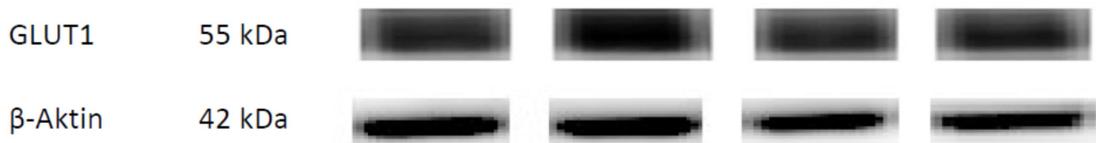
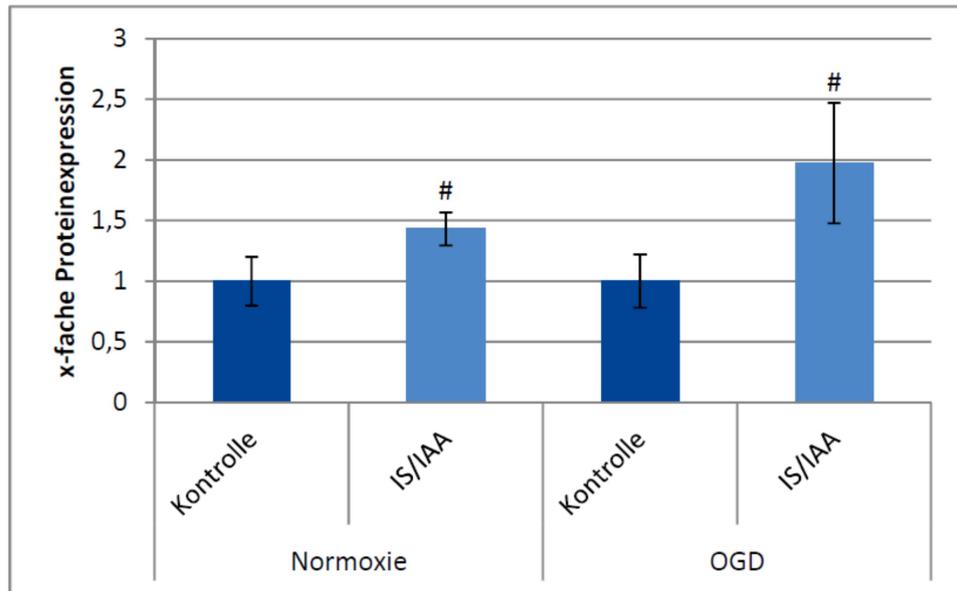
**Abbildung 32:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid) im t-Test wurde wie folgt markiert: #  $P < 0,05$ . Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der detektierten GLUT1-Proteinmenge der Zellen, welche unter Normoxie mit IS behandelt worden waren, im Vergleich zur Kontrolle ( $P < 0,05$ ). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin

Die Inkubation mit IAA erbrachte in der Normoxie eine Steigerung der detektierten GLUT1-Transporter auf das 1,51-fache, unter OGD auf das 1,73-fache des Kontrollwertes. Diese Änderungen erreichten keine statistische Signifikanz (siehe Abb. 33).



**Abbildung 33:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol). Ladekontrolle: β-Aktin

Unter Inkubation mit beiden Toxinen zeigte die GLUT1-Expression unter Normoxie einen Anstieg auf das 1,4-fache und unter OGD auf das Doppelte des jeweiligen Kontrollwerts. Beide Änderungen zeigten im t-Test eine statistische Signifikanz mit einem P-Wert von 0,02 (siehe Abb. 34).

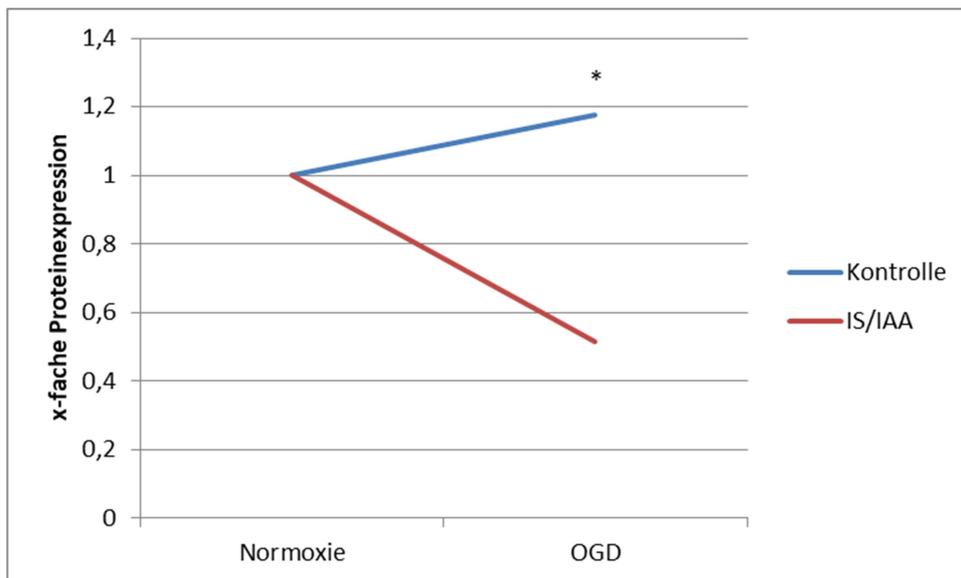


**Abbildung 34:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, und mit je mit 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (je 1 mM Kaliumchlorid/Ethanol) im t-Test wurde wie folgt markiert: # P <0,05. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der GLUT1-Proteinmenge der mit IS/IAA behandelten Zellen sowohl unter Normoxie als auch nach OGD im Vergleich mit der Kontrolle (P <0,05). Ladekontrolle: β-Aktin.

### 3.4.4 Vergleich der Normoxie mit der OGD

Die Co-Kultur mit Toxin-Inkubation wurde jeweils einmal unter Normoxie und einmal unter OGD-Bedingungen durchgeführt. Um die Validität der Kombination von Toxin-Inkubation und OGD bezüglich ihrer Wirkung zu verifizieren zu können, wurden die oben beschriebenen Daten mittels einer zweifaktoriellen ANOVA mit den Einflussfaktoren Behandlung mit den Ausprägungen OGD oder Normoxie und Inkubation mit Toxinen oder in oder jeweiliger Kontrollsubstanz auf deren Wechselwirkung analysiert.

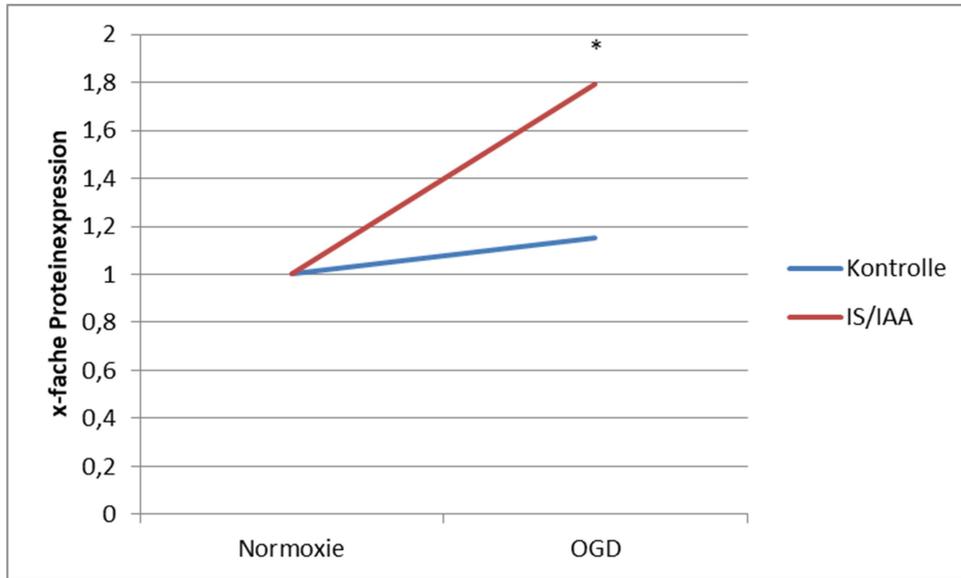
Hierbei konnte eine signifikante Wechselwirkung der Einflussfaktoren auf die Claudin-5-Expression mit einem P-Wert von 0,02 bei Inkubation mit beiden Toxinen festgestellt werden (siehe Abb. 35).



**Abbildung 35:** Vergleichende Darstellung der Claudin-5-Expression bezüglich der Wechselwirkung von der Inkubation mit je 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) und der oxygen-glucose deprivation (OGD)-Behandlung. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (je 1 mM Kaliumchlorid/Ethanol) in der ANOVA wurde wie folgt markiert: \*  $P < 0,05$ . Es zeigte sich eine signifikante Wechselwirkung ( $P < 0,05$ ).

Bezüglich der Occludin-Expression zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse bezüglich der Wechselwirkungen ( $P_{\text{Occludin}} = 0,08$ ).

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der GLUT1-Expression zwischen der Normoxie und der OGD mit einem P-Wert von 0,02 bei Inkubation mit beiden Toxinen (siehe Abb. 36).



**Abbildung 36:** Vergleichende Darstellung der GLUT1-Expression bezüglich der Wechselwirkung von der Inkubation mit je 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) und der oxygen-glucose deprivation (OGD)-Behandlung. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (je 1 mM Kaliumchlorid/Ethanol) in ANOVA wurde wie folgt markiert: \*  $P < 0,05$ . Es zeigte sich eine signifikante Wechselwirkung ( $P < 0,05$ ).

## **4 Diskussion**

Das ANV ist ein häufiges Krankheitsbild, in dessen Verlauf mit lebensbedrohlichen Folgen gerechnet werden muss. Es betrifft nicht nur die Nieren, dem Fokus der Erkrankung, sondern führt aufgrund des Ausfalls der Nierenfunktion als Entgiftungs- und Hormonproduktionsort zu systematischen Komplikationen und der Beeinträchtigung einer Reihe von lebensnotwendigen Organen. Hierunter fällt auch das Gehirn mit dem Bild der UE, deren Pathogenese bislang ungeklärt blieb (Stewart 2009). Forschungen mittels Tierversuchen an Mäusen ergaben eine zerebrale Entzündungsreaktion und eine Steigerung der vaskulären Permeabilität, ohne jedoch ein Hirnödem nachweisen zu können (Liu et al. 2008), jedoch konnten andere Studien mit Hilfe von MRT Hinweise auf Hirnödeme gewinnen (Kim et al. 2016).

Ziel dieser Arbeit war es, die Pathomechanismen der akuten UE zu analysieren und ein Modell zu entwickeln, mit dem in der Zukunft weitere Erkenntnisse über diese Erkrankung gewonnen werden können.

Als Modell der Blut-Hirn-Schranke wurde die Zelllinie cEND gewählt, welche über angemessene Charakteristika wie einen hohen transendothelialen Widerstand und Expression von den TJ-Proteinen Occludin und Claudin-5 aufweist (Förster et al. 2005; Helms et al. 2016).

### **4.1 Festlegung von Toxinkonzentrationen**

Zunächst mussten geeignete Toxine gefunden werden, mit denen die Urämie in vitro nachkonstruiert werden konnte. Aus der Literatur konnten die Tryptophan-Metabolite Indoxylsulfat und Indoleessigsäure entnommen werden (Gondouin et al. 2013a), auf welchen der Fokus dieser Arbeit liegt. Um die Konzentrationen der Giftstoffe der Zellkultur anzupassen, wurden Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt. Hierzu wurde der Test EZ4U verwendet. Vergleichende Versuchsdurchläufe ergaben eine für die weitere Arbeit passende Konzentration beider Toxine von 1 mM. Diese Konzentration liegt weit über den in vivo gemessenen (Vanholder et al. 2003b). Hier zeigt sich, dass ein Modell, gerade wenn es aus einer anderen Spezies, wie in diesem Falle Mäusen, gewonnen wurde, nie die exakten Gegebenheiten in vivo wiedergeben kann. Sie können nur genutzt werden, um Teilaspekte zu betrachten. Zudem ist zu

beachten, dass im ANV es nicht nur zur Akkumulation von IS und IAA, sondern auch von einer großen Anzahl anderer Toxine kommt. Desweiteren sind beide Toxine in vivo proteingebunden und absolute Konzentrationen schwer zu verifizieren (Duranton et al. 2012). In den durchgeführten Versuchen wurden albuminhaltige Medien verwendet. Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen ergaben keine Beeinträchtigung durch die Proteinkonzentration im Medium (Stinghen et al. 2014). Ebenso muss angeführt werden, dass das ANV mit einer Hypoalbuminämie assoziiert ist (Mehta 2003), welche in Zusammenhang mit der Dauer des Deliriums gebracht werden konnte (Brown und Brown 1995), und davon ausgegangen werden muss, dass die Toxinspiegel einer großen Streuung unterliegen, welche kaum in in-vitro-Studien rekonstruiert werden kann. Für diese Theorie spricht ebenfalls, dass die Höhe der Toxinkonzentrationen wenig mit dem Ausmaß der neurologischen Symptomatik korreliert (Burn und Bates 1998). Daher ist für die Festlegung der Toxinkonzentrationen die individuelle Wirkung der Substanzen im Modell Ausschlag gebend.

### **4.2 Wirkung der Toxine IS und IAA auf den elektrischen Widerstand der BHS**

Die Werte für den transendothelialen Widerstand unter Inkubation mit den genannten Toxinen sanken, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen, was auf eine intakte Barrierefunktion der BHS in dem Versuchsaufbau hindeutet. Dennoch kann aufgrund der Tendenz der Werte nicht darauf geschlossen werden, dass an der Barriere keine Veränderungen stattfinden. So könnten die Zellen die Schäden, die von den Toxinen hervorgerufen werden, durch Anpassung ihrer Proteinausstattung kompensieren, sodass die Barriere für eine Zeit aufrechterhalten werden kann (Tian et al. 2014). Effekte, die nach 48 h auftreten, sollten in weiterführenden Studien analysiert werden. Um Veränderungen auf Proteinebene der TJs nachweisen zu können, werden präzisere Untersuchungsmethoden als der TEER benötigt.

### **4.3 Wirkung der Toxine IS und IAA auf die Expression der TJ-Proteine der BHS**

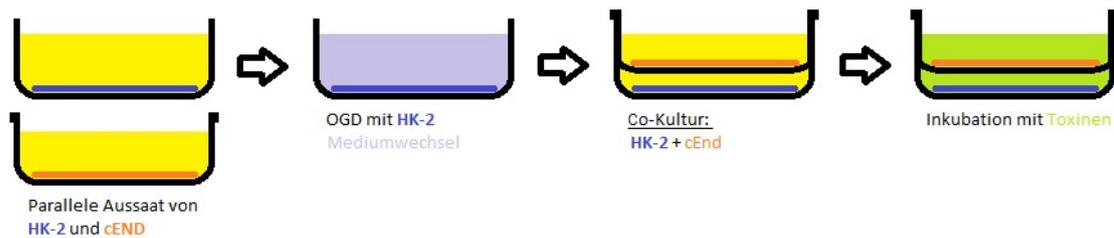
Es wurde das Verfahren des Western Blots gewählt, um Veränderungen auf Proteinebene zu erfassen. Hierfür wurden cEND-Zellen mit den Toxinen in der genannten Konzentration inkubiert und anschließend wie unter 2.2.4, 2.2.5, 2.2.6 und 2.2.7 analysiert. Es zeigte sich nach der Inkubation mit IS für 48 h eine statistische nicht signifikante Erhöhung der Claudin-5-Expression. Nach Inkubation mit IAA konnte keine Änderung der Proteinexpression festgestellt werden. Nach Inkubation mit IS zeigte Occludin nach 24 h eine erhöhte Proteinexpression, welche keine statistische Signifikanz erlangte. Nach 48 h zeigte sich eine deutlich erniedrigte Konzentration auf das 0,4-fache des Kontrollwertes mit einem Signifikanzwert von 0,1. Diese Ergebnisse könnten die Aufrechterhaltung der elektrischen Barriere, welche in den TEER-Versuchen gezeigt werden konnte, mittels erhöhter Expression von Claudin-5 (Tian et al. 2014) und Occludin (Balda et al. 1996; Förster et al. 2005) erklären (Tian et al. 2014; Balda et al. 1996). Diese Kompensationsmechanismen könnten im Verlauf ausgeschöpft sein, weshalb nach 48 h eine stark erniedrigte Konzentration von Occludin festgestellt werden konnte. Desweiteren ist zu beachten, dass die beobachteten Effekte nach 48 h stärker als nach 24 h Inkubation zu verzeichnen waren und somit von einer zeitabhängigen Wirkung der Toxine ausgegangen werden kann, was sich auch in anderen Forschungsreihen gezeigt hat (Gondouin et al. 2013a).

#### **4.4 Wirkung der Toxine IS und IAA auf die Expression der Glukosetransporter der BHS**

Ebenfalls zeigte der Glukosetransporter SGLT1 eine Steigerung der Proteinexpression nach der Inkubation mit IAA für 48 h, welche statistische Signifikanz erlangte. Eine ähnliche Expressionstendenz konnte für den zweiten Vertreter der SGLT-Familie SGLT2 gezeigt werden. Auch die Ergebnisse des wichtigsten Glukosetransporters des Gehirns GLUT1 wiesen auf eine erhöhte Expression nach 48 h unter der Inkubation mit IS und IAA hin. Dies spricht für eine aus pathologischen Gründen veränderte Nachfrage des Gehirns an Glukose, beziehungsweise dafür, dass mittels einer erhöhten Zufuhr an Zucker und somit Energie dem im ANV erniedrigten Metabolismus (Burn und Bates 1998) entgegen gesteuert wird. Auch bei den Glukosetransportern waren die sichersten Ergebnisse nach einer Zeitspanne von 48 h zu erkennen. Dies weist auf eine zeitabhängige Wirkung der Toxine.

#### **4.5 Etablierung eines in vitro Modells der Interaktion von Gehirndothel- und Nierenzellen**

Um ein möglichst präzises Modell der Interaktion von Nieren- und Gehirndothelzellen zu gewinnen, wurde ein Verfahren entwickelt, in dem beide Zelltypen miteinander kultiviert werden können. Hierzu wurden die Zelllinien HK-2- und die bereits in der einfachen Inkubation verwendeten cEND-Zellen gewählt. Zu Beginn wurden beide Zelllinien getrennt voneinander gezüchtet und kultiviert. Die cEND-Zellen wurden auf speziellen Transwell-Einsätzen ausgesät. Am 6. Tag wurden die Gehirndothelzellen mit 1 % ssFCS-haltigem Medium ausdifferenziert. Am darauffolgenden Tag wurden die Nierenzellen einer OGD zugefügt, um einen Schaden an den Zellen zu rekonstruieren, der dem im ischämischen ANV ähnelt (Sauvant et al. 2009). Im Anschluss wurden beide Zelltypen in einem gemeinsamen Well unter Standardbedingungen kultiviert und Glukose dem Medium, welches in der OGD verwendet wurde, aber ansonsten dem normalen Kultivierungsmedium der cEND-Zellen entsprach, hinzugefügt. Nach zwei Tagen gemeinsamer Kultivierung wurden die cEND-Zellen geerntet und mittels Western Blot wie zuvor beschrieben analysiert (siehe Abb. 37).



**Abbildung 37:** Schematische Darstellung der Co-Kultur. Humane Nierenzellen-2 (HK-2) und cerebrale (murine) Endothelzellen (cEND) wurden primär getrennt voneinander gezogen. Am 6. Tag wurden die cEND-Zellen differenziert und am 7. Tag wurden die HK-2-Zellen einer OGD (oxygen-glucose deprivation) zugeführt. Danach wurden die Zellen zusammen kultiviert, Glukose und Toxine hinzugeführt und am 9. Tag geerntet. (eigene Abbildung)

#### 4.5.1 Expressionsverhalten der TJ-Proteine in der Co-Kultur

Bezüglich der TJ-Proteine konnte gezeigt werden, dass es zu Änderungen des Aufbaus der BHS kommen könnte. So zeigte Claudin-5 eine stark signifikante Senkung der Expression, wenn die HK-2-Zellen der OGD zugeführt und das Medium mit beiden Toxinen versetzt wurde. Eine dieser Beobachtung entsprechende Tendenz konnte bei Occludin, das für die Regulation der BHS relevant ist, dargestellt werden. Dies spricht für einen Zusammenbruch der BHS im Verlauf der Erkrankung, da eine niedrige Konzentration an Claudin-5 und Occludin mit dem Verlust von Polarität und Barrierefunktion assoziiert ist (Liu et al. 2015; Nitta et al. 2003b; Sawada et al. 2003). Diese Ergebnisse widersprechen auf den ersten Blick den Ergebnissen der einfachen Inkubation. Die in den Vorversuchen gezeigte aufrechterhaltene elektrische Barriere und eine Steigerung der TJ-Protein-Proteinexpression deuten auf kompensierende Mechanismen hin, die Funktion der BHS zu bewahren. Jedoch könnten diese Kapazitäten letztendlich ausgeschöpft sein und die BHS ihre Funktion verlieren, was eine erhöhte vaskuläre Permeabilität (Liu et al. 2008) und die Entstehung eines vaskulären Hirnödems erklären könnte (Wais 2012; Kim et al. 2016).

#### **4.5.2 Expressionsverhalten der Glukosetransporter in der Co-Kultur**

GLUT1, der Basis-Glukosetransporter des Gehirns, zeigte den zuvor bei den SGLT-Transportern beschriebenen Ergebnissen entsprechende Veränderungen. Es konnte gezeigt werden, dass die GLUT1-Expression in dem beschriebenen Verfahren signifikante Steigerungen erreichte, insbesondere wenn beide Toxine den Zellen hinzugefügt wurden. Dies stärkt die Annahme, dass es im Rahmen der UE zu einem erhöhten Transport von Glukose über die BHS kommen könnte. Eine Hyperglykämie, wie sie im ANV beobachtet wird (Husi und Human 2015), bildet dieses Modell jedoch nicht ab. Ebenso konnte keine Analyse der SGLT-Proteine durchgeführt werden, welche Gegenstand derzeitiger Forschungen sind.

#### **4.6 Vergleich der einfachen Inkubation mit der Co-Kultur**

Wird die einfache Inkubation mit der Co-Kultur verglichen, sind einige wichtige Unterschiede zu vermerken. Einerseits sind gegensätzliche Effekte auf die TJ-Proteine Claudin-5 und Occludin festzustellen. So zeigt Occludin in der einfachen Inkubation eine Erhöhung der Proteinkonzentration nach 24 h und nach 48 h eine deutlich erniedrigte Protein-Expression, in der Co-Kultur zeigten beide Proteine Claudin-5 und Occludin eine Senkung. Dies würde zeigen, dass in dem hier vorgestellten Modell der Co-Kultur die Zellen eindeutig zusätzlichem Stress ausgesetzt werden und das Modell die komplexen Vorgänge im ANV besser als die einfache Inkubation rekonstruiert.

GLUT1 zeigte in beiden Versuchsmodellen einen Anstieg. Dies spricht für einen deutlichen Effekt der Urämie bezüglich des Glukosetransports, welcher sogar unter geringeren Stessbedingungen eintritt, und ein signifikantes Ergebnis.

Werden die die Effekte der OGD im Vergleich zur einfachen Inkubation und der Normoxie betrachtet, ist festzuhalten, dass die Effekte unter OGD viel stärker sind und häufiger signifikante Ergebnisse erzielt werden konnten, insbesondere wenn die beiden Toxine gemischt den Zellen hinzugefügt wurden. Dies weist darauf hin, dass die Ergebnisse der Co-Kultur nicht einfach auf die gemeinsame Kultivierung der beiden Zelllinien zurückzuführen sind, sondern die Simulation eines ischämischen ANV nötig ist, die beschriebenen Ergebnisse zu erzielen. Zusammenfassend sprechen diese Aspekte für die Eignung des Modells als Rekonstruktion der Interaktion von Gehirnendothelzellen und Nierenzellen im Rahmen des ANV.

#### **4.7 Betrachtung der Effekte der OGD im Vergleich mit der Normoxie in der Co-Kultur**

Die OGD wurde als Modell des ANV angewendet. Im Vergleich zu Versuchsdurchgängen ohne OGD, die unter Standardbedingungen durchgeführt wurden, zeigten sich signifikante Wechselwirkungen von OGD und Toxininkubation in Anbetracht der Claudin-5- und GLUT1-Expressionen. Diese Ergebnisse sprechen für die Validität des Co-Kultur-Modells.

#### **4.8 Betrachtung der Toxine IS und IAA**

Die aufgezeigten Ergebnisse bestätigen weiterhin die Bedeutung der beiden urämischen Toxine IS und IAA bezüglich der Pathogenese neurologischer Symptome und Veränderungen im ZNS (Iwata et al. 2007). IS kann den Transport von Medikamenten über die BHS beeinflussen (Ohtsuki et al. 2002) und eine Rolle in der Behandlung der UE spielen. In den hier beschriebenen Versuchssettings konnten Effekte des Toxins sowohl auf die TJ- Proteine als auch auf die Glukosetransporter gezeigt werden. Ebenso konnte für IAA eine mögliche Bedeutung bezüglich der UE aufgezeigt werden, da es ebenfalls die Proteinexpression der TJ als auch der Glukosetransporter beeinflussen könnte.

#### **4.9 Weitere Arbeitsansätze**

Um die genannten Hypothese weiter verifizieren zu können, sollten in Zukunft TEER-Messungen im Rahmen des Co-Kultur-Modells durchgeführt werden. Ebenso sollten die Ergebnisse bezüglich GLUT1 in Versuchsreihen mit dem GLUT1-Inhibitor Phloretin bestätigt werden (Lorris Betz et al. 1975). Interessant

wäre weiterhin, Gehirnschnitte von Mäusen im ANV bezüglich der TJ-Proteine und Glukosetransporter zu untersuchen und cEND-Zellen in einer vergleichenden Versuchsreihe mit Seren von ANV-Patienten zu versetzen. Ebenfalls sollten weitere Bestandteile wie die Cadherine und die JAMs, die einen Beitrag zur Dichtigkeit der BHS leisten, analysiert werden.

Desweiteren sollten die Bedeutung von Zytokinen im Rahmen der UE untersucht werden, um entzündliche Vorgänge genauer zu betrachten. Hierbei bieten sich Versuche in dem hier vorgestellten Co-Kultur-Modell mit beiden Zelllinien an.

Ebenso ist die Bedeutung der SGLT an der BHS weiter zu untersuchen. Die hier aufgeführten Ergebnisse in der einfachen Inkubation deuten daraufhin, dass die Glukosetransporter neben den Transportern der GLUT-Familie eine Rolle bezüglich der Versorgung des Gehirns mit Glukose spielen können.

## 5 Zusammenfassung

Die UE ist ein wesentlicher Teil des Symptomkomplexes des ANV. Die Ursachen für die Beteiligung des Nervensystems bei diesem nephrologischen Krankheitsbild blieben bisweilen ungeklärt, da es vor allem an geeigneten in-vitro-Modellen fehlte. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Pathomechanismen der UE zu untersuchen und ein für weitere Forschungsvorhaben geeignetes Modell der Interaktion von Nieren- und Gehirnendothelzellen zu entwickeln.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die nephrogenen Toxine IS und IAA Veränderungen an der TJ-Ausstattung von Gehirnendothelzellen auslösen können. Ebenso konnte festgestellt werden, dass die Menge an den Glukosetransportern GLUT1 und Mitgliedern der SGLT-Familie im in vitro Modell unter Inkubation mit genannten Toxinen gesteigert wird, was für eine erhöhte Nachfrage an Energie in Form von Zuckermolekülen im Rahmen der UE sprechen könnte.

Transport von Zuckermolekülen ist an den Transport von Wassermolekülen gebunden. Bei dem Transporter GLUT1 werden bei dem Transport von einem Glukosemolekül stets 40 Wassermoleküle mittransportiert. Aber auch bei den SGLT konnte nachgewiesen werden, dass pro Glukosemolekül bis zu 260 Wassermoleküle transportiert werden (Loo et al. 1996; Naftalin 2008; Zeuthen et al. 2006). Eine erhöhte Expression von Glukosetransportern impliziert demnach nicht nur einen deutlich gesteigerten Transport an Glukose, sondern auch an Wasser, und kann somit zu einer Ödembildung führen.

Zu genauerer Untersuchung der Interaktion der Gehirnendothel- und Nierenzellen im ANV konnte ein in vitro Co-Kultur Modell geschaffen werden. So wurden Gehirnendothelzellen und Nierenzellen, an welchen mittels OGD ein ischämisches ANV nachgestellt wurde, gemeinsam kultiviert. Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell bietet eine Möglichkeit, ein ANV und die Wechselbeziehung der beiden Zelltypen zu rekonstruieren. Es konnte gezeigt werden, dass der Aufbau der BHS in der Co-Kultur so verändert wird, dass es zu einer erhöhten Permeabilität und einem Hirnödem kommen könnte. Sowohl für Claudin-5 als auch für Occludin, zwei für die Funktion der BHS sehr wichtigen Proteine, konnten erniedrigte Proteinexpressionen im Modell

festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte der Glukosetransporter GLUT1 eine vom physiologischen Zustand abweichende Erhöhung der Proteinexpression, was die in der einfachen Inkubation generierte Hypothese der erhöhten Glukosenachfrage im ANV entspricht.

Die Bedeutung der Toxine IS und IAA für die Pathogenese der UE konnte weiter klarifiziert werden. Die gezeigten Ergebnisse deuten auf eine bedeutende Rolle im Rahmen des Pathomechanismus der Erkrankung und Schäden an der BHS hin.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Ω	Ohm
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
1% ssFCS	Steroid-gestripptes fetale Kalbsserum (engl. steroid stripped fetal calf serum)
7H6	Anti-TJ-assoziertes Protein (engl. anti-tight junction-associated protein)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AF-6	Afadin-6
ANOVA	Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
ANV	Akutes Nierenversagen
ATCC <sup>®</sup>	American Type Culture Collection (Eigename)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BL1, 2	Basallamina 1, 2
C	Kohlenstoff
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CCI	Kontrollierte, kortikale Einschlagsverletzung (engl. controlled cortical impact injury)
cEND	Zerebrale Endothelzelllinie (engl. cerebral endothel cell line)

## Abkürzungsverzeichnis

cm	Centimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
Cu	Kupfer
Da	Dalton
dl	Deziliter
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemolumineszenz
ECM	Endotheliales Zellmedium (engl. endothelial cell medium)
EGF	Endothelialer Wachstumsfaktor (engl. endothelial growth factor)
Engl.	englisch
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (engl. nitric oxid synthetase)
ET	Endothelin
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kalbsserum (engl. fetal calf serum)
G-CSF	Granulozytenkolonien-stimulierender Faktor (engl. Granulocyte-colony stimulating factor)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT1	Glukosetransporter 1
Gly	Glycin
h	Stunde (engl. hour)
HK-2	Menschliche Nierenzellen 2 (engl. human kidney-2)
HPV	Humanes Papillomavirus

## Abkürzungsverzeichnis

HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
IAA	Indolessigsäure (engl. indol-3-acetic acid)
IC	Intrazelluläre Helix (engl. intracellular helix)
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (engl. intercellular adhesion molecule)
IL-1, -18	Interleukin -1, -18
IS	Indoxylsulfat (engl. indoxylsulfate)
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül (engl. junctional adhesion molecule)
K <sup>+</sup>	Kalium (Ion)
KC	Von-Keratinocyten-abgeleitetes Chemokin (engl. keratinocyte-derived chemokin)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease – Improving Global Outcomes
kg	Kilogramm
L	Liter
M	Mol
mg	Miligramm
min.	mindestens
mL	Milliliter
mmHg	mm Quecksilbersäule
MRT	Magnetresonanztomographie
N, N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na <sup>+</sup>	Natrium (Ion)
NO	Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxid)
O, O <sub>2</sub>	Sauerstoff

## Abkürzungsverzeichnis

OAT	Transporter organischer Anionen (engl. organic anion transporter)
OGD	Sauerstoff-Glukose-Entzug (engl. oxygen-glucose deprivation)
PAR3	Partitionierungsdefekt 3 Homolog (engl. partitioning defective 3 homolog)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PG	Prostaglandin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
TEER	Transendothelialer elektrischer Widerstand (engl. transendothelial electrical resistance) Ebenfalls als transepithelialer elektrischer Widerstand bezeichnet
TJ	Zonula occludens (engl. tight junction)
TM1e	Transmembranäre Domäne 1e (engl. transmembrane domaine 1e)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tyr	Tyrosin
UE	Urämische Enzephalopathie
VE-Cadherin	Vaskuläres, endotheliales Cadherin (engl. vascular endothelial cadherin)
XTT	Na-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzolsulfonsäurehydrat
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1,-2,-3	Zonula occludens Protein-1,-2, -3

## Abkürzungsverzeichnis

---

ZONAB	Zona occludens assoziiertes Nukleinsäure bindendes Protein (engl. zonula occludens associated nucleic acid-binding protein)
-------	---

## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** RIFLE Staging-System (Akronym für Risk – Injury – Failure – Loss – End stage kidney disease (engl. Risiko – Verletzung – Versagen - Verlust – endgradige Nierenerkrankung). Die Schwere des Nierenversagens wird an der Reduktion der Nierenfunktion gemessen (eigene Abbildung). ..... 1
- Abbildung 2:** Formen des akuten Nierenversagens in 3 Formen entsprechend der Lokalisation der Pathologie (eigene Abbildung). ..... 3
- Abbildung 3:** Vaskuläre Faktoren, die zur Pathogenese und schließlich Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) beitragen. (Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS), Endothelin (ET), Interleukin-18 (IL-18), interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), Prostaglandin (PG), Stickstoffmonoxid (NO), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) (Schrier et al. 2004). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink® by Copyright Clearance Center eingeholt. .... 4
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke mit beteiligten Zelltypen, Basallamina 1 und 2 (BL1,2) und Tight Junctions (Abbott et al. 2010). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink® by Copyright Clearance Center eingeholt. .... 8
- Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke (Afadin-6 (AF-6), Anti-TJ-assoziiertes Protein 7H6 (7H6), junktionales Adäsionsmolekül (JAM), Partitionierungsdefekt 3 Homolog (PAR3), vaskuläres, endotheliales Cadherin (VE-Cadherin), Zona occludens assoziiertes Nukleinsäure bindendes Protein (ZONAB), Zonula occludens Protein-1,2,3 (ZO-1,2,3)) (Förster 2008). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung direkt über den Verlag Springer Nature eingeholt. .... 10
- Abbildung 6:** Schematische Darstellung transmembranärer TJ-Proteine (C-(Kohlenstoff)-Terminus (C), Glycin (Gly), junktionales Adäsionsmolekül (JAM), N-(Stickstoff)-Terminus (N), Tyrosin (Tyr)) (Förster 2008). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung direkt über den Verlag Springer Nature eingeholt. .... 12
- Abbildung 7:** Struktur des humanen Glukosetransporters 1 (GLUT1) basierend auf Kristallanalysen (C-(Kohlenstoff)-Terminus (C), intrazelluläre Helix 1-12 (IC1-12), N-(Stickstoff)-Terminus (N), transmembranöse Domaine 1e (TM1e)) (Deng et al. 2014). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink® by Copyright Clearance Center eingeholt. .... 14
- Abbildung 8:** Mechanismus des intestinalen Glukosetransports am Beispiel der Glukose-Reabsorbtion im proximalen Tubulus der Niere. Glucose wird im Symport mit Natrium entlang eines Konzentrationsgradienten mit Hilfe eines Natrium/Glukose-Cotransporters in die Zelle und passiv mittels eines Glukose-Transporters aus der Zelle transportiert. Natrium wird ATP-abhängig aus der Zelle gefördert (Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Natrium ( $\text{Na}^+$ ), Kalium ( $\text{K}^+$ ))

	(Hediger et al. 1989). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink® by Copyright Clearance Center eingeholt.....	16
<b>Abbildung 9:</b>	Schematische Darstellung eines einfachen Endothels mit transzellulären (durch die Zelle) und parazellulären (seitlich an den Zellen vorbei) Transportwegen (Claude 1978). Für die Verwendung dieser Abbildung in der Dissertation wurde die Genehmigung über Rightslink® by Copyright Clearance Center eingeholt.....	32
<b>Abbildung 10:</b>	Schematischer Aufbau eines Semidry Western Blots (eigene Abbildung) .....	35
<b>Abbildung 11:</b>	Schematische Darstellung der Co-Kultur von humanen Nierenzellen-2 (HK-2) und cerebrallen (murinen) Endothelzellen (cEND). HK-2- und cEND-Zellen wurden primär getrennt voneinander gezogen. Am 6. Tag wurden die cEND-Zellen differenziert und am 7. Tag wurden die HK-2-Zellen einer OGD (oxygen-glucose deprivation) zugeführt. Danach wurden die Zellen zusammen kultiviert, Glukose und Toxine hinzugeführt und am 9. Tag geerntet (1% steroid-gestripptes fetale Kalbsserum (1% ssFCS), Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium (DMEM++), endotheliales Zellmedium (ECM++), Kohlenstoffdioxid (CO <sub>2</sub> ), Sauerstoff (O <sub>2</sub> ), Stickstoff (N <sub>2</sub> )) (eigene Abbildung). .....	37
<b>Abbildung 12:</b>	XTT-Reduktionstest EZ4U: Abhängigkeit der Zellaktivität von der Konzentration von Indoxylsulfat (IS) und Kaliumchlorid (KCl) unter Inkubation für 24 h. Alle Werte wurden ins Verhältnis zu 1% Steroid-gestripptem, fetalem Kalbsserum (1 % ssFCS) gesetzt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (Kontrolle für KCl: 1 % ssFCS, Kontrolle für IS: KCl 1 mM) im t-Test wurde wie folgt markiert: # P <0,05, ## P <0,01. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellaktivität der Zellen, welche mit 1 mM KCl behandelt wurden, im Vergleich zu denjenigen, die mit 1% ssFCS behandelt wurden (P <0,05). Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellaktivität von den Zellen, welche mit 10 mM IS behandelt wurden, im Vergleich zu denjenigen, die mit 1 mM KCl behandelt wurden (P <0,01). Threshold: 80% Zellaktivität.....	40
<b>Abbildung 13:</b>	XTT-Reduktionstest EZ4U: Abhängigkeit der Zellaktivität von der Konzentration von Indolessigsäure (IAA) und Ethanol (EtOH) unter Inkubation für 24 h. Alle Werte wurden ins Verhältnis zu 1% Steroid-gestripptem, fetalem Kalbsserum (1 % ssFCS) gesetzt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (Kontrolle für EtOH: 1 % ssFCS, Kontrolle für IAA: EtOH 1mM) im t-Test wurde wie folgt markiert: ## P <0,01. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellaktivität der Zellen, welche mit 5 mM IAA behandelt wurden, im Vergleich zu denjenigen, die mit 1 mM EtOH behandelt wurden (P <0,01). Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellaktivität der Zellen, welche mit 10 mM IAA behandelt wurden, im Vergleich zu denjenigen, die mit 1 mM EtOH behandelt wurden (P <0,01). Threshold: 80% Zellaktivität .....	41

- Abbildung 14:** TEER-Messung: Abhängigkeit der TEER-Werte von der Dauer der Inkubation mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) für 24 h und 48 h. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der TEER-Werte der mit IS behandelten Zellen im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid)..... 42
- Abbildung 15:** TEER-Messung: Abhängigkeit der TEER-Werte von der Dauer der Inkubation mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) für 24 h und 48 h. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der mit IAA behandelten Zellen im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM Ethanol). ..... 43
- Abbildung 16:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin. .... 44
- Abbildung 17:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin..... 45
- Abbildung 18:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid) im t-Test wurde wie folgt markiert: ##  $P < 0,01$ . Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der detektierten Occludin-Proteinmenge der Zellen, welche mit IS für 48 h behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle ( $P < 0,01$ ). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin..... 46
- Abbildung 19:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin..... 47
- Abbildung 20:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin ..... 48

- Abbildung 21:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin..... 49
- Abbildung 22:** Western Blot sodium dependent glucose cotransporter 1 (SGLT1): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von SGLT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin ..... 50
- Abbildung 23:** Western Blot sodium dependent glucose cotransporter 1 (SGLT1): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von SGLT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM EtOH) im t-Test wurde wie folgt markiert: #  $P < 0,05$ . Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der detektierten SGLT1-Proteinmenge der Zellen, welche mit IAA für 48 h behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle ( $P < 0,05$ ). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin. .... 51
- Abbildung 24:** Western Blot sodium dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von SGLT2 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin ..... 52
- Abbildung 25:** Western Blot sodium dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2): cEND-Zellen wurden 24 h und 48 h mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von SGLT2 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1mM Ethanol). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin..... 53
- Abbildung 26:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung

- der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid). ..... 54
- Abbildung 27:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin ..... 55
- Abbildung 28:** Western Blot Claudin-5: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit je 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Claudin-5 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Verleich zu der Kontrolle (je 1 mM Kaliumchlorid/Ethanol) im t-Test wurde wie folgt markiert: ## P <0,01. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der detektierten Claudin-5-Proteinmenge der Zellen, welche zusätzlich zu der Inkubation mit IS/IAA einer OGD zugeführt worden waren, im Vergleich zur Kontrolle (P <0,01). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin. .... 56
- Abbildung 29:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Verleich zu der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid) im t-Test wurde wie folgt markiert: # P <0,05. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der detektierten Occludin-Proteinmenge der Zellen, welche unter Normoxie mit IS behandelt worden waren, im Vergleich zur Kontrolle (P <0,01). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin. .... 57
- Abbildung 30:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein representatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin ..... 58

- Abbildung 31:** Western Blot Occludin: cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit je 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von Occludin analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (je 1 mM Kaliumchlorid/Ethanol). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin..... 59
- Abbildung 32:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indoxylsulfat (IS) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (1 mM Kaliumchlorid) im t-Test wurde wie folgt markiert: #  $P < 0,05$ . Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der detektierten GLUT1-Proteinmenge der Zellen, welche unter Normoxie mit IS behandelt worden waren, im Vergleich zur Kontrolle ( $P < 0,05$ ). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin..... 60
- Abbildung 33:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, sowie mit 1 mM Indolessigsäure (IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Probe und der Kontrolle (1 mM Ethanol). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin..... 61
- Abbildung 34:** Western Blot Glukosetransporter 1 (GLUT1): cEND-Zellen wurden für 48 h mit HK-2-Zellen, welche zuvor einer oxygen-glucose deprivation (OGD) zugeführt worden waren, und mit je mit 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) inkubiert und anschließend mittels Western Blot auf die Proteinexpression von GLUT1 analysiert. In dem Diagramm ist die quantitative Auswertung der Proteinbanden dargestellt. Darunter ist ein repräsentatives Western Blot aufgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (je 1 mM Kaliumchlorid/Ethanol) im t-Test wurde wie folgt markiert: #  $P < 0,05$ . Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der GLUT1-Proteinmenge der mit IS/IAA behandelten Zellen sowohl unter Normoxie als auch nach OGD im Vergleich mit der Kontrolle ( $P < 0,05$ ). Ladekontrolle:  $\beta$ -Aktin..... 62
- Abbildung 35:** Vergleichende Darstellung der Claudin-5-Expression bezüglich der Wechselwirkung von der Inkubation mit je 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) und der oxygen-glucose deprivation (OGD)-Behandlung. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (je 1 mM Kaliumchlorid/Ethanol) in der ANOVA wurde wie

	folgt markiert: * P <0,05. Es zeigte sich eine signifikante Wechselwirkung (P < 0,05).....	63
<b>Abbildung 36:</b>	Vergleichende Darstellung der GLUT1-Expression bezüglich der Wechselwirkung von der Inkubation mit je 1 mM Indoxylsulfat und Indolessigsäure (IS/IAA) und der oxygen-glucose deprivation (OGD)-Behandlung. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu der Kontrolle (je 1 mM Kaliumchlorid/Ethanol) in ANOVA wurde wie folgt markiert: * P <0,05. Es zeigte sich eine signifikante Wechselwirkung (P < 0,05).....	64
<b>Abbildung 37:</b>	Schematische Darstellung der Co-Kultur. Humane Nierenzellen-2 (HK-2) und cerebrale (murine) Endothelzellen (cEND) wurden primär getrennt voneinander gezogen. Am 6. Tag wurden die cEND-Zellen differenziert und am 7. Tag wurden die HK-2-Zellen einer OGD (oxygen-glucose deprivation) zugeführt. Danach wurden die Zellen zusammen kultiviert, Glukose und Toxine hinzugeführt und am 9. Tag geerntet. (eigene Abbildung).....	69

## 7.1 Lizenzrechte der verwendeten Abbildungen

Die folgenden Abbildungen sind aus Publikationen entnommen worden. Für die Verwendung in dieser Disseration wurde jeweils eine Genehmigung eingeholt.

Abbildung 3: Vaskuläre Faktoren, die zur Pathogenese und schließlich Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) beitragen. (Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS), Endothelin (ET), Interleukin-18 (IL-18), interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), Prostaglandin (PG), Stickstoffmonoxid (NO), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) (Schrier et al. 2004).

Journal: The journal of clinical investigation

Copyright: Rightslink® by Copyright Clearance Center

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke mit beteiligten Zelltypen, Basallamina 1 und 2 (BL1,2) und Tight Junctions (Abbott et al. 2010).

Journal: Neurobiology of Disease

Copyright: Rightslink® by Copyright Clearance Center

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke (Afadin-6 (AF-6), Anti-TJ-assoziertes Protein 7H6 (7H6), junctionales Adäsionsmolekül (JAM), Partitionierungsdefekt 3 Homolog (PAR3), vaskuläres, endotheliales Cadherin (VE-Cadherin), Zona occludens assoziiertes Nukleinsäure bindendes Protein (ZONAB), Zonula occludens Protein-1,2,3 (ZO-1,2,3)) (Förster 2008).

Journal: Histochemistry and cell biology

Copyright: Springer Nature (Genehmigung direkt über den Verlag erhalten)

Abbildung 6: Schematische Darstellung transmembranärer TJ-Proteine (C-(Kohlenstoff)-Terminus (C), Glycin (Gly), junctionales Adäsionsmolekül (JAM), N-(Stickstoff)-Terminus (N), Tyrosin (Tyr)) (Förster 2008).

Journal: Histochemistry and cell biology

Copyright: Springer Nature (Genehmigung direkt über den Verlag erhalten)

Abbildung 7: Struktur des humanen Glukosetransporters 1 (GLUT1) basierend auf Kristallanalysen (C-(Kohlenstoff)-Terminus (C), intrazelluläre Helix 1-12 (IC1-12), N-(Stickstoff)-Terminus (N), transmembranöse Domäne 1e (TM1e)) (Deng et al. 2014).

Journal: Nature

Copyright: Rightslink® by Copyright Clearance Center

Abbildung 8: Mechanismus des intestinalen Glukosetransports am Beispiel der Glukose-Reabsorbtion im proximalen Tubulus der Niere. Glucose wird im Symport mit Natrium entlang eines Konzentrationsgradienten mit Hilfe eines Natrium/Glukose-Cotransporters in die Zelle und passiv mittels eines Glukose-Transporters aus der Zelle transportiert. Natrium wird ATP-abhängig aus der Zelle gefördert (Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Natrium (Na<sup>+</sup>), Kalium (K<sup>+</sup>)) (Hediger et al. 1989).

Journal: Klinische Wochenschrift

Copyright: Rightslink® by Copyright Clearance Center

Abbildung 9: Schematische Darstellung eines einfachen Endothels mit transzellulären (durch die Zelle) und parazellulären (seitlich an den Zellen vorbei) Transportwegen (Claude 1978).

Journal: Journal of Membrane Biology

Copyright: Rightslink® by Copyright Clearance Center

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Materialien .....	21
<b>Tabelle 2:</b> Geräte .....	22
<b>Tabelle 3:</b> Substanzen .....	23
<b>Tabelle 4:</b> Kulturmedien und Zusätze.....	23
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Primärantikörper .....	25
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Sekundärantikörper .....	25
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Kits .....	25

## 9 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. Joan (2005): Dynamics of CNS Barriers. Evolution, Differentiation, and Modulation. In: *Cell Mol Neurobiol* 25 (1), S. 5–23. DOI: 10.1007/s10571-004-1374-y.
- Abbott, N. Joan; Patabendige, Adjanie A. K.; Dolman, Diana E. M.; Yusof, Siti R.; Begley, David J. (2010): Structure and function of the blood-brain barrier. In: *Neurobiol Dis* 37 (1), S. 13–25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- Abbott, N. Joan; Rönnbäck, Lars; Hansson, Elisabeth (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. In: *Nat Rev Neurosci* 7 (1), S. 41–53. DOI: 10.1038/nrn1824.
- Ahdieh, Minoo; Vandenbos, T. I.M.; Youakim, Adel (2001): Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma. In: *Am J Physiol* 281 (1), C2019-C2038. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.281.6.C2029.
- Anderson, James M.; van Itallie, Christina M. (2009): Physiology and function of the tight junction. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (2), a002584, 1-16. DOI: 10.1101/cshperspect.a002584.
- Arieff, A. I.; Massry, S. G.; Barrientos, A.; Kleeman, C. R. (1973): Brain water and electrolyte metabolism in uremia. Effects of slow and rapid hemodialysis. In: *Kidney Int* 4 (3), S. 177–187. DOI: 10.1038/ki.1973.100.
- Balda, Maria S.; Whitney, J. Andrew; Flores, Catalina; Gonzalez, Sirenia; Cereijido, Marcelino; Matter, Karl (1996): Functional Dissociation of Paracellular Permeability and Transepithelial Electrical Resistance and Disruption of the Apical-Basolateral Intramembrane Diffusion Barrier by Expression of a Mutant Tight Junction Membrane Protein. In: *J Cell Biol* 134 (4), S. 1031–1049.
- Braniste, Viorica; Al-Asmakh, Maha; Kowal, Czeslawa; Anuar, Farhana; Abbaspour, Afrouz; Tóth, Miklós et al. (2014): The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. In: *Sci Transl Med* 6 (263), 263ra158, 1-8. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009759.
- Brown, Thomas M.; Brown, Rebekah L.S. (1995): Neuropsychiatric Consequences of Renal Failure. In: *Psychosomatics* 36 (3), S. 244–253. DOI: 10.1016/S0033-3182(95)71663-2.
- Burek, Malgorzata; Salvador, Ellaine; Förster, Carola Y. (2012): Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model. In: *J Vis Exp* (66), e4022, 1-6. DOI: 10.3791/4022.
- Burn, D. J.; Bates, D. (1998): Neurology and the kidney. In: *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 65 (6), S. 810–821. DOI: 10.1136/jnnp.65.6.810.
- Bywaters, Eric George Laphorne; Beall, D. (1941): Crush injuries with impairment of renal function. In: *BMJ* (1(4185)), S. 427–432. DOI: 10.1136/bmj.1.4185.427.
- Chenouard, Alexis; Vuillaumier-Barrot, Sandrine; Seta, Nathalie; Kuster, Alice (2015): A Cause of Permanent Ketosis. GLUT-1 Deficiency. In: *JIMD Rep* 18, S. 79–83. DOI: 10.1007/8904\_2014\_352.

- Claude, Philippa (1978): Morphological factors influencing transepithelial permeability. A model for the resistance of the zonula occludens. In: *J Membr Biol* 39 (2-3), S. 219–232. DOI: 10.1007/BF01870332.
- Cohen, Gerald; Glorieux, Griet; Thornalley, Paul; Schepers, Eva; Meert, Natalie; Jankowski, Joachim et al. (2007): Review on uraemic toxins III. Recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro-towards a standardized approach for research on uraemia. In: *Nephrol Dial Transplant* 22 (12), S. 3381–3390. DOI: 10.1093/ndt/gfm210.
- Czupalla, Cathrin J.; Liebner, Stefan; Devraj, Kavi (2014): In vitro models of the blood-brain barrier. In: *Methods Mol Biol* 1135, S. 415–437. DOI: 10.1007/978-1-4939-0320-7\_34.
- Dantzer, R. (2001): Cytokine-induced sickness behavior. Mechanisms and implications. In: *Ann N Y Acad Sci* 933, S. 222–234. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb05827.x.
- DeLeo, J. A.; Yeziarski, R. P. (2001): The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. In: *Pain* 90 (1-2), S. 1–6. DOI: 10.1016/s0304-3959(00)00490-5.
- Deng, Dong; Xu, Chao; Sun, Pengcheng; Wu, Jianping; Yan, Chuangye; Hu, Mingxu; Yan, Nieng (2014): Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. In: *Nature* 510 (7503), S. 121–125. DOI: 10.1038/nature13306.
- Dou, Laetitia; Bertrand, Emilie; Cerini, Claire; Faure, Valerie; Sampol, Jose; Vanholder, Raymond et al. (2004): The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. In: *Kidney Int* 65 (2), S. 442–451. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00399.x.
- Duranton, Flore; Cohen, Gerald; Smet, Rita de; Rodriguez, Mariano; Jankowski, Joachim; Vanholder, Raymond; Argiles, Angel (2012): Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. In: *J Am Soc Nephrol* 23 (7), S. 1258–1270. DOI: 10.1681/ASN.2011121175.
- Edamatsu, Takeo; Fujieda, Ayako; Ezawa, Atsuko; Itoh, Yoshiharu (2014): Classification of Five Uremic Solutes according to Their Effects on Renal Tubular Cells. In: *Int J Nephrol* 2014, S. 512178. DOI: 10.1155/2014/512178.
- Eknoyan, Garabed (2002): Emergence of the Concept of Acute Renal Failure. In: *Am J Nephrol* 22 (2-3), S. 225–230. DOI: 10.1159/000063766.
- Enomoto, Atsushi; Niwa, Toshimitsu (2007): Roles of organic anion transporters in the progression of chronic renal failure. In: *Ther Apher Dial* 11 Suppl 1, 27-31. DOI: 10.1111/j.1744-9987.2007.00515.x.
- Felinski, Edward A.; Antonetti, David A. (2005): Glucocorticoid regulation of endothelial cell tight junction gene expression. Novel treatments for diabetic retinopathy. In: *Curr Eye Res* 30 (11), S. 949–957. DOI: 10.1080/02713680500263598.
- Förster, Carola (2008): Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. In: *Histochem Cell Biol* 130 (1), S. 55–70. DOI: 10.1007/s00418-008-0424-9.
- Förster, Carola; Kahles, Timo; Kietz, Silke; Drenckhahn, Detlev (2007): Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. In: *J Physiol (Lond)* 580 (Pt.3), S. 937–949. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.129007.

- Förster, Carola; Mäkela, Sari; Wärrri, Anni; Kietz, Silke; Becker, David; Hultenby, Kjell et al. (2002): Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (24), S. 15578–15583. DOI: 10.1073/pnas.192561299.
- Förster, Carola; Silwedel, Christine; Golenhofen, Nikola; Burek, Malgorzata; Kietz, Silke; Mankertz, Joachim; Drenckhahn, Detlev (2005): Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. In: *J Physiol (Lond)* 565 (Pt 2), S. 475–486. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.084038.
- Furuse, M.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Tsukita, S. (2001): Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. In: *J Cell Biol* 153 (2), S. 263–272. DOI: 10.1083/jcb.153.2.263.
- Furuse, Mikio; Fujita, Kohji; Hiiragi, Takashi; Fujimoto, Kazushi; Tsukita, Shoichiro (1998): Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. In: *J Cell Biol* 141 (7), S. 1539–1550. DOI: 10.1083/jcb.141.7.1539.
- Furuse, Mikio; Hirase, Tetsuaki; Itoh, Masahiko; Nagafuchi, Akira; Yonemura, Shigenobu; Tsukita, Sachiko; Tsukita, Shoichiro (1993): Occludin: A novel Integral Protein Localizing at Tight Junctions. In: *J Cell Biol* 126 (6), S. 1777–1788. DOI: 10.1083/jcb.123.6.1777.
- Gondouin, Bertrand; Cerini, Claire; Dou, Laetitia; Sallée, Marion; Duval-Sabatier, Ariane; Pletinck, Anneleen et al. (2013a): Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. In: *Kidney Int* 84 (4), S. 733–744. DOI: 10.1038/ki.2013.133.
- Gondouin, Bertrand; Cerini, Claire; Dou, Laetitia; Sallée, Marion; Duval-Sabatier, Ariane; Pletinck, Anneleen et al. (2013b): Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. supplementary methods. In: *Kidney Int* 84 (4).
- Heberden, William (1802): Commentaries on the history and cure of diseases. Reprinted by Classics of Medicine Library, Birmingham,. London, Payne.
- Hediger, M. A.; Turk, E.; Pajor, A. M.; Wright, E. M. (1989): Molecular genetics of the human Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. In: *Klin Wochenschr* 67 (17), S. 843–846. DOI: 10.1007/BF01717337.
- Helms, Hans C.; Abbott, N. Joan; Burek, Malgorzata; Cecchelli, Romeo; Couraud, Pierre-Olivier; Deli, Maria A. 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. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 36 (5), S. 862–890. DOI: 10.1177/0271678X16630991.
- Herold, G. u. Mitarbeiter (2014): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis, S. 634.
- Ho, Kwok M.; Sheridan, David J. (2006): Meta-analysis of frusemide to prevent or treat acute renal failure. In: *BMJ* 333 (7565), S. 420. DOI: 10.1136/bmj.38902.605347.7C.
- Hopkins, Stephen J. (2007): Central nervous system recognition of peripheral inflammation. A neural, hormonal collaboration. In: *Acta Biomed* 78 Suppl 1, S. 231–247.

- Husi, Holger; Human, Christin (2015): Molecular determinants of acute kidney injury. In: *J Inj Violence Res* 7 (2), S. 75–86. DOI: 10.5249/jivr.v7i2.615.
- Iwata, Kazufumi; Watanabe, Hiroshi; Morisaki, Takafumi; Matsuzaki, Takanobu; Ohmura, Takafumi; Hamada, Akinobu; Saito, Hideyuki (2007): Involvement of indoxyl sulfate in renal and central nervous system toxicities during cisplatin-induced acute renal failure. In: *Pharm Res* 24 (4), S. 662–671. DOI: 10.1007/s11095-006-9183-2.
- Keaney, James; Campbell, Matthew (2015): The dynamic blood-brain barrier. In: *FEBS J* 282 (21), S. 4067–4079. DOI: 10.1111/febs.13412.
- Khwaja, Arif (2012): KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. In: *Nephron Clin Pract* 120 (4), c179-84. DOI: 10.1159/000339789.
- Kierdorf, H. P. (2006): Organversagen Niere. Diagnostik und Therapie. In: *Dtsch Med Wochenschr* 131 (44), S. 2475–2479. DOI: 10.1055/s-2006-955033.
- Kim, D. M.; Lee, I. H.; Song, C. J. (2016): Uremic Encephalopathy. MR Imaging Findings and Clinical Correlation. In: *Am J Neuroradiol* 37 (9), S. 1604–1609. DOI: 10.3174/ajnr.A4776.
- Kniesel, Uwe; Wolburg, Hartwig (2000): Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier. In: *Cell Mol Neurobiol* 20 (1), S. 57–76. DOI: 10.1023/a:1006995910836.
- Konsman, Jan Pieter; Parnet, Patricia; Dantzer, Robert (2002): Cytokine-induced sickness behaviour. Mechanisms and implications. In: *Trends Neurosci* 25 (3), S. 154–159. DOI: 10.1016/s0166-2236(00)02088-9.
- Krause, Gerd; Winkler, Lars; Mueller, Sebastian L.; Haseloff, Reiner F.; Piontek, Jörg; Blasig, Ingolf E. (2008): Structure and function of claudins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (3), S. 631–645. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.10.018.
- Laffel, L. (1999): Ketone bodies. A review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. In: *Diabetes Metab Res Rev* 15 (6), S. 412–426. DOI: 10.1002/(sici)1520-7560(199911/12)15:6<412::aid-dmrr72>3.0.co;2-8.
- Lameire, Norbert; van Biesen, Wim; Vanholder, Raymond (2005): Acute renal failure. In: *Lancet* 365 (9457), S. 417–430. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)17831-3.
- Lee, H. Thomas; Park, Sang Won; Kim, Mihwa; Ham, Ahrom; Anderson, Lana J.; Brown, Kevin M. et al. (2012): Interleukin-11 protects against renal ischemia and reperfusion injury. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 303 (8), F1216-24. DOI: 10.1152/ajprenal.00220.2012.
- Leichtweiss, H. P.; Lübbers, D. W.; Weiss, C.; Baumgärtl, H.; Reschke, W. (1969): The oxygen supply of the rat kidney. Measurements of intrarenal pO<sub>2</sub>. In: *Pflugers Arch* 309 (4), S. 328–349. DOI: 10.1007/bf00587756.
- Liu, Manchang; Liang, Yideng; Chigurupati, Srinivasulu; Lathia, Justin D.; Pletnikov, Mikhail; Sun, Zhaoli et al. (2008): Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. In: *J Am Soc Nephrol* 19 (7), S. 1360–1370. DOI: 10.1681/ASN.2007080901.
- Liu, Wei-Ye; Wang, Zhi-Bin; Wang, Yue; Tong, Ling-Chang; Li, Ya; Wei, Xin et al. (2015): Increasing the Permeability of the Blood-brain Barrier in Three Different Models in vivo. In: *CNS Neurosci Ther* 21 (7), S. 568–574. DOI: 10.1111/cns.12405.

- Loo, D. D. F.; Zeuthen, T.; Chandy, G.; Wright, E. M. (1996): Cotransport of water by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (23), S. 13367–13370. DOI: 10.1073/pnas.93.23.13367.
- Lorris Betz, A.; Drewes, Lester R.; Gilboe, David D. (1975): Inhibition of glucose transport into brain by phlorizin, phloretin and glucose analogues. In: *Biochim Biophys Acta Biomembr* 406 (4), S. 505–515. DOI: 10.1016/0005-2736(75)90028-0.
- MacAulay, N.; Zeuthen, T. (2010): Water transport between CNS compartments. Contributions of aquaporins and cotransporters. In: *Neuroscience* 168 (4), S. 941–956. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.016.
- Maher, Frances; Vannucci, Susan J.; Simpson, Ian A. (1994): Glucose transporter proteins in brain. In: *FASEB J* 8 (13), S. 1003–1011. DOI: 10.1096/fasebj.8.13.7926364.
- Mahoney, C. A.; Sarnacki, P.; Arieff, A. I. (1984): Uremic encephalopathy. Role of brain energy metabolism. In: *Am J Physiol* 247 (3 Pt 2), F527-32. DOI: 10.1152/ajprenal.1984.247.3.F527.
- Masino, Susan A.; Ruskin, David N. (2013): Ketogenic diets and pain. In: *J Child Neurol* 28 (8), S. 993–1001. DOI: 10.1177/0883073813487595.
- Mehta, R. L. (2003): Acute Renal Failure Definitions and Classification. Time for Change? In: *J Am Soc Nephrol* 14 (8), S. 2178–2187. DOI: 10.1097/01.ASN.0000079042.13465.1A.
- Mehta, Ravindra L.; Kellum, John A.; Shah, Sudhir V.; Molitoris, Bruce A.; Ronco, Claudio; Warnock, David G. et al. (2007): Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. In: *Crit Care*, 11:R31. DOI: 10.1186/cc5713.
- Mitic, L. L.; Anderson, J. M. (1998): Molecular architecture of tight junctions. In: *Annu Rev Physiol* 60, S. 121–142. DOI: 10.1146/annurev.physiol.60.1.121.
- Miyazaki, T.; Ise, M.; Seo, H.; Niwa, T. (1997): Indoxyl sulfate increases the gene expressions of TGF-beta 1, TIMP-1 and pro-alpha 1(I) collagen in uremic rat kidneys. In: *Kidney Int Suppl* 62, S15-22.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J Immunol Methods* 65 (1-2), S. 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Mueckler, M.; Caruso, C.; Baldwin, S. A.; Panico, M.; Blench, I.; Morris, H. R. et al. (1985): Sequence and structure of a human glucose transporter. In: *Science* 229 (4717), S. 941–945. DOI: 10.1126/science.3839598.
- Naftalin, Richard J. (2008): Osmotic water transport with glucose in GLUT2 and SGLT. In: *Biophys J* 94 (10), S. 3912–3923. DOI: 10.1529/biophysj.107.122531.
- Nag, Sukriti; Manias, Janet L.; Stewart, Duncan J. (2009): Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. In: *Acta Neuropathol* 118 (2), S. 197–217. DOI: 10.1007/s00401-009-0541-0.
- Nash, Kevin; Hafeez, Abdul; Hou, Susan (2002): Hospital-acquired renal insufficiency. In: *Am J Kidney Dis* 39 (5), S. 930–936. DOI: 10.1053/ajkd.2002.32766.

- Nelimarkka, O.; Niinikoski, J. (1984): Oxygen and carbon dioxide tensions in the canine kidney during arterial occlusion and hemorrhagic hypotension. In: *Surg Gynecol Obstet* 158 (1), S. 27–32.
- Nishizaki, Tomoyuki; Kammesheidt, Anja; Sumikawa, Katumi; Asada, Takashi; Okada, Yasuhiro (1995): A sodium- and energy-dependent glucose transporter with similarities to SGLT1–2 is expressed in bovine cortical vessels. In: *Neurosci Res* 22 (1), S. 13–22. DOI: 10.1016/0168-0102(95)00876-U.
- Nitta, Takehiro; Hata, Masaki; Gotoh, Shimpei; Seo, Yoshiteru; Sasaki, Hiroyuki; Hashimoto, Nobuo et al. (2003a): Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. In: *J Cell Biol* 161 (3), S. 653–660. DOI: 10.1083/jcb.200302070.
- Nitta, Takehiro; Hata, Masaki; Gotoh, Shimpei; Seo, Yoshiteru; Sasaki, Hiroyuki; Hashimoto, Nobuo et al. (2003b): Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. In: *J Cell Biol* 161 (3), S. 653–660. DOI: 10.1083/jcb.200302070.
- Niwa, T.; Ise, M. (1994): Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. In: *J Lab Clin Med* 124 (1), S. 96–104.
- Orter, Sabrina; Förster, Carola; Bohnert, Michael (2018): Validation of sodium/glucose cotransporter proteins in human brain as a potential marker for temporal narrowing of the trauma formation. In: *Int J Legal Med* 133, S. 1107–1114. DOI: 10.1007/s00414-018-1893-6.
- Ohtsuki, Sumio; Asaba, Hiroshi; Takanaga, Hitomi; Deguchi, Tsuneo; Hosoya, Ken-ichi; Otagiri, Masaki; Terasaki, Tetsuya (2002): Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin. Its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain. In: *J Neurochem* 83 (1), S. 57–66. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2002.01108.x.
- Ryan, Michael J.; Johnson, Gretchen; Kirk, Judy; Fuerstenberg, Sally M.; Zager, Richard A.; Torok-Storb, Beverly (1994): HK-2. An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. In: *Kidney Int* 45 (1), S. 48–57. DOI: 10.1038/ki.1994.6.
- Sajja, Ravi K.; Prasad, Shikha; Cucullo, Luca (2014): Impact of altered glycaemia on blood-brain barrier endothelium. An in vitro study using the hCMEC/D3 cell line. In: *Fluids Barriers CNS* 11 (1), S. 8. DOI: 10.1186/2045-8118-11-8.
- Salvador, Ellaine; Burek, Malgorzata; Förster, Carola Y. (2016): Tight Junctions and the Tumor Microenvironment. In: *Curr Pathobiol Rep* 4, S. 135–145. DOI: 10.1007/s40139-016-0106-6.
- Sauvant, Christoph; Schneider, Reinhard; Holzinger, Hildegard; Renker, Sylvia; Wanner, Christoph; Gekle, Michael (2009): Implementation of an in vitro model system for investigation of reperfusion damage after renal ischemia. In: *Cell Physiol Biochem* 24 (5-6), S. 567–576. DOI: 10.1159/000257513.
- Sawada, Norimasa; Murata, Masaki; Kikuchi, Keisuke; Osanai, Makoto; Tobioka, Hirotoshi; Kojima, Takashi; Chiba, Hideki (2003): Tight junctions and human diseases. In: *Med Electron Microsc* 36 (3), S. 147–156. DOI: 10.1007/s00795-003-0219-y.

Scheepers, Andrea; Joost, Hans-Georg; Schürmann, Annette (2004): The Glucose Transporter Families SGLT and GLUT: Molecular Basis of Normal and Aberrant Function. In: *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28 (5), S. 364–371. DOI: 10.1177/0148607104028005364.

Schrier, Robert W.; Wang, Wei; Poole, Brian; Mitra, Amit (2004): Acute renal failure. Definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. In: *J Clin Invest* 114 (1), S. 5–14. DOI: 10.1172/JCI200422353.

Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H. et al. (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. In: *Cancer Res* 48 (17), S. 4827–4833.

Si, Jianping; Wang, Shaohui; Liu, Ning; Yang, Xiaofei; Wang, Ying; Li, Ling et al. (2017): Anticonvulsant effect of exogenous beta-hydroxybutyrate on kainic acid-induced epilepsy. In: *Exp Ther Med* 14 (1), S. 765–770. DOI: 10.3892/etm.2017.4552.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal Biochem* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Stewart, Jim (2009): Adding insult to injury. A review of the care of patients who died in hospital with a primary diagnosis of acute kidney injury (acute renal failure) : a report by the National Confidential Enquiry into Patient Outcome and Death, 2009. London: National Confidential Enquiry into Patient Outcome and Death.

Stinghen, Andréa E. M.; Chillon, Jean-Marc; Massy, Ziad A.; Boullier, Agnès (2014): Differential effects of indoxyl sulfate and inorganic phosphate in a murine cerebral endothelial cell line (bEnd.3). In: *Toxins (Basel)* 6 (6), S. 1742–1760. DOI: 10.3390/toxins6061742.

Thal, Serge C.; Wyschkon, Sebastian; Pieter, Dana; Engelhard, Kristin; Werner, Christian (2008): Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. In: *J Neurotrauma* 25 (7), S. 785–794. DOI: 10.1089/neu.2007.0497.

Tian, R.; Luo, Y.; Liu, Q.; Cai, M.; Li, J.; Sun, W. et al. (2014): The effect of claudin-5 overexpression on the interactions of claudin-1 and -2 and barrier function in retinal cells. In: *Curr Mol Med* 14 (9), S. 1226–1237. DOI: 10.2174/1566524014666141015160355.

Uchino, Shigehiko; Bellomo, Rinaldo; Goldsmith, Donna; Bates, Samantha; Ronco, Claudio (2006): An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients. In: *Crit Care Med* 34 (7), S. 1913–1917. DOI: 10.1097/01.CCM.0000224227.70642.4F.

Uchino, Shigehiko; Kellum, John A.; Bellomo, Rinaldo; Doig, Gordon S.; Morimatsu, Hiroshi; Morgera, Stanislao et al. (2005): Acute renal failure in critically ill patients. A multinational, multicenter study. In: *JAMA* 294 (7), S. 813–818. DOI: 10.1001/jama.294.7.813.

Vanholder, Raymond; Deyn, Peter PAUL de; van Biesen, Wim; Lameire, Norbert (2008): Marconi revisited. From kidney to brain--two organ systems communicating at long distance. In: *J Am Soc Nephrol* 19 (7), S. 1253–1255. DOI: 10.1681/ASN.2008040404.

- Vanholder, Raymond; Smet, Rita D. E.; Glorieux, Griet; S, Angel ARGILE'; Baurmeister, Ulrich; Brunet, Philippe et al. (2003a): Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability 63, S. 1934–1943, zuletzt geprüft am 07.09.2017.
- Vanholder, Raymond; Smet, Rita de; Glorieux, Griet; Argiles, Angel; Baurmeister, Ulrich; Brunet, Philippe et al. (2003b): Review on uremic toxins. Classification, concentration, and interindividual variability. In: *Kidney Int* 63 (5), S. 1934–1943. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.
- Vemula, Sharanya; Roder, Karen E.; Yang, Tianzhi; Bhat, G. Jayarama; Thekkumkara, Thomas J.; Abbruscato, Thomas J. (2009): A functional role for sodium-dependent glucose transport across the blood-brain barrier during oxygen glucose deprivation. In: *J Pharmacol Exp Ther* 328 (2), S. 487–495. DOI: 10.1124/jpet.108.146589.
- Wais, Sebastian (2012): Die Rolle der Glukosetransporter an der Blut-Hirn-Schranke nach einem Schädel-Hirn-Trauma und deren eventueller Einfluss auf die Entwicklung eines sekundären Hirnödems. Hg. v. Universität Würzburg.
- Weber, C. R.; Turner, J. R. (2007): Inflammatory bowel disease. Is it really just another break in the wall? In: *Gut* 56 (1), S. 6–8. DOI: 10.1136/gut.2006.104182.
- Weber, F.; Rieckmann, P. (1995): Pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. The role of cytokines. In: *Nervenarzt* 66 (2), S. 150–155.
- Whitehead, T. P.; Kricka, L. J.; Carter, T. J.; Thorpe, G. H. (1979): Analytical luminescence. Its potential in the clinical laboratory. In: *Clin Chem* 25 (9), S. 1531–1546.
- Yu, Amy S.; Hirayama, Bruce A.; Timbol, Gerald; Liu, Jie; Diez-Sampedro, Ana; Kepe, Vladimir et al. (2013): Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. In: *Am J Physiol, Cell Physiol* 304 (3), C240-7. DOI: 10.1152/ajpcell.00317.2012.
- Yu, Mina; Kim, Young Ju; Kang, Duk-Hee (2011): Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. In: *Clin J Am Soc Nephrol* 6 (1), S. 30–39. DOI: 10.2215/CJN.05340610.
- Zeuthen, Thomas; Belhage, Bo; Zeuthen, Emil (2006): Water transport by Na<sup>+</sup>-coupled cotransporters of glucose (SGLT1) and of iodide (NIS). The dependence of substrate size studied at high resolution. In: *J Physiol (Lond)* 570 (Pt 3), S. 485–499. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.100933.

### 10 Danksagung

*Auf dem Marktplatz der Universitätsstadt Göttingen steht auf einem Brunnen das wohl meist geküsste Mädchen der Welt: das Gänseliesel.*

*Niemand weiß, wer dieses Mädchen ist oder woher sie kommt, aber was sie den Göttingern bedeutet, ist weit über die Stadtgrenzen bekannt. Sie ist ihr Wahrzeichen.*

*Es ist eine Jahrzehnte lange Tradition der Doktoranden der Stadt, nach ihrer Promotionsfeier zu dem Gänseliesel emporzuklettern, ihr Blumen zu bringen und sie zu küssen.*

*Ein einfaches Mädchen ohne Herkunft, ohne Geld und ohne Bildung mit einer Gans zu ihrer Rechten und einer zu ihrer Linken, steht für viele am Höhepunkt ihres akademischen Werdegangs.*

Dieser Brauch hat mich Jahre lang immer wieder inspiriert, motiviert und diese Arbeit auf eine gewisse Art und Weise vorangetrieben.

In diesem Sinne möchte ich folgenden Personen danken:

Ich danke Prof. Dr. Dr. Carola Y. Förster für die Vergabe des Themas, die stets konstruktive Kritik und Bestrebungen, das Projekt voranzubringen.

Ebenfalls danke ich Priv.-Doz. Dr. Reinhard Schneider für die Idee zu diesem Projekt.

Ein außerordentlicher Dank an Prof. Dr. Christoph Wanner für die Rezeption des Korreferates.

Einen Dank an Prof. Dr. Norbert Roewer und Prof. Dr. Patrick Meybohm für die Möglichkeit, die Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin und Schmerztherapie der Universität Würzburg durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin Priv.-Doz. Dr. Malgorzata Burek, die mir von Anfang an mit Rat und Tat zur Seite stand und die mit ihrer Unterstützung einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistete.

Ebenso möchte ich Anja Neuhoff und Elisabeth Wilken danken, die mir so viel beibrachten und in jeder auch nur so ausweglos erscheinenden Situation und zu jeder Tageszeit halfen. Für ihre Hilfe und Ideen möchte ich zudem Priv.-Doz. Dr. Winfried Neuhaus, Dr. Sabrina Oerter und Katharina Pech danken.

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank Dr. Karen Blumenbach für ihren Beistand in den vergangenen Jahren. Ohne ihre Förderung und ihren Optimismus hätte ich diesen Weg niemals eingeschlagen.

Als kleines Zeichen der Wertschätzung ihrer großartigen Arbeit möchte ich mich bei Simone De Smet bedanken.

Ein kleiner Dank an die Angestellten des Bamberger Bahnhofs.

Last but not least möchte ich meinen Eltern Birgit und Dr. Fred-Robert Burmester, meinem Bruder Markus R. Burmester, meiner ganzen Familie und meinen Freunden, insbesondere Dr. Sebastian Smolne, danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und ohne die ich heute nicht dort wäre, wo ich jetzt bin.

*„Errare humanum est, sed in errare perseverare diabolicum.“* Hieronymus

## 11 Publikation

Burek, Malgorzata; Burmester, Sandra; Möller-Ehrlich, Kerstin; Schneider, Reinhard; Roewer, Norbert; Förster, Carola Y. (2018): In vitro model of kidney-brain crosstalk in kidney ischemia/reperfusion injury.

Vorge stellt auf dem „21st International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers“, 19-21.09.2018, Arad, Rumänien

Burek, Malgorzata; Burmester, Sandra; Salvador, Ellaine R.; Möller-Ehrlich, Kerstin; Schneider, Reinhard; Roewer, Norbert; Nagai, Michiaki; Förster, Carola Y. (2020): Kidney ischemia / reperfusion injury induces changes in the drug transporter expression at the blood-brain barrier in vivo and in vitro.

*Eingereicht: Frontiers in Physiology, section Renal and Epithelial Physiology, am 05.06.2020*