

**Molekulare Ziele der Glukokortikoidbehandlung  
unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen  
in einem *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kinga Grażyna Blecharz

geboren in Krosno, Polen

Würzburg 2009

Eingereicht am: 18.12.2009

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter : Prof. Dr. Carola Förster

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:



*Meinen lieben Eltern*



---

# Inhaltsverzeichnis

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Die Blut-Hirn-Schranke: Aufbau und Funktion

- 2.1.1 Aufbau der Endothelbarriere
- 2.1.2 Adhärenskontakte
- 2.1.3 Occludenskontakte
- 2.1.4 Das Zytoskelett der Endothelzellen
- 2.1.5 Regulation der BHS-Eigenschaften durch Glukokortikoide
- 2.1.6 Molekulare Wirkung von Glukokortikoiden

### 2.2 Multiple Sklerose

- 2.2.1 Pathologie der Krankheit
- 2.2.2 GCs in der MS-Therapie

### 2.3 Nebenwirkungen von GCs

- 2.3.1 GC-induzierte Hypertonie

### 2.4 Ziele der Arbeit

- 2.4.1 GC-Effekte auf die Expression des VE-Cadherins und die Zytoskelett-Reorganisation im *in vitro* Modell der BHS, cEND
- 2.4.2 Wirkung von GCs auf die Barriereigenschaften der cEND-Zellen nach Inkubation in MS-Patientenseren
- 2.4.3 Erniedrigte NO-Produktion als Nebenwirkung des GC-induzierten Abbaus des GRs

## 3. MATERIALIEN UND METHODEN

### 3.1 Materialien

- 3.1.1 Verwendete Substanzen
- 3.1.2 Verwendete Antikörper
- 3.1.3 Verwendete Primer und Sonden

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

- 3.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen)
- 3.2.2 Isolierung der Gesamt-RNA mit Trizol<sup>®</sup> (Roth)
- 3.2.3 Präparation von doppelsträngiger Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen
- 3.2.4 Konzentrationsbestimmung: RNA/ DNA
- 3.2.5 Transformation Hitzeschock-kompetenter Bakterien
- 3.2.6 Anfertigung von Glycerol-Stocks
- 3.2.7 Reverse Transkription
- 3.2.8 Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)
- 3.2.9 Quantitative *real-time* RT-PCR
- 3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

### 3.3 Biochemische Methoden

- 3.3.1 Anfertigung von Zelllysaten
- 3.3.2 Konzentrationsmessung von Proteinen nach Bradford
- 3.3.3 Konzentrationsmessung von Proteinen mit Amidoschwarz
- 3.3.4 SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese und Western-Blot
- 3.3.5 Zytoskelett-Assoziationsassay
- 3.3.6 Anfertigung von Proben für Messungen der eNOS-Aktivität mit <sup>15</sup>N-Arginin

- 3.3.7 Messung von NO mit Diaminofluoreszein-2-Diacetat (DAF-2-DA)
- 3.3.8 Anfertigung von Proben zur Bestimmung des intrazellulären BH<sub>4</sub>-Gehaltes mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)
- 3.3.9 Luciferase-Assay
- 3.3.10 Biolumineszenzmessung
- 3.3.11 Immunzytochemie
- 3.3.12 Markierung des Nucleus mit Propidium-Iodid

### **3.4 Zellkulturmethoden**

- 3.4.1 Präparation und Immortalisierung der Hirnendothelzelllinie cEND
- 3.4.2 Kultivieren von verwendeten Zellen / Zelllinien
- 3.4.3 Transfektion von Zellen
- 3.4.4 Herstellung von Hormon-bereinigtem FCS
- 3.4.5 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes
- 3.4.6 Statistische Analyse

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1 Dexamethason-Wirkung auf die Expression von VE-Cadherin in cEND-Zellen**

- 4.1.1 Dexamethason-induzierte morphologische Veränderungen der cEND-Zellen durch Reorganisation des Zytoskeletts
- 4.1.2 Induktion der VE-Cadherin-Proteinproduktion durch Dexamethason in cEND-Zellen
- 4.1.3 Regulation der VE-Cadherin-Genexpression durch GCs
- 4.1.4 Dexamethason-vermittelte die Transaktivierung des VE-Cadherin-Promoter-Konstruktes in HEK293-Zellen
- 4.1.5 Erhöhung der VE-Cadherin-Promoteraktivität durch Dexamethason-Behandlung in cEND-Zellen
- 4.1.6 Dexamethason-induzierte Verstärkung der VE-Cadherin-Verankerung an das Aktin-Zytoskelett: Zytoskelett-Assoziationsassay

### **4.2 Wirkung von GCs auf die Barriereeigenschaften von MS-Patientenseren-inkubierten cEND-Zellen**

- 4.2.1 Erniedrigung des TERs in cEND-Zellen durch Behandlung mit MS-Patientenseren
- 4.2.2 Keine Wiederherstellung des TERs nach Dexamethason-Behandlung in cEND-Zellen nach Inkubation mit MS-Patientenseren
- 4.2.3 Unterschiedliche Effekte auf die Expression von TJ-Proteinen vermittelt durch die Inkubation mit MS-Patientenseren
- 4.2.4 Geringe Veränderungen der Expression junctionaler Proteine in mit MS-Krankheitsseren inkubierten cEND-Zellen nach Dexamethason-Behandlung
- 4.2.5 Dexamethason-vermittelte Änderungen der Genexpression junctionaler Proteine in mit Patientenseren inkubierten cEND-Zellen
- 4.2.6 Änderungen der MMP-9 und TIMP-1-Genexpression nach Seruminkubation und Dexamethason-Gabe

### **4.3 GC-induzierter proteasomaler Abbau des GRs und die Erniedrigung der NO-Produktion im myokardialen Endothel**

- 4.3.1 Erniedrigung der NO-Produktion durch Dexamethason-Behandlung in MyEND-Zellen
- 4.3.2 Keine Veränderungen der eNOS-Proteinexpression trotz erniedrigter NO-Produktion in MyEND-Zellen nach Dexamethason-Gabe
- 4.3.3 Dexamethason-induzierte Erniedrigung der BH<sub>4</sub>-Produktion durch Herunterregulation der GTPCH-1-Expression in MyEND-Zellen
- 4.3.4 Liganden-abhängige Herunterregulation des GR-Proteins
- 4.3.5 Verstärkung der GC-vermittelten Transkriptionsaktivierung durch Inhibition des Liganden-abhängigen proteasomalen GR-Abbaus
- 4.3.6 Wiederherstellung der GTPCH-1-Genexpression durch Überexpression des ubiquitinylierungsdefekten GRs in GC-behandelten MyEND-Zellen
- 4.3.7 Inhibition des proteasomalen Abbaus des GRs als Grund für die Erhöhung BH<sub>4</sub>-Produktion über das Kontroll-Niveau in Dexamethason-behandelten MyEND-Zellen
- 4.3.8 Einfluss des Liganden-abhängigen GR-Abbaus auf die eNOS-Aktivität

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Einfluss von GCs auf die Eigenschaften der BHS untersucht an cEND-Zellen

- 5.1.1 GC-Therapie bei Schrankenstörungen
- 5.1.2 Dexamethason-induzierte morphologische Veränderungen der cEND-Zellen
- 5.1.3 Regulation der Proteinexpression und der Verstärkung der VE-Cadherin-Assoziation am Aktin-Zytoskelett durch Dexamethason
- 5.1.4 Ausschluss des VE-Cadherins als direktes Zielgen der GC-GR-Wirkung

### 5.2 Einfluss von MS-Seren auf die Barriereigenschaften der cEND-Zellen

- 5.2.1 Negative Auswirkungen auf die Barriereigenschaften der cEND-Zellen nach Krankheitsseren-Inkubation
- 5.2.2 Unterschiedliche Einflüsse von Dexamethason auf die Proteinexpression von Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin in cEND-Zellen nach Inkubation in Patientenseren
- 5.2.3 Dexamethason- vermittelte Herunterregulation der MMP-9-Genexpression in MS-Seren inkubierten cEND-Zellen

### 5.3 GC-induzierter proteasomaler Abbau des GRs und die Erniedrigung der NO-Produktion im myokardialen Endothel

- 5.3.1 Negative Wirkung der Dexamethason-Behandlung auf die NO-Synthese in MyEND-Zellen
- 5.3.2 Verlore Zielgenaktivierung in MyEND-Zellen als Konsequenz des GC-induzierten Abbaus des GRs

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

## 7. ANHANG

- 7.1 Abkürzungsverzeichnis
- 7.2 Chemikalienauflistung
- 7.3 Auflistung von Geräten
- 7.4 Auflistung von Verbrauchsmaterialien
- 7.5 Lebenslauf
- 7.6 Publikationsliste
- 7.7 Danksagung
- 7.8 Ehrenwörtliche Erklärung

## 1. Zusammenfassung

Die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist bei vielen Erkrankungen des humanen zentralen Nervensystems (ZNS) beeinträchtigt. Unter verschiedenen neuroinflammatorischen Bedingungen, wie bei zerebralen Ischämien, Traumata, Hirntumoren oder der Multiplen Sklerose (MS), kommt es zum Verlust der protektiven Schrankenfunktion. Zu den ersten Anzeichen des BHS-Zusammenbruchs zählt der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion: der Adhärens- und Occludenskontakte. Therapeutische Maßnahmen dieser Krankheiten beinhalten Behandlungen mit Glukokortikoiden (GCs), wobei der Mechanismus und die Wirkungsweise dieser Substanzen bis heute nicht vollkommen aufgeklärt sind.

In der zerebralen Hirnendothelzelllinie cEND [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**, 475-486] wurde eine Funktionsverbesserung der Endothelbarriere durch die Expressionerhöhung von Occludin nach GC-Behandlung bereits analysiert. Daraufhin wurden andere Kandidaten des apikalen Junctionssystems gesucht, die positiv auf GC-Gabe ansprechen. Der erste Teil der Arbeit präsentiert den positiven Einfluss der Dexamethason-Behandlung auf die Expression des Adhärenskontakt-Proteins VE- (Vascular-Endothelial) Cadherin in cEND-Zellen. Dabei wurde eine Reorganisation des Zytoskeletts, eine verstärkte Verankerung des VE-Cadherins an das Zytoskelett, sowie eine einhergehende Morphologieänderung der behandelten Zellen beobachtet. Untersuchungen der Transkriptionsaktivierung des VE-Cadherin-Promoters nach Dexamethason-Behandlung, wiesen auf einen indirekten Steroid-Effekt hin, der zu einer Erhöhung der VE-Cadherin-Proteinsynthese führte. Somit sind GCs wichtig für die Proteinsynthese und -organisation beider Kontaktproteinarten: der Adhärens- und Occludenskontakte in mikrovaskulären Hirnendothelzellen.

Die Beeinträchtigung der BHS-Integrität mit Veränderungen der Occludenskontaktexpression zählt zu den frühen Ereignissen bei der Entstehung einer Inflammation des ZNS, wie beispielsweise bei der MS. Im zweiten Teil der Dissertation wurde die Herunterregulation von Occludenskontaktproteinen in der cEND-Zelllinie untersucht. Dabei wurden cEND-Zellen mit Seren von Patienten, die sich in zwei verschiedenen Stadien der MS befanden, behandelt: in der akuten Exazerbationsphase oder der Remissionsphase, und auf die Protein- und Genexpression mit und ohne Dexamethasons-Behandlung untersucht. Es konnte ein negativer Effekt auf den Barrierewiderstand und die Occludenskontaktexpression, sowie eine erhöhte MMP-9-Genexpression nach Krankheitssereninkubation gezeigt werden. Die

Dexamethason-Behandlung ergab eine geringe, aber keine vollständige Rekonstitution der Barrierefunktion. Anhand dieser Studie konnte jedoch erstmals eine Erniedrigung der Protein- und mRNA-Synthese von Claudin-5 und Occludin in Remissionspatientenseren inkubierten cEND-Zellen demonstriert werden. Somit könnten diese Erkenntnisse zur Prädiagnose einer bevorstehenden Exazerbationsphase der MS eingesetzt werden.

Eine Langzeit-GC-Behandlung führt zu zahlreichen Nebenwirkungen, u. a. zum Bluthochdruck, welcher aufgrund einer eingeschränkten Produktion des vasodilatativen Faktors Stickstoffmonoxid, NO, im myokardialen Endothel hervorgerufen wird. Veränderungen in der NO-Produktion, wie auch anderer Faktoren der NO-Signalkaskade in der myokardialen Endothelzelllinie MyEND unter Einfluss von Dexamethason standen im Zentrum des dritten Teils dieser Arbeit. Während keine Veränderungen in der Expression der endothelialen NO-Synthase, eNOS, nach GC-Behandlung gezeigt werden konnten, wurden repressive Einflüsse von Dexamethason auf die Enzymaktivität der eNOS in MyEND-Zellen untersucht. GC-Gabe führte zur einer herabgesetzten Synthese des essenziellen Co-Faktors der eNOS, des Tetrahydrobiopterins, BH<sub>4</sub>, sowie zu einer Herunterregulation der GTP-Cyclohydrolase-1 (GTPCH-1), des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der BH<sub>4</sub>-Produktion. Im Gegensatz zu bisherigen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, konnte in der vorliegenden Studie belegt werden, dass die Herunterregulation der GTPCH-1 mRNA-Level auf den Liganden-abhängigen proteasomalen Abbau des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) zurückzuführen ist. Das 26S-Proteasom moduliert die GR-abhängige Genexpression durch Kontrolle des Umsatzes und des Recyclings des Rezeptors selbst, wodurch eine regulierte Hormonresponsivität gewährleistet wird. Die Aufhebung des Liganden-abhängigen Abbaus des GR-Proteins durch gezielte Proteasominhibition, sowie durch eine Überexpression des ubiquitinylierungsdefekten GR-Konstruktes, K426A-GR, in Dexamethason-behandelten MyEND-Zellen resultierte in einer Erhöhung der GTPCH-1-Expression, sowie einer gesteigerten eNOS-Aktivität. Die hier beschriebenen Ergebnisse erlauben einen innovativen Einblick in die Erkenntnisse zur GC-vermittelten Hypertonie.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass GC-Behandlungen von mikrovaskulären Hirnendothelzellen zu einer Stabilisierung der Endothelbarriere führen. Unter pathologischen Bedingungen, wie der MS, wird der protektive GC-Effekt durch andere Faktoren beeinträchtigt

## Summary

The integrity of the blood-brain barrier (BBB) is compromised in many disorders of the human central nervous system. A breakdown of the blood-brain barrier under conditions of neuroinflammation and cerebral ischemia, but also traumas, brain tumours and multiple Sclerosis (MS), leads to loss of the protective function of the barrier. In its breakdown one of the first observable changes is the loss of intercellular adhesion and concomitant an increase of permeability. Although therapeutic strategies for diseases with impaired BBB function include the treatment with glucocorticoids (GCs) but the mechanism explaining GC action still remains unclear.

Recent studies showed the influence of GCs on the expression of the tight junction protein occludin in the brain capillary endothelial cell line cEND, contributing to improvement in endothelial barrier functions. In this study, we investigated GC effects on the expression of the adherens junction proteins VE- (vascular-endothelial) cadherin. It was possible to show a positive influence of dexamethasone administration on VE-cadherin protein levels as well as a rearrangement and the anchorage of VE-cadherin protein to the cytoskeleton. Investigation of transcriptional activation of the VE-cadherin promoter by dexamethasone, however, did not point to direct glucocorticoid-mediated VE-cadherin gene induction. But it rather suggested indirect steroid effects leading to increased VE-cadherin protein synthesis. We thus propose that glucocorticoid effects on VE-cadherin protein synthesis and organization are important for the formation of both adherens and tight junctions, and for improved barrier properties in microvascular brain endothelial cells.

Abnormalities in the expression profile of tight junctions in cerebral endothelium constituting barrier functions occur early during neuroinflammation, as Multiple Sclerosis (MS). In the second part of this study, the disruption of tight junction proteins in the cEND cell line was analysed. cEND cells were incubated with sera from patients, which were in two different states of MS: in the acute exacerbation or the remission phase of the disease, and protein levels and gene expression of claudin-5, occludin and VE-cadherin with and without dexamethasone treatment were investigated. There arised a downregulation of claudin-5 and occludin on protein and mRNA levels and an accompanying upregulation of MMP-9 activity revealed. A minor reconstitution of barrier functions related to dexamethasone treatment could be shown. However, no reconstitution could be detected to the control level. Especially, observations in downregulation of claudin-5 and occludin in cEND cells incubated with sera from patients in remission phase of MS could not be demonstrated

before. Thus, this finding is proposed to be a new useful prediagnostic tool for an early detection of upcoming exacerbation phase.

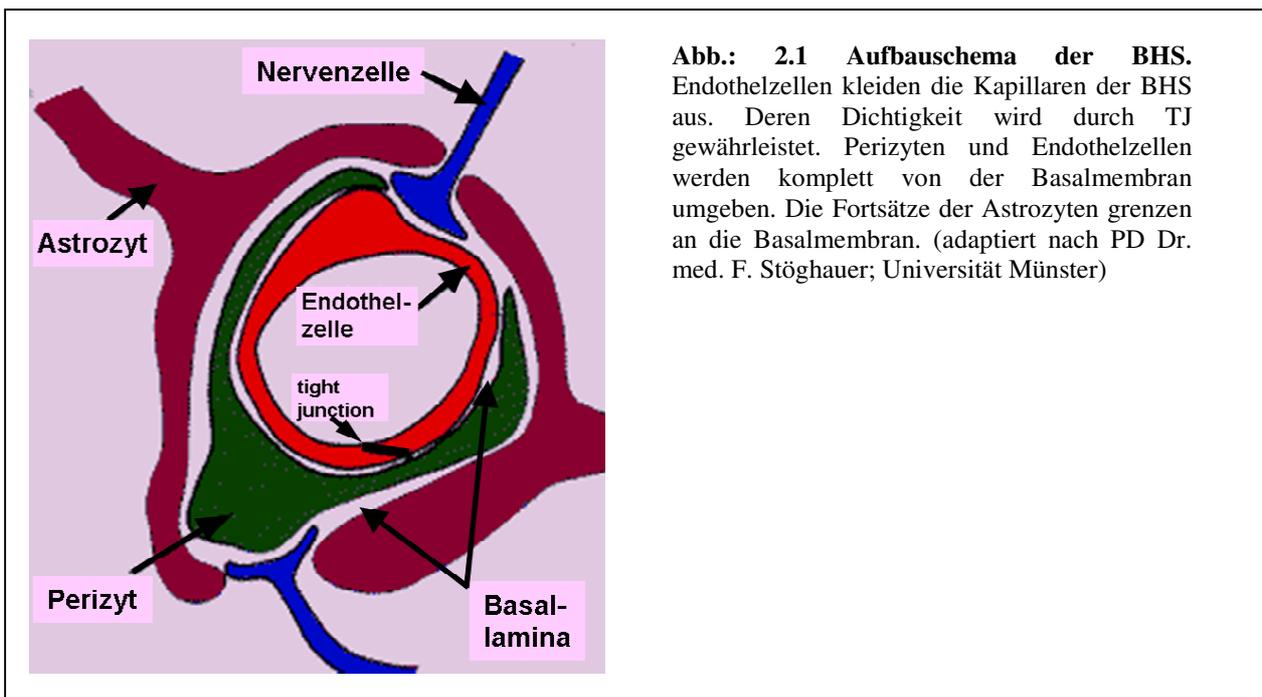
One of the numerous side effects of GC therapy is hypertension arising from reduced release of the endothelium-derived vasodilator nitric oxide, NO, being in the centre of the third part of this study. While effects of dexamethasone on endothelial NO synthase, eNOS, expression itself could not be demonstrated, repressive effects of dexamethasone on eNOS enzyme activity were shown in the myocardial endothelial cell line MyEND. Following GC-treatment we observed decreased levels of the essential cofactor of eNOS, tetrahydrobiopterin, BH<sub>4</sub>. We also determined a downregulation of GTP cyclohydrolase-1, GTPCH-1, the key enzyme of BH<sub>4</sub> synthesis. In contrast to recent data from other groups, we postulate that this downregulation of GTPCH-1 mRNA levels is not a direct downregulation effect of GC action. But it is rather a consequence of the ligand-dependent proteasomal degradation of the GC receptor, GR. The 26S-proteasome modulates GR-dependent gene transcription by regulation of its turnover and the recycling of receptor/transcriptional DNA complexes, thereby ensuring continued regulation of hormone responsivity. In this work, the inhibition of proteasome-mediated proteolysis of GR by using inhibitors of the 26S-proteasome, or overexpression of a point-mutated, ubiquitination-defective GR construct, K426A-GR, which attenuates endothelial GC responsivity, was demonstrated. The abrogation of ligand-dependent degradation of GR protein resulted in increased levels of GTPCH-1 hence expression, leading to an increased eNOS-activity. These results provide a new insight into the research of GC-induced hypertension.

Taken together, these data demonstrate, that GC treatment in microvascular brain endothelial cells leads to barrier stabilisation, but under conditions of MS there are many other factors like cytokines and chemokines, which abrogate this positive action.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Blut-Hirn-Schranke: Aufbau und Funktion.

Das Gehirn erfüllt als Hauptbestandteil des Zentralen Nervensystems (ZNS) einzigartige Funktionen. Deswegen muss die Aufrechterhaltung der Homöostase, eine konstante Versorgung mit Nährstoffen und ein besonderer Schutz vor körperfremden Substanzen, sowie vor schädigenden Umwelteinflüssen gewährleistet sein. Die Regulation des Substratflusses obliegt der Blut-Hirn-Schranke (BHS), einer physiologischen Diffusionsbarriere, essenziell für die Gewährleistung einer strikten Homöostase und für die Funktionen des ZNS (Pardridge, 1988; Hatashita & Hoff, 1990; McDonald, 1994). Die BHS ist aus vier Schichten aufgebaut: dem Endothel der Kapillaren, den Perizyten, der diese beiden Zelltypen umgebenden Basalmembran, sowie den Fortsätzen der Astrozyten. Alle Komponenten der BHS sind gleichermaßen wichtig für ihre normale Funktion und Stabilität.



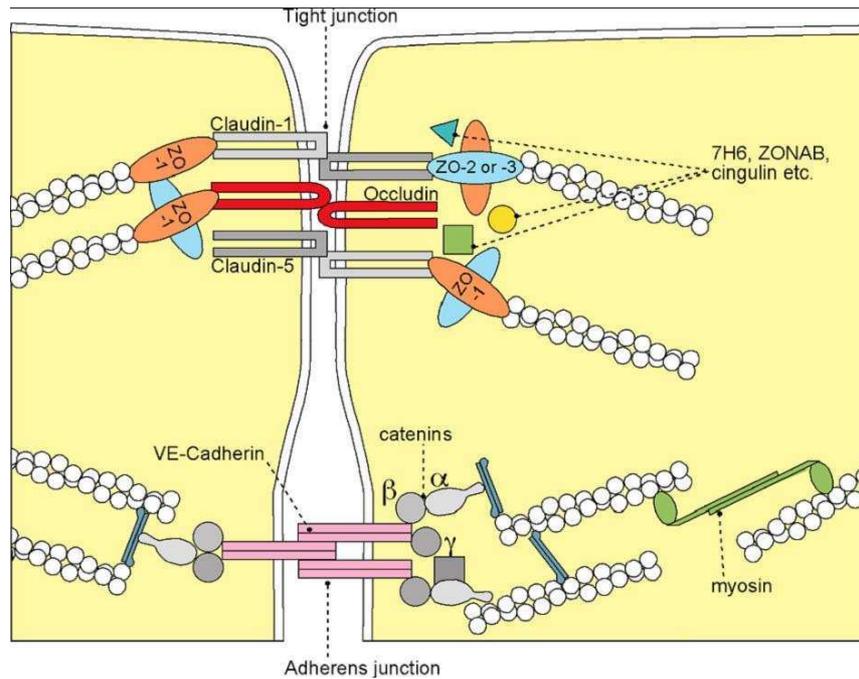
Die eigentliche Barrierefunktion erfüllen jedoch die Endothelzellen mit ihren Adhärenskontakten (engl. *Adherens Junctions*, AJs), sowie den Occludenskontakten (engl. *Tight Junctions*, TJs) (Risau & Wolburg, 1990). So wird eine Barriere gegen alle sonst kapillargängigen Stoffe gebildet, die am Übertritt in das besonders empfindliche Hirngewebe gehindert oder in Abhängigkeit von der physikalisch-chemischen Beschaffenheit des Stoffes auch selektiv durchgelassen werden. Die TJ der Endothelzellen begrenzen den parazellulären Fluss von hydrophilen Molekülen durch die BHS. Im Gegensatz dazu diffundieren kleine

lipophile Substanzen, wie O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>, entlang ihres Konzentrationsgradienten frei durch die Plasmamembranen (Grieb *et al.*, 1985). Im Übrigen findet ein aktiver, Energieverbrauchender Transport statt. Mit Hilfe spezieller, transzellulärer Transporter gelangen Nährstoffe, wie Glukose (GLUT-1) und Aminosäuren (z.B. L-Sytem, A-System) ins Gehirn (Dermietzel *et al.*, 1992; McAllister *et al.*, 2001; Elfeber *et al.*, 2004). Gleichzeitig ermöglicht Rezeptor-vermittelte Endozytose das Eindringen von größeren Molekülen (Pardridge *et al.*, 1985; Pardridge, 1986; Zhang & Pardridge, 2001). Zudem wird die Permeabilität des BHS-Endothels auch durch Astrozyten kontrolliert. Ihre Fortsätze liegen eng aneinandergereiht an der Basalmembran der Hirnkapillaren und stehen in unmittelbarer Wechselwirkung mit dem Endothel (Neuhaus *et al.*, 1991). Astrozyten schütten eine Reihe Botenstoffe aus, die die Durchlässigkeit der Endothelzellen im Sekunden- oder im Minutenbereich verändern können (Liebner *et al.*, 2000; Abbott, 2002). Umgekehrt sezernieren Endothelzellen ebenfalls Faktoren, die die Differenzierung der Astrozyten anregen (wie den Leukämie-inhibierenden Faktor, LIF) (Abbott, 2002). Die Plasmamembran der Astrozytenfortsätze grenzt an die Basalmembran, die die Endothelzellen der BHS in einer Doppelschicht vollkommen umgibt (M. Pavelka und J. Roth: *Funktionelle Ultrastruktur*. Verlag Springer, S. 234–235. ISBN 3-211-83563-6). Die Basalmembran ist ca. 40-50 nm dick und besteht im Wesentlichen aus Kollagen IV, Heparinsulfat-Proteoglycan, Laminin, Fibronectin und weiteren extrazellulären Matrixproteinen (Hawkins & Davis, 2005; Newton, 2006).

### **2.1.1 Aufbau der Endothelbarriere**

Von großer Bedeutung unter den die Endothelbarriere gewährleistenden Zell-Zell-Kontakten sind die Adhärens- und Occludenskontakte, die beide als schmale, eine Zelle vollkommen umgebende Bänder vorkommen (Dejana, 2004). Als Brücke zwischen Endothel und der extrazellulären Matrix (ECM) dienen Zell-Matrix-Kontakte, welche ebenfalls die Barriereigenschaften des Endothels beeinflussen. Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören die Integrine (Mehta & Malik, 2006).

Alle junktionalen Adhäsionsproteine binden über ihren zytoplasmatischen Anteil, über sog. Adapterproteine, an das Zytoskelett (Lampugnani *et al.*, 1995; Bazzoni & Dejana, 2004). Das Aktinzytoskelett spielt also gemeinsam mit den Adhäsionsmolekülen, über die reine Verankerungsfunktion hinausgehend, eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und der Regulation der Endothelbarriere (Mehta & Malik, 2006; Vandenbroucke *et al.*, 2008).



**Abb.: 2.1.1 Endotheliale Zell-Zell-Kontakte.** Adhärens- und Occludenskontakte bilden die Endothelbarriere aus. VE-Cadherin wird intrazellulär über Adaptermoleküle ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Catenin,  $\alpha$ -Aktinin) am Aktinomyosin-Zytoskelett gekoppelt. Claudin-1, -3, -5 und Occludin sind über ZO-1-3, Cingulin an das Aktin-Zytoskelett gebunden. Quelle: modifiziert nach (Forster, 2008).

## 2.1.2 Adhärenskontakte

Der Begriff Adhärenskontakt (AJ) fasst eine Gruppe von Zell-Zell-Kontaktmolekülen zusammen, zu denen *Zonulae adhaerentes* (Gürteldesmosomen), *Fasciae adhaerentes* (Streifendesmosomen) und *Puncta adhaerentes* (Punkt-desmosomen) gehören (Drenckhahn, 2003). Die typischen AJ kommen im Epithel- und Endothelgewebe vor, wo sie direkt unterhalb der Occludenskontakte einen Adhäsionsgürtel bilden. AJs stehen in enger Verbindung mit den Aktin-Filamenten zweier benachbarter Zellen, wodurch es zu einer mechanischen Verstärkung kommt. Auf diese Weise werden Aktin-Filamente mehrerer Zellen zu einem transzellulären Netzwerk zusammengeschlossen (Hartsock & Nelson, 2008).

Das spezifisch im Endothel vorkommende Adhäsionsmolekül dieser Art ist das *Vascular Endothelial Cadherin* (VE-Cadherin oder Cadherin-5) (Gumbiner, 1996; Dejana *et al.*, 1999; Gumbiner, 2005), ein Transmembranprotein, welches  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Adhäsion in Trans-Ausrichtung vermittelt. Durch Homodimerisierung bildet es eine Reißverschluss-ähnliche Struktur entlang der Zelloberfläche durch laterale Aggregation (Takeichi, 1988; Pokutta *et al.*, 1994; Boggon *et al.*, 2002). Durch das zytoplasmatische Ende interagiert das VE-Cadherin mit Plaqueproteinen: dem  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin), die ihrerseits an das  $\alpha$ -Catenin binden (Lampugnani *et al.*, 1995; Perez-Moreno *et al.*, 2003). Das letztgenannte Protein bindet an Aktin-Mikrofilamente und ist an der Polymerisierung dieser beteiligt, was

entweder direkt oder auch indirekt durch eine Reihe von anderen Proteinen, wie das Vinculin, ZO-1 oder das  $\alpha$ -Actinin, erfolgt (Itoh *et al.*, 1997; Perez-Moreno *et al.*, 2003). Cadherine, die eine Verankerung mit dem Aktinzytoskelett ausgebildet haben, stabilisieren die junctionale Struktur und tragen zur spezifischen Zellmorphologie, Zell-Zell-Erkennung und zum Überleben der Zelle bei (Gumbiner, 1996; Dejana *et al.*, 2000). In endothelialen Vorläuferzellen wird das VE-Cadherin charakteristischerweise sehr früh exprimiert (Vittet *et al.*, 1996; Dejana *et al.*, 1999; Gumbiner, 2005). Die wichtige adhäsive Rolle dieses Proteins (Baumgartner *et al.*, 2003) enthüllte u. a. eine *knock-out*-Studie an der Maus: das fehlende VE-Cadherin-Gen verursacht eine Inaktivierung korrespondierender Gene, VE-Cadherin<sup>-/-</sup> Endothelzellen weisen keinerlei Adhäsion mehr auf, was zur Letalität innerhalb der ersten 5 Tage der Embryonalentwicklung führt (Carmeliet *et al.*, 1999). Das VE-Cadherin ist Wechselwirkungspartner des  $\beta$ -Catenins an der Zellmembran, welches auch als Transkriptionsfaktor fungieren kann: dabei dissoziiert es vom VE-Cadherin, mit anschließender nukleärer Translokation (Liebner *et al.*, 2008). Zu einer Lockerung der Cadherin-Cadherin-Kontakte kann es auch durch posttranslationale Veränderungen des Proteins kommen, z.B. durch Phosphorylierung, welche, durch den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und dessen Rezeptor VEGF-R2 (Carmeliet & Jain, 2000) vermittelt wird. Diese Interaktion mit dem VE-Cadherin verursacht eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität und Verringerung des Zellwachstums (Lampugnani *et al.*, 2006) und spielt eine Rolle bei der Angiogenese (Cavallaro *et al.*, 2006; Lampugnani & Dejana, 2007).

### 2.1.3 Occludenskontakte

Neben den Adhärenskontakten gehören zum apikalen junctionalen Komplex der BHS auch Occludenskontakte (TJ), zu denen drei integrale Membranproteinfamilien zählen: die Claudine, Occludin und die *Junction Adhesion Molecules* (JAMs), sowie eine Reihe akzessorischer Proteine (ZO-1,-2 und -3, Cingulin) und andere. Claudine und Occludin bilden gemeinsam die Transmembran-Komponente der Occludenskontakte aus. Akzessorische Proteine befinden sich im Zytoplasma und verbinden membranständige Proteine mit Aktin (Fanning *et al.*, 1998). Beide, das Occludin und die Claudine, sind gleichermaßen Voraussetzung für die Ausbildung der BHS (Sonoda *et al.*, 1999).

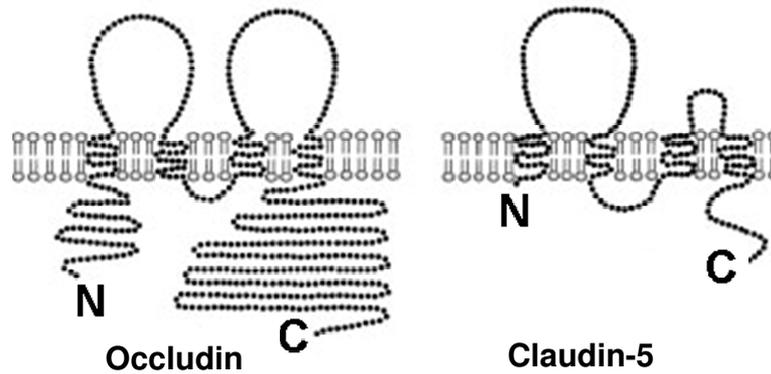
TJ bilden eine dichte Diffusionsbarriere zwischen zwei benachbarten Zellen aus. Die membranständigen Bänder, die Occludin und die Claudine gemeinsam ausbilden, beinhalten fluktuierende Kanäle, die eine Kontrolle über die selektive Diffusion hydrophiler Substanzen, sowie Ionen ermöglichen (Matter & Balda, 2003). Occludin war das erste in

Occludenskontakten lokalisierte TJ-Protein, das 1993 mit Hilfe der Gefrierbruchelektronenmikroskopie entdeckt wurde (Furuse *et al.*, 1993). Es ist ein 65 kDa großes Phosphoprotein mit zwei zytoplasmatischen und vier Transmembrandomänen.

Occludin spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der epithelialen und endothelialen Permeabilität (Hirase *et al.*, 1997). Hierbei korreliert die Stärke der gewebespezifischen Expression des Occludins mit den Barriereeigenschaften des jeweiligen Gewebes (Hirase *et al.*, 1997). Die Überexpression von Occludin verursacht einen Anstieg des transepithelialen elektrischen Widerstandes in MDCK-Zellen (*Madin-Darby canine kidney cells*) (McCarthy *et al.*, 1996). Die unterschiedliche Occludin-Proteinexpression in Hirnkapillaren und den Gefäßen nicht-neuronaler Organe suggeriert, dass eine hohe Occludin-Expression maßgeblich für eine niedrige Permeabilität der Hirnendothelzellen ist. Occludin ist deshalb ein konsistenter Marker für die Funktion von TJ der BHS.

Aus der Familie der Claudine sind über 20 Mitglieder bekannt. Gemeinsam mit dem Occludin sind sie essenziell für die Gewährleistung der niedrigen endothelialen Permeabilität, des parazellulären Ionenflusses und der Polarität der Endothelzellen der BHS (Tsukita *et al.*, 2001). Einige Claudine erfüllen gewebespezifische Funktionen und regulieren auf Transkriptionsebene auch organspezifische Funktionen (Ikenouchi *et al.*, 2003). In Endothelzellen der BHS werden die Claudine -3, -5 und -12 exprimiert. Die Anwesenheit des Claudin-1 im Hirnendothel wird allerdings immer noch diskutiert (Liebner *et al.*, 2000). Ähnlich dem Occludin, besitzen Claudine vier Membran-durchspannende Abschnitte, zwei extrazelluläre Schleifen und zwei zytoplasmatische Termini (Morita *et al.*, 1999).

Claudin-5-defiziente Mäuse sterben bereits nach einem Tag postnatal. Ihre BHS-Integrität ist erheblich gestört und durchlässig für kleine Moleküle (< 800 kDa) (Nitta *et al.*, 2003). Bis heute ist die Transkriptionskontrolle des Claudin-5-Gens weitgehend unbekannt. Einen Beitrag zu dessen Erforschung lieferte eine Arbeit unserer Gruppe, in der die Regulation des Claudin-5-Promoters durch Glukokortikoide (GCs) und das Zytokin *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) beschrieben wurde (Burek & Forster, 2009).



**Abb.: 2.3.1 Schematische Gegenüberstellung von Occludin und dem Claudin-5.** Beide Proteine besitzen vier transmembranäre und zwei schleifenförmige extrazelluläre Domänen. Über den COOH-Terminus können Occludin und Claudine mit Plaqueproteinen interagieren. Quelle: (Schneeberger & Lynch, 2004) (modifiziert).

#### 2.1.4 Das Zytoskelett der Endothelzellen

Das Zytoskelett ist ein dynamisches und anpassungsfähiges Netzwerk im Zytoplasma, das aus polymerisierenden und depolymerisierenden Strukturproteinen (Filamenten) besteht. Es ist verantwortlich für die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihre äußere Morphologie. Ebenso vermittelt es die aktive Bewegung der Zelle, sowie Transportvorgänge und Signale innerhalb der Zelle (Bogatcheva & Verin, 2008). Die Strukturen des Zytoskeletts sind mit Adapterproteinen assoziiert, die der Verstärkung der Filamente dienen, sich entlang der Filamente bewegen und mit anderen Strukturen verbinden können (Lee & Gotlieb, 2003).

In eukaryotischen Zellen werden drei verschiedene Zytoskelettfilamente unterschieden: Aktin- und Intermediärfilamente, sowie Mikrotubuli.

Aktinfilamente sind faserähnliche Strukturen mit einem Durchmesser von 7-9 nm, die aus Aktin bestehen: dem am stärksten exprimierten Protein im Zytoplasma eukaryotischer Zellen. F-Aktin (Mikrofilament) setzt sich aus polymerisierten Aktinmonomeren (G-Aktin) zusammen und dient vor allem der Stabilisierung der Zellmorphologie (Lee & Gotlieb, 2003; Jacobson & Garcia, 2007). Zu den wichtigen F-Aktin-assoziierten Proteinen gehören  $\alpha$ -Aktinin, Spectrin und Filamin. Die Interaktion mit dem Motorprotein Myosin führt zur Bildung kontraktiver Filamentbündel (Stressfasern), die u. a. zur Stabilisierung der Zelle gegen externe Zugkräfte dienen. An bestimmten Regionen ist das Aktinzytoskelett der Zelle mit der extrazellulären Matrix (ECM) verbunden (Gardel *et al.*, 2008). Mittels dieser fokalen Kontakte sind Aktinfilamente unter Zwischenschaltung von Adapterproteinen an Integrinen verankert (Defilippi *et al.*, 1991).

Neben den AJs und TJs trägt auch das Zytoskelett einen Beitrag zur Gewährleistung der Barrierefunktionen der Endothelzellen bei. *In vitro*-Studien mit F-Aktin-depolymerisierenden Substanzen (beispielsweise Cytochalasin D) zeigten eine gesteigerte Permeabilität und Lückenbildung in der Endothelbarriere (Haselton *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997). Der Einsatz von entsprechenden Dosen Aktinzytoskelett-stabilisierender Agenzien (wie Jasplakinolid) konnte die von Cytochalasin D hervorgerufenen Schäden in der Barriere aufheben (Waschke *et al.*, 2005).

Ausserdem konnte die Regulation der Kontraktilität des Aktinzytoskeletts in *in vitro*-Studien gezeigt werden (Lu *et al.*, 2008; Jalimarada *et al.*, 2009). Durch Hemmung der Myosin-ATPase kommt es zu einer verminderten Zellkontraktion und basalen Permeabilität und somit zu einer gesteigerten Barrierefunktion (Adamson 2002). Ähnliche Effekte konnten durch Hemmung der Rho-Kinase mittels Y27632 erzielt werden (Waschke *et al.*, 2004b).

### **2.1.5 Regulation der BHS-Eigenschaften durch GCs**

Die Regulation der BHS-Eigenschaften kann auf vielerlei Ebenen stattfinden. Dies kann u. a. auch durch dynamische Veränderung der Kontaktprotein-Gen- oder Proteinexpression zustande kommen, welche durch zelluläre oder metabolische Faktoren hervorgerufen werden können (Madara *et al.*, 1986; Madara, 1988; Schneeberger & Lynch, 1992; Anderson *et al.*, 1993; Citi, 1993; Leach *et al.*, 2000; Forster, 2008). Neben Wachstumsfaktoren, Calcium oder Phorboläther wird diese Regulation auch durch GCs vermittelt.

GCs zählen zu den Corticosteroiden, einer Klasse von Steroidhormonen, die in der Nebennierenrinde gebildet werden. Der gemeinsame Vorläufer natürlich vorkommender GCs, wie des Cortisols und des Corticosterons, ist das Progesteron. Die zwar funktionell unterschiedlichen Corticosteroide (GCs, Mineralokortikoide und Sexualhormone) weisen ein gemeinsames Grundgerüst auf, welches aus einem Cholesterin-Molekül besteht. Daneben gibt es eine Reihe synthetischer Corticosteroide mit GC-Wirkung. Die GC-Produktion beginnt mit einer fünfstufigen Synthese von Cortisol aus Cholesterin.

Alle GCs haben vielfältige physiologische Wirkungen: sie beeinflussen den Stoffwechsel und die Energieproduktion, den Wasser- und Elektrolythaushalt, das Nervensystem, sowie das Herz- und Kreislaufsystem.

Der barriereabdichtende Effekt von GCs lässt sich klinisch eindeutig nachweisen. Bereits wenige Stunden nach GC-Gabe, die beispielsweise bei der Behandlung des Umgebungsödems bei Gehirntumoren zur Anwendung kommt, kann eine Permeabilitätsreduktion der Gehirnkapillaren beobachtet werden (Gomes *et al.*, 2005).

Der zugrunde liegende Mechanismus der GC-Wirkung auf die Barriereigenschaften der BHS wurde bisher an verschiedenen *in vitro* BHS-Modellen beschrieben und charakterisiert. Die Arbeitsgruppe um Firestone (Buse *et al.*, 1995) beschrieb zum ersten Mal, dass das synthetische, hochpotente GC Dexamethason die Differenzierung der TJ-Proteine in Epithelzellen beeinflusst. Schließlich wurde am Endothel gezeigt, dass Dexamethason die ZO-1-Expression und den transendothelialen elektrischen Widerstand (transendothelial electrical resistance, TER) erhöht (Singer *et al.*, 1994). Ebenso konnten starke Dexamethason-Effekte auf die Permeabilität von Ratten-Hirndendothelzellen demonstriert werden (Romero *et al.*, 2003). An einem primären Zellkulturmodell der BHS aus der Maus und dem Schwein, das in der Arbeitsgruppe um Galla entwickelt wurde (Hoheisel *et al.*, 1998; Lohmann *et al.*, 2002; Weidenfeller *et al.*, 2005), sowie an Hirndendothelzelllinien der Maus (Forster *et al.*, 2005; Weidenfeller *et al.*, 2005; Harke *et al.*, 2008) und des Menschen (Weksler *et al.*, 2005; Forster *et al.*, 2008) wurde der Einfluss von Hydrokortison auf die Permeabilitätseigenschaften und TJ-Expression charakterisiert. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Komponenten der ECM bei der Ausbildung der Barriereigenschaften eine wichtige Rolle spielen. Den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) schreibt man sowohl beim Prozess der Ausbildung als auch des Verlustes der BHS-Eigenschaften eine besondere Rolle zu (Alexander & Elrod, 2002; Lohmann *et al.*, 2002). Hydrokortison stabilisiert hierbei die Barriere durch Zielgenaktivierung des MMP-Inhibitoren TIMP-1, des *Tissue Inhibitors of MMPs* durch den GR (Forster *et al.*, 2007).

### **2.1.6 Molekulare Wirkung von Glukokortikoiden**

GCs vermögen, aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften, durch die Plasmamembran zu diffundieren und im Zytosol der Zielzellen an lösliche Rezeptoren zu binden (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Diese freien GC-Rezeptoren (GRs) bestehen aus mehreren Domänen: einer variablen N-terminalen Domäne zur Modulation der Transkription, einer hochkonservierten Domäne für die Bindung an die DNA, sowie einer erweiterten Domäne zur Bindung des GCs (Giguere *et al.*, 1986). Der GR wird in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert: GR $\alpha$  und GR $\beta$ . Die beiden Proteinisoformen werden durch alternatives *Splicing* generiert, jedoch von einem gemeinsamen Gen kodiert (Encio & Detera-Wadleigh, 1991). Freie GRs werden mit Inhibitorproteinen, den Hitzeschock-Proteinen Hsp90 und Hsp59 komplexiert (Sanchez *et al.*, 1986; Gustafsson *et al.*, 1989), welche sie im Zytoplasma halten und daran hindern, an die DNA zu binden. Die Bindung des GC-Moleküls an den Rezeptor veranlasst die Dissoziation des Inhibitor-Komplexes, wodurch das aktivierte Rezeptorprotein in den Zellkern transloziert

(Madan & DeFranco, 1993) und sich dort an entsprechende Promoterbereiche der DNA anlagert (Rexin *et al.*, 1988; Gehring, 1993). Zur DNA-Bindung besitzen die Rezeptoren in der zentralen Domäne zwei Zink-Finger-Bereiche, in denen jeweils ein  $Zn^{2+}$  von vier Cysteinresten in einer tetraederartigen Form gebunden ist. Die Konsensus-Sequenzen auf den Promoterregionen der DNA (*Glucocorticoid Responsive Elements*, GREs) sind kurze, palindromisch organisierte Bereiche (Beato & Klug, 2000) und befinden sich innerhalb von Promotoren oder anderen regulatorischen Elementen, welche GC-abhängige Gene regulieren. Die Bindung des GC-GR-Komplexes an einen Promoter aktiviert oder reprimiert die Transkription, wodurch das GC als chemisches Signal wirkt, das spezifische Gene in bestimmten Zellen an- oder ausschaltet (Beato, 1989; Neeck *et al.*, 2002). Eine Kontrolle der Transkription wird im Zusammenwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren erreicht. Viele Fragestellungen zum molekularen Mechanismus der GC-Wirkung müssen jedoch noch vollständig aufgeklärt werden.

## **2.2 Multiple Sklerose**

### **2.2.1 Pathologie der Krankheit**

Die Multiple Sklerose (MS), auch bekannt als *Encephalomyelitis disseminata*, ist eine weit verbreitete, chronische und entzündliche Autoimmunerkrankung der westlichen Welt. Während ihres Verlaufs treten in der weißen Substanz des Gehirns und des Rückenmarks verstreut vielfache Entmarkungsherde auf (Keegan & Noseworthy, 2002). Jüngere und ältere Individuen scheinen gleichermaßen von der Krankheit betroffen zu sein. Die MS verursacht eine progressive Demyelinisierung und permanente axonale Schäden von Anbeginn der Krankheit (Rodriguez *et al.*, 1994). Obwohl die MS bereits seit über einem Jahrhundert im Fokus der Wissenschaft steht, bleiben die Gründe und Ätiologien der Krankheit weiterhin unzureichend erforscht (Noseworthy, 1999). Die häufigste Form der MS, die schubförmige remittierende Form, wird durch Exazerbationen charakterisiert (Lucchinetti *et al.*, 1996; Lucchinetti *et al.*, 1998; Noseworthy *et al.*, 2000), die als signifikante Veränderungen der Grundkonditionen des Patienten definiert sind. Damit werden wesentliche Verschlechterungen der Symptome oder das Auftreten mehrerer oder neuer Symptome bezeichnet. Die Exazerbationssymptome werden durch Schädigung des ZNS verursacht, welche durch den Zusammenbruch der BHS entstehen. Durch die Zerstörung der BHS kommt es zu einer ZNS-Infiltration durch aktivierte T-Lymphozyten (T-Zellen) und schließlich zur Demyelinisierung. Die rasch proliferierenden T-Zellen sezernieren ein proinflammatorisches

Zytokin-Repertoire, das u. a. TNF- $\alpha$ , Interferon (IFN)- $\gamma$  oder Interleukin (IL)-1 $\beta$ , -2, -6 -12 beinhaltet (D'Souza *et al.*, 1996; Minagar & Alexander, 2003). Diese wiederum erhöhen die Aktivität der Makrophagen und Mikroglia, die sowohl zur Degeneration des Myelins als auch der oligodendroglären Zellen führen (Zhang *et al.*, 1994). Zusätzlich aktivieren Zytokine Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (Rosenberg, 2002a, b; Rosenberg & Mun-Bryce, 2004; Forster *et al.*, 2007), deren Ziele, u. a. Junctionsproteine im Endothel, abgebaut werden.

Nach einem akuten Schub tritt in der Regel eine Remissions-, also Erholungsphase der Krankheit ein, in welcher antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) dominieren (Kennedy *et al.*, 1992; Houry *et al.*, 1992; Navikas & Link, 1996). Die komplexen und weitgehend unverstandenen Aspekte dieser Krankheit erfordern eine Aufklärung der molekularen Vorgänge an neuronalen Zelltypen und -verbänden. Von gleichgroßer Bedeutung ist das Verständnis der Mechanismen, die zum Zusammenbruch der Barriereigenschaften des Hirnendothels führen und zu deren Entschlüsselung der Einsatz verschiedener *in vitro* Zellkulturmodelle eine wichtige Rolle beitragen könnte.

### 2.2.2 GCs in der MS-Therapie

Der Einsatz hoch dosierter GCs gehört zum etablierten Standard der Therapie akuter MS-Schübe. GCs wirken dosisabhängig auf verschiedenen Ebenen: der genomischen und nicht-genomischen (Buttgereit *et al.*, 1999), immunsuppressiven Ebene (Boumpas *et al.*, 1993; Andersson & Goodkin, 1998). Ebenso vermitteln sie die Apoptose zytotoxischer T-Lymphozyten (Dowling *et al.*, 1980). Eine hochdosierte Gabe von GCs bewirkt auch eine herabgesetzte Produktion proinflammatorischer Zytokine (La Mantia *et al.*, 1994; Crockard *et al.*, 1995; Leussink *et al.*, 2001). In der Therapie werden Methylprednisolon und Dexamethason bevorzugt eingesetzt, deren Vorteil ist die geringe mineralokortikoide Wirkung, eine hohe Rezeptoraffinität, sowie eine lineare Dosiskinetik (Buttgereit *et al.*, 1999; Lipworth, 2000; Grauer *et al.*, 2001). In vielen Fällen zeigt die GC-Therapie bei der MS jedoch keine Wirksamkeit (Reichardt *et al.*, 2006). Zudem wird *in vitro* der GC-Einfluss meistens an Neuronen- und am Glia-Modellsystem untersucht. Dies ist nicht ausreichend, da die Schädigungen des ZNS im Moment des BHS-Zusammenbruchs beginnen und GCs ebenfalls einen Einfluss auf die Endothelien der BHS ausüben und der Verschluss der BHS eine wichtige Rolle in der Entwicklung der MS spielt. Zudem haben die Endothelzellen der BHS direkten Kontakt zu dem mit proinflammatorischen Zytokinen angereicherten Blut. Wichtig ist daher, zu analysieren, wie man unter Einsatz von GCs die Permeabilität der Endothelzellen in einem akuten Schub der MS herabsetzen kann.

In der hier vorgestellten Studie sollte eine Dexamethason-Behandlung nach einer Inkubation der mikrovaskulären Hirndothelzelllinie cEND in verschiedenen MS-Patientenseren vorgenommen werden. Auf verschiedenen Ebenen wurden die BHS-Qualitäten des Endothelzell-*Monolayers* mit einem Augenmerk darauf untersucht, ob die vorgenommene GC-Behandlung einen Einfluss auf die Wiederherstellung der BHS-Eigenschaften hat, welche bei der Inkubation mit MS-Seren herabgesetzt wurden.

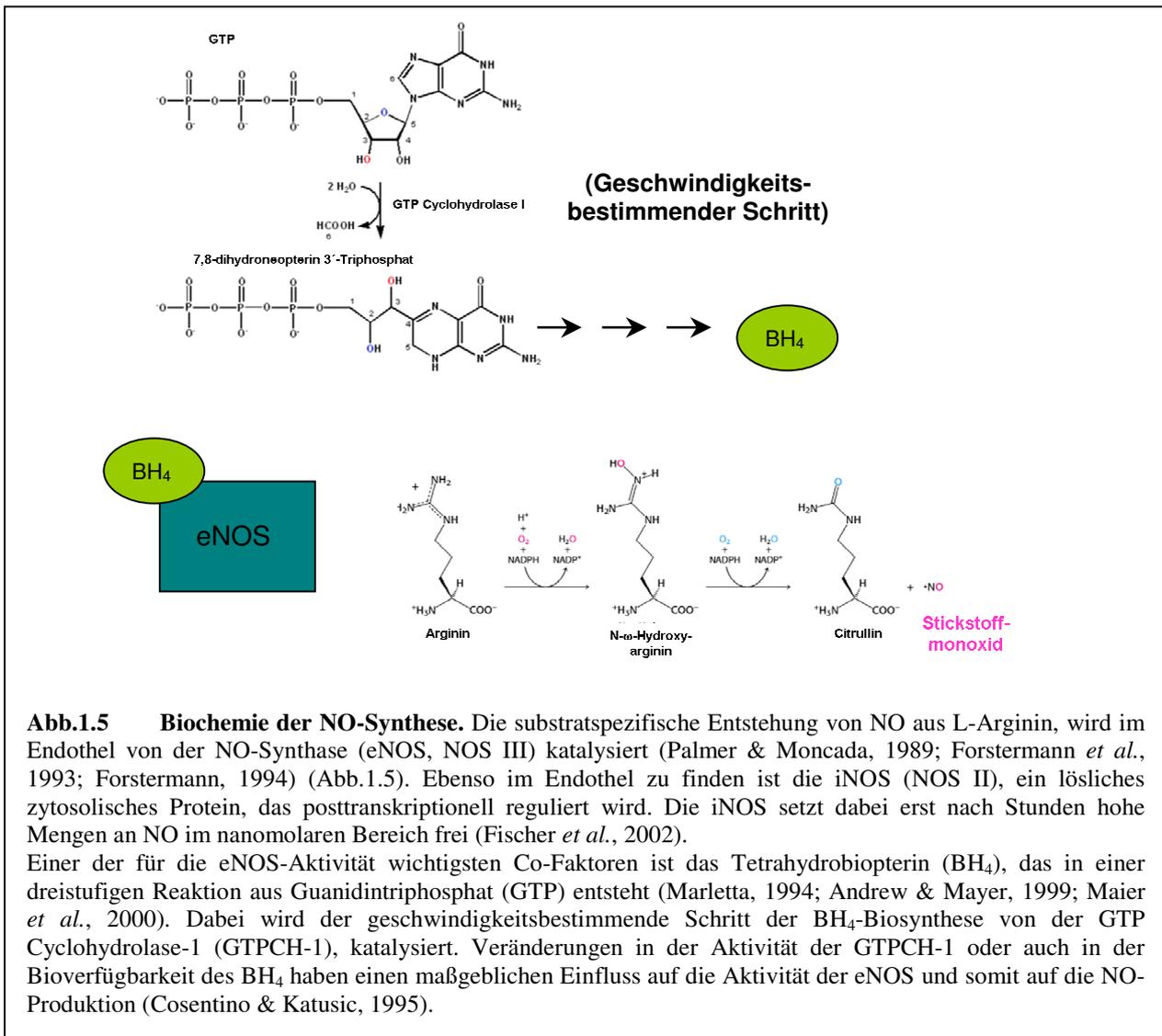
## **2.3 Nebenwirkungen von GCs**

Die chronische Verabreichung von GCs verursacht zahlreiche Nebenwirkungen. Systemische Applikationen von GCs können durch eine intrinsische mineralokortikoide Wirkung Störungen des Elektrolythaushaltes verursachen, wie zum Beispiel Hybernatriämie, mit nachfolgendem Bluthochdruck, oder Calciumverlust, mit daraus resultierender Osteoporose (Di Munno & Delle Sedie, 2008; Panoulas *et al.*, 2008; Lidofsky & Smith, 2009; van Brussel *et al.*, 2009). Auch die durch Hypokaliämie begünstigten Herzrhythmusstörungen und Bluthochdruck sind gefürchtete Nebenwirkung (Khosla & Hogan, 2006; Kokot & Hylaklekt, 2008). Durch die katabole Wirkung finden sich Muskelschwund, Myopathien, Wundheilungs- und Fettumverteilungsstörungen mit der Cushing-typischen Stammfettsucht (Mastaglia, 2008; Shalet & Mukherjee, 2008; Dodt *et al.*, 2009). Weitere unerwünschte Effekte sind Exazerbationen vorbestehender Infektionen, Thromboseeigung und Entstehung des sogenannten Steroiddiabetes durch verminderte Glukosetoleranz. Bei Langzeitbehandlungen mit GCs erhöht sich das Risiko für Infarktanfälligkeit, lokale Atrophien, Katarakte und auch Glaukome (Madias & Hood, 1982; Shatney & Lillehei, 1982; LeGal & Morrissey, 1990). Nicht selten treten psychische Veränderungen bei Patienten nach GC-Langzeittherapie auf (Kronenberg *et al.*, 2009). Auch das abrupte Absetzen der GC-Langzeitbehandlung kann unerwünschte Folgen haben. Häufig kommt es zur Nebennierenrinden-Insuffizienz und zur Verschlimmerungen der Grunderkrankung.

### **2.3.1 GC-induzierte Hypertonie**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiges Signalmolekül in Endothelzellen, das bei gestörter Endothelfunktion vermindert gebildet wird. Durch die Fähigkeit des NO, sich an Proteine anzulagern und mit ihnen eine chemische Reaktion einzugehen, werden viele physiologische und pathologische Prozesse reguliert (Wink *et al.*, 1996). Furchgott und Zawadski wiesen 1980 erstmals nach, dass Endothelzellen eine wesentliche Rolle bei der Gefäßerweiterung,

sowie in der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur und des Blutdrucks spielen (Furchgott & Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 2002; Panoulas *et al.*, 2008). Nur im intakten Endothel konnte eine Dilatation isolierter Gefäße, beispielsweise durch Acetylcholin oder Bradykinin, gezeigt werden (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987; Palmer & Moncada, 1989).



Ein Ungleichgewicht in der Produktion des NO durch das Endothel, führt zu vielen kardiovaskulären Krankheitsbildern, zu denen die koronare Dysfunktion, Arteriosklerose, Hypercholesterolämie, sowie der Bluthochdruck gehören (Schmidt *et al.*, 1992; Werner-Felmayer *et al.*, 2002; Wallerath *et al.*, 2004). Die hier genannten koronaren Krankheitsbilder sind nicht selten die Konsequenz einer GC-Langzeitbehandlung (Aida *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2004). Während GCs, wie z.B. das Dexamethason, erfolgreich bei der Behandlung von BHS-Läsionen eingesetzt werden, die bei verschiedenen zentralnervösen Erkrankungen

auftreten können, oder bei der Immunsuppression eine wichtige Rolle spielen (Hatashita & Hoff, 1990; McDonald, 1994), ist ebenso gut bekannt, dass GCs eine Menge unerwünschter Nebeneffekte auf das nicht-neuronale Endothel ausüben (Wallerath *et al.*, 2004). Neben dem NO spielt die Anwesenheit des BH<sub>4</sub> eine unabdingbare Rolle für die optimale Funktion aller NOS-Isoformen (Hong *et al.*, 2001; Ignarro *et al.*, 2002). Die Wichtigkeit dieses Moleküls wurde bereits in der Literatur ausführlich beschrieben. *In vitro* Studien referierten beispielsweise, dass in nativen Gefäßpräparationen eine 30-fach höhere NOS-Aktivität gemessen wurde als in BH<sub>4</sub>-freien Präparationen. Der Verlust der BH<sub>4</sub>-Bioverfügbarkeit verursacht die Produktion von Superoxiden (O<sup>-</sup>), was zu einer Endotheldysfunktion als Begleiterscheinung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z.B. des Bluthochdruckes, führt (Fukushima & Nixon, 1980; Giovanelli *et al.*, 1991; Kapatos *et al.*, 1992). Insbesondere schreibt man GCs zu, die Bioverfügbarkeit dieses Co-Faktors zu reduzieren, sowie die Expression des an der BH<sub>4</sub>-Produktion beteiligten Enzyms, GTPCH-1, maßgeblich zu beeinflussen (Johns *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2003a).

Der komplexe Mechanismus, d. h. wie gewebespezifische GC-Einfluss auf das Endothel unterschiedlicher Herkunft, zustande kommt, erfordert jedoch genauere Aufklärung. Einen Hinweis zur Aufklärung der gewebespezifischen Wirkung von GCs lieferte die Studie von Prof. Dr. C. Förster (Forster *et al.*, 2006), in der zwei endotheliale Zelllinien, zerebraler und myokardialer Herkunft gegenüber gestellt wurden. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit könnten ebenfalls ein Anhaltspunkt für einen Aspekt der GC-induzierten Reduktion der NO-Produktion darstellen (siehe 5.3.2).

## **2.4 Ziele der Arbeit**

### **2.4.1 GC-Effekte auf die Expression des VE-Cadherins und die Zytoskelett-Reorganisation in dem Zellkulturmodell der BHS, cEND**

Das AJ-Protein VE-Cadherin ist neben den TJs im Hirnendothel essenziell für die Gewährleistung der Schrankenfunktionen. Im ersten Teil der Dissertation sollten barriereabdichtende Effekte einer Dexamethason-Behandlung im Zusammenhang mit diesem Protein überprüft werden. Anhand verschiedener Methoden, wie Western-Blot und der quantitativen *real-time* RT-PCR sollte die Protein- und Genexpression von VE-Cadherin bestimmt werden. Mit Hilfe des Promoter-Reporter *Luciferase-Assays* zur Messung der VE-Cadherin-Promoteraktivität unter GC-Einsatz, sowie durch den simultanen Einsatz von Dexamethason und dem GR-Antagonisten RU486 sollten genomische von nicht-genomischen Effekten auf die VE-Cadherin-Genexpression unterschieden werden. Durch immunzytochemische Fluoreszenzmarkierungen des VE-Cadherins und des F-Aktins sollte die Lokalisation beider Proteine, sowie die Zellmorphologie vor und nach Dexamethason-Gabe untersucht werden. Zusätzlich sollte durch eine Zellfraktionierung Dexamethason-behandelter und unbehandelter cEND-Zellen, eine Analyse Zytoskelett-gebundener Proteine durchgeführt werden. Durch die Untersuchung von Effekten, die GCs auf das VE-Cadherin ausüben, wäre ein Beitrag geleistet zur Charakterisierung von barriereabdichtenden Effekten von GCs und zur Genexpressionskontrolle durch den GR in Endothelzellen der BHS.

### **2.4.2 Wirkung von GCs auf Barriereeigenschaften der cEND-Zellen nach Inkubation in MS-Patientenseren**

In diesem Teilprojekt der Dissertation sollte *in vitro*, unter Verwendung des BHS-Zellkulturmodells, cEND, eine Charakterisierung barriereschädigender Effekte von MS-Krankheitsseren, sowie barrierestabilisierender Effekte einer Dexamethason-Behandlung durchgeführt werden. Die zur Verfügung gestellten Seren stammen von Patienten aus zwei verschiedenen Stadien der MS: des akuten Schubes (Exazerbation), sowie der Remissionsphase. Als Kontrolle wurden Seren gesunder Probanden verwendet. Die mit Patientenseren inkubierten cEND-Zellen sollten auf Protein- und mRNA-Ebene auf die Expression drei wichtiger Kontaktmoleküle des apikalen junctionalen Komplexes untersucht werden: des Claudin-5, Occludins und VE-Cadherins. Zusätzlich sollte Dexamethason als Behandlungagens eingesetzt werden, um in MS-Seren inkubierten cEND-Zellen barriereverändernde Wirkungen einer GC-Behandlung zu demonstrieren. Ebenso sollte die

Rolle der MMP-9 im Bezug auf die durch MS-Seren induzierte Herunterregulation der Expression von Kontaktmolekülen überprüft werden.

### **2.4.3 Erniedrigte NO-Produktion als Nebenwirkung des GC-induzierten Abbaus des GRs**

In diesem Teil der Dissertation wird postuliert, dass der negative Einfluss auf die NO-Signalkaskade als Konsequenz einer gewebespezifischen Herunterregulation des GRs nach GC-Langzeitbehandlung zu verstehen ist (Silva *et al.*, 1994). Die Hypothese basiert auf Erkenntnissen aus einer bereits veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. C. Förster (Forster *et al.*, 2006). Anders als in Endothelzellen zentralnervöser Herkunft, bei denen es zu keinem erheblichen Abbau des GRs durch GC-Gabe kommt und somit die Transaktivierungsaktivität des GR-GC-Komplexes erhalten bleibt, konnte im peripheren Endothel ein GC-induzierter proteasomaler Abbau des GRs gezeigt und der Verlust der GR-Transaktivierungsaktivität demonstriert werden.

Als Modellsystem für diese Untersuchungen stand die myokardiale Endothelzelllinie MyEND (Golenhofen *et al.*, 2002) zur Verfügung. Diese sollten einer Dexamethason-Behandlung von mehreren Tagen Dauer unterzogen werden, wonach eNOS- und GTPCH-1-Genexpression, sowie anschließend die BH<sub>4</sub>-Level vor und nach der GC-Gabe gemessen werden sollten. Hierbei sollte die Rolle des GR und dessen proteasomalen Abbaus durch den Einsatz eines Proteasom-Inhibitors untersucht werden. Zusätzlich sollten die Effekte auf die verschiedenen Moleküle der NO-Produktionskaskade nach einer Transfektion mit dem ubiquitinylierungsdefekten GR-Konstrukt K426A-GR als positiv-Kontrolle untersucht werden (Wallace & Cidlowski, 2001). Dieses Teilprojekt wäre ein wichtiger Beitrag zur Erforschung und Aufklärung der GC-induzierten Hypertonie mit therapeutischem Ansatz.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Verwendete Substanzen

Tabelle 3.1.1 Testreagenzien

Name	Hersteller	Angewendete Konzentration
<b>Dexamethason</b>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	50 nM, 100 nM, 1 $\mu$ M
<b>Hydrokortison</b>	Sigma-Aldrich	50 nM, 100 nM, 1 $\mu$ M
<b>Mifepriston (RU486)</b>	Sigma-Aldrich	1 $\mu$ M
<b>Calpain Inhibitor I</b>	Sigma-Aldrich	25 mM

##### 3.1.2 Verwendete Antikörper

Tabelle 3.1.2 Primärantikörper

Zielstruktur	Hersteller	Konzentration	Sekundär-Antikörper
<b>murines Claudin-5</b>	Zymed zy-34-1600	1:1000	goat anti mouse
<b>muriner GR</b>	Santa Cruz Biotechnology sc-1004	1:1000	goat anti rabbit
<b>murines Occludin</b>	Zymed zy-71-1500	1:1000	goat anti rabbit
<b>murines ZO-1</b>	Zymed	1:1000	goat anti rabbit
<b>murines VE-Cadherin</b>	Santa Cruz Biotechnology sc-6458	1:1000	donkey anti goat
<b>Hybridoma-Überstand gegen VE-Cadherin</b>	Hybridomaüberstand (Gotsch <i>et al.</i> , 1997)	unverdünnt	goat anti rat
<b>Cortaktin (Alexa Phalloidin- gekoppelt)</b>	Upstate, NY	1:60	---
<b>murines eNOS</b>	Sigma-Aldrich	1:1000	goat anti mouse
<b>murines GTPCH-1</b>	Abbiotech, San Diego	1:250	goat anti rabbit
<b>murines MMP-9</b>	Chemicon, (Hofheim) AB 19047	1:1000	goat anti rabbit

Tabelle 3.1.3 Sekundärantikörper

Sekundär-antikörper	Hersteller	Konzentration	
		bei Western-Blot (Peroxidase-gekoppelt)	Bei ICC (Cy2-, Cy3- oder FITC-gekoppelt)
goat anti mouse	Dianova, Hamburg	1:3000	1:600
goat anti rabbit	Dianova, Hamburg	1:3000	1:600
goat anti rat	Dianova, Hamburg	1:3000	1:600
donkey anti goat	Dianova, Hamburg	1:3000	1:600

### 3.2.2 Verwendete Primer und Sonden

Tabelle 3.1.4 Primer (MWG-Biotech AG, Ebersberg)

Name des amplifizierten Gens	Sequenz des forward Primers	Sequenz des revers Primers	Annealing-Temperatur
murines GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)	5'-CAAGACGGACCA GAGCGAAAGC-3'	5'-CAATCTCGGGTG GCTGAACGC-3'	60°C
murines GTPCH-1 (GTP-Cyclohydrolase-1)	5'-CAACGCGC ACTTCA-3'	5'-GGCTGCAAGGC TTCTGTGAT-3'	60°C
murines VE-Cadherin	5'-TTGCCAGCCCT ACGAACCTAAAG-3'	5'-ACCACCGCCCTC CTCATCGTAAGT-3'	60°C
murine eNOS	5'-TTCCGGCTGCC ACCTGATCCTAA-3'	5'-AATATATGTCCT TGCTCAAGGCA-3'	60°C
murines TIMP-1 (Tissue Inhibitor of MMPs)	5'-CCAGAACCGCG TGAAGAGT-3'	5'-TCTCCAAGCAC AAGCCTA-3'	60°C

Tabelle 3.1.5 Sonden für quantitative *real-time* RT-PCR (Applied Biosystem, Foster City, USA)

Name des amplifizierten Gens	Nummer
murines claudin-5	Mm0727012_s1
murines GAPDH	Mm99999915_g1
murines occludin	Mm00516701_m1
murines VE-cadherin	Mm00486938_m1
murines MMP-9	Mm00486938_g1

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen)**

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurden die Zellen im Guanidinthiocyanat-haltigem Homogenisierungspuffer des RNeasy-Kits (Qiagen) lysiert (RLT-Puffer). Das Zellhomogenat wurde zur weiteren Verarbeitung in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, mit 70% (v/v) Ethanol (p.a) versetzt und gründlich vermischt. Das Homogenat wurde auf eine Säule überführt und 15 sec lang bei 13000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415C) zentrifugiert. Nach Entfernen des Durchflusses wurde die Säule mit Eluierungspuffer (RW1-Puffer) versetzt und erneut 15 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit Ethanol-haltigem Waschpuffer (RPE-Puffer). Zur vollkommenen Beseitigung des Ethanols aus der Säule, wurde diese 2 min lang leer bei 13000 rpm zentrifugiert. Durch zweifaches Eluieren mit RNase-freiem Wasser wurde, die an die Matrix der Säule gebundene, RNA gelöst. Die RNA-Langzeitaufbewahrung erfolgte auf -80°C.

### **3.2.2 Isolierung der Gesamt-RNA mit Trizol® (Roth)**

Die Zellkulturen wurden in 1 ml Trizol® lysiert. Das Homogenat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und 5 min lang bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurde dem Trizol®-Zellhomogenat Chloroform beigemischt und die Lösung gevortext. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415C) erfolgte eine deutliche Auftrennung der Lösung in 3 Phasen. Die obere, wässrige Phase enthielt die zu isolierende RNA. Diese wurde sorgfältig von der mittleren (Protein-haltigen) und der unteren (DNA-haltigen) Phase abgenommen, und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Hinzugabe von 100% Isopropanol (p.a) und mehrmaligem Invertieren des Eppendorf-Reaktionsgefäßes erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Es bildete sich ein weißer Niederschlag, wonach das Isopropanol entfernt werden konnte. Nach 2-fachem Waschen des Niederschlags mit 100% Ethanol (p.a.) wurde der Alkohol entfernt, das Pellet im Reaktionsgefäß liegend auf RT getrocknet und in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

### **3.2.3 Präparation von doppelsträngiger Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen**

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden bakterielle Übernacht-Kulturen angesetzt. Hierzu wurden die Bakterien aus den auf 80°C aufbewahrten gewünschten Glycerolstocks angeimpft

und in 5 ml sterilem LB-Medium mit entsprechendem Anitibiotikumzusatz bei 37°C über Nacht in sterilen Reagenzröhrchen auf einem Drehrad (eigene Herstellung) inkubiert.

**LB-Medium (Luria Bertani Broth):**

10 g Bacto™-Tryptone	10 g NaCl
5 g Bacto™ Yeast-Extract	ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O
pH 7,4	

Die angewachsene Bakterienkultur wurde in einem 2 ml-Eppendorf-Reagenzgefäß bei 13000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Aus dem verbliebenen Sediment wurde mit Hilfe des *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) die Plasmid-DNA gewonnen.

Hierbei wurde das Bakteriensediment in 250 µl Resuspensionslösung (*Cell Resuspension Solution*) gelöst, wonach 250 µl Lysis Puffer (*Cell Lysis Solution*) zugefügt und die entstandene Lösung durch Kippen vermischt wurde. Als nächstes wurde die Suspension nach Zugabe von 10 µl der Protease-Lösung (*Alkaline Protease Solution*) 5 min lang bei RT inkubiert. Die Lösung wurde durch 350 µl *Neutralisation Solution* neutralisiert und bei 13000 rpm 10 min lang zentrifugiert. Der somit entstandene Überstand wurde auf eine vorbereitete Säule überführt, 1 min lang bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde im folgenden Schritt mit 750 µl Waschlösung (*Wash Solution* mit Ethanolzusatz) gereinigt, erneut 1 min lang zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Waschschrift wurde unter Zugabe von 250 µl Waschlösung wiederholt. Die Säule wurde schließlich auf ein 1,5 ml-Eppendorf-Reagenzgefäß gesetzt und mit 100 µl Nuclease-freiem Wasser (*Nuclease-Free Water*) durch Zentrifugieren bei 13000 rpm eluiert.

Die mit Hilfe des Kits gewonnene Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

**3.2.4 Konzentrationsbestimmung: RNA / DNA**

Die Quantität der isolierten RNA oder DNA wurde photometrisch analysiert. Dazu wurden die Stammlösungen 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette am Spektral-Photometer (Ultrospec 2000, Fa. Pharmacia Biotech, Upsala Schweden) gemessen. Den Konzentrationsberechnung der Nukleinsäuren wurden folgende Koeffizienten zugrunde gelegt: 1 OD = 50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 1 OD = 40 µg/ml RNA. Der Quotient der Absorptionen  $A_{260}/A_{280}$  zeigte Verunreinigungen mit Proteinen an. Dieser sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

### **3.2.5 Transformation Hitzeschock-kompetenter Bakterien**

cDNA wurde per Hitzeschock-Verfahren in chemisch kompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Hierzu wurde ein 50 µl-Aliquot chemisch kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 µl der gewünschten cDNA versehen. Die 30-minütige Inkubation des Gemisches erfolgte auf Eis, wonach die Bakterien-cDNA-Lösung einem 30 sec langen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt wurde. Erneut wurde der Ansatz 10 min lang auf Eis inkubiert und anschließend 250 µl raumtemperiertes SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde für 1 h bei 37°C auf einem Drehrad gedreht. Nach der Inkubation wurde die angezüchtete Bakterienkultur 1 min lang bei 13000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415C) zentrifugiert und der Überstand auf eine mit entsprechendem Antibiotikum versehene LB-Agar-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach ca. 8 h konnten die durch das Antibiotikum selektierten Bakterien-Kulturen zur Isolierung von Plasmid-DNA oder Anfertigung von Glycerolstocks angeimpft werden.

### **3.2.6 Anfertigung von Glycerol-Stocks**

Für längerfristige Aufbewahrung von transformierten Bakterienkulturen stelle man aus den entsprechenden, frisch angewachsenen Kulturen Glycerolstocks her. Hierfür wurde 1 ml der frischen Kultur mit 1 ml einer 98% (v/v) autoklavierten Glycerol-Lösung gemischt und auf -80°C gefroren. Die jeweiligen Glycerolstocks konnten je nach Bedarf mit einem sterilen Zahnstocher angeimpft werden.

### **3.2.7 Reverse Transkription**

Die RNA wurde nach der Methode von Pyra (Pyra *et al.*, 1994), Chang (Chang *et al.*, 1997) und Maudru (Maudru & Peden, 1997) in cDNA revers transkribiert, unter Verwendung des High Capacity cDNA Archive Kits (Applied Biosystems). Vor Beginn der reversen Transkription wurde die RNA denaturiert, gefolgt vom Anlagern des reversen Transkriptions-Primers. Danach begann die eigentliche reverse Transkription, katalysiert von der MultiScribe™ Reversen Transkriptase. Die Reaktionsbedingungen wurden aufbauend auf die Arbeiten von Pyra (Pyra *et al.*, 1994) durchgeführt:

**Tabelle 3.2.7 Standardprotokoll der reversen Transkription**

<b>Annealing</b>	<b>Denaturierung</b>	95°C 15 min
	<b>Inkubation</b>	37°C 30 min
<b>Reverse Transkription</b>	<b>Inkubation</b>	37°C 1,5 h
	<b>Kühlen</b>	4°C

### 3.2.8 Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Die Methode der PCR wird zur Vervielfältigung von Doppelstrang-DNA eingesetzt. Sie wurde 1985 von Saiki erstmals veröffentlicht (Saiki *et al.*, 1985). Die Reaktion, die von der DNA-Polymerase katalysiert wird, läuft in drei Schritten ab (Abb. 3.2.8). Zunächst kommt es zur Denaturierung der eingesetzten DNA bei einer Temperatur von 95°C und zur Separierung in Einzelstränge. Nach einer Abkühlung auf 50-65°C hybridisieren die Primer mit den DNA-Einzelsträngen in der Phase des *Annealings*. Im dritten Schritt erfolgt die Elongation der DNA-Stränge in Gegenwart von Deoxynukleosid-Triphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und einer entsprechenden DNA-Polymerase. Dies resultierte letztlich in komplementären DNA-Strängen, die als Matrize für den nächsten Zyklus dienen.

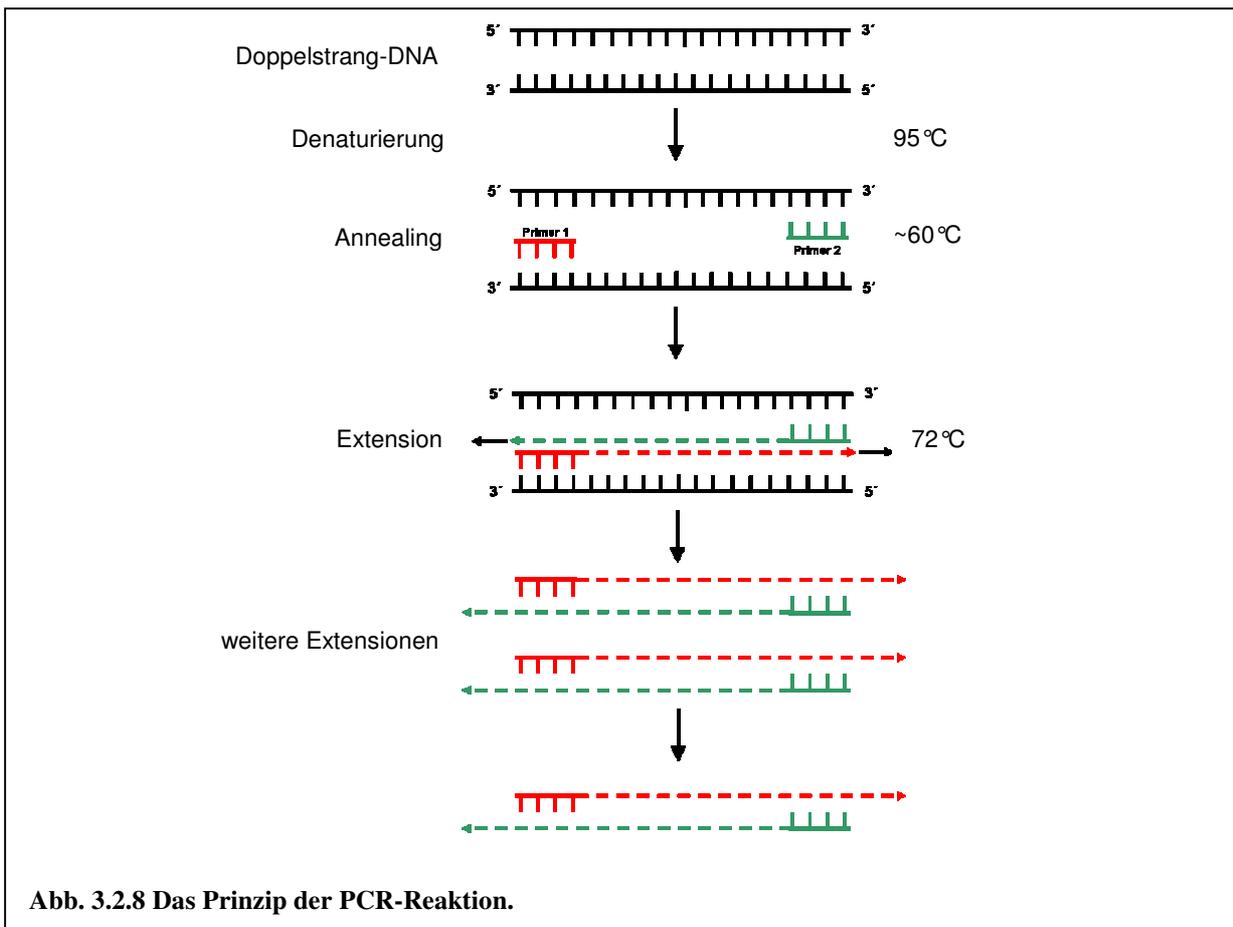
Verwendete Primer-Paare wurden von der Firma MWG-Biotech AG bezogen und in einer Konzentration von 25 pmol für eine Reaktion eingesetzt. Zur Amplifizierung kurzer DNA-Sequenzen wurde die Taq-Polymerase eingesetzt.

#### Ansatz einer PCR-Reaktion:

50 ng	DNA-Template
5 µl	10x-PCR-Puffer
1 µl	30 pmol Primer forward (3' Oligonukleotid)
1 µl	30 pmol Primer reverse (5' Oligonukleotid)
1 µl	10 mM dNTP-Mix (GIBCO)
0-3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,5 µl	DNA-Polymerase (5 U/ml)
ad 50 µl ddH <sub>2</sub> O	

**Tabelle 3.2.8 Standard-PCR-Programm eingesetzt je nach Annealing-Temperatur der Primer**

Pre-Denaturierung	94°C	3-5 min	25-35 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	50-65°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation	72°C	10 min	
Abkühlen	4°C		



### 3.2.9 Quantitative *real-time* RT-PCR

Die *real-time* RT-PCR basiert auf dem Prinzip der PCR, mit dem Unterschied, dass hierbei die Anzahl der Kopien mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit gemessen wird. Dafür wurde neben den beiden PCR Primern ein Fluoreszenzsignalgeber, das *SYBR Green I* (ABgene) zur Ermittlung der Kopienzahl benötigt, nach der Methode beschrieben in BRUNNERT 2002 und FORTMANN 2002. Es wurde ein Mastermix hergestellt, in dem je entsprechende Mengen an Primer (1,5 µl 100 pmol/ Reaktion), ddH<sub>2</sub>O (3,5 µl/ Reaktion), sowie das *SYBR Green I* (12,5 µl/ Reaktion) eingesetzt wurden. Je 20 µl des Mastermixes wurden in Triplikaten in je eine Vertiefung der Reaktionsplatte pipettiert und mit 5 µl der zu untersuchenden cDNA (25 ng/µl) versehen. Die *real-time* RT-PCR-Maschine (Applied Biosystems, Darmstadt) wurde entsprechend des Standardprotokolls programmiert und die PCR-Reaktion 40 Zyklen lang durchgeführt. Nach Abschluss der Reaktion konnte mit Hilfe der entsprechenden Software ABI PRISM 7300 SDS Software (*relative quantification study*) der *threshold cycle* (Ct) determiniert werden. Jede Reaktion und Genexpression wurde auf die Expression des GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-Gens normalisiert,

das bei jeder Reaktion als interne Kontrolle mitgeführt wurde. Die Berechnung der Genexpression des jeweiligen Gens basierte auf der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode.

### 3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese mit 0,8 - 2,0 (w/v)% (w/v) Agarose in TBE-Puffer wurde in horizontalen Gelelektrophoresekammern durchgeführt. Die Proben wurden mit 10  $\mu$ l 6x-DNA-Probenpuffer versetzt und auf das Gel geladen. Als Größenmarker stand SSL-Marker (Fermentas Life Science) zur Verfügung, der Banden bis zur Größe von 100 bp detektierte. Nach Beladen des Gels wurde dieses 10 min lang an eine Spannung von 80 mV angeschlossen und die DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Die Spannung wurde als Nächstes für 15-20 min auf 120 mV erhöht. Die Markierung der DNA erfolgte durch eine Inkubation des Gels in einer Etidiumbromid-TBE-Lösung, wonach die Detektion unter der UV-Lampe möglich war.

#### 6x Probenpuffer für Agarosegele:

1 mM EDTA pH 8  
50% Glycerol  
0,25% Xylencyanol FF  
0,25% Bromphenolblau

#### 1x TBE-Puffer:

110 mM Tris-HCl  
89 mM Borsäure  
2 mM Na-EDTA

## 3.3 Biochemische Methoden

### 3.3.1 Anfertigung von Zelllysaten

Zelllysate für Western-Blot-Proteinanalysen wurden aus konfluenten Zellen, auf einer mindestens 25 cm<sup>2</sup> großen Fläche hergestellt. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgesogen, der *Monolayer* mit einer den Gefäßboden bedeckenden Menge PBS gewaschen und mit 200  $\mu$ l 3-fach konzentriertem, DTE-versetztem Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) bedeckt. Die Zellen wurden mit einem Spatel abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Mittels Ultraschall wurde die Zellsuspension zum mechanischen Aufbruch der Zellen sonifiziert. Der Proteingehalt wurde mittels der Amidoschwarz-Konzentrationsbestimmung ermittelt.

### 3.3.2 Konzentrationsmessung von Proteinen nach Bradford

Die Proteinbestimmungen der *Luciferase-Assay*-Lysate erfolgten nach der von BRADFORD (Bradford, 1976) etablierten Methode. 10  $\mu$ l der auf ihren Proteingehalt zu untersuchenden Probe wurden mit 1 ml 1:5 verdünntem BRADFORD-Reagenz (Roth) versehen und 10 min

lang unter gelegentlichem Vortexen auf RT inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde im UV-Spektrometer (Ultrospec 2000, Fa. Pharmacia Biotech, Upsala Schweden) bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine Leerprobe gemessen. Eine Eichkurve wurde mit BSA erstellt.

### 3.3.3 Konzentrationsmessung von Proteinen mit Amidoschwarz

Amidoschwarz-Proteinbestimmung (Zlatanova *et al.*, 1994) wurde bei Proben mit Detergenzzusatz verwendet. Je 5 µl der Proben, sowie der Standards wurden auf eine Zellulose-Membran aufgetragen und auf RT getrocknet. Die Zellulose-Streifen wurden 10 min lang in der Amidoschwarz-Färbelösung unter Schütteln angefärbt. Daraufhin wurde die Zellulose mit der Entfärbelösung vollkommen entfärbt, woraufhin nur die mit Amidoschwarz angefärbten Spots sichtbar waren. Die Membranstreifen wurden auf einem saugfähigen Filterpapier getrocknet. Nach der Trocknung wurden die "Spots" ausgeschnitten und einzeln in Eppendorf-Reagenzgefäßen mit je 1 ml Auflöselösung unter gelegentlichem Vortexen für ca. 30 min (maximal 1,5 h) in einem Wasserbad, bei einer Temperatur von 50°C, inkubiert. Während der Inkubation wurde die Zellulose-Membran aufgelöst und der Farbkomplex in Lösung gebracht. Die Extinktion jeder Probe wurde mit Hilfe des UV –Spektralphotometers (Ultrospec 2000, Fa. Pharmacia Biotech, Upsala Schweden) bei einer Wellenlänge von 620 nm in Halbmikroküvetten gemessen, und nach Bestimmung der Eichkurve wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

#### **Amidoschwarz-Färbelösung:**

0,5% (w/v) Amidoschwarz  
45% (v/v) Methanol  
45% (v/v) ddH<sub>2</sub>O

#### **Entfärbelösung:**

47,5% (v/v) Methanol  
5% (v/v) Eisessig  
47,5% (v/v) ddH<sub>2</sub>O

#### **Auflöselösung:**

80% (v/v) Ameisensäure  
10% (v/v) Eisessig  
10 g TCA

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese und Western-Blot

Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit 3-fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer gemischt und 5 min lang auf 95°C gekocht. Das SDS-PAA-Gel wurde gemäß dem Standardprotokoll der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Ornstein und Davis (Ornstein, 1964) hergestellt und nach dem Auspolymerisieren entsprechend mit 20 µg der gewünschten Proben beladen. Die Gelelektrophorese wurde zunächst, bis die Proben das 5% Sammelgel verlassen haben, bei einer Spannung von 80 V, durchgeführt. Als nächstes wurde

die Spannung auf ca. 140 V zur Auftrennung der Proben durch das höherprozentige SDS-PAA-Trenngel (je nach Größe der aufzutrennenden Proteine: 10, 12, bzw. 15%) erhöht.

Im Anschluss an die SDS-PAA-Gelelektrophorese wurden, nach der Methode von Towbin (Towbin *et al.*, 1979; Towbin & Gordon, 1984) im Semidry-Blotverfahren, die Proteine mittels eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blotkammer wurde 90 min lang bei 42 mA an ein elektrisches Feld angeschlossen. Zur Überprüfung und Kennzeichnung der einzelnen, transferierten Proteine wurde die Membran mit einer Ponceau-S-Lösung (0,1% Ponceau-S in 5% Essigsäure) angefärbt. Nach Abwaschen der Färbelösung mit ddH<sub>2</sub>O wurde die Membran mit einer 10% Magermilch-PBS-Tween<sup>®</sup>-Lösung mindestens 20 min lang zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindestellen gesättigt. Im daraufhin folgenden Schritt wurde die Membran in einer geringen Menge Erstantikörper-Milchlösung im Verhältnis 1:1000 eingeschweift und über Nacht auf 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurde der Überschuss der Erstantikörper-Lösung 3-fach mit PBS-Tween<sup>®</sup> von der Nitrozellulosemembran gewaschen und diese für 1 h in eine Milchlösung mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper im Verhältnis 1:3000 auf RT inkubiert. Daraufhin folgten 3 Waschschrte mit PBS-Tween<sup>®</sup>, wonach die Membran 1 min lang in gleichen Anteilen ECL (*enhanced chemiluminescence*) I und ECL II, zur Oxidation von Luminol durch die Rettichperoxidase in Gegenwart von Wasserstoff, inkubiert wurde. Die chemilumineszente Reaktion konnte auf einem photosensitiven Röntgenfilm detektiert werden, und mittels einer einminütigen Inkubation zunächst in der Entwickler-, dann in der Fixierlösung sichtbar gefertigt werden.

### Verwendete Lösungen und Puffer:

#### 5x Trenngelpuffer:

22,71 g Tris  
ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O  
pH 8,8

#### 5x Sammelgelpuffer:

7,625 g Tris  
ad 100 ddH<sub>2</sub>O  
pH 6,8

#### 5x Elektrophoresepuffer:

50 g SDS  
720 g Glycin  
150 g Tris  
ad 10 l ddH<sub>2</sub>O

#### Blotpuffer:

25 mM Tris  
195 mM Glycin  
20% Methanol  
0,1% SDS

#### ECL I-Lösung:

1 ml 250 mM Luminol (in DMSO)  
1 ml 90 mM p-Coumarin-Säure (in DMSO)  
10 ml 1 M Tris/ HCl pH 8,5  
ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O

#### ECL II-Lösung:

64 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
8,510 ml 1M Tris/ HCl pH 8,5  
ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O.

Tabelle 3.3.4.1 Stammlösungen für Trenn- und Sammelgellösungen:

	Glycerin	Trenngel-Sammelgel-Puffer	Rotiphorese A	Rotiphorese B	ddH <sub>2</sub> O
<b>5% Trenngel</b>		2,25 ml	16,17 ml	7,5 ml	ad 100 ml
<b>7,5% Trenngel</b>	4,5 ml	20 ml	24,25 ml	11,25 ml	ad 100 ml
<b>10% Trenngel</b>	6,75 ml	20 ml	32,33 ml	15 ml	ad 100 ml
<b>12% Trenngel</b>	8,1 ml	20 ml	38,8 ml	18 ml	ad 100 ml
<b>15% Trenngel</b>	ad 100ml	20 ml	48,5 ml	22,5 ml	----
<b>5% Sammelgel</b>	----	20 ml	16,17 ml	7,5 ml	ad 100 ml

Tabelle 3.3.4.2 Herstellung eines SDS-PAA-Gels:

	x% Trenngel	5% Sammelgel
<b>Stammlösung</b>	6 ml	3 ml
<b>TEMED (conz)</b>	6 µl	3 ml
<b>10% APS</b>	21 µl	16 µl

Tabelle 3.3.4.3 3x Probenpuffer für SDS-PAGE:

	für 20 ml	für 40 ml	für 80 ml
<b>Tris</b>	0,454 g	0,908 g	1,96 g
<b>SDS</b>	1,2 g	2,4 g	4,8 g
<b>Glycerin</b>	7,56 g	15,12 g	30,24 g
<b>DTT</b>	30mg	60 mg	120 mg
<b>Bromphenolblau (10 mg/ml)</b>	400 µl	800 µl	1600 µl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	ad 20 ml	ad 40 ml	ad 80 ml

pH 6,9

### 3.3.5 Zytoskelett-Assoziationsassay

Das Zytoskelett-Assoziationsassay ermöglichte mittels eines Detergens Zellbestandteile in eine Zytosol- und eine Zytoskelett-Phase zu fraktionieren. Hierzu wurden Zellen auf einer 25 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche ausgesät, und nach Konfluenz, sowie entsprechender Behandlung in 1 ml Triton X-100-haltigem Translokationspuffer aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung 30 min lang bei 13000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415C) auf 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand, die Triton X-100-haltige Phase, enthielt alle Zytosolbestandteile. Das Pellet, die Zytoskelett-haltige Zellfraktion, wurde 2-fach mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 100-200 µl SDS-haltigem 1xPP versetzt, wonach die Zelllösung 30 min lang gekocht wurde. Im Anschluss daran erfolgte ein erneuter

Zentrifugierschritt: 10 min lang bei 13000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415C) auf 4°C, wonach eine Konzentrationsmessung mit Amidoschwarz durchgeführt werden konnte. Die Proben wurden mittels der SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt, und die Proteinbanden nach Western-Blot-Transfer visualisiert.

**Translokationspuffer:**

10 mM HEPES (pH 7,4)	250 mM Succrose
150 mM KCl	1 mM EGTA
3 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub>

### 3.3.6 Anfertigung von Proben für Messungen der eNOS-Aktivität mit <sup>15</sup>N-Arginin

Konfluente und entsprechend behandelte MyEND-Zellmonolayer wurden 24 h lang mit einer 5 mM L-[Guanidino-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin (<sup>15</sup>N-Arginin) bei 37°C inkubiert. Die behandelten Zellüberstände wurden bis zur eNOS-Aktivitätsmessung bei -80°C aufbewahrt. In der Abteilung der Kardiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik in Würzburg wurde die eNOS-Aktivitätsmessung freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Med. Thomas Thum durchgeführt. Hierbei wurde die Umwandlung von L-[Guanidino-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin in <sup>15</sup>N-Nitrat mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie durchgeführt.

### 3.3.7 Messung von NO mit Diaminofluoreszein-2-Diacetat (DAF-2-DA)

Zur Untersuchung des NO-Gehaltes in MyEND-Zellen wurde der Überstand der zuvor entsprechend behandelten Zellmonolayer mit 2 mM DAF-2-DA versehen. Danach erfolgte eine halbstündige Inkubation der Lösung bei 37°C, in der das membrangängige DAF-2DA durch intrazelluläre Esterasen zu 4,5-Diaminofluoreszein (DAF-2) deacetyliert wird. Eine fluorometrische Detektion des NO im Überstand wurde am Victor Wallac 2 Fluoreszenz-Spectro-Photometer (Perkin Elmer, Überlingen) bei einer Exzitation von 491 nm und einer Emission von 513 nm durchgeführt.

### 3.3.8 Anfertigung von Proben zur Bestimmung des intrazellulären BH<sub>4</sub>-Gehaltes mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Nach entsprechender Behandlung wurden MyEND-Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in 250 µl des Puffers geerntet bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C weggefroren. Die Messung der BH<sub>4</sub> wurde mittels Hochleistungschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) in der Arbeitsgruppe von Dr. med. Julian Widder aus der Abteilung

für Kardiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik in Würzburg freundlicherweise durchgeführt.

### HPLC-Puffer:

50 nM Tris  
1 mM DTT  
1 mM EDTA  
pH 7,4

### 3.3.9 *Luciferase-Assay*

Zur Untersuchung der Promoteraktivität wurde ein Reportergensystem verwendet, bei dem der zu untersuchende Genpromoter vor ein *Firefly*-Luziferasegen geschaltet wurde (in pGL3-basic-Plasmid).

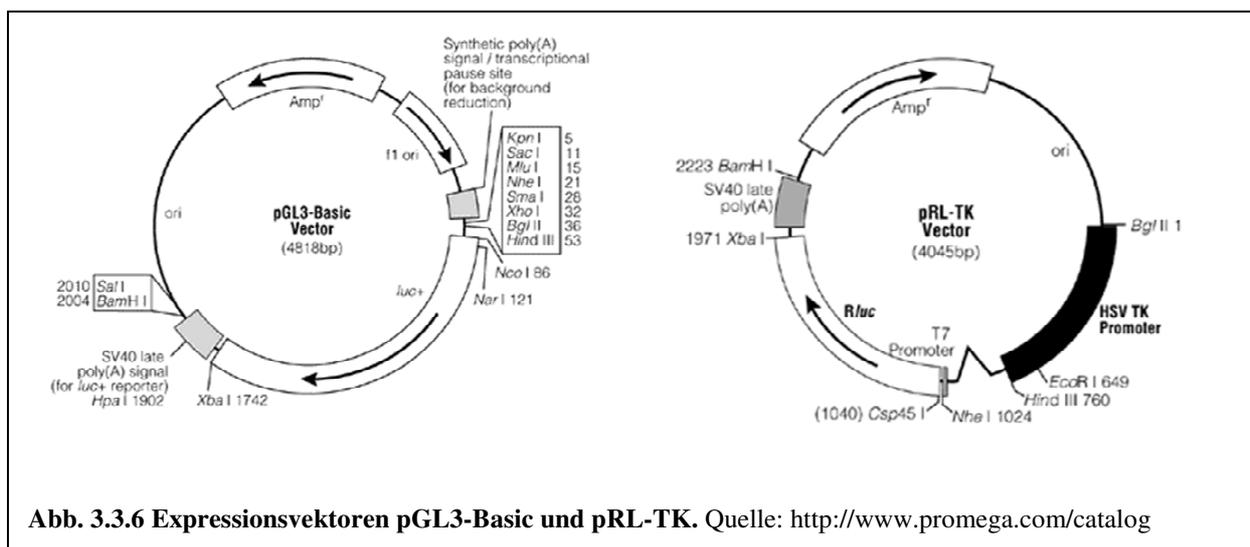
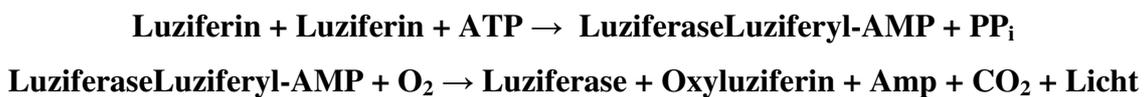


Abb. 3.3.6 Expressionsvektoren pGL3-Basic und pRL-TK. Quelle: <http://www.promega.com/catalog>

Wird am zu untersuchenden Promoter-Expression initiiert, kommt es im Anschluss gleichermaßen zur Expression des Luziferasegens. Durch Messung der Luziferaseaktivität kann eine Aussage über die Stärke der Aktivierung des Promoters getroffen werden. Die *Firefly*- und *Renilla*-Luziferasen besitzen aufgrund ihrer evolutionären Herkunft verschiedene Enzymstrukturen und Substratansprüche. Diese Unterschiede machen es möglich, zwischen ihrer jeweiligen Biolumineszenz-Reaktion selektiv zu unterscheiden. Im DLR<sup>TM</sup> Assay System (Promega) wird die Lumineszenz der *Firefly*-Luziferase-Reaktion unterdrückt, während die lumineszente Reaktion der *Renilla*-Luziferase stimuliert wird. Die *Firefly*-Luziferase ist ein monomeres Protein von 61 kDa, das nicht auf posttranslationale Prozessierung der Enzymaktivität anspricht (Wood et al., 1984; de Wet et al., 1985). Somit funktioniert sie direkt nach der Translation als ein Reporter gen. Die Photonenemission erfolgt

durch die Oxidation des Leuchtkäfer-Luziferins in einer Reaktion in Anwesenheit von ATP,  $Mg^{2+}$  und  $O_2$ .

Die Umsetzung zu Oxyluziferin erfolgt durch das Intermediat Luziferyl-AMP, das sehr langsam umgesetzt wird, nach folgender Reaktion, bei der es zusätzlich zur Lichtemission kommt:



Die *Renilla*-Luziferase (36 kDa), ebenso ein monomeres Protein, wird als ein natürliches Substrat aus der *Renilla reniformis* aufgereinigt und besteht zu 3% aus Kohlenhydraten (Matthews et al., 1977). Ähnlich wie bei der *Firefly*-Luziferase, ist eine posttranslationale Modifizierung durch eine Änderung der Enzymaktivität nicht möglich, womit die *Renilla*-Luziferase ebenso als ein Reporter gen gleich im Anschluss zur Translation verwendet werden kann. Die lumineszente Reaktion, die von der *Renilla*-Luziferase katalysiert wird, beansprucht  $O_2$  und das Coelenterat-Luziferin (Coelenterazin). Die Kinetik der Reaktion der *Renilla*-Luziferase liefert im *Luciferase Assay* ein stabiles Lumineszenzsignal, das im Laufe der Messung sehr langsam abschwächt, weswegen das Expressionsplasmid pRL-TK mit dem Plasmid, das den zu untersuchenden Promoter beinhaltet, als Transfektionskontrolle dienen kann. Alle *Firefly*-Luziferase-Werte können auf den *Renilla*-Luziferase-Wert normalisiert werden.

### 3.3.10 Biolumineszenzmessung

Der Lumat 9507, Berthold Luminometer, wurde zunächst mit 70% Ethanol (p.a.) und schließlich 2-fach mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, wonach am Abfuhrschlauch das Reagenz *Stop & Glow*<sup>®</sup> angeschlossen wurde. Nach dem Waschen des Gerätes mit dem Reagenz, erfolgte die Messung. Gefrorene Lysate wurden schnell auf 37°C im Wasserbad aufgetaut und lichtgeschützt zusammen mit dem Reagenz LAR II auf Eis aufbewahrt. Das LAR II wurde in 100 µl in durchsichtigen Reagenzgläsern vorgelegt. Nach gründlichem Vortexen wurden je 20 µl eines Lysats mit dem vorgelegten LAR II durch Auf- und Abpipettieren gemischt, ins Messgerät gestellt und die RLU (*relative light units*)-Werte zweifach ermittelt. Aus den Werten konnte im Microsoft<sup>®</sup>-Excel-Programm nach Eingabe der entsprechenden RLU-Werte der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase-Messungen, sowie der Proteinkonzentrationen einzelner

Lysate die Transfektionseffizienz und die Transaktivierung des zu untersuchenden Promoters erstellt werden.

### **3.3.11 Immunzytochemie**

Auf Gelatine-beschichteten Deckgläsern ausgesäte Endothelzellen, wurden nach Konfluenz, entsprechender Behandlung und 3 Waschschritten mit PBS, 10 min lang mit einer 3,5% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert. Nach Absaugen und sachgemäßer Entsorgung der PFA-Lösung wurden die Zellen erneut 3-fach je 10 min lang mit PBS gewaschen, anschließend 5 min lang mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Nach erneutem 3-fachen Waschen mit PBS wurden die Deckgläser auf Objektträgern platziert. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30 min lang mit BSA/NGS (*bovine serum albumin/normal-goat-serum*) abgesättigt und die Zellen anschließend über Nacht auf 4°C in einer feuchten Kammer mit entsprechendem Erstantikörper inkubiert. Vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Zellen vom Antikörperüberschuss 3-fach, je 10 min lang mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 45 min lang mit Zweitantikörper auf Raumtemperatur inkubiert, 3-fach mit PBS gewaschen und mit 60% Glycerin/ 1% n-Propylgallat zum Schutz vor Verbleichen eingedeckt und der Rand des Deckglases mit Nagellack abgedichtet. Alle Antikörper wurden in PBS verdünnt.

### **3.3.12 Markierung des Nucleus mit Propidium-Iodid**

Die Markierung des Nucleus erfolgte nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper. Hierzu wurde eine 1:1000 verdünnte Propidium-Iodid-PBS-Lösung angefertigt, welche nicht länger als 10 sec lang auf den Zellen gehalten wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen nach 3.3.9 mit PBS gewaschen.

### 3.4 Zellkulturmethoden

**Tabelle 3.4.1** Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen

Name	Herkunft	Kulturmedium (Hersteller)	FCS-Gehalt	Mediumzusätze
<b>cEND</b>	Mikrovaskuläre zerebrale Endothelzelllinie, murin (Forster <i>et al.</i> , 2005)	DMEM (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	10% (inaktiviert) 1% (bereinigt von Hormonen) bei Differenzierung	Penizillin + Streptomycin 200 mM L-Glutamin 100x (PAA-Laboratories, Berlin) 100 mM Na-Pyruvat (Biochrom AG, Berlin) NEAA 100x (Biochrom AG) MEM-Vitamine 100x (Biochrom AG)
<b>MyEND</b>	Mikrovaskuläre, myokardiale Endothelzelllinie, murin (Golenhofen <i>et al.</i> , 2002)	DMEM (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	10% 1% bei Differenzierung	Penizillin + Streptomycin
<b>HEK293</b>	<i>Human Embryonic Kidney Cells</i> ,	MEM (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	10%	Penizillin + Streptomycin
<b>Cos-7</b>	<i>African Monkey Kidney Cells</i> , (Gluzmann <i>et al.</i> , 1981)	DMEM (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	10%	Penizillin + Streptomycin
<b>GP+E 86 Δneo</b>	<i>PymT (retrovirus) packaging cell line</i> (Markowitz <i>et al.</i> , 1990)	DMEM (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	10%	Penizillin + Streptomycin

#### 3.4.1 Präparation und Immortalisierung der Hirnendothelzelllinie cEND

Das Protokoll basiert auf der Methode, die in der Dissertation von C. Silwedel ausgearbeitet wurde (Forster *et al.*, 2005). Für die Präparation der Hirnendothelzelllinie cEND wurden mindestens fünf neonatale C57/Bl6-Mäuse verwendet. Die Entfernung der Großhirne erfolgte durch Dekapitieren der Mäuse außerhalb der Sterilbank. Die Großhirne wurden vorsichtig aus der Schädelhöhle entfernt, woraufhin die Meningen durch Abrollen entlang eines sterilisierten Papierfilters entfernt wurden. Die Großhirne wurden in sterilen, eiskaltem Puffer A überführt und mit Hilfe eines Skalpells und einer dünnen Plastikpipette homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde in einen 50 ml-Falcon aufgenommen und 5 min bei 250 g auf RT zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der daraufhin folgende 0,75% Kollagenase IV-Verdau erfolgte 30 min lang auf 37°C im Wasserbad im Verhältnis der einzelnen Komponenten: 1 Volumenteil Hirngewebe : 3 Volumenteile Puffer A : 1 Volumenteil Kollagenase IV. Als nächstes wurde der Verdau durch Zugabe von eiskaltem Puffer A gestoppt (Gesamtvolumen 15 ml), woraufhin ein Zentrifugierschritt folgte, 5 min lang bei 250 g. Der Überstand wurde abgesaugt und das anverdaute Sediment durch einen BSA-Gradienten vom Myelin getrennt. Hierzu wurde das Sediment in 10 ml einer 25% BSA-

Lösung resuspendiert und 20 min lang bei 1000 g zentrifugiert. Am Ende des Zentrifugierschrittes bildeten sich ein deutliches, rotes Sediment, sowie eine Schicht des hellen Myelins an der Oberfläche der BSA-Lösung. Das Myelin und ein Teil der BSA-Lösung wurde daraufhin dekantiert, der Rest abgesaugt. Das Sediment wurde in 5 ml Puffer A aufgenommen und in einen sauberen 15 ml-Falcon mit weiteren 5 ml vorgelegtem Puffer A überführt, resuspendiert und weitere 5 min lang bei 250 g zentrifugiert. Das gewaschene Sediment wurde in ca. 500 µl Kulturmedium (Zusammensetzung siehe unten) gelöst und auf einer mit Kollagen IV beschichteten Vertiefung einer 12-well-Platte ausgesät. Nach einer Inkubation von 45 min im Zellkultur-Brutschrank bei 37°C wurde der Mediumüberstand in eine nächste Kollagen IV beschichtete Vertiefung überführt und die Vertiefung, in der sich bereits die ersten Zellen abgesetzt hatten, mit Kulturmedium aufgefüllt.

Nach 24 h erfolgte der erste Immortalisierungsschritt durch Transfektion der Endothelzellen mit dem Polyoma Middle T (PymT) Virus (Markowitz *et al.*, 1990; Regina *et al.*, 1998): hierzu wurden 800 µg/ml Polybren, dem hier verwendeten Transfektionsreagenz in PBS, in einem Verhältnis von 1:100, mit dem virushaltigem Überstand, der am Tag zuvor 1:12-gesplitteten GP+E 86 Δneo-Zellen (Aumailley *et al.*, 1991), verdünnt. Die Endkonzentration der Immortalisierungslösung betrug 8 µg Polybren pro ml Medium. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert, und das Kulturmedium durch das Immortalisierungsmedium ersetzt. Die Transfektion wurde nach weiteren 24 h wiederholt, wonach eine Kultivierung der Endothelzellpräparation in DMEM bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre, bis zum Erreichen der Konfluenz und dem Erhalt einer homogenen Endothelkultur, erfolgte.

**Puffer A:**

15 mM Hepes  
5,6 mM KCl  
1% (w/v) BSA  
pH 7,4

153 mM NaCl  
2,3 mM CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O  
2,6 mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O

**3.4.2 Kultivieren von verwendeten Zellen / Zelllinien****3.4.2.1 Bebrüten von Zellen**

Die kultivierten Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Marke) bei einer Temperatur von 37°C und einem 5% CO<sub>2</sub>-Anteil in wassergesättigter Atmosphäre (ca. 90% Wasserfeuchtigkeit) aufbewahrt.

### 3.4.2.2 Mediumwechsel

Standardmäßig wurde der Medienwechsel alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Hierzu wurde das Kulturmedium auf 37°C erwärmt und der Mediumüberstand von den Zellkulturen mit einer sterilen Pasteurpipette aus dem Kulturgefäß abgesogen und durch eine entsprechende Menge frischen Mediums, je nach Größe des Kulturgefäßes, ersetzt.

### 3.4.2.3 Beschichtung von Kulturgefäßen

**Kollagen IV-Beschichtung** (Arbeits-Stocklösung: 50 µl/ ml in 50 mM Essigsäure) Die zu beschichtenden Kulturgefäße wurden mit der Kollagen IV-Lösung bedeckt und 1 h lang auf RT inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde anschließend abgesogen und die beschichteten Flächen 3-fach mit PBS gewaschen, wonach die Zellkulturen im Medium in das Kulturgefäß überführt werden konnten.

#### *Gelatinieren der Kulturgefäße*

Der Boden des Kulturgefäßes wurde mit einer entsprechenden Menge 0,5% (w/v) Gelatine (Kollagen I) bedeckt und zur Vernetzung 10 min lang auf RT inkubiert. Zum Absinken des Gelatineüberschusses vom Flaschenboden wurden Kulturflaschen für weitere 5 min auf den Rand gestellt. Die Gelatine wurde hiernach vollkommen abgesogen und die Zellkultur entsprechend in das beschichtete Kulturgefäß überführt.

#### *Gelatinieren von Deckgläsern*

Die Beschichtung von Glasflächen mit Gelatine erforderte eine zusätzliche Quervernetzung mit 2% (v/v) Glutaraldehyd/ PBS. Dazu wurden die Deckgläser 30 min lang in 0,5% (v/v) Gelatine inkubiert. Nach Absaugen der Gelatine wurden die Gläser weitere 30 min lang in einer 2% Glutaraldehyd/ PBS-Lösung inkubiert, wonach eine 3-fache Spülung mit PBS erfolgte. Die beschichteten und quervernetzten Deckgläser konnten bei 4°C in einer PBS-Penicillin-Streptomycin-Lösung (100 ml PBS + 1 ml Penicillin-Streptomycin) aufbewahrt werden.

#### *Beschichtung mit Poly-L-Lysin*

Eine 0,5 ng/ml-konzentrierte Poly-L-Lysin-Stocklösung wurde auf 50 ng/ml mit sterilem ddH<sub>2</sub>O verdünnt, die Kulturgefäße mit der Lösung bedeckt und 1 h lang auf RT inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde abgesogen, das beschichtete Kulturgefäß 2-fach mit ddH<sub>2</sub>O

gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Eine Lagerung der Poly-L-Lysin-beschichteten Kulturgefäße war nach Abdichten mit Parafilm bei 4°C möglich.

#### **3.4.2.4 Passagieren von Zelllinien**

Das Subkultivieren, das sogenannte *Splitten* der Zellen, erfolgte, sobald diese einen konfluenten *Monolayer* gebildet hatten. Hierfür wurde das Medium abgesogen, die Kultur einmal mit PBS gewaschen und als nächstes durch Einwirkung von Trypsin-EDTA abgelöst. Für ein 1:3-*Splitten* verwendete man je 3 ml Trypsin auf eine Kulturflasche von 75 cm<sup>2</sup> Fläche. Endothelzellen wurden zusätzlich nach der PBS-Spülung mit einer kleinen Menge Trypsin gewaschen. Nach Ablösen der Zellen wurde die Enzymwirkung durch Zugabe von 6 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellsuspension aufgenommen und entsprechend auf 3 neue Kulturgefäße aufgeteilt. Verwendete Kulturschalen wurden mit frischem Medium auf den entsprechenden Stand befüllt.

#### **3.4.2.5 Kryokonservieren von Zellen**

Zum Einfrieren von Zellproben wurden die Zellen, wie in der Beschreibung des Passagierens geschrieben, vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst, mit reichlich Medium in ein 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min lang bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesogen und das verbliebene Sediment mit dem Einfriermedium aufgenommen. Hierzu wurden die Zellen aus einer Kulturflasche von einer 75 cm<sup>2</sup> großen Fläche in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und als nächstes je 1 ml davon auf ein zuvor auf Eis gekühltes Kryoröhrchen (Nunc) portioniert. Für das Einfrieren wurde das bisher verwendete Kulturmedium mit 20% FCS-Anteil und mit 10% DMSO versetzt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C eingefroren und nach spätestens 3 Tagen für eine Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Zur Qualitätsüberprüfung der eingefrorenen Zellen wurde nach einer Woche ein Kryoaliquot probeaufgetaut (siehe 3.4.2.6).

#### **Einfriermedium:**

9 ml Medium mit 20% FCS-Anteil und Penizillin-Streptomycin-Zusatz  
1 ml DMSO

#### **3.4.2.6 Auftauen von kryokonservierten Zellen**

Zum Auftauen der Zellen wurden die eingefrorenen Kryoröhrchen mit einer geringen Menge erwärmtem Mediums gefüllt, und das aufgetaute Einfriermedium mit den gefrorenen Zellen in

ein 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde 5 min lang bei 250 g zentrifugiert, der Überstand abgesogen, das Zellsediment in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine entsprechende Kulturflasche überführt.

### **3.4.3 Transfektion von Zellen**

#### **3.4.3.1 Transfektion von Endothelzellen mit Effectene™ (Qiagen)**

Das Effectene™ Transfektionsreagenz wurde zur Transfektion von konfluenten Endothelzellen verwendet und wird in Verbindung mit einem Enhancer und einem DNA-Kondensierungspuffer verwendet. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf Zellen, die auf einer Fläche einer Kulturplatte mit 12 Vertiefungen ausgesät wurden. Im ersten Schritt der Reaktion erfolgte die Bildung eines DNA-Enhancer-Komplexes, zu dem 0,5 µg Plasmid-DNA mit 70 µl EC-Puffer suspendiert wurden. Durch Zugabe des Enhancers und einer anschließenden 5-minütigen Inkubation auf RT in einem 3-fachen des DNA-Volumens erfolgte eine DNA-Enhancer-Komplexbildung. Daraufhin wurde ein 2-faches des DNA-Volumens an Effectene™-Reagenz beigefügt, wodurch eine Komplexbildung mit dem Transfektionsreagenz erfolgte. Nach sorgfältigem Mischen der Lösung und einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurde der Lösung 600 µl DMEM beigefügt und gemischt. Im Anschluss darauf wurde die Lösung langsam und tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 24 h wurde das Transfektionsreagenz abgesaugt und mit frischem MEM-Medium ersetzt.

#### **3.4.3.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit Polyfect™ (Qiagen)**

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 60%. Hierzu wurde 0,5 µg Plasmid-DNA mit 6 µl des Genporter-Transfektionsreagenzes gemischt und 10 min lang auf RT inkubiert. Danach wurde 600 µl MEM-Medium mit der Transfektionslösung suspendiert und langsam auf die Zellen pipettiert. Nach 24 h wurde das Transfektionsreagenz abgesaugt und mit frischem MEM-Medium ersetzt.

### **3.4.4 Herstellung von Hormon-bereinigtem FCS**

Für die Reinigung des FCS von natürlich vorkommenden Hormonen wurde in einem Messzylinder 5,61 g Aktivkohle in 170 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nachdem die Aktivkohle ein Sediment gebildet hatte, wurde das ddH<sub>2</sub>O abgenommen und die beiden Schritte zweimal wiederholt. Parallel wurde 0,56 g Dextran-T70 in einer geringen Menge PBS gelöst und das Aktivkohlesediment mit 170 ml PBS gemischt, woraufhin beide Lösungen miteinander vermengt und mit Hilfe eines Magnetrührers gelöst wurden. Je 17 ml der entstandenen

Lösungen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und bei 1000 g 20 min lang zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde entfernt und die Falcon-Röhrchen auf 50 ml mit hitzeinaktiviertem FCS (1 h lang auf 56°C inkubiert) aufgefüllt. Die Gefäße wurden als nächstes 1 h lang bei 37°C geschüttelt und danach 20 min lang bei 1000 g zentrifugiert. Zum Sedimentieren erfolgte eine Inkubation der Röhrchen samt Inhalt auf 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde der Überstand in eine Spritze aufgenommen und durch einen 0,45 µm Filteraufsatz sterilfiltriert. Die Aliquots mit Hormon-bereinigtem FCS wurden bis zur Verwendung auf -20°C aufbewahrt.

### **3.4.5 Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes**

Endothelzellen wurden auf gelatinisierten Transwell-Filtereinsätzen (BD) für Kulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Der transendotheliale elektrische Widerstand wurde nach Erreichen der Konfluenz des Endothel-*Monolayers* mit Hilfe eines Volt-Ohm-Meter (World Precision Instruments) gemessen. Als Leerwert wurde ein Filter ohne Zellen mitgemessen. Der TER in  $\Omega \times \text{cm}^2$  wurde unter Berücksichtigung des Widerstandes des Leerwertes kalkuliert nach der Formel:

$$\text{TER} = [\text{Messwert (behandelte Zellen)} - \text{Leerwert}] \times \text{Filterfläche}$$

### **3.4.6 Statistische Analyse**

Statistische Unterschiede der verschiedenen Versuchsansätze wurden mittels eines zweiseitigen „student's T-Tests“ (Microsoft Excel™ berechnet. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Mittelwertabweichung angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  (\*) angenommen,  $p < 0,01$  (\*\*) wurden als hochsignifikant angenommen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Dexamethason-Wirkung auf die Expression von VE-Cadherin in cEND-Zellen**

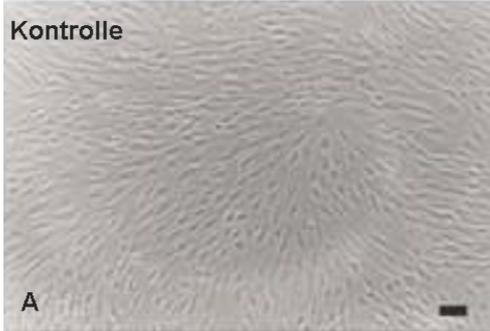
In diesem Teil der Arbeit wurden die Effekte einer GC-Behandlung auf die Protein- und Genexpression von VE-Cadherin, sowie die einhergehenden Veränderungen in der Organisation des filamentösen Aktins (F-Aktins) im murinen BHS-Modell, den cEND-Zellen, untersucht. Der Mechanismus, der zu diesen Veränderungen führt, ist weitgehend unklar.

#### **4.1.1 Dexamethason-induzierte morphologische Veränderungen der cEND-Zellen durch Reorganisation des Zytoskeletts**

Zunächst wurden Behandlungszeitreihen angefertigt, in denen cEND-Zellen in 24 h-Abständen mit 100 nM Dexamethason inkubiert wurden. Lichtmikroskopische Beobachtungen lieferten die ersten Befunde. Eine 72-stündige Applikation von 100 nM Dexamethason führte zu einer deutlichen Morphologieänderung, die sich durch eine Oberflächenvergrößerung manifestierte (Abb. 4.1.1.B), verglichen mit unbehandelten spindelförmig, länglich gewachsenen cEND-Zellen (Abb. 4.1.1.A). Dexamethason-behandelte, sowie unbehandelte cEND-Zellen wurden im folgenden Schritt immunzytochemisch auf VE-Cadherin und F-Aktin markiert. Abb. 4.1.1C zeigt die Immunmarkierung von VE-Cadherin in unbehandelten cEND-Zellen. Die spindelförmige, längliche Anordnung des VE-Cadherins an den Zellgrenzen ist deutlich zu erkennen. Eine GC-Behandlung verursachte hingegen eine verstärkte VE-Cadherin Immunfärbung, sowie eine deutliche Oberflächenvergrößerung der Zellen (Abb. 4.1.1D). Es folgte eine Immunmarkierung mit Alexa-Phalloidin 488 auf F-Aktin, das durch Plaque-Proteine mit VE-Cadherin assoziiert ist. Die Immunfluoreszenz-Untersuchung demonstrierte, eine Umverteilung des F-Aktins in GC-behandelten cEND-Zellen, was sich durch die Ausbildung eines deutlichen und kontinuierlichen, kortikalen Aktin-Ringes (Schnittler, 1998) äußerte, als Korrelat dieser morphologischen Umstrukturierungen (Abb. 4.1.1E). Im Unterschied dazu fanden sich in unbehandelten cEND-Zellen Aktin-Stressfasern, die nach Dexamethason-Behandlung reduziert bzw. nicht mehr nachzuweisen waren (Abb. 4.1.1F).

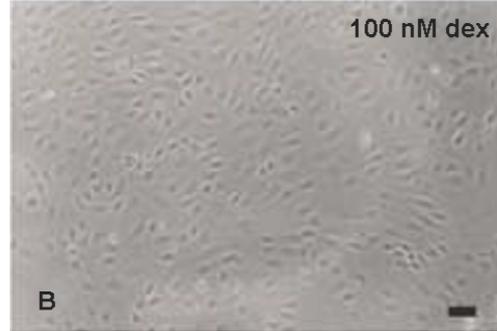
**Aufnahme: Inverses Lichtmikroskop (Olympus)**

Kontrolle



A

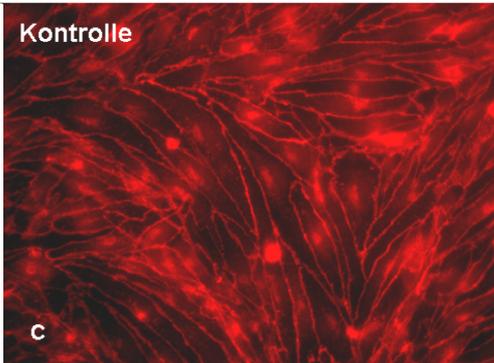
100 nM dex



B

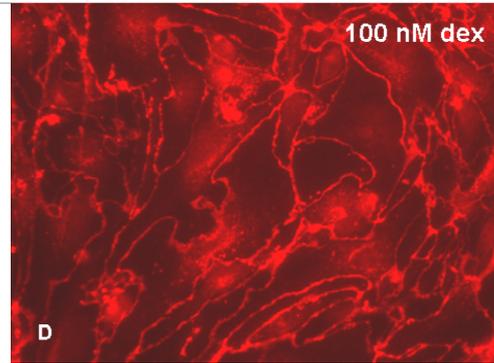
**Immunzytochemie**

Kontrolle



C

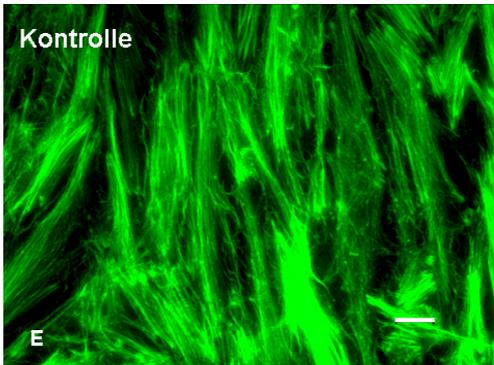
100 nM dex



D

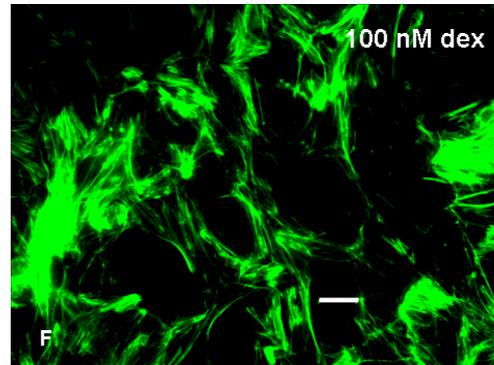
VE-Cadherin (rot)

Kontrolle



E

100 nM dex



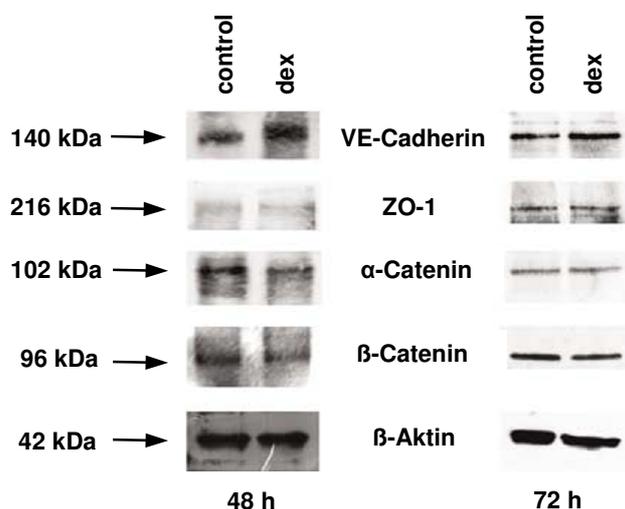
F

F-Aktin (Alexa-Phalloidin 488, grün)

**Abb.: 4.1.1 Morphologische Veränderungen vermittelt durch eine GC-Behandlung in der cEND-Zelllinie.** Konfluente cEND-Zellen wurden 72 h lang mit bzw. ohne 100 nM Dexamethason kultiviert und mit 4% PFA fixiert. A und B stellen lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen dar (Größenbalken: 50  $\mu$ m): A unbehandelte und B Dexamethason-behandelte cEND-Zellen. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen weisen cEND-Zellen von B eine deutliche Morphologieänderung von spindelförmig, länglich (A) zu flächig, breit, auf. C-D stellen fluoreszenzmikroskopische Bilder behandelter und unbehandelter cEND-Zellen dar. Cy3 (rot) markiert ist das VE-Cadherin (Größenbalken: 10  $\mu$ m). D demonstriert verglichen mit C eine Zellflächenvergrößerung. Eine Stressfaser-Markierung durch immunzytochemische Markierung von F-Aktin mit Alexa-Phalloidin 488 ist in E zu sehen. Reduktion der Stressfasern, sowie eine Ausbildung eines prominenten Aktin-Ringes aufgrund der Dexamethason-Behandlung in F zu beobachten.

#### 4.1.2 Induktion der VE-Cadherin-Proteinproduktion durch Dexamethason in cEND-Zellen

Im Zentrum des folgenden Untersuchungsschrittes stand das VE-Cadherin, dessen Veränderungen bereits an den zuvor beschriebenen Immunmarkierungen berichtet wurden. Zusätzlich wurden intrazelluläre Plaque-Proteine der Adhärenskontakte untersucht, wie das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin, sowie ZO-1, welches sich sowohl Occludens- als auch Adhärenskontakte teilen (Schnittler, 1998). Alle Proteine wurden über Western-Blot quantifiziert. Hierzu wurden cEND-Zellen mit und ohne Dexamethason für 48 h und 72 h inkubiert. Anhand der Western-Blot-Daten konnte eine Erhöhung der Proteinexpression des VE-Cadherins detektiert werden. Die densitometrische Analyse der VE-Cadherin-Banden führte zu folgenden Ergebnissen (Abb. 4.1.2): nach 48 h Dexamethason-Behandlungszeit kam es, verglichen mit dem Expressionslevel des VE-Cadherins in unbehandelten cEND-Zellen, das mit 100% gleich gesetzt wurde, zu einer Erhöhung der VE-Cadherin-Proteinexpression um  $49,1 \pm 2,6\%$ . Eine 72 h Dexamethason-Behandlung bewirkte eine Expressionserhöhung um  $30 \pm 6\%$ . Im Gegensatz dazu blieb die detektierte Proteinmenge von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin, sowie ZO-1, in 48 h und 72 h lang behandelten cEND-Zellen unverändert. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

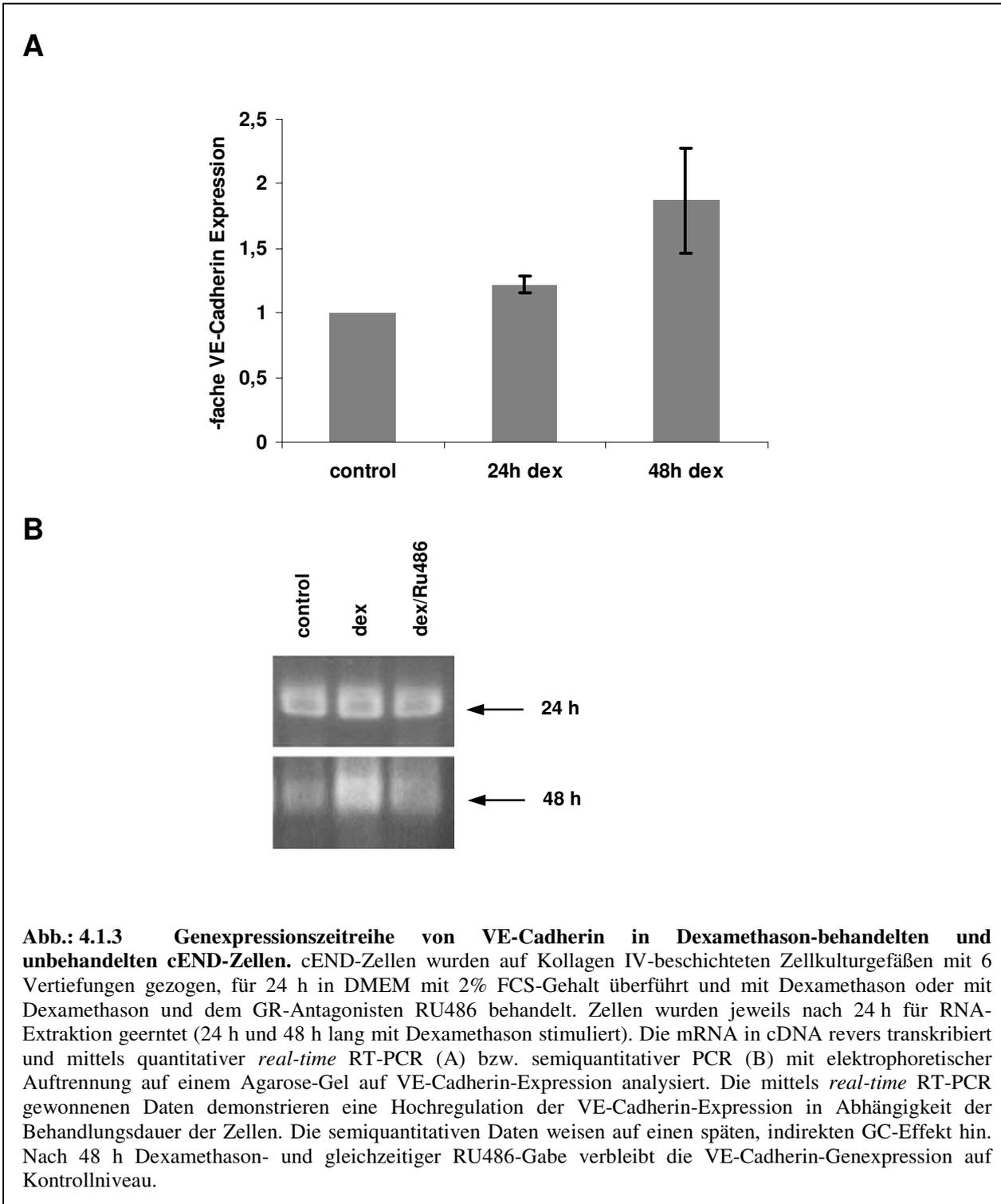


**Abb.: 4.1.2 Auswirkungen einer Dexamethason-Behandlung auf die VE-Cadherin- und Plaque-Proteinexpression in cEND-Zellen.** cEND-Zellen wurden auf 25 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert, für 24 h in DMEM mit 2% FCS-Gehalt überführt und 48 h bzw. 72 h lang mit Dexamethason behandelt und unbehandelt kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 3-fach konzentriertem Laemmli-Puffer aufgenommen, lysiert und nach einer PAA-Gelelektrophorese auf VE-Cadherin, sowie die Plaque-Proteine ZO-1,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin über Western-Blot untersucht. Nach 48 h und 72 h Behandlungszeit konnte ein deutlicher Anstieg der VE-Cadherin-Proteinexpression erkannt werden, verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Zu keiner Zeit der Dexamethason-Behandlung konnten Veränderungen der Plaque-Proteinexpression detektiert werden. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

### 4.1.3 Regulation der VE-Cadherin-Genexpression durch GCs

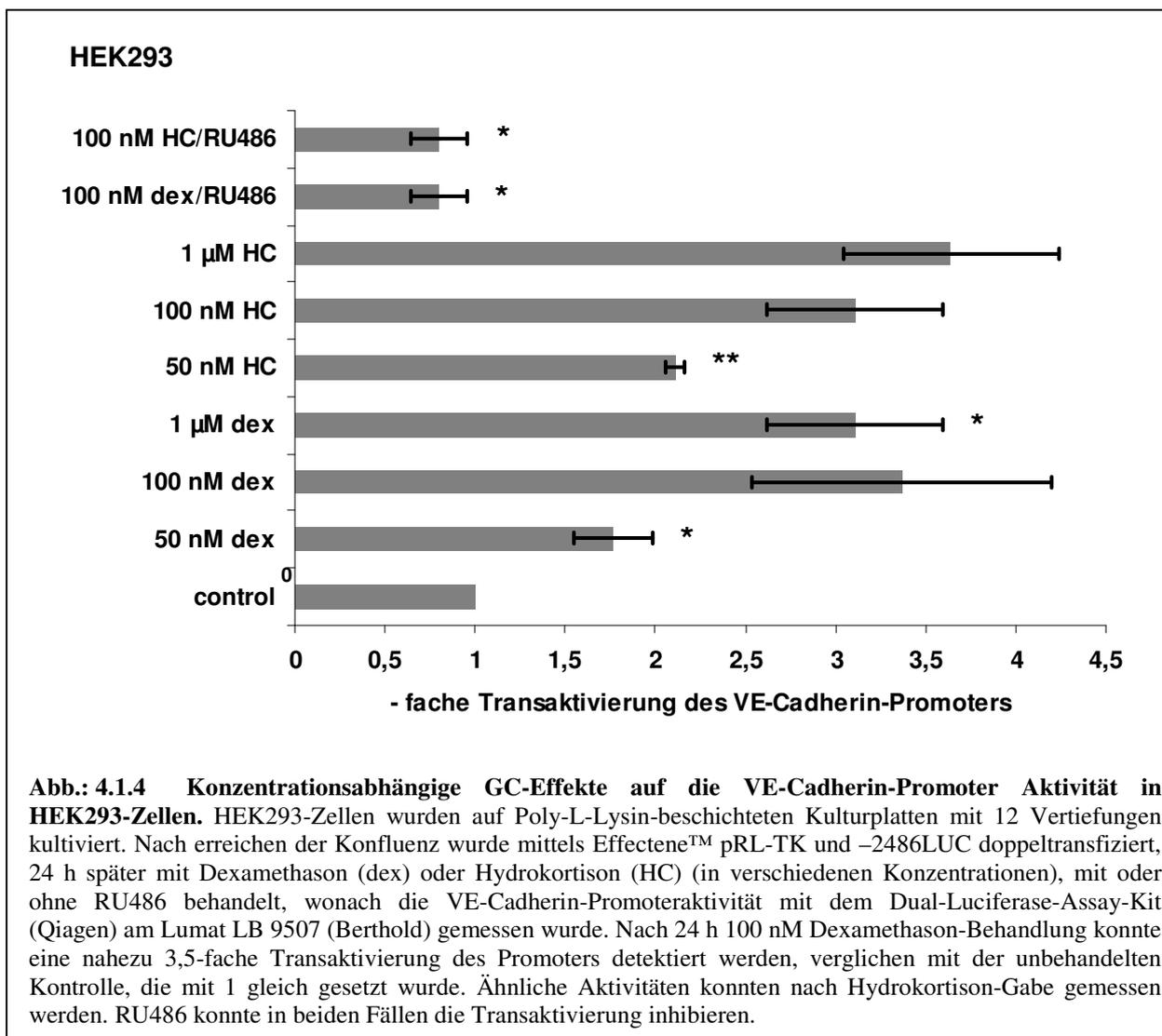
Die positiven Effekte, die durch die Western-Blot-Analysen des VE-Cadherin Proteins in cEND-Zellen aufgezeigt wurden, waren Anlass, die Effekte von GCs auf die Genexpression des VE-Cadherins zu überprüfen. Ebenso wichtig war es, zu ermitteln, ob das VE-Cadherin-Gen zu den direkten Zielgenen der GC-Wirkung gehört. Die Bestimmung des Zeitpunktes der Transkriptionsaktivierung des VE-Cadherin-Gens war Voraussetzung für diese Aufgabenstellung. Somit wurden cEND-Zellen alle 24 h mit 100 nM Dexamethason behandelt und jeweils nach 24 h und 48 h zusammen mit unbehandelten Zellen geerntet. Gesamt-RNA wurde schließlich aus den Zellen isoliert, revers in cDNA transkribiert und auf VE-Cadherin-Transkription mittels quantitativer *real-time* RT-PCR untersucht. Für jede Reaktion wurde die Expression der endogenen Kontrolle, des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gen (GAPDH), mitbestimmt. 24 h nach Beginn der Dexamethason-Behandlung kam es zu einer Erhöhung der Expression um das  $1,22 \pm 0,07$ -fache. Die Inkubationszeit von 48 h verursachte einen maximalen Anstieg der VE-Cadherin-Expression um das  $1,86 \pm 0,41$ -fache, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die mit 1 gleich gesetzt wurde.

Um herauszufinden, ob die Erhöhung der VE-Cadherin-Transkription auf die direkte Wechselwirkung des GRs mit der VE-Cadherin-DNA zurückzuführen ist, wurde die mRNA aus Dexamethason-behandelten cEND-Zellen, sowie mRNA aus simultan mit dem GR-Antagonisten RU486 inkubierten Zellen, auf VE-Cadherin-Expression untersucht. Die revers transkribierte mRNA wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die unter UV-Licht fotografierten Banden, densitometrisch analysiert. Nach nur 24 h konnte weder durch die alleinige Dexamethason-Behandlung ( $0,96 \pm 0,041$ -fache Expression) noch durch die simultane Dexamethason- und RU486-Behandlung ( $1,01 \pm 0,03$ -fache Expression) ein signifikanter Effekt detektiert werden. Nach 48 h fand sich jedoch eine  $1,8 \pm 0,12$ -fache Erhöhung der VE-Cadherin-Expression. Dieser Effekt trat in Gegenwart von RU486 nicht mehr auf, verglichen mit der Kontrolle aus unbehandelten cEND-Zellen.



#### 4.1.4 Dexamethason-vermittelte Transaktivierung des VE-Cadherin-Promoter-Konstruktes in HEK293-Zellen

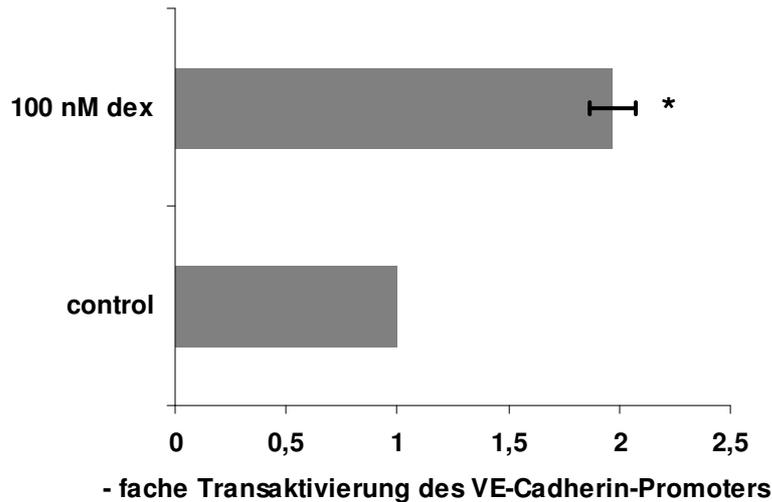
Um die direkt durch den GR vermittelten Effekte auf die VE-Cadherin-Genexpression aufzuzeigen, wurde anschließend die Transaktivierung des VE-Cadherin-Genpromoters 24 h nach Dexamethason-Behandlung getestet. Hierbei wurde das VE-Cadherin-Promoter-Konstrukt -2486LUC (Lelievre *et al.*, 2000) für Transaktivierungsstudien mittels *Luciferase-Assay* eingesetzt. Das Experiment wurde zunächst in HEK293-Zellen, die endogen den GR exprimieren (Oakley *et al.*, 1999), etabliert. Zuvor wurden in Vorversuchen verschiedene Transfektionsmethoden zur Erzielung einer optimalen Transfektionseffizienz getestet. Die Etablierung der Transfektion des Promoter-Konstruktes (siehe Diplomarbeit Blecharz K., 2006) befasste sich mit der Festlegung der angewandten Transfektionsmethode, sowie einer für die Transfektion eingesetzten cDNA-Konzentration. Getestet wurde die Transfektion mittels Permeabilisierung und der Einsatz verschiedener Reagenzien, wie CaCl<sub>2</sub> (eigene Herstellung), Lipofectamine 2000<sup>®</sup> (Invitrogen), GenPorter<sup>™</sup> (GLS), TransFectin<sup>™</sup> (Biorad), sowie Effectene<sup>™</sup> *Transfection Reagent* (Qiagen). Die Transfektion mit Effectene<sup>™</sup> erwies sich als bestgeeignete Methode, um eine Doppeltransfektion mit dem Kontrollvektor pRL-TK und dem -2486LUC-Konstruktes für den *Luciferase-Assay* durchzuführen. In HEK293-Zellen konnte die Transaktivierung des VE-Cadherin-Promoter-Konstruktes -2486LUC von  $3,37 \pm 0,83$ -fach durch 100 nM Dexamethason gemessen werden (Abb. 4.1.4). Zur Errechnung der Ergebnisse wurde die pRL-TK-Aktivität einbezogen. Lysate aus unbehandelten Zellen dienten als Kontrolle und wurden mit 1 gleich gesetzt.



#### 4.1.5 Erhöhung der VE-Cadherin-Promoteraktivität durch Dexamethason-Behandlung in cEND-Zellen

Die in HEK293-Zellen etablierten Transfektionsbedingungen konnten auf den BHS-Kontext übertragen werden. Das VE-Cadherin-Promoter-Konstrukt wurde zusammen mit dem Kontrollvektor pRL-TK unter Verwendung von Effectene™ in konfluente cEND-Zellen transfiziert. Nach 24 h Dexamethason-Behandlung konnte eine  $1,97 \pm 0,1$ -fache Promoteraktivität des -2486LUC-Konstruktes gemessen werden (Abb. 4.1.5).

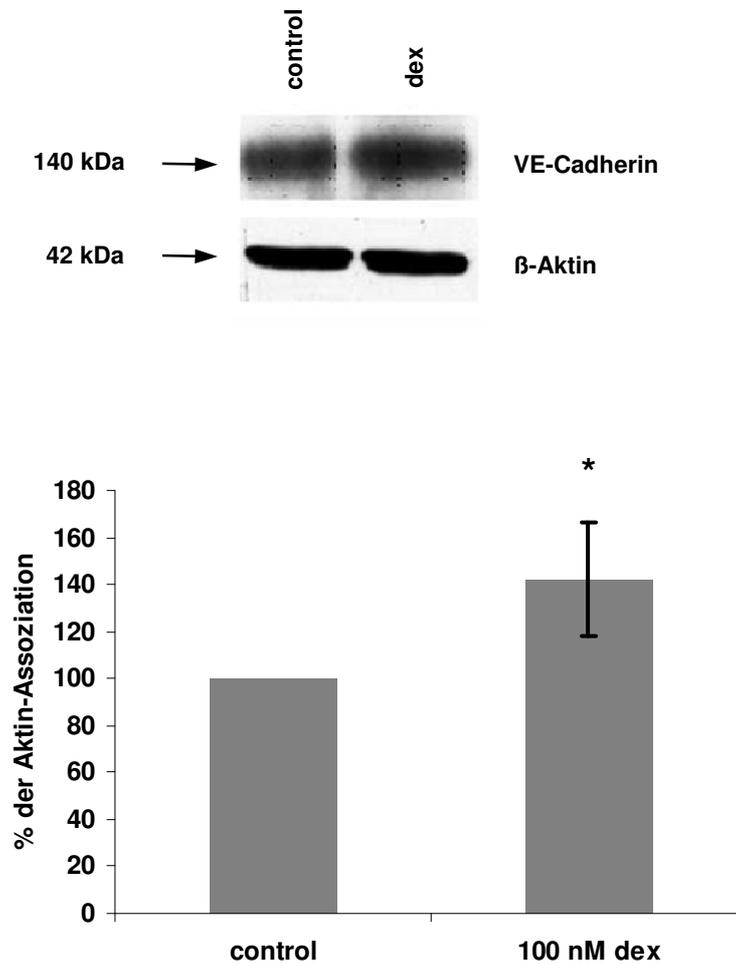
cEND



**Abb.: 4.1.5** Transaktivierung des VE-Cadherin-Genpromoters durch Dexamethason in cEND-Zellen. Konfluente, auf kollagenisierten Kulturschalen mit 6 Vertiefungen gewachsenen cEND-Zellen wurden nach Überführung in DMEM mit 2% FCS-Gehalt mit pRL-TK und dem -2486LUC-Konstrukt transfiziert, und am darauffolgendem Tag 24 h lang mit 100 nM Dexamethason (dex) stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach Lyse der Zellen konnte eine fast 2-fache Transaktivierung des VE-Cadherin-Promoters gemessen werden, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, die mit 1 gleich gesetzt wurde.

#### 4.1.6 Dexamethason-induzierte Verstärkung der VE-Cadherin-Verankerung an das Aktin-Zytoskelett: Zytoskelett-Assoziationsassay

Die Funktion der Endothelbarriere ist im großen Maße abhängig von den endothelialen Junctionen und deren Verankerung am Aktin-Zytoskelett. Mit dem Zytoskelett-Assoziationsassay ist es möglich, die Menge des am Zytoskelett-verankerten VE-Cadherins zu bestimmen. Mittels dieser Methode kommt es zu einer Zellysatauftrennung durch das Detergens Triton X-100 in zytosolische und Zytoskelett-assoziierte Zellbestandteile. Im Detergens-unlöslichen Niederschlag, also der Zytoskelett-Fraktion, können alle Zytoskelett- und zytoskelettverankerten Proteine, ebenso das Zytoskelett-assoziierte VE-Cadherin, über Western-Blot quantifiziert werden. Hierfür wurden konfluente cEND-Zellen mit und ohne 100 nM Dexamethason kultiviert, nach 48 h lysiert, und in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Die densitometrischen Analysen der Western-Blot-Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung des im Zytoskelett verankerten VE-Cadherins um  $42 \pm 24,1\%$  im Vergleich zur Kontrolle, die mit 100% gleich gesetzt wurde (Abb.4.1.6). Als Kontrolle dienten Zytoskelett-Fractionen aus unbehandelten cEND-Zellen.



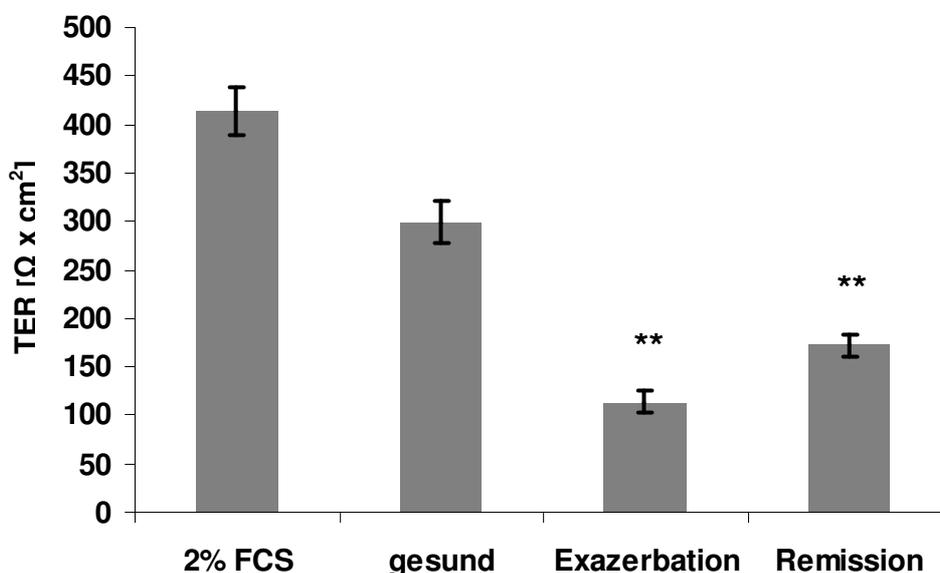
**Abb.: 4.1.6 Folgen der Dexamethason-Behandlung auf die Assoziation von VE-Cadherin an das Aktin-Zytoskelett.** cEND-Zellen wurden auf Kollagen IV-beschichteten 25 cm<sup>2</sup> großen Kulturflaschen bis zum Erreichen der Konfluenz gezogen. Nach Überführen in DMEM mit 2% FCS-Gehalt für 24 h wurden die Zellen 72 h lang mit 100 nM Dexamethason stimuliert und mit Triton X-100-haltigem Puffer fraktioniert. Die Zytoskelett-Phase wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und VE-Cadherin, sowie β-Aktin als Ladekontrolle immunmarkiert. Nach densitometrischer Analyse konnte eine um 42 ± 24,1% erhöhte Assoziation des VE-Cadherins an das Aktin-Zytoskelett gemessen werden.

## 4.2 Wirkung von GCs auf die Barriereigenschaften von MS-Patientenseren-inkubierten cEND-Zellen

Im Krankheitsverlauf der MS kommt es zu einem Zusammenbruch der BHS. Zur Behandlung dieser komplexen Krankheit werden u. a. GCs eingesetzt. Die genaue Wirkungsweise und Effektivität der GCs ist unter diesen pathophysiologischen Bedingungen jedoch weitgehend unerforscht. Im zweiten Teilprojekt der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss MS-Patientenseren auf die Barriereigenschaften des BHS-Modells cEND ausüben und welche Effekte eine GC-Behandlung unter diesen Bedingungen erzielen kann.

### 4.2.1 Erniedrigung des TERs in cEND-Zellen durch Behandlung mit MS-Patientenseren

Die Occludens- und Adhärenskontaktproteine Claudin-5, Occludin, sowie das VE-Cadherin gehören zu den Schlüsselmediatoren der besonders hohen endothelialen Dichtigkeit im Gehirn. Veränderungen der Topologie oder Expression dieser Moleküle wirkt sich auf Permeabilität des Endothelzell-*Monolayers* aus. Gemessen wurde der TER an cEND-Zellen, die zuvor 48 h mit Seren von gesunden Probanden, sowie Seren von Patienten im Exazerbations- bzw. Remissionsstadium der MS behandelt wurden. Zunächst wurde der TER an Zellen gemessen, die 48 h in DMEM mit einem 2% Gehalt GC-bereinigten FCS kultiviert wurden. Diese Zellen wiesen einen TER von  $413 \pm 25 \Omega \times \text{cm}^2$  auf. Bei cEND-Zellen, die in 2% Serum Gesunder kultiviert wurden, konnte ein niedrigerer TER von  $299 \pm 21 \Omega \times \text{cm}^2$  gemessen werden. Dieser Wert wurde als Kontrollwert genutzt und mit 100% gleich gesetzt. cEND-Zellen, die in DMEM mit 2% Seren von Exazerbationspatienten inkubiert wurden, wiesen einen deutlich erniedrigten TER von  $114 \pm 11 \Omega \times \text{cm}^2$  auf, der  $38,1 \pm 3,2\%$  des Kontrollwertes darstellte. Die Behandlung der cEND-Zellen mit Serum von Remissionspatienten verursachte ebenfalls eine Erniedrigung des TERs auf  $172 \pm 12 \Omega \times \text{cm}^2$ , also  $49,8 \pm 3,5\%$  der Kontrolle.



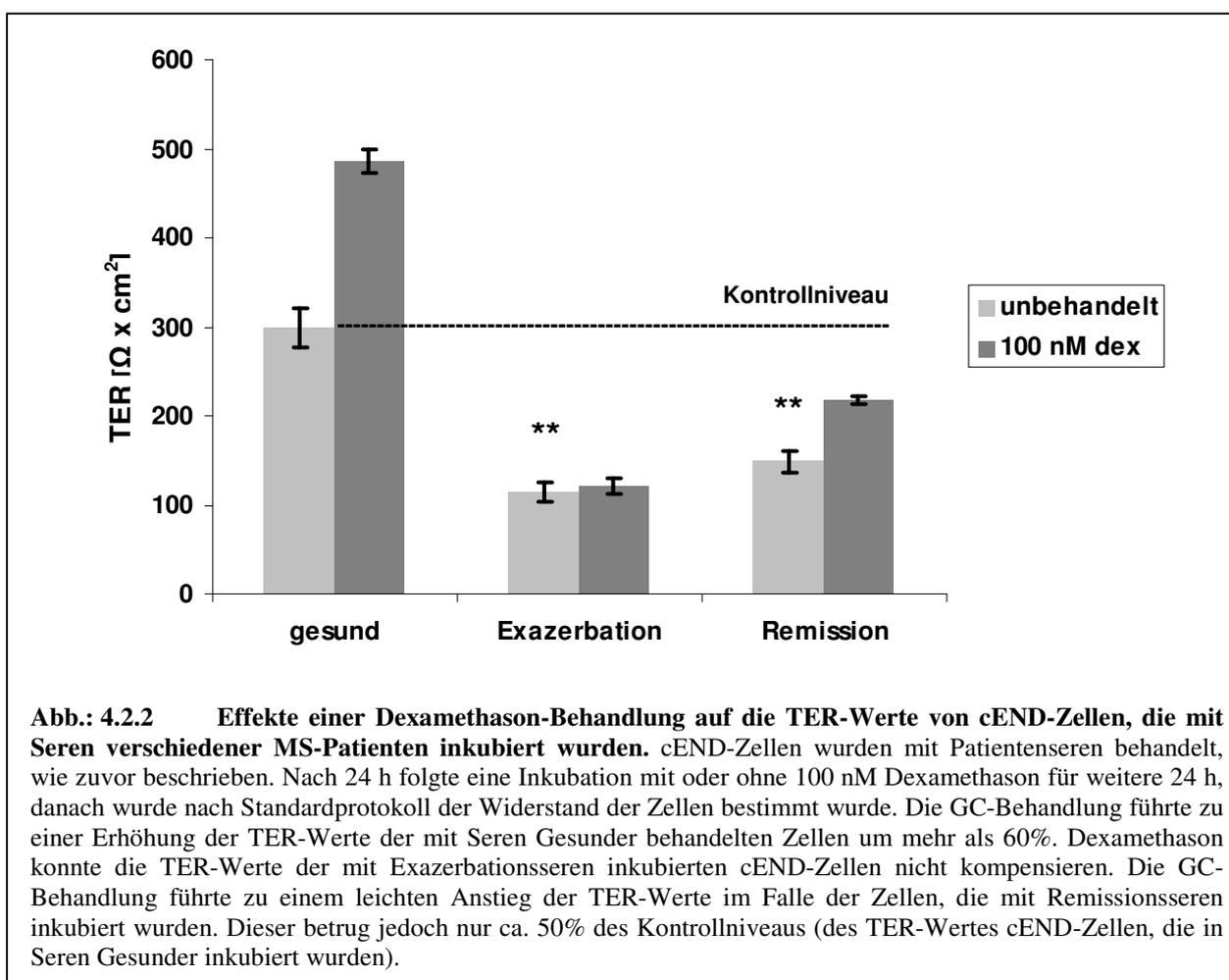
**Abb.: 4.2.1 Änderungen der TER-Werte nach Inkubation der cEND-Zellen in Seren verschiedener MS-Patienten.** Konfluente, auf Kollagen IV-beschichtete Transwell-Filter ausgesäte cEND-Zellen wurden für 24 h auf 2% FCS-haltiges DMEM überführt. Danach wurde ein Teil der Zellen in DMEM mit 2% Patientenserum bzw. Seren gesunder Probanden überführt und 48 h lang darin kultiviert. TER-Werte wurden unter Berücksichtigung des Widerstandes der Leerfilter mittels 2 Elektroden (World Precision Instruments, Inc., New Haven, CT; USA) gemessen. cEND-Zellen, die mit Seren Gesunder inkubiert wurden, wiesen einen etwas niedrigeren TER auf, verglichen mit Zellen, die in DMEM mit 2% FCS-Gehalt kultiviert wurden. Die Inkubation mit Krankheitsseren führte zu einer Erniedrigung des TERs um mehr als 50%; mit Exazerbationsseren inkubierte cEND-Zellen wiesen die höchste Permeabilität auf, verglichen mit Zellen, die mit Seren gesunder Probanden inkubiert wurden.

#### 4.2.2 Keine Wiederherstellung des TERs nach Dexamethason-Behandlung in cEND-Zellen nach Inkubation mit MS-Patientenserum

cEND-Zellen wurden für insgesamt 48 h in DMEM mit einem 2% Gehalt MS-Patientenserum gehalten. Nach 24 h dieser Inkubation erfolgte eine Behandlung mit 100 nM Dexamethason für 24 h, woraufhin der TER bestimmt wurde. Der TER, der an cEND-Zellen ermittelt wurde, die mit Serum Gesunder inkubiert wurden und unbehandelt blieben, diente als Kontrolle und betrug  $299 \pm 21 \Omega \times \text{cm}^2$  bzw. 100%. Die Behandlung mit Dexamethason verursachte eine Erhöhung des gemessenen TERs auf  $486 \pm 13 \Omega \times \text{cm}^2$ , was  $162,5 \pm 3,8\%$  der Kontrolle betrug. Im Unterschied dazu, führte eine gleichzeitige Behandlung mit Dexamethason zu keinem Anstieg des TERs bei cEND-Zellen, die mit Exazerbationsseren inkubiert wurden. Hierbei stieg der TER von  $114 \pm 11 \Omega \times \text{cm}^2$  auf  $120 \pm 9 \Omega \times \text{cm}^2$ , was  $105,3 \pm 5,3\%$  der unbehandelten cEND-Zellen dieser Serie darstellte. Die Behandlung von cEND-Zellen, die zuvor mit Serum von Remissionspatienten inkubiert wurden, führte zu einem geringen

Anstieg des TER vom Kontrollwert der unbehandelten Zellen (100%): von  $149 \pm 12 \Omega \times \text{cm}^2$  (100%) auf  $218 \pm 4 \Omega \times \text{cm}^2$ ,  $146,3 \pm 2,6\%$  der unbehandelten Zellen.

Zusammenfassend zeigen die TER-Ergebnisse, dass die Inkubation mit MS-Patientenseren zu einer gesteigerten Permeabilität des cEND-Monolayers führte. Eine Dexamethason-Behandlung bewirkte jedoch keine Wiederherstellung des TERs auf das Kontrollniveau.



#### 4.2.3 Unterschiedliche Effekte auf die Expression von TJ-Proteinen vermittelt durch die Inkubation mit MS-Patientenseren

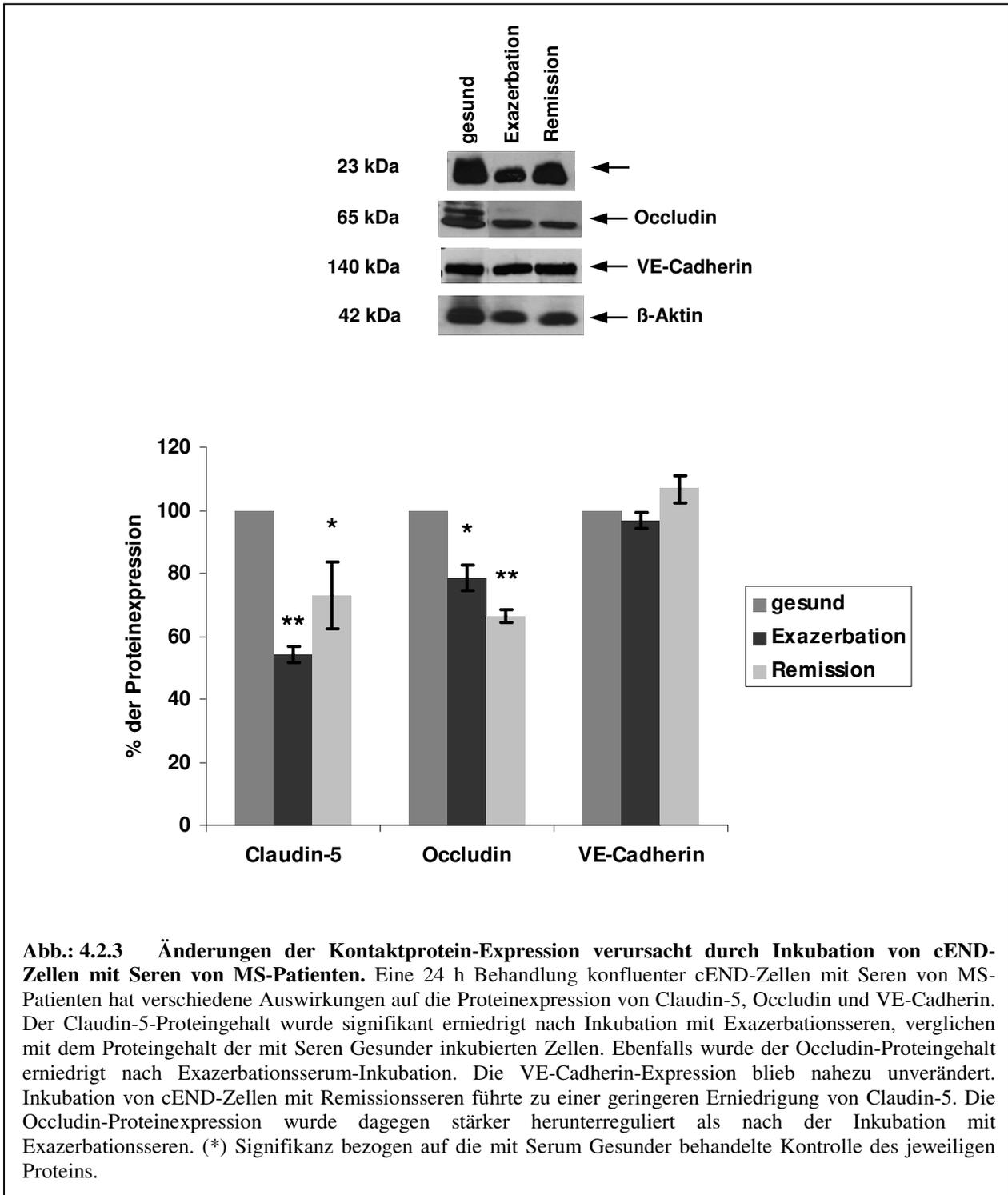
Die Proteine des Occludens- und Adhärenskontakt-Komplexes gewährleisten die Dichtigkeit und die Integrität der BHS. Um die Ursache der Permeabilitätssteigerung der mit Krankheitsseren inkubierten cEND-Monolayer aufzuklären, wurden Änderungen in der Expression der Junctionproteine über Western-Blot untersucht. Hierfür wurden cEND-Zellen im Standard-Versuchsaufbau mit Patientenseren inkubiert und Lysate hergestellt. Die Resultate aus den Proteinanalysen wurden mittels Densitometrie quantifiziert und graphisch

dargestellt. Untersucht wurden drei Proteine des junctionalen Komplexes: Claudin-5, Occludin, sowie das VE-Cadherin. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mitbestimmt.

Im Falle des Claudin-5 konnte bei cEND-Zellen, die mit Seren von Exazerbationspatienten inkubiert wurden, eine Erniedrigung des Proteingehaltes beobachtet werden. Diese betrug  $54,34 \pm 19,6\%$  der Kontrolle, also cEND-Zellen, die mit Seren Gesunder inkubiert und mit 100% gleich gesetzt wurde. Bei cEND-Zellen, die mit Seren von Remissionspatienten inkubiert wurden, kam es zu einer herabgesetzten Claudin-5 Proteinexpression, die  $72,7 \pm 10,6\%$  der Kontrolle betrug. Die Western-Blot-Analyse von Claudin-5 stimmt somit mit den Ergebnissen der TER-Messung überein.

Als nächstes wurden Änderungen der Proteinexpression von Occludin in Abhängigkeit von der Behandlung mit verschiedenen Patientenseren untersucht. Hier zeigte sich, dass die Inkubation mit Seren von Exazerbationspatienten eine Herunterregulation des Occludin-Proteinlevels auf  $78,4 \pm 4,1\%$  der Kontrolle verursachte. Es kam durch die Inkubation mit Seren von Remissionspatienten sogar zu einer noch stärkeren Erniedrigung der Occludin-Proteinlevel auf  $66,5 \pm 2,1\%$  der Kontrolle.

Ebenfalls wurden über Western-Blot die Proteinlevel des VE-Cadherins untersucht. Dabei erwiesen sich nach Inkubation mit den verschiedenen Patientenseren kaum Änderungen in der Expression dieses Proteins. Nach Inkubation mit Exazerbationsseren konnte eine VE-Cadherin-Proteinexpression von  $96,8 \pm 2,6\%$  detektiert werden. Die Inkubation der cEND-Zellen mit Seren von Remissionspatienten verursachte eine VE-Cadherin-Expression auf  $106,6 \pm 4,1\%$ .

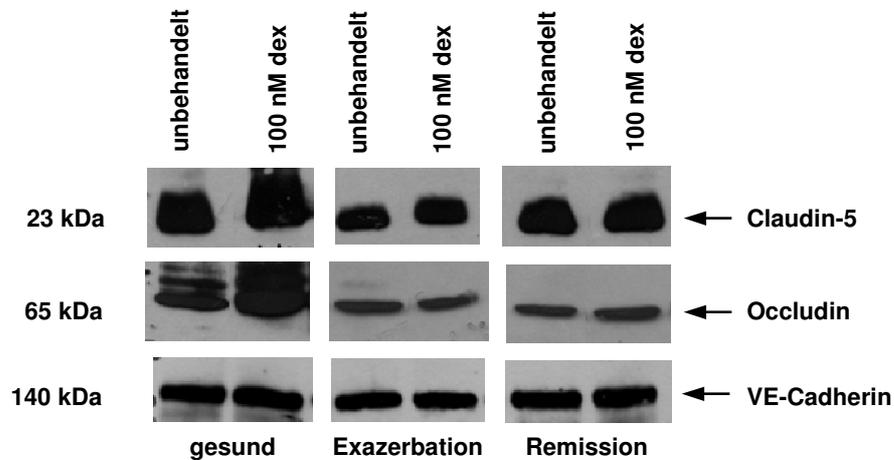


#### 4.2.4 Geringe Veränderungen der Expression junctionaler Proteine in mit MS-Krankheitsseren inkubierten cEND-Zellen nach Dexamethason-Behandlung

In weiteren Experimenten wurden Dexamethason-Effekte auf die Proteinexpression von Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin in cEND-Zellen ermittelt, die wie in den vorangehenden Versuchsanordnungen mit Patientenseren inkubiert wurden. Eine 24 h

Dexamethason-Behandlung von cEND-Zellen, die mit Seren gesunder Probanden inkubiert wurden, resultierte in einer  $117 \pm 6,3\%$  Claudin-5-Proteinexpression (gesund + dex), verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (gesund unbehandelt), die mit 100% gleich gesetzt wurde. Dexamethason verursachte in cEND-Zellen, die zuvor mit Exazerbationsseren inkubiert wurden (Exazerbation + dex), eine Claudin-5-Proteinexpression von  $112,13 \pm 10,8\%$ , im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Exazerbation unbehandelt). Die Claudin-5-Proteinmenge in Remissionsseren inkubierten cEND-Zellen nach Behandlung mit Dexamethason betrug  $105,11 \pm 2,3\%$  (Remission + dex). Außerdem wurden Dexamethason-Effekte auf die Expression des Occludin-Proteins in Patientenseren inkubierten cEND-Zellen bestimmt. Hierbei kam es zu einer Hochregulation der Occludin-Proteinexpression in Dexamethason-behandelten cEND-Zellen, die zuvor mit Seren gesunder Probanden inkubiert wurden. Diese gemessene Proteinmenge stellte  $191 \pm 10,2\%$  der unbehandelten Kontrolle dar, die mit 100% gleich gesetzt wurde. Die Dexamethason-Behandlung verursachte eine Erniedrigung der Occludin-Proteinexpression in cEND-Zellen, die in Exazerbationsseren inkubiert wurden (Exazerbation + dex) auf  $73,9 \pm 10,8\%$  der unbehandelten Kontrolle (Exazerbation unbehandelt). Zellen, die mit Remissionsseren inkubiert und zusätzlich mit 100 nM Dexamethason behandelt wurden, wiesen  $110,9 \pm 2,4\%$  (Remission + dex) der Occludin-Kontrolllevel auf (Remission unbehandelt).

Eine Dexamethason-Behandlung hatte kaum Einfluss auf die VE-Cadherin-Proteinexpression. Nach Inkubation der cEND-Zellen mit Seren gesunder Probanden kam es durch die darauffolgende Dexamethason-Behandlung zu einer Expression von  $101,2 \pm 5,9\%$  (gesund + dex) der unbehandelten Kontrolle (gesund unbehandelt). cEND-Zellen, die nach einer Inkubation mit Exazerbationsseren mit Dexamethason behandelt wurden (Exazerbation + dex), wiesen eine VE-Cadherin-Proteinexpression von  $112,8 \pm 3,4\%$  der unbehandelten Kontrolle (Exazerbation unbehandelt) auf. Dexamethason beeinflusste die VE-Cadherin-Proteinlevel der cEND-Zellen, die mit Remissionsseren inkubiert wurden, kaum- die Proteinlevel in diesem Falle betragen  $100 \pm 2,9\%$  (Remission + dex), verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Remission unbehandelt).



**Abb.: 4.2.4 Effekte der Dexamethason-Behandlung auf die Kontaktprotein-Expression in in Krankheitseren inkubierten cEND-Zellen.** cEND-Zellen wurden für Western-Blot-Versuche auf Kollagen IV-beschichteten Kulturflaschen ausgesät und nach zuvor beschriebenem Standardprotokoll mit DMEM mit 2% Patientenserum-Gehalt inkubiert. Nach 24 h der Inkubation folgte eine Hinzugabe 100 nM Dexamethasons für weitere 24 h. Die erhaltenen Banden wurden densitometrisch analysiert. Dexamethason verursachte im Falle der cEND-Zellen, die mit Seren Gesunder inkubiert wurden, eine Hochregulation der Claudin-5- und Occludin-Proteinexpression. VE-Cadherin-Niveaus aus dem gleichen experimentellen Ansatz wiesen eine geringe Hochregulation der Proteinexpression von VE-Cadherin auf. VE-Cadherin-Mengen blieben unbeeinträchtigt nach Dexamethason-Behandlung im Falle der Inkubation mit beiden Krankheitseren. Im Falle von Claudin-5 führte die 24 h Dexamethason-Behandlung zu einer Hochregulation bei gleichzeitiger Inkubation mit Exazerbationsseren. Bei der Remissionsseren-Inkubation kam es nach Dexamethason-Behandlung zu einem leichten Anstieg der Claudin-5-Expression, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Dexamethason verursachte eine Herunterregulation der Occludin-Level in cEND-Zellen, die in Exazerbationsseren inkubiert wurden. Es kam zu einem ca. 10% Anstieg der Occludin-Proteinexpression bei cEND-Zellen, die in DMEM mit Remissionsserum-Gehalt kultiviert wurden, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

#### 4.2.5 Dexamethason-vermittelte Änderungen der Genexpression junktionaler Proteine in mit Patientenserum inkubierten cEND-Zellen

Um herauszufinden, ob die Inkubation in MS-Patientenserum und die daraufhin folgende Dexamethason-Behandlung Einfluss auf die Genexpression der zu untersuchenden Junctionsproteine nehmen, wurden cEND-Zellen anhand der gleichen experimentellen Ansätze mit Patientenserum mit oder ohne Dexamethason inkubiert. Die erhaltenen RNA-Proben wurden mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und mit der quantitativen *real-time* RT-PCR analysiert. Tabelle 4.2.1 fasst die Ergebnisse der *real-time* RT-PCR-Analysen zusammen. Als Kontrollen für alle Messungen dienten cEND-Zellen, die mit Seren Gesunder inkubiert und nicht mit Dexamethason behandelt wurden. Es fand sich eine Induktion der Occludin-Transkription, verursacht durch die 24-stündige Dexamethason-Behandlung, in mit Seren Gesunder inkubierten cEND-Zellen. Dieselbe Behandlung

verursachte hingegen nur eine sehr schwache Claudin-5 und VE-Cadherin Hochregulation. Der prominenteste Effekt der Dexamethason-Behandlung in cEND-Zellen, die mit Exazerbationsseren inkubiert wurden, konnte erneut im Falle des Occludin-Gens detektiert werden. Verglichen damit, hatte die Inkubation mit Exazerbationsseren fast keinen Einfluss auf die Genexpression von Occludin und VE-Cadherin. Die Genexpression von Claudin-5 wurde nach Inkubation mit Exazerbationsseren am stärksten negativ beeinflusst. Eine zusätzliche Dexamethason-Behandlung führte zu keiner Induktion der drei Gene. Eine Inkubation der cEND-Monolayer mit Remissionsseren führte zu einer schwachen Herunterregulation des Occludin-Gens, verglichen mit den Kontrolle. Die 100 nM Behandlung mit Dexamethason in cEND-Zellen, die mit Remissionsseren inkubiert wurden, wirkte sich am stärksten auf die Genexpression von Occludin und Claudin-5 aus, bei der die Expressionsaktivierung das  $1,57 \pm 0,01$ -fache und  $1,45 \pm 0,08$ -fach der Kontrolle betrug.

**Tabelle.4.2.1 Dexamethason-Effekte auf die Genexpression von Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin nach Inkubation mit Patientenseren.**

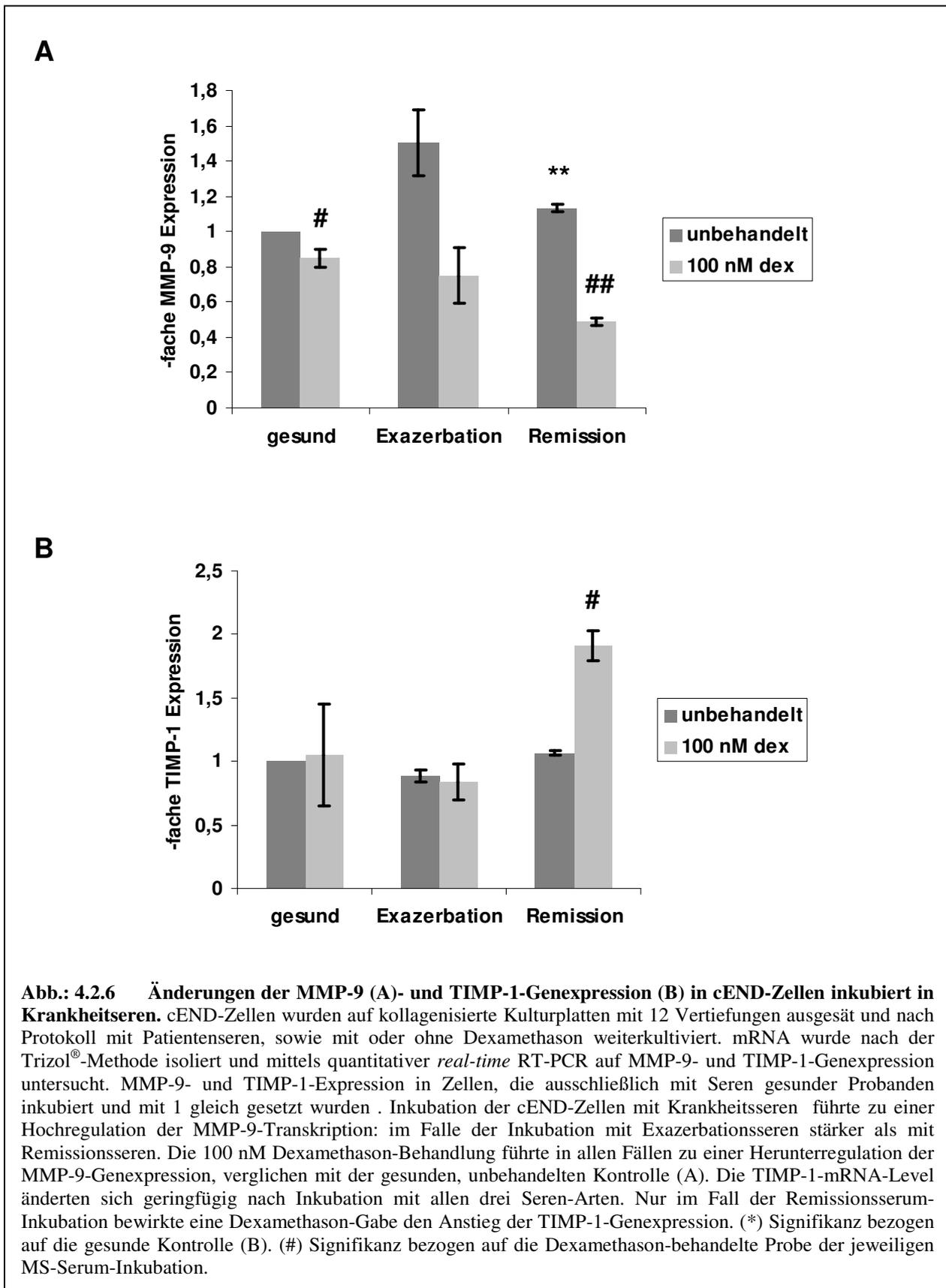
	<b>Claudin-5</b>	<b>Occludin</b>	<b>VE-Cadherin</b>	
	1	1	1	<b>unbehandelt</b>
<b>gesund</b>	$1,48 \pm 0,13$	$1,714 \pm 0,06 (**)$	$1,29 \pm 0,04$	<b>100 nM dex</b>
	$0,777 \pm 0,02$	$1,005 \pm 0,16$	$0,994 \pm 0,12$	<b>unbehandelt</b>
<b>Exazerbation</b>	$0,951 \pm 0,06$	$1,025 \pm 0,14$	$1,14 \pm 0,16$	<b>100 nM dex</b>
	$0,917 \pm 0,02$	$0,876 \pm 0,14$	$0,977 \pm 0,16$	<b>unbehandelt</b>
<b>Remission</b>	$1,57 \pm 0,01$	$1,45 \pm 0,08$	$1,089 \pm 0,19$	<b>100 nM dex</b>

#### **4.2.6 Änderungen der MMP-9- und TIMP-1-Genexpression nach Sereninkubation und Dexamethason-Gabe**

Da die Effekte der Patientenseren auf den TER der cEND-Zellen nur zum Teil mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen korrelieren, wurde die Induktion der MMP-9-, sowie TIMP-1-Expression in cEND-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubation mit den jeweiligen Patientenseren überprüft. Um die Rolle der MMP-9 bei der Degradation der Kontaktproteine zu evaluieren, wurde im folgenden Experiment zunächst eine quantitative *real-time* RT-PCR auf das MMP-9-Gen durchgeführt. cEND-Zellen, die mit Seren gesunder

Probanden inkubiert wurden, dienten als Kontrolle und wurden mit 1 gleich gesetzt. Alle Ergebnisse stehen im Verhältnis zu dieser Kontrolle. Zunächst konnte in cEND-Zellen, die mit Seren von Exazerbationspatienten inkubiert wurden, eine erhöhte MMP-9-Transkriptmenge detektiert werden. Diese war  $1,503 \pm 0,19$ -fach höher als die MMP-9-Expression der gesunden Kontrolle. Eine zusätzliche Dexamethason-Behandlung für 24 h erniedrigte die MMP-9-Expression auf das  $0,751 \pm 0,16$ -fache. Eine Inkubation der cEND-Zellen in DMEM mit 2% Remissionsserum führte zu einem Expressionsanstieg der MMP-9 um das  $1,133 \pm 0,02$ -fache. Eine Dexamethason-Stimulation verursachte auch hier eine Herunterregulation der MMP-9-Genexpression um das  $0,49 \pm 0,02$ -fache. Ebenfalls verursachte eine Dexamethason-Behandlung im Falle der cEND-Zellen, die mit 2% Serum gesunder Probanden inkubiert wurden, eine  $0,849 \pm 0,05$ -fache Transkriptmenge des MMP-9-Gens.

Quantitative *real-time* RT-PCR-Untersuchungen der TIMP-1-Expression zeigten keine Unterschiede nach Inkubation mit den jeweiligen Patientenseren und nach Dexamethason-Behandlung. Inkubation der cEND-Zellen mit Seren Gesunder, sowie eine daraufhin folgende Dexamethason-Gabe bewirkte eine TIMP-1-Genexpression von  $1,05 \pm 0,4$ , verglichen mit der gesunden Kontrolle. Eine Inkubation in Exazerbationsseren führte zu einer  $0,886 \pm 0,05$ -fachen TIMP-1-Expression. Die gemessene TIMP-1-Genexpression nach einer Dexamethason-Behandlung betrug das  $0,834 \pm 0,14$ -fache der Kontrolle. Nach Remissionsseren-Inkubation konnte eine  $1,066 \pm 0,02$ -fache Expression detektiert werden. Dexamethason induzierte hierbei eine Hochregulation des TIMP-1-Gens von  $1,908 \pm 0,12$  der Kontrolle.

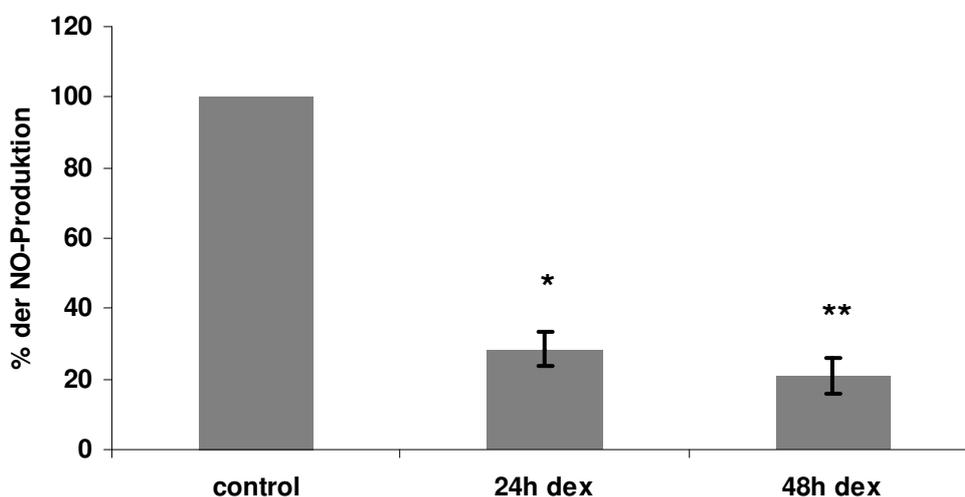


### 4.3 GC-induzierter proteasomaler Abbau des GRs und die Erniedrigung der NO-Produktion im myokardialen Endothel

Die immortalisierte Endothelzelllinie MyEND wurde aus dem Myokard neonataler Mäuse präpariert (Golenhofen *et al.*, 2002). Die Zelllinie wurde erstmals für Untersuchungen der Signalkaskade der NO-Biosynthese im Zusammenhang mit GCs verwendet.

#### 4.3.1 Erniedrigung der NO-Produktion durch Dexamethason-Behandlung in MyEND-Zellen

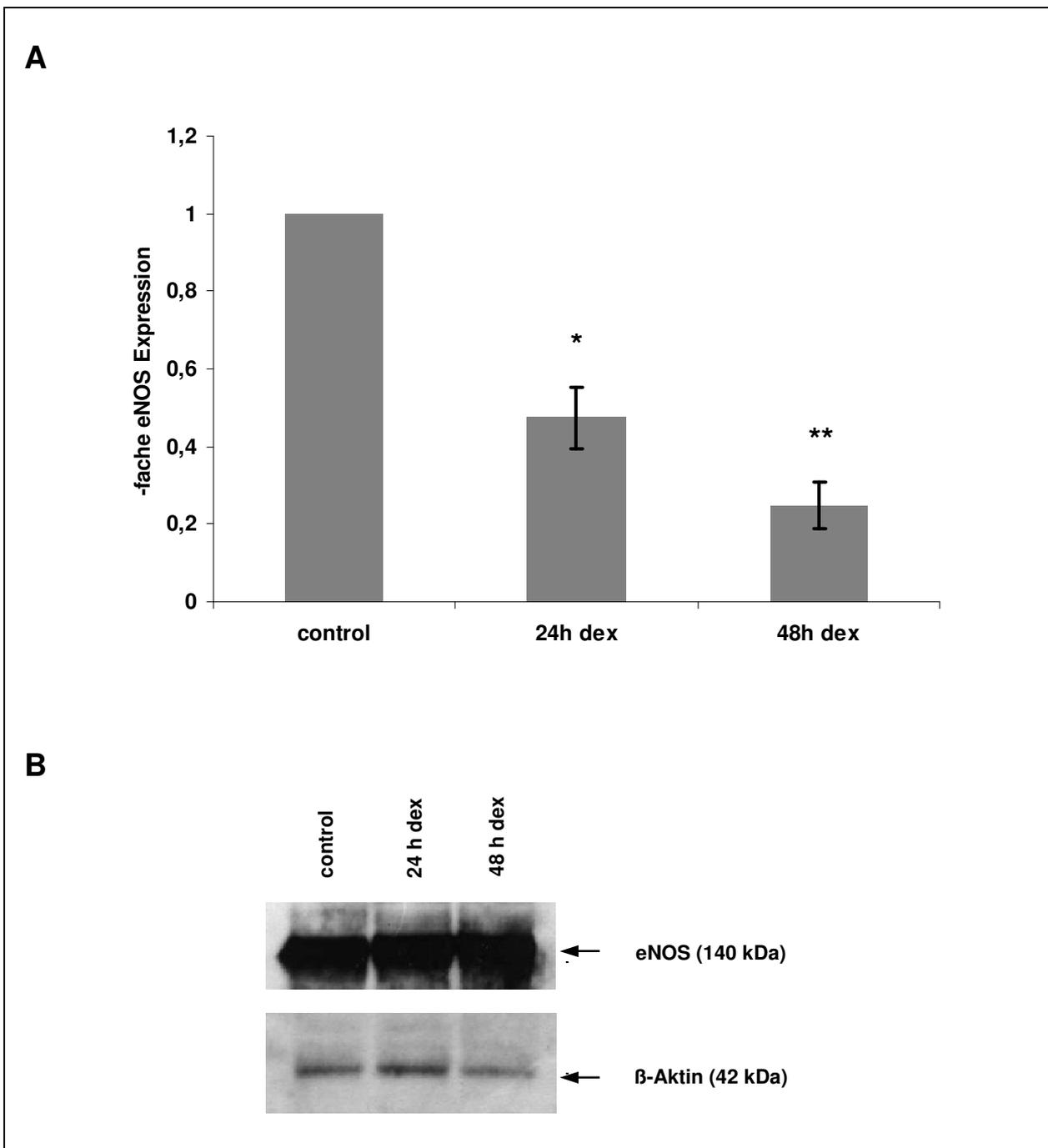
Aus vielen Publikationen ist bekannt, dass GCs eine Erniedrigung der NO-Produktion verursachen (Saruta, 1996; Mitchell & Webb, 2002; Akaike & Matsumoto, 2007). Für NO-Messungen aus dem Mediumüberstand wurden hierzu MyEND-Zellen mit 100 nM Dexamethason behandelt und zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h die Bestimmung von NO durchgeführt. Verglichen mit Proben aus unbehandelten Zellen, konnte bereits nach 24 h Dexamethason-Behandlung eine  $28,4 \pm 4,9\%$  Erniedrigung und nach 48 h eine Erniedrigung von  $21,0 \pm 5,3\%$  des NO-Gehaltes im Mediumüberstand gemessen werden. Die Messung qualifizierte die MyEND-Zelllinie als ein geeignetes Modellsystem für weitere Untersuchungen.

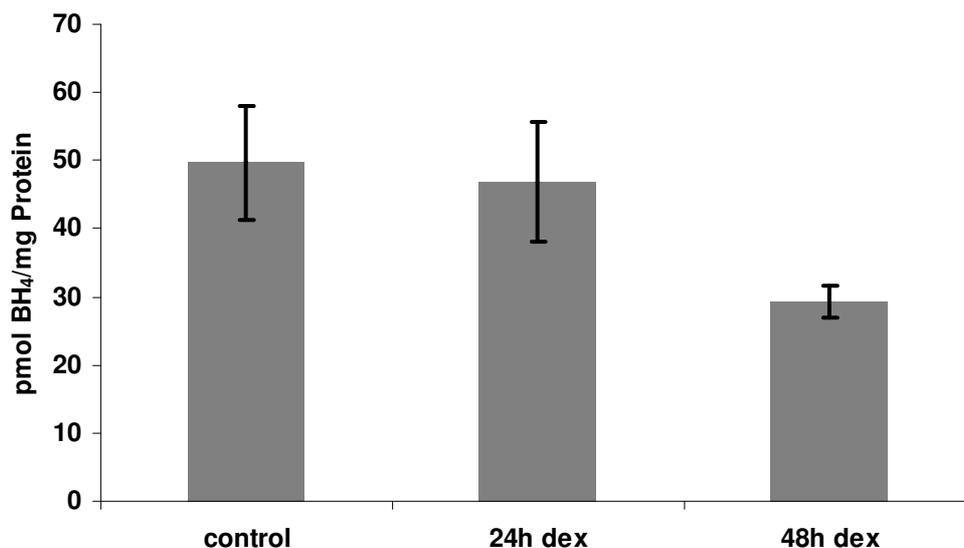


**Abb.: 4.3.1 Negativer Einfluss der Dexamethason-Behandlung auf die NO-Produktion in MyEND-Zellen.** Konfluente MyEND-Zellen wurden für 24 h in Serum-reduziertes Kulturmedium überführt, wonach eine Behandlung mit 100 nM Dexamethason erfolgte. Zellüberstände wurden nach 24 h und 48 h abgenommen und mit 5 mM DAF-2DA für 30 min bei 37°C inkubiert. Fluoremtrische Messung zur Bestimmung des NO-Gehaltes wurde am Victor Wallac Perkin Elmer durchgeführt. NO-Gehalt der unbehandelten Kontroll-Überstände wurde mit 100% gleich gesetzt. Eine GC-Behandlungszeit von 24 h führte zu einer Erniedrigung der NO-Produktion bis zu  $28,4 \pm 4,9\%$  der Kontrolle. Nach 48 h kam es zu einer NO-Produktion von  $21,0 \pm 5,3\%$ .

#### 4.3.2 Keine Veränderungen der eNOS-Proteinexpression trotz erniedrigter NO-Produktion in MyEND-Zellen nach Dexamethason-Gabe

Veränderungen im Produktionsprofil des Vasodilatators NO suggerieren Änderungen in der eNOS-Transkription bzw. Translation. Somit war unser Fokus zunächst auf die mRNA-Ebene der eNOS nach GC-Behandlung gerichtet. Mittels quantitativer *real-time* RT-PCR war es möglich nach 24 h eine  $0,474 \pm 0,08$ -fache Herunterregulation der eNOS-Genexpression zu erheben. 48 h-Behandlung mit dem GC resultierte in einer Erniedrigung der eNOS-Genexpression um das  $0,247 \pm 0,06$ -fache verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, dessen eNOS-Expression mit 1 gleich gesetzt wurde (Abb.4.3.2A).





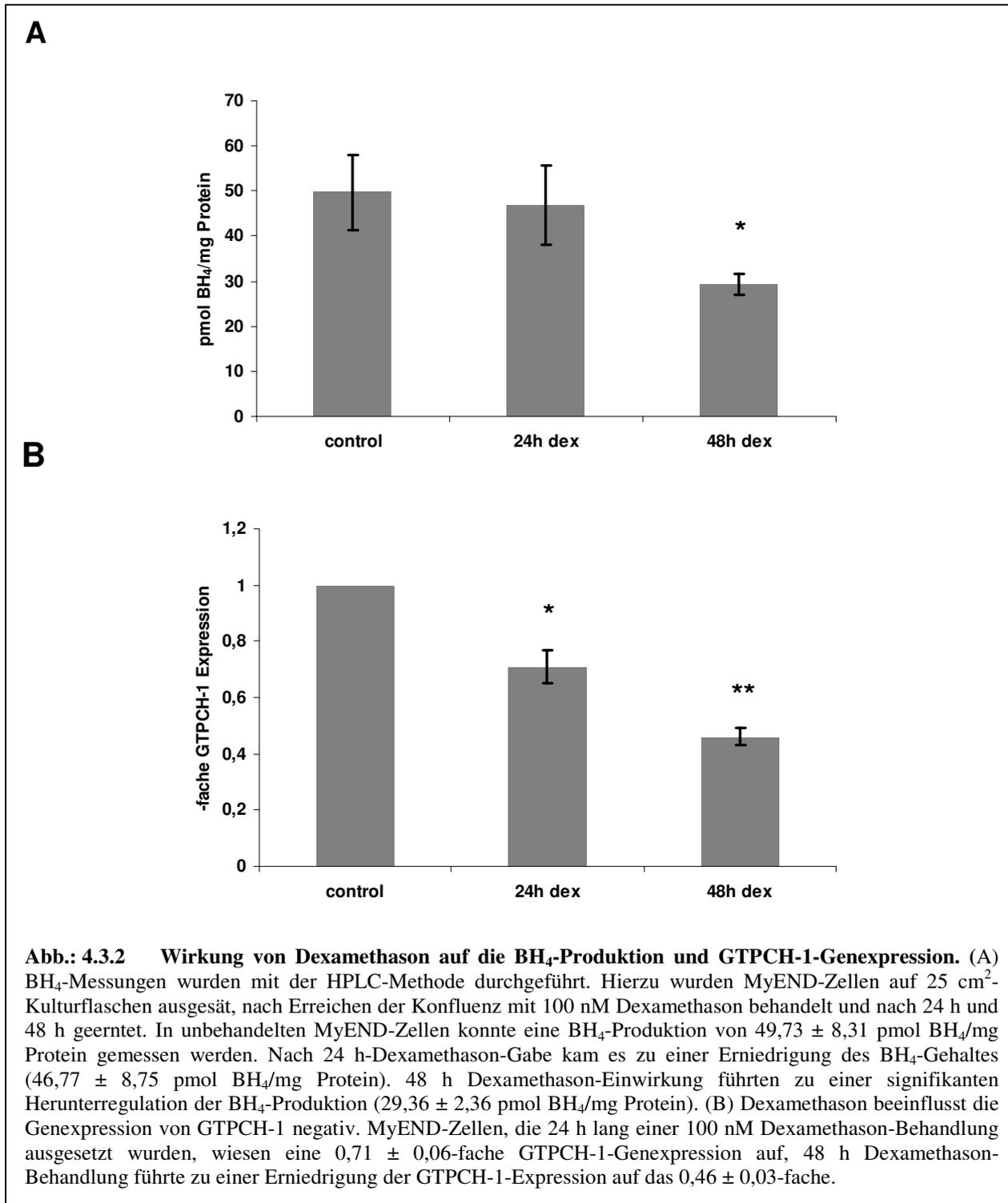
**Abb.: 4.3.2** Effekte der Dexamethason-Behandlung auf die Gen- und Proteinexpression der konstitutiven NOS, eNOS in MyEND-Zellen. Dexamethason-Behandlung verursachte eine Herunterregulation der eNOS-Transkription im Zeitverlauf (A): 24 h GC-Behandlung führte zu einer Erniedrigung der eNOS mRNA-Level auf das  $0,474 \pm 0,08$ -fache, 48 h Behandlung führte zu einer  $0,247 \pm 0,06$ -fachen Erniedrigung der unbehandelten Kontrolle. Eine Herunterregulation der eNOS auf Proteinebene konnte nicht gemessen werden: 24 h-Dexamethason-Behandlung führte zu einer Proteinexpression von  $102,11 \pm 8,72\%$ , nach 48 h zu einer Proteinexpression von  $99,5 \pm 10,4\%$ .

Darüber hinaus zeigten Untersuchungen der eNOS-Proteinlevel keine signifikanten Veränderungen in der eNOS-Expression (Abb.4.3.2B). 24 h Dexamethason-Einwirkung führte zu einer eNOS-Proteinexpression von  $102,11 \pm 8,72\%$ , nach 48 h Dexamethason-Behandlung erreichten die eNOS-Proteinlevel  $99,5 \pm 10,4\%$  der unbehandelten Kontrolle.

#### 4.3.3 Dexamethason-induzierte Erniedrigung der BH<sub>4</sub>-Produktion durch Herunterregulation der GTPCH-1-Expression in MyEND-Zellen

Da Dexamethason-Gabe eine geringe Erniedrigung der eNOS-mRNA nicht aber des Proteins verursacht, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Änderungen in der Expression eines anderen Proteins aus der NO-Biosynthese für die Herunterregulation der NO-Produktion verantwortlich sein könnte. Die Aktivität der eNOS ist maßgeblich von der Bioverfügbarkeit des von der GTPCH-1 produzierten BH<sub>4</sub> abhängig. Um zu überprüfen, ob einer dieser Faktoren auf Dexamethason-Behandlung reagiert, wurden MyEND-Zellen erneut in einer Zeitreihe mit 100 nM Dexamethason behandelt und Proben für eine HPLC-Untersuchung erstellt, mit Hilfe derer die Quantität des BH<sub>4</sub> gemessen werden konnte. Dexamethason-Behandlung verursachte eine geringe Erniedrigung des BH<sub>4</sub>-Gehaltes von  $49,73 \pm 8,31$  pmol

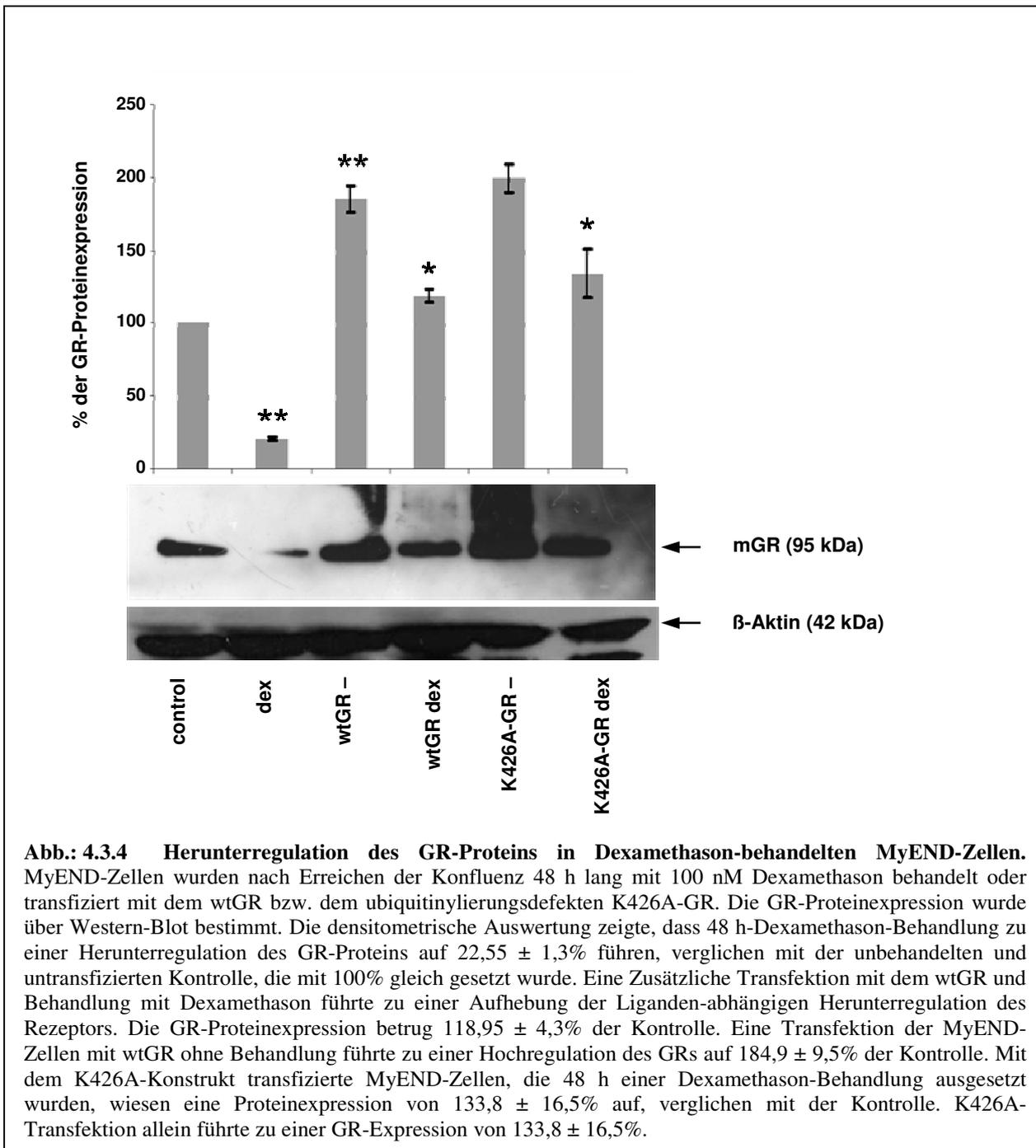
BH<sub>4</sub>/mg Protein (BH<sub>4</sub>-Gehalt unbehandelter MyEND-Zellen) bis  $46,77 \pm 8,75$  pmol BH<sub>4</sub>/mg Protein nach 24 h Behandlung. Nach 48 h Dexamethason-Gabe konnte  $29,36 \pm 2,36$  pmol BH<sub>4</sub>/mg Protein gemessen werden, was verglichen mit der Kontrolle, die mit 100% gleich gesetzt wurde, einer Erniedrigung des BH<sub>4</sub>-Gehaltes von  $58,85 \pm 4,7\%$  entspricht.



Erniedrigte BH<sub>4</sub>-Werte nach Dexamethason-Behandlung deuteten auf eine Herunterregulation der GTPCH-1-Expression hin. Mittels quantitativer *real-time* RT-PCR wurden nun erneut unbehandelte, sowie 24 h und 48 h lang Dexamethason-behandelte MyEND-Zellen untersucht (Abb. 4.3.2.B). Die mRNA-Analysen zeigten bereits nach 24 h Dexamethason-Gabe eine Herunterregulation der GTPCH-1-Genexpression um das  $0,71 \pm 0,06$ -fache, nach 48 h Behandlung konnte eine  $0,46 \pm 0,03$ -fach erniedrigte GTPCH-1-Genexpression nachgewiesen werden. Die GTPCH-1-Expression der unbehandelten Kontrolle wurde mit 1 gleich gesetzt. Die Daten aus der Genexpressionanalyse bestärken die Vermutung, dass die Herunterregulation der GTPCH-1 eine upstream-Ursache für durch die GC-Behandlung verursachte Erniedrigung des NO-Gehaltes sein könnte.

#### 4.3.4 Liganden-abhängige Herunterregulation des GR-Proteins

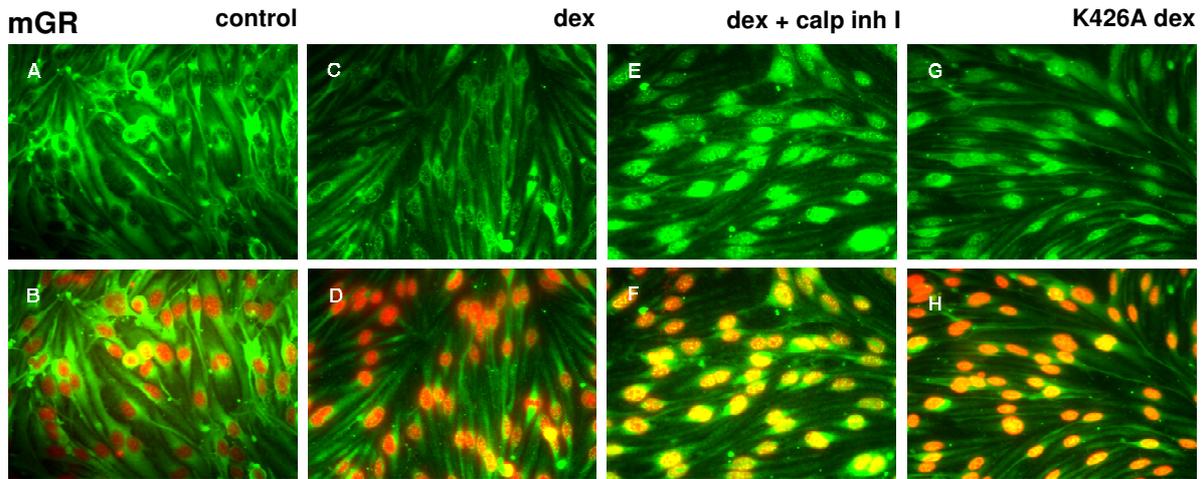
Genomische GC-Effekte werden durch den GR vermittelt. In einer vorangegangenen Arbeit (Forster *et al.*, 2006) wurde die gewebespezifische, Liganden-abhängige Herunterregulation des GR im Gefäßendothel durch den proteasomalen Abbau charakterisiert. In Übereinstimmung mit dieser Studie und mit Arbeiten aus der Gruppe um Prof. Dr. J.A. Cidlowski (Laboratory of Signal Transduction, national Institute of Environmental Health Science, National Institute of health, Research Triangle Park, NC, USA) (Bellingham *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1994) verursachte eine 48 h lange Behandlung mit 100 nM Dexamethason von MyEND-Zellen eine Herunterregulation des GR-Proteins auf  $22,55 \pm 1,3\%$  der Kontrolle (100%) (Abb. 4.3.4). In MyEND-Zellen, die zuvor mit dem Wildtyp-GR (wtGR)-Konstrukt transfiziert und als nächstes 48 h lang mit Dexamethason behandelt wurden, konnte eine erhöhte GR-Proteinexpression von  $118,95 \pm 4,3\%$  gemessen werden. Eine Transfektion ohne darauffolgende GC-Behandlung verursachte eine GR-Proteinexpression von  $184,9 \pm 9,5\%$ . Zusätzlich wurde das ubiquitinierungsdefekte GR-Konstrukt K426A-GR (Wallace & Cidlowski, 2001) nach gleichem Schema transient in konfluente MyEND-Zellen transfiziert, gefolgt von einer 48 h GC-Behandlung. Die GR-Proteinexpression stieg auf  $133,8 \pm 16,5\%$  der Kontrolle an. Die Transfektion mit dem Konstrukt ohne Behandlung verursachte eine  $199,33 \pm 10\%$  GR-Proteinexpression.



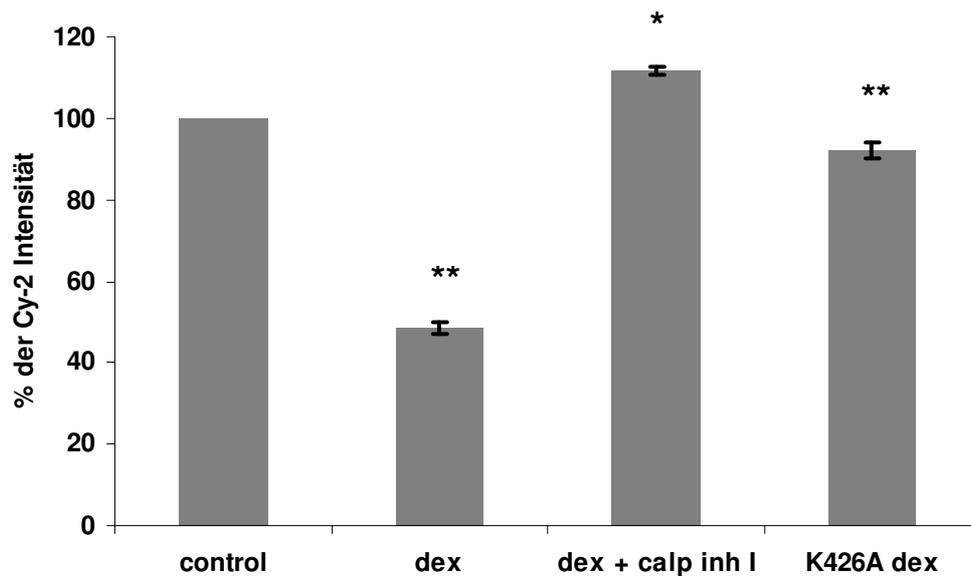
#### 4.3.5 Verstärkung der GC-vermittelten Transkriptionsaktivierung durch Inhibition des Liganden-abhängigen proteasomalen GR-Abbaus

Die Aktivierung der Transkription von GR-Zielgenen erfordert die Translokation des GR-GC-Komplexes aus dem Zytoplasma in den Zellkern, in dem die Bindung an die DNA erfolgt. Deshalb wurde die Lokalisation des GR-Proteins in der Zelle in Abhängigkeit von den verschiedenen Behandlungen mittels immunzytolochemischer Fluoreszenzmarkierung des

GRs durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit der Image J-Software quantifiziert. Als Marker für den Zellkern wurde Propidium-Iodid (PI) eingesetzt. Die GR-Immunmarkierung visualisierte das GR-Protein in unbehandelten Kontroll-MyEND-Zellen im Zytoplasma (Abb. 4.3.5). Eine 48 h Dexamethason-Behandlung verursachte keine Translokation des GR-Proteins in den Zellkern. Vielmehr, kam es zu einer Erniedrigung der GR-Menge, gemessen anhand der Fluoreszenz-Intensität, die  $48,45 \pm 1,3\%$  der Kontrolle betrug. Eine gleichzeitige Behandlung mit Dexamethason und dem Proteasom-Inhibitor Calpain Inhibitor I führte zu einer Translokation des GR-Proteins aus dem Zytoplasma in den Zellkern, was durch eine Co-Lokalisation der grünen Cy2- und der PI-Fluoreszenz manifestiert wurde. Ebenso kam es zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität, die hier  $111,7 \pm 1,1\%$  betrug. Eine Transfektion der MyEND-Zellen mit dem K426A-GR-Konstrukt und einer 48 h GC-Behandlung verursachte, wie erwartet, ebenfalls eine Translokation des GRs in den Zellkern, wonach eine Transkriptionsaktivierung ermöglicht wurde. Die Fluoreszenz-Intensität betrug  $91,9 \pm 2,0\%$  verglichen mit den Kontrollzellen.



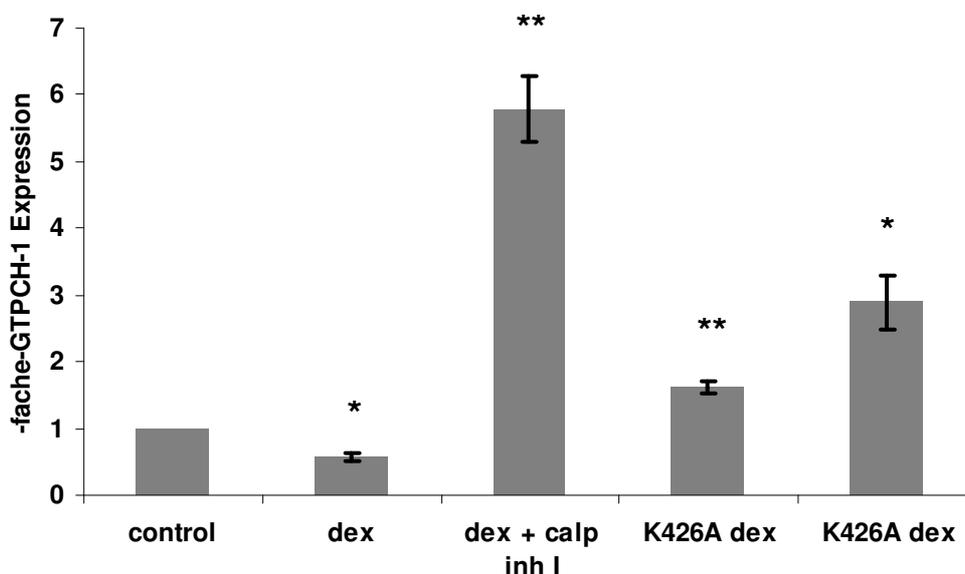
mGR + PI



**Abb.: 4.3.5 Verhinderung der Liganden-abhängigen Herunterregulation des GR-Proteins durch Inhibition der proteasomalen Degradation des GRs.** (A,C,E,G) Immunfärbung des GR-Proteins (Cy2, grün) und Überlagerung der GR-Protein Immunmarkierung mit der PI-Kernfärbung (PI, rot) in MyEND Zellen. (A-B) Kontrollzellen; unbehandelte und untransfizierte MyEND-Zellen; GR-Protein wurde im Zytoplasma lokalisiert. Analyse der GR-Fluoreszenzintensität erfolgte unter Anwendung der Image J-Software. Cy2-Fluoreszenz des GR-Proteins wurde mit 100% gleich gesetzt. (C-D) MyEND-Zellen wurden mit 100 nM Dexamethason für 48 h lang behandelt. GR-Protein wurde im Zytoplasma lokalisiert, Fluoreszenz des GR-Proteins war auf  $48,45 \pm 1,3\%$  der Kontrolle reduziert. (E-F) MyEND-Zellen wurden simultan mit Dexamethason und Calpain Inhibitor I behandelt (Fluoreszenzintensität:  $111,7 \pm 1,1\%$ ), GR-Protein war nicht mehr im Zytoplasma nachzuweisen, Translokation in den Nucleus (Co-Lokalisation der GR-Markierung mit der PI-Gegenfärbung). (G-H) MyEND-Zellen wurden transfiziert mit dem ubiquitinylierungsdefekten K426A-GR-Konstrukt und 48 h lang mit 100 nM Dexamethason behandelt. Die Fluoreszenzanalyse legte eine  $91,9 \pm 2\%$  Intensität, verglichen mit der Kontrolle, zugrunde. Co-Lokalisation des GR-Proteins mit der PI-Gegenfärbung im Nucleus.

#### 4.3.6 Wiederherstellung der GTPCH-1-Genexpression durch Überexpression des ubiquitinierungsdefekten GRs in GC-behandelten MyEND-Zellen

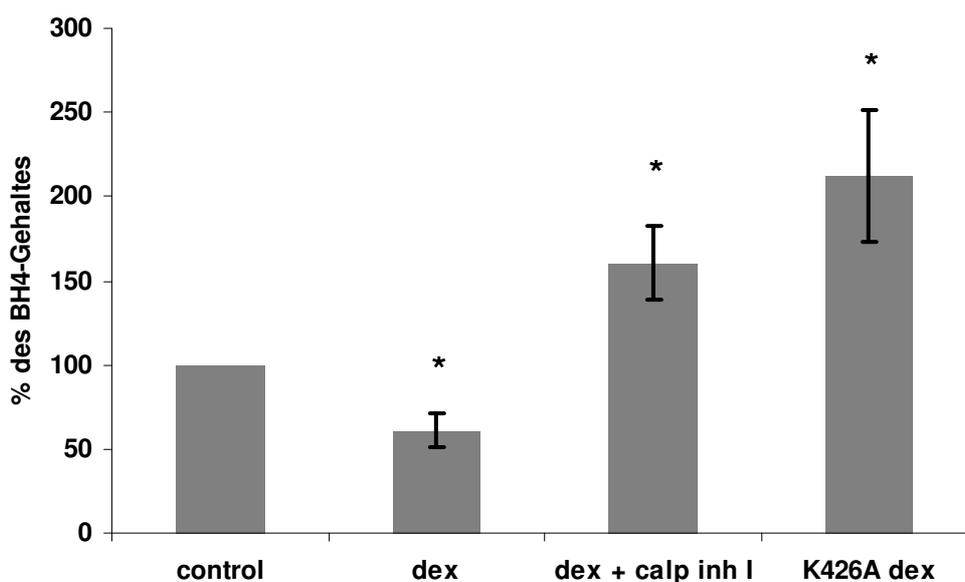
Erneut wurden GTPCH-1-mRNA-Mengen in unterschiedlich behandelten bzw. transfizierten MyEND-Zellen mittels quantitativer *real-time* RT-PCR analysiert. Eine 24 h Behandlung mit Dexamethason führte, wie zuvor, zu einer  $0,58 \pm 0,06$ -fachen GTPCH-1-Genexpression, verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen. (Abb. 4.3.6). Eine gleichzeitige Calpain Inhibitor I-Behandlung bewirkte eine signifikante Hochregulierung der GTPCH-1-Transkripte um das  $5,78 \pm 0,5$ -fache der Kontrolle. Ebenso wurden MyEND-Zellen transfiziert. Transient mit dem K426A-GR-Konstrukt transfizierte MyEND-Zellen wiesen eine  $2,89 \pm 0,4$ -fache GTPCH-1-Genexpression auf. Eine Transfektion der Zellen mit K426A-GR ohne zusätzliche Behandlung führte zu einer  $1,62 \pm 0,1$ -fachen GTPCH-1-Genexpression.



**Abb.: 4.3.6 Hochregulation der GTPCH-1-Genexpression durch Verhinderung des Proteasom-vermittelten GR-Abbaus in Dexamethason-behandelten MyEND-Zellen.** Konfluente MyEND-Zellen wurden für jeweils 24 h mit Dexamethason oder Dexamethason und Calpain Inhibitor I behandelt oder 24 h vor der Behandlung mit K426A-GR transfiziert. GTPCH-1-Genexpression wurde über quantitative *real-time* RT-PCR untersucht. Dexamethason-Behandlung in MyEND-Zellen führte zu einer Herunterregulierung der GTPCH-1 um das  $0,58 \pm 0,06$ -fache. Simultane Behandlung mit Dexamethason und Calpain Inhibitor I führte zu einer  $5,78 \pm 0,5$ -fach erhöhten GTPCH-1-Transkriptmenge, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Transiente Transfektion mit K426A-GR und 24 h-Dexamethason-Behandlung erhöhte die Genexpression der GTPCH-1 um das  $2,89 \pm 0,4$ -fache. Die Transfektion allein bewirkte eine Hochregulierung der GTPCH-1-Genexpression um das  $1,62 \pm 0,1$ -fache der Kontrolle, die mit 1 gleich gesetzt wurde.

#### 4.3.7 Inhibition des proteasomalen Abbaus des GRs als Grund für die Erhöhung der BH<sub>4</sub>-Produktion über das Kontroll-Niveau in Dexamethason-behandelten MyEND-Zellen

Zur Überprüfung, ob nach Inhibition des proteasomalen Abbaus des GRs die BH<sub>4</sub>-Produktion positiv beeinflusst wird, wurden MyEND-Zellen für eine HPLC-Untersuchung ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz entsprechend 48 h lang behandelt. Eine 100 nM Dexamethason-Behandlung führte zu einer erniedrigten BH<sub>4</sub>-Produktion, die  $60,7 \pm 9,9\%$  betrug, verglichen mit der mit 100% gleich gesetzten unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.3.7). Eine simultane Behandlung mit Dexamethason und dem Proteasom-Inhibitor Calpain Inhibitor I ließ die BH<sub>4</sub>-Werte über den Kontrollwert hinaus ansteigen, auf  $160,6 \pm 22,3\%$ . Ebenso führte eine Transfektion der MyEND-Zellen mit dem GR-Konstrukt K426A und der Dexamethason-Behandlung zu einem Anstieg der Co-Faktor-Produktion, auf  $212,6 \pm 39,1\%$ , verglichen mit der Kontrolle.

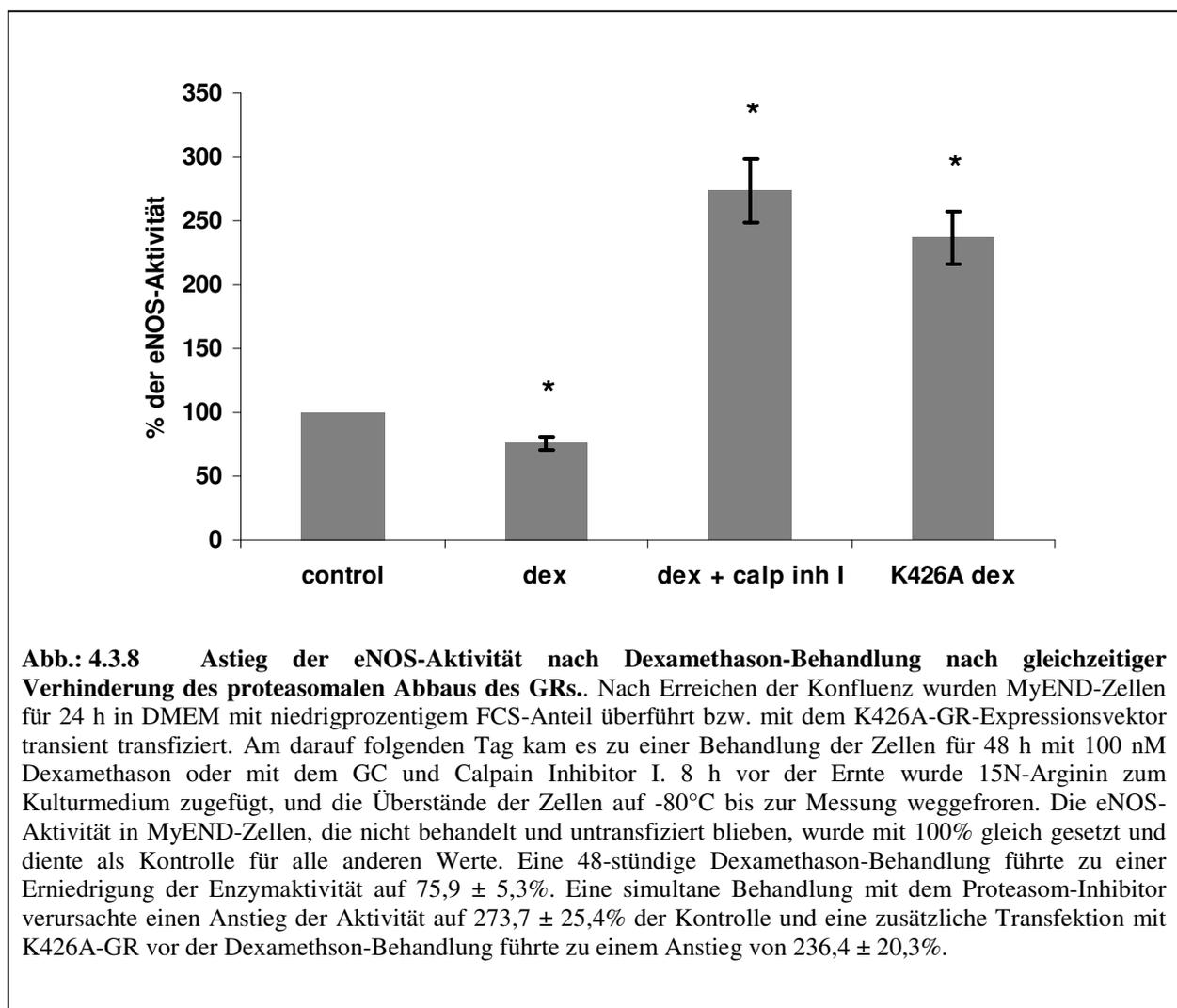


**Abb.: 4.3.7** Entgegenwirken der Herunterregulation des BH<sub>4</sub> nach Dexamethason-Behandlung durch Inhibition des proteasomalen Abbaus des GRs. Nach Erreichen der Konfluenz wurden MyEND-Zellen 48 h lang mit und ohne 100 nM Dexamethason kultiviert, sowie zur Verhinderung des proteasomalen Abbaus des GR-Proteins simultan zur Dexamethason-Behandlung mit Calpain Inhibitor I stimuliert oder entsprechend mit dem ubiquitinylierungsdefekten GR-Konstrukt K426A-GR transfiziert und im Anschluss darauf 48 h lang mit Dexamethason behandelt. Eine Dexamethason-Behandlung führte zu einer Erniedrigung der BH<sub>4</sub>-Werte auf  $60,7 \pm 9,9\%$ . Nach simultaner Calpain Inhibitor I-Behandlung kam es zu einer Erhöhung der BH<sub>4</sub>-Level auf  $160,6 \pm 22,3\%$ , der unbehandelten Kontrolle (100%). Eine zur Dexamethason-Behandlung zusätzliche Transfektion führte zu einem Anstieg des BH<sub>4</sub> in MyEND-Zellen auf  $212,6 \pm 39,1\%$ , verglichen mit der Kontrolle.

#### 4.3.8 Einfluss des Liganden-abhängigen GR-Abbaus auf die eNOS-Aktivität

Als nächstes wurde die Aktivität des NO-produzierenden Enzyms, eNOS, nach den zuvor getesteten Behandlungen in MyEND-Zellen ermittelt. Die eNOS-Aktivität gibt eine Aussage über die NO-Produktion in der Zelle und wird über die Konversion des natürlich markierten Substrats der eNOS  $^{15}\text{N}$ -Arginin in  $^{15}\text{N}$ -Citrullin berechnet.

Die eNOS-Aktivität wurde prozentual angegeben und bezieht sich auf die unbehandelte und untransfizierte Kontrolle, die mit 100% gleich gesetzt wurde (Abb. 4.3.8). Eine Dexamethason-Behandlung der MyEND-Zellen über 48 h führte zu einer Erniedrigung der eNOS-Aktivität auf  $75,9 \pm 5,3\%$  der Kontrolle. Um zu testen, wie sich die eNOS-Aktivität ändert, wenn es zu einer Proteasom-Inhibition kommt, wurden MyEND-Zellen gleichzeitig mit 100 nM Dexamethason und 25 mM Calpain Inhibitor I behandelt. Hierbei kam es zu einem Anstieg der Enzymaktivität, die  $273,7 \pm 25,4\%$  betrug. Ebenso verursachte die Transfektion mit dem Expressionsvektor K426A-GR einen Anstieg der eNOS-Aktivität von  $236,4 \pm 20,3\%$  verglichen mit der unbehandelten und untransfizierten Kontrolle.



## 5. Diskussion

### 5.1 Einfluss von GCs auf die Eigenschaften der BHS untersucht an cEND-Zellen

#### 5.1.1 GC-Therapie bei Schrankenstörungen

Eine Vielzahl von Noxen kann im Rahmen pathophysiologischer Zustände zur Störung der BHS führen: Ammoniak bei Leberversagen, Entzündungsmediatoren bei Sepsis, Röntgenbestrahlung. Unter krankhaften Bedingungen, insbesondere bei Entzündungen (wie z.B. bei Infektionen des ZNS, in der Nähe wachsender Tumoren oder nach Gewebetraumatisierung), tritt in der Regel ein lokaler Zusammenbruch der BHS ein (Jin *et al.*, 2008; Myers *et al.*, 2008; Theoharides *et al.*, 2008). Hirntumoren entwickeln ihr eigenes Kapillarsystem, welches entdifferenziert ist und keine vollständige endotheliale BHS aufweist (Long *et al.*, 1970 & 1979). Infolgedessen wird die BHS durchlässig, wodurch die Homöostase im ZNS gefährdet wird. Bei Hirnödemen gelangt Plasma über den hydrostatischen Gradienten in den Extrazellulärraum. Es erzeugt einen erhöhten Gewebedruck, der von Abnahme der Hirndurchblutung, Autoregulationsverlust und Azidose begleitet wird (Ichai *et al.*, 1997; Shima, 2003; Troy *et al.*, 2005; Adukauskiene *et al.*, 2007). Zu den primär zu beobachtenden Anzeichen einer Barrierestörung gehört der Verlust der interzellulären Adhäsion, dies geht mit einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität einher (Neuwelt, 2004; Hawkins & Davis, 2005; Zlokovic, 2008). Diese Studien belegen, wie wichtig die Rolle der Zell-Zell-Interaktion ist und dass diese einen wichtigen Aspekt bei der Gewährleistung der korrekten Struktur und Funktion der BHS darstellt.

Obwohl die Strategien zur erfolgreichen Behebung des BHS-Zusammenbruchs die GC-Therapie beinhalten (Engelhardt, 2000; Qizilbash *et al.*, 2002), ist der genaue Mechanismus der GC-Wirkung noch nicht genau erforscht. In den meisten Fällen konzentrieren sich die Publikationen auf die Wirkung der GCs unter entzündlichen Bedingungen. Während der Entzündung kommt es durch Aktivierung des NFκB-Signalweges zu einer Expressionserhöhung von Zelloberflächen-Adhäsionsmolekülen mit einer darauffolgenden T-Zell-Rekrutierung durch die BHS (Engelhardt, 2000; Qizilbash *et al.*, 2002). GCs können dem durch Zytokine aktivierten NFκB-Signalweg entgegenwirken. Der Effekt der hierbei eingesetzten GCs kann, nach intravenöser Injektion von Gadolinium-*diethylene-triamine pentaacetic acid* (Gd-DTPA) mit Hilfe der MRT-Diagnostik, visualisiert werden. Der Verschluss der BHS wird durch eine komplette Aufhebung des Gadolinium-Signals innerhalb von wenigen Tagen demonstriert (Burnham *et al.*, 1991).

Ein anderer Aspekt des GC-induzierten Barriereverschlusses ist die Induktion der Expression

von TJs und AJs (Hoheisel *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 2003; Weidenfeller *et al.*, 2005; Weksler *et al.*, 2005; Blecharz *et al.*, 2008), genauso wie GC-induzierte Zielgenaktivierung am Endothel der BHS (Forster *et al.*, 2005; Harke *et al.*, 2008) Die Studien dieser Arbeit sind ein Beitrag zur Aufklärung der biochemischen und molekularen Wirkungsweise von GCs bei BHS-Verschluss.

### **5.1.2 Dexamethason-induzierte morphologische Veränderung der cEND-Zellen**

Die im Vorfeld durchgeführten cDNA-Array-Experimente an GC-behandelten cEND-Zellen gaben erste Anhaltspunkte, dass die Genexpression des VE-Cadherin unter GC-Wirkung in cEND-Zellen erhöht wird (Burek M, unveröffentlichte Daten). Wie am Beispiel von Occludin sollte auch hier Schritt für Schritt die molekulare Grundlage dieses Mechanismus untersucht werden.

In einer bereits veröffentlichten Arbeit (Forster *et al.*, 2005) wurde bereits eine durch HC-Behandlung verursachte Morphologieänderung der cEND-Zellen dokumentiert, unterstützt von TER-Messungen als verlässliches Maß für die Barrieredichtigkeit. Durch die beschriebene Morphologieänderung der GC-behandelten cEND-Zellen verkürzt sich die Länge des für eine Diffusion zur Verfügung stehenden Parazellularraums um bis zu 50%, verglichen mit Messungen, die an unbehandelten Zellen durchgeführt wurden (Forster *et al.*, 2005). Die hier dargestellten immunzytochemischen Färbungen des VE-Cadherins in Dexamethason-behandelten und unbehandelten cEND-Zellen ergeben ähnliche Resultate. Die verstärkte VE-Cadherin-Markierung und die beobachteten Morphologieänderungen der Dexamethason-behandelten cEND-Zellen tragen zu einer erheblichen parazellulären Diffusionsreduktion bei. Ebenfalls ergaben sich Unterschiede in der Topologie des F-Aktins, welche sich nach 72 h Dexamethason-Gabe durch eine erhöhte Konzentration des polymerisierten F-Aktins an den Zell-Zell-Kontakten manifestierte. Gleichzeitig kam es zu einer Reduktion der Stressfasern. Eine starke Reduktion von Aktin-Stressfasern, die allerdings nicht als Resultat einer erhöhten Aktin-Protein-Expression auftritt, wurde ebenso von anderen Arbeitsgruppen als ein Indiz für eine verstärkte mechanische Barriestabilisierung in primären Endothelzellen aus verschiedenen Spezies beschrieben (Romero *et al.*, 2003; Torok *et al.*, 2003). Experimente in Dexamethason-behandelten Hirnendothelzellen aus Ratten, aus der Arbeitsgruppe um Romero, beschreiben eine Barriestabilisierung durch Umverteilung des Cortaktins und F-Aktins, die mit einer Verminderung der Permeabilität des Zell-Monolayers korrelieren (Romero *et al.*, 2003). Die Zytoskelett-Umorganisation könnte auch eine Ursache für die Morphologieveränderungen und Ausbildung einer ausdifferenzierteren

Zellphänotyps nach 72 h GC-Behandlung sein, welche mit Hilfe der Lichtmikroskopie deutlich zu sehen sind. Diese Art von Morphologieänderung wurde auch häufig an Epithelzellen und primären Endothelzellen beobachtet (Lossinsky & Shivers, 2004). Eine Depolymerisierung des F-Aktins oder eine Fragmentierung des kortikalen Aktin-Ringes führt zu einer Erhöhung der endothelialen Barrierepermeabilität (Schnittler *et al.*, 1990; Waschke *et al.*, 2004a). Ebenfalls haben Arbeiten gezeigt, dass eine unzureichende Verfügbarkeit der Aktin-Filamente, verbunden mit einer intrazellulären Störung, mit einer erniedrigten transepithelialen Resistenz zusammenhängt (Madara *et al.*, 1986).

### **5.1.3 Regulation der Proteinexpression und der Verstärkung der VE-Cadherin-Assoziation am Aktin-Zytoskelett durch Dexamethason**

Im Anschluss auf die Immunmarkierungen wurden positive Effekte auf die VE-Cadherin-Proteinexpression gefunden werden. Die Proteinlevels von VE-Cadherin waren in cEND-Zellen bereits nach 48 h signifikant erhöht, nach 72 h hielt der Effekt weiterhin an. Den Aussagen anderer Autoren zufolge ist der Anstieg der VE-Cadherin-Proteinexpression zu erwarten. Es gibt viele Berichte darüber, dass es, unter verschiedenen anderen Behandlungs- und Kultivierungsbedingungen von Endothel- aber auch Epithelzellen, gemeinsam mit einer Erhöhung der TJ-Expression, verbunden mit einer Barriereabdichtung, gleichzeitig zu einem Anstieg der AJ-Expression kommt (Rubin *et al.*, 1991), da diese gemeinsam eine gemeinsame Funktionseinheit bilden (Gumbiner, 1996). Die Erhöhung der VE-Cadherin Proteinmenge und somit die Vergrößerung der Zelloberfläche ermöglicht die verstärkte Ausbildung der Sekundärkomponenten der Endothelbarriere- wie des Claudin-5 und des Occludins- die dadurch einen verstärkten Occludenskontakt-Komplex bildet. Von der Verknüpfung beider Kontaktarten mit dem Aktinzytoskelett hängt die Funktionen der Endothelbarriere maßgeblich ab (Claude & Goodenough, 1973; Wolburg *et al.*, 1994). Diese Vernetzung ermöglicht die Ausbildung eines besonders dichten peripheren Ringes an der zytoplasmatischen Oberfläche junctionaler Zellen (Schnittler, 1998). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch Dexamethason hervorgerufenen Optimierungen der Barrierefunktion mit einer stärkeren Verankerung des VE-Cadherins an das Zytoskelett korrelieren. Zellfraktionierungen von behandelten und unbehandelten cEND-Zellen belegten, dass die Zytoskelett-Assoziation von VE-Cadherin durch das GC erhöht wurde. Der Anstieg der Proteinlevel von VE-Cadherin nach Dexamethason-Behandlung, konnte auf eine gesteigerte relative Rekrutierung des VE-Cadherins aus dem Zytosol in die Zytoskelett-assoziierte Zellfraktion zurückgeführt werden. Komplementär dazu ermöglichte diese GC-

induzierte VE-Cadherin-Rekrutierung die in 4.1.1 diskutierte Reorganisation des F-Aktins. Das Phänomen der hier beschriebenen stärkeren Verankerung von Zell-Zell-Kontakten am Zytoskelett und der daraus resultierenden verbesserten Barrierefunktionen ergaben bereits Untersuchungen von Madara und Kollegen (Madara *et al.*, 1986). Die späte zelluläre Antwort 24 h bis 48 h nach der GC-Behandlung, dessen Resultat der Anstieg der VE-Cadherin-Proteinmenge ist, könnte zusätzlich die Expression einer Reihe weiterer Gene, sowie struktureller oder regulatorischer Faktoren induzieren. Diese könnten in die Zelldifferenzierung, der Wiederverfügbarkeit und der Umorganisation von Aktinfilamenten aus den Stressfasern in die Zellperipherie involviert sein. Für Folgeexperimente könnten beispielsweise Untersuchungen von Veränderungen in der Aktivität der GTPasen der Rho-Familie genannt werden. Hierbei könnte die Hochregulation des Rac1, das in Endothelzellen an Ausbildung und Verstärkung des kortikalen Aktin-Ringes beteiligt ist (Adamson *et al.*, 2002), ins Auge gefasst werden.

Adhärensproteine aus der Familie der Cadherine werden durch das  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenin strukturell mit dem F-Aktin verbunden (Gumbiner, 1996). Diese und zusätzlich das ZO-1, das einen Link zwischen den TJs und AJs darstellt, wurden ebenfalls auf Proteinebene untersucht. Hier konnten nach 48 h und 72 h jedoch keine Expressionsunterschiede detektiert werden, was im Falle der beiden Catenine mit den Daten anderer Arbeitsgruppen ebenfalls übereinstimmt (Romero *et al.*, 2003). ZO-1 wies nach beiden Behandlungszeiten ebenfalls keine Änderungen in der Proteinexpression auf. Zwar behaupten manche Autoren, ZO-1-Protein würde ebenfalls positiv auf die Dexamethason-Behandlung ansprechen (Romero *et al.*, 2003), was in cEND-Zellen jedoch nicht bestätigt werden konnte.

#### **5.1.4 Ausschluss des VE-Cadherins als direktes Zielgen der GC-GR-Wirkung**

Die Effekte der GC-Wirkung können verschiedener Natur sein (Beato, 1989; Reichardt *et al.*, 2006). Man unterscheidet: (1) Direkte genomische Effekte, bei denen es zu einer Induktion des Zielgens kommt, welche durch direkte Bindung des GRs an ein entsprechendes Element auf der DNA des Zielgens verursacht wird.

(2) Indirekte genomische Effekte, die sich durch eine Protein-Protein-Interaktion des GRs mit anderen sequenzspezifischen, Transkriptionsfaktoren äußern. Zusätzlich kann (3) eine nicht-transkriptionelle Regulation genannt werden, welche durch die Wirkung des GRs über eine Signalkaskade verursacht wird, die durch eine vergleichbar langsame Kinetik charakterisiert wird.

Am Beispiel des Occludin-Gens sollte ebenfalls am VE-Cadherin eine direkte, durch den GR vermittelte Transkriptionsaktivierung untersucht werden. Mittels quantitativer *real-time* RT-PCR, aber auch durch den Einsatz des GR-Antagonisten RU486 wurde die Genexpression im Zeitverlauf der Dexamethason-Behandlung überprüft. Die gemessene VE-Cadherin-Expressionsinduktion erwies sich jedoch als eine späte Wirkung von GCs. Geringe Effekte auf die VE-Cadherin Geninduktion konnten erst nach 24 h beobachtet werden. Es lag keine Veränderungen in der VE-Cadherin-Genexpression als ein Kurzeiteffekt von Dexamethason vor. Die erhaltenen Daten weisen also eher auf keinen direkten Effekt der GC-Wirkung hin. Komplementär zu diesen Ergebnissen konnte ebenfalls keine Transaktivierung des VE-Cadherin-Promoter-Reporter-Gens unter GC-Wirkung bis 24 h nach Behandlungsbeginn dokumentiert werden. Zunächst wurden diese Effekte in der leichttransfizierbaren HEK293-Zelllinie untersucht, und die experimentellen Bedingungen auf den BHS-Kontext, also auf cEND-Zellen, übertragen. Wie erwartet kam es in HEK293-Zellen zu einer deutlich höheren Transaktivierung des VE-Cadherin-Promoter-Reportergens als in cEND-Zellen. Die fast 2-fache Erhöhung der Promoteraktivität stimmte überein mit der Geninduktion des VE-Cadherins nach 48 h und den Ergebnissen der Western-Blot-Versuche. Die gravierenden Unterschiede in der Analyse der Transaktivierung des VE-Cadherin-Promoters in den beiden Zelllinien kommen durch die Effektivität der Transfektion, welche deutlich höher in HEK293-Zellen ist. Den Aussagen anderer Autoren zufolge sind Endothelzellen generell schwer transfizierbar. Die Hersteller des von uns verwendeten VE-Cadherin-Promoter-Konstruktes, -2486LUC-, verweisen allerdings auch auf Transfektionsschwierigkeiten, die das Konstrukt scheinbar selbst birgt (Lelievre *et al.*, 2000).

## 5.2 Einfluss von MS-Seren auf Barriereigenschaften der cEND-Zellen

Die Schädigung der BHS und der daraus resultierende Anstieg der endothelialen Permeabilität kommen mitunter durch die Fehlregulation der Zelladhäsion zustande. Dies sind frühe Abnormalitäten, die im Verlauf der MS beobachtet werden können (Noseworthy *et al.*, 2000; Keegan & Noseworthy, 2002). Die Schädigung der BHS im Verlauf dieser Krankheit ist ebenfalls das Ergebnis der Interaktionen zwischen Hirnendothel und aktivierten, Antigen-präsentierenden Immunzellen, sowie der Th-1-Lymphozyten. Die daran beteiligten Immunzellen sezernieren proinflammatorische Zytokine (Balkwill & Burke, 1989; Minagar & Alexander, 2003), die im Serum von MS-Patienten aufzufinden sind. Zu nennen sind hier vor allem  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IFN}\gamma$ . Diese verursachen nach Eintritt in die Zirkulation gravierende

Veränderungen am Endothel (Noseworthy *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2009). In zwei zuvor publizierten Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten die Folgen einer TNF $\alpha$ -Behandlung an cEND- und cerebEND-Zellen demonstriert werden (Forster *et al.*, 2005; Silwedel & Forster, 2006). Bereits nach einer 8-stündigen Gabe des Zytokins wurde die Gen- und Proteinexpression von Claudin-5 und Occludin maßgeblich negativ beeinflusst. Ebenso kam es zu einer Hochregulation der MMP-9. Da in der MS jedoch nicht nur ein proinflammatorisches Zytokin, sondern mehrere gemeinsam vorliegen, zusammen mit verschiedenen anderen barriereverändernden Faktoren, wurde in den hier präsentierten Untersuchungen, der Einfluss von MS-Patientenseren auf die Eigenschaften der cEND-Zelllinie getestet. Die zur Inkubation der Zellen verwendeten Seren beinhalten ein Gemisch dieser MS-typischen Faktoren dar. Zudem wurden nicht ausschließlich Seren von Patienten, die sich in der akuten Phase der MS befinden, verwendet. Untersuchungen von Veränderungen am Hirnendothel-*Monolayer* durch Inkubation mit Seren von Spendern, die sich gerade in der Remissionsphase befinden, waren ebenfalls von Interesse.

Die Auswirkungen auf die Endothel-*Monolayer*-Eigenschaften nach MS-Serum Inkubation wurden bereits in der Literatur beschrieben (Minagar *et al.*, 2003). Darin wurden TER-Messungen, sowie Untersuchungen der Proteinexpression von Occludin und VE-Cadherin nach einer 24 h-Inkubation mit MS-Patientenseren von SVEC-10-Zellen, einer Endothelzelllinie aus Blutgefäßen der axillären Lymphknoten einer Maus, beschrieben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert der Daten dargestellt, die sich aus der Behandlung mit Exazerbations- und Remissionsseren ableiten. In unserer Studie wurden die einzelnen Effekte der verschiedenen Seren separat ausgewertet. Den unterschiedlichen Ergebnissen zufolge, unterscheidet sich die Serumzusammensetzung zum Zeitpunkt einer Exazerbationphase von der der Remission. Als Antwort auf die Arbeit von Minagar sollten die Effekte der MS-Seren-Inkubation unter weiteren Aspekten charakterisiert und vertieft werden. Ebenfalls sollte die Analyse in einem geeigneterem Zellkultur-Modellsystem mit BHS-Hintergrund stattfinden, so wie der cEND-Zelllinie. Zusätzlich wurde neben der Proteinexpression von Occludin und VE-Cadherin auch die Claudin-5-Expression untersucht, zumal es in einer vorangegangenen Arbeit aus unserer Gruppe eine Herunterregulierung der Claudin-5-Proteinlevel nach Zytokin-Behandlung gab. Außerdem wurden in dieser Arbeit Occludin, Claudin-5 und das VE-Cadherin auf Genexpression getestet.

Neben den Effekten, die durch die Inkubation mit den jeweiligen Seren verursacht wurden, stand in diesem Teilprojekt die Untersuchung einer auf die Seruminkubation hin folgenden GC-Behandlung im Fokus. GCs spielen in der Therapie der MS eine große Rolle. Ihre

Anwendung ist einerseits mit verschiedenen Nebenwirkungen verbunden, der Nutzen der Therapie bei akuten Schüben ist jedoch erheblich (Reichardt *et al.*, 2006). Während niedrige GC-Dosierungen im akuten MS-Schub vor allem immunmodulatorische Effekte haben, bewirken hochdosierte GC-Applikationen vor allem den Verschluss der BHS, die von großer Bedeutung zur Hemmung der Fortschreitung der Krankheit ist. Zudem induzieren GCs in der MS die T-Zell-Apoptose im ZNS (Reichardt *et al.*, 2006). Der genaue Mechanismus, aber auch die Wirksamkeit der GC-Therapie, die nicht immer erfolgreich ist, erfordert jedoch noch viel Forschungseinsatz. Die untersuchten barrierschädigenden Folgen auf die Eigenschaften der Hirnendothelzelllinie cEND, nach Inkubationen in verschiedenen Krankheitsseren und nach darauffolgender Dexamethason-Behandlung, ist ein kleiner Beitrag zu diesem Vorhaben.

### **5.2.1 Negative Auswirkungen auf die Barriereigenschaften der cEND-Zellen nach Krankheitsseren-Inkubation**

MS-Seren-Inkubation der cEND-Zellen führt zu einer starken Abnahme des TERs: die Inkubation im Exazerbationsserum bewirkte eine TER-Reduktion von über 60%, nach Remissionsserum-Inkubation kam es zu einer Erniedrigung von mehr als 50%, verglichen mit der Kontrolle.

Ein Anstieg der Barrierepermeabilität geht einher mit Veränderungen des Expressionsprofils der TJ-Proteine am Endothel-*Monolayer*. Auch auf Proteinebene konnte eine Verringerung der Occludin und Claudin-5-Expression gemessen werden. Im Falle des Claudin-5 kam es, aufgrund einer Inkubation mit Exazerbationsserum, zu einer stärkeren Herunterregulierung des Proteins als durch eine Inkubation mit Remissionsserum. Bei Occludin verhielt es sich unter diesen Bedingungen entgegengesetzt. Diesen Beobachtungen zufolge, könnten in der Pathologie der MS beide Proteine von unterschiedlichen Mediatoren, sowohl posttranslational oder auf Transkriptionsebene reguliert werden. Viele, bereits publizierte Daten, berichten von der Herunterregulation von Occludin-Proteinen durch Zytokin-Wirkung in unterschiedlichen Geweben (Colgan *et al.*, 1993; Wachtel *et al.*, 2001; Minagar *et al.*, 2003; Forster *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 2009). Darunter findet sich eine Studie, in der gezeigt werden konnte, dass IL-1 $\beta$  sich in humanem *Cornea*-Epithelzellen negativ auf die Proteinexpression von Occludin auswirkt und somit die epitheliale Barrierefunktion in der experimentellen Augenentzündung zerstört wird (Kimura *et al.*, 2009). Die VE-Cadherin-Proteinexpression blieb weitgehend von den Folgen der Inkubation mit beiden Arten der Krankheitsseren unbeeinflusst. Diese Daten unterstützen also nur teilweise die Ergebnisse der vorangegangenen Studie von Minagar und Kollegen (Minagar *et al.*, 2003), in welcher

allerdings die für Experimente eingesetzten Patientenserum aus beiden Stadien der MS stammen. Hierbei gibt es, wie zuvor erwähnt gravierende Unterschiede in der Serum Zusammensetzung und den Folgen auf die Barriereigenschaften der Endothelzell-*Monolayers*. Andererseits konnten nach TNF $\alpha$ -Behandlung von cEND-Zellen ebenfalls keine Unterschiede in der Expression des VE-Cadherins detektiert werden (Forster *et al.*, 2007). Dies stimmt zudem überein mit Western-Blot-Analysen der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. K. Kimura (Dept. Of Ocular Pathophysiology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Japan), die ebenfalls keine Veränderungen im Expressionslevel des gesamten Adhärenskontakt-Komplexes unter Einfluss von IL-1 $\beta$  fand. Überprüft wurden hierbei mitunter Proteinmengen des E-Cadherin, sowie des damit assoziierten  $\beta$ -Catenin. Der für diesen Effekt und den nach Occludin-Herunterregulation eingetretenen Barrierezusammenbruch verantwortliche Transkriptionsfaktor könnte NF $\kappa$ B und der von ihm ausgelöste Signalweg sein. NF $\kappa$ B spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Zellwachstums, der Apoptose, sowie der Inflammation durch Genexpressionskontrolle (Brasier, 2006; Ahn *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 2007). Des Weiteren stellt NF $\kappa$ B eine Implikation für den Ubiquitin-Proteasom-Proteindegradierungsprozess dar (Chen, 2005). Interessant wäre zu überprüfen, ob NF $\kappa$ B eine Rolle in der negativen Beeinflussung der Occludin-Protein- und Genexpression in dem hier vorgestellten experimentellen Aufbau, spielt. Zudem wäre es möglich, dass die starke Herunterregulierung von Occludin einen Zusammenhang mit Zytokin aktivierten Proteasen aufweist, wie der MMP-9. Die Genexpression der MMP-9 wurde hier bereits dargestellt. Auch der Phosphorylierung oder Dyslokation von Occludin der Zellperipherie könnte bei diesen Vorgängen eine bedeutende Rolle zugeschrieben werden.

Während die VE-Cadherin-Proteinmengen kaum verändert waren, trotz Serum-Inkubation und GC-Behandlung der Zellen, besteht die Möglichkeit, dass die Inkubation mit Exazerbation- oder Remissionsserum eine Tyrosin-Phosphorylierung des Proteins verursacht haben könnte. Hierdurch kam eine Schwächung der Barriereigenschaften durch eine erhöhte Permeabilität und Desintegrität des Endothel-*Monolayers* zustande (Nawroth *et al.*, 2002; Lilien & Balsamo, 2005; Yap *et al.*, 2007; Vestweber *et al.*, 2009). Daher wäre es wichtig die Expression der für die VE-Cadherin-Phosphorylierung verantwortlichen Interaktionspartner zu untersuchen: das VEGF und dessen Rezeptor VEGF-R2.

Darüber hinaus sollte in weiterführenden Experimenten überprüft werden, ob es Unterschiede in Serum individueller Patienten gibt, die sich in der Exazerbations- oder Remissionsphase der MS befinden. Darüber könnte schon allein eine genauere Untersuchung der

Zusammensetzung einzelner Seren, wie z.B. der Konzentration einzelner Zytokine, eine Aussage treffen. Es ist bekannt, dass das Expressionslevel der pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokine in verschiedenen Phasen der MS unterschiedlich ist (Khoury *et al.*, 1992; Kalman & Lublin, 1993). In der Exazerbationsphase der MS kommt es zur Erhöhung der Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, -2, -6) mit einer herabgesetzten Produktion antiinflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) (Navikas & Link, 1996). In der Remissionsphase der Krankheit dominieren antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  (Kennedy *et al.*, 1992; Khoury *et al.*, 1992). Die Einflüsse, die auf der Wirkung der prominent im Serum einzelner Phasen vorkommenden pro- und antiinflammatorischen Zytokine basieren, sollten deshalb separat an cEND-Zellen analysiert werden. Dies würde eine Zuordnung ihrer Wirkung der, gemäß dieser Arbeit, untersuchten Faktoren ermöglichen.

### **5.2.2 Unterschiedliche Einflüsse von Dexamethason auf die Proteinexpression von Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin in cEND-Zellen nach Inkubation mit Patientenseren**

Die Dexamethason-Gabe erbrachte nur geringe Effekte auf die Behebung der negativen Folgen der Exazerbationsseren-Inkubation. Die TER-Werte stiegen nach GC-Applikation nicht an, die Protein- und Genexpression wurde ebenfalls nur schwach beeinflusst im Falle des Claudin-5, die Occludin-Proteinlevel sanken sogar weiter. Grund für die schwachen GC-Effekte könnte der Versuchsaufbau sein, der keine längere GC-Behandlung erlaubte. Die hier verwendeten cEND-Zellen wurden für 48 h in DMEM mit einem 2% Anteil der jeweiligen Seren inkubiert. Zusätzlich wurde jeweils nach 24 h Serum-Inkubation mit 100 nM Dexamethason behandelt und für weitere 24 h gehalten. Die Durchführung der Experimente dauerte somit mehrere Tage lang, was eine Limitierung darstellte. Vor der Probenernte waren viele Zellen bereits abgestorben, was nicht nur durch den Seruminkubation-verursachten Zelltod zustande kam. Das Ablösen vieler Zellen kam sicherlich auch durch die lange Inkulturrhaltung zustande, sowie durch die Exploitation der Beschichtung. Die hier beschriebenen Limitierungen für die Zellhaltung und die Durchführung der Experimente erlaubten leider keine längere Dexamethason-Behandlung. Die Dauer der GC-Therapie eines akuten MS-Schubes hingegen dauert 3 bis 4 Tage, wonach eine Aufhebung des MRT-Signals nach GC-Gabe als Konsequenz für die BHS-Stabilisierung beobachtet werden kann (Grauer *et al.*, 2001). Zusätzlich wird bei der Therapie akuter MS-Schübe Methylprednisolon statt

Dexamethason eingesetzt. Die Verwendung dieses GCs sollte in weiterführenden Experimenten überprüft werden.

Eindeutigere Resultate konnten jedoch an cEND-Zellen beobachtet werden, die vor der GC-Behandlung mit Remissionsseren inkubiert wurden. Die mRNA-Analysen von Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin waren konsistent mit den Proteinexpressionsdaten von Western-Blot-Experimenten. Die 24-stündige Dexamethason-Behandlung erbrachte jedoch ebenfalls keine Rekonstitution des TERs auf das Kontrollniveau. Es konnte jedoch ein positiver Einfluss auf die Claudin-5- und Occludin-Genexpression in cEND-Zellen, die zuvor mit Remissionsseren inkubiert wurden, erkannt werden.

### **5.2.3 Dexamethason-vermittelte Herunterregulation der MMP-9-Genexpression in MS-Seren-inkubierten cEND-Zellen**

Dr. Y. Benesová und Mitarbeiter (Dept. Of Neurology, University Hospital, Brno, Tschechische Republik) schlugen in zuvor publizierten Arbeiten einige Proteine vor, die als Biomarker für verschiedene Verläufe der MS fungieren könnten. Darunter fanden sich neben den TJ-Proteinen Claudin-5 und Occludin auch MMP-9 und -2 wieder (Benesova *et al.*, 2009). Gemäß einer vorangegangenen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe, wurde bereits der Anstieg von MMP-9 auf mRNA und Proteinebene in cEND-Zellen nach TNF $\alpha$ -Gabe, und die Unterdrückung dieses Effektes durch simultane Behandlung mit Dexamethason, beschrieben (Forster *et al.*, 2007). Somit wurde die Genexpression von MMP-9 in mit Patientenseren-inkubierten cEND-Zellen mit und ohne Dexamethason analysiert. In Übereinstimmung mit *in vitro* (Benesova *et al.*, 2009) und *in vivo* (Lindberg *et al.*, 2001; Benesova *et al.*, 2009) Daten, die an unterschiedlichen MS-Modellsystemen beobachtet werden konnten, führte eine Dexamethason-Behandlung zu einer Aufhebung der MS-Seren-induzierten Hochregulierung der MMP-9, sowohl nach Remissions- als auch nach Exazerbationsseren-Inkubation. MMP-9 spielt somit eine Rolle bei der Detektion von akuten MS-Schüben. Dies ist auch in dem hier vorgestellten *in vitro* Modellsystem, der cEND-Zelllinie, der Fall.

Wichtig wäre gewesen, die MMP-9-Aktivität in Abhängigkeit von MS-Seren-Inkubation und Dexamethason-Behandlung zu untersuchen. Leider war eine Durchführung dessen, mit Hilfe der Zymographie im gewohnten Behandlungsschema, unmöglich durchzuführen. Denn die für dieses Experiment verwendeten Mediumüberstände führen dazu, dass kein Signal der aktiven MMP-9 auf dem Coomassie-Blue Brilliant G angefärbten PAA-Gel mit Gelatine-Zusatz detektiert werden konnte. Weiter lieferte der kommerziell erhältliche MMP-9-Activity Assay Kit keine eindeutigen Ergebnisse. Ein Western-Blot-Experiment im Hinblick auf MMP-9

zeigte ebenfalls keine Unterschiede in der MMP-9-Proteinexpression. Diese Experimente müssten in Zukunft etabliert werden, da deren Aussage die *real-time* RT-PCR-Daten bestärken würden.

Ebenso wurde die Genexpression des Inhibitors der MMP-9, des TIMP-1-Gens, nach Seruminkubation und Dexamethason-Behandlung analysiert. Dies führte jedoch nur in einem Fall zu einem signifikanten Unterschied, verglichen mit der gesunden, unbehandelten Kontrolle: GC-Gabe nach Remissionsseren-Inkubation bewirkte einen fast 2-fachen Anstieg der TIMP-1-mRNA-Level. Zwar waren diese Daten nicht völlig übereinstimmend mit Daten der oben genannten Studie (Forster *et al.*, 2007), in der Dexamethason neben einer Erniedrigung der MMP-9-Genexpression auch eine Genaktivierung des TIMP-1 bewirkte. Dies konnte in diesem experimentellen Aufbau, vor allem im Fall der Inkubation mit Seren Gesunder, nicht nachvollzogen werden. Die fast 2-fache Erhöhung der TIMP-1-Expression in Remissionsseren-inkubierten und Dexamethason-behandelten cEND-Zellen ist jedoch interessant und könnte in Folgeexperimenten weiterverfolgt werden.

### **5.3 GC-induzierter proteasomaler Abbau des GRs und die Erniedrigung der NO-Produktion im myokardialen Endothel**

#### **5.3.1 Negative Wirkung der Dexamethason-Behandlung auf die NO-Synthese in MyEND-Zellen**

Die vorangegangenen Teile dieser Dissertation beschäftigten sich mit der wichtigen Rolle von GCs bei der Therapie zentralnervöser Krankheiten. Diese entscheidende Rolle wird GC schon seit einem halben Jahrhundert zugeschrieben (Koehler, 1995; Qizilbash *et al.*, 2002; Kaal & Vecht, 2004). Dexamethason ist das synthetische GC, das üblicherweise verwendet wird. Seine hochpotente Wirkung entfaltet es zwischen 24 h und 72 h. Zudem besitzt Dexamethason gegenüber anderen GCs ausschliesslich eine hohe Affinität zum GR und keine mineralokortikoide Wirkung. Im letzten Abschnitt dieser Dissertation wurde der negative, NO-Synthese reduzierende Effekt der GC-Behandlung im murinen Herzendothel untersucht. In Übereinstimmung mit zahlreichen Literaturquellen werden in dieser Studie alte und neue Erkenntnisse zur GC-induzierten Erniedrigung der NO-Produktion präsentiert. Sehr wohl ist bekannt, dass das synthetische GC Dexamethason eine Erniedrigung der NO-Produktion im myokardialen Endothel *in vivo* und *in vitro* verursacht (Saruta, 1996; Rogers *et al.*, 2002; Panoulas *et al.*, 2008). Zur Validierung eines entsprechenden Modellsystems, für die hier beschriebenen Versuche, konnte diese Eigenschaft erstmalig in der myokardialen Endothelzelllinie aus der Maus, MyEND, (Golenhofen *et al.*, 2002) gezeigt werden (Abb. 4.3.1A).

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die GC-Gabe eine Herunterregulation der BH<sub>4</sub>-Produktion verursacht (Abb. 4.3.2A). Zahlreiche Publikationen weisen auf eine wichtige Rolle des eNOS-Cofaktors hin, dessen Produktion durch GC-Behandlung stark beeinträchtigt ist (Wever *et al.*, 1997; Thony *et al.*, 2000). Unter physiologischen Bedingungen kommt es bei einer Erniedrigung der BH<sub>4</sub>-Synthese zur endothelialen Unterfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen. Dazu zählen Diabetes (Meininger *et al.*, 2000; Shinozaki *et al.*, 2000), Artherosklerose (Laursen *et al.*, 2001), Hypercholesterolemie (Fukuda *et al.*, 2002; Gounarides *et al.*, 2007; Hadoke *et al.*, 2009) und dem Bluthochdruck (Hong *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2003b; Makras *et al.*, 2006). Das Resultat der Beeinträchtigung der BH<sub>4</sub>-Produktion ist eine verringerte, NO-vermittelte Vasodilatation. Zudem verursacht eine erniedrigte BH<sub>4</sub>-Verfügbarkeit eine erhöhte Produktion von O<sup>-</sup>, statt NO, was durch Entkopplung der eNOS zustande kommt (Cosentino & Katusic, 1995; Cosentino & Luscher, 1999; Katusic, 2001; Landmesser *et al.*, 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine BH<sub>4</sub>-Supplementierung die NO-Produktion und die durch den Faktor bedingte Relaxation von

Blutgefäßen *in vivo* und *in vitro* verbessert (Cosentino & Luscher, 1999; Meininger *et al.*, 2000; Shinozaki *et al.*, 2000; Laursen *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2003).

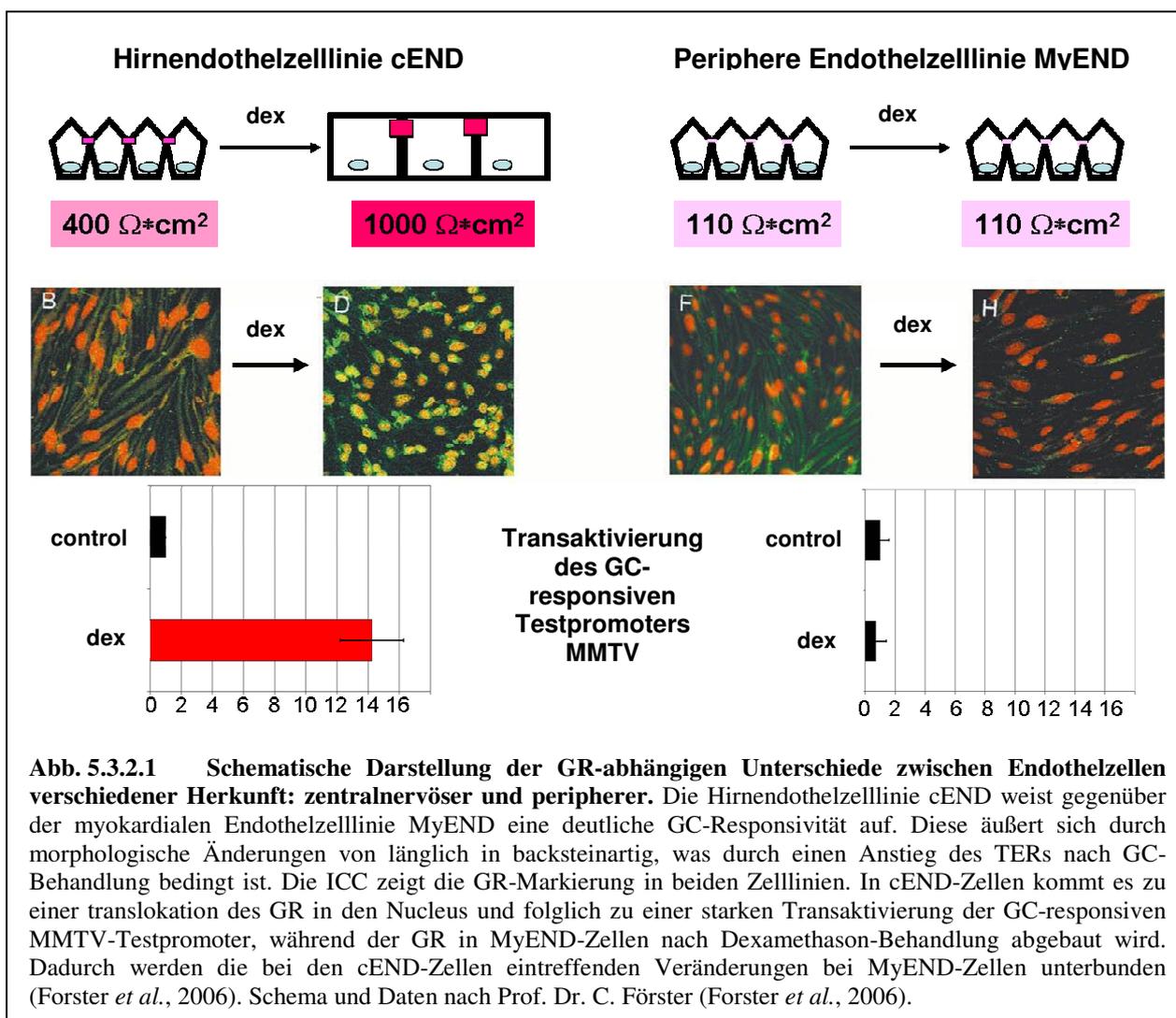
Auch konnte hier gezeigt werden, dass Dexamethason eine erniedrigte GTPCH-1-Genexpression induziert (Abb 4.3.2B), was eine Erklärung für die niedrigen BH<sub>4</sub>-Werte nach 48 h war. Zahlreiche Studien stellen die Wichtigkeit der GTPCH-1 für die Endothelfunktion dar. Einige von ihnen beschreiben die Herunterregulation der GTPCH-1 bei GC-induziertem Bluthochdruck (Cosentino & Luscher, 1999; Ignarro *et al.*, 2002). Eine andere Arbeitsgruppe berichtet darüber, dass ein Gentransfer der humanen GTPCH-1 die BH<sub>4</sub>-Level und die beeinträchtigte Endothelfunktion in den Blutgefäßen von hypertensiven Ratten wiederherstellen kann.

Im Falle des NO-produzierenden Enzyms, eNOS, brachte die Dexamethason-Behandlung zwar auf mRNA-Ebene, nicht aber auf Proteinebene, eine Herunterregulation (Abb. 4.3.1.B und 4.3.1.C) Somit konnten die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Wallerath *et al.*, 1999; Wallerath *et al.*, 2004; Schafer *et al.*, 2005) in MyEND-Zellen nicht bestätigt werden. Die hier präsentierten Ergebnisse sollten jedoch die Thesen aus der Literatur nicht negieren. Vielmehr waren die Ergebnisse Anlass, andere, von der GC-Behandlung beeinträchtigte Faktoren, *downstream* von der eNOS in der NO-Produktionskaskade, zu untersuchen. Andererseits stimmen unsere Ergebnisse überein mit früheren Befunden über GC-induzierte Verminderte eNOS-mRNA-Stabilität ohne beeinträchtigte eNOS-Protein-Level (Wallerath *et al.*, 1999; Zicha *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2004). Durchaus ist es jedoch möglich, dass das von uns ausgewählte Zellkulturmodell eine längere GC-Behandlungszeit erfordert, um negative Veränderungen in der eNOS-Proteinexpression zu detektieren.

Die MyEND-Zellen besitzen gegenüber anderen in der Literatur beschriebenen Modellen enorme Vorteile. Die direkte myokardiale Herkunft und die Immortalisierung erlaubt es, die Zellen über mehrere Passagen und unter wiederholbaren Bedingungen für Experimente zu verwenden. Zahlreiche Publikationen zum Thema der GC-induzierten Beeinträchtigung der Vasodilatation im Herzen basieren auf Experimenten, die in nicht-cardialen Endothelzellen durchgeführt wurden, wie beispielsweise in HUVEC-Zellen (Zerr-Fouineau *et al.*, 2007). Andere Gruppen führen Versuche an Präparationen von Aortenringen, die sehr aufwendig gewonnen werden, durch (Mitchell *et al.*, 2004).

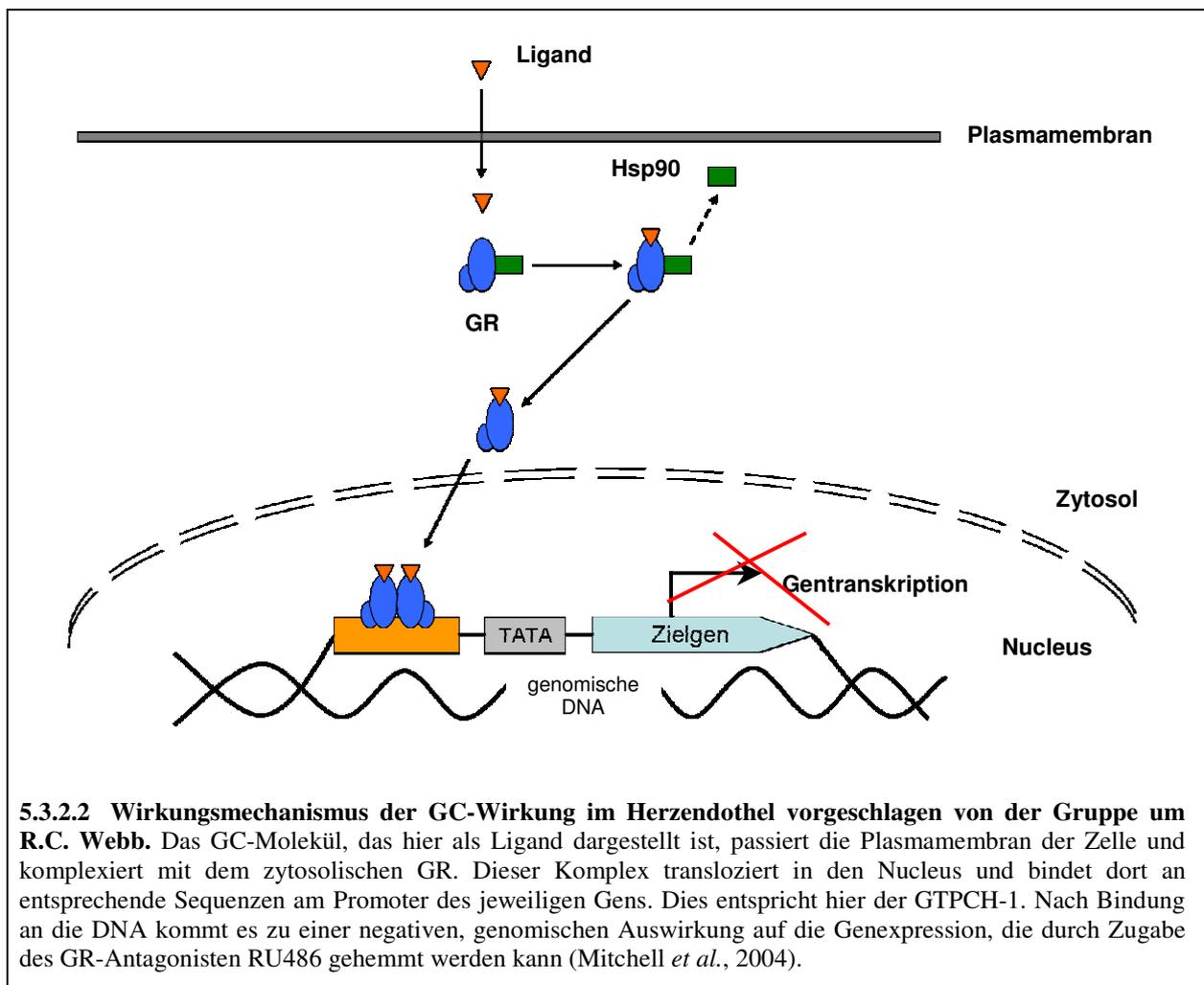
### 5.3.2 Verlorene Zielgenaktivierung in MyEND-Zellen als Konsequenz der GC-induzierten Abbaus des GRs

Den Überlegungen für die Untersuchung der GC-induzierten Verringerung der Vasodilatation im peripheren Endothel ging eine Studie voran, welche zuvor von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. C. Förster publiziert wurde (Forster *et al.*, 2006). Dabei wurde ein Vergleich von zwei Endothelzelllinien verschiedener Herkunft, den cEND- und MyEND-Zellen, im Bezug auf Veränderungen der Barriereigenschaften nach Dexamethason-Behandlung, durchgeführt. Die folgende Abbildung (Abb. 5.3.1.1) präsentiert schemenhaft eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Publikation.



Im Zusammenhang mit dem GC-induzierten Bluthochdruck durch verminderte NO-Produktion, beschränkten sich andere Arbeitsgruppen auf die negativen, herunterregulierenden Genexpressionseffekte der GC-GR-Wirkung (Johns *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2003a; Mitchell *et al.*, 2004). Dabei wird von einem direkten negativen

genomischen Effekt der GC-Behandlung auf die Expression der GTPCH-1 und somit auf die Produktion des  $\text{BH}_4$  berichtet. Dieser direkte negative genomische Effekt wird auch als ein GR-vermitteltes Phänomen beschrieben, nachdem durch simultanen Einsatz des GR-Antagonisten RU486 die herunterregulierende Wirkung von Dexamethason auf die Genexpression der GTPCH-1 und die eingeschränkte Vasodilatation der verwendeten Aortenringe unterbunden wurde. Die folgende Abbildung (Abb. 5.3.3.1) stellt die von der Arbeitsgruppe um R.C. Webb vorgeschlagene Wirkungsweise der GCs auf die Expression der GTPCH-1 im Herzendothel dar.



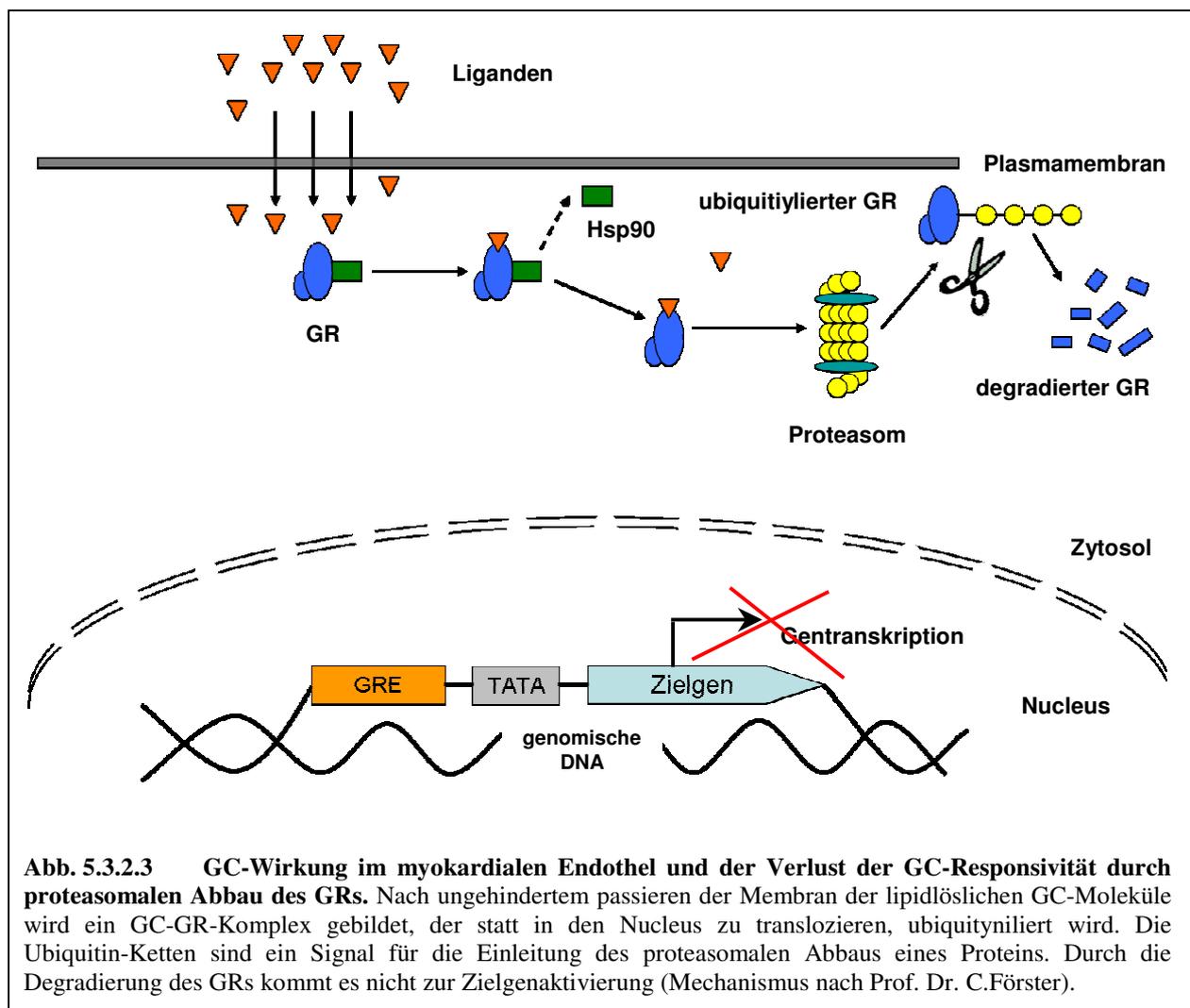
Die Liganden-abhängige Herunterregulation des GRs und der damit assoziierte Verlust der GC-Responsivität wurde vor einigen Jahren von Prof. J.A. Cidlowski und Kollegen ausführlich beschrieben (Bellingham *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1994; Webster & Cidlowski, 1994; Wallace & Cidlowski, 2001). Dem zufolge ist die Wirksamkeit von GCs abhängig ist von der Konzentration der GRs in der Zelle. Durch die Komplexierung mit dem Liganden kommt es zu einer Herunterregulation des GR-Proteins (negatives *feed-back*), die nach Ligandenentzug wieder reversibel ist (Cidlowski & Cidlowski, 1981; McIntyre & Samuels,

1985; Hoeck *et al.*, 1989; Burnstein *et al.*, 1990; Bellingham *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1994). Der GR-Status in der Zelle wird sowohl auf Transkriptions- als auch Translationsebene kontrolliert (Oakley & Cidlowski, 1993; Schmidt & Meyer, 1994). Ebenso zeigte sich der GR-Phosphorylierungszustand als ein wichtiger Faktor für die Rezeptor-Stabilität (Bodwell *et al.*, 1991; Mason & Housley, 1993; Almlof *et al.*, 1995). Eine Phosphorylierungs-defekte Mutante des murinen GRs unterliegt, im Gegensatz zum nativen Protein, nicht der Liganden-abhängigen Herunterregulation (Webster *et al.*, 1997). Aufgrund der Proteinphosphorylierung, die als ein Signal für Proteinerkennung für das Ubiquitin agiert, wurde vermutet, dass die GR-Degradierung durch das Proteasom vermittelt wird (Fuchs *et al.*, 1998; Hershko & Ciechanover, 1998; Laney & Hochstrasser, 1999; Kornitzer & Ciechanover, 2000). Der Ubiquitin-Signalweg beinhaltet die Ubiquitin-aktivierenden Enzyme (UBAs), die E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (UBCs) und die E3-Ubiquitin-Ligase Enzyme (Wiederkehr *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung ermöglicht die Erkennung des Proteins durch die E2 und/ oder E3-Enzyme, die kovalent das 76 AS große Protein Ubiquitin an die Lysin-Reste des Proteins binden und es so für den Abbau freigeben (Chen *et al.*, 1995; Baldi *et al.*, 1996; Skowrya *et al.*, 1999). Die Polyubiquitylierung eines Proteins ermöglicht die Erkennung durch den Proteasom-Multiproteinkomplex, welches das Protein in kleine Polypeptide und Aminosäuren degradiert. Die Entdeckung verschiedener Inhibitoren des Proteasoms erlaubte die Aufklärung der Rolle des Stoffwechsels kurz- und langlebiger Proteine (Driscoll & Goldberg, 1990; Coux *et al.*, 1996; Lee & Goldberg, 1998; DeMartino & Slaughter, 1999). Es konnte auch demonstriert werden, dass der GR mit dem E2-konjugierenden Protein (Kaul *et al.*, 2002; Garside *et al.*, 2006), sowie mit zwei Proteinen des E3-Ligase-Komplexes (Wang & DeFranco, 2005) interagiert. Die funktionellen und physiologischen Konsequenzen aber sind weitgehend unerforscht. In der vorliegenden Arbeit sollte demonstriert werden, dass der Liganden-abhängige Abbau des GR-Proteins einen Einfluss auf die NO-Synthese hat. Die negative Einflussnahme auf die NO-Signalkaskade könnte der Grund für die bei Patienten mit Langzeit-GC-Therapie auftretende Hypertonie sein.

Unsere Daten weisen auf eine unterschiedliche GC-Antwort durch unterschiedliche Transaktivierungsaktivität des GRs im neuronalen und nicht-neronalen Endothel hin. In diesem Zusammenhang präsentieren wir die negativen Auswirkungen der GC-Behandlung auf die NO- und BH<sub>4</sub>-Produktion, sowie auf die GTPCH-1-Expression in MyEND-Zellen, als das Ergebnis des Verlustes der Transaktivierungsaktivität des GRs in MyEND-Zellen. Dieser Responsivitätsverlust wird durch den proteasomalen Abbau des GRs verursacht und konnte

durch einen simultanen Einsatz von Dexamethason und des Proteasominhibitors Calpain Inhibitor I, sowie durch die Transfektion des ubiquitinylierungsdefekten GR-Expressionsvektors, K426A-GR (Wallace & Cidlowski, 2001), vollkommen unterdrückt oder gar verbessert werden. Durch Protektion des GRs mittels dieser Methoden war es möglich, die herunterregulierte GTPCH-1-Expression (Abb. 4.3.6), die BH<sub>4</sub>-Produktion (Abb. 4.3.7) und entsprechend die eNOS-Aktivität (Abb. 4.3.8), die das Korrelat der NO-Produktion darstellt, zu regenerieren.

Resultierend aus den hier präsentierten Ergebnissen, kann in der folgenden Abbildung (Abb. 5.3.2.3) der Mechanismus der GC-verursachten zellulären Ereignisse im peripheren Endothel dargestellt werden.



**Abb. 5.3.2.3 GC-Wirkung im myokardialen Endothel und der Verlust der GC-Responsivität durch proteasomalen Abbau des GRs.** Nach ungehindertem passieren der Membran der lipidlöslichen GC-Moleküle wird ein GC-GR-Komplex gebildet, der statt in den Nucleus zu translozieren, ubiquitinyliert wird. Die Ubiquitin-Ketten sind ein Signal für die Einleitung des proteasomalen Abbaus eines Proteins. Durch die Degradierung des GRs kommt es nicht zur Zielgenaktivierung (Mechanismus nach Prof. Dr. C.Förster).

Die zellulären Mechanismen der GC-Wirkung sind noch nicht vollkommen verstanden und aufgeklärt. Weitere Experimente zur gewebespezifischen Wirkung von GCs wäre im Sinne der Patienten, die auf längerfristige GC-Therapien angewiesen sind. Die Entwicklung einer

neuen Generation Hirnendothel-spezifischer GR-Liganden mit weniger oder sogar keinen Nebenwirkungen am peripheren Endothel gehört zu den Herausforderungen, die heutzutage der Forschung und der Pharmaindustrie gestellt wird. Der BHS-protective, immunsuppressive und immunmodulatorische Einsatz von GCs, ist bis heute mit vielen unerwünschten Effekten auf das myokardiale Endothel verbunden (Saruta, 1996).

Die Grundlage für die Entwicklung neuer, gewebespezifisch wirkender GR-Liganden ist die Untersuchung des GR-Status und die daraus folgende Responsivität in GC-behandelten Zellen. Ebenso wichtig wäre jedoch die Durchführung von *in vivo*-Experimenten, die hier formulierten Aussagen bestätigen würden.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abbott N. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200, 527.
- Adamson RH, Curry FE, Adamson G, Liu B, Jiang Y, Aktories K, Barth H, Daigeler A, Golenhofen N, Ness W & Drenckhahn D. (2002). Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *J Physiol* 539, 295-308.
- Adukauskiene D, Bivainyte A & Radaviciute E. (2007). [Cerebral edema and its treatment]. *Medicina (Kaunas)* 43, 170-176.
- Ahn KS, Sethi G & Aggarwal BB. (2007). Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic. *Curr Mol Med* 7, 619-637.
- Aida K, Shi Q, Wang J, VandeBerg JL, McDonald T, Nathanielsz P & Wang XL. (2004). The effects of betamethasone (BM) on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in adult baboon femoral arterial endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 91, 219-224.
- Akaike M & Matsumoto T. (2007). [Glucocorticoid-induced reduction in NO bioavailability and vascular endothelial dysfunction]. *Clin Calcium* 17, 864-870.
- Alexander JS & Elrod JW. (2002). Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat* 200, 561-574.
- Almlof T, Wright AP & Gustafsson JA. (1995). Role of acidic and phosphorylated residues in gene activation by the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 270, 17535-17540.
- Anderson JM, Balda MS & Fanning AS. (1993). The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 5, 772-778.
- Andersson PB & Goodkin DE. (1998). Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review. *J Neurol Sci* 160, 16-25.
- Andrew PJ & Mayer B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43, 521-531.
- Aumailley M, Timpl R & Risau W. (1991). Differences in laminin fragment interactions of normal and transformed endothelial cells. *Exp Cell Res* 196, 177-183.
- Baldi L, Brown K, Franzoso G & Siebenlist U. (1996). Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B-alpha. *J Biol Chem* 271, 376-379.
- Balkwill FR & Burke F. (1989). The cytokine network. *Immunol Today* 10, 299-304.

- Baumgartner W, Schutz GJ, Wiegand J, Golenhofen N & Drenckhahn D. (2003). Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. *J Cell Sci* 116, 1001-1011.
- Bazzoni G & Dejana E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84, 869-901.
- Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344.
- Beato M & Klug J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6, 225-236.
- Bellingham DL, Sar M & Cidlowski JA. (1992). Ligand-dependent down-regulation of stably transfected human glucocorticoid receptors is associated with the loss of functional glucocorticoid responsiveness. *Mol Endocrinol* 6, 2090-2102.
- Benesova Y, Vasku A, Novotna H, Litzman J, Stourac P, Beranek M, Kadanka Z & Bednarik J. (2009). Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis. *Mult Scler*.
- Blecharz KG, Drenckhahn D & Forster CY. (2008). Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1139-1149.
- Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L, Pardi R & Bender JR. (1997). Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol* 273, H286-294.
- Bodwell JE, Orti E, Coull JM, Pappin DJ, Smith LI & Swift F. (1991). Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 266, 7549-7555.
- Bogatcheva NV & Verin AD. (2008). The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. *Microvasc Res* 76, 202-207.
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM & Shapiro L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308-1313.
- Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR & Balow JE. (1993). Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 119, 1198-1208.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brasier AR. (2006). The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol* 6, 111-130.
- Burek M & Forster CY. (2009). Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter. *Mol Cell Endocrinol* 298, 19-24.

- Burnham JA, Wright RR, Dreisbach J & Murray RS. (1991). The effect of high-dose steroids on MRI gadolinium enhancement in acute demyelinating lesions. *Neurology* 41, 1349-1354.
- Burnstein KL, Jewell CM & Cidlowski JA. (1990). Human glucocorticoid receptor cDNA contains sequences sufficient for receptor down-regulation. *J Biol Chem* 265, 7284-7291.
- Buse P, Woo PL, Alexander DB, Reza A & Firestone GL. (1995). Glucocorticoid-induced functional polarity of growth factor responsiveness regulates tight junction dynamics in transformed mammary epithelial tumor cells. *J Biol Chem* 270, 28223-28227.
- Buttgereit F, Brand MD & Burmester GR. (1999). Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem Pharmacol* 58, 363-368.
- Carmeliet P & Jain RK. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D & Dejana E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98, 147-157.
- Cavallaro U, Liebner S & Dejana E. (2006). Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res* 312, 659-667.
- Chang A, Ostrove JM & Bird RE. (1997). Development of an improved product enhanced reverse transcriptase assay. *J Virol Methods* 65, 45-54.
- Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D & Maniatis T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9, 1586-1597.
- Chen ZJ. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7, 758-765.
- Cidlowski JA & Cidlowski NB. (1981). Regulation of glucocorticoid receptors by glucocorticoids in cultured HeLa S3 cells. *Endocrinology* 109, 1975-1982.
- Citi S. (1993). The molecular organization of tight junctions. *J Cell Biol* 121, 485-489.
- Claude P & Goodenough DA. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58, 390-400.
- Colgan SP, Parkos CA, Delp C, Arnaout MA & Madara JL. (1993). Neutrophil migration across cultured intestinal epithelial monolayers is modulated by

- epithelial exposure to IFN-gamma in a highly polarized fashion. *J Cell Biol* 120, 785-798.
- Cosentino F & Katusic ZS. (1995). Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 91, 139-144.
- Cosentino F & Luscher TF. (1999). Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 43, 274-278.
- Coux O, Tanaka K & Goldberg AL. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65, 801-847.
- Crockard AD, Treacy MT, Droogan AG, McNeill TA & Hawkins SA. (1995). Transient immunomodulation by intravenous methylprednisolone treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 1, 20-24.
- D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS & Antel JP. (1996). Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 184, 2361-2370.
- Defilippi P, van Hinsbergh V, Bertolotto A, Rossino P, Silengo L & Tarone G. (1991). Differential distribution and modulation of expression of alpha 1/beta 1 integrin on human endothelial cells. *J Cell Biol* 114, 855-863.
- Dejana E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 261-270.
- Dejana E, Bazzoni G & Lampugnani MG. (1999). Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 252, 13-19.
- Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O & Bazzoni G. (2000). The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol* 44, 743-748.
- DeMartino GN & Slaughter CA. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 274, 22123-22126.
- Dermietzel R, Krause D, Kremer M, Wang C & Stevenson B. (1992). Pattern of glucose transporter (Glut 1) expression in embryonic brains is related to maturation of blood-brain barrier tightness. *Dev Dyn* 193, 152-163.
- Di Munno O & Delle Sedie A. (2008). Effects of glucocorticoid treatment on focal and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *J Endocrinol Invest* 31, 43-47.
- Dotz C, Wellhoner JP, Schutt M & Sayk F. (2009). [Glucocorticoids and hypertension]. *Internist (Berl)* 50, 36-41.
- Dowling PC, Bosch VV & Cook SD. (1980). Possible beneficial effect of high-dose intravenous steroid therapy in acute demyelinating disease and transverse myelitis. *Neurology* 30, 33-36.

- Driscoll J & Goldberg AL. (1990). The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J Biol Chem* 265, 4789-4792.
- Elfeber K, Kohler A, Lutzenburg M, Osswald C, Galla HJ, Witte OW & Koepsell H. (2004). Localization of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. *Histochem Cell Biol* 121, 201-207.
- Encio IJ & Detera-Wadleigh SD. (1991). The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 266, 7182-7188.
- Engelhardt B. (2000). Role of glucocorticoids on T cell recruitment across the blood-brain barrier. *Z Rheumatol* 59 Suppl 2, II/18-21.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA & Anderson JM. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 29745-29753.
- Fischer A, Folkerts G, Geppetti P & Groneberg DA. (2002). Mediators of asthma: nitric oxide. *Pulm Pharmacol Ther* 15, 73-81.
- Forster C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 130, 55-70.
- Forster C, Burek M, Romero IA, Weksler B, Couraud PO & Drenckhahn D. (2008). Differential effects of hydrocortisone and TNF $\alpha$  on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Physiol* 586, 1937-1949.
- Forster C, Kahles T, Kietz S & Drenckhahn D. (2007). Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol* 580, 937-949.
- 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, 475-486.
- 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, 413-425.
- Forstermann U. (1994). Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelforschung* 44, 402-407.
- Forstermann U, Nakane M, Tracey WR & Pollock JS. (1993). Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J* 14 Suppl I, 10-15.
- Fuchs SY, Fried VA & Ronai Z. (1998). Stress-activated kinases regulate protein stability. *Oncogene* 17, 1483-1490.

- Fukuda Y, Teragawa H, Matsuda K, Yamagata T, Matsuura H & Chayama K. (2002). Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia. *Heart* 87, 264-269.
- Fukushima T & Nixon JC. (1980). Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal Biochem* 102, 176-188.
- Furchgott RF & Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S & Tsukita S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123, 1777-1788.
- Gardel ML, Sabass B, Ji L, Danuser G, Schwarz US & Waterman CM. (2008). Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed. *J Cell Biol* 183, 999-1005.
- Garside H, Waters C, Berry A, Rice L, Ardley HC, White A, Robinson PA & Ray D. (2006). UbcH7 interacts with the glucocorticoid receptor and mediates receptor autoregulation. *J Endocrinol* 190, 621-629.
- Gehring U. (1993). The structure of glucocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45, 183-190.
- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG & Evans RM. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645-652.
- Giovanelli J, Campos KL & Kaufman S. (1991). Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7091-7095.
- Golenhofen N, Ness W, Wawrousek EF & Drenckhahn D. (2002). Expression and induction of the stress protein alpha-B-crystallin in vascular endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 117, 203-209.
- Gomes JA, Stevens RD, Lewin JJ, 3rd, Mirski MA & Bhardwaj A. (2005). Glucocorticoid therapy in neurologic critical care. *Crit Care Med* 33, 1214-1224.
- Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H & Vestweber D. (1997). VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 110 ( Pt 5), 583-588.
- Gounarides JS, Korach-Andre M, Killary K, Argentieri G, Turner O & Laurent D. (2007). Effect of dexamethasone on glucose tolerance and fat metabolism in a diet-induced obesity mouse model. *Endocrinology*.
- Grauer O, Offenhausser M, Schmidt J, Toyka KV & Gold R. (2001). [Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations]. *Nervenarzt* 72, 577-589.

- Grieb P, Forster RE, Strome D, Goodwin CW & Pape PC. (1985). O<sub>2</sub> exchange between blood and brain tissues studied with 18O<sub>2</sub> indicator-dilution technique. *J Appl Physiol* 58, 1929-1941.
- Gumbiner BM. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
- Gumbiner BM. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 622-634.
- Gustafsson JA, Wikstrom AC & Denis M. (1989). The non-activated glucocorticoid receptor: structure and activation. *J Steroid Biochem* 34, 53-62.
- Hadoke PW, Iqbal J & Walker BR. (2009). Therapeutic manipulation of glucocorticoid metabolism in cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 156, 689-712.
- Harke N, Leers J, Kietz S, Drenckhahn D & Forster C. (2008). Glucocorticoids regulate the human occludin gene through a single imperfect palindromic glucocorticoid response element. *Mol Cell Endocrinol* 295, 39-47.
- Hartsock A & Nelson WJ. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778, 660-669.
- Haselton FR, Dworska E, Evans SS, Hoffman LH & Alexander JS. (1996). Modulation of retinal endothelial barrier in an in vitro model of the retinal microvasculature. *Exp Eye Res* 63, 211-222.
- Hatashita S & Hoff JT. (1990). Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. *Stroke* 21, 582-588.
- Hawkins BT & Davis TP. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57, 173-185.
- Hershko A & Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S & Rubin LL. (1997). Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110 ( Pt 14), 1603-1613.
- Hoeck W, Rusconi S & Groner B. (1989). Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cells. Investigations with a monospecific antiserum against a bacterially expressed receptor fragment. *J Biol Chem* 264, 14396-14402.
- Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T & Galla HJ. (1998). Hydrocortisone reinforces the blood-brain properties in a serum free cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 312-315.

- Hong HJ, Hsiao G, Cheng TH & Yen MH. (2001). Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38, 1044-1048.
- Ichai C, Ciais JF & Grimaud D. (1997). [The internal environment and intracranial hypertension]. *Ann Fr Anesth Reanim* 16, 435-444.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM & Wood KS. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61, 866-879.
- Ignarro LJ, Napoli C & Loscalzo J. (2002). Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res* 90, 21-28.
- Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M & Tsukita S. (2003). Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 116, 1959-1967.
- Inoue J, Gohda J, Akiyama T & Semba K. (2007). NF-kappaB activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci* 98, 268-274.
- Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S & Tsukita S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138, 181-192.
- Jacobson JR & Garcia JG. (2007). Novel therapies for microvascular permeability in sepsis. *Curr Drug Targets* 8, 509-514.
- Jalimarada SS, Shivanna M, Kini V, Mehta D & Srinivas SP. (2009). Microtubule disassembly breaks down the barrier integrity of corneal endothelium. *Exp Eye Res.*
- Jin W, Wang H, Ji Y, Hu Q, Yan W, Chen G & Yin H. (2008). Increased intestinal inflammatory response and gut barrier dysfunction in Nrf2-deficient mice after traumatic brain injury. *Cytokine* 44, 135-140.
- Johns DG, Dorrance AM, Tramontini NL & Webb RC. (2001). Glucocorticoids inhibit tetrahydrobiopterin-dependent endothelial function. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 27-31.
- Kaal EC & Vecht CJ. (2004). The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol* 16, 593-600.
- Kalman B & Lublin FD. (1993). Immunopathogenic mechanisms in experimental allergic encephalomyelitis. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 6, 182-188.
- Kapatos G, Hirayama K & Hasegawa H. (1992). Tetrahydrobiopterin turnover in cultured rat sympathetic neurons: developmental profile, pharmacologic sensitivity, and relationship to norepinephrine synthesis. *J Neurochem* 59, 2048-2055.

- Katusic ZS. (2001). Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H981-986.
- Kaul S, Blackford JA, Jr., Cho S & Simons SS, Jr. (2002). Ubc9 is a novel modulator of the induction properties of glucocorticoid receptors. *J Biol Chem* 277, 12541-12549.
- Keegan BM & Noseworthy JH. (2002). Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53, 285-302.
- Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS & Mohler KM. (1992). Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* 149, 2496-2505.
- Khosla N & Hogan D. (2006). Mineralocorticoid hypertension and hypokalemia. *Semin Nephrol* 26, 434-440.
- Khoury SJ, Hancock WW & Weiner HL. (1992). Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 176, 1355-1364.
- Kimura K, Teranishi S & Nishida T. (2009). Interleukin-1beta-induced disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 597-603.
- Koehler PJ. (1995). Use of corticosteroids in neuro-oncology. *Anticancer Drugs* 6, 19-33.
- Kokot F & Hyla-Klekot L. (2008). Drug-induced abnormalities of potassium metabolism. *Pol Arch Med Wewn* 118, 431-434.
- Kornitzer D & Ciechanover A. (2000). Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol* 182, 1-11.
- La Mantia L, Eoli M, Milanese C, Salmaggi A, Dufour A & Torri V. (1994). Double-blind trial of dexamethasone versus methylprednisolone in multiple sclerosis acute relapses. *Eur Neurol* 34, 199-203.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B & Dejana E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* 129, 203-217.
- Lampugnani MG & Dejana E. (2007). Adherens junctions in endothelial cells regulate vessel maintenance and angiogenesis. *Thromb Res* 120 Suppl 2, S1-6.

- Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C & Dejana E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 174, 593-604.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE & Harrison DG. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111, 1201-1209.
- Laney JD & Hochstrasser M. (1999). Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97, 427-430.
- Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T & Harrison DG. (2001). Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103, 1282-1288.
- Leach L, Lammiman MJ, Babawale MO, Hobson SA, Bromilou B, Lovat S & Simmonds MJ. (2000). Molecular organization of tight and adherens junctions in the human placental vascular tree. *Placenta* 21, 547-557.
- Lee DH & Goldberg AL. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8, 397-403.
- Lee TY & Gotlieb AI. (2003). Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity. *Microsc Res Tech* 60, 115-127.
- LeGal YM & Morrissey LL. (1990). Methylprednisolone interventions in myocardial infarction: a controversial subject. *Can J Cardiol* 6, 405-410.
- Lelievre E, Mattot V, Huber P, Vandebunder B & Soncin F. (2000). ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene* 19, 2438-2446.
- Leussink VI, Jung S, Merschorf U, Toyka KV & Gold R. (2001). High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* 58, 91-97.
- Lidofsky S & Smith J. (2009). Glucocorticoid-induced osteoporosis in inflammatory bowel disease. *Med Health R I* 92, 128-130.
- Liebner S, Corada M, Bangsow T, Babbage J, Taddei A, Czupalla CJ, Reis M, Felici A, Wolburg H, Fruttiger M, Taketo MM, von Melchner H, Plate KH, Gerhardt H & Dejana E. (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 183, 409-417.
- Liebner S, Kniesel U, Kalbacher H & Wolburg H. (2000). Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 79, 707-717.

- Lilien J & Balsamo J. (2005). The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 17, 459-465.
- Lindberg RL, De Groot CJ, Montagne L, Freitag P, van der Valk P, Kappos L & Leppert D. (2001). The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain* 124, 1743-1753.
- Lipworth BJ. (2000). Therapeutic implications of non-genomic glucocorticoid activity. *Lancet* 356, 87-89.
- Lohmann C, Huwel S & Galla HJ. (2002). Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: evaluation of different in vitro assays. *J Drug Target* 10, 263-276.
- Lossinsky AS & Shivers RR. (2004). Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol* 19, 535-564.
- Lu L, Feng Y, Hucker WJ, Oswald SJ, Longmore GD & Yin FC. (2008). Actin stress fiber pre-extension in human aortic endothelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 65, 281-294.
- Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M & Lassmann H. (1996). Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6, 259-274.
- Lucchinetti CF, Brueck W, Rodriguez M & Lassmann H. (1998). Multiple sclerosis: lessons from neuropathology. *Semin Neurol* 18, 337-349.
- Madan AP & DeFranco DB. (1993). Bidirectional transport of glucocorticoid receptors across the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3588-3592.
- Madara JL. (1988). Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? *Cell* 53, 497-498.
- Madara JL, Barenberg D & Carlson S. (1986). Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J Cell Biol* 102, 2125-2136.
- Madias JE & Hood WB, Jr. (1982). Effects of methylprednisolone on the ischemic damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 65, 1106-1113.
- Maier W, Cosentino F, Lutolf RB, Fleisch M, Seiler C, Hess OM, Meier B & Luscher TF. (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 35, 173-178.
- Makras P, Toloumis G, Papadogias D, Kaltsas GA & Besser M. (2006). The diagnosis and differential diagnosis of endogenous Cushing's syndrome. *Hormones (Athens)* 5, 231-250.

- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P & Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Markowitz D, Hesdorffer C, Ward M, Goff S & Bank A. (1990). Retroviral gene transfer using safe and efficient packaging cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 612, 407-414.
- Marletta MA. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78, 927-930.
- Mason SA & Housley PR. (1993). Site-directed mutagenesis of the phosphorylation sites in the mouse glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268, 21501-21504.
- Mastaglia FL. (2008). Inflammatory muscle diseases. *Neurol India* 56, 263-270.
- Matter K & Balda MS. (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 225-236.
- Maudru T & Peden K. (1997). Elimination of background signals in a modified polymerase chain reaction-based reverse transcriptase assay. *J Virol Methods* 66, 247-261.
- McAllister MS, Krizanac-Bengez L, Macchia F, Naftalin RJ, Pedley KC, Mayberg MR, Marroni M, Leaman S, Stanness KA & Janigro D. (2001). Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res* 904, 20-30.
- McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD & Schneeberger EE. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109 ( Pt 9), 2287-2298.
- McDonald WI. (1994). Rachele Fishman-Matthew Moore Lecture. The pathological and clinical dynamics of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 338-343.
- McIntyre WR & Samuels HH. (1985). Triamcinolone acetonide regulates glucocorticoid-receptor levels by decreasing the half-life of the activated nuclear-receptor form. *J Biol Chem* 260, 418-427.
- Mehta D & Malik AB. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 86, 279-367.
- Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, Martinez-Zaguilan R, Rojas JD, Kelly KA & Wu G. (2000). Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J* 349, 353-356.
- Minagar A & Alexander JS. (2003). Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 9, 540-549.

- Minagar A, Ostanin D, Long AC, Jennings M, Kelley RE, Sasaki M & Alexander JS. (2003). Serum from patients with multiple sclerosis downregulates occludin and VE-cadherin expression in cultured endothelial cells. *Mult Scler* 9, 235-238.
- Mitchell BM, Dorrance AM, Mack EA & Webb RC. (2004). Glucocorticoids decrease GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin-dependent vasorelaxation through glucocorticoid receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 43, 8-13.
- Mitchell BM, Dorrance AM & Webb RC. (2003a). GTP cyclohydrolase 1 downregulation contributes to glucocorticoid hypertension in rats. *Hypertension* 41, 669-674.
- Mitchell BM, Dorrance AM & Webb RC. (2003b). GTP cyclohydrolase 1 inhibition attenuates vasodilation and increases blood pressure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H2165-2170.
- Mitchell BM & Webb RC. (2002). Impaired vasodilation and nitric oxide synthase activity in glucocorticoid-induced hypertension. *Biol Res Nurs* 4, 16-21.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K & Tsukita S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 511-516.
- Murata T, Hori M, Sakamoto K, Karaki H & Ozaki H. (2004). Dexamethasone blocks hypoxia-induced endothelial dysfunction in organ-cultured pulmonary arteries. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 647-655.
- Myers JS, Pierce J & Pazdernik T. (2008). Neurotoxicology of chemotherapy in relation to cytokine release, the blood-brain barrier, and cognitive impairment. *Oncol Nurs Forum* 35, 916-920.
- Navikas V & Link H. (1996). Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 45, 322-333.
- Nawroth R, Poell G, Ranft A, Kloep S, Samulowitz U, Fachinger G, Golding M, Shima DT, Deutsch U & Vestweber D. (2002). VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J* 21, 4885-4895.
- Neeck G, Renkawitz R & Eggert M. (2002). Molecular aspects of glucocorticoid hormone action in rheumatoid arthritis. *Cytokines Cell Mol Ther* 7, 61-69.
- Neuhaus J, Risau W & Wolburg H. (1991). Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Ann N Y Acad Sci* 633, 578-580.
- Neuwelt EA. (2004). Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 54, 131-140; discussion 141-132.
- Newton HB. (2006). Advances in strategies to improve drug delivery to brain tumors. *Expert Rev Neurother* 6, 1495-1509.

- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M & Tsukita S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161, 653-660.
- Noseworthy JH. (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399, A40-47.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M & Weinshenker BG. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952.
- Oakley RH & Cidlowski JA. (1993). Homologous down regulation of the glucocorticoid receptor: the molecular machinery. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3, 63-88.
- Oakley RH, Webster JC, Jewell CM, Sar M & Cidlowski JA. (1999). Immunocytochemical analysis of the glucocorticoid receptor alpha isoform (GRalpha) using GRalpha-specific antibody. *Steroids* 64, 742-751.
- Ornstein L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 121, 321-349.
- Palmer RM, Ferrige AG & Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
- Palmer RM & Moncada S. (1989). A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158, 348-352.
- Panoulas VF, Douglas KM, Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Nightingale P, Kita MD, Elisaf MS & Kitas GD. (2008). Long-term exposure to medium-dose glucocorticoid therapy associates with hypertension in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 47, 72-75.
- Pardridge WM. (1986). Blood-brain barrier transport of nutrients. *Nutr Rev* 44 Suppl, 15-25.
- Pardridge WM. (1988). Recent advances in blood-brain barrier transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28, 25-39.
- Pardridge WM, Eisenberg J & Yang J. (1985). Human blood-brain barrier insulin receptor. *J Neurochem* 44, 1771-1778.
- Perez-Moreno M, Jamora C & Fuchs E. (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112, 535-548.
- Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R & Engel J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 223, 1019-1026.

- Pyra H, Boni J & Schupbach J. (1994). Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1544-1548.
- Qizilbash N, Lewington SL & Lopez-Arrieta JM. (2002). Corticosteroids for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000064.
- Regina A, Koman A, Piciotti M, El Hafny B, Center MS, Bergmann R, Couraud PO & Roux F. (1998). Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 71, 705-715.
- Reichardt HM, Gold R & Luhder F. (2006). Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev Neurother* 6, 1657-1670.
- Rexin M, Busch W & Gehring U. (1988). Chemical cross-linking of heteromeric glucocorticoid receptors. *Biochemistry* 27, 5593-5601.
- Risau W & Wolburg H. (1990). Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 13, 174-178.
- Rodriguez M, Siva A, Ward J, Stolp-Smith K, O'Brien P & Kurland L. (1994). Impairment, disability, and handicap in multiple sclerosis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Neurology* 44, 28-33.
- Rogers KM, Bonar CA, Estrella JL & Yang S. (2002). Inhibitory effect of glucocorticoid on coronary artery endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H1922-1928.
- Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud PO & Adamson P. (2003). Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 344, 112-116.
- Rosenberg GA. (2002a). Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist* 8, 586-595.
- Rosenberg GA. (2002b). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39, 279-291.
- Rosenberg GA & Mun-Bryce S. (2004). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 1-16.
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J & et al. (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 115, 1725-1735.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

- Sanchez ER, Housley PR & Pratt WB. (1986). The molybdate-stabilized glucocorticoid binding complex of L-cells contains a 98-100 kdalton steroid binding phosphoprotein and a 90 kdalton nonsteroid-binding phosphoprotein that is part of the murine heat-shock complex. *J Steroid Biochem* 24, 9-18.
- Saruta T. (1996). Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Hypertens Res* 19, 1-8.
- Schafer SC, Wallerath T, Closs EI, Schmidt C, Schwarz PM, Forstermann U & Lehr HA. (2005). Dexamethasone suppresses eNOS and CAT-1 and induces oxidative stress in mouse resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H436-444.
- Schmidt K, Werner ER, Mayer B, Wachter H & Kukovetz WR. (1992). Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *Biochem J* 281 ( Pt 2), 297-300.
- Schmidt TJ & Meyer AS. (1994). Autoregulation of corticosteroid receptors. How, when, where, and why? *Receptor* 4, 229-257.
- Schneeberger EE & Lynch RD. (1992). Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262, L647-661.
- Schneeberger EE & Lynch RD. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1213-1228.
- Schnittler HJ. (1998). Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 3, 30-39.
- Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N & Drenckhahn D. (1990). Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 431, 379-401.
- Shalet S & Mukherjee A. (2008). Pharmacological treatment of hypercortisolism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15, 234-238.
- Shatney CH & Lillehei RC. (1982). The influence of megadose methylprednisolone on experimental myocardial infarct size. *Adv Shock Res* 8, 187-193.
- Shima K. (2003). Hydrostatic brain edema: basic mechanisms and clinical aspect. *Acta Neurochir Suppl* 86, 17-20.
- Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Maegawa H, Kojima H, Masada M, Toda N, Kikkawa R & Kashiwagi A. (2000). Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res* 87, 566-573.
- Silva CM, Powell-Oliver FE, Jewell CM, Sar M, Allgood VE & Cidlowski JA. (1994). Regulation of the human glucocorticoid receptor by long-term and chronic treatment with glucocorticoid. *Steroids* 59, 436-442.

- 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, 37-45.
- Singer KL, Stevenson BR, Woo PL & Firestone GL. (1994). Relationship of serine/threonine phosphorylation/dephosphorylation signaling to glucocorticoid regulation of tight junction permeability and ZO-1 distribution in nontransformed mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 269, 16108-16115.
- Skowyra D, Koepp DM, Kamura T, Conrad MN, Conaway RC, Conaway JW, Elledge SJ & Harper JW. (1999). Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science* 284, 662-665.
- Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y & Tsukita S. (1999). Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 147, 195-204.
- Takeichi M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102, 639-655.
- Theoharides TC, Rozniecki JJ, Sahagian G, Jacobson S, Kempuraj D, Conti P & Kalogeromitros D. (2008). Impact of stress and mast cells on brain metastases. *J Neuroimmunol* 205, 1-7.
- Thony B, Auerbach G & Blau N. (2000). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 347 Pt 1, 1-16.
- Torok M, Huwyler J, Gutmann H, Fricker G & Drewe J. (2003). Modulation of transendothelial permeability and expression of ATP-binding cassette transporters in cultured brain capillary endothelial cells by astrocytic factors and cell-culture conditions. *Exp Brain Res* 153, 356-365.
- Towbin H & Gordon J. (1984). Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J Immunol Methods* 72, 313-340.
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Troy PJ, Clark RP, Kakarala SG, Burns J, Silverman IE & Shore E. (2005). Cerebral edema during treatment of diabetic ketoacidosis in an adult with new onset diabetes. *Neurocrit Care* 2, 55-58.
- Tsukita S, Furuse M & Itoh M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 285-293.
- van Brussel MS, Bultink IE & Lems WF. (2009). Prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 10, 997-1005.

- Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R & Malik AB. (2008). Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* 1123, 134-145.
- Vestweber D, Winderlich M, Cagna G & Nottebaum AF. (2009). Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol* 19, 8-15.
- Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G & Dejana E. (1996). Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 88, 3424-3431.
- Wachtel M, Bolliger MF, Ishihara H, Frei K, Bluethmann H & Gloor SM. (2001). Down-regulation of occludin expression in astrocytes by tumour necrosis factor (TNF) is mediated via TNF type-1 receptor and nuclear factor-kappaB activation. *J Neurochem* 78, 155-162.
- Wallace AD & Cidlowski JA. (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 276, 42714-42721.
- Wallerath T, Godecke A, Molojavyi A, Li H, Schrader J & Forstermann U. (2004). Dexamethasone lacks effect on blood pressure in mice with a disrupted endothelial NO synthase gene. *Nitric Oxide* 10, 36-41.
- Wallerath T, Witte K, Schafer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B & Forstermann U. (1999). Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13357-13362.
- Wang X & DeFranco DB. (2005). Alternative effects of the ubiquitin-proteasome pathway on glucocorticoid receptor down-regulation and transactivation are mediated by CHIP, an E3 ligase. *Mol Endocrinol* 19, 1474-1482.
- Waschke J, Baumgartner W, Adamson RH, Zeng M, Aktories K, Barth H, Wilde C, Curry FE & Drenckhahn D. (2004a). Requirement of Rac activity for maintenance of capillary endothelial barrier properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H394-401.
- Waschke J, Curry FE, Adamson RH & Drenckhahn D. (2005). Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H1296-1305.
- Waschke J, Drenckhahn D, Adamson RH & Curry FE. (2004b). Role of adhesion and contraction in Rac 1-regulated endothelial barrier function in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H704-711.
- Webster JC & Cidlowski JA. (1994). Downregulation of the glucocorticoid receptor. A mechanism for physiological adaptation to hormones. *Ann N Y Acad Sci* 746, 216-220.

- Webster JC, Jewell CM, Bodwell JE, Munck A, Sar M & Cidlowski JA. (1997). Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem* 272, 9287-9293.
- Weidenfeller C, Schrot S, Zozulya A & Galla HJ. (2005). Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res* 1053, 162-174.
- Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA & Couraud PO. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J* 19, 1872-1874.
- Werner-Felmayer G, Golderer G & Werner ER. (2002). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects. *Curr Drug Metab* 3, 159-173.
- Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F & Rabelink TJ. (1997). Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 340-344.
- Wiederkehr T, Bukau B & Buchberger A. (2002). Protein turnover: a CHIP programmed for proteolysis. *Curr Biol* 12, R26-28.
- Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, Cook J, Pacelli R, Liebmann J, Krishna M, Ford PC & Mitchell JB. (1996). Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul* 34, 159-187.
- Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C & Risau W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107 ( Pt 5), 1347-1357.
- Yap AS, Crampton MS & Hardin J. (2007). Making and breaking contacts: the cellular biology of cadherin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 19, 508-514.
- Zerr-Fouineau M, Chataigneau M, Blot C & Schini-Kerth VB. (2007). Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors. *FASEB J* 21, 265-273.
- Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL & Hafler DA. (1994). Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179, 973-984.
- Zhang Y & Pardridge WM. (2001). Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 114, 168-172.

- Zheng JS, Yang XQ, Lookingland KJ, Fink GD, Hesslinger C, Kapatos G, Kovesdi I & Chen AF. (2003). Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension. *Circulation* 108, 1238-1245.**
- Zicha J, Dobesova Z & Kunes J. (2001). Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J Hypertens* 19, 247-254.**
- Zlatanova J, Paneva E & Yaneva J. (1994). A spot test for protein detection and semiquantitative estimation in small samples. *Cytobios* 78, 135-138.**
- Zlokovic BV. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178-201.**

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	<i>Adenocorticotrope Hormone</i>
AJ	<i>Adherence Junction</i>
APS	Ammomiumpersulfat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
AS	Aminosäure
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
Calp. Inh.I	Calpain Inhibitor I
CRH	<i>Corticotrophin Releasing Factor</i>
CT	<i>Treshold Cycle</i>
Cy	Cyanin
dd	demineralisiert/destiliert
dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1, 4-Dithio-DL-threitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid-Na <sub>2</sub> -salt
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
FCS	<i>Fetal Calv Serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glukokortikoid
Gd-DTPA	<i>Gadolinum-diethylene-triamine pentaacetic acid</i>
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRE	<i>Glucocorticoid Response Elements</i>
GTP	Guanidintri-phosphat
GTPCH-1	GTP-Cyclohydrolase-1
HC	Hydrokortison
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSP	Hitzeschock-Protein
ICC	<i>Immunocytochemistry</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani Broth
LIF	Leukämie inhibierender Faktor

Luc	Luciferase
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MS	Multiple Sklerose
NEAA	<i>Not Essential Aminoacids</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
NO	<i>Nitrite Oxide</i>
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium-Iodid
PP	Probenpuffer
pRL-TK <sup>®</sup>	Normalisierungsvektor, Promega, Mannheim
RLU	<i>Relative Light Units</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	<i>Sodium-Dodecylsulfate</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of MMP</i>
TJ	<i>Tight Junction</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Tween <sup>®</sup> 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Umdrehungen
u. a.	unter anderen
UV	Ultraviolett
x	mal
z.B.	zum Beispiel
VE	<i>Vascular Endothelial</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
v/v	Volumen-/ Volumenverhältnis
wt	Wildtyp
w/v	Gewichts-/ Volumenverhältnis
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Für Abkürzungen von physikalischen und chemischen Einheiten werden die IUPAC Empfehlungen verwendet.

## 7.2 Chemikalienuflistung

Alle Chemikalien und Substanzen wurden nach höchstmöglichem Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen:

Aceton, AppliChem, Darmstadt  
Aktivkohle reinst., Merck, Darmstadt  
Amidoschwarz, AppliChem, Darmstadt  
Ameisensäure, AppliChem, Darmstadt  
Ampizillin, PAA-Laboratories, Berlin  
APS, Merck, Darmstadt  
Bacto™ Yeast Extract, BD Biosciences, Heidelberg  
β-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt  
Bradford Reagenz, Roth, Karlsruhe  
Bromphenolblau, AppliChem, Darmstadt  
CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, AppliChem, Darmstadt  
DAF-2DA, Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
DMEM-Medium, Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
DMSO, Merck, Darmstadt  
DTE, Merck, Darmstadt  
EDTA, Merck, Darmstadt  
Eisessig, AppliChem, Darmstadt  
Ethanol, AppliChem, Darmstadt  
FCS, Biochrom, PAA-Laboratories, Berlin  
Gelatine, Merck, Darmstadt  
Glycerol, AppliChem, Darmstadt  
HEPES, AppliChem, Darmstadt  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, p.a., AppliChem, Darmstadt  
KCl, AppliChem, Darmstadt  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, AppliChem, Darmstadt  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, AppliChem, Darmstadt  
Kollagen IV, Fluka, Taufenkirchen  
Luminol, AppliChem, Darmstadt  
Magermilch,  
Mannitol, Serva-Electrophoresis, Heidelberg  
MEM-Medium, Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Methanol, AppliChem, Darmstadt  
NaCl, AppliChem, Darmstadt  
Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, AppliChem, Darmstadt  
p-Coumarin-Säure90, AppliChem, Darmstadt  
PBS, Biochrom, Berlin  
Penicillin-Streptomycin, PAA-Laboratories, Berlin  
Poly-L-Lysin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Ponceau S, AppliChem, Darmstadt  
SDS, AppliChem, Darmstadt  
TEMED, Roth, Karlsruhe  
TRIS, Roth, Karlsruhe  
Tween® 20, AppliChem, Darmstadt  
Xylencyanol, Merck, Darmstadt

### 7.3 Auflistung von Geräten

Blotgerät	Laborgeräte Keutz
Brutschrank	Heraeus Instruments
Camera, HRP-100 Mikroskop AP	Princeton Instruments
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Drehrad	Darke-Willock Equipment
Electrophoresis Power Supply	Gibco BRL, Keutz
Elektrophoresekammer Protean II xi	BioRad
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop, Axioskop2 mot plus	Zeiss
Lumat LB 9507	Berthold
PHERO-stab. 500 Elektrophoresis Power Supply	Biotech-Fischer
Magnetrührer, Model L-71	Labinco
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Megafuge1.0	Heraeus Sepatech
Mikrozentrifuge, Hermile z 160 m	Hartenstein Laborbedarf
pH Meter pH 523	WTW
Real Time PCR System 7300	Applied Biosystems
Schüttler, KL2	Labortechnik Edmund Bühler
Spectralphotometer	Pharmacia Biosystems
Sterilbank, Lamin Ain HB 2448	Heraeus Instruments
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems
Thermocycler 60	BioRad Laboratiries
Transblot Elektrophorese Transfer Cell SD Semi Dry	BioRad
UV/VIS Spectralphotometer	Pharmacia Biosystems
Vortexer L46	Hartenstein Laborbedarf

## 7.4 Auflistung von Verbrauchsmaterialien und Kits

Blotting-Papier	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Deckgläser	Knittel Gläser
dNTPs	GIBCO BRL, Keutz
<i>Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System</i>	Promega, Mannheim
Effectene <sup>®</sup> Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Einmal-Küvetten	Brand
Fotolaborchemikalien	Kodak, Paris
Frischhaltefolie	Dow, Midland
Gel Blotting-Filterpapier	Whatman, Middlesex
Glaskapillaren	World Precision Instruments, Florida
GenePorter <sup>™</sup>	GLS
Glasflammer	Gasi, Schütt, Göttingen
Glaswaren	Schott, Wertheim
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Hyperfilm <sup>™</sup> ECL	Amersham Biosciences
Lipofectamine <sup>®</sup> 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Nitrocellulose	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Objektträger	Marienfeld
Objektträger, SuperFrost <sup>®</sup> Plus	Menzel-Gläser
Parafilm „M“ <sup>®</sup>	Pechiney Plastic Packaging, Menasha
Prestained Protein Marker (PPL)	Fermentas Life Science, St. Leon- Roth
Puderfreie Latex-Handschuhe	Kimberly-Clark, Mainz
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden
Röhren	Sarstedt, Nümbrecht
SSL-Marker 100 bp Ladder, Generuler	Fermentas Life Science, St. Leon- Roth
<i>Titan One Tube RT-PCR System</i>	Roche, Mannheim
TransFectin <sup>™</sup> Lipid Reagent	BioRad Laboratiries, München
<i>Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System</i>	Promega, Mannheim

## 7.5 Publikationsliste:

**Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal re-arrangements in murine brain endothelial cEND cells.**

*Blecharz, K.G., Drenckhahn, D. and Förster, C.Y. (2008)*  
*J Cereb Blood Flow Metab*, 28 (6): 1139-1149. IF: 5.741

**Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis.**

*Blecharz, K.G., Haighika, A., Stasiolek, M., Kruse, N., Drenckhahn, D., Gold, R., Roewer, N., Chan, A. and Förster C.Y.*  
*Mult Scler* 2010 Mar; 16 (3): 293-302. IF: 3.279

**Combination therapy with proteasomal inhibitors and glucocorticoids ameliorates ischemia-induced brain edema and blood-brain barrier disruption in mice.**

*Kleinschnitz, C., Blecharz, K.G., Kahles, T., Thum, T., Schwarz, T., Stoll, G., Roewer, N. and Förster C.Y.*  
*Stroke* 42(4): 1081-1089. IF: 7,041

**Proteasome inhibition as a therapeutical target for prevention of glucocorticoid-induced hypertension.**

*Blecharz, K.G., Bauersachs, J., Thum, T., Widder, J., Drenckhahn, D. and Förster, C.Y.*  
(in Vorbereitung)

**Posterpräsentationen:****VE-cadherin expression is regulated by glucocorticoids in blood brain-barrier endothelial cells.**

*Blecharz, K.G., Drenckhahn, D. and Förster, C.*

Posterpräsentation: 8. Expertentreffen Blut-Hirn-Schranke in Bad Herrenalb, 2006  
III. Cardiovascular Healing Symposium, Symposium der Medizinischen  
Klinik Würzburg zusammen mit der Leopoldina, 2006  
23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 2006  
12th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) 2008

**Establishment of novel brain endothelial cell lines from transgenic and knock-out mice to monitor glucocorticoid effects on the blood-brain barrier.**

*Blecharz K.G., Drenckhahn D. and Förster C.*

Posterpräsentation: 9. Expertentreffen Blut-Hirn-Schranke in Bad Herrenalb, 2007

**Down-regulation of glucocorticoid receptor in dexamethasone-treated myocardial endothelial cell line MyEND causes a decreased NO production.**

*Blecharz, K.G., Bauersachs, J., Thum, T., Drenckhahn, D. and Förster, C.*

Posterpräsentation: 24. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, 2007  
Joint scientific meeting of the SFB's 688 and 612, Düsseldorf, 2007

**Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral endothelial cell line cEND.**

*Blecharz, K.G., Burek, M. and Förster C.*

Posterpräsentation: Joint Meeting between SEISC and German and Swiss Blood-Brain  
Interface Networks in Strasbourg, Frankreich, 2009

**Glucocorticoid-mediated regulation of tight junctions under pathophysiological conditions in the murine cerebral endothelial cell line cEND.**

*Blecharz, K.G., Burek, M., Chan, A., Haghikia, A., Kruse, N., Drenckhahn, D., Gold, R.,  
Roewer, N. and Förster, C.Y.*

Posterpräsentation: International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain  
Barrier in London, Großbritannien, 2009

## 7.6 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Carola Förster für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit, die vielfältigen Gespräche und Anregungen, Unterstützung, Hilfe, Ideen und Vorschläge, sowie die ehrlich entgegengebrachte Kritik.

Prof. Dr. Georg Krohne danke ich für die Betreuung der Dissertation als Vertreter der Fakultät der Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Detlev Drenckhahn und Prof. Dr. Norbert Roewer, die mir die Möglichkeit gegeben hatten, die Arbeit am Institut der Anatomie und Zellbiologie II und in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie durchzuführen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Małgorzata Burek, die mir im Arbeitsalltag eine ehrliche und kritische Freundin und Arbeitskollegin war, auch wenn es einmal nicht um die Blut-Hirn-Schranke ging.

Frau Katharina Mattenheimer und Frau Bianca Schneiker gilt ebenfalls großer Dank. Sie standen mir jederzeit mit Hilfe und Ratschlägen bei und haben sich stets darum bemüht, dass die Laborarbeit den rechten Gang beibehält. Zum anderen sind sie mir in dieser Zeit zu guten Freundinnen geworden.

Des Weiteren allen Kollegen und Kolleginnen und allen Mitarbeitern aus dem Institut der Anatomie und der Experimentellen Anästhesiologie ein großer Dank: Frau Katherina Pech und Frau Judith Skirde für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung; Dr. Christoph Blomeyer und Dr. Jan Stumpner für hilfreiche Gespräche und Rat.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. Thomas Thum (derzeit Leiter der Abteilung Molekulare und Translationale Therapiestrategien der Medizinischen Hochschule Hannover), Dr. Julian Widder, sowie Prof. Dr. Johann Bauersachs aus der Abteilung der Kardiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik in Würzburg, den Kooperationspartnern aus dem SFB688, die die eNOS-Aktivitätsmessungen und BH<sub>4</sub>-Messungen mittels HPLC durchgeführt haben.

Ebenso danke ich Frau Sabine Mantel für ihre große Geduld, Hilfsbereitschaft und Verständnis bei der Korrektur der Dissertation.

Letztlich danke ich natürlich dem SFB 688 für die Finanzierung dieser Doktorarbeit.

Ich danke von ganzem Herzen Sebastian Lang, der mir in den Jahren mit viel Liebe und Geduld beigestanden hat.

Ein abschließendes, großes Dankeschön gilt natürlich meinen Eltern, die mich über all die Jahre meines Biologie-Studiums und der Promotion immer unterstützt haben und mir bei Problemen stets mit Ruhe und Kraft hilfreich zur Seite standen.

## 7.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass die im Fachbereich der Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg eingereichte Arbeit mit dem Titel „Molekulare Zielgene der Glukokortikoidbehandlung unter verschiedenen pathophysiologischen bedingungen in einem *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke“ im Institut der Anästhesie und Intensivmedizin unter Leitung von Prof. Dr. C. Förster ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in und ausländischen biologischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit oder eine andere als Dissertation vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurde veröffentlicht, wie in angehängter Publikationsliste angegeben.

Würzburg, den 18.Dezember 2009

Kinga Blecharz