

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin und
Schmerztherapie**

der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Patrick Meybohm

**Auswirkungen des Protocadherin-gamma-C3-Knockouts auf die
Barriereigenschaften der Blut-Hirn-Schranke**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christina Dilling

aus Nürnberg

Würzburg, November 2021



Referentin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Malgorzata Burek

Koreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Blut – Hirn – Schranke.....	1
1.1.1	Funktion	1
1.2	Modelle der BHS in vitro	3
1.2.1	cEND und cerebEND.....	3
1.3	Protocadherine	4
1.4	Signalwege und deren Beeinflussung durch Protocadherine.....	6
1.4.1	mTOR.....	6
1.4.2	Wnt-Signalweg	7
1.5	CRISPR/Cas9	8
1.6	Ziel der Arbeit	10
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	12
2.1.2	Substanzen	13
2.1.3	Antikörper	15
2.1.4	Sonden real-time PCR	16
2.1.5	Kits.....	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Zellkulturmethoden	18
2.2.1.1	Kultivierung der Zellkulturen.....	18
2.2.1.2	Etablierung der Knock-out Zelllinien.....	19
2.2.1.3	Messung des Transendothelialen Elektrischen Widerstands (TEER)	20
2.2.1.4	Messung der Zellpermeabilität	20

2.2.1.5	Zellmigration	20
2.2.1.6	Zelladhäsion	21
2.2.1.7	Gefäßformation	22
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.2.1	RNA-Isolation	22
2.2.2.2	Reverse Transkription - Herstellung cDNA	24
2.2.2.3	Quantitative real-time PCR	25
2.2.3	Biochemische Methoden	26
2.2.3.1	Immunhistochemie	26
2.2.3.2	Proteinpräparation	28
2.2.3.3	Proteinmengenbestimmung	28
2.2.3.4	Elektrophorese	29
2.2.3.5	Western Blot	31
2.3	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Etablierung der Knock-out Zelllinien	34
3.2	Färbung	34
3.3	Zellpermeabilität	35
3.4	Wachstumsverhalten	37
3.4.1	Gefäßformation	38
3.5	Zelladhäsion	39
3.6	Veränderungen der Tight Junctions	40
3.7	Wnt- Signalweg	43
3.8	mTOR-Signalweg	45
3.9	Mesenchymale Marker	46

4	Diskussion.....	48
4.1	Knock-out.....	48
4.2	Barriereeigenschaften und Regulation der TJ-Proteine	48
4.3	Wachstumsverhalten	53
4.4	Adhäsionsverhalten	54
4.5	Mesenchymale Marker	55
4.6	Signalwege	56
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis.....	60
I.	Abkürzungsverzeichnis	
II.	Abbildungsverzeichnis	
III.	Tabellenverzeichnis	
IV.	Danksagung	
V.	Lebenslauf	
VI.	Veröffentlichungen	

1 Einleitung

1.1 Blut – Hirn – Schranke

1.1.1 Funktion

Zur Aufrechterhaltung eines spezifischen Milieus im neuronalen Gewebe des zentralen Nervensystems sind komplexe Regulationsmechanismen nötig. Eine zentrale Rolle kommt dabei der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu. Diese verhindert den unkontrollierten Austausch von Ionen, Molekülen und Zellen und schützt das neuronale Gewebe vor dem Eindringen von Toxinen, während gleichzeitig die Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet wird (Abbott et al., 2006). Gebildet wird die BHS von den Endothelzellen der zerebralen Blutgefäße. Diese bilden untereinander Tight Junctions (TJ) aus, welche die Grundlage der Barrierefunktion darstellen (Wolburg et al., 2002).

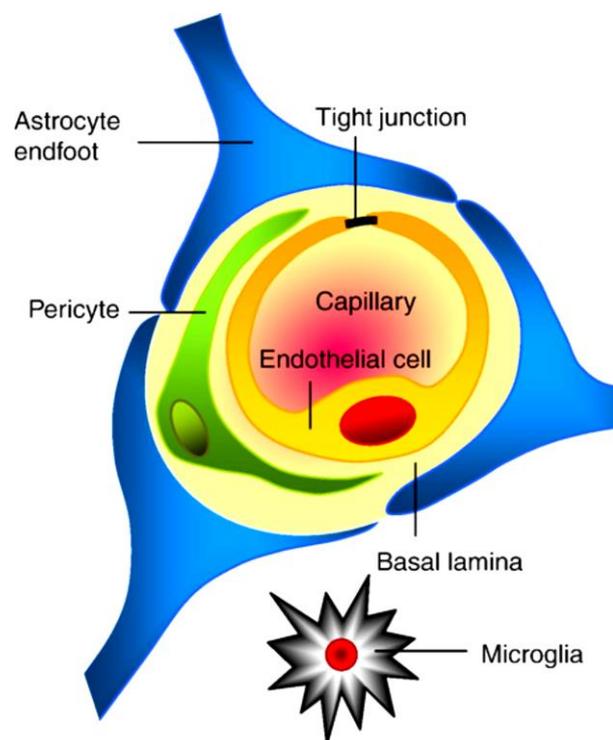


Abbildung 1: Schematische Darstellung der BHS. Die Endothelzellen der zerebralen Blutgefäße bilden TJs aus. Die Kapillaren sind von Perizyten umgeben, die gemeinsam mit den Endothelzellen von der Basallamina umschlossen sind. Die Endfüße der Astrozyten formen sich um die Kapillaren und spielen durch Zell-Interaktionen eine wichtige Rolle bei der Regulation der BHS (Abbott et al., 2010). Lizenz zur Veröffentlichung der Abbildung vorhanden.

Die TJ bilden eine dichte, gürtelartige Barriere, welche die unkontrollierte parazelluläre Diffusion verhindert. Gebildet werden die TJ von spezifischen Proteinen, von denen Occludin als erstes identifiziert werden konnte (Furuse et al., 1993). Neben Occludin werden die TJ von weiteren Transmembranproteinen, den Claudinen gebildet.

Während Occludin hauptsächlich regulatorische Eigenschaften zu haben scheint, sind die Claudine für die Ausbildung der dichten Barriere verantwortlich (Wolburg et al., 2002). Die Isoformen Claudin-1, -3, -5 und -12 konnten an zerebralen Endothelzellen nachgewiesen werden (Haseloff et al., 2015). Weitere Proteine, wie die Junctionalen Adhäsions Moleküle (engl. Junctional adherens molecules, JAM) und Zonula occludens Proteine (ZO), sind an der Verbindung der TJ Proteine untereinander und mit dem zytoskelettalen Apparat beteiligt (siehe Abbildung 2).

Zum junctionalen Komplex gehören neben den TJs die Adhärenskontakte (engl. Adherens Junctions, AJ), die über VE-Cadherin (Vascular-Endothelial-Cadherin) den primären Zellkontakt herstellen und essentiell für die Ausbildung und Stabilisierung der TJ sind (Abbott et al., 2010).

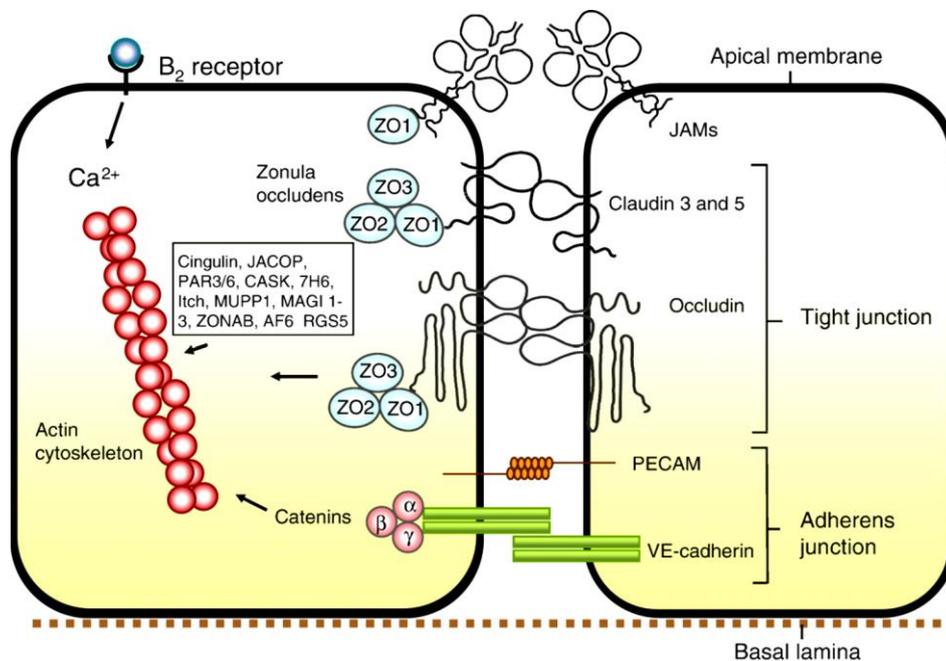


Abbildung 2: Molekulare Darstellung des Junctionalen Komplexes. Die TJ bestehen aus Occludin und Claudinen, welche über Zonula occludens Proteine (ZO1-3) an das Zytoskelett gekoppelt sind. Für den primären Zellkontakt sind die Adhärenskontakte (adherens junctions) nötig, welche von VE-Cadherinen gebildet werden (Abbott et al., 2010). Lizenz zur Veröffentlichung der Abbildung vorhanden.

1.2 Modelle der BHS in vitro

Bereits seit den 1970er Jahren wird versucht in vitro Modelle der BHS zu generieren. Nachdem zunächst nur die Isolation von kapillären Gefäßen im Ganzen aus dem Gehirn gelang, konnten mit fortschreitender Technik, die die Gefäße umgebenden Perizyten und Basalmembranen entfernt werden und die Isolierung von primären Endothelzellen erfolgen (Helms et al., 2016). Zur Validierung der BHS Modelle werden verschiedene Parameter herangezogen, wie der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER), die parazelluläre Permeabilität, die Expression von TJ Proteinen (insbesondere Occludin, Claudin-5 und ZO-1), die Expression von Effluxpumpen und anderen charakteristischen Transportern, z.B. ABC Transporter und SLC (Helms et al., 2016).

Die Endothelzellen spielen für die Barriereigenschaften eine entscheidende Rolle. Man weiß jedoch, dass die phänotypische Ausprägung auch durch die Astrozyten und Perizyten reguliert wird (Abbott et al., 2006). Die endothelialen Zellkulturen, werden daher nicht nur als Monokultur, sondern auch als Ko-Kultur mit Astrozyten verwendet, da sich in diversen Studien eine Erhöhung des TEER durch die Ko-Kultur zeigte (Helms et al., 2016). In einigen Modellen werden in einer Triple-Kultur neben den Astrozyten auch Perizyten verwendet (Nakagawa et al., 2009).

Da die Generierung menschlicher primärer Endothelzelllinien mit einigen Schwierigkeiten (u.a. der zuverlässigen Beschaffung von Proben) verbunden ist, verwenden die meisten Arbeitsgruppen Modelle aus Schweinen, Rindern, Ratten oder Mäusen. Es gibt jedoch auch einige menschliche BHS Modelle, wie z.B. die hCMEC/D3 Zelllinie, welche aus Gewebe des Temporallappens, nach Entfernung im Rahmen einer operativen Epilepsieoperation gewonnen wurde (Weksler et al., 2005). Darüber hinaus werden neuartige humane in vitro Modelle aus Stammzellen gewonnen (Helms et al., 2016).

1.2.1 cEND und cerebEND

Förster et al. generierten die murinen, immortalisierten zerebralen bzw. zerebellären Endothelzelllinien cEND und cerebEND (Forster et al., 2005; Silwedel et al., 2006). Beide Zelllinien zeigen ein spindelförmiges Zellwachstum und bilden einen einschichtigen

Zellrasen, welcher nach Erreichen der Konfluenz zu einer Inhibition des weiteren Zellwachstums führt. Sowohl in cEND als auch cerebEND kann die Expression wichtiger TJ Proteine, wie Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin gezeigt werden. cEND zeigen einen TEER von bis zu $900 \Omega\text{cm}^2$, cerebEND bis zu $500 \Omega\text{cm}^2$ und damit höhere Werte als die kommerziell erhältliche Zelllinie bEND.3, für die Werte von $100\text{-}140 \Omega\text{cm}^2$ beschrieben wurden (Silwedel et al., 2006; Tóth et al., 2011). Passend hierzu zeigen cEND Zellen eine geringere Permeabilität für Makromoleküle, wie z.B. FITC-Dextran (4–500 kDa) oder Fluoreszein (300 Da). Durch Kultivierung in Medium mit niedrigerem Serumgehalt erhöht sich die Dichtigkeit der Zellschichten und die Permeabilität für Makromoleküle nimmt ab. cEND Zellen zeigen eine starke Reaktion auf die Behandlung mit Glukokortikoiden. Es konnte eine Zunahme des TEER, ein Einfluss auf die Regulation von TJ Proteinen, wie Claudin-5 und Occludin, sowie auf die zytoskeletale Organisation gezeigt werden (Blecharz et al., 2008; Burek et al., 2009; Forster et al., 2005; Harke et al., 2008). Auf inflammatorische Einflüsse, wie die Behandlung mit TNF α reagieren cEND und cerebEND mit einer Abnahme des TEER und verminderter Expression von TJ Proteinen, wobei die Effekte in der cerebEND Zelllinie ausgeprägter ausfallen. Es zeigt sich in cerebEND Zellen außerdem eine geringere Expression von Claudin-1 und Occludin im Vergleich zu cEND. Für Claudin-3 und -12 zeigen sich höhere Expressionslevel (Silwedel et al., 2006). Dies lässt darauf schließen, dass die immortalisierten Endothelzelllinien aus unterschiedlichen Gehirnregionen auch abweichende Barriereigenschaften aufweisen und unterschiedlich auf pathogene Einflüsse reagieren. Seit vielen Jahren haben sich cEND und cerebEND in der Erforschung der BHS Eigenschaften in vitro als geeignete Modelle erwiesen.

1.3 Protocadherine

Cadherine sind eine große Gruppe von Molekülen, die neben Ca^{2+} abhängiger Zelladhäsion viele weitere regulatorische Eigenschaften der Zellkommunikation, u.a. während der Embryogenese und der neuronalen Entwicklung, vermitteln (Takeichi, 1988; Yagi et al., 2000).

Mit bisher über 80 identifizierten Formen sind die Protocadherine (Pcdhs) die größte Subgruppe der Cadherine und werden hauptsächlich im Nervensystem exprimiert (Kim et al., 2011). Entdeckt wurden sie durch den Einsatz von PCR Primern für extrazelluläre Anteile der Cadherine (Sano et al., 1993). Pcdhs bestehen aus sechs oder sieben extrazellulären Domänen (sog. Ectodomänen, EC), einem transmembranen Anteil und einer variablen zytoplasmatischen Domäne (Variable Cytoplasmatic Domain, VCD). Basierend auf ihrer genomischen Organisation unterscheidet man weiterhin in geclusterte und nicht-geclusterte Pcdhs. Zu den geclusterten Pcdhs zählen Pcdh α , β und γ , deren genetische Information in drei sequentiellen Clustern auf dem Chromosom 5q31 (Chromosom 18 in Mäusen) liegt und insgesamt 52 Gene enthält (Frank et al., 2002). Die nicht-geclusterten Pcdhs unterteilt man in Pcdh δ 1, δ 2 und ϵ Untergruppen, deren Gene an unterschiedlichen Stellen im Genom verteilt liegen (Kim et al., 2011).

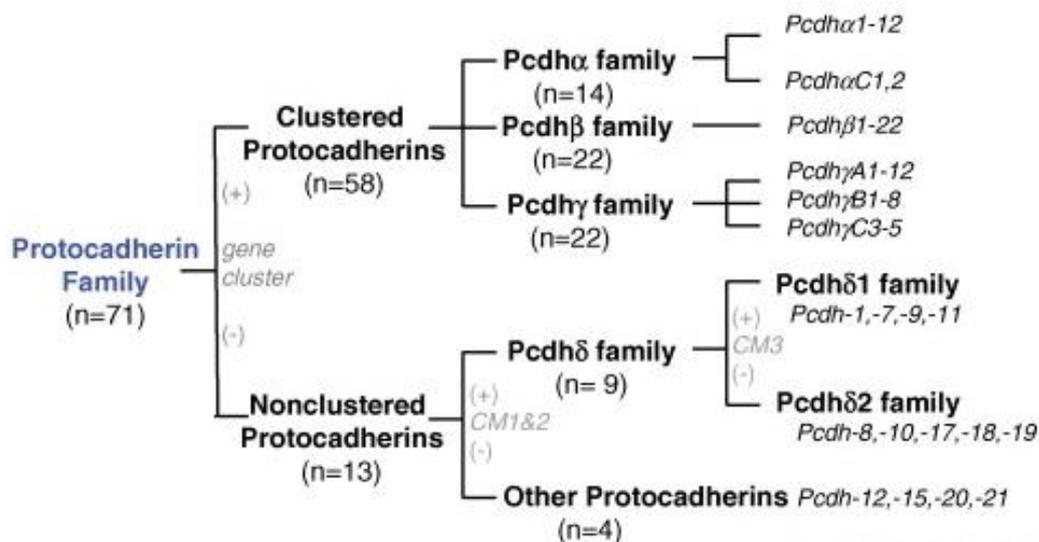


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pcdh-Familie. Lizenz zur Veröffentlichung der Abbildung vorhanden (Morishita et al., 2007).

Die geclusterten Pcdhs spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems. Insbesondere für die γ -Protocadherine konnte eine Beteiligung an der Regulation von neuronalem Überleben (C. Lin et al., 2010; Prasad et al., 2008; X. Wang et al., 2002), Synaptogenese (Garrett et al., 2009; Weiner et al., 2005), axonaler Entwicklung (Prasad et al., 2011) und der dendritischen Arborisation der Neuronen (Garrett et al., 2012; Molumby et al., 2016) nachgewiesen werden.

Außerdem spielen Pcdhs eine Rolle bei der Zellmigration, Zellseparation und Differenzierung (Aamar et al., 2008; Kuroda et al., 2002; Medina et al., 2004) sowie der Inhibition von Zellwachstum (Okazaki et al., 2002; J. S. Yu et al., 2008).

Für Pcdh α und γ wurde eine Interaktion mit den Tyrosinkinase PYK2 und FAK nachgewiesen, die zu einer Inaktivierung dieser Kinasen führt (J. Chen et al., 2009). Außerdem interagieren die γ -Pcdhs mit PDCD 10 (programmed cell death 10), auch als CCM3 (cerebral cavernous malformation protein 3) bekannt, einer Ursache für zerebrale kavernöse Malformationen (C. Lin et al., 2010). Mäuse, bei denen die Gene für alle 22 γ Pcdhs entfernt wurden, starben kurz nach der Geburt (X. Wang et al., 2002).

Neben diesen Eigenschaften wird die Möglichkeit der Tumor-Suppression durch Pcdhs diskutiert. So konnte für einige Pcdhs eine epigenetische Stilllegung und eine Minderexpression in Mamma-Karzinomen (J. S. Yu et al., 2008), sowie in Tumoren von Leber, Niere und Kolon nachgewiesen werden (Dallosso et al., 2009; Dallosso et al., 2012; Okazaki et al., 2002). Insbesondere im Wilms-Tumor, einem kindlichen Nierentumor, und beim kolorektalen Karzinom konnte eine Hypermethylierung und damit verbundene Minderexpression der geclusterten Pcdhs nachgewiesen werden.

1.4 Signalwege und deren Beeinflussung durch Protocadherine

1.4.1 mTOR

Bei mTOR (engl. Mammalian target of rapamycin) handelt es sich um eine Serin/Threonin Kinase, die an der Regulation unzähliger Prozesse, wie Zellwachstum, Zellüberleben, Metabolismus, Autophagie und Immunität, beteiligt ist. Die Signalübertragung erfolgt über zwei Komplexe, mTOR1 und mTOR2, wobei nur mTOR1 durch Rapamycin gehemmt werden kann, während die Regulation von mTOR2 Rapamycin-unabhängig erfolgt. Eine Dysregulation von mTOR spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Krankheiten, wie Alzheimer, Diabetes, Adipositas und Krebs (Harries et al., 2012; Hua et al., 2019). Auch in der Neurogenese, sowie der Entwicklung des Gehirns werden viele Prozesse, wie Proliferation und Migration über mTOR reguliert. Viele neurodegenerative Erkrankungen, aber auch Hirntumore, Autismus und

Epileptische Erkrankungen können mit einer fehlerhaften mTOR Funktion assoziiert werden (LiCausi et al., 2018).

Dallosso et al. zeigten eine Regulierung von mTOR durch Pcdh γ C3 im kolorektalen Karzinom. Dabei konnte Pcdh γ C3 als möglicher Tumorsuppressor identifiziert werden. Die in normalen Kolonepithelien hoch exprimierte Pcdh-Isoform zeigte sich in Karzinomzellen hypermethyliert und damit inaktiviert, während sie in Adenomen und normalen Kolonepithelzellen zu großen Teilen unmethyliert vorlag. Dies deutet auf eine Schlüsselrolle in der Adenom-Karzinom-Transformation hin. Eine Überexpression von Pcdh γ C3 führte zu einer Reduktion der mTOR Aktivität, während ein Knock-down mit erhöhter mTOR Aktivität in Adenomzellen assoziiert war (Dallosso et al., 2012).

1.4.2 Wnt-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin Signalweg ist während der Embryogenese an vielen biologischen Prozessen beteiligt, wie der Zelldifferenzierung und Proliferation, während er in adulten Zellen meist inaktiviert ist. Dysregulationen des Wnt-Signalwegs sind mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert, wie angeborenen Syndromen, Fehlbildungen und Karzinomen (Clevers et al., 2012).

In der inaktiven Form wird der Haupteffektor des Signalwegs, β -Catenin, durch den Destruktionskomplex, bestehend aus Axin1, Gsk3b und APC, kontinuierlich phosphoryliert und im Anschluss ubiquitiniert und abgebaut (s. Abbildung 4A). Durch Bindung von Wnt-Liganden an den Komplex aus LRP5/6 und Frizzeld (FZD) kommt es zur Aktivierung des Signalwegs, infolgedessen der Destruktionskomplex inaktiviert wird und β -Catenin akkumuliert (s. Abbildung 4B). Durch Translokation in den Nukleus wird dort die Transkription von Wnt-Zielgenen initiiert (V. S. Li et al., 2012).

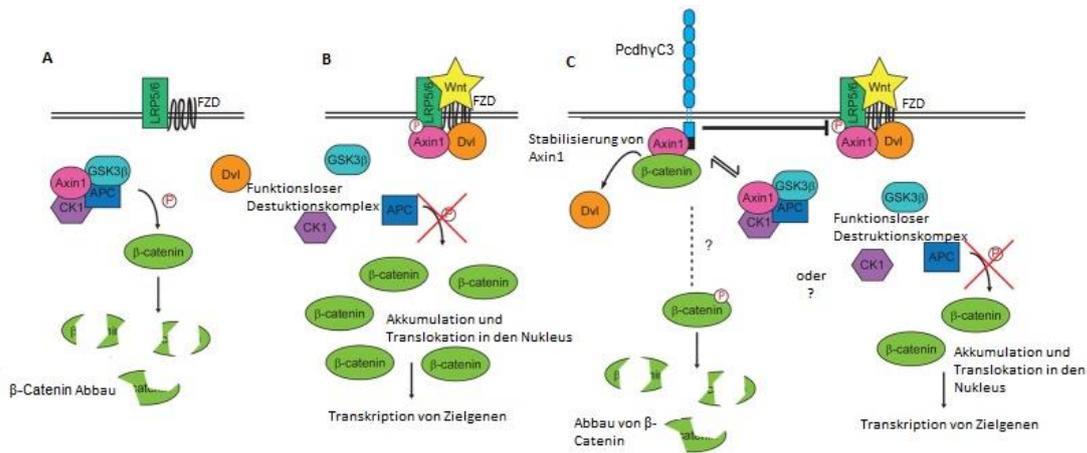


Abbildung 4: Wnt-Signalweg. A: Inaktivierte Form, β -Catenin wird durch den Destruktionskomplex phosphoryliert und abgebaut. B: Aktivierte Form, durch Bindung von Wnt kommt es zur Inaktivierung des Destruktionskomplex, β -Catenin akkumuliert und transloziert in den Nucleus, wo es die Transkription von Zielgenen aktiviert. C: Durch PcdhyC3 wird Axin1 an der Membran stabilisiert. Es kommt zu einer verminderten Phosphorylierung von Lrp5/6 und einer Hemmung des Wnt Signalwegs. Es ist unklar, ob das membrangebundene Axin1 einen funktionsfähigen Destruktionskomplex bilden kann oder ob die Regulation von β -Catenin durch PcdhyC3 auf andere Weise abläuft (Darstellung modifiziert nach Mah et al., 2016). Lizenz zur Veröffentlichung der Abbildung vorhanden.

Dalosso et al. zeigten einen hemmenden Einfluss von γ -Pcdhs auf den Wnt-Signalweg im kindlichen Wilms Tumor (Dalosso et al., 2009) und im kolorektalen Karzinom (Dalosso et al., 2012). PcdhyC3 konnte von 20 unterschiedlichen γ -Pcdh Isoformen als einzige mit konstant hemmendem Einfluss identifiziert werden. Die VCD von PcdhyC3 bindet dabei Axin1 und stabilisiert es so an der Membran (vgl. Abbildung 4C), was zu einer Herunterregulation des Wnt-Signalwegs führt (Mah et al., 2016).

1.5 CRISPR/Cas9

Bei CRISPR (engl. clustered regularly interspaced palindromic repeats) handelt es sich um Palindrom-artige Wiederholungen im Genom, zwischen denen kurze sog. Zwischensequenzen liegen. Diese wurden 1987 zum ersten Mal in *Escherichia coli* nachgewiesen (Ishino et al., 1987). Die Vermutung, dass es sich dabei um eine Art bakterielles Immunsystem handelt, erhärtete sich 2005 mit dem Nachweis, dass die Zwischensequenzen ursprünglich aus Viren oder Plasmiden stammen (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005) und der Erkenntnis, dass CRISPR assoziierte Gene (Cas) für Proteine mit Nuklease- oder Helicase-Domänen codieren (Jansen et al., 2002; Pourcel et

al., 2005). Die aus den Zwischensequenzen codierte CRISPR RNA (crRNA) fungiert als Vorlage, welche im Komplex mit dem Cas Protein in der Lage ist, eingedrungene Fremd-DNA aufzufinden (Brouns et al., 2008; Marraffini et al., 2008) und durch Induktion von Doppelstrangbrüchen ein weiteres Vermehren der Viren zu verhindern (Garneau et al., 2010).

Es konnten drei CRISPR Cas Systeme (I-III) identifiziert werden. Während I und III aus einem Komplex an Proteinen bestehen, funktioniert die RNA geleitete DNA-Erkennung im Cas II System über ein einzelnes Cas Protein (van der Oost et al., 2014). Allen Systemen gemein ist, dass zur Erkennung der Ziel DNA ein sog. PAM (engl. Protospacer Adjacent Motif) nötig ist. Dabei handelt es sich um ein kurzes DNA-Motiv, welches an die zur crRNA passende Sequenz angrenzt und ohne welches ein Erkennen der DNA-Sequenz nicht stattfinden kann.

2011 zeigte sich, dass an der Ausreifung der crRNA eine dem CRISPR Genlokus vorgelagerte Sequenz beteiligt ist, welche für die tracrRNA (engl. trans-activating RNA) codiert (Deltcheva et al., 2011). Im gleichen Jahr wurde Cas9 als das Protein identifiziert, welches die Funktion des Cas II-Systems darstellt. Hierbei handelt es sich um ein großes multifunktionelles Protein mit zwei mutmaßlichen Nuklease Domänen: HNH und RuvC like (Sapranauskas et al., 2011). Jinek et al. zeigten 2012 in *S. pyogenes* die Funktion von CRISPR/Cas9 als Endonuklease, welche durch eine Doppel RNA (tracrRNA:crRNA) zur Zielsequenz geführt wird, wo ein gezielter Doppelstrangbruch erfolgt. Die HNH Domäne schneidet dabei den Strang, der komplementär zur 20 Nukleotid-langen crRNA ist, RuvC like den dazu komplementären DNA-Strang. Weiterhin gelang es aus den beiden RNA Sequenzen tracrRNA und crRNA eine sog. Single guide (sgRNA) zu synthetisieren, welche beide Funktionen in sich vereint. Am 5' Ende befindet sich dabei eine Sequenz aus 20 Nukleotiden, welche die zu schneidende Ziel-DNA Sequenz festlegt, am 3' Ende eine Doppelstrang Sequenz, über welche die Bindung an die Cas9 Nuklease stattfindet (s. Abbildung 5). Mit diesem Mechanismus wurde ein einfach herzustellendes Werkzeug geschaffen, um gezielt DNA-Doppelstrangbrüche herbeizuführen, vorausgesetzt, die anvisierte DNA liegt neben einer PAM Sequenz (Jinek et al., 2012).

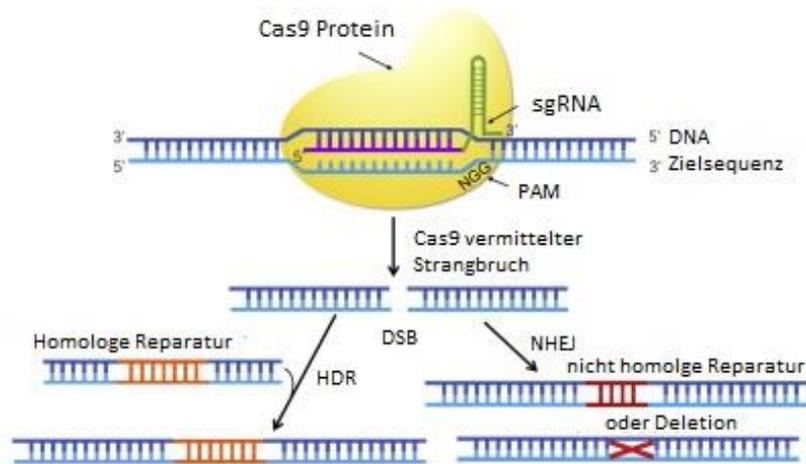


Abbildung 5: CRISPR/Cas9 Die Cas9 Endonuklease findet anhand der Nukleotidsequenz der sgRNA die zu schneidende DNA-Sequenz, die neben einer PAM Region liegt und induziert dort einen Doppelstrangbruch (DSB). Die Reparatur erfolgt entweder über nicht homologes Verknüpfen der Enden (NHEJ) oder als Homologe Reparatur (HDR). Abbildung modifiziert nach (Tian et al., 2017). Lizenz zur Veröffentlichung der Abbildung vorhanden.

Weiterentwicklungen ermöglichen den Einsatz der Cas9 Nuklease auch in tierischen und menschlichen Zellen. Durch Transfektion eines Plasmids, welches für die Cas9 Nuklease und eine spezifische RNA Sequenz codiert, kann dieser Mechanismus auch in nicht eukaryonten Zellen genutzt werden, um gezielt DNA zu schneiden (Cong et al., 2013; Jinek et al., 2013).

Die Reparatur des so entstandenen Doppelstrangbruchs erfolgt entweder durch nicht homologe Verknüpfung der Enden (engl. non homologous end joining, NHEJ), welche relativ fehleranfällig ist, oder anhand einer spezifischen Vorlage (engl. homology directed repair, HDR). Die HDR kann genutzt werden, um z.B. ebenfalls über ein Plasmid eine Reparaturvorlage zur Verfügung zu stellen, über die präzise DNA-Veränderungen, wie das Einbringen eines Antibiotika-Resistenz-Gens, erzielt werden können (Ran et al., 2013).

1.6 Ziel der Arbeit

Das Vorkommen und die Funktion der Pcdhs in peripherem und neuronalem Gewebe wurde bereits mehrfach beschrieben und untersucht. Von einigen Autoren wurden Pcdhs auch bereits in zerebralen Gefäßen beschrieben.

Zur Expression und Funktion von Pcdhs an Endothelzellen des Gehirns, insbesondere an mikrovaskulären Endothelien ist bisher wenig bekannt und dies soll daher Gegenstand der Untersuchung dieser Arbeit sein.

In Vorarbeit zu dieser wurde die Expression verschiedener Pcdhs an endothelialen Zellen untersucht. Hierbei konnte eine starke Expression auf mRNA und Protein-Ebene an zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (brain microvascular endothelial cells, BMEC), sowie an Endothelzellen des Herzens und der Nabelschnur nachgewiesen werden (Dilling et al., 2017).

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von Pcdhs an BMECs und der Blut-Hirn-Schranke werden im Rahmen dieser Arbeit Knock-out Zelllinien für die Isoform Pcdh γ C3 erstellt und der Einfluss auf die Expression der Gene der TJ Proteine und der Wnt und mTor Signalwege untersucht. Außerdem erfolgt eine Analyse der Barriereigenschaften und des Wachstumsverhaltens dieser Zelllinien.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
24-well Nuclon Surface Gewebeplatte	Thermo Fisher Scientific
24-Well Trans-well Platte (ThinCert, Porengröße 0,4µm)	Greiner Bio One
6 Well Nuclon Surface Gewebeplatten	Greiner Bio One
96 well Zellkulturplatte	Thermo Fisher Scientific
Biosphere® Filter Tips, steril 0,5-20µl	Sarstedt AG & Co
Biosphere® Filter Tips, steril 100-1000µl	Sarstedt AG & Co
Biosphere® Filter Tips, steril 2-100µl	Sarstedt AG & Co
Cell Scraper 16cm	Sarstedt
Culture-Insert 2 Well in µ-Dish 35 mm	Ibidi GmbH
Deckglas 24x32mm	A. Hartenstein GmbH
Einfrierröhrchen	Sarstedt AG & Co
Glas-Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co KG
Insulinspritze Omnican® 40	B. Braun Melsungen AG
MicroAmp™ Optical 96 well reaction plate	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
Nalgene Cryogenic Vials	Thermo Fisher Scientific
Neubauer-Improved Zählkammer	Marienfeld
PCR SoftTubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH
Pipette 10µl	Thermo Fisher Scientific
Pipette 100µl	Eppendorf AG
Pipette 1000µl	Eppendorf AG
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	BioRad Laboratories
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG
SafeSeal Micro Tube 2 ml	Sarstedt AG & Co
Tubes 1,5 ml	Greiner Bio One
Warthman® Filterpapier	GE Healthcare
Zellkulturflasche 25 cm ²	Greiner Bio One
Zellkulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio One
Zentrifugenröhrchen 15ml	Cell Star, Greiner Bio One

Tabelle 2: Geräte

Geräte	Hersteller
Alpha Innotech FlourChem FC2 Imaging System	Alpha Innotec
Centrifuge 5418R	Eppendorf
Consort Gel Electrophoresis Power Supply E861	Consort
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000	Keyence
Gefrierschrank -20° C	Liebherr
Gefrierschrank -80° C	Tahlheimer Kühlung GmbH &Co
Haraeus Megafuge 16 R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heizblock Dri-Block heaters DB2A	Tecne
Heracell™ 150i Co2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Inkubator C60	Labotec GmbH
Inkubator Forma Steri-Cult	Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank profiline	Liebherr
Magnetrührer GLW M21	GLW Gesellschaft für laborbedarf GmbH
Megafuge 16R Centrifuge	Heraeus
Microspin FV-2400Personal Spin-Vortex	Biosan
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
NanoDrop 2000 Spektrometer	Thermo Fisher Scientific
PowerPac HC High Current Power Supply	Bio Rad Laboratories
Reagenzglasmixer Mini-Vortexer	A. Hartenstein GmbH
Spektrometer Tecan Genios Pro	Tecan
Stäbchen-Elektrode	World Precision Instruments Inc.
StepOnePlus qPCR Maschine	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank Haraeus® HERA-safe®	Thermo Fisher Scientific
Sunrise Basic Tecan	Tecan Austria GmbH
Tecan GeniosPro Microplate Reader	Tecan
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transferkammer Western Blot	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad	GBL
Zentrifuge PerfectSpin P	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Substanzen

Tabelle 3: Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
4',6- Diamidine-2'-phenylindoledihydrochlorid (DAPI)	Roche 10236276001
Accutase	Life Technologies A11105-01

Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem A2941
Bandenmarker peqGOLD prestained protein	VWR Chemicals 27-2210
Beta-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich M6250
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich AT906
Bromphenol Blue	Sigma Aldrich B0126
Cell-stain Solution	Millipore 90144
cOmplete™ ULTRA Tablets Proteaseinhibitor	Roche 5892970001
Coomassie Blau-Färbelösung	Sigma-Aldrich 27815
Destilliertes Wasser	B. Braun Melsungen AG 00088992
Dulbecos modified eagle Medium (DMEM)	Sigma Aldrich D5796
Dymethylsulfoxid (DMSO)	Merck 8.02912.1000
Effectene Transfection Reagent	Qiagen 1054250
Endothelial Cell Medium (ECM)	Cell biologics M1168
Ethanol	Merck 32205
Fetales Kälberserum (FCS)	Merck-Sigma F7524
Fluoreszierendes Natrium-Salz	Sigma Aldrich F6377
Glycin	AppliChem 131340.1211
Isopropanol	Sigma Aldrich I9516
Luminol	Sigma Aldrich A8511
Magermilchpulver	AppliChem 2710453
Matrigel Matrix	Corning 354230
Methanol	Merck 32213
N,N,N',N' Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich T9281
NaCl	Sigma Aldrich 31434
Natrium-Deoxycholat	Sigma Aldrich D6750
Natriumhydrogencarbonat	Merck 1.06329.1000
Nuclease free water	Ambion AM9937
p-Coumaric Acid	Sigma C9008
Penicillin/Streptomycin	Merck A221β
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich D8537
Puromycin	Merck 540222
Rotiophorese® Gel 30 Acrylamid	Carl Roth GmbH&Co K 3029.2
Schweineserum	Vector Laboratories ZC0609
SDS ultrapure	AppliChem GmbH A1112,0500
Speed Coating solution	PeloBiotech PB-LU-000-0002-00
Streptavidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories SP-2002
Tris Pufferan	Carl Roth GmbH&Co KG 5429
Tween® 20	Sigma Aldrich 9005-64-5
Vascular endothelial Growth Factor (VEGF)	Thermo Fisher Scientific
Vecta Mount Einbettlösung	Vector Laboratories H-500
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich 216763

2.1.3 Antikörper

Tabelle 4: Primärantikörper Western Blot

Zielprotein	Hersteller	Konzentration	Sekundärantikörper
Claudin-1	Invitrogen 519000	1:200 in 5% Milch/PBS	anti-rabbit
Claudin-3	Invitrogen 341700	1:200 in 0,5% BSA/PBS	anti-rabbit
Claudin-5	Invitrogen 35-2500	1:200 In 1% BSA/PBS	anti-mouse
Claudin-12	IBL International JP 18801	1: 100 in 0,5% BSA/PBS	anti-rabbit
Occludin	Acris GmbH AP26410PU-N	1:50 In 1% BSA/PBS	anti-guinea pig
Pcdh-intra	M. Frank, et al. 2005 Universität Freiburg	1:10.000 In 1% BSA/PBS	anti-rabbit
PCDHyc3	Stress Marq SMC-474D	1:1000 In 1% BSA/PBS	anti-mouse
Sqstm1	Cell Signaling #5114	1:1000 In 5% BSA/PBS	anti-rabbit
VE-Cadherin	Santa Cruz Sc-6458	1:200 In 1% BSA/PBS	anti-goat
ZO-1	Thermo Fisher Scientific 402300	1:100 In 1% BSA/PBS	anti-rabbit
β-Actin- Peroxidase	Sigma Aldrich A3854	1:25000 In 5% Milch/PBS	-

Tabelle 5: Sekundärantikörper Western Blot

Sekundärantikörper	Hersteller	Konzentration
anti- mouse Ig-HRP	Roche 12015218001	1:400
anti-goat Ig-HRP	Santa Cruz Sc-2056	1:3000
anti-guinea pig Ig-HRP	Santa Cruz Sc-2438	1:5000
anti-rabbit Ig-HRP	Cell Signaling #7074	1:2000

2.1.4 Sonden real-time PCR

Tabelle 6: Sonden real-time PCR

Sonde	Abkürzung	Hersteller und Katalognummer
Axin-1		Thermo Fisher Scientific Mm 01299060_m1
Claudin-1	Cldn1	Thermo Fisher Scientific Mm 00516701_m1
Claudin-3	Cldn3	Thermo Fisher Scientific Mm00515499_m1
Claudin-5	Cldn5	Thermo Fisher Scientific Mm00727012_s1
Claudin-12	Cldn12	Thermo Fisher Scientific Mm01316511_m1
Fn-1		Thermo Fisher Scientific Mm 01256744_m1
Fzd-1		Thermo Fisher Scientific Mm 00445405_s1
Gsk3b		Thermo Fisher Scientific Mm 00444911_m1
Lasp-1		Thermo Fisher Scientific Mm 04208400_g1
Lrp-5		Thermo Fisher Scientific Mm 01227476_m1
Mtor		Thermo Fisher Scientific Mm 00444968_m1
Occludin	Ocln	Thermo Fisher Scientific Mm 00500912_m1
Pard-3		Thermo Fisher Scientific Mm 00473929_m1
Protocadherin γC3	PcdhyC3	Thermo Fisher Scientific Mm 04213633_s1
Sglt1		Thermo Fisher Scientific Mm 01218039_m1
Snai-1		Thermo Fisher Scientific Mm 00441533_g1
Sqstm-1		Thermo Fisher Scientific Mm 00448091_m1
VE-Cadherin	Cdh5	Thermo Fisher Scientific Mm 00486938_m1
Vim		Thermo Fisher Scientific Mm01333430_m1
Zo-1	Tjp1	Thermo Fisher Scientific Mm 00493699_m1

β Actin	Actnb	Thermo Fisher Scientific Mm 01205647_g1
18 S rRNA	Endogene Kontrolle	Thermo Fisher Scientific 4352930E

2.1.5 Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits

Name	Hersteller und Katalognummer
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific 23225
NucleoSpin® miRNA Kit	Machery Nagel 740971.50
High Capacitiv cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific 4368814
ECM Cell Adhesion Array (Colorimetric)	Milipore ECM540

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Kultivierung der Zellkulturen

Es wurden die in der Arbeitsgruppe etablierten cerebralen und cerebellaren Endothelzelllinien cEND (Forster et al., 2005) und cerebEND (Silwedel et al., 2006) für die Versuche verwendet. Hierbei handelt es sich um immortalisierte, murine Endothelzelllinien, die als Modell der Blut-Hirn-Schranke dienen. Diese waren in Vorarbeit nach dem üblichen Protokoll (Burek et al., 2012) isoliert und in niedriger Passagenzahl eingefroren und im Stickstofftank gelagert worden.

Nach Entnahme aus dem Tank wurden die Zellen vorsichtig bei 37°C im Wasserbad (*GBL*) aufgetaut und anschließend in 5 ml vorgewärmtes Medium aufgenommen und in eine 25cm² Zellkulturflasche (*Greiner Bio-One*) gegeben, die zuvor für 5-10 Minuten mit Speed coating Lösung (*PeloBiotech*) beschichtet wurde.

Für die cerebEND-Zellen wurde DMEM (Dulbecco's modified eagle Medium, *Sigma Aldrich*) mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, *Merck-Sigma*) und 1 % Penicillin/Streptomycin (*Sigma Aldrich*) verwendet.

Die cEND Zellen wurden in ECM (Endothelial Cell Medium, *Cell biologics*) kultiviert.

Am Tag nach dem Auftauen erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank (*Thermo Fisher Scientific*) inkubiert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Nach sieben Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 (cerebEND) bzw. 1:2 (cEND) gesplittet. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 8-10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, *Sigma Aldrich*) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml vorgewärmte Accutase Lösung (Stem Pro Cell Dissociation Reagent, *Thermo Fisher Scientific*) auf die Zellen gegeben, welche nach einer Einwirkzeit von 5 bis 7 Minuten eine gute Ablösung der Zellen erwirkte. Zur Beendigung der Wirkung der Accutase wurde erneut gewärmtes Medium hinzugegeben und die Zellsuspension auf zwei bzw. drei mit Speed coating Lösung vorbereitete 25cm² Zellkulturflaschen verteilt. Nach weiteren sieben Tagen erfolgte die nächste Aufteilung der Zellen im entsprechenden Verhältnis und Überführung in 75cm² Zellkulturflaschen (*Greiner Bio-One*). Anschließend wurden die Zellen für die Versuche entsprechend

vorbereitet. Ebenso wurde ein Teil der Zellen, um niedrige Passagenzahlen beizubehalten, in regelmäßigen Abständen für spätere Versuche wieder eingefroren. Die Zellen einer 75cm² Zellkulturflasche konnten auf vier Einfrier-Röhrchen verteilt werden. Hierfür wurden die Zellen, wie beim Splitten, zunächst mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von Accutase abgelöst. Nach Hinzufügen von 15 ml Medium wurde die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen (Cell Star, *Greiner Bio-One*) gegeben und bei RT für fünf Minuten mit 1000 x g zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 4 ml Einfriermedium aufgenommen, welches aus dem jeweils verwendeten Kulturmedium, mit Zusatz von 10% FCS und 10% DMSO bestand. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Einfrier-Röhrchen (*Sarsted*) gegeben und zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend im Stickstofftank gelagert.

2.2.1.2 Etablierung der Knock-out Zelllinien

Die Herstellung der Knock-out Zelllinien erfolgte durch Anwendung des CRISPR/Cas Verfahrens.

Zur Etablierung der Knock-out Zelllinien für Pcdh γ C3 (auch Pcdh2 genannt) wurden das Pcdh2 CRISPR/ Cas9 KO-Plasmid (sc-430015, *Santa Cruz Biotechnology*) und das Pcdh2-HDR-Plasmid (sc-430015-HDR, *Santa Cruz Biotechnology*) mit zielspezifischer Matrize zur homologen Rekombination mit dem Puromycin Resistenz-Gen verwendet.

Als Transfektionsreagenz wurde das Effectene Transfection Reagent (*Qiagen*) verwendet.

Die Zellen wurden zunächst auf eine 6-Napf Platte (6-well-Nuclon Surface Gewebepplatten, *Greiner Bio One*) ausgesät und nach 24 h mit 1 μ g des KO und des HDR Plasmids transfiziert und für mind. 24 h inkubiert. Nach 48 h erfolgte die Zugabe von 3 μ g/ml Puromycin zum Zellmedium, um nicht transfizierte Zellen zu eliminieren.

Nach 4-wöchiger Selektion erfolgte zur Bestätigung des erfolgreichen Knock-outs die Analyse mittels Western Blot.

2.2.1.3 Messung des Transendothelialen Elektrischen Widerstands (TEER)

Zur Messung des Transendothelialen Elektrischen Widerstands wurden die cerebEND Zellen auf mit Speed coating solution beschichteten 24-Napf Trans-wells™ Einsätzen (ThinCert, Porengröße 0,4µm, Greiner Bio-One) für sieben Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Die Messungen des Widerstands erfolgten jeweils direkt nach dem Mediumwechsel an Tag 7, 9, 11 und 15 nach Aussaat mittels Stäbchen-Elektrode (World Precision Instruments Inc.). Der Widerstand eines leeren Trans-wells™ wurde von den gemessenen Werten abgezogen, bevor die endgültige Berechnung des Transendothelialen Widerstands in $\Omega \text{ cm}^2$ erfolgte.

2.2.1.4 Messung der Zellpermeabilität

Um die Permeabilität der Endothelzellen zu bestimmen wurden die cerebEND Zellen zunächst auf 24-Napf Trans-wells™ ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für 24 Stunden mit 1% FCS DMEM differenziert.

Fluoreszierendes Natrium-Salz (Fluorescein sodium salt, Sigma Aldrich) mit einer Molekülgröße von 376 Da wurde in einer Konzentration von 10 µM mit dem Kulturmedium vermischt. Um den parazellulären Durchfluss messen zu können, wurden 200 µl hiervon in die obere Kammer des Trans-wells™ gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die untere Kammer war hierbei mit normalem Medium befüllt. Alle 20 Minuten erfolgte die Entnahme von Proben aus der unteren Kammer und die Fluoreszenz wurde am Fluoreszenz Spectrometer (Tecan Genios Pro, Tecan) bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen. Die Durchlässigkeit der Zellen wurde anhand des Vergleichs mit leeren Trans-wells™ und in Korrelation mit der Ausgangskonzentration bestimmt.

2.2.1.5 Zellmigration

Um die Fähigkeit der Zelllinien zur Migration zu beurteilen, wurde ein spezielles Zellkulturgefäß mit zwei getrennten Kammern verwendet (2 well silicone insert, Ibidi GmbH). Die beiden Kammern werden durch einen Silikoneinsatz gebildet, der

rückstandfrei entfernt werden kann und hierdurch eine definierte 500 µm breite zellfreie Lücke liefert.

Nach der Aussaat der Zellen wurden diese für sieben Tage bis zur Ausbildung einer konfluenten Zellschicht in den getrennten Kammern herangezogen. Nach Entfernung des Silikoneinsatzes und Zugabe von 1 % FCS DMEM wurden mittels Keyence BZ9000 Mikroskop (Keyence) die erste Aufnahme der Lücke erstellt. Es folgten zwei weitere Aufnahmen nach 24 und 48 Stunden. Anschließend wurde mittels BZ-II-Analyzer Software (Keyence) der Anteil der freien Fläche im Vergleich zum Ausgangspunkt berechnet, woraus die Wachstumsrate errechnet werden konnte.

Zur besseren Darstellbarkeit wurden die Zellen nach 48 Stunden mittels Cell Stain solution (Merck) angefärbt.

2.2.1.6 Zelladhäsion

Zur Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit der Zellen an verschiedene Komponenten der Extrazellulären-Matrix (ECM) wurde das ECM Cell Adhesion Array Kit (Merck) verwendet. Dieses besteht aus einer 96-Napf Platte, die in zwölf Streifen unterteilt ist. Jeder dieser Streifen besteht aus sieben mit verschiedenen humanen Proteinen der Extrazellulärmatrix beschichteten Nöpfen, sowie einer mit BSA beschichteten Kontrolle. Durch Aussaat der Zellen auf diese und anschließender kolorimetrischer Analyse wurde die relative Adhäsionsfähigkeit ermittelt.

Die cerebEND Zellen wurden, wie beschrieben, durch Zugabe von Accutase gelöst, in Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Improved Zählkammer (Marienfeld) ermittelt. Anschließend wurde eine Zellsuspension mit $1,0 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter in serumfreiem DMEM hergestellt.

Die im Kit enthaltenen Reaktionsstreifen wurden nach Herstellerangaben mit PBS rehydriert, bevor je 100 µl der Zellsuspension pro Napf hinzugegeben wurden. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C im CO₂ Brutschrank wurde das Medium verworfen und in mehreren Waschsritten mit dem Assay Buffer die nicht anhaftenden Zellen entfernt. Zur Färbung der Zellen erfolgte die Zugabe von 100 µl Cell Stain Solution pro Napf. Nach fünf Minuten wurde diese entfernt und anschließend zur Beseitigung von

Resten mehrere Waschschriffe mit destilliertem Wasser durchgeführt. Nachdem die Nöpfe für einige Minuten bei RT getrocknet wurden, erfolgte die Zugabe von 100 µl Extraction Buffer. Nach zehn Minuten war die an die Zellen gebundene Farbe wieder vollständig gelöst und die Absorption konnte mittels Tecan Microplate Reader (Tecan GeniosPro, *Tecan*) bei einer Wellenlänge von 540-570 nm ermittelt werden.

2.2.1.7 Gefäßformation

Die Fähigkeit endothelialer Zellen, Gefäße zu formen, kann in vitro untersucht werden. Hierfür wurde die Matrigel® Matrix (*Corning*) verwendet, welche in ihren Bestandteilen der Basalmatrix von Säugetieren ähnelt. Vor der Verwendung wurde das Matrigel, welches bei -20°C gelagert wird, über Nacht bei 4°C aufgetaut. Da nach Herstellerangaben eine Gelierung des Gels ab 22°C zu erwarten ist, erfolgten die weiteren Arbeitsschritte zur Vorbereitung des Gels auf Eis mit ebenfalls vorgekühlten Materialien. Zunächst wurde dem Matrigel VEGF (Vascular endothelial growth factor, *Thermo Fisher Scientific*) in einer Konzentration von 20 ng/ml hinzugefügt. In einer 24-Napf Platte wurde jeder Napf blasenfrei mit 289 µl des vorbereiteten Gels befüllt und diese für 1h bei 37°C inkubiert, was zur Auspolymerisierung des Gels führte.

Es erfolgte die Herstellung einer Zellsuspension mit 4×10^5 Zellen pro Milliliter wie beschrieben (s. 2.2.1.6) und die Zugabe von 300 µl der Suspension in jeden Napf. Nach einer Inkubation von 16-18 h bei 37°C im Inkubationsschrank wurden mittels Keyence BZ9000 Mikroskop (*Keyence*) Aufnahmen erstellt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MetaVi Lab Software (*Ibidi GmbH*).

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation

Die Zellen wurden nach dem Splitten auf 6-Napf Gewebepplatten (6-well-Nuclon Surface Gewebepplatten, *Greiner Bio One*) ausgesät und sechs bis sieben Tage bis zur Konfluenz gezogen. Das Lysieren der Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers. Hierfür wurden die Zellen nach Entfernen des Kulturmediums zunächst einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl ML-Puffer

(*Machery Nagel*) pro Napf. Das Lysat wurde nach 5 Minuten Inkubation bei RT mit einem Zellschaber (*Sarstedt*) abgekratzt und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Zur Aufbewahrung wurden diese bei -80°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Zur Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) wurde das NucleoSpin® miRNA Kit (*Machery Nagel*) verwendet.

Zunächst wurde die Probe zur weiteren Lyse 10-mal mit einer 1 ml Spritze (Omicron 1 ml Spritze, *Braun*) aufgezogen und anschließend in den ersten NucleoSpin Filter gegeben. Dieser wurde zur Homogenisierung und Abfiltration unlysierter Bestandteile für 1 Minute mit einer Zentripetalbeschleunigung (Relative centrifugal force, RCF) von 11.000 x g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 16R, *Thermo Fisher Scientific*). Dem hierbei gewonnenen Material wurden 150 µl Ethanol hinzugefügt, um ein Binden großer RNAs und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) an die NucleoSpin RNA-Säule zu ermöglichen. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde dieser mit der Probe beladen und für 1 Minute mit 14.000 x g zentrifugiert, wobei ein Durchfluss, der kleinere RNAs und Proteine enthielt und ein Überstand in der NucleoSpin-RNA-Säule, mit größeren RNA und DNA-Resten entstanden. Zur Verdauung dieser DNA wurde nach Zugabe von 350 µl MDB-Puffer und Zentrifugation von bei 11.000 x g zum Überstand in der NucleoSpin RNA Säule 100 µl DNase (*Machery Nagel*) hinzugegeben und diese für 15 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde zur Entfernung der Proteinreste zum Durchfluss aus dem oben beschriebenen Schritt 300 µl MP-Puffer hinzugegeben, wodurch nach einer dreiminütigen Zentrifugation mit 11.000 x g ein Proteinpellet am Boden des Eppendorf-Röhrchens entstand. Dieses wurde verworfen und der Überstand in den NucleoSpin Protein Entfernung-Filter pipettiert und eine Minute mit 11.000 x g zentrifugiert, wodurch im Durchfluss ausschließlich kleine Ribonukleinsäuren enthalten waren. Um eine Bindung dieser an die NucleoSpin RNA-Säule zu ermöglichen, wurden 800 µl MX-Puffer hinzugegeben und die Probe nach Abschluss der Verdauung durch die DNase, in mehreren Schritten auf die RNA-Säule geladen. Die anschließenden Waschschriffe mit 600 µl MW1 Waschpuffer und 700 µl MW2 Waschpuffer mit je 30-sekündiger Zentrifugation mit 11.000 x g dienten der Entfernung von restlichen DNA-Fragmenten,

Kontaminationen oder Salzen. Um mögliche Ethanolreste aus dem MW2 Waschpuffer zu entfernen erfolgte ein abschließender Zentrifugationsschritt mit 11.000 x g für zwei Minuten.

Die in der NucleoSpin RNA-Säule gebundene RNA wurde durch Zugabe von 40 µl 90°C warmen destilliertem Wasser und zweiminütiger Zentrifugation bei 11.000 x g aus der Säule herausgelöst.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Spektrometer (NanoDrop 2000, *Thermo Fisher Scientific*). Für die spätere Verwendung wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2 Reverse Transkription - Herstellung cDNA

Zur Erzeugung einsträngiger komplementärer DNA (cDNA) aus der gewonnenen RNA wurde des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet, mit dem bis zu 2 µg RNA in einer Reaktion umgeschrieben werden können. Der Mastermix wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und jeweils 6,8 µl auf die Reaktionsgefäße (0,2 ml Eppendorf) verteilt.

Mastermix (Ansatz pro Reaktion)

2	µl	10x RT Buffer
2	µl	10x Random Primers
0,8	µl	dNTP Mix (100mM)
1	µl	Reverse Transkriptase
1	µl	RNAse Inhibitor

Für jede RNA Probe wurde die Konzentration bestimmt, um einheitlich 1 µg RNA pro Reaktion anzusetzen. Die RNA wurde mit der entsprechenden Menge an destilliertem Wasser verdünnt, um ein Endvolumen von 20 µl pro Reaktionsgefäß zu erhalten und dem Mastermix hinzugefügt. Nach gründlichem Vermischen des Ansatzes erfolgte die Herstellung der cDNA im Thermal Cycler (Thermal Cycler 2720, *Applied Biosystems*) mit folgendem Programm:

25°C	37°C	85°C	4°C
10 min	120 min	5min	∞

Anschließend wurde die cDNA direkt weiterverwendet oder zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

2.2.2.3 Quantitative real-time PCR

Zur Amplifizierung und Quantifizierung der Proben wurde die Methode der quantitativen Echtzeit (real-time) PCR verwendet, bei der es möglich ist, die Menge der amplifizierten DNA während der laufenden Reaktion zu bestimmen und keine weiteren Analyseverfahren nach der herkömmlichen PCR nötig werden.

Die hierfür verwendeten TaqMan-Sonden (*Thermo Fisher Scientific*) sind spezifische Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und am 3' Ende mit einem sog. Quencher markiert sind. Das Signal des Reporter-Farbstoffs wird hierbei durch den Quencher fast vollständig unterdrückt. Durch die Amplifikation der spezifischen DNA-Sequenz führt die 5'-Nuclease Aktivität der eingesetzten Taq-Polymerase dazu, dass die Sonde abgebaut und der Farbstoff freigesetzt wird.

In eine 96-Napf Platte (MicroAmp Optical 96 well reaction plate, *Thermo Fisher Scientific*) wurden pro Ansatz 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*) zusammen mit 1 µl der spezifischen TaqMan Sonde (*Thermo Fisher Scientific*) und 4 µl Nuclease-freiem Wasser (*Ambion*) pipettiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl der cDNA, die zuvor 1:10 mit Nuclease-freiem Wasser verdünnt worden war. Für jedes zu untersuchende Gen wurden Triplikate angelegt, um hohe Genauigkeiten zu erzielen. Als endogene Kontrolle diente die 18S ribosomale Ribonukleinsäure (18S-rRNA), für die ebenfalls wie oben beschrieben verfahren wurde.

Reaktionsansatz:

10	µl	TaqMan Universal PCR Mastermix
1	µl	TaqMan Sonde
4	µl	Nuclease-freies Wasser
5	µl	cDNA (1:10 in Nuclease-freiem Wasser)

Anschließend wurde die Platte mit einer Folie (MicroAmp Optical Adhesive Film, *Thermo Fisher Scientific*) gründlich zugeklebt, zum Durchmischen gevortext und kurz mit der Tischzentrifuge (*Thermo Fisher Scientific*) zentrifugiert, um sicher zu gehen, dass keine Reste des Reaktionsansatzes an den Seiten der Näpfe oder der Folie haften geblieben sind.

Die vorbereitete Platte wurde dann in die PCR-Maschine (StepOne Plus RT-PCR System, *Thermo Fisher Scientific*) gestellt und die real-time PCR durchgeführt. Nach der zehnminütigen Initialisierung bei 95°C, folgten 50 Zyklen, wobei ein Zyklus aus 15 Sekunden bei 95°C und einer Minute bei 60°C bestand. Anschließend erfolgte die Abkühlung auf RT.

Die Auswertung wurde mit der Software des Herstellers (StepOne Software Version 2.3, *Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt, wobei die Genexpression dabei auf die Expression der endogenen Kontrolle normalisiert wurde.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Immunhistochemie

Zur Visualisierung verschiedener Proteine der TJ an den wildtypischen (WT) und Knock-out (KO) cerebEND Zellen, wurden diese fünf bis sechs Tage vorher auf Deckgläser (*Hartenstein*) ausgesät und für einen Tag in DMEM, welches 1 % FCS enthielt, differenziert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit eiskaltem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Deckgläser für 15 Minuten in PBS/BSA inkubiert, bevor sie für eine Stunde mit 5% Schweineserum (Normal Swine Serum, *Vector Laboratories*) in PBS/BSA geblockt wurden. Die Deckgläser, welche später mit Biotin-markierten Antikörpern behandelt wurden, wurden zusätzlich jeweils 15 Minuten mit Streptavidin und Biotin blockiert (Streptavidin/Biotin Blocking Kit, *Vector Laboratories*). Anschließend erfolgte die Zugabe der Primärantikörper (siehe Tabelle 8), welche in 5% Schweineserum in PBS/BSA gelöst waren und die lichtgeschützte Inkubation bei 4°C über Nacht. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (*Roche*) 1:100 zum Primärantikörper dazu gegeben.

Tabelle 8: Primärantikörper Immunhistochemie

Zielprotein	Hersteller	Konjugat	Konzentration	Sekundärantikörper
Pcdh γ C3	StressMarq SMC-474	Biotin	1:100	Streptavidin
Occludin	Thermo Fisher Scientific 331594	Alexa Flour 594	1:200	-
Claudin-5	Thermo Fisher Scientific 352588	Alexa Flour 488	1:200	-
ZO-1	Thermo Fisher Scientific 402300		1:500	anti-rabbit

Am nächsten Tag wurden die Deckgläser zunächst dreimal mit PBS/BSA gewaschen, bevor die Zugabe des Sekundärantikörpers (s. Tabelle 9), verdünnt in 5% Schweineserum in PBS/BSA, erfolgte. Bei Alexa-Fluor markierten Primärantikörpern wurde kein Sekundärantikörper benötigt.

Tabelle 9: Sekundärantikörper Immunhistochemie

Sekundärantikörper	Konjugat	Hersteller	Konzentration
Streptavidin	CF 594	Biotium 29036	1:1000
Donkey anti-rabbit	Alexa Flour 488	Thermo Fisher Scientific A21206	1:200

Zur Kontrolle wurden Deckgläser ohne Behandlung mit Primärantikörpern mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Nach einer einstündigen lichtgeschützten Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser mit einem Tropfen Einbettlösung (Vectashield, *Vector Laboratories*) auf Objektträgern fixiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Keyence BZ9000 Fluoreszenz-Mikroskop (*Keyence*) erstellt.

2.2.3.2 Proteinpräparation

Die Zellen wurden nach dem Splitten auf 6-Napf Platten (6-well-Nuclon Surface Gewebepplatten, *Greiner Bio One*) ausgesät und für sechs bis sieben Tage bis zur Konfluenz herangezogen. Nach Entfernung des Mediums erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit eisgekühltem PBS. Zur Lyse der Zellen wurden pro Napf jeweils 100 µl RIPA-Puffer, versetzt mit 20 µl Protease Inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail, *Roche*) hinzugegeben und die Zellen nach wenigen Minuten auf Eis mit einem Zellschaber (Cell scraper, *Sarstedt*) von den Näpfen abgeschabt und in vorbereitete Eppendorf-Röhrchen gegeben. Anschließend wurden die Proben bei -80°C für die spätere Verwendung eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

RIPA-Puffer:

50	mM	Tris pH 8,0
150	mM	NaCl
0,1	%	SDS
0,5	%	Na-Deoxycholat
1	%	NP40

2.2.3.3 Proteinmengenbestimmung

Die eingefrorenen Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und für 10 min mit einer RCF von 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Proteinmenge verwendet.

Hierfür wurde das Pierce BCA Protein assay Kit (*Thermo Fischer Scientific*) eingesetzt, mit welchem nach der Bicinchoninsäure-Methode der Proteingehalt bestimmt werden kann.

Es wurde zunächst nach Anleitung eine Standardverdünnungsreihe angelegt, bei der bovines Serumalbumin (BSA, *Sigma Aldrich*) von einer Konzentration von 2000 µg/ml auf 25 µg/ml verdünnt wurde.

Diese wurde für die Messung auf einer 96-Napf Platte (*Thermo Fisher Scientific*) aufgetragen, die weiteren Näpfe wurden mit je 22 µl destilliertem Wasser und jeweils

3 µl der zu testenden Proben befüllt. Anschließend wurde in jeden Napf 200 µl der BCA-Reaktions-Lösung (Reagent A: Reagent B 50:1) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C und Abkühlung auf RT konnte die Absorption der Proben bei 560 nm im Mikroplatten-Reader (Sunrise Basic Tecan, *Tecan*) gemessen werden. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte durch den Vergleich der Proben mit einer anhand der Verdünnungsreihe erstellten Standardkurve. Anschließend wurde einem Teil der Proben im Verhältnis 3:1 4x Lämmli-Puffer und 6% β-Mercaptoethanol (*Sigma Aldrich*) zugesetzt und diese bei -20°C eingefroren. Die restlichen nativen Proben wurden erneut bei -80°C aufbewahrt.

4x Lämmli-Puffer:

8 % SDS
40 % Glycerol
0,004 % Bromophenol blue
0,250 M Tris HCl pH6,8
6 % β-Mercaptoethanol

2.2.3.4 Elektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein SDS-Page Gelelektrophorese-Verfahren angewendet. Zunächst wurden hierfür zwei 1,5 mm dicke Glasplatten (*BioRad*) in einer dafür vorgesehenen Halterung (*BioRad*) angebracht, um dann das Trenngel (7%, 10% oder 12%) einzufüllen. Um eine gerade Oberfläche zu erhalten wurde dieses mit Isopropanol (*Sigma Aldrich*) überschichtet, welches nach dem Aushärten des Trenngels, nach ca. 30 min, wieder vollständig entfernt wurde. Anschließend wurde das Sammelgel eingegossen und luftblasenfrei ein 1,5 mm breiter Kamm mit zehn bzw. zwölf Taschen eingesetzt. Nach der Auspolymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Nach Entfernen der Kämme wurde sorgfältig geprüft, ob sich noch Gelreste in den Taschen befinden und diese ggf. mit Puffer ausgespült. Die bereits mit Lämmli und β-Mercaptoethanol versetzten Proben wurden für 5 min bei 95 °C im Blockthermostat (Dri-Block DB2A, *Techne*) aufgeköcht und

danach jeweils 20 µg der Proteinproben in die Taschen pipettiert. Zur Detektion der Proteinbanden wurde eine der Taschen mit 2 µg Bandenmarker (peqGOLD prestained protein, *VWR Chemicals*) befüllt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei RT im Sammelgel bei einer Spannung von 60 V, im Trenngel bei 130 V (Stomquelle PowerPac™ HC High-Current Power Supply, *BioRad*).

Elektrophoresepuffer:

900	ml	Destilliertes Wasser
15	g	TRIS
72	g	Glycin
5	g	SDS

Sammelgel:

3,48	ml	H ₂ O
850	µl	Acrylamid/BIS 30:2
625	µl	1M Tris, pH 6,8
50	µl	10% SDS
50	µl	10% APS
5	µl	TEMED

Trenngel 10 %:

4	ml	H ₂ O
3,4	ml	Acrylamid/BIS 30:2
2,5	ml	3M Tris, pH 8,8
100	µl	10% SDS
100	µl	10% APS
6	µl	TEMED

2.2.3.5 Western Blot

Zur weiteren Analyse mittels Antikörpern erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (*Bio Rad Laboratories*) mittels Tank-Blotting Verfahren, bei dem die Proteine entlang eines senkrecht zur Laufrichtung angelegten Stroms vom Elektrophorese-Gel auf die Membran übertragen werden (Towbin et al., 1979).

Zunächst wurde die PVDF-Membran für 60 Sekunden in 100 % Methanol aktiviert, um hydrophobische Wechselwirkungen mit dem Transferpuffer zu vermindern. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel entnommen, das Sammelgel verworfen und das Trenngel für einige Minuten im Transferpuffer eingelegt, um Reste des Elektrophoresepuffers zu entfernen, welche zu Beeinträchtigungen beim Transfer führen könnten. Anschließend wurde das Gel zusammen mit der PVDF-Membran zwischen zwei Whatman® Filter Papiere (*GE Healthcare*), welche vorher ebenfalls für einige Minuten im Transferpuffer eingeweicht wurden, gelegt und zwischen zwei Faserpolstern in die dafür vorgesehene Kassette nach Angaben des Herstellers luftblasenfrei eingespannt. Die PVDF-Membran wurde dabei auf Seite der Anode angebracht.

Es wurden bis zu vier solcher Transfersandwiche in die Transferkammer (*Thermo Fisher Scientific*) eingesetzt und dieses mit dem gekühlten Transferpuffer befüllt. Um eine regelmäßige Temperatur- und Ionenverteilung an den Transfersandwiches zu erreichen wurde ein magnetischer Rührstab (*GLW*) auf den Boden des Transfergeräts gegeben und durch einen Magnetrührer (Magnetrührer *GLW M21*) auf die maximal mögliche Drehzahl eingestellt. Die Übertragung der Proteine erfolgte über Nacht bei 4°C und einer angelegten Stromstärke von 40 mA pro Gel.

Transferpuffer (Herstellung 1 L):

100	ml	10X Towbin (0,25 M Tris und 1,92 M Glycin)
200	ml	Methanol
700	ml	Destilliertes Wasser

Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen, wurden die Gele angefärbt, um so im Gel verbliebene Proteinbanden sichtbar zu machen. Hierfür wurden die Gele zunächst für 10 Minuten bei RT mit Coomassie Blau-Färbelösung (*Fuka*) inkubiert und anschließend für 30 Minuten mit der Entfärbelösung behandelt. Danach wurden die Gele über Nacht in destilliertes Wasser gelegt und am nächsten Tag konnte das Ergebnis abgelesen werden. Hierbei zeigte die oben genannte Transfermethode sehr gute Ergebnisse mit lediglich geringen Proteinresten im Gel im Bereich sehr großer Proteine.

Um ein Binden weiterer Proteine an mögliche freie Stellen der PVDF Membran zu verhindern, wurde diese für 60 Minuten in 5 % Magermilchpulver (*AppliChem*) in PBS eingelegt, um eine Absättigung zu erzielen.

Es erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher in BSA bzw. Magermilch mit PBS (siehe Tabelle 4) gelöst war, bei 4 °C über Nacht. Um ungebundene Antikörper vollständig zu entfernen und unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu verhindern wurde die Membran dreimalig für 10 Minuten mit 0,1% Tween (*Sigma Aldrich*) in PBS gewaschen und anschließend erneut für 20 Minuten in 5% Magermilch/PBS blockiert. Dann folgte die Zugabe des mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) markierten Sekundärantikörpers in 1% BSA/PBS (siehe Tabelle 5) für 60 Minuten bei RT.

Zur Darstellung der Banden wurde das Prinzip der Luminol-Chemilumineszenz verwendet, welche durch die Meerrettichperoxidase katalysiert wird. Hierbei entsteht nach Oxidation durch Wasserstoffperoxid ein energetisch angeregtes Substrat, welches beim Übergang in den Grundzustand Lichtemissionen im Bereich des blauen Wellenspektrums freisetzt. Diese Emissionen können durch einen Lumineszenz-Imager gemessen werden.

Hierfür wurde die Membran nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper erneut dreimalig für 10 Minuten mit 0,1% Tween/PBS gewaschen, bevor sie für 2 Minuten in 10 ml Entwicklerlösung gelegt wurde, welche unmittelbar vorher aus beiden Komponenten zusammen gemischt wurde. Anschließend erfolgte die Entwicklung mittels FluorChem FC2 Multi-Imager II (*Alpha Innotec*) und die Auswertung mittels ImageJ Software.

Entwicklerlösung: (Promega)

ECL I:

25	ml	Tris 1M pH 8,8
5	ml	Luminol
2,2	ml	p-Coumaric-Acid
Ad 250	ml	Destilliertes Wasser

ECL II:

25	ml	Tris 1 M, pH 8,8
160	μ l	Wasserstoffperoxid
Ad 250	ml	Destilliertes Wasser

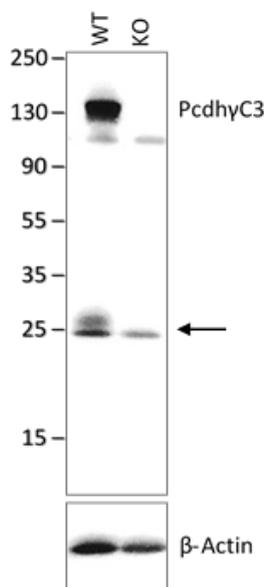
2.3 Statistische Auswertung

Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mithilfe der Programme Excel und GraphPad Prism 7. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen der durchgeführten Versuche. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der T-Test durchgeführt. Als signifikant werden p-Werte $< 0,05$ erachtet und mit * dargestellt. P-Werte $< 0,01$ wurden mit ** und p-Werte $< 0,001$ mit *** markiert.

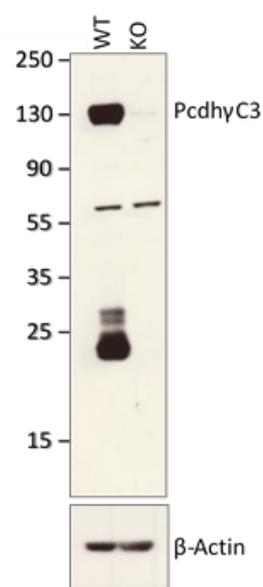
3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Knock-out Zelllinien

Die Etablierung der Zelllinien erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema. Als Kontrolle des erfolgreichen KO des PcdhyC3 Gens wurde eine Western Blot Analyse verwendet. Hierbei konnte bei den KO-Zellen ein eindeutiger Verlust der Bande für 130 kDa, die das komplette PcdhyC3 Protein darstellt, festgestellt werden. Auch im Bereich von 25 kDa, welches den C-terminalen Anteil des PcdhyC3 Proteins repräsentiert, konnte ein Signalverlust detektiert werden.



**Abbildung 7: Western Blot cEND.
Nachweis des Knock-out von
PcdhyC3**



**Abbildung 6: Western Blot cerebEND.
Nachweis des Knock-out von
PcdhyC3**

3.2 Färbung

Nach Immunfärbung der cerebEND Zellen mit den in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgelisteten Antikörpern zeigt sich für Claudin-5 in den KO-Zellen ein stärkeres Signal und die TJ erscheinen ebenmäßiger (siehe Abbildung 8). Auch ZO-1 zeigt sich in den KO-Zellen etwas stärker gefärbt, während nach der Behandlung mit dem Occludin Antikörper die Unterschiede marginal erscheinen. Für PcdhyC3 zeigt sich in den WT Zellen eine Färbung im Bereich des Zytoplasmas, welche in den KO-Zellen weniger

deutlich ist. Es lässt sich jedoch in den KO-Zellen eine Immunfärbung direkt um den Zellkern beobachten.

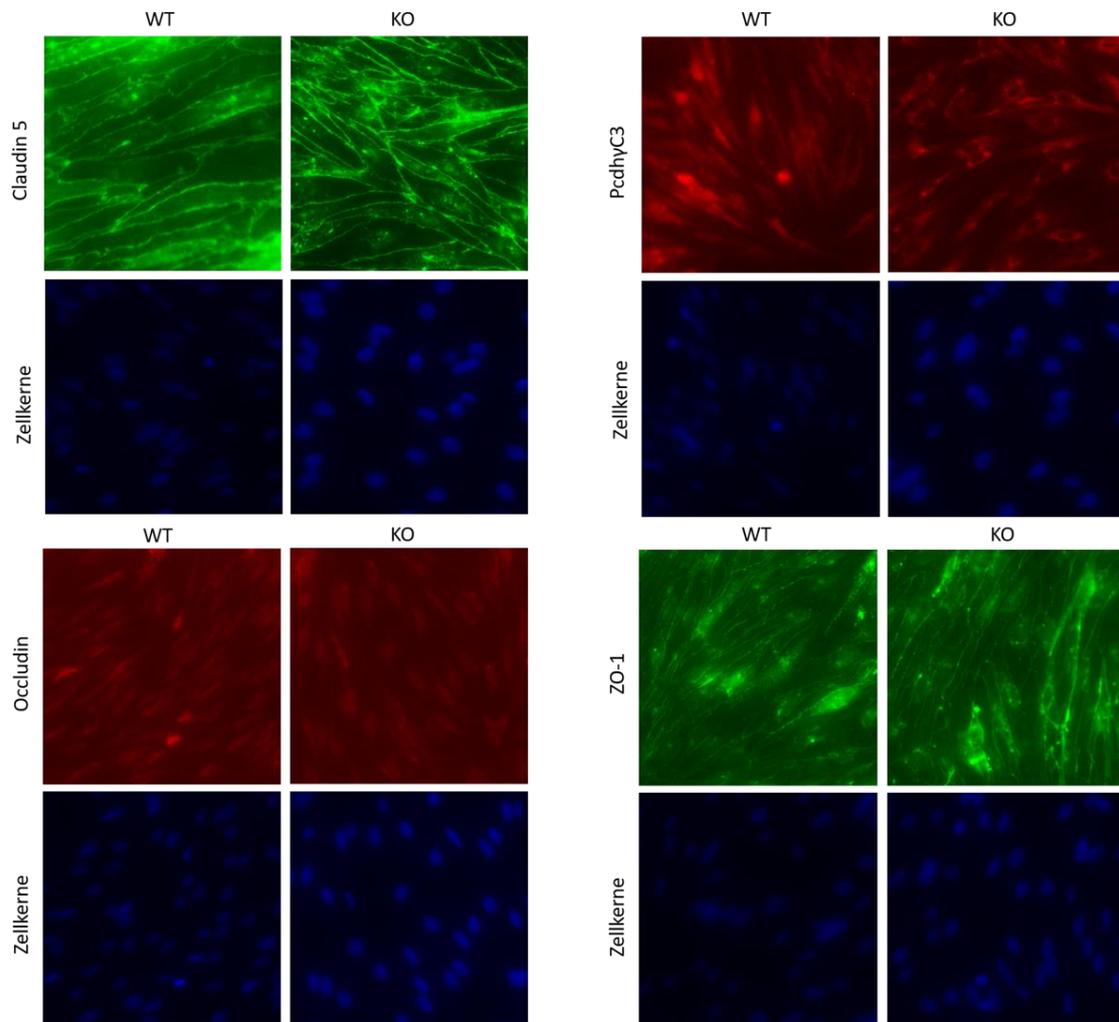


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung der cerebEND Zellen. Die Aufnahmen wurden mit dem Keyence BZ9000 Fluoreszenz-Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung erstellt.

3.3 Zellpermeabilität

Zur Untersuchung der Effekte eines Knock-outs von PCDHYC3 auf die Barriereigenschaften der Endothelzellen wurde der transendotheliale elektrische Widerstand, so wie die Permeabilität für Fluoreszein untersucht. Es zeigt sich, dass der TEER der KO-Zellen gegenüber den WT Zellen erniedrigt ist und in Kongruenz zeigt sich eine erhöhte Permeabilität der KO-Zellen.

Zur Messung des TEER wurden cerebEND Zellen zunächst für sieben Tage in den Transwells zur Konfluenz herangezogen. Die Messungen erfolgten ab Tag 7. Berechnet wurde

der elektrische Widerstand in Ωcm^2 und ist in % des Widerstands der WT Zellen dargestellt (siehe Abbildung 9).

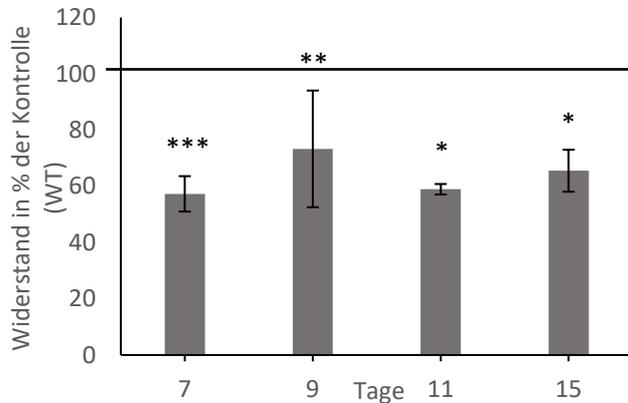


Abbildung 9: Transendothelialer elektrischer Widerstand. Abgebildet ist der TEER der KO-Zellen als % des Widerstands der WT-Zellen, welche jeweils als 100% gesetzt wurden. Untersucht wurden cerebEND Zellen in zwei unabhängigen Versuchsreihen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Statistische Signifikanz wird ab einem p-Wert von $< 0,05$ angenommen. $P < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

Zur Messung der Permeabilität wurde, wie beschrieben, der parazelluläre Durchfluss von Fluoreszierendem Natrium Salz gemessen. Die cerebEND KO und WT Zellen wurden für sechs Tage in Trans-wells™ kultiviert, bevor die Versuche durchgeführt wurden. Gemessen wurde die Fluoreszenz in den Proben der unteren Näpfe. Berechnet wurde die Permeabilität der KO-Zellen prozentual zu den WT-Zellen, welche als 100% gesetzt wurde. Es zeigt sich eine 45% höhere Permeabilität der KO-Zellen (siehe Abbildung 10).

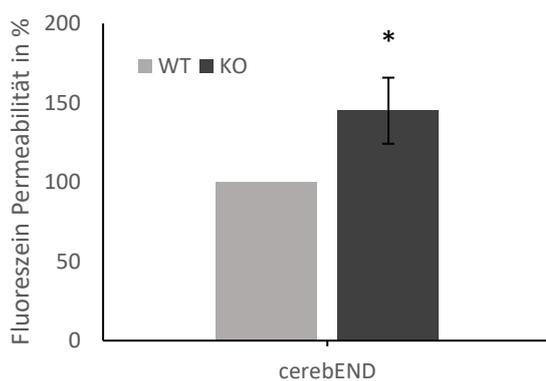


Abbildung 10: Permeabilität der PcdhgC3 WT und KO cerebEND Zellen. Die Permeabilität der KO-Zellen ist in % der WT Zellen dargestellt, welche auf 100% gesetzt wurde. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p Wert $< 0,05$ angenommen.

3.4 Wachstumsverhalten

Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens der WT und KO-Zelllinien wurde ein Wundheilungsansatz verwendet. Hierbei wurden die Zellen, wie beschrieben, zunächst in einer durch einen Silikoneinsatz getrennten Kammer herangezogen. Nach Entfernung der Trennkammer entstand eine definierte Lücke von 500 μ m (siehe Abbildung 11 A). Die freie Fläche wurde nach 48 Stunden gemessen und daraus die Wachstumsrate berechnet, wobei die WT-Zellen als Kontrolle verwendet und deren Wachstumsrate als 1 gesetzt wurde. Es zeigt sich für die KO-Zellen in der cerebEND Zelllinie eine 2,1-fache und in der cEND Zelllinie eine 22,4-fache Wachstumsrate (Abbildung 11 B).

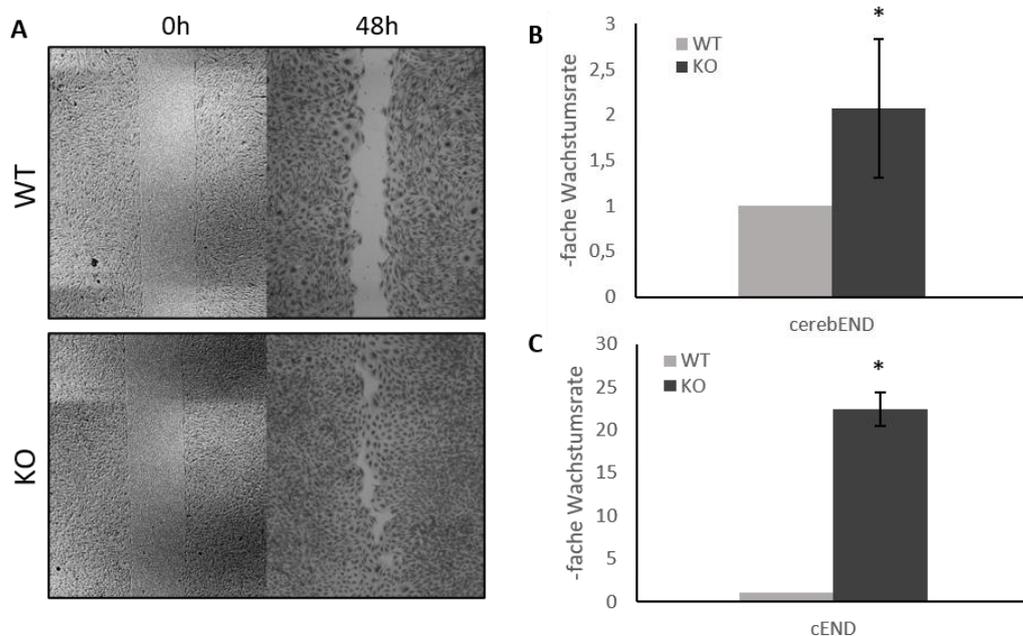


Abbildung 11: Wundheilungsansatz der PcdhyC3 WT und KO cerebEND Zellen. Dargestellt sind die Zellen jeweils nach unmittelbarer Entnahme der Trennung (0h) und zum Zeitpunkt 48h, nach Färbung mit Cell Stain solution (A). Gemessen wurde die freie Fläche eines definierten Bereichs und daraus die Wachstumsrate berechnet. Wachstumsrate der KO-Zellen im Vergleich zu den WT Zellen für cerebEND (B) und cEND (C). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Statistische Signifikanz wird angenommen ab einem p-Wert < 0,05 und mit * gekennzeichnet.

3.4.1 Gefäßformation

Die Fähigkeit der Endothelzelllinien *in vitro* Gefäße zu formen, wurde untersucht, indem die Zellen auf Matrigel® (*Corning*), einem Gel, das in seiner Zusammensetzung der Basalmembran ähnelt, gesät wurden. In diesem Gel bilden Endothelzellen gefäßartige Strukturen (sog. Tubes), welche sich verzweigen und rundliche Strukturen (sog. Loops) ausbilden (Abbildung 13). Es erfolgte die Auswertung von vier Passagen cEND Zellen. Mit Hilfe der MetaVi Lab Software (*Ibidi GmbH*) wurden folgende Parameter bestimmt: Anzahl der Loops, bewachsene Fläche, Länge der Tubes und Anzahl der Verzweigungen, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied für einen der Parameter zwischen der WT und der KO-Zelllinie nachgewiesen werden kann (Abbildung 12).

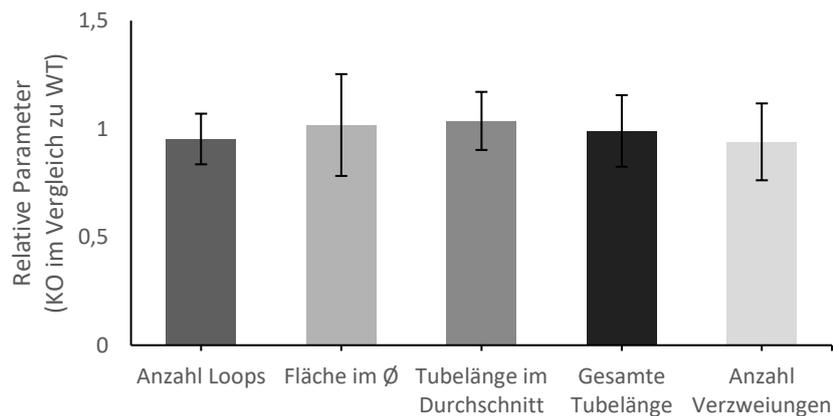


Abbildung 12: Auswertung Matrigel. Auswertung von vier Passagen cEND Zellen als Mittelwert und Standardabweichung. Verglichen werden die KO mit den WT Zellen, deren Daten normalisiert und als 1 gesetzt wurden. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p-Wert von <0,05 angenommen.

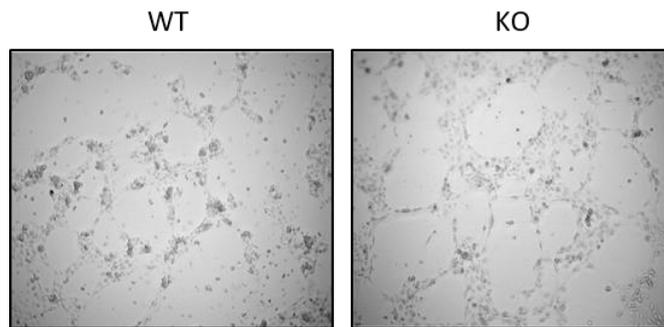


Abbildung 13: Matrigel cEND. Wachstum der cEND Zellen im Matrigel. Die Bilder wurden nach 16h Inkubation bei 37°C mit dem Keyence Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.5 Zelladhäsion

Zur Ermittlung der Adhäsion an verschiedene Komponenten der Extrazellulären Matrix wurde der ECM Cell Adhesion Array Kit (*Merck*) wie oben beschrieben verwendet. Dabei erfolgte die Analyse von drei aufeinander folgenden Passagen von cerebEND WT und KO-Zellen im Vergleich.

Es zeigt sich hierbei eine stärkere Adhäsion der KO-Zelllinie an allen getesteten ECM Komponenten, statistisch signifikant kann der Unterschied nur für Laminin nachgewiesen werden.

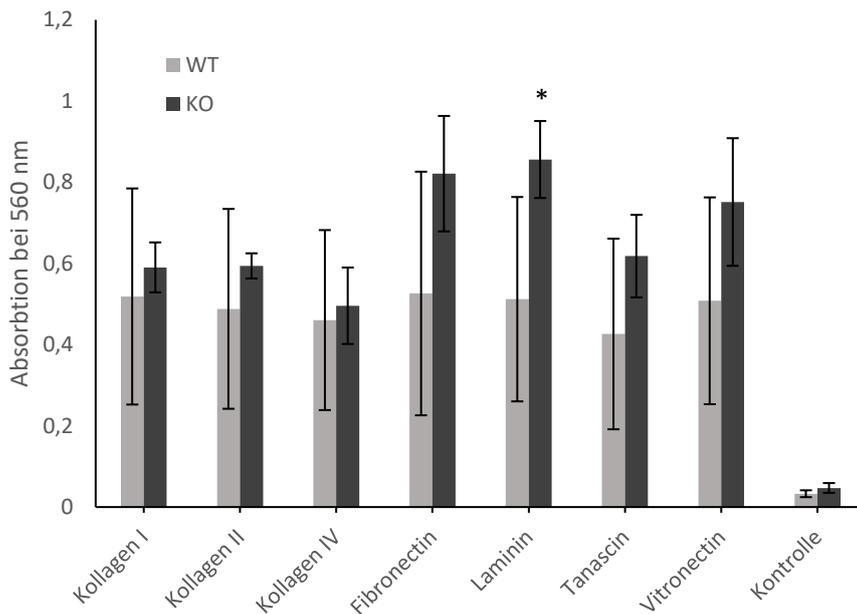


Abbildung 14: Adhäsion an die ECM. CerebEND KO-Zellen zeigen eine stärkere Adhäsion an den verschiedenen Komponenten der ECM als WT Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unterschiedlichen Versuchen mit Zellen von drei aufeinanderfolgenden Passagen als Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikanz (*) wird angenommen ab einem p Wert von < 0,05.

3.6 Veränderungen der Tight Junctions

Eine wichtige Rolle für die Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke spielen die TJs. Zur Untersuchung der Auswirkung des Knock-outs von Pcdh γ 3 auf die Proteine der Tight Junctions wurde zusätzlich zur Immunfärbung (siehe Abbildung 8) deren Expression auf mRNA und Proteinebene untersucht.

In der cerebEND Zelllinie zeigt sich für die KO-Zelllinie auf mRNA Ebene für Claudin-3 eine Erniedrigung auf den 0,73-fachen und für Occludin auf den 0,16-fachen Wert. Für Claudin-5, VE-Cadherin und ZO-1 erhöhen sich die Werte auf den 4,38-, 2,15- bzw. 2,58-fachen Wert. Diese Veränderungen sind statistisch relevant. Für Claudin-1 ergibt sich eine Erhöhung auf das 1,42-fache, welche statistisch nicht relevant ist. Auf Proteinebene bestätigt sich die verminderte Expression von Occludin auf das 0,79-fache des Werts der WT Zellen. Für Claudin-3 zeigt sich hingegen eine Zunahme des Proteinlevels auf den 3,53-fachen Wert. Eine statistisch relevante Zunahme wird ebenso für Claudin-5 auf einen 2,25-fachen Wert und ZO-1 auf den 1,45-fachen Wert nachgewiesen. Für VE-

Cadherin zeigt sich mit einem Wert von 0,98 kein relevanter Unterschied (siehe Abbildung 15).

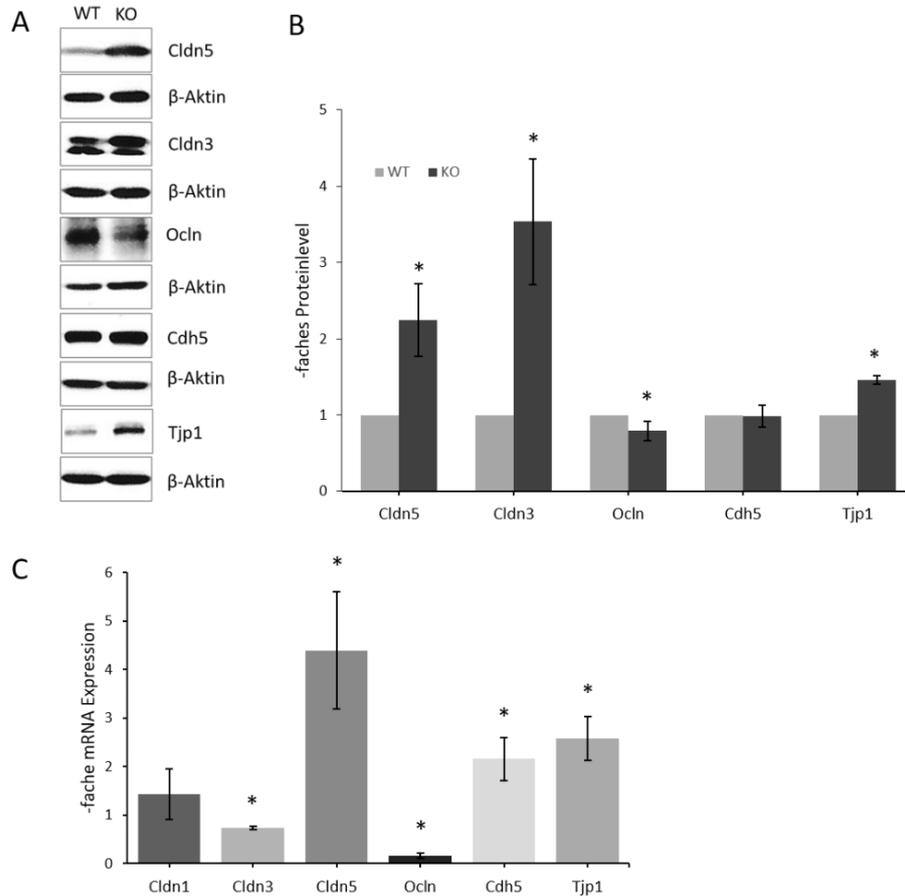


Abbildung 15: Veränderung der TJ-Proteine in der cerebEND Zelllinie. Dargestellt sind die Veränderungen der TJ Proteine der PcdhyC3 KO-Zelllinie auf Proteinebene im WB (A). β -Aktin dient als Ladungskontrolle. Das Proteinlevel wird als Mittelwert und Standardabweichung angegeben (B). C zeigt die Veränderungen auf mRNA-Ebene. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p Wert < 0,05 angenommen. Cdh5 = Cadherin 5 = VE-Cadherin; Cldn1 = Claudin-1; Cldn3 = Claudin-3; Cldn5 = Claudin-5; Occludin = Occludin; Tjp1 = Tight Junction Protein 1 = ZO-1.

Für die cEND Zelllinie zeigt sich in der KO-Zelllinie auf mRNA Ebene eine verminderte Expression von Claudin-3 (0,55-fach) und Claudin-12 (0,65-fach) als statistisch relevant. Für Occludin kann eine Abnahme auf den 0,87-fachen Wert gezeigt werden, welcher nicht statistisch signifikant ist. Eine signifikante Zunahme auf mRNA Ebene wird für Claudin-5 und ZO-1 nachgewiesen, mit 2,15-fachem bzw. 1,25-fachem Wert. Für VE-Cadherin zeigt sich kein Unterschied zur WT Zelllinie.

Auf Proteinebene zeigt sich für Claudin-3, Occludin und VE-Cadherin eine Abnahme des Proteinlevels auf den 0,54-fachen, 0,82-fachen bzw. 0,75-fachen Wert. Das Proteinlevel von Claudin-12 erhöht sich in der KO-Zelllinie auf den 2,13-fachen Wert und für Claudin-5 auf den 3,34-fachen Wert (siehe Abbildung 16). Diese Änderungen sind statistisch relevant. Kein relevanter Unterschied zeigt sich auf Proteinebene für ZO-1.

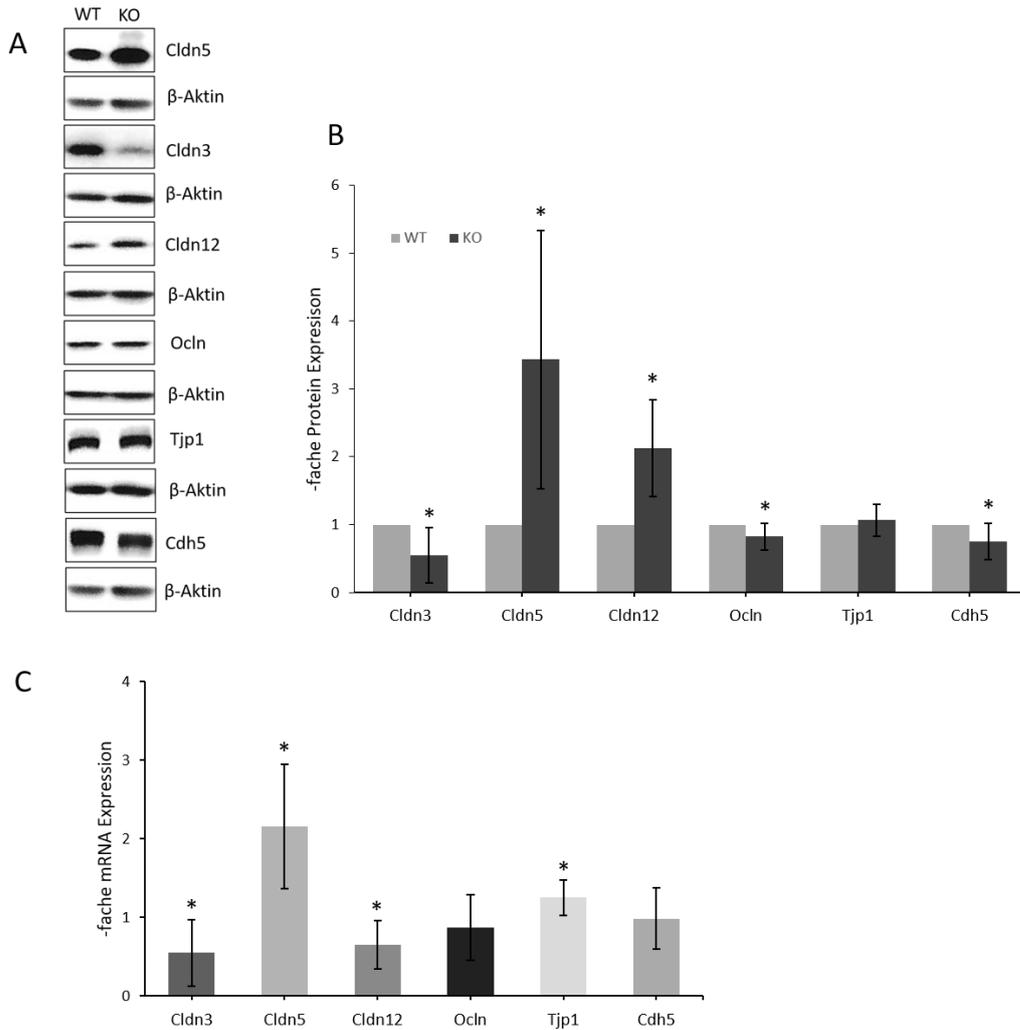


Abbildung 16: Veränderung der TJ Proteine in der cEND Zelllinie. Dargestellt sind die Veränderungen der TJ Proteine der PcdhyC3 KO-Zelllinie auf Proteinebene im WB (A). β-Aktin dient als Ladungskontrolle. Das Proteinlevel wird als Mittelwert und Standardabweichung angegeben (B). C zeigt die Veränderungen auf mRNA-Ebene. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p Wert < 0,05 angenommen. Cdh5 = Cadherin 5 = VE-Cadherin; Cldn3 = Claudin-3; Cldn5 = Claudin-5; Cldn 12 = Claudin-12; Ocln = Occludin; Tjp1 = Tight Junction Protein 1 = ZO-1.

3.7 Wnt- Signalweg

Um die Effekte des KO von PcdhyC3 an Endothelzellen auf den Wnt-Signalweg zu charakterisieren, wurde die Expression ausgewählter Vertreter des Signalwegs auf mRNA-Ebene untersucht.

In der cerebEND Zelllinie zeigt sich in der KO-Linie eine 1,46-fach erhöhte Expression von Fzd-1, während Axin-1 (0,66-fach), Lrp-5 (0,64-fach), Pard-3 (0,58-fach) und Gsk3b (0,76-fach) eine verminderte Expression zeigen. Diese Veränderungen sind statistisch relevant (siehe Abbildung 17).

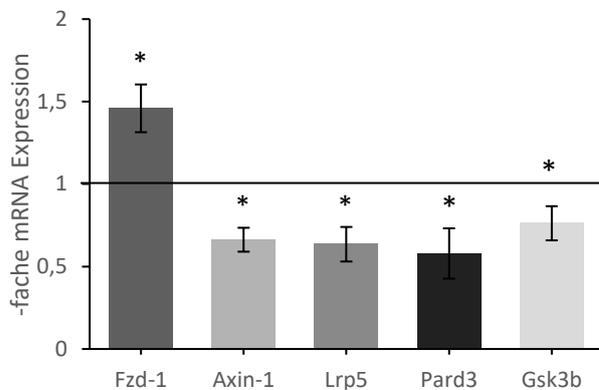


Abbildung 17: Einfluss des KO auf den Wnt-Signalweg in cerebEND. Dargestellt ist die -fache mRNA Expression von KO im Vergleich zu WT Zellen. Analysiert wurden drei aufeinanderfolgende Passagen von cerebEND Zellen. Gezeigt werden Mittelwert und Standardabweichung. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p-Wert von < 0,05 angenommen. Axin-1 = Axin1, Fzd-1 = Frizzled 1, Gsk3b = Glykogensynthetasekinase 3 beta, Lrp5= LDL Receptor Related Protein 5, Pard3 = Par-3 family cell polarity regulator.

Die cEND KO-Zellen zeigen eine erhöhte Expression von Fzd-1 auf den 3,72-fachen Wert und von Lrp5 auf den 1,33-fachen Wert. Eine verminderte Expression kann für Axin-1 (0,77-fach) und Pard3 (0,77-fach) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). Für Gsk3b zeigt sich mit dem 0,96-fachen Wert keine relevante Veränderung im Vergleich mit den WT Zellen.

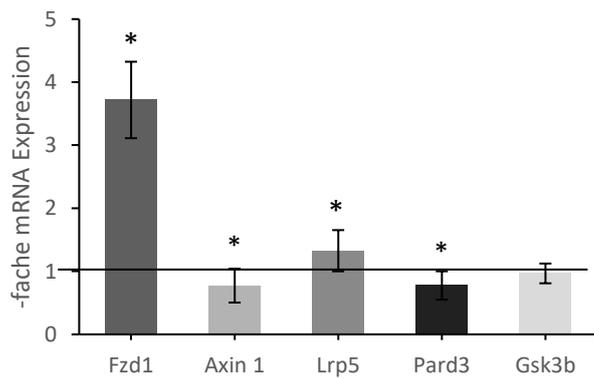


Abbildung 18: Einfluss des KO auf den Wnt-Signalweg in cEND. Dargestellt ist die -fache mRNA Expression von KO im Vergleich zu WT Zellen. Analysiert wurden drei aufeinanderfolgende Passagen von cEND Zellen. Gezeigt werden Mittelwert und Standardabweichung. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p-Wert von < 0,05 angenommen. Axin-1 = Axin1, Fzd-1 = Frizzled 1, Gsk3b = Glykogensynthetasekinase 3 beta, Lrp5= LDL Receptor Related Protein 5, Pard3 = Par-3 family cell polarity regulator.

3.8 mTOR-Signalweg

Im Anschluss erfolgte die Untersuchung des KO-Effekts auf den mTOR Signalweg.

In den Pcdhyc3-KO Zellen kann auf mRNA-Ebene eine verminderte Expression für mTOR und Sqstm nachgewiesen werden. In den Untersuchungen der cerebEND Zelllinie ergibt sich eine 0,79-fache Expression von mTOR bzw. 0,37-fache Expression von Sqstm (siehe Abbildung 19). Auch in den cEND Zellen zeigt sich die mTOR Expression erniedrigt auf einen Wert von 0,79. Diese Änderungen sind statistisch relevant. Für Sqstm zeigt sich in cEND KO-Zellen eine Erniedrigung auf den 0,81-fachen Wert, welche statistisch nicht signifikant nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 20).

Auf Proteinebene zeigt sich in beiden Zelllinien, mit dem 0,65-fachen Wert in cerebEND KO und dem 0,77-fachen Wert in cEND KO-Zellen, eine verminderte Proteinmenge für Sqstm im Western-Blot.

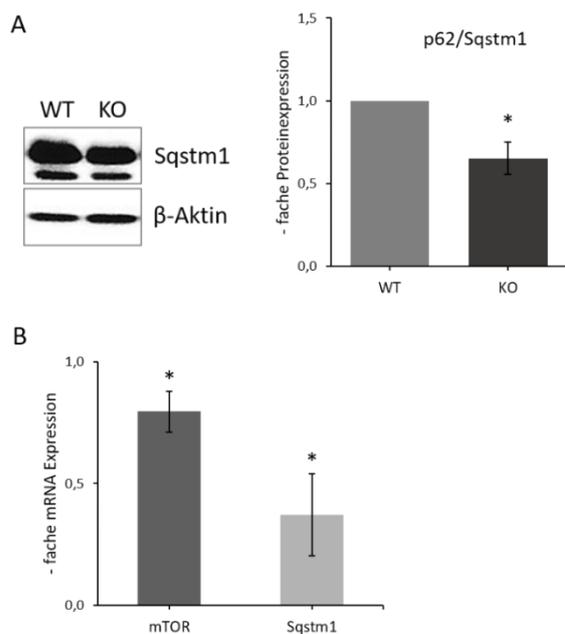


Abbildung 19: Veränderungen von mTOR und Sqstm1 in cerebEND. Es wurden drei aufeinanderfolgende Passagen untersucht. A zeigt die Veränderung auf Proteinebene. β -Aktin als Ladungskontrolle. B: Dargestellt ist die mRNA Expression der KO-Zellen im Vergleich zur WT Zelllinie als Mittelwert und Standardabweichung. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p-Wert < 0,05 angenommen. mTOR = Mammalian target of rapamycin; Sqstm-1= p62/Sqstm-1= Sequestosom 1.

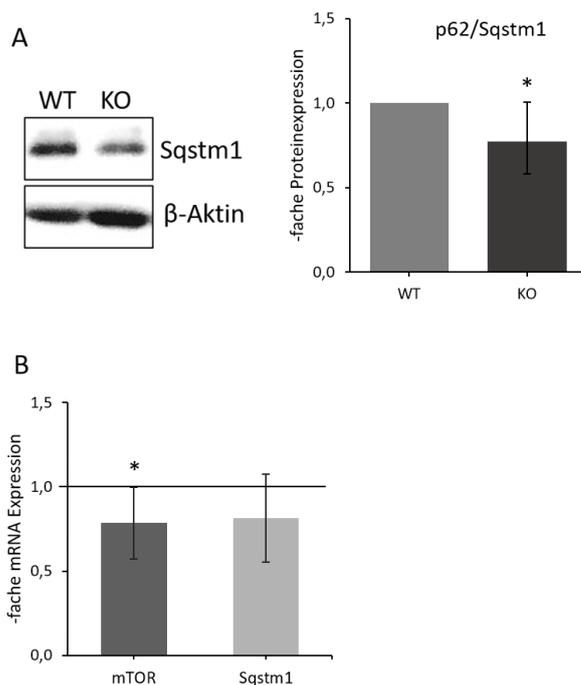


Abbildung 20: Veränderungen von mTOR und Sqstm1 in cerebEND. Es wurden drei aufeinanderfolgende Passagen untersucht. A zeigt die Veränderung auf Proteinebene. β -Aktin als Ladungskontrolle. B: Dargestellt ist die mRNA Expression der KO-Zellen im Vergleich zur WT Zelllinie als Mittelwert und Standardabweichung. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p-Wert < 0,05 angenommen. mTOR = Mammalian target of rapamycin; Sqstm-1= p62/Sqstm-1= Sequestosom 1

3.9 Mesenchymale Marker

Als nächstes wurde der Effekt des Knock-outs von PcdhyC3 auf ausgewählte mesenchymale Markerproteine auf mRNA-Ebene untersucht.

In der cerebEND Linie zeigt sich eine statistisch relevante Verminderung auf 0,72-fache nur für Lasp1 (siehe Abbildung 21). Nicht relevant sind die Veränderungen für Snai 1 (1,05-fach), Fn1 (0,97-fach) und Vim (1,47-fach).

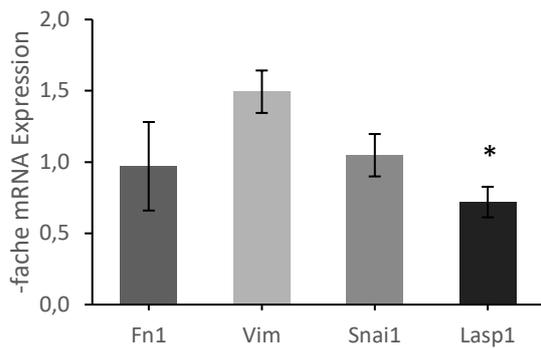


Abbildung 21: Veränderung mesenchymaler Marker in cerebEND. Dargestellt sind die Veränderungen der KO-Zellen im Vergleich zur WT Zelllinie als Mittelwert und Standardabweichung von drei aufeinanderfolgenden Passagen. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p-Wert von < 0,05 angenommen. Fn1 = Fibronectin 1; Lasp1 = LIM and SH3 domain protein 1; Snai1 = Snail family zinc finger; Vim = Vimentin.

In der cEND KO-Linie zeigt sich ebenfalls eine auf das 0,70-fache verminderte mRNA-Expression für Lasp1. Die Expression von Snai1 zeigt sich auf die 2,08-fache Menge erhöht. Keine relevanten Änderungen zeigen sich für Vim und Fn1 (siehe Abbildung 22).

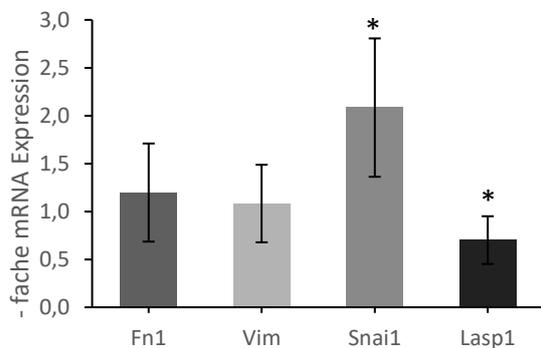


Abbildung 22: Veränderung mesenchymaler Marker in cEND. Dargestellt sind die Veränderungen der KO-Zellen im Vergleich zur WT Zelllinie als Mittelwert und Standardabweichung von drei aufeinanderfolgenden Passagen. Statistische Signifikanz (*) wird ab einem p-Wert von < 0,05 angenommen. Fn1 = Fibronectin 1; Lasp1 = LIM and SH3 domain protein 1; Snai1 = Snail family zinc finger; Vim = Vimentin.

Untersuchungen zum Einfluss des KO von PcdhyC3 auf die mesenchymalen Marker auf Proteinebene sind im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt, könnten aber zum genaueren Verständnis des Einflusses von PcdhyC3 auf die regulatorischen Mechanismen der Endothelzellen in Zukunft erfolgen.

4 Diskussion

4.1 Knock-out

Zur Untersuchung verschiedener Gene und ihrer Relevanz in biologischen Prozessen und der Entstehung von Krankheiten gibt es eine Reihe von Methoden, diese *in vitro* und *in vivo* auszuschalten oder zu verändern. Zink Finger Nukleasen und TAL (engl. transcription activator like) Nukleasen sind bekannte Werkzeuge, um sequenzspezifische DNA-Veränderungen zu erzielen, jedoch mit aufwändigem Proteindesign und Syntheschwierigkeiten verbunden (Doudna et al., 2014). SiRNAs (engl. small interfering RNA) bieten eine Möglichkeit zum posttranskriptionellen Knock-down von Genen und finden nicht nur in der Forschung Anwendung, sondern sind auch als potenzielle Therapeutika von Viruserkrankungen, erblichen Krankheiten und Karzinomen Gegenstand der Untersuchungen (Fakhr et al., 2016; Kanasty et al., 2013). Es handelt sich dabei um eine reversible Ausschaltung der Genexpression, weshalb der Effekt des Knock-downs, gerade in Zellen mit hoher Teilungsrate, nicht dauerhaft ist. Durch die CRISPR/Cas9 Methode gelingt ein einfach anzuwendender Sequenzspezifischer Knock-out von Genen auf DNA-Ebene (Doudna et al., 2014).

Mit dieser Methode wurden die Knock-out Zelllinien cEND Pcdh γ C3 KO und cerebEND Pcdh γ C3 KO erstellt. Die Kontrolle des Knock-outs erfolgt per Western Blot, in dem sich für beide KO-Zelllinien keine Banden im Bereich von 130 kDa, dem Bandenbereich von Pcdh γ C3 zeigen. Auch in der PCR kann der Knock-out verifiziert werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Interessanterweise ist in der immunhistochemischen Anfärbung eine Färbung der KO-Zellen nach Behandlung mit dem Pcdh γ C3 Antikörper zu erkennen, wobei eine deutliche Verminderung des Signals im Bereich des Zytoplasmas im Vergleich zu den WT Zellen zu erkennen ist. Der verwendete Antikörper ist zu 97% spezifisch für die VCD der Pcdhs. Möglicherweise werden dennoch auch andere Pcdhs mit angefärbt.

4.2 Barriereigenschaften und Regulation der TJ-Proteine

Die BHS trennt das neuronale Gewebe von seiner Umgebung. Insbesondere die mikrovaskulären Gefäße spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Austausches von Sauerstoff und Nährstoffen, aber auch dem Schutz des neuronalen

Gewebes vor schädlichen Einflüssen. Die besondere Dichte der Kapillaren des Gehirns wird unter anderem über die TJ vermittelt. Eine Dysfunktion der BHS lässt sich bei diversen Pathologien, wie der Multiplen Sklerose, Tumoren, Speicherkrankheiten, Hypoxie, Ischämie und Hirnödemen beobachten (Abbott et al., 2010). Die Barriereigenschaften der BHS können durch diverse Umstände positiv oder negativ beeinflusst werden. Interleukine, Tumornekrosefaktor α , Bradykinin oder Prostaglandine führen zu einer Abnahme der Dichte. Eine Verstärkung der Barrierefunktion kann durch den Einfluss von cAMP und Steroiden beobachtet werden (Abbott et al., 2006). Burek et al. zeigten einen Einfluss von Glukokortikoiden auf die Expression von Occludin und Claudin-5 und eine damit einhergehende Zunahme der Dichte (Burek et al., 2012).

Der KO von PcdhyC3 scheint einen negativen Einfluss auf die Barriereigenschaften der Endothelzellen zu haben. Es zeigt sich in den KO-Zellen eine 45% höhere Permeabilität für Fluoreszein und bis zu 43% niedrigere TEER-Werte im Vergleich zu den WT Zellen.

Bei den Claudinen handelt es sich um Transmembranproteine, welche den Interzellulärspalt durchspannen und hauptsächlich für die Dichte der TJ verantwortlich sind. Claudin-1, -3, -5 und -12 sind an der Ausbildung der TJ in zerebralen Endothelien beteiligt (Haseloff et al., 2015).

Claudin-3 ist an der Entstehung und der Aufrechterhaltung der TJs beteiligt und kontrolliert dadurch die parazelluläre Dichte (Milatz et al., 2010; Wolburg et al., 2003). Liebner et al. zeigten einen Einfluss des Wnt/ β -Catenin Signalwegs auf Claudin-3. Eine Aktivierung des Signalwegs führt zu erhöhter Claudin-3 Expression und damit zu einer Ausreifung der TJs und Stabilisierung der BHS (Liebner et al., 2008). Der KO von PcdhyC3 führt zu einer verminderten Expression von Claudin-3 auf mRNA Ebene, passend zu den nachgewiesenen verminderten Barriereigenschaften. In cEND KO-Zellen ist dieser Effekt auch auf Proteinebene nachweisbar, während in cerebEND KO-Zellen das Proteinlevel von Claudin-3 um das 3,5-fache erhöht ist. Möglicherweise findet hier eine posttranskriptionelle Regulation statt, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Eine Rolle könnte dabei die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch PcdhyC3 (Mah et al., 2016),

bzw. der durch den KO bedingte Verlust der inhibierenden Wirkung spielen. Genauere Untersuchungen sollten hierzu zukünftig erfolgen.

Claudin-5 ist an den kapillären Endothelien des Gehirns über 100-fach stärker exprimiert als die anderen Claudine und sorgt hauptsächlich für Ausformung, Ausreifung und Aufrechterhaltung der TJs und kontrolliert dadurch den parazellulären Durchtritt kleiner Moleküle (Haseloff et al., 2015). Die Regulation von Claudin-5 erfolgt über unterschiedliche Mechanismen. Durch den Transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β), ein Zytokin, das an der embryonalen Zellentwicklung beteiligt ist, erfolgt eine Inhibition der Claudin-5 Expression (Watabe et al., 2003). Durch Adrenomedullin (Honda et al., 2006), Glukokortikoide (Forster et al., 2006) und Östrogene (Burek et al., 2010) wird die Promoter-Aktivität erhöht, was eine gesteigerte Claudin-5 Expression und damit dichtere BHS zur Folge hat. Auch VE-Cadherin, als Bestandteil der Adhärenz Junctions, kann die Claudin-5 Expression über eine Modulation der Promoter-Aktivität positiv beeinflussen (Taddei et al., 2008). Interessanterweise führt der KO von PcdhyC3 zu erhöhten Leveln von Claudin-5 auf mRNA und Proteinebene in den beiden KO-Linien. Diese Ergebnisse sind unerwartet und stehen im Gegensatz zu den verminderten Barriereigenschaften, die sich in den KO-Zellen finden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Gegenregulation oder der KO von PcdhyC3 hat Einfluss auf die Funktionalität von Claudin-5. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den genauen Mechanismus zu verstehen.

Claudin-12 unterscheidet sich strukturell von den anderen Claudinen, die an den zerebralen Kapillaren nachgewiesen wurden. Über die genaue Funktion an der BHS ist bisher wenig bekannt. Castro Dias et al. zeigten, dass der Knock-out von Claudin-12 in einem Tiermodell für Multiple Sklerose zur Ausbildung einer intakten BHS ohne Zeichen von Dysfunktion oder Entzündung führte, was eine Beteiligung von Claudin-12 an der Ausbildung und Aufrechterhaltung der TJ-Integrität unwahrscheinlich macht (Castro Dias et al., 2019). Eine Beteiligung von Claudin-12 am parazellulären Ca²⁺ Transport wird diskutiert (Fujita et al., 2008). Der KO von PcdhyC3 führt zu einem vermindertem mRNA Level von Claudin-12. Auf Proteinebene zeigt sich in cEND KO-Zellen dagegen ein erhöhtes Claudin-12 Level. Hierbei könnte es sich womöglich um eine Kreuzreaktion des

Antikörpers mit einem anderen Claudin handeln. Castro Dias et al. beschrieben in ihrer Arbeit Probleme mit der Selektivität der aktuell kommerziell erhältlichen Claudin-12 Antikörper und vermuten Kreuzreaktionen mit anderen Claudinen, insbesondere da das Level von Claudin-12 an zerebralen Kapillaren eher niedrig ist (Castro Dias et al., 2019).

Occludin wurde als erstes Transmembranprotein der TJs identifiziert und wird an nahezu allen TJ exprimiert, weshalb es als TJ-Marker Protein angesehen wird (Furuse et al., 1993). Occludin KO-Mäuse bilden morphologisch normale TJs, entwickeln allerdings diverse Pathologien, wie chronische Inflammation, Dysfunktion von Speicheldrüsen und Verkalkungen des Gehirns (Saitou et al., 2000). Die Funktion von Occludin an den TJ scheint regulatorisch zu sein. So ist es u.a. an der Signalvermittlung von Zytokinen, wie TNF α beteiligt (Van Itallie et al., 2010). Hypoxie führt zu verminderten Occludin-Leveln, genauso wie der Einfluss von Interleukin 17 und TNF α . Es gibt Hinweise auf eine Interaktion zwischen Occludin und VEGF. Titchenell et al. beschreiben eine VEGF-vermittelte Occludin Delokalisation und in Folge erhöhte endotheliale Permeabilität an retinalen Gefäßen (Titchenell et al., 2012). In den PcdhyC3-KO Linien kann eine verminderte Expression von Occludin auf mRNA und Proteinebene nachgewiesen werden. Der KO könnte über die Herunterregulation von Occludin an der Verminderung der TJ-Dichte beteiligt sein. Soweit bekannt wurde der Einfluss von Protocadherinen auf Occludin bisher noch nicht beschrieben. Eine genaue Untersuchung der Interaktion könnte in Zukunft erfolgen.

Die Zonula occludens (ZO 1-3) Proteine binden an die Transmembranproteine Occludin, sowie die Claudine und an zytoskelettale Komponenten, wie Aktin. Hierdurch regulieren sie die korrekte Anordnung der TJ und determinieren die Polarität der Endothelzellen (Fanning et al., 2009; Van Itallie et al., 2014). ZO-1 spielt eine Rolle bei der Angiogenese, Barriere-Formation, Zellbindung und -migration. Eine Herunterregulation von ZO-1 führt zu Störungen der TJ, sowie verminderter Spannung an VE-Cadherin, einer wichtigen Komponente der AJ (Tornavaca et al., 2015). Durch den KO von PcdhyC3 kommt es zu einem erhöhten Level von ZO-1 auf mRNA Ebene. Diese Zunahme ist in den cerebEND PcdhyC3 KO deutlicher ausgeprägt als in cEND PcdhyC3 KO und bestätigt sich auch auf Proteinebene, während in den cEND KO-Zellen kein relevanter Unterschied im WB

gezeigt werden kann. Ähnlich wie bei Claudin-5 korreliert die Zunahme der ZO-1-Expression nicht mit den verminderten Barriereigenschaften der KO-Zellen und kann durch das Zusammenspiel aller deregulierten Signalwege in den KO-Zellen verursacht sein.

VE-Cadherin ist das wichtigste Transmembran-Protein der endothelialen Adhärenzkontakte. Neben der Vermittlung des primären Kontakts zwischen zwei Zellen, beeinflussen die AJ auch die Ausbildung und Integrität der TJ. Beim Ischämischen Schlaganfall, der mit massiver Dysregulation der BHS Integrität verbunden ist, konnten erhöhte Level von zirkulierenden VE-Cadherin Mikropartikeln nachgewiesen werden (Li et al., 2015). Als eine Form der Interaktion zwischen TJ und AJ konnte der Einfluss von VE-Cadherin auf die Promoter Aktivität von Claudin-5 nachgewiesen werden (Taddei et al., 2008). Daneben spielt VE-Cadherin eine Rolle bei der Angiogenese und der Ausbildung embryonaler Gefäßsysteme und kontrolliert in adulten Organismen die Permeabilität der Gefäße und deren Wachstum (Giannotta et al., 2013). Die Regulation von VE-Cadherin durch den KO von PcdhyC3 stellt sich in den beiden KO-Zelllinien unterschiedlich dar. Während in cerebENDPcdhyC3 KO ein deutlicher Anstieg des mRNA Levels beobachtet wird, aber keine relevante Veränderung auf Proteinebene, zeigt sich in cENDPcdhyC3 KO kein Unterschied im mRNA Level, jedoch ein signifikant erniedrigtes Proteinlevel.

Die unterschiedliche Regulation einiger TJ und AJ-Proteine könnte darauf zurückzuführen sein, dass die beiden Zelllinien aus unterschiedlichen Gehirnregionen entstammen. Möglicherweise werden die BHS der verschiedenen Regionen abweichend reguliert. Wie beschrieben (s. Abschnitt 1.2.1) reagieren die beiden Zellreihen ungleich stark auf inflammatorische Einflüsse und auch in vivo kann eine unterschiedliche Anfälligkeit der Gehirnregionen für diverse neurodegenerative Erkrankungen beobachtet werden (Minagar et al., 2003; Sweeney et al., 2018). Der KO von PcdhyC3 zeigt vor allem eine unterschiedliche Beeinflussung von Claudin-3, ZO-1 und VE-Cadherin an den beiden untersuchten Zelllinien cEND und cerebEND. Weitere Untersuchungen könnten hierzu in Zukunft sinnvoll sein.

4.3 Wachstumsverhalten

Durch Wundheilungsansätze lässt sich das Wachstumsverhalten der Endothelzellen beurteilen. Der KO von PcdhyC3 führt in beiden KO-Zellreihen zu deutlich höheren Wachstumsraten verglichen mit den WT-Linien. Diese Ergebnisse passen zu den Erkenntnissen, dass Pcdhs in die Regulation von Zellproliferation, -migration und Zelltod involviert sind. Eine Herunterregulation von Pcdh 7 führt bei Magenkarzinom-Zellen zu einer Zunahme der Zellmigration und -invasivität (H. F. Chen et al., 2017). Auch für Pcdh 10 ist eine Hypermethylierung und Inaktivierung in vielen Tumoren, wie dem Nasopharynx-Karzinom und dem Nicht-Kleinzelligen-Lungen-Karzinom beschrieben. Die Inaktivierung führt hier ebenfalls zu gesteigerter Zellmigration und verminderten Apoptoseraten (Pancho et al., 2020; Ying et al., 2006).

Weiterhin konnten auch den geclusterten Pcdhs Tumorsuppressoreigenschaften, z.B. beim Kolorektalen-Karzinom oder bei Nierentumoren nachgewiesen werden (Dallosso et al., 2012). Die Regulation von Zellproliferation und -migration erfolgt über diverse Signalwege, u.a. spielen der Wnt/ β -Catenin Signalweg und mTOR eine Rolle. Eine negative Regulierung dieser durch PcdhyC3 konnte gezeigt werden (Dallosso et al., 2012; Mah et al., 2016). Der Wegfall der Inhibition durch den KO von PcdhyC3 stellt einen Erklärungsansatz für die höhere Wachstumsrate der KO-Zellen dar.

Die Ausbildung eines funktionierenden vaskulären Systems des Gehirns erfolgt während der Embryogenese. Die Angiogenese wird dabei durch eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, wie PECAM, VE-Cadherin, N-Cadherin und Protocadherin 1 reguliert (Krishna et al., 2009). Insbesondere die Cadherine regulieren die Gefäßausformung, -integrität und -dichte und beeinflussen so die Ausbildung der BHS (Cavallaro et al., 2006). Eine Dysregulation der Angiogenese lässt sich in vielen Tumoren beobachten. In einigen Karzinomen, in denen Pcdhs als Tumorsuppressoren nachgewiesen wurden, konnte auch eine negative Regulation der Angiogenese festgestellt werden. So beeinflusst Pcdh8 diese beim Ösophaguskarzinom (H. Yu et al., 2020). Für Pcdh10 konnte eine Rolle bei der Regulation der Gefäßformation im Multiplen Myelom gezeigt werden (Y. Li et al., 2012). Zur Untersuchung des Einflusses des KO von PcdhyC3 auf die Gefäßformation wurde ein Tube-Formation Ansatz

durchgeführt. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Ausformung und Verzweigung der Gefäße zwischen der WT und KO-Zelllinie. Ein Einfluss von Pcdh γ C3 auf die Fähigkeit der zerebralen Endothelzellen zur Gefäßformation scheint daher an dieser Stelle unwahrscheinlich.

4.4 Adhäsionsverhalten

Die ECM füllt den interzellulären Raum und verbindet die Zellen eines Organismus miteinander. Sie besteht aus Polysacchariden und Faserbestandteilen. Bei den Faserbestandteilen unterscheidet man strukturelle Proteine, wie Kollagen und Elastin von Adhäsionsproteinen wie Fibronectin, Laminin oder Vitronectin. Die ECM reguliert eine Vielzahl von Prozessen, wie Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -differenzierung. Die Zellen besitzen Rezeptoren zur Kommunikation mit der ECM, sog. Integrine. Diese binden an ECM-Proteinbestandteile und intrazellulär an Bestandteile des zytoskelettalen Apparats (Teti, 1992; Theocharis et al., 2019). Bisher ist wenig zur Interaktion zwischen der ECM und Pcdhs bekannt. Untersuchungen am Magen-Karzinom zeigten eine verminderte Adhäsion an Fibronectin nach dem Knock-down von PcdhB9 (Mukai et al., 2017). Lin et al. zeigten eine erhöhte Interaktion der Laminin-Untereinheit γ 2 nach Überexpression von Pcdh8 und hohe Pcdh8 Level korrelieren mit schlechteren Prognosen beim Magen-Karzinom (Y. Lin et al., 2018).

Ein statistisch signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten kann von allen untersuchten ECM Komponenten nur für Laminin nachgewiesen werden. Hier adhären die Pcdh γ C3 KO-Zellen stärker als die WT-Zellen. Dennoch zeigt sich die Tendenz zu stärkerer Adhäsion der KO-Zellen auch an allen anderen untersuchten Komponenten. Eine Interaktion von Integrinen mit E-Cadherin wurde beschrieben (Canel et al., 2013). Denkbar wäre eine durch den KO von Pcdh γ C3 induzierte Veränderung im Bereich der Integrine, welche das Adhäsionsverhalten beeinflusst. Soweit bekannt gibt es hierzu bisher noch keine Untersuchungen.

4.5 Mesenchymale Marker

Wie beschrieben, sind die Pcdhs in vielen Tumoren dysreguliert. Deshalb wurde der Einfluss von Pcdh γ C3 auf einige mesenchymale Markerproteine stichprobenartig untersucht. Es zeigt sich kein relevanter Effekt auf die mRNA Expression von Fibronectin und Vimentin.

Beim Snail Family Zink Finger (Snai1 oder Snail) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle bei der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) spielt. Bei diesem Prozess verlieren Epithelzellen ihre Polarität durch Auflösung von AJs und TJs und werden wieder migrationsfähig, eine Eigenschaft, die während der Embryogenese benötigt wird, aber auch in der Entstehung und Progression von Tumoren entscheidend ist. Snai1 vermittelt hierbei eine Unterdrückung der Expression von E-Cadherin, dessen Funktionsverlust zum wichtigsten Schritt bei der EMT zählt. Weiterhin beeinflusst Snai1 weitere Entwicklungsprozesse, wie die neuronale Differenzierung, Ausrichtung und Überleben von Zellen (Y. Wang et al., 2013; Wu et al., 2010). An den cerebEND KO-Zellen kann kein Unterschied in der Snai1 Expression gezeigt werden. In den cEND KO-Zellen zeigt sich ein 2,08-fach erhöhtes mRNA Level. Pcdh γ C3 könnte über den Einfluss auf Snai1 zur höheren Wachstumsrate der KO-Zellen beitragen, jedoch zeigt sich in den cerebEND KO-Zellen, die ebenfalls schnelleres Wachstum zeigen, keine Regulation von Snai1. Weitere Untersuchungen zum genauen Verständnis der Interaktion sind nötig.

Ein weiterer Marker, der zu gesteigerter Zellmigration und Invasivität beiträgt ist das LIM und SH3 Domänen Protein (Lasp1). Lasp1 interagiert mit dem Zytoskelett, über Aktin-bindende Proteine, ebenso mit TJs über eine Bindung an ZO-2 (Burrige et al., 2016). Eine Überexpression von Lasp1, wie sie in diversen Tumoren beobachtet werden kann, führt zu gesteigerter zytoskelettaler Umorganisation und erhöhter Zellmigration, Faktoren, die zur Ausbreitung von Tumoren beitragen (Ruggieri et al., 2017). In beiden Pcdh γ C3 KO-Zelllinien ist das mRNA Level von Lasp1 signifikant erniedrigt, so dass von einem Einfluss von Pcdh γ C3 auf Lasp1 an Gefäßen des Gehirns ausgegangen werden kann.

4.6 Signalwege

Es wurde bereits gezeigt, dass der Wnt-Signalweg durch Pcdh- γ Isoformen beeinflusst wird. Mah et al. identifizierten dabei Pcdh γ C3 als einzige inhibierende Isoform, während alle anderen Isoformen aktivierende Eigenschaften zu haben scheinen (Mah et al., 2016). Pcdh γ C3 interagiert dabei mit Axin 1 und stabilisiert dieses an der Zellmembran, was zu verminderter Phosphorylierung von Lrp5 führt. Auch in kolorektalen Karzinomzellen wurde eine Suppression des Wnt-Signalwegs durch Pcdh γ C3 nachgewiesen (Dallosso et al., 2012).

In den Endothelzellen kommt es nach dem KO von Pcdh γ C3 zu einer deutlichen Zunahme des mRNA Levels von Frizzeld, einem Bestandteil des Rezeptors, an den der Wnt-Ligand bindet. Der Effekt ist mit der 3,72-fachen Menge in cEND stärker ausgeprägt als in cerebEND (1,46-fach). In den cerebEND KO-Zellen werden alle weiteren untersuchten Bestandteile des Signalwegs leicht vermindert exprimiert. Im Unterschied dazu nimmt in den cEND KO-Zellen das mRNA Level von Lrp5 etwas zu (1,33-fach). Haÿ et al. zeigten eine Interaktion von N-Cadherin mit Lrp5 und Axin. N-Cadherin kann dabei über die Ausbildung eines Komplexes mit Axin und Lrp5 den Wnt-Signalweg negativ regulieren (Haÿ et al., 2009). Eine Interaktion zwischen Pcdh γ C3 und Lrp3 ist auf Grund der o.g. Ergebnisse ebenfalls denkbar, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Es fallen die ungleichen Effekte des KO in den untersuchten Zelllinien auf, welche auf die unterschiedlichen Ursprungsregionen der Zelllinien zurückzuführen sein könnten. Ein Wegfall des Einflusses von Pcdh γ C3 könnte zu einer Hochregulierung des Rezeptors und möglicherweise zu einer höheren Empfindlichkeit für Wnt-Liganden führen. Der Einfluss von Wnt-Liganden und die weitere nachgeschaltete Regulation wurden in dieser Arbeit nicht untersucht und könnten Gegenstand weiterer Forschung sein.

Die Kinase mTOR ist u.a. beteiligt an der Regulation von Proteinsynthese, Fettstoffwechsel, Glycogenese, Angiogenese, Inflammation, Apoptose und Autophagie (Harries et al., 2012). Dallosso et al. zeigten einen Einfluss von Pcdh γ C3 auf die mTOR Aktivität. Im kolorektalen Karzinom könnte Pcdh γ C3 als Tumorsuppressor wirken, da es von allen Pcdhs in normalen Kolonepithelien die höchste Expression zeigt, wohingegen

es in Tumorzellen zu einer Hypermethylierung und damit Inaktivierung von PcdhyC3 kommt. Diese Inaktivierung ist mit einem erhöhten mTOR Level, sowie einer reduzierten Apoptose-Rate assoziiert. Bei Überexpression von PcdhyC3 konnten Dalosso et al. verminderte mTOR Proteinlevel nachweisen (Dalosso et al., 2012).

Der KO von PcdhyC3 scheint an den Endothelzellen den gegenteiligen Effekt zu haben, denn in beiden KO-Zelllinien können signifikant verminderte mTOR Level nachgewiesen werden. Die Regulation von mTOR durch PcdhyC3 unterliegt in verschiedenen Geweben womöglich unterschiedlichen Mechanismen.

Wird eine Zelle Mangelzuständen ausgesetzt, kommt es zu einer Inhibition von mTOR, was zur Aktivierung von Autophagie führt. Als Schlüsselprotein der Autophagie fungiert Sequestosom-1 (p62/Sqstm-1). Das Level an p62/Sqstm-1 wird über den Prozess der Autophagie reguliert. Ein erhöhtes Level an Autophagie führt zu Herunterregulation von p62/Sqstm (Islam et al., 2018; Jung et al., 2010). In Kongruenz zu diesen bekannten Mechanismen zeigt sich in den KO-Zelllinien Sqstm-1 auf mRNA und Proteinebene vermindert. Der Verlust von PcdhyC3 in Endothelzellen des Gehirns könnte ähnliche Effekte, wie eine Minderversorgung haben. Genauere Untersuchungen hierzu sind für das Verständnis der Regulation nötig.

5 Zusammenfassung

Protocadherine spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems und sind an Prozessen der Zellmigration und -differenzierung, sowie der Hemmung von Zellwachstum beteiligt.

Um die Funktion und Regulation von Protocadherin gamma C3 (PcdhyC3) an mikrovaskulären Endothelzellen des Großhirns (cEND) und des Kleinhirns (cerebEND) zu untersuchen, wurden die PcdhyC3-Knock-out (KO) Zelllinien mit der CRISPR/Cas9 Methode etabliert.

Der KO führt zu verminderten Barriereigenschaften der Blut-Hirn-Schranke (BHS), was sich in einer erhöhten Permeabilität für Fluoreszein und einem verringerten transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) widerspiegelt. Der KO von PcdhyC3 führt zu einer veränderten Expression von Tight-Junction (TJ)-Proteinen. Occludin wird in beiden KO-Zelllinien vermindert exprimiert, während Claudin-5, das hauptsächlich zur Bildung und Aufrechterhaltung der TJ beiträgt, in den KO-Zellen interessanterweise stärker exprimiert wird als in den Wildtyp-Zellen. ZO-1 wird auch nach dem KO stärker exprimiert, was nach bisherigen Erkenntnissen zu einer Erhöhung der Barriereigenschaften führen sollte. Es zeigen sich, z.B. für Claudin-3 und VE-Cadherin, teilweise unterschiedliche Regulationen auf mRNA und Proteinebene und gegenläufige Effekte in den beiden untersuchten Zelllinien. Eine weitergehende genauere Untersuchung möglicher posttranskriptionellen Einflüsse und hinsichtlich der Unterschiede zwischen den aus verschiedenen Hirnregionen stammenden Zelllinien erscheint sinnvoll.

Beide KO-Zelllinien zeigen im Wundheilungsansatz erhöhte Wachstumsraten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Die Signalwege Wnt und mTOR sind an der Regulation von Zellproliferation und -migration beteiligt. Der KO von PcdhyC3 führt in den untersuchten Endothelzellen zu einer veränderten mRNA-Expression von Komponenten der Wnt- und mTOR-Signalwege. Diese mRNA-Regulation legt nahe, dass PcdhyC3 beide Signalwege in Endothelzellen beeinflussen kann. Die Fähigkeit der Endothelzellen zur Gefäßformation wurde in einem Tube Formation Assay untersucht und wird durch den KO von PcdhyC3 nicht signifikant beeinflusst. Bei der Untersuchung des

Adhäsionsverhaltens an Komponenten der Extrazellulärmatrix wird nach dem KO von Pcdh γ C3 tendenziell eine stärkere Bindung gefunden, die jedoch nur für die Komponente Laminin statistisch relevant nachgewiesen werden kann.

Zusammengefasst führt der KO von Pcdh γ C3 an cerebEND und cEND Zellen zu einer Reihe von Veränderungen der Zellfunktion. Für ein genaueres Verständnis dieser Veränderungen und der klinischen Relevanz veränderter Pcdh γ C3-Spiegel, z.B. im Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen und Störungen der Integrität der BHS, sind weitere Untersuchungen notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- Aamar, E., & Dawid, I. B. (2008). Protocadherin-18a has a role in cell adhesion, behavior and migration in zebrafish development. *Dev Biol*, *318*(2), 335-346. doi:10.1016/j.ydbio.2008.03.040
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, *37*(1), 13-25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Abbott, N. J., Ronnback, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, *7*(1), 41-53. doi:10.1038/nrn1824
- Blecharz, K. G., Drenckhahn, D., & Förster, C. Y. (2008). Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, *28*(6), 1139-1149. doi:10.1038/jcbfm.2008.2
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading)*, *151*(Pt 8), 2551-2561. doi:10.1099/mic.0.28048-0
- Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., . . . van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, *321*(5891), 960-964. doi:10.1126/science.1159689
- Burek, M., Arias-Loza, P. A., Roewer, N., & Förster, C. Y. (2010). Claudin-5 as a novel estrogen target in vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *30*(2), 298-304. doi:10.1161/atvbaha.109.197582
- Burek, M., & Förster, C. Y. (2009). Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter. *Mol Cell Endocrinol*, *298*(1-2), 19-24. doi:10.1016/j.mce.2008.09.041
- Burek, M., Salvador, E., & Forster, C. Y. (2012). Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model. *J Vis Exp*(66), e4022. doi:10.3791/4022
- Burridge, K., & Guilluy, C. (2016). Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res*, *343*(1), 14-20. doi:10.1016/j.yexcr.2015.10.029
- Canel, M., Serrels, A., Frame, M. C., & Brunton, V. G. (2013). E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci*, *126*(Pt 2), 393-401. doi:10.1242/jcs.100115
- Castro Dias, M., Coisne, C., Baden, P., Enzmann, G., Garrett, L., Becker, L., . . . Engelhardt, B. (2019). Claudin-12 is not required for blood-brain barrier tight junction function. *Fluids Barriers CNS*, *16*(1), 30. doi:10.1186/s12987-019-0150-9
- Cavallaro, U., Liebner, S., & Dejana, E. (2006). Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res*, *312*(5), 659-667. doi:10.1016/j.yexcr.2005.09.019
- Chen, H. F., Ma, R. R., He, J. Y., Zhang, H., Liu, X. L., Guo, X. Y., & Gao, P. (2017). Protocadherin 7 inhibits cell migration and invasion through E-cadherin in gastric cancer. *Tumour Biol*, *39*(4), 1010428317697551. doi:10.1177/1010428317697551
- Chen, J., Lu, Y., Meng, S., Han, M. H., Lin, C., & Wang, X. (2009). alpha- and gamma-Protocadherins negatively regulate PYK2. *J Biol Chem*, *284*(5), 2880-2890. doi:10.1074/jbc.M807417200
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, *149*(6), 1192-1205. doi:10.1016/j.cell.2012.05.012
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., . . . Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, *339*(6121), 819-823. doi:10.1126/science.1231143
- Dallosso, A. R., Hancock, A. L., Szemes, M., Moorwood, K., Chilukamarri, L., Tsai, H. H., . . . Malik, K. (2009). Frequent long-range epigenetic silencing of protocadherin gene

- clusters on chromosome 5q31 in Wilms' tumor. *PLoS Genet*, 5(11), e1000745. doi:10.1371/journal.pgen.1000745
- Dalosso, A. R., Oster, B., Greenhough, A., Thorsen, K., Curry, T. J., Owen, C., . . . Malik, K. (2012). Long-range epigenetic silencing of chromosome 5q31 protocadherins is involved in early and late stages of colorectal tumorigenesis through modulation of oncogenic pathways. *Oncogene*, 31(40), 4409-4419. doi:10.1038/onc.2011.609
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., . . . Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607. doi:10.1038/nature09886
- Dilling, C., Roewer, N., Forster, C. Y., & Burek, M. (2017). Multiple protocadherins are expressed in brain microvascular endothelial cells and might play a role in tight junction protein regulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37(10), 3391-3400. doi:10.1177/0271678x16688706
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. doi:10.1126/science.1258096
- Fakhr, E., Zare, F., & Teimoori-Toolabi, L. (2016). Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Ther*, 23(4), 73-82. doi:10.1038/cgt.2016.4
- Fanning, A. S., & Anderson, J. M. (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 1165, 113-120. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x
- Forster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J., & Drenckhahn, D. (2005). Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol*, 565(Pt 2), 475-486. doi:10.1113/jphysiol.2005.084038
- Forster, C., Waschke, J., Burek, M., Leers, J., & Drenckhahn, D. (2006). Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific. *J Physiol*, 573(Pt 2), 413-425. doi:10.1113/jphysiol.2006.106385
- Frank, M., & Kemler, R. (2002). Protocadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(5), 557-562. doi:[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00365-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00365-4)
- Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., . . . Chiba, H. (2008). Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell*, 19(5), 1912-1921. doi:10.1091/mbc.e07-09-0973
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123(6 Pt 2), 1777-1788. doi:10.1083/jcb.123.6.1777
- Garneau, J. E., Dupuis, M., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., . . . Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71. doi:10.1038/nature09523
- Garrett, A. M., Schreiner, D., Lobas, M. A., & Weiner, J. A. (2012). gamma-protocadherins control cortical dendrite arborization by regulating the activity of a FAK/PKC/MARCKS signaling pathway. *Neuron*, 74(2), 269-276. doi:10.1016/j.neuron.2012.01.028
- Garrett, A. M., & Weiner, J. A. (2009). Control of CNS synapse development by {gamma}-protocadherin-mediated astrocyte-neuron contact. *J Neurosci*, 29(38), 11723-11731. doi:10.1523/jneurosci.2818-09.2009
- Giannotta, M., Trani, M., & Dejana, E. (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*, 26(5), 441-454. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.020

- Haÿ, E., Laplantine, E., Geoffroy, V., Frain, M., Kohler, T., Müller, R., & Marie, P. J. (2009). N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. *Mol Cell Biol*, *29*(4), 953-964. doi:10.1128/mcb.00349-08
- Harke, N., Leers, J., Kietz, S., Drenckhahn, D., & Förster, C. (2008). Glucocorticoids regulate the human occludin gene through a single imperfect palindromic glucocorticoid response element. *Mol Cell Endocrinol*, *295*(1-2), 39-47. doi:10.1016/j.mce.2008.08.011
- Harries, L. W., Fellows, A. D., Pilling, L. C., Hernandez, D., Singleton, A., Bandinelli, S., . . . Melzer, D. (2012). Advancing age is associated with gene expression changes resembling mTOR inhibition: evidence from two human populations. *Mech Ageing Dev*, *133*(8), 556-562. doi:10.1016/j.mad.2012.07.003
- Haseloff, R. F., Dithmer, S., Winkler, L., Wolburg, H., & Blasig, I. E. (2015). Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol*, *38*, 16-25. doi:10.1016/j.semcdb.2014.11.004
- Helms, H. C., Abbott, N. J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P. O., Deli, M. A., . . . Brodin, B. (2016). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab*, *36*(5), 862-890. doi:10.1177/0271678X16630991
- Honda, M., Nakagawa, S., Hayashi, K., Kitagawa, N., Tsutsumi, K., Nagata, I., & Niwa, M. (2006). Adrenomedullin improves the blood-brain barrier function through the expression of claudin-5. *Cell Mol Neurobiol*, *26*(2), 109-118. doi:10.1007/s10571-006-9028-x
- Hua, H., Kong, Q., Zhang, H., Wang, J., Luo, T., & Jiang, Y. (2019). Targeting mTOR for cancer therapy. *J Hematol Oncol*, *12*(1), 71. doi:10.1186/s13045-019-0754-1
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, *169*(12), 5429-5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
- Islam, M. A., Sooro, M. A., & Zhang, P. (2018). Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*, *19*(5). doi:10.3390/ijms19051405
- Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, *43*(6), 1565-1575. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, *2*, e00471. doi:10.7554/eLife.00471
- Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, *584*(7), 1287-1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017
- Kanasty, R., Dorkin, J. R., Vegas, A., & Anderson, D. (2013). Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat Mater*, *12*(11), 967-977. doi:10.1038/nmat3765
- Kim, S.-Y., Yasuda, S., Tanaka, H., Yamagata, K., & Kim, H. (2011). Non-clustered protocadherin. *Cell Adhesion & Migration*, *5*(2), 97-105. doi:10.4161/cam.5.2.14374
- Krishna, K., & Redies, C. (2009). Expression of cadherin superfamily genes in brain vascular development. *J Cereb Blood Flow Metab*, *29*(2), 224-229. doi:10.1038/jcbfm.2008.123
- Kuroda, H., Inui, M., Sugimoto, K., Hayata, T., & Asashima, M. (2002). Axial protocadherin is a mediator of prenotochord cell sorting in Xenopus. *Dev Biol*, *244*(2), 267-277. doi:10.1006/dbio.2002.0589

- Li, P., & Qin, C. (2015). Elevated circulating VE-cadherin+CD144+endothelial microparticles in ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Res*, *135*(2), 375-381. doi:10.1016/j.thromres.2014.12.006
- Li, V. S., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., . . . Clevers, H. (2012). Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*, *149*(6), 1245-1256. doi:10.1016/j.cell.2012.05.002
- Li, Y., Yang, Z. S., Song, J. J., Liu, Q., & Chen, J. B. (2012). Protocadherin-10 is involved in angiogenesis and methylation correlated with multiple myeloma. *Int J Mol Med*, *29*(4), 704-710. doi:10.3892/ijmm.2012.880
- LiCausi, F., & Hartman, N. W. (2018). Role of mTOR Complexes in Neurogenesis. *Int J Mol Sci*, *19*(5). doi:10.3390/ijms19051544
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C. J., . . . Dejana, E. (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*, *183*(3), 409-417. doi:10.1083/jcb.200806024
- Lin, C., Meng, S., Zhu, T., & Wang, X. (2010). PDCD10/CCM3 acts downstream of $\{\gamma\}$ -protocadherins to regulate neuronal survival. *J Biol Chem*, *285*(53), 41675-41685. doi:10.1074/jbc.M110.179895
- Lin, Y., Ge, X., Zhang, X., Wu, Z., Liu, K., Lin, F., . . . Li, J. (2018). Protocadherin-8 promotes invasion and metastasis via laminin subunit γ 2 in gastric cancer. *Cancer Sci*, *109*(3), 732-740. doi:10.1111/cas.13502
- Mah, K. M., Houston, D. W., & Weiner, J. A. (2016). The gamma-Protocadherin-C3 isoform inhibits canonical Wnt signalling by binding to and stabilizing Axin1 at the membrane. *Sci Rep*, *6*, 31665. doi:10.1038/srep31665
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, *322*(5909), 1843-1845. doi:10.1126/science.1165771
- Medina, A., Swain, R. K., Kuerner, K. M., & Steinbeisser, H. (2004). Xenopus paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *Embo j*, *23*(16), 3249-3258. doi:10.1038/sj.emboj.7600329
- Milatz, S., Krug, S. M., Rosenthal, R., Günzel, D., Müller, D., Schulzke, J. D., . . . Fromm, M. (2010). Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta*, *1798*(11), 2048-2057. doi:10.1016/j.bbamem.2010.07.014
- Minagar, A., & Alexander, J. S. (2003). Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler*, *9*(6), 540-549. doi:10.1191/1352458503ms965oa
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, *60*(2), 174-182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3
- Molumby, M. J., Keeler, A. B., & Weiner, J. A. (2016). Homophilic Protocadherin Cell-Cell Interactions Promote Dendrite Complexity. *Cell Rep*, *15*(5), 1037-1050. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.093
- Morishita, H., & Yagi, T. (2007). Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, *19*(5), 584-592. doi:10.1016/j.ceb.2007.09.006
- Mukai, S., Oue, N., Oshima, T., Imai, T., Sekino, Y., Honma, R., . . . Yasui, W. (2017). Overexpression of PCDHB9 promotes peritoneal metastasis and correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer. *J Pathol*, *243*(1), 100-110. doi:10.1002/path.4931
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, A., . . . Niwa, M. (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells,

- pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*, 54(3-4), 253-263.
doi:10.1016/j.neuint.2008.12.002
- Okazaki, N., Takahashi, N., Kojima, S., Masuho, Y., & Koga, H. (2002). Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis*, 23(7), 1139-1148.
- Pancho, A., Aerts, T., Mitsogiannis, M. D., & Seuntjens, E. (2020). Protocadherins at the Crossroad of Signaling Pathways. *Front Mol Neurosci*, 13, 117.
doi:10.3389/fnmol.2020.00117
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading)*, 151(Pt 3), 653-663.
doi:10.1099/mic.0.27437-0
- Prasad, T., Wang, X., Gray, P. A., & Weiner, J. A. (2008). A differential developmental pattern of spinal interneuron apoptosis during synaptogenesis: insights from genetic analyses of the protocadherin-gamma gene cluster. *Development*, 135(24), 4153-4164.
doi:10.1242/dev.026807
- Prasad, T., & Weiner, J. A. (2011). Direct and Indirect Regulation of Spinal Cord Ia Afferent Terminal Formation by the gamma-Protocadherins. *Front Mol Neurosci*, 4, 54.
doi:10.3389/fnmol.2011.00054
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11), 2281-2308.
doi:10.1038/nprot.2013.143
- Ruggieri, V., Agriesti, F., Tataranni, T., Perris, R., & Mangieri, D. (2017). Paving the path for invasion: The polyedric role of LASP1 in cancer. *Tumour Biol*, 39(6), 1010428317705757. doi:10.1177/1010428317705757
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., . . . Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*, 11(12), 4131-4142. doi:10.1091/mbc.11.12.4131
- Sano, K., Tanihara, H., Heimark, R. L., & al, e. (1993). Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *The EMBO Journal*, 12(6), 2249-2256.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 39(21), 9275-9282. doi:10.1093/nar/gkr606
- Silwedel, C., & Forster, C. (2006). Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli. *J Neuroimmunol*, 179(1-2), 37-45.
doi:10.1016/j.jneuroim.2006.06.019
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*, 14(3), 133-150. doi:10.1038/nrneurol.2017.188
- Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., . . . Dejana, E. (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol*, 10(8), 923-934.
doi:10.1038/ncb1752
- Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102(4), 639-655.
- Teti, A. (1992). Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol*, 2(10 Suppl), S83-87.
- Theocharis, A. D., Manou, D., & Karamanos, N. K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *Febs j*, 286(15), 2830-2869. doi:10.1111/febs.14818

- Tian, P., Wang, J., Shen, X., Rey, J. F., Yuan, Q., & Yan, Y. (2017). Fundamental CRISPR-Cas9 tools and current applications in microbial systems. *Synth Syst Biotechnol*, 2(3), 219-225. doi:10.1016/j.synbio.2017.08.006
- Titchenell, P. M., Lin, C. M., Keil, J. M., Sundstrom, J. M., Smith, C. D., & Antonetti, D. A. (2012). Novel atypical PKC inhibitors prevent vascular endothelial growth factor-induced blood-retinal barrier dysfunction. *Biochem J*, 446(3), 455-467. doi:10.1042/bj20111961
- Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., . . . Balda, M. S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol*, 208(6), 821-838. doi:10.1083/jcb.201404140
- Tóth, A., Veszelka, S., Nakagawa, S., Niwa, M., & Deli, M. A. (2011). Patented in vitro blood-brain barrier models in CNS drug discovery. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 6(2), 107-118. doi:10.2174/157488911795933910
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350-4354.
- van der Oost, J., Westra, E. R., Jackson, R. N., & Wiedenheft, B. (2014). Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 12(7), 479-492. doi:10.1038/nrmicro3279
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol*, 36, 157-165. doi:10.1016/j.semcdb.2014.08.011
- Van Itallie, C. M., Fanning, A. S., Holmes, J., & Anderson, J. M. (2010). Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci*, 123(Pt 16), 2844-2852. doi:10.1242/jcs.065581
- Wang, X., Weiner, J. A., Levi, S., Craig, A. M., Bradley, A., & Sanes, J. R. (2002). Gamma protocadherins are required for survival of spinal interneurons. *Neuron*, 36(5), 843-854.
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., & Zhou, B. P. (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*, 13(9), 963-972. doi:10.2174/15680096113136660102
- Watabe, T., Nishihara, A., Mishima, K., Yamashita, J., Shimizu, K., Miyazawa, K., . . . Miyazono, K. (2003). TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Biol*, 163(6), 1303-1311. doi:10.1083/jcb.200305147
- Weiner, J. A., Wang, X., Tapia, J. C., & Sanes, J. R. (2005). Gamma protocadherins are required for synaptic development in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(1), 8-14. doi:10.1073/pnas.0407931101
- Weksler, B. B., Subileau, E. A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., . . . Couraud, P. O. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *Faseb j*, 19(13), 1872-1874. doi:10.1096/fj.04-3458fje
- Wolburg, H., & Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*, 38(6), 323-337.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., . . . Engelhardt, B. (2003). Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*, 105(6), 586-592. doi:10.1007/s00401-003-0688-z
- Wu, Y., & Zhou, B. P. (2010). Snail: More than EMT. *Cell Adh Migr*, 4(2), 199-203. doi:10.4161/cam.4.2.10943

- Yagi, T., & Takeichi, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev*, *14*(10), 1169-1180.
- Ying, J., Li, H., Seng, T. J., Langford, C., Srivastava, G., Tsao, S. W., . . . Tao, Q. (2006). Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation. *Oncogene*, *25*(7), 1070-1080. doi:10.1038/sj.onc.1209154
- Yu, H., Jiang, X., Jiang, L., Zhou, H., Bao, J., Zhu, X., . . . Huang, J. (2020). Protocadherin 8 (PCDH8) Inhibits Proliferation, Migration, Invasion, and Angiogenesis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit*, *26*, e920665. doi:10.12659/msm.920665
- Yu, J. S., Koujak, S., Nagase, S., Li, C. M., Su, T., Wang, X., . . . Parsons, R. (2008). PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer. *Oncogene*, *27*(34), 4657-4665. doi:10.1038/onc.2008.101

I. Abkürzungsverzeichnis

μg	<i>Mikrogramm</i>
μm	<i>Mikrometer</i>
AJ	<i>Adherens Junction</i>
BHS	<i>Blut-Hirn-Schranke</i>
BMEC	<i>Brain Microvascular Endothelial Cells</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
bzw	<i>beziehungsweise</i>
Cas	<i>CRISPR assoziierte Gene</i>
cDNA	<i>Komplementär DNA</i>
cm^2	<i>Quadratcentimeter</i>
Da	<i>Dalton</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
ECM	<i>Extrazellulärmatrix</i>
FCS	<i>Fetales Kälberserum</i>
h	<i>Stunde</i>
HDR	<i>Homology Directed Repair</i>
JAM	<i>Junctionale Adhäsions Moleküle</i>
KO	<i>Knock-out</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
nm	<i>Nanometer</i>
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
Pcdh	<i>Protocadherin</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
RCF	<i>Zentripetalbeschleunigung</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
Snail	<i>Snail Family Zink Finger</i>
TEER	<i>Transendothelialer Elektrischer Widerstand</i>
TGF β	<i>Transformierender Wachstumsfaktor beta</i>
TJ	<i>Tight Junction</i>
u.a.	<i>unter anderem</i>
VCD	<i>Variable Cytoplasmatic Domain</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	<i>Wildtypisch</i>
ZO	<i>Zonula Occludens Protein</i>

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der BHS.	1
Abbildung 2: Molekulare Darstellung des Junktionalen Komplex.	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pcdh-Familie.....	5
Abbildung 4: Wnt-Signalweg.	8
Abbildung 5: CRISPR/Cas9	10
Abbildung 6: Western Blot cerebEND. Nachweis des Knock-out von PcdhyC3	34
Abbildung 7: Western Blot cEND. Nachweis des Knock-out von PcdhyC3	34
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung der cerebEND Zellen.	35
Abbildung 9: Transendothelialer elektrischer Widerstand.	36
Abbildung 10: Permeabilität der PcdhgC3 WT und KO cerebEND Zellen.	36
Abbildung 11: Wundheilungsansatz der PcdhyC3 WT und KO cerebEND Zellen.....	37
Abbildung 12: Auswertung Matrigel.	38
Abbildung 13: Matrigel cEND.	39
Abbildung 14: Adhäsion an die ECM.	40
Abbildung 15: Veränderung der TJ-Proteine in der cerebEND Zelllinie.....	41
Abbildung 16: Veränderung der TJ Proteine in der cEND Zelllinie.....	42
Abbildung 17: Einfluss des KO auf den Wnt-Signalweg in cerebEND.	43
Abbildung 18: Einfluss des KO auf den Wnt-Signalweg in cEND.	44
Abbildung 19: Veränderungen von mTOR und Sqstm1 in cerebEND.	45
Abbildung 20: Veränderungen von mTOR und Sqstm1 in cEND.	46
Abbildung 21: Veränderung mesenchymaler Marker in cerebEND.....	47
Abbildung 22: Veränderung mesenchymaler Marker in cEND.	47

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial	12
Tabelle 2: Geräte	13
Tabelle 3: Verwendete Substanzen	13
Tabelle 4: Primärantikörper Western Blot	15
Tabelle 5: Sekundärantikörper Western Blot	15
Tabelle 6: Sonden real-time PCR	16
Tabelle 7: Verwendete Kits.....	17
Tabelle 8: Primärantikörper Immunhistochemie	27
Tabelle 9: Sekundärantikörper Immunhistochemie.....	27

IV. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Malgorzata Burek, die mir die Möglichkeit zu einer Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe an der Klinik für Anästhesiologie gegeben hat.

Sie stand mir über all die Jahre stets mit Rat und Tat zur Seite, führte mich in die experimentelle Laborarbeit ein, begleitete mich bei Schwierigkeiten und hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen. Sie schenkte mir Vertrauen und Sicherheit, alle Herausforderungen zu meistern. Ohne ihre Förderung und Geduld wäre diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen.

Als nächstes möchte ich mich bei Frau A. Neuhoff, Frau E. Wilken und Frau K. Steinisch bedanken, die mir als Labortechnische Assistentinnen zur Seite standen, mir die Grundlagen und Geheimnisse der Laborarbeit beigebracht haben, mich stets technisch unterstützten und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten. Die Arbeit im Labor war auf Grund ihrer Unterstützung und der angenehmen Arbeitsatmosphäre eine sehr positive Erfahrung.

Ich bedanke mich bei der Hanns-Seidel-Stiftung, die mich während meines Studiums ideell und finanziell unterstützt hat und mir auch so die Freiheit eines Semesters im Labor ermöglicht hat.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für die ausdauernde Unterstützung und Geduld. Die Zeit der Entstehung dieser Arbeit war nicht immer leicht und auch mit einigen Hürden verbunden, bei deren Überwindung ich immer auf ihren Rückhalt zählen konnte. Sie verstanden es immer, mich liebevoll zu motivieren und mir die nötige Kraft und den benötigten Freiraum zur Vollendung der Arbeit zu schenken.

V. Lebenslauf

VI. Veröffentlichungen

Publikationen:

1. Gabbert L, **Dilling C**, Meybohm P, Burek M (2020) Deletion of Protocadherin gamma C3 in brain microvascular endothelial cells induces phenotypic and functional changes. *Front. Pharmacol.* 11:590144. doi: 10.3389/fphar.2020.590144. IF 5,810
2. **Dilling C**, Roewer R, Förster C, Burek M (2017) Multiple protocadherins are expressed in brain microvascular endothelial cells and might play a role in tight junction protein regulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Oct;37(10):3391-3400. IF 6,200

Publizierte Abstracts:

1. Burek M, Gabbert L, **Dilling C**, Roewer N (2019) Protocadherin gamma C3 (PcdhgC3) knockout brain microvascular endothelial cells show reduced barrier properties. *Fluids and Barriers of the CNS* 2019, 16(Suppl1):A123.
2. Gabbert L, **Dilling C**, Sisario D, Soukhoroukov V, Burek M (2017) Protocadherins at the blood-brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS* (2017), 14(Suppl 2):A18.

Kongressteilnahmen:

1. Kaupp V, **Dilling C**, Meybohm P, Burek M (2021) Protocadherin gamma C3 (PCDHGC3) and its role at the blood-brain barrier. 2021 Virtual Symposium "Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers", 22-24.09.2021, digital
2. Gabbert L, **Dilling C**, Roewer N, Burek M (2019) Protocadherin gamma C3 (PcdhgC3) knockout brain microvascular endothelial cells show reduced barrier properties. 13th International Conference on Cerebral Vascular Biology, 25-28.06.2019, Miami, USA
3. Gabbert L, **Dilling C**, Roewer N, Burek M (2018) Protocadherin gamma C3 influences multiple signaling pathways in brain microvascular endothelial cell lines. 21st International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers, 19-21.09.2018, Arad, Rumänien

4. Gabbert L, **Dilling C**, Sisario D, Soukhoroukov V, Burek M (2017) Protocadherins at the blood-brain barrier. 20th International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers, 13-15.09.2017, Krakau, Polen
5. Gabbert L, **Dilling C**, Burek M (2017) Influence of Protocadherin-gamma deletion on inflammatory response in brain microvascular endothelial cells. Else-Kröner-Symposium Translational Immunology-From Target to Therapy IV, 4-5.05.2017, Würzburg
6. **Dilling C**, Förster CY, Burek M (2016) Multiple protocadherins are expressed in brain microvascular endothelial cells and might play a role in tight junction protein regulation. 5th Cold Spring Harbor conference on Blood Brain Barrier, 7-10.12.2016, Cold Spring Harbor, NY, USA