

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg

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

Neuroprotektive Effekte von Isosteviol-Natrium in einem *in vitro* Modell des
Schlaganfalls

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nils Rösing

aus Weimar

Würzburg, 2023

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

Koreferent: Prof. Dr. med. Christian Wunder

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2023

Der Promovend ist Arzt.

Diese Arbeit ist meiner Familie und Pauline gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Schlaganfall.....</i>	1
1.2	<i>Schädel-Hirn-Trauma</i>	2
1.3	<i>Primäre und sekundäre Hirnschädigung</i>	2
1.4	<i>Blut-Hirn-Schranke</i>	3
1.4.1	Tight Junctions.....	4
1.4.2	Integrine	5
1.4.3	Hirnödem und Hirndruck.....	6
1.5	<i>Stevia und Isosteviol-Natrium</i>	7
1.6	<i>Glukosetransporter</i>	7
1.7	<i>Ziel dieser Arbeit.....</i>	8
2	Material und Methoden.....	10
2.1	<i>Material.....</i>	10
2.1.1	Substanzen	10
2.1.2	Geräte.....	11
2.1.3	Material	12
2.1.4	Western Blot Antikörper	13
2.1.5	qRT-PCR Antikörper.....	14
2.1.6	Verwendete Kits	14
2.1.7	Verwendete Zellkulturmedien.....	14
2.2	<i>Methoden.....</i>	15
2.2.1	Herstellung von Isosteviol-Natrium.....	15

2.2.2	Zellkulturmethoden.....	16
2.2.3	Sauerstoff-Glukose-Entzug und Behandlung mit STVNA.....	17
2.2.4	Proteinernte	18
2.2.5	Proteinmengenbestimmung.....	18
2.2.6	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	19
2.2.7	Western Blot.....	21
2.2.8	RNA-Isolation.....	23
2.2.9	cDNA Herstellung	24
2.2.10	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion	25
2.2.11	Optische Volumenbestimmung	25
2.2.12	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	<i>Ergebnisse Western Blot</i>	<i>28</i>
3.1.1	Expressionsverhalten <i>in vitro</i> von Claudin-5 im Western Blot nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h.....	28
3.1.2	Expressionsverhalten <i>in vitro</i> von Occludin nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h im Western Blot	29
3.1.3	Expressionsverhalten <i>in vitro</i> von GLUT1 nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h im Western Blot.....	30
3.2	<i>Ergebnisse quantitative real-time RT-Polymerase-Kettenreaktion</i>	<i>32</i>
3.2.1	Expressionsverhalten <i>in vitro</i> von Claudin-5 in der qRT-PCR nach 4h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h.....	32
3.2.2	Expressionsverhalten <i>in vitro</i> von Integrin α 1 und Integrin α v in der qRT-PCR nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h.....	33

3.2.3	Expressionsverhalten <i>in vitro</i> von GLUT1 nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h in der qRT-PCR.....	35
3.2.4	Optische Volumenmessung von cerebEND nach 4 h OGD und gleichzeitiger Behandlung mit 10 mg/l und 20 mg/l STVNA	36
4	Diskussion.....	38
4.1	<i>Wirkung von STVNA auf die Expression von Claudin-5 und Occludin.....</i>	<i>39</i>
4.2	<i>Wirkung von STVNA auf die Expression von Integrin α1 und Integrin αv.....</i>	<i>40</i>
4.3	<i>Wirkung von STVNA auf den Glukosetransport.....</i>	<i>41</i>
4.4	<i>Wirkung von STVNA auf das Zellvolumen</i>	<i>42</i>
5	Zusammenfassung	44
6	Literaturverzeichnis:	45
7	Abkürzungsverzeichnis.....	53
8	Abbildungsverzeichnis	55
9	Tabellenverzeichnis.....	56
10	Danksagung	58
11	Lebenslauf	59
12	Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen	61

1 Einleitung

1.1 Schlaganfall

Laut der Deutschen Schlaganfall Gesellschaft erleiden in Deutschland jedes Jahr mehr als 260.000 Menschen einen Schlaganfall (DSG 2019). Schlaganfälle sind eine sehr häufige Todesursache und eine der wichtigsten Ursachen für schwere Behinderung im Erwachsenenalter (Busch MA 2017). Häufige klinische Symptome eines Schlaganfalls sind das plötzliche Auftreten von neurologischen Defiziten wie Sprachstörungen, oder Schwäche einer Körperhälfte (Yew and Cheng 2015). Bei akuten Schlaganfällen kommt es zu einer Durchblutungsstörung von Teilen des Gehirns, aus der ein Mangel an Sauerstoff und Glukose resultiert, welcher zum sofortigen Untergang von Hirngewebe führt. Es kann eine ischämische und/oder hämorrhagische Ursache zugrunde liegen, wobei eine ischämische in 85 Prozent (%) der Fälle überwiegt (Musuka, Wilton et al. 2015). Ischämische Schlaganfälle sind durch einen Gefäßverschluss gekennzeichnet, bei dem der distal der Verschlussstelle liegende Infarktkern mit umliegender Penumbra nicht ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden kann. Die Penumbra ist ein direkt an den Infarktkern angrenzender gefährdeter Bereich, der noch überlebensfähige Zellen enthält und durch eine Reperfusion gerettet werden kann (Thirugnanachandran, Ma et al. 2018). Ursächlich für einen Gefäßverschluss sind in den meisten Fällen thrombembolische Ereignisse aufgrund von Vorhofflimmern, einer ausgeprägten Atherosklerose, oder anderen kardialen Erkrankungen (Campbell, De Silva et al. 2019). Dem hämorrhagischen Schlaganfall liegt eine Gefäßruptur mit anschließender Blutung und potenzieller Hirndrucksteigerung zugrunde. Hierbei handelt es sich in 15 % um nicht-traumatische intrazerebrale Blutungen, mit Blutung in den intrakraniellen Raum und in 5 % um eine subarachnoidale Blutung mit Blutung in den kranialen oder spinalen Liquorraum (Schubert and Lalouschek 2006). Entscheidend für das Outcome von Schlaganfallpatienten ist die Zeit zwischen Symptombeginn und Therapiebeginn in einer Fachklinik mit Stroke Unit. In der klinischen Akutversorgung von ischämischen Schlaganfällen werden die medikamentöse intravenöse Thrombolyse mit Recombinant Tissue

Plasminogen Activator (rtPA) bis 4,5 Stunden (h) und die mechanische Katheter gestützte Rekanalisation bis 6 h nach Symptombeginn angewendet (Campbell, De Silva et al. 2019).

1.2 Schädel-Hirn-Trauma

Die Inzidenz eines Schädelhirntraumas (SHT) beträgt in Deutschland jährlich circa 10,1/100.000 (Maegele, Lefering et al. 2019) und ist im frühen Erwachsenenalter eine häufige Todesursache (Steudel, Cortbus et al. 2005). Besonders bei polytraumatisierten Patienten ist ein begleitendes SHT mit einer erhöhten Mortalität und verringerten Lebensqualität verbunden, weswegen eine zeitnahe und zielgerichtete Versorgung notwendig ist (Antoni, Heinz et al. 2017). Die schwere eines erlittenen SHT's und die damit verbundene zerebrale Hypoxie und Hypovolämie sind für das Überleben und spätere Outcome entscheidend. Die Glasgow-Coma-Scale (GCS) ist ein häufig in der Notfallmedizin eingesetztes Scoringssystem zur initialen Beurteilung von Notfallpatienten, in der die beste verbale und motorische Reaktion, sowie das Augenöffnen beurteilt werden (Teasdale and Jennett (1974). Auf Grundlage der GCS kann ein leichtes von einem mittleren und einem schweren SHT unterschieden werden (Beier and Hoppe 2011). Die Neuronen spezifische Enolase ist ein Laborparameter der häufig bei Hirnschäden erhöht ist. Allerdings ist sie nicht zur Einschätzung eines SHT geeignet da sie erhebliche diagnostische Graubereiche aufweist und somit keine definitiven Aussagen zulässt (Hoppe K 2021).

1.3 Primäre und sekundäre Hirnschädigung

Primäre Hirnschäden sind das Ergebnis von unmittelbar auf das Gehirn einwirkenden Faktoren, wie ein ischämischer Schlaganfall oder eine akute mechanische Gewalteinwirkung auf den Kopf. Sekundäre Hirnschäden treten im Nachgang einer primären Hirnschädigung auf und haben ihre Ursache in einer Entzündungsreaktion, einem Hirnödem oder einer Blutung. Da die primäre Hirnschädigung nicht behandelbar ist, konzentriert sich die Therapie auf die Behandlung von sekundären Hirnschäden (Hackenberg and Unterberg 2016, Larsen and Ziegenfuß 2019).

1.4 Blut-Hirn-Schranke

Die ersten Hinweise auf das Vorhandensein einer Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurden 1885 von Paul Ehrlich beschrieben (Ehrlich 1885). Nachdem er Versuchstieren Farbstoffe injiziert hatte, bemerkte er, dass sich das gesamte Körpergewebe bis auf das Gehirn und das Rückenmark anfärbte. Die BHS bildet durch ihren dreischichtigen Aufbau aus Kapillarendothelzellen, Basalmembran und Astrozyten eine selektiv durchlässige Barriere, die sowohl den Schutz als auch die Energieversorgung des Gehirns gewährleistet (Abbott, Patabendige et al. 2010, Burek, Salvador et al. 2012). Sie hat fünf Basismechanismen für die Endothelpassage von solublen Molekülen. Die Diffusion einiger lipophiler Substanzen und Gase entlang eines Konzentrationsgradienten, die parazelluläre Diffusion, den aktiven Transport über Proteintransporter, erleichterte Diffusion durch Transporter basierte Transzytose (Zelldurchwanderung) und die Diffusion durch membranständige Kanäle. Eine wesentliche Bedeutung zur Aufrechterhaltung dieser Barrierefunktionen kommt dabei den Tight Junction Proteinen zu (Greene, Hanley et al. 2019).

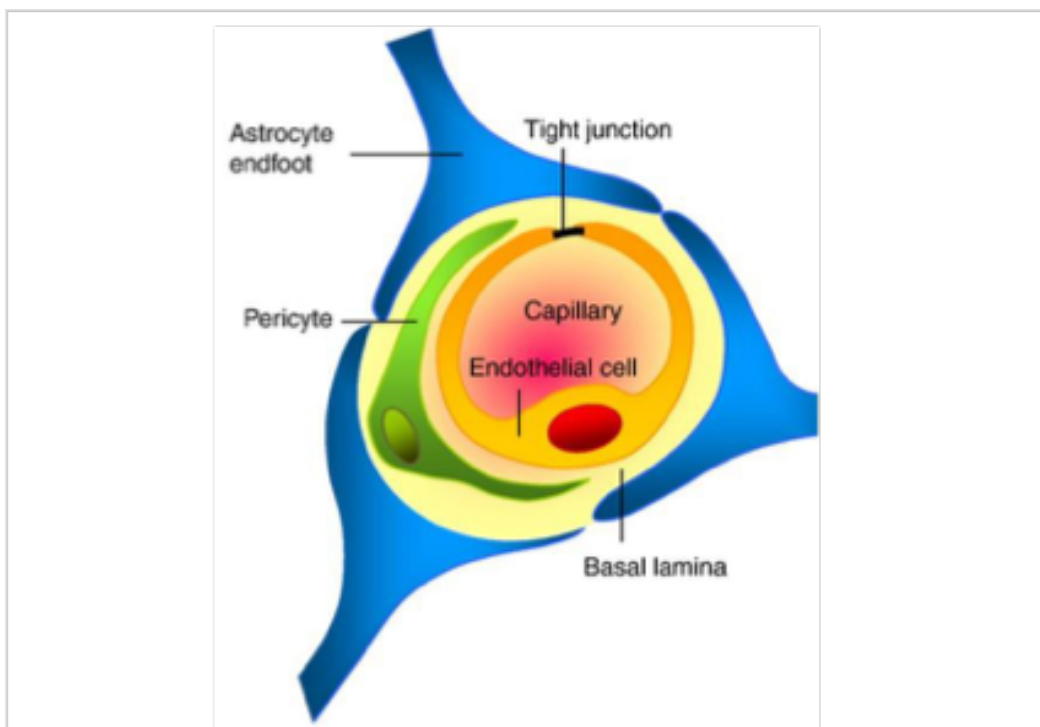


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke (Abbott, Patabendige et al. 2010). Abbildungslizenz liegt vor.

1.4.1 Tight Junctions

Tight Junctions bilden apikal eine dichte Barriere zwischen den einzelnen Endothelzellen und unterbinden den interzellulären Transport (Anderson and Van Itallie 2009). Aufgrund dieser Eigenschaft ermöglichen Sie einen streng limitierten Austausch von Stoffen zwischen dem Körperkreislauf und dem zentralen Nervensystem (ZNS). Sie sind aus vier verschiedenen Proteinfamilien aufgebaut. Den Occludinen, den Tricellulinen, den Claudinen und den Junctional Adhesion Molecules (JAM's). Diese sind über die intrazellulären Proteine ZO 1, ZO 2, ZO 3 mit dem Zytoskelett der Zellen verbunden (Fromm 2011). Occludine und Claudine gehören zu den zwei verschiedenen Klassen von integralen Membranproteinen und spielen eine bedeutende Rolle für die Barrierefunktion der BHS (Förster 2008). Gemeinsam mit Occludin konnten Claudin 1, -3, -5 und Claudin 12 im Gehirn nachgewiesen werden (Abbott, Patabendige et al. 2010), wobei Claudin 5 besonders wichtig für die Integrität der BHS zu sein scheint (Greene, Kealy et al. 2018). In der Literatur gibt es Hinweise, dass Occludin als früher Biomarker nach einer akuten Schädigung der BHS eine wichtige Rolle spielt (Pan, Yu et al. 2017) und als Target zum Nachweis einer Stabilisierung der BHS dienen könnte (Forster, Silwedel et al. 2005). In der Ätiologie von Hirntumoren, zerebraler Ischämie, Meningitis, Enzephalitis oder Multipler Sklerose scheint der Zusammenbruch der BHS und der darauffolgende neuroinflammatorische Zustand von elementarer Bedeutung zu sein (Forster, Silwedel et al. 2005, Forster, Burek et al. 2008).

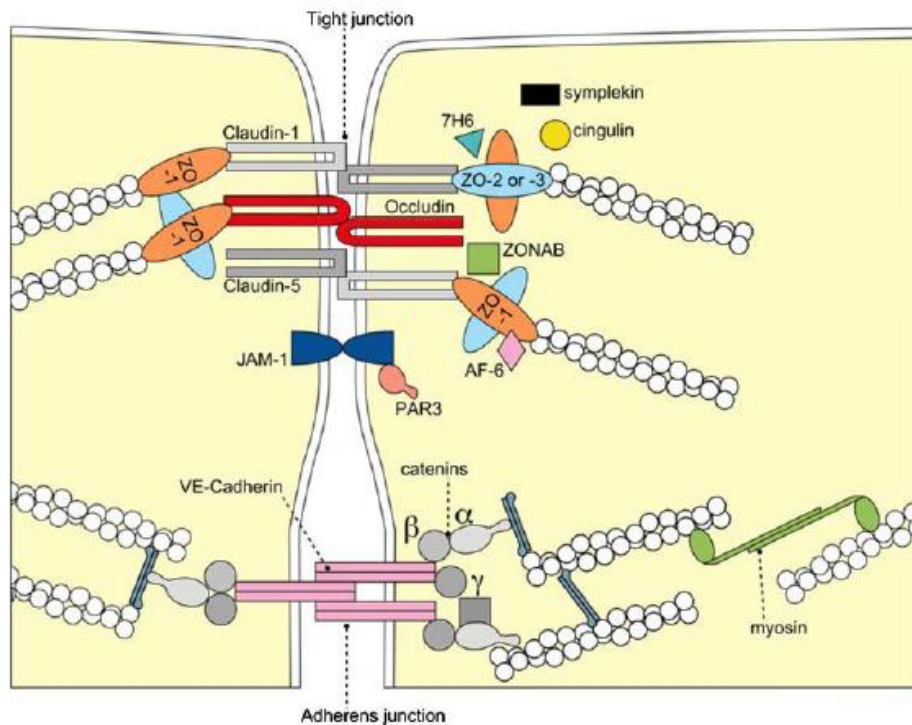


Abbildung 2: Schematische Grafik zum Aufbau der Tight Junctions der BHS
 Die Tight Junctions werden aus Occludin und Claudin gebildet und sind über Zonula occludens Protein 1 (ZO-1) und Zonula occludens Protein3 (ZO-3) mit dem Zytoskelett verbunden (Förster 2008). Abbildung von (Förster 2008). Open Access unter den Bedingungen der Creative Common Attribution Noncommercial License.

1.4.2 Integrine

Integrine sind extrazelluläre Matrixrezeptoren, die als Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Bei Säugetieren sind 24 unterschiedliche Kombinationen für Integrin $\alpha\beta$ -Heterodimere bekannt (Hynes 2002, Park and Goda 2016). Integrine stellen eine wichtige Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix her. Extrazelluläre Signale können über Integrine nach intrazellulär übertragen werden und durch eine zelluläre Aktivierung eine erhöhte Rezeptorspezifität generieren (Sastry and Horwitz 1996, Giancotti and Ruoslahti 1999, del Zoppo and Milner 2006). Im Rahmen von Entzündungsreaktionen kann ebenfalls ein verändertes Expressionsmuster von Integrinen beobachtet werden. In Versuchen zur Wirkung von Dexamethason auf die Induktion der Expression des Metalloproteinase-Inhibitors TIMP-1 mit der murinen endovaskulären Endothelzelllinie aus der Großhirnrinde von Mäusen

(cEND) konnte gezeigt werden, dass das Expressionsverhalten von Integrin $\alpha 1$ umgekehrt proportional zu einem erhöhten Integrin αv Expressionslevel nach Gabe von TNF α abläuft (Förster, Kahles et al. 2007). In der Literatur gibt es Hinweise, dass Integrine als Matrixadhäsionsrezeptoren eine entscheidende Rolle in der Integrität der BHS als Permeabilitätsbarriere spielen und dass eine verminderte Expression von Integrienen Modulation dieser Rezeptoren in Zusammenhang mit dem Zusammenbruch der BHS einhergeht (del Zoppo and Milner 2006). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die in einer Computertomographie nachgewiesene Menge an Integrin $\alpha v \beta 3$ mit der Schwere von Hirnverletzungen bei Schlaganfällen korreliert (Sun, Zeng et al. 2014).

1.4.3 Hirnödem und Hirndruck

Ein Hirnödem entsteht durch eine vermehrte Flüssigkeitsansammlung im Gehirn aufgrund einer vorausgegangenen Schädigung der BHS, oder der Blut-Liquor-Schranke. Es tritt häufig im Rahmen einer sekundären Hirnschädigung nach einem zerebral ischämischen Ereignis auf und kann in ein vasogenes und ein zytotoxisches Hirnödem unterteilt werden (Klatzo 1967). Das zytotoxische Hirnödem ist durch die intrazelluläre Ansammlung von osmotisch aktiven Substanzen wie H_2O , Cl^- und Na^+ durch das Versagen der Zellvolumenkontrolle gekennzeichnet. Ursächlich ist ein, aus einer Ischämie der Endothelzellen der BHS, resultierender Mangel an Adenosintriphosphat (ATP) mit unzureichender Funktion der Na^+/K^+ -ATPase, die im physiologischen Zustand für die Aufrechterhaltung eines osmotischen Gradienten zur Zellvolumenregulation notwendig ist (Simard, Kent et al. 2007, Jentsch 2016). Das vasogene Hirnödem entsteht auf Grundlage einer gestörten Kapillarpermeabilität mit Zusammenbruch der Barrierefunktion der BHS, sodass osmotisch aktive Plasmaproteine und Makromoleküle wie Albumin, Immunglobulin G und Dextran in den Extrazellularraum einströmen können. Es kommt zu einer Hirnschwellung mit Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) (Simard, Kent et al. 2007), mit der Gefahr einer zerebralen Ischämie und damit einhergehender Hypoxie. Deshalb sind die Kontrolle des intrakraniellen Drucks und des zerebralen Perfusionsdruck zentrale Bestandteile in der Therapie des erhöhten ICP (Larsen and Ziegenfuß

2019). Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie empfiehlt zur Behandlung des raumfordernden ischämischen Schlaganfalls die Aufrechterhaltung der Homöostase und eine frühzeitige Entscheidung zur Entlastungstrepanation als Therapiemaßnahmen. Verfahren, wie die Osmotherapie mit Mannitol oder Hypothermie können nicht generell, empfohlen werden. Diuretika, Glukokortikoide, Barbiturate, Hyperventilation und TRIS-Puffer werden zur Hirndrucksenkung zur Zeit auch nicht empfohlen (Huttner H. et al.). Aufgrund der wenigen allgemeinen Therapieansätze zur Behandlung von zerebral ischämischen Ereignissen mit Hirnödemen und gesteigertem Hirndruck ist es notwendig, weitere Therapiemaßnahmen zu etablieren.

1.5 Stevia und Isosteviol-Natrium

Stevia ist ein natürlich vorkommender pflanzlicher Süßstoff aus den Blättern der Pflanze *Stevia rebaudiana* Bertoni und wurde schon lange als Süßungsmittel in Südamerika, besonders in Brasilien und Paraguay, genutzt (Ferrazzano, Cantile et al. 2015). Die Blätter der Pflanze bestehen aus Steviolglykosiden, die sich aus Steviosiden, Rebaudiosiden (A-F), Steviolbiosiden und Isosteviol zusammensetzen, welche für den mittlerweile weltweit genutzten süßen Geschmack der Pflanzenblätter verantwortlich sind (Momtazi-Borojeni, Esmaeili et al. 2017). Isosteviol zeigt bisher in der Anwendung keine Nebenwirkungen, ist nicht kardiotoxisch und möglicherweise auch in der koronaren Reperfusionstherapie einsetzbar (Yin, Chen et al. 2017). Seine lösliche Form ist STVNA, das sich aufgrund seiner hohen Löslichkeit und Bioverfügbarkeit als mögliches Notfallmedikament eignen könnte. Die neuro- und kardioprotektive Funktion von STVNA konnte bereits in einigen experimentellen Versuchen nachgewiesen werden (Hu, Sun et al. 2016, Zan, Zhang et al. 2018, Chen, Beng et al. 2019, Zhang, Lu et al. 2019, Zhong, Lu et al. 2019).

1.6 Glukosetransporter

Glukose ist für die Zellen des Gehirns und der BHS ein wichtiger Energielieferant. Der über das SLC2A1 Gen codierte Glukosetransporter GLUT1 ist maßgeblich am Glukosetransport über die BHS beteiligt (Maher, Vannucci et al. 1994). Eine

schadensabhängige Expression von SGLT1 und GLUT1 konnte im Mausmodell bereits nachgewiesen werden (Wais 2012). GLUT1 ist ein insulinunabhängiger klassischer Uniporter, der über den Konzentrationsgradienten von Glukose angetrieben wird. Pro Molekül Glukose werden ca. 40 Moleküle Wasser transportiert (MacAulay and Zeuthen 2010), die bei einer erhöhten Expression von GLUT1 zu einer vermehrten Wasseransammlung in den Zellen der BHS führen kann. Neben GLUT1 kann auch der Natrium Glukose Kotransporter SGLT1 im Gehirn nachgewiesen werden (Koepsell 2017). Über einen von der Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhaltenen Konzentrationsgradienten wird Glukose sekundär aktiv zusammen mit Natrium von extrazellulär nach intrazellulär transportiert. Da dieser Transport von der Leistung der Natrium-Kalium-ATPase abhängig ist wird er als sekundär aktiv bezeichnet (Wright, Loo et al. 2011). In experimentellen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte Expression von SGLT1 mit einem vermindertem Infarkt volumen, einem reduzierten Hirnödem und verbesserten motorischen Fähigkeiten nach einem SHT assoziiert ist (Sebastiani, Greve et al. 2018).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Eine häufige Ursache für zerebrale ischämische Episoden sind Schlaganfälle, Schädel-Hirn-Traumata und Herz-Kreislauf-Stillstände, deren Behandlung sich in ständiger Weiterentwicklung befindet und bis heute nicht abschließend erforscht wurde. Sobald eine primäre irreversible Hirnschädigung eingetreten ist, folgt im Nachgang eine sekundäre Schädigung, die sowohl inflammatorischer als auch ödematöser Genese sein kann. Aktuell gibt es Hinweise, dass Isosteviol-Natrium (STVNA) einen neuroprotektiven Effekt nach fokalen zerebralen ischämischen Episoden im Tiermodell hat (Hu, Sun et al. 2016). Das Ziel dieser Arbeit war einen neuroprotektiven Effekt von STVNA in einem *in vitro* Modell des Schlaganfalls in einer mikrovaskulären endothelialen Zelllinie aus der Kleinhirnrinde von Mäusen (cerebEND) nachzuweisen. Da es während eines Schlaganfalls durch die unterbrochene Blutzufuhr zu einem ausgeprägten Mangel an Sauerstoff und

Glukose kommt, hat sich das Verfahren der Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) als in vitro Modell des Schlaganfalls bewährt (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit könnten sich neue Ansätze für die präklinische und klinische Therapie zur Reduktion von sekundären Hirnschäden nach zerebral ischämischen Ereignissen entwickeln. Diese Arbeit entstand in Kooperation der experimentellen Anästhesie (AG Förster) des Universitätsklinikums Würzburg mit dem Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie und dem Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg.

2 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt sind tabellarisch die verwendeten Substanzen, Geräte, Materialien, Western Blot Antikörper, qRT-PCR Antikörper, Kits und Zellkulturmedien aufgelistet.

2.1 Material

2.1.1 Substanzen

Tabelle 1: Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
Aceton	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH A2941
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma Aldrich A7906
cOmplete™ Ultra Tablets Proteaseinhibitor	Roche 05892970001
Destilliertes Wasser	B. Braun Melsungen AG 00088992
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
DMEM-high glucose 4,5g/l	Sigma-Aldrich D5796
DMEM-No Glucose	Thermo Fisher Scientific 11966925
Ethanol	Th.Geyer
Fetales Kälberserum (FCS)	Merck S0115
GAPDH (TaqMan Sonde)	ThermoFisher scientific
Gelatine	Serva 22151
Glycerol	Invitrogen
Glycine	AppliChem 131340.1211
Isopropanol	Sigma Aldrich I9516
Isosteviol 680 mg, 2.1 mmol	Carboluten Chemicals GmbH
Luminol 97%	Sigma Aldrich A8511
Methanol	Honeywell Riedel-de-Hen
Milchpulver	AppliChem 2710453
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma T9281
NaCl	Sigma Aldrich 31434
NaOH	Sigma Aldrich
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumfluorid	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid, 1 mol/L	Merck
Nucleasefreies Wasser	Thermo Fisher Scientific AM9937

p-Cumarsäure	Sigma Aldrich C9008
PBS ohne Mg ²⁺ Ca ²⁺	Sigma-Aldrich
Penicillin / Streptomycin	Merck A2213
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich D8537
Poly-D-Lysine	Thermo Fisher Scientific
Proteinmarker "PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder", 10-250 kDa	Thermo scientific 414465
RNase away	Sigma Aldrich
RNase-freies Wasser	Invitrogen
RNase-Inhibitor	Applied biosystems
Rotiphorese® Gel 30 Acrylamid	Carl Roth GmbH+Co. KG 3029.2
Salzsäure, 1 mol/L	Roth
SDS	AppliChem
Sodium Deoxycholate	Sigma Aldrich D6750
β-Aktin	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich M6250
THF	Thermo Fisher Scientific
Tris Pufferan®	Carl Roth GmbH+ Co. KG 3029.2
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypsin	Biochrom
Tween-20	Sigma Aldrich 9005-64-5
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich 216763

2.1.2 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Avanti J-30I	BECKMAN
Bruker AV400 Instrument	Bruker Biopsin
CCD-Kamera	uEYE, IDS GmbH
Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Centrifuge 5418 R	Eppendorf
Elektrophoresekammer	Bio Rad Laboratories
FluorChem FC2 Imaging System	Alpha Innotech
Gefrierschrank -80°	Thalheimer Kühlung GmbH+Co
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Haraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific
Heizblock Dri-Block© heaters DB28	Techne

Heracell TM 150i Co2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Inkubator C60	Labotec GmbH
Kühlschrank profiline	Lieberherr
Lichtmikroskop	Leitz DMRM
Magnetrührer GLW M21	GLW Gesellschaft für Laborbedarf GmbH
Microspin FV-2400 Personal Spin-Vortex	Biosan
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Nanodrop-2000	Thermo Fisher Scientific
Reagnezglas mixer Mini-Vortexer	A. Hartenstein GmbH
Rotationsverdampfer	Buchi™
StepOne Plus qPCR Maschine	Thermo Fisher Scientific
Steri-Cult 200 Incubator	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank Heraeus© HERA-safe© Sunrise	Thermo Fisher Scientific
Thermal Cycler 2720	TECAN
Transferkammer für Western Blot	Thermo Fisher Scientific
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus UW3080	Thermo Fisher Scientific
Vortex GLW L46	Dandelin electronic GmbH und Co.KG
Zentrifuge PerfectSpinP	GLW Gesellschaft für Laborbedarf GmbH
	Thermo Fisher Scientific

2.1.3 Material

Tabelle 3: Verwendetes Material

Material	Hersteller
6-Well Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific
95-Well Zellkulturplatte	Thermo Fisher Scientific
Biosphere® sterile Filter Tips 0,5-20 µl	Sarstedt AG und Co
Biosphere® sterile Filter Tips 100-1000 µl	Sarstedt AG und Co
Biosphere® sterile Filter Tips 2-100 µl	Sarstedt AG und Co
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories
Glas-Pasteurpipetten	Brand GmbH und Co KG
Glasplatte, klein	BioRad Laboratories
Glasplatte 1,5 mm	BioRad Laboratories
Gummimembran	BioRad Laboratories

Halterung WB	Biometra
Insulinspritze Omnican® 40	B.Braun Melsungen AG
Kamm	BioRad Laboratories
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
PDMS-Kammer	Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik
Pipette 10 µl	Thermo Fisher Scientific
Pipette 100 µl	Eppendorf AG
Pipette 1000 µl	Eppendorf AG
Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran	Eppendorf AG
Steriles 15ml Tube	BioRad Laboratories
Stromquelle	Biorad Laboratories
T25 und T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt AG und Co
Transferkammer	Biometra
Tube 1,5ml	Greiner Bio One
Western Blot Gel Halterung	BioRad Laboratories
Wortmen-Papier	GE Healthcare
Zellschaber 25cm	Greiner Bio One

2.1.4 Western Blot Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Western Blot Antikörper

Zielprotein	Hersteller	Konzentration	Sek. Antikörper
Claudin 5	Invitrogen 35-2500	1:500 1%BSA/PBS	Roche Lumi Light Plus Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit) 12015218001 1:3000 1%BSA/PBS
Occludin	ACRIS AP26410PU- N	1:100 1%BSA/PBS	Santa Cruz Goat anti guinea pig IgG-HRP Sc-2438 1:5000 1%BSA/PBS
GLUT 1	EMD Milipore 07-1401	1:2000 5%Milch/PBS	CellSignaling Technology 7074S 1:3000 1%BSA/PBS
β-Aktin	Sigma Aldrich A3854	1:25.0000 1%BSA/PBS	

2.1.5 qRT-PCR Antikörper

Tabelle 5: Verwendete qRT-PCR Antikörper

Taq Man Sonde	Assay ID	Gene Symbol
GLUT-1	Mm01192270_m1	slc2a1
Claudin 5	Mm00727012_s1	cldn5
Integrin a1	Mm01306375_m1	Itga1
Integrin av	Mm00434486_m1	Itgav
Canx	Mm00500330_m1	Canx

2.1.6 Verwendete Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin ^o RNA Plant	Macherey-Nagel 740949.10
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific 43688814
Taq Man Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems 4444557
BCA-Protein Assay Kit	Thermo Scientific 23225

2.1.7 Verwendete Zellkulturmedien

Tabelle 7: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Substanz	Hersteller
500 ml DMEM	Sigma Aldrich D5796
10% FCS	Sigma Aldrich F7524
100 U/ml Penicillin/Streptomycin	Biochrom A2213

Tabelle 8: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums

Substanz	Hersteller
500 ml DMEM	Sigma Aldrich D5796
1% FCS	Sigma Aldrich F7524
100 U/ml Penicillin/Streptomycin	Biochrom A2213

Tabelle 9: Verwendetes OGD Medium

Substanz	Hersteller
DMEM, no glucose, no glutamine, no phenol red	Gibco A1443001

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Isosteviol-Natrium

Die Chemikalien wurden von den Firmen Carboluten Chemicals GmbH (St. Ingbert, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) bezogen und wurden ohne weitere Aufbereitung verwendet. ^1H (400.132 MHz) NMR Spektren wurden auf einem Bruker AV400 Instrument (Bruker Biopsin) aufgenommen. Als interner Standard wurde das Signal eines deuterierten Lösungsmittels genutzt (DMSO- d_6 : 2.5 ppm).

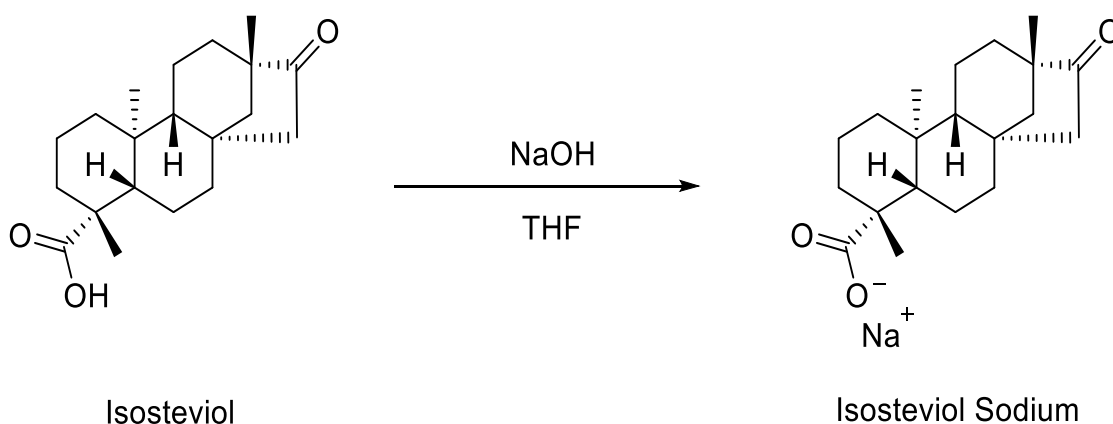


Abbildung 3: Formel zur Herstellung von STVNA.

Isosteviol (680 mg, 2.1 mmol) wurde in THF (70 ml) gelöst und mit 8 M NaOH (286 μL , 2.2 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 30 Minuten (min) gerührt. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, erhält man das STVNA als weißes Salz. Ausbeute: 680 mg (2.0 mmol, 95 %). In Abbildung 4 sind NMR Aufnahmen von Isosteviol und STVNA dargestellt. In der NMR Aufnahme von STVNA ist ein Verlust des Säureprotons an Position 11,7 (ppm) und ein Shift der Methylgruppen im Vergleich zur NMR Aufnahme von Isosteviol zu beobachten. Dadurch kann eine erfolgreiche Reaktion und die Reinheit des hergestellten STVNA bestätigt werden.

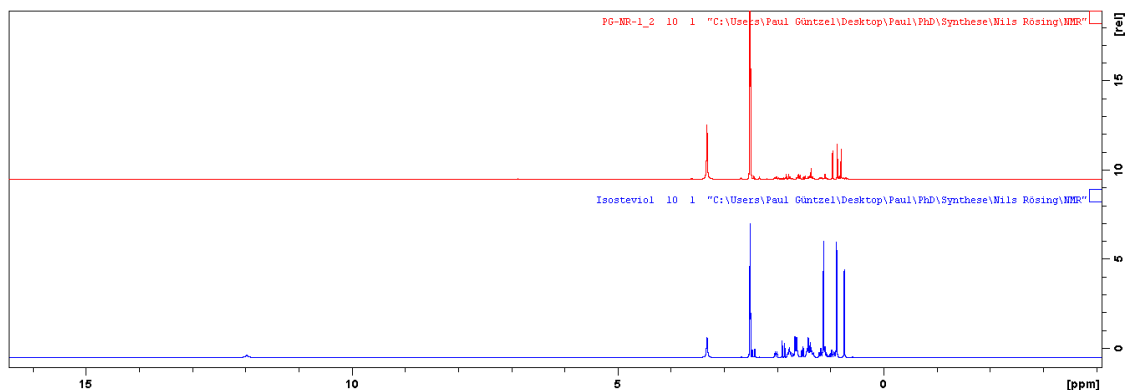


Abbildung 4: NMR STVNA

Das Fehlen des Säureprotons an Position 11,97 (ppm) und ein Shift der Methylgruppen bestätigen die Reinheit des Produktes.

2.2.2 Zellkulturmethoden

Die Zellversuche wurden mit im Labor etablierten cerebEND Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie besteht aus immortalisierten mikrovaskulären Endothelzellen aus der Kleinhirnrinde von neonatalen Mäusen, deren Gewinnung bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben wurde (Silwedel and Forster 2006, abm 2019). Die cerebEND Zellen wurden in mit 0,5 % Gelatine in Wasser beschichteten, 75 cm² großen Zellkulturflaschen (T-75, 250 ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) in einem Brutschrank (Steri-Cult 200 Incubator, Thermo Fisher Scientific) bei 5 % CO₂ und 37 Grad Celsius (°C) in 20 Milliliter (ml) Zellkulturmedium pro Flasche gelagert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das alte Zellkulturmedium unter einer sterilen Werkbank (Herasafe® Heraeus®) abgesaugt und durch 20 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt wurde. An jedem siebten Tag mussten die cerebEND Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet werden. Dazu wurden die cerebEND Zellen einer 75cm² Zellkulturflasche unter einer sterilen Werkbank zweimal mit PBS (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) gewaschen und mit 2 ml Trypsin (Biochrom) vorsichtig abgelöst. Die Flasche wurde mit 58 ml Zellkulturmedium aufgefüllt und vorsichtig geschüttelt, sodass sich die Zellen gleichmäßig im Medium verteilen konnten. Anschließend konnten jeweils 20 ml Zellsuspension in neue mit 0,5 % Gelatine in Wasser beschichtete 75 cm² Zellkulturflaschen überführt werden. Danach wurden die Zellen in dem Brutschrank (Steri-Cult 200

Incubator, Forma Scientific) bei 5 % CO₂ und 37 °C gelagert. Nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen konnten die bis dahin konfluent gewachsenen Zellen einer 75 cm² Zellkulturflasche gesplittet und auf mit 0,5 % Gelatine in Wasser beschichtete 6-Well Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific) ausgesät werden.

2.2.3 Sauerstoff-Glukose-Entzug und Behandlung mit STVNA

Als *in vitro* Modell des Schlaganfalls wurde das Verfahren der OGD genutzt (Goldberg and Choi 1990). Damit sich die cerebEND Zellen vor dem Verfahren nicht weiter ausdifferenzieren konnten, wurde 24 h vor dem Verfahren ein Mediumwechsel unter einer sterilen Werkbank vorgenommen. Die cerebEND Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und es folgte anschließend ein Wechsel auf ein Medium mit 1% FCS (Merck) in DMEM (Sigma-Aldrich). Nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen für 24 h in einem Brutschrank (Steri-Cult 200 Incubator, Forma Scientific) gelagert. Nach 24 h wurden die Zellen aus dem Brutschrank geholt und unter einer sterilen Werkbank zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte bei der OGD Versuchsgruppe ein Mediumwechsel auf ein glukose- und pyruvatfreies Medium (Thermo Fisher Scientific) mit 1 % FCS und bei der Kontrollgruppe auf ein Medium mit 1 % FCS in DMEM. Nach dem Mediumwechsel wurde die OGD Gruppe für 4 Stunden in einem CO₂ Inkubator (Heracell 150i, Thermo Scientific) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 1 % O₂ gelagert (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011). Die Normoxie Gruppe wurde für 4 h in einem Brutschrank (Steri-Cult 200 Incubator, Forma Scientific) bei 5% CO₂ und 37°C gelagert. Nach 4h wurden beide Versuchsgruppen aus ihrem jeweiligen Inkubator geholt und zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss fand bei allen Gruppen ein Wechsel auf ein Medium mit 1% FCS mit einem Gehalt von 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA und eine Inkubation von 0 h, 4 h und 24 h in einem Brutschrank (Steri-Cult 200 Incubator, Forma Scientific) bei 5 % CO₂ und 37 °C statt.

2.2.4 Proteinernte

Die cerebEND Zellen wurden nach einer jeweiligen Reoxygenierungszeit von 0 h, 4 h, und 24 h aus dem Brutschrank (Steri-Cult 200 Incubator, Forma Scientific) geholt und unter einer sterilen Werkbank zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen. In jede Vertiefung wurden 130 Mikroliter (μl) gekühlter RIPA Puffer und 20 μl gekühlter Protease Inhibitor Cocktail (Roche) hinzugegeben. Mit einem Spatel wurden die cerebEND Zellen vorsichtig abgeschabt, in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert. Die Aufbereitung der Proben erfolgte mit einem Ultraschall-Homogenisator (Bandelin SONOPULS) auf Eis. Anschließend wurden die aufbereiteten Proben für 10 min bei 10.000 Gravitationsbeschleunigungen (G) und 4°C in einer Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5418 R) abzentrifugiert. Der Überstand der einzelnen Proben wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

2.2.5 Proteinmengenbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit der Bicinchoninsäure – Methode (Smith, Krohn et al. 1985) und einem BCA-Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). In jedes benötigte Well einer 96-Well Zellkulturplatte (Thermo Fisher Scientific) wurden 22 μl H₂O (B Braun), 3 μl der jeweiligen Probe und 200 μl der BCA- Reaktionslösung gegeben. Durch eine auf der gleichen 96-Well Zellkulturplatte aufgetragenen Kalibrierungsreihe und eine 30-minütige Inkubation in einem Brutschrank (Forma Scientific Steri-Cult 200 Incubator) bei 5 % CO₂ und 37 °C konnte, nach Abkühlung der Platte auf Raumtemperatur, eine Proteinbestimmung mit einem Spektralphotometer (TECAN sunrise) bei 540 nm durchgeführt werden. Für die nachfolgende Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde von jeder Probe eine entsprechende Proteinmenge für 20 μg entnommen und mit 4X Lämmli und darin enthaltenen 6 % β -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich) auf 20 μl aufgefüllt.

2.2.6 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Das Verfahren der SDS-PAGE ermöglichte die Auftrennung von unterschiedlich großen Proteinstrukturen im elektrischen Feld. Um die Struktur und unterschiedlichen Ladungszustände der einzelnen Proteine aufzulösen, wurde zu den Proteinproben SDS (AppliChem) im Überschuss hinzugegeben. Die Proteinproben wurden durch Laemmli separiert (Laemmli 1970). Um die Polymerisation des benötigten Sammelgels und Trenngels in die Wege zu leiten, wurde Ammoniumpersulfat (AppliChem) und zur Katalyse dieser Reaktion Tetramethylethyldiamin (Sigma) genutzt. Zur Herstellung des Sammelgels wurden eine 1,5 Millimeter (mm) Glasplatte (BioRad Laboratories) und eine dazu passende kleinere Glasplatte (BioRad Laboratories) in eine Halterung (BioRad Laboratories) eingespannt und nach unten mit einer Gummimembran (BioRad Laboratories) abgedichtet. Zwischen die Glasplatten wurde das Trenngel eingefüllt und mit Isopropanol (Sigma Aldrich) überschichtet. Das Isopropanol wurde abgossen und oberhalb des ausgehärteten Trenngels wurde das Sammelgel bis zur Oberkante der Glasplatten hinzugegeben. Ein an die Größe der Glasplatten angepasster Kamm (BioRad Laboratories) wurde in das noch flüssige Sammelgel eingebracht. Nach 30 min wurde das fertige Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer (BioRad Laboratories) eingebaut. Das Innere der Elektrophoresekammer wurde bis zum Überlaufen mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Beim Befüllen der äußeren Kammer wurde darauf geachtet, dass der Flüssigkeitsspiegel unterhalb des inneren Flüssigkeitsspiegels lag. Der Kamm wurde aus dem Sammelgel entfernt und die Geltaschen wurden mit Elektrophoresepuffer gespült, um übrig gebliebene Gelreste zu entfernen. In die äußeren Taschen wurden jeweils 3 µl Marker (Proteinmarker "PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder", 10-250 kDa, Thermo Fisher Scientific) gefüllt. Um ein gleiches Volumen in allen Geltaschen zu erhalten, wurden die Taschen mit 4X Lämmli und RIPA mit Proteinaseinhibitor (Roche) auf 20 µl aufgefüllt. Die gefrorenen mit 4X Lämmli und 6 % β-Mercaptoethanol versetzten Proteinproben wurden in einem Heizblock (Dri-Block DB 2A, Techne) für fünf Minuten auf 70 °C erhitzt. In jede Geltasche wurden jeweils 20 Mikrogramm (µg) in 20 µl in die

entsprechenden Geltaschen aufgeladen. Die Elektrophoresekammer wurde an eine Stromquelle (PowerPac™ HC High-Current Power Supply, BioRad Laboratories) mit 60 Volt angeschlossen, bis die Proteine durch das Sammelgel gelaufen waren. Sobald die Bande des Markers im Trenngel angekommen war, wurde die Spannung auf 135 Volt erhöht. Sobald die Lauffront ca. 5 mm von der Unterkante des Trenngels entfernt war, wurde die Stromquelle abgeschaltet. In den folgenden Tabellen wird die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers, des Trenngels, des Sammelgels, des RIPA-Puffers und des 4X-Lämmli-Puffers dargestellt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers

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

Tabelle 11: Zusammensetzung des Trenngels (12 %)

3,35 ml	H ₂ O
4 ml	Acrylamid/BIS (30:2)
2,5 ml	3M Tris pH 8,8
100 µl	10% SDS
100 µl	10% APS
6 µl	TEMED

Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels

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

Tabelle 13: Zusammensetzung des RIPA-Puffers

50 mM	Tris pH 8,0
150 mM	NaCl
0,1 %	SDS
0,5 %	Sodium Deoxycholate
1 %	NP 40

Tabelle 14: Zusammensetzung des 4X Lämmli-Puffers

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

2.2.7 Western Blot

Um eine Antikörperbindung an die Proteine zu ermöglichen, wurde die Methode nach Kyhse-Andersen verwendet (Kyhse-Andersen 1984). Anstatt Nitrozellulose wurde eine stabilere Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran (BioRad Laboratories) als Proteinträger verwendet. Das Trenngel wurde bei Raumtemperatur aus der Elektrophoresekammer ausgebaut und in einen mit Towbin-Puffer getränkten Semidry-Blotting Sandwich bestehend aus beidseitig aufgelegtem Vlies mit Wortmen-Papieren (GE Healthcare) und in der Mitte eingelegter mit 100 % Methanol (Sigma Aldrich) vorbehandelter PVDF-Membran überführt. Das Semidry-Blotting Sandwich wurde mit einer Halterung (Biometra) in ein Transfergerät (Biometra) eingebaut. Durch einen zur ursprünglichen Laufrichtung angelegten Stromfluss von 40 Milliampere pro Gel, wurden die im Trenngel separierten Proteine bei 4 °C über Nacht auf die immobilisierende PVDF-Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran mit einer Pinzette aus dem Semidry-Blotting Sandwich herausgenommen und für 1 h mit 5 % Magermilch (Carl Roth) (w/v) in PBS geschwenkt. Anschließend wurde die Magermilch verworfen und es erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Lösung mit dem Primärantikörper abgekippt und die PVDF-Membran wurde dreimal für 10 min in PBS mit 0,1 %

Tween 20 (Sigma Aldrich) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran für 20 min in PBS mit 5 % Magermilchpulver (Carl Roth) eingelegt. Anschließend wurde die Magermilch verworfen und der sekundäre Western-Blot Antikörper hinzugegeben. Nach 1h wurde der sekundäre Antikörper verworfen und die PVDF-Membran wurde dreimal für 10 min in PBS mit 0,1 % Tween 20 (Sigma Aldrich) gewaschen. Eine Darstellung der in der PVDF-Membran enthaltenen Proteine wurde durch die Methode der Elektrochemilumineszenz (ECL-Methode) ermöglicht (Whitehead, Kricka et al. 1979). Für die Entwicklerlösung wurden jeweils 4 ml ECL I mit 4 ml ECL II gemischt und zu der PVDF Membran in einer Lichtgeschützten Box gegeben, sodass die Entwicklerlösung die PVDF- Membran vollständig bedeckte. Nach 2 min wurde die PVDF-Membran mit einer Pinzette aus der Entwicklerlösung genommen und mit einem Imagen FlourChem FC2 (Cell Biosciences) und der Software (AlphaView Version 1.3.0.7, Innovatech Corporation) entwickelt. Nach dem Entwickeln wurde die Membran mit einer Pinzette in PBS mit 0,1 % Tween 20 (Sigma Aldrich) gelegt. Anschließend wurde die PVDF-Membran für 5 min mit destilliertem H₂O (Braun), 5 min mit 0,2M NaOH (Merck), 5 min destilliertem H₂O (Braun) und 10 min in PBS mit 0,1 % Tween 20 (Sigma Aldrich) gestrippt. Eine Aufbewahrung der gestrippten PVDF-Membranen erfolgte lichtgeschützt in PBS mit 0,1 % Tween 20 (Braun) bei 4 °C.

Tabelle 15: Zusammensetzung der ECL I Lösung

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

Tabelle 16: Zusammensetzung der ECL II Lösung

32 µl	Wasserstoffperoxid
5 ml	Tris 1M (pH8,8)
ad 50 ml	dH ₂ O

Tabelle 17: Zusammensetzung des Runningpuffers 10X (pH 8,8-9,2)

1 l	Destilliertes H ₂ O
39 mM	Glycine
48 mM	Tris
1,3 mM	10% SDS

Tabelle 18: Zusammensetzung des Transferpuffers

2 l	Destilliertes H ₂ O
250 mM	Glycine
0,1 %	10 % SDS

2.2.8 RNA-Isolation

Die Ribonukleinsäure-Isolation erfolgte nach dem NucleoSpin® RNA-Protokoll. Die cerebEND Zellen wurden aus dem Brutschrank (Steri-Cult 200 Incubator, Forma Scientific) geholt und unter einer sterilen Werkbank (Herasafe HS15, Heraeus) zweimal mit PBS gewaschen und mit 350 µl RA1 Puffer (Machery-Nagel) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich) pro Vertiefung behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber (Greiner BioOne Sarstedt) abgeschabt und in ein steriles 1,5 ml Cap überführt. Die Zellstruktur der Zellen wurde mit einer sterilen Spritze (Insulinspritze Omnican®, B. Braun Melsungen AG) durch zehnmalsiges Aufziehen aufgespalten. Um das Zelllysate zu reinigen und die Viskosität zu reduzieren wurden die einzelnen Proben auf einen NucleoSpin®Filter (violet ring) in einem sterilen 2 ml Cap pipettiert und bei 11.000 G für eine Minute zentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf). Nach der Zentrifugation wurde der NucleoSpin®Filter (violet ring) verworfen und 350 µl Ethanol 70 % (Sigma Aldrich) zu dem im Cap befindlichen Zelllysate hinzugegeben, um die anschließende Bindung der RNA an der NucleoSpin®RNA Säule (light blue ring) zu verbessern. Das mit Ethanol vermischte Zelllysate wurde auf eine in einem sterilen Cap steckende NucleoSpin®RNA Säule (light blue ring) nach zwei bis dreimaligem auf- und ab-pipettieren überführt. Anschließend wurde das Zelllysate bei 11.000 G für 30 Sekunden zentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf). Nachfolgend wurden 350 µl MDB Puffer (Membrane Desalting Buffer) auf die NucleoSpin®RNA Säule (light blue ring) hinzugegeben und es erfolgte eine Zentrifugation bei 11.000 G für eine Minute. Durch die Hinzugabe von 95 µl

DNase Reaktionsmix und einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur, wurde die sich in der NuceloSpin® RNA Säule (light blue ring) befindliche DNA verdaut. Mit 200 µl RAW2-Puffer (Machery-Nagel) wurde die Aktivität der DNase beendet und es erfolgte eine Zentrifugation für 30 Sekunden (Centrifuge 5415C, Eppendorf) bei 11.000 G. Danach wurde die NuceloSpin® RNA Säule (light blue ring) in ein neues nukleasefreies Cap überführt. Auf die NuceloSpin® RNA Säule (light blue ring) wurden 600 µl RA3 Puffer gegeben und es folgte eine Zentrifugation bei 11.000 G für 30 Sekunden. Der Durchfluss am Boden des Caps wurde verworfen und die NuceloSpin® RNA Säule (light blue ring) wurde erneut in dem Cap platziert und unter Zugabe von 250 µl RA3 Puffer für 2 min bei 11.000 G zentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf). Um die RNA herauszuwaschen, wurde die NuceloSpin® RNA Säule (light blue ring) in ein neues nukleasefreies Cap überführt, mit 40 µl RNase freiem H₂O (Machery Nagel) befüllt und bei 11.000 G für 1 min zentrifugiert. Die RNA Säule (light blue ring) wurde verworfen und das Cap, mit der im Durchfluss enthaltenen RNA, verschlossen und auf Eis gelagert. Mit einem Spektromer (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) wurde die RNA Konzentration der jeweiligen Proben erhoben. Abschließend wurden die RNA Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.9 cDNA Herstellung

Die Herstellung der cDNA erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). In ein nukleasefreies 0,2 ml Caps wurden 6,8 µl Mastermix, 0,4 µg der RNA Probe und die entsprechende Menge nukleasefreies H₂O für ein Gesamtvolumen von 20 µl pipettiert. In einem Thermal Cycler (Thermal Cycler, 2720, Applied Biosystems) wurden die 0,2 ml Caps für 10 min bei 25 °C, 120 min bei 37 °C und für 5 min bei 85 °C inkubiert. Anschließend konnten die Caps bei Bedarf bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 19: Zusammensetzung für 6,8 µl Mastermix

2 µl	10x RT Buffer
0,8 µl	25x dNTP Mix (100mM)
2 µl	10x RT Random Primer
1 µl	Multiscribe Reverse Transkriptase
1 µl	RNAse Inhibitor

2.2.10 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ermöglichte eine Vermehrung der zu untersuchenden DNA-Sequenzen, die im Anschluss mit TaqMan Sonden nachgewiesen werden konnten. Die cDNA Proben wurden 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. In die jeweiligen Wells einer 96 Well Zellkulturplatte (Thermo Fisher Scientific) wurden 11 µl Taq Man Fast Advanced Master Mix mit der jeweiligen qRT-PCR-Sonde und 9 µl verdünnte cDNA gegeben. Als endogene Kontrollsonde wurde Canx verwendet. Die qRT-PCR-Platten wurden mit einer sterilen Folie abgeklebt und in die qRT-PCR-Maschine (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems) überführt. Während der qRT-PCR wurde die 96-Well Platte für 15 Minuten auf 95 °C erhitzt, sodass die Enzyme aktiviert werden konnten. Danach folgten 50 Zyklen bei 96 °C für 15 Sekunden und bei 60 °C für 1 Minute. Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden mit der endogenen Canx Kontrollgruppe verglichen und mit der zugehörigen Software (Sequence Detection Software Version 1.4, Applied Biosystems) ausgewertet.

2.2.11 Optische Volumenbestimmung

Um einen Effekt von STVNA auf das Volumen von cerebEND Zellen nach 4 h OGD nachzuweisen, wurde ein etabliertes Verfahren zur optischen Volumenbestimmung genutzt (Andronic 2014, Andronic, Shirakashi et al. 2015). Die cerebEND Zellen wurden für 5 Tage nach dem Standardprotokoll für Zellkultur in einem Brutschrank (Steri-Cult 200 Incubator, Forma Scientific) bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert (abm 2019). Am 6. Tag erfolgte ein OGD Verfahren (Gwag, Lobner et al. 1995) und eine gleichzeitige Behandlung mit 0 mg/l, 10 mg/l und 20mg/l STVNA. Nach dem OGD Verfahren wurde schnellstmöglich eine

optische Volumenbestimmung durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 300 μ l Trypsin abgelöst. Im Anschluss wurden 1,5 ml Zellkulturmedium pro Well hinzugegeben und die jeweilige Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Abbildung 5 zeigt eine vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik hergestellte Polymethylsiloxan-Kammer (PDMS-Kammer) die mit einem mit Poly-D-Lysin (Thermo Fisher Scientific) beschichteten Deckgläschen nach oben abgedeckt wurde. Anschließend wurde mit einer Spritze ein Teil der Zellsuspension aus dem Falconröhrchen entnommen und über einen Dreiwegehahn in die PDMS-Kammer injiziert.

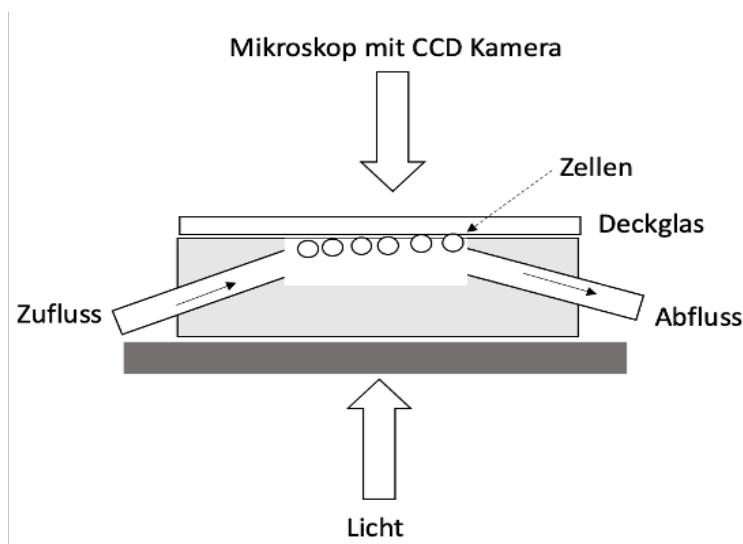


Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer PDMS-Kammer
 Modifizierte Grafik nach einer Abbildung von Dr. Joseph Andronic aus dem Institut für Biotechnologie der Universität Würzburg (Andronic 2014).

Die PDMS-Kammer wurde auf die Seite des Deckgläschens gedreht, damit sich die cerebEND Zellen an dem Deckgläschen anheften konnten. Nach 20 min wurde die PDMS-Kammer wieder mit dem Deckgläschen nach oben gedreht und die Zellen konnten unter einem Lichtmikroskop (Leica Leitz DMRM, Hamburg, Germany) bei 20-facher Vergrößerung betrachtet werden. Mit einer CCD-Kamera (uEYE, IDS GmbH, Obersulm, Deutschland) und dem Programm uEye (IDS GmbH, Obersulm, Deutschland) wurden die Zellen auf einem Bildschirm visualisiert. Über ein Makro wurde ein Farbbild in ein Graustufenbild umgewandelt und im Programm ImageJ geöffnet. Mithilfe eines weiteren Makros

konnte die Pixelzahl pro Fläche und somit auch der Radius ermittelt werden. Über ein Skript im Programm Origin war es möglich den Radius nicht mehr in Pixel, sondern in Mikrometern (μm) darzustellen (117 Pixel= 50 μm). Mit dem Radius konnte das Volumen der einzelnen Zellen annähernd berechnet werden ($V=4/3*\pi*r^3$).

2.2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten aus den Versuchen erfolgte mit GraphPad PRISM Version 7/8. Als Analyseverfahren, wurden der T-Test, die explorative Datenanalyse, Two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test und die univariante Varianzanalyse (ANOVA) benutzt. Die Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse Western Blot

3.1.1 Expressionsverhalten *in vitro* von Claudin-5 im Western Blot nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h

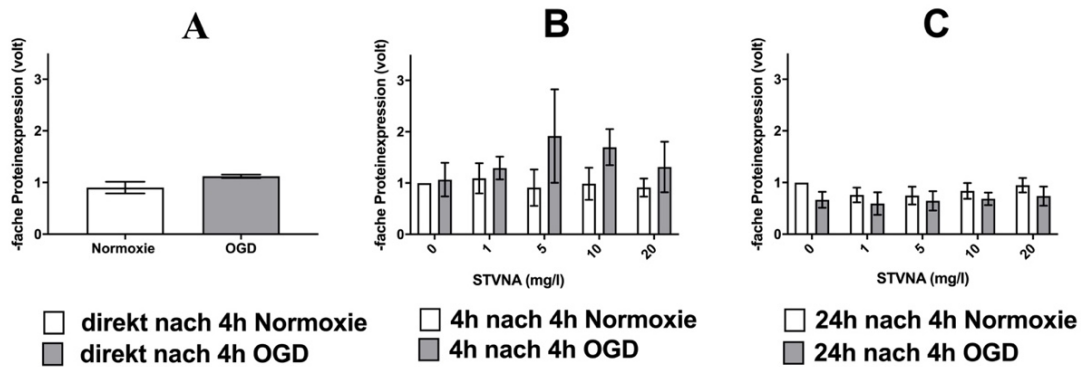


Abbildung 6: Western Blot und desitometrische Analyse von Claudin-5 nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C) Die gezeigten Werte entsprechen 4 unabhängigen Experimenten direkt nach 4 h OGD, 3 unabhängigen Experimenten 4 h nach 4 h OGD und 5 unabhängigen Experimenten 24 h nach 4 h OGD. Die Ladekontrolle wurde mit β -Actin durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem ungepaarten t-Test, dem Tunkey's multiple comparison test und GraphPad PRISM 7/8. Data +/- SEM. Signifikante Ergebnisse $p < 0,05$ wurden mit * markiert.

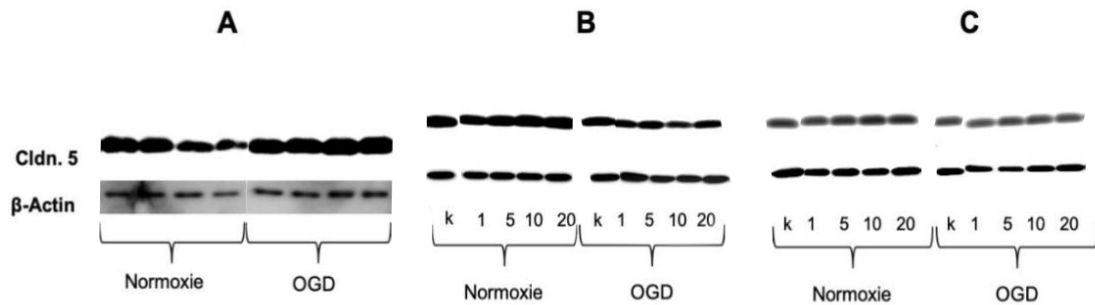


Abbildung 7: Western Blot von Claudin-5 und β -Actin Kontrolle direkt nach 4 h OGD (A) und einer anschließenden Behandlung mit 0 (k), 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA 4 h nach 4 h OGD (B) und 24 h nach 4 h OGD (C) k=Kontrolle

Abbildung 6 und 7 zeigen die Expression von Claudin-5 im Western Blot nach 4h OGD und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA für 4 h und 24 h. Claudin-5 ist essentiell für die Funktion der BHS und das in diesem Bereich vermutlich am stärksten angereicherte Tight Junction Protein (Greene, Hanley et al. 2019). Das Expressionsverhalten von Claudin-5 wurde direkt nach 4 h OGD und nach einer Behandlung mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA für 4 h

und 24 h nach 4 h OGD untersucht, um einen möglichen Effekt von STVNA auf die Funktion der BHS nachzuweisen. Im Western Blot zeigte Claudin-5 direkt nach 4 h OGD keine signifikanten Veränderungen der Expression im Vergleich zur unbehandelten Normoxie Gruppe. 4 h nach 4 h OGD konnte ein Maximum mit einer erhöhten Expression um das 1,8-fache der unbehandelten OGD Gruppe bei einer Konzentration von 5 mg/l STVNA festgestellt werden. Des Weiteren konnten in den mit 1, 10 und 20 mg/l STVNA behandelten cerebEND Zellen ebenfalls 4 h nach 4 h OGD erhöhte Expressionslevel im Vergleich zur unbehandelten OGD Gruppe festgestellt werden. 24 h nach 4 h OGD zeigten sich erniedrigte Expressionslevel von Claudin-5 in allen OGD Gruppen im Vergleich zur jeweils zugehörigen Normoxie Kontrollgruppe.

3.1.2 Expressionsverhalten *in vitro* von Occludin nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h im Western Blot

Abbildung 8 und 9 zeigen das Expressionsverhalten von Occludin nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA für 4 h und 24 h. Das Tight-Junction-Protein Occludin der BHS Schranke wurde untersucht, da es womöglich ebenso wie Claudin-5 eine essenzielle Rolle für die Barrierefunktion und in der Therapie von Funktionsstörungen der BHS spielt (Forster, Silwedel et al. 2005, Pan, Yu et al. 2017). Die Expressionsrate von Occludin zeigte einen in etwa vergleichbaren Verlauf, wie die von Claudin-5. Initial kam es direkt nach 4 h OGD zu einer verminderten Expression von Occludin auf das 0,7-fache des Expressionslevels der unbehandelten Normoxie Gruppe. 4 h nach 4h OGD konnte die höchste Expression von Occludin in den mit 4 h OGD und 5 mg/l (3,5-fache Erhöhung) und 10 mg/l (3,4-fache Erhöhung) STVNA behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten OGD Gruppe, die direkt nach 4 h OGD geerntet wurde festgestellt werden. 24 h nach 4 h OGD wurde ein nahezu ausgeglichenes Expressionslevel zwischen allen Versuchsgruppen festgestellt.

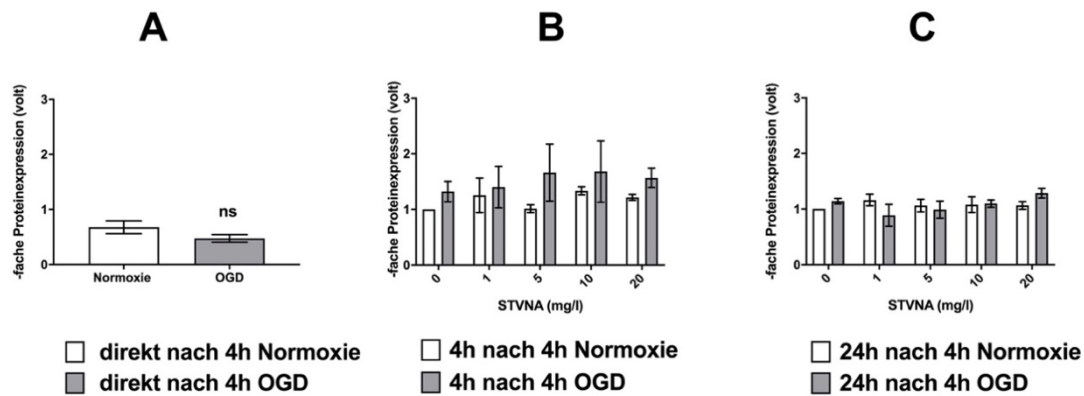


Abbildung 8: Western Blot und desitometrische Analyse von Occludin nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C) Die gezeigten Werte entsprechen 4 unabhängigen Experimenten direkt nach 4 h OGD, 3 unabhängigen Experimenten 4 h nach 4 h OGD und 4 unabhängigen Experimenten 24 h nach 4 h OGD. Die Ladekontrolle wurde mit β -Actin durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test, dem Tukey's multiple comparison Test und GraphPad PRISM 7/8 ermittelt. Data \pm SEM. Signifikante Ergebnisse $p < 0,05$ wurden mit * markiert.

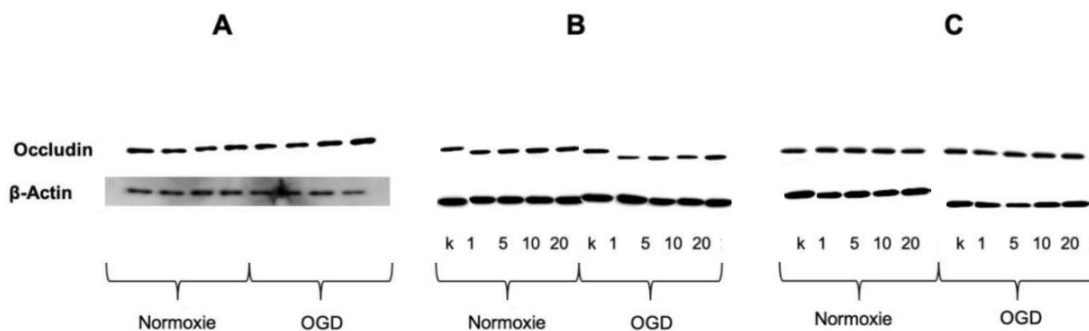


Abbildung 9: Western Blot von Occludin und β -Actin Kontrolle direkt nach 4 h OGD (A) und einer anschließenden Behandlung mit 0 (k), 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA 4 h nach 4 h OGD (B) und 24 h nach 4 h OGD (C) k=Kontrolle

3.1.3 Expressionsverhalten *in vitro* von GLUT1 nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h im Western Blot

Abbildungen 10 und 11 zeigen die Expression von GLUT1 nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA für 4 h und 24 h im Western Blot.

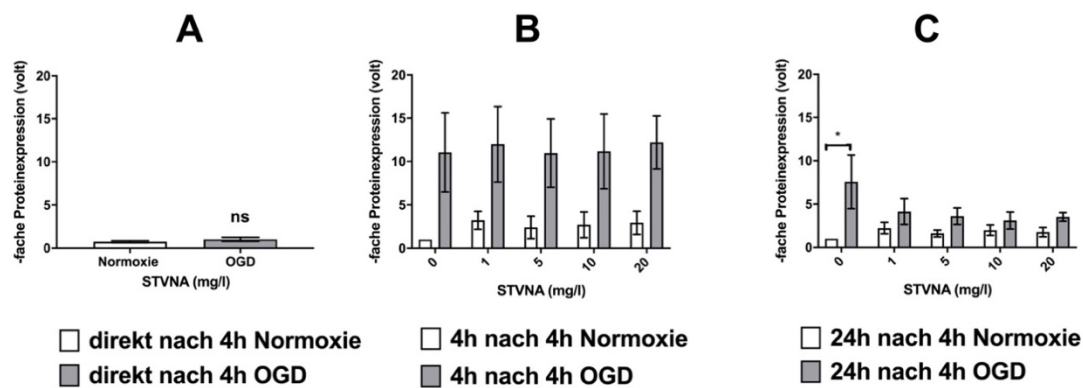


Abbildung 10: Western Blot und desitometrische Analyse von GLUT1 nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C) Die gezeigten Werte entsprechen (A) 4 unabhängigen Experimenten direkt nach 4 h OGD (B) 3 unabhängigen Experimenten 4 h nach 4h OGD und (C) 4 unabhängigen Experimenten 24 h nach 4 h OGD. Die Ladekontrolle wurde mit β -Actin durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test, dem Tukey's multiple comparison Test und GraphPad PRISM 7/8 ermittelt. Data +/-SEM. Signifikante Ergebnisse $p < 0,05$ wurden mit * markiert.

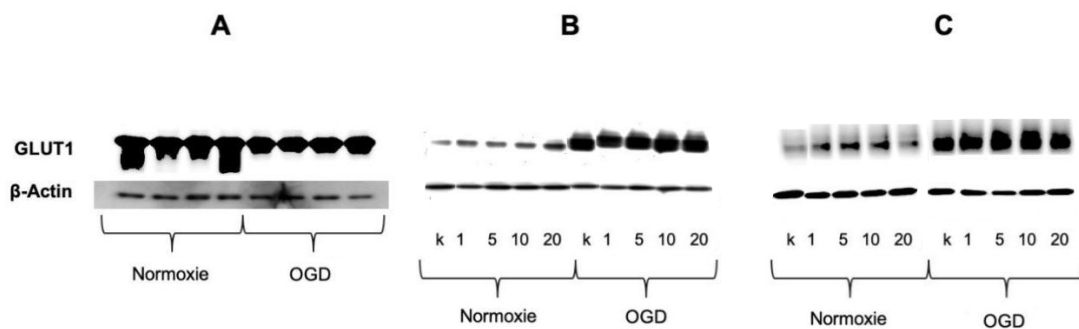


Abbildung 11: Western Blot von GLUT1 und β -Actin Kontrolle direkt nach 4 h OGD (A) und einer anschließenden Behandlung mit 0 (k), 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA 4 h nach 4 h OGD (B) und 24 h nach 4 h OGD (C) k=Kontrolle

Da GLUT1 eine Rolle in der Entwicklung eines Hirnödems spielt (Zheng, Romme et al. 2010) wurde das Expressionsverhalten von GLUT1 direkt nach 4 h OGD und nach einer anschließenden Behandlung mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA für 4 h und 24 h untersucht. Direkt nach 4 h OGD wurde eine nicht signifikante Erhöhung von GLUT1 auf das 1,36-fache vom Ausgangswert der unbehandelten Normoxie Kontrollgruppe gemessen. 4 h nach 4 h OGD stieg die Expression von GLUT1 um nahezu das 10-fache des Ausgangswertes der unbehandelten OGD Gruppe direkt nach OGD in allen mit OGD behandelten Gruppen an. 24 h nach 4 h OGD konnte in der unbehandelten OGD Kontrollgruppe ein Rückgang der GLUT1 Expression auf das 0,86-fache des Expressionslevel der unbehandelten OGD Kontrollgruppe, die 4 h nach 4 h OGD geerntet wurde beobachtet werden.

Diese verminderte Expression zeigte sich als signifikant erhöhtes Maximum 24 h nach 4 h OGD mit einer 6,57-fach erhöhten Expression im Vergleich zur zugehörigen Normoxie Kontrollgruppe. Das Maximum konnte mit einer Signifikanz $p < 0,05$ gesichert werden. Die mit STVNA behandelten Gruppen zeigten 24 h nach 4 h OGD eine verminderte Expression im Vergleich zur unbehandelten OGD Kontrollgruppe. Dabei konnte die niedrigste Expression von GLUT1 bei einer Konzentration von 10 mg/l beobachtet werden.

3.2 Ergebnisse quantitative real-time RT-Polymerase-Kettenreaktion

3.2.1 Expressionsverhalten *in vitro* von Claudin-5 in der qRT-PCR nach 4h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h

Abbildung 12 zeigt das Expressionsverhalten von Claudin-5 nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA für 4 h und 24 h in der qRT-PCR. Die Expression von Claudin-5 war direkt nach 4 h OGD auf das 0,43-fache des Ausgangswertes der unbehandelten Normoxie Gruppe erniedrigt. Dieses bereits bekannte Expressionsverhalten konnte mit einer statistischen Signifikanz $p < 0,0001$ gesichert werden (Liu, Wang et al. 2015). 4 h nach 4 h OGD zeigte sich eine leicht erhöhte Expression von Claudin-5 bei einer Konzentration von 0 mg/l STVNA im Vergleich zur OGD Gruppe, die direkt nach 4 h OGD geerntet wurde. Die mit STVNA behandelten Normoxie Gruppen zeigten nach 4 h Behandlungszeit eine leicht erhöhte Expression von Claudin-5 bei einer Konzentration von 1, 5 und 10 mg/l STVNA im Vergleich zur unbehandelten Normoxie Kontrollgruppe, die direkt nach 4 h Normoxie geerntet wurde. 24 h nach 4 h OGD wurden im Vergleich zu den Ergebnissen nach 4h Behandlungszeit erhöhte Expressionslevel von Claudin-5 in den mit STVNA behandelten cerebEND Zellen gemessen. Hier zeigte sich ein Maximum bei einer Konzentration von 10 mg/l STVNA.

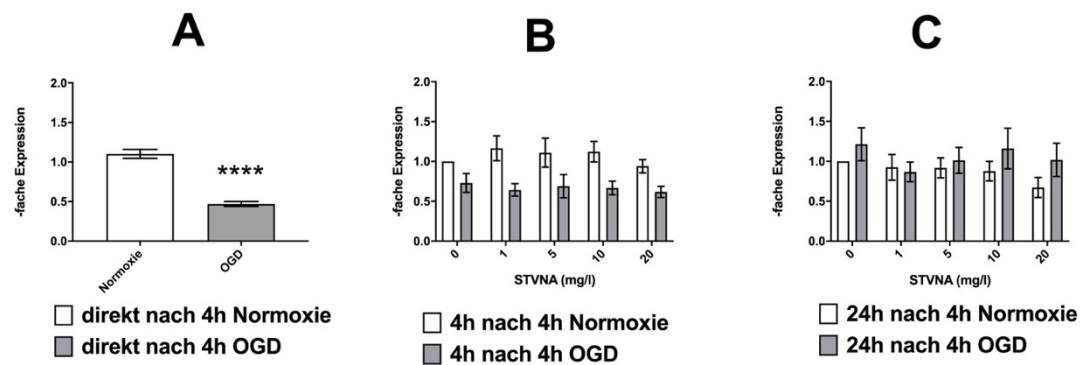


Abbildung 12: qRT-PCR von Claudin-5 nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C)

Die gezeigten Werte entsprechen jeweils 4 unabhängigen Experimenten, deren Referenzkontrolle mit Can X erfolgte. Statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test, dem Tukey's multiple comparison Test und GraphPad PRISM 7/8 ermittelt. Data +/- SEM. Signifikante Ergebnisse $p < 0,05$ wurden mit * markiert. **** $p < 0,0001$. Werte mit unzureichender Standardabweichung wurden aus der statistischen Auswertung entfernt.

3.2.2 Expressionsverhalten *in vitro* von Integrin $\alpha 1$ und Integrin αv in der qRT-PCR nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h

Abbildung 13 zeigt das Expressionsverhalten von Integrin $\alpha 1$ und Integrin αv nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA für 4 h und 24 h in der qRT-PCR. Integrine sind als Transmembranproteine ein zentraler Bestandteil für die Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten, sowie der Signaltransduktion von der Matrix auf das Zytoskelett. Um den Einfluss von STVNA auf die Entzündungsreaktion zu testen, wurde die Expression von Integrin $\alpha 1$ und Integrin αv nach 4 h OGD und nach einer Behandlung mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA für 4 h und 24 h nach 4 h OGD in der quantitativen qRT-PCR untersucht. Direkt nach 4 h OGD zeigte die OGD Versuchsgruppe eine Erhöhung von Integrin $\alpha 1$ auf das 1,12-fache im Vergleich zur unbehandelten Normoxie Gruppe. 4 h nach 4 h OGD wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt. 24 h nach 4 h OGD konnte ein erhöhtes Expressionsverhalten in allen mit STVNA und OGD behandelten Versuchsgruppen beobachtet werden. Das höchste Expressionslevel konnte 24 h nach 4 h OGD bei einer Konzentration von 10 mg/l festgestellt werden. Direkt nach 4 h OGD wurde eine erhöhte Expression von Integrin αv mit einer

Signifikanz $p < 0,0001$ gesichert (Forster, Kahles et al. 2007). 4 h nach 4 h OGD wurde die höchste Expression von Integrin αv bei einer Konzentration von 1 mg/l gemessen. Ebenfalls konnte nach einer Behandlung mit 5 mg/l STVNA eine leicht erhöhte Expression gemessen werden. Bei einer Konzentration von 10 mg/l und 20 mg/l STVNA wurde jeweils eine erniedrigte Expression im Vergleich zur unbehandelten OGD Gruppe 4 h nach 4 h OGD gemessen. Nach einer Behandlungszeit von 24 h nach 4 h OGD zeigte die mit OGD und STVNA behandelten Gruppen ein nahezu ausgeglichenes Expressionsverhalten. Das höchste Expressionslevel zeigte sich bei einer Konzentration von 5 mg/l STVNA.

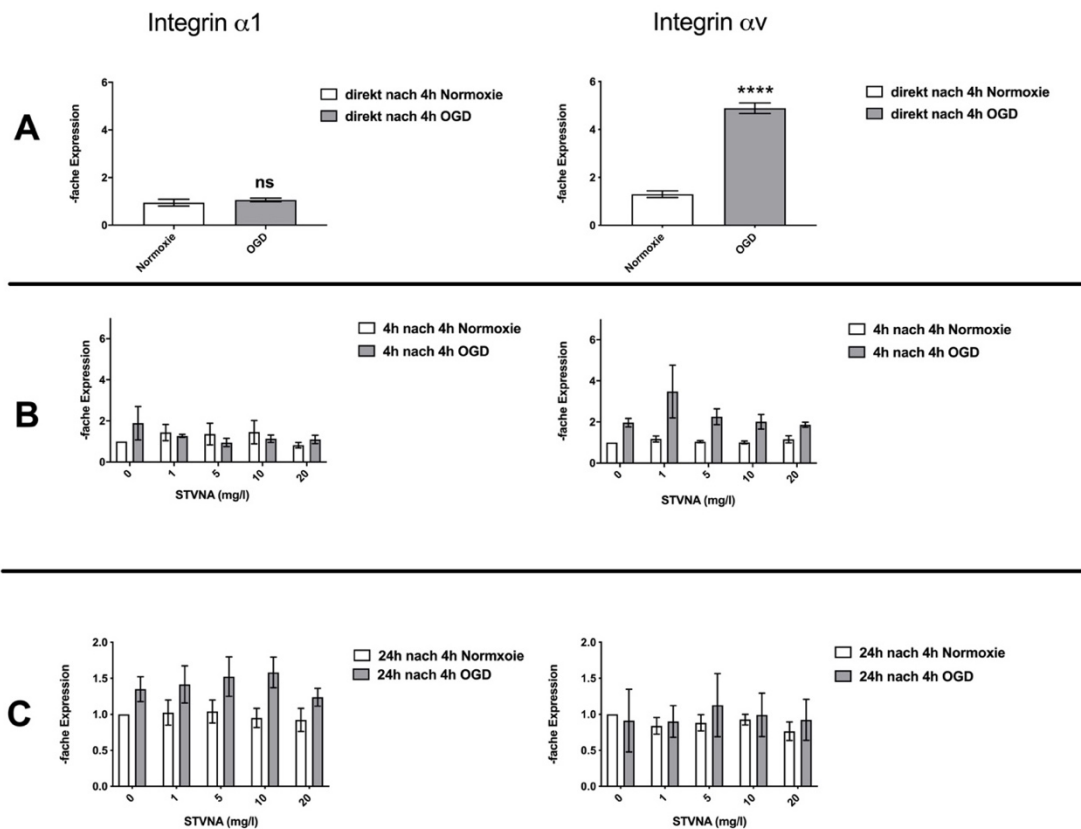


Abbildung 13: qRT-PCR von Integrin $\alpha 1$ und Integrin αv nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C)

Die gezeigten Werte entsprechen jeweils 4 unabhängigen Experimenten, deren Kontrolle mit Can X erfolgte. Statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test, dem Tukey's multiple comparison Test und GraphPad PRISM 7/8 ermittelt. Data +/- SEM. Signifikante Ergebnisse $p < 0,05$ wurden mit * markiert. **** $p < 0,0001$. Werte mit unzureichender Standardabweichung nach qRT-PCR wurden aus der statistischen Auswertung entfernt.

3.2.3 Expressionsverhalten *in vitro* von GLUT1 nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit STVNA für 4 h und 24 h in der qRT-PCR

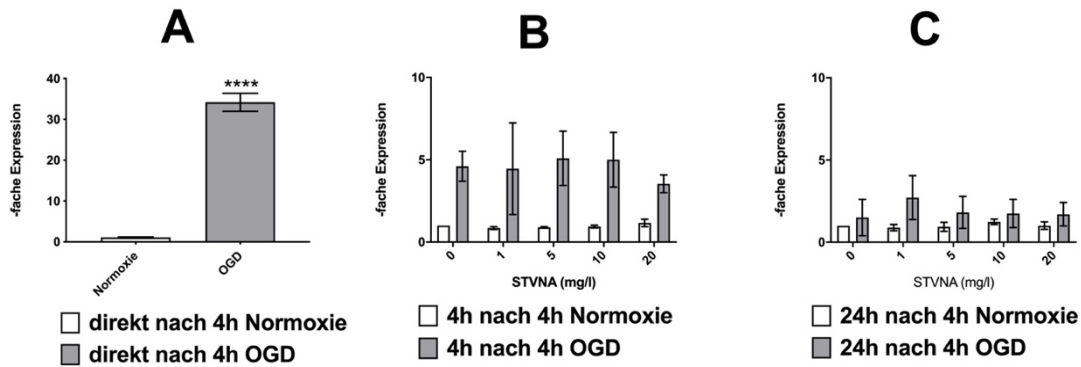


Abbildung 14: qRT-PCR von GLUT1 nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C)
 Die gezeigten Werte entsprechen jeweils 4 unabhängigen Experimenten, deren Referenzkontrolle mit Can X erfolgte. Statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test, dem Tukey's multiple comparison Test und GraphPad PRISM 7/8 ermittelt. Data +/- SEM. Signifikante Ergebnisse $p < 0,05$ wurden mit * markiert. **** $p < 0,0001$. Werte mit unzureichender Standardabweichung wurden aus der statistischen Auswertung entfernt.

Abbildung 14 zeigt das Expressionsverhalten von GLUT1 nach 4 h OGD und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA für 4h und 24h in der qRT-PCR dargestellt. Direkt nach 4 h OGD konnte eine vermehrte Expression von GLUT1 auf das 31,2-fache des Ausgangswertes der unbehandelten Normoxie Gruppe mit einer Signifikanz $p < 0,0001$ gesichert werden. 4 h nach 4 h OGD wurde die stärkste Expression von GLUT1 bei einer Konzentration von 5 mg/l STVNA auf das 0,15-fache des Ausgangswertes der unbehandelten OGD Gruppe direkt nach 4 h OGD gemessen. Die niedrigste Expression von GLUT1 4 h nach 4 h OGD zeigte sich bei einer Konzentration von 20 mg/l mit einer Reduktion auf das 0,39-fache des Ausgangswertes der unbehandelten OGD Gruppe 4 h nach 4 h OGD. 24 h nach 4 h OGD konnte ein Maximum bei einer Konzentration von 1 mg/l STVNA festgestellt werden. Die niedrigste Expression von GLUT1 24 h nach 4 h OGD wurde bei einer Konzentration von 0 mg/l STVNA gemessen. Zusammenfassend kam es 24 h

nach 4 h OGD zu nahezu ausgeglichene Expressionslevel zwischen den mit OGD behandelten Gruppen.

3.2.4 Optische Volumenmessung von cerebEND nach 4 h OGD und gleichzeitiger Behandlung mit 10 mg/l und 20 mg/l STVNA

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der optischen Volumenmessung von cerebEND Zellen direkt nach 4 h OGD und gleichzeitiger Behandlung mit 0, 10 und 20 mg/l STVNA. Nach Hinweisen auf einen neuroprotektiven Effekt von STVNA in den vorherigen Versuchen stellte sich die Frage, ob STVNA ebenfalls einen Einfluss auf das Zellvolumen der cerebEND Zellen *in vitro*, während 4 h OGD haben könnte. In diesem Versuch sollten die Effekte von 10 mg/l und 20 mg/l STVNA auf das Zellvolumen von cerebEND Zellen, während 4 h OGD mit Hilfe der optischen Zellvolumenbestimmung in einer Durchflusskammer untersucht werden. In der nach 4 h OGD durchgeführten optischen Zellvolumenmessung konnte eine Volumenzunahme um 19,87 % in der unbehandelten OGD Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Normoxie Gruppe gemessen werden (Kempe 2018). Diese Volumenzunahme wurde mit einer Signifikanz $p < 0,0001$ gesichert. Direkt nach 4 h OGD konnte bei einer Konzentration von 20 mg/l STVNA die stärkste Zellvolumenreduktion um 15,28 % im Vergleich zur unbehandelten OGD Gruppe gemessen werden. Diese Volumenreduktion konnte mit einer Signifikanz $p < 0,0001$ gesichert werden. Die Behandlung mit 10 mg/l STVNA während 4 h OGD zeigte eine nicht signifikante ($p = 0,47$) Volumenreduktion auf das 0,95-fache des Ausgangswertes der unbehandelten OGD Gruppe. Die mit 10 mg/l und 20 mg/l STVNA und 4 h Normoxie behandelten Zellen zeigten keine signifikante Volumenänderungen im Vergleich zur unbehandelten Normoxie Gruppe.

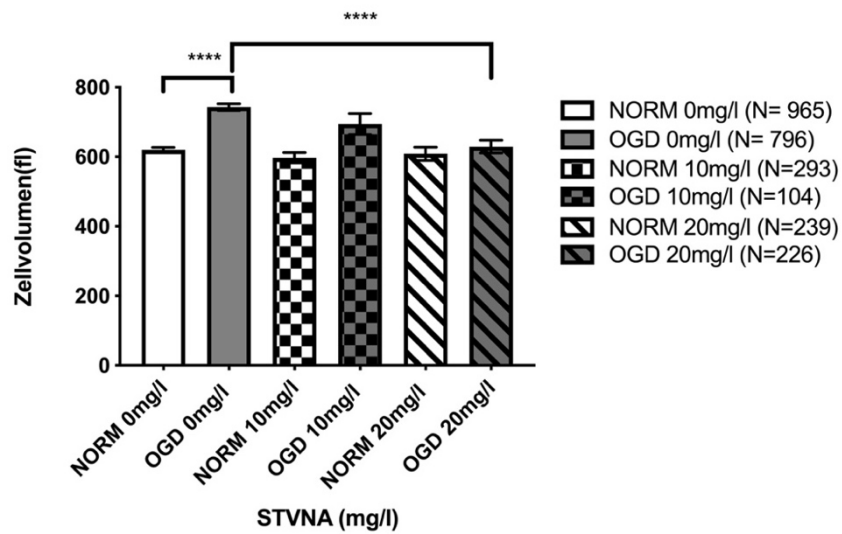


Abbildung 15: Optische Volumenmessung von cerebEND Zellen nach 4 h OGD und gleichzeitiger Behandlung mit 10 mg/l und 20 mg/l STVNA
 Statistische Signifikanz wurde mit dem Tukey's multiple comparison Test und GraphPad PRISM 7/8 ermittelt. Data +/- SEM. Signifikante Ergebnisse $p < 0,05$ wurden mit * markiert. **** $p < 0,000$. Werte über 2000fI wurden aus der statistischen Analyse entfernt.

4 Diskussion

Der Mangel an Sauerstoff und Glukose während einer Ischämie ist für Zellen der BHS ein vital bedrohlicher Zustand, der nur kurze Zeit überlebt werden kann (CY 2014). Beim Absterben der Zellen kommt zu einem strukturellen Verlust der Barrierefunktion der BHS und zur Entstehung von Endothelödemem (Krueger et al., 2015, 2017). Primäre Hirnschäden sind häufig auf einen direkt eintretenden nekrotischen Zelltod infolge eines Sauerstoff- und Glukosemangels zurückzuführen (Duris, Splichal et al. 2018). Initial durch ein Trauma entstandene Hirnschäden können nicht verhindert werden, weshalb sich die Behandlungsmaßnahmen auf die daraus resultierenden sekundären Hirnschäden konzentrieren. Bisher existieren nur Ansätze für ein Behandlungskonzept von sekundären Hirnschäden nach zerebral ischämischen Ereignissen. Pharmakologische Interventionen, die einen dauerhaften Nutzen bringen indem sie die zugrunde liegende Ätiologie günstig beeinflussen und dadurch dem Ausbruch einer Krankheit oder einer klinischen Verschlechterung vorbeugen, können als neuroprotektive Strategien definiert werden (Shoulson 1998). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis eines neuroprotektiven Effektes von STVNA in einem *in vitro* Modell des Schlaganfalls auf cerebEND Zellen der BHS von Mäusen. Neuroprotektive Effekte von STVNA konnten bereits nach zerebraler Ischämie in Ratten (Hu, Sun et al. 2016, Zan, Zhang et al. 2018, Zhang, Lu et al. 2019) und nach Hypoxie in Neuroblastomzellen (Zhong, Lu et al. 2019) nachgewiesenen werden. In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Herstellung von STVNA entwickelt und dessen Wirkung auf die Barrierefunktion, den Glukosetransport und das Zellvolumen direkt, 4 h und 24 h nach 4 h OGD auf cerebEND Zellen untersucht. Als geeignetes *in vitro* Modell des Schlaganfalls wurde das Verfahren der OGD gewählt, in dem sowohl Zellschäden als auch entzündliche Prozesse entstehen und nachgewiesen werden können (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011, Neuhaus, Burek et al. 2012, Neuhaus, Gaiser et al. 2014). CerebEND Zellen wurden für 4 h OGD ausgesetzt und anschließend für 0 h, 4 h und 24 h mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA behandelt. Nach 0 h, 4 h und 24 h Behandlungszeit wurden die jeweiligen Zellen geerntet, aufbereitet und mit den Verfahren Western Blot und qRT-PCR

ausgewertet. Der Behandlungszeitraum von 0 h direkt nach 4 h OGD wurde gewählt um den direkten Effekt des OGD Verfahrens ohne Behandlung mit STVNA nachzuweisen. Die Behandlungszeiträume von 4 h und 24 h wurden gewählt, um einen möglichen Effekt von STVNA innerhalb eines klinisch relevanten Therapiezeitfensters nach einem zerebral ischämischen Ereignis *in vitro* zu überprüfen (Mendelson and Prabhakaran 2021) (JAMA 2021, 325:1088-1098).

4.1 Wirkung von STVNA auf die Expression von Claudin-5 und Occludin

Um einen möglichen Effekt von STVNA auf die Barrierefunktion der BHS nach 4 h OGD nachzuweisen, wurde das Expressionsverhalten der Tight Junction Proteine Claudin-5 und Occludin untersucht. Direkt nach 4 h OGD zeigte sich in der qRT-PCR eine signifikant verminderte Expression von Claudin-5 im Vergleich zur unbehandelten Normoxie Kontrollgruppe (Koto, Takubo et al. 2007, Liu, Wang et al. 2015). 4 h nach 4 h OGD lagen die Expressionslevel von Claudin-5 in der qRT-PCR weiterhin unterhalb der Expressionslevel der Normoxie Kontrollgruppen. Im Western Blot zeigten die Expressionslevel von Claudin-5 4 h nach 4 h OGD eine erhöhte Expression in den mit OGD behandelten Gruppen mit einem Maximum bei 5 mg/l und 10 mg/l STVNA im Vergleich zur unbehandelten OGD Gruppe. Dieses Ergebnis könnte ein möglicher Hinweis auf einen stabilisierenden Effekt von STVNA auf die Expression von Claudin-5 innerhalb der ersten 4 h nach 4 h OGD sein. 24 h nach 4 h OGD kam es zu einem weitgehenden Ausgleich der Expressionslevel der Versuchsgruppen sowohl im Western Blot als auch in der qRT-PCR. Für Occludin konnte direkt nach 4 h OGD eine verminderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Funktion von Occludin innerhalb der BHS kann somit von einer gestörten Barrierefunktion nach OGD ausgegangen werden (Haseloff, Dithmer et al. 2015). 4 h nach 4 h OGD zeigten die Expressionslevel von Occludin ebenfalls eine zu der von Claudin-5 vergleichbare erhöhte Expression bei 5 mg/l und 10 mg/l STVNA im Vergleich zur unbehandelten OGD Gruppe. Da sowohl Occludin als auch Claudin-5 4 h nach 4 h OGD bei einer Konzentration von 5 mg/l und 10 mg/l STVNA erhöhte

Expressionslevel im Vergleich zur unbehandelten OGD Gruppe zeigten, könnte dies ein Hinweis auf einen strukturell und funktionell stabilisierenden Effekt von STVNA in diesem Konzentrationsbereich sein. 24 h nach 4 h OGD kam es bei Claudin-5 und Occludin sowohl im Western Blot als auch in der qRT-PCR zu einem weitgehenden Ausgleich der Expressionlevel. Somit sind erste Effekte von STVNA, wie von Hu, Sun et al. beschrieben, bereits innerhalb einer Behandlungszeit von 4 h zu vermuten (Hu, Sun et al. 2016). Schlaganfälle sind eine häufige Ursache für Todesfälle und schwere Behinderung im Erwachsenenalter. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass irreversible fokale Schädigungen bereits innerhalb weniger Minuten entstehen und nach 6 h vollständig ausgebildet sind (Zivin 1998). Diesbezüglich sollte schnellstmöglich die Diagnostik und Therapie erfolgen. Die Behandlung von ischämischen Schlaganfällen bis 4,5 h nach Symptombeginn mit rtPA zeigt klinische Vorteile (Kim 2019), hat allerdings ein erhöhtes Blutungsrisiko und beeinflusst die Integrität der BHS (Su, Fredriksson et al. 2008).

4.2 Wirkung von STVNA auf die Expression von Integrin $\alpha 1$ und Integrin αv

Das Expressionsverhalten von Integrin $\alpha 1$ und Integrin αv wurde direkt nach 4 h OGD und nach einer Behandlungszeit von 4 h und 24 h mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA nach 4h OGD mittels qRT-PCR untersucht. Integrin αv und Integrin $\alpha 1$ sind von entscheidender Bedeutung für die Integrität der BHS (Defilippi, van Hinsbergh et al. 1991, Su, Atakilil et al. 2012). 4 h und 24 h nach 4h OGD sind in den mit STVNA behandelten cerebEND Zellen neuroprotektive Hinweise in Bezug auf ein verringertes Expressionsverhalten von Integrin αv zu erkennen. Allerdings konnte unter den gewählten Bedingungen weiterhin Integrin αv nachgewiesen werden. Dieser Therapieansatzpunkt sollte durch zukünftige Forschungsprojekte noch weiter untersucht werden. In einem experimentellen Modell des Schlaganfalls konnte eine verringerte Expression von Integrin $\alpha 1$ nachgewiesen werden (Tagaya, Haring et al. 2001). Integrin $\alpha 1$ ist als α -Untereinheit des Hauptkollagenrezeptors Integrin $\alpha 1\beta 1$ auf dem mikrovaskulären Endothel für die Endothelzelladhäsion an den Matrixliganden Kollagen Typ IV

verantwortlich (Defilippi et al., 1991). Somit wäre die Integrität der BHS bei einer verminderten Expression von Integrin $\alpha 1$ gefährdet. In den mit 1 mg/l, 5 mg/l und 10 mg/l STVNA behandelten Zellen 24 h nach 4 h OGD ein erhöhtes Expressionslevel von Integrin $\alpha 1$ festgestellt werden. Dieses Ergebnis weist auf neuroprotektive Effekte von STVNA auf das Expressionsverhalten von Integrin $\alpha 1$ innerhalb von 24h nach OGD hin. Dieser Therapieansatzpunkt sollte ebenfalls durch zukünftige Forschungsprojekte noch weiter untersucht werden.

4.3 Wirkung von STVNA auf den Glukosetransport

GLUT1 ist einer der am häufigsten in Gehirnendothelzellen exprimierte GLUT Transporter (Mueckler and Thorens 2013) und weist während einer Ischämie in mikrovaskulären Endothelzellen der BHS und Glia ein verändertes Expressionsverhalten auf (Espinoza-Rojo, Iturralde-Rodriguez et al. 2010). Mit jedem Glukosemolekül werden von GLUT1 40 Moleküle Wasser transportiert (MacAulay and Zeuthen 2010). Dieser Kotransport von Wasser ist unter anderem verantwortlich für eine Zellschwellung und damit verbundene sekundäre Hirnschädigung nach zerebral ischämischen Ereignissen (Zheng, Romme et al. 2010, Neuhaus, Burek et al. 2012, Wais 2012). Um den Einfluss von STVNA auf den Glukosetransport an der BHS zu untersuchen, wurde das Expressionsverhalten von GLUT1 direkt nach 4 h OGD und nach einer Behandlungszeit von 4 h und 24 h nach 4 h OGD mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA mittels Western Blot und qRT-PCR untersucht. Sowohl im Western Blot als auch in der qRT-PCR war die Expression von GLUT1 direkt nach 4 h OGD erhöht. Dadurch konnte ein abgelaufener Sauerstoff- und Glukosemangel in den cerebEND Zellen nach OGD nachgewiesen werden (Richardson, Knowles et al. 2008, Neuhaus, Burek et al. 2012). Nach einer Behandlungszeit von 4 h nach 4 h OGD mit 20 mg/l STVNA konnte in der qRT-PCR eine verminderte Expression von GLUT1 beobachtet werden. Diese Beobachtung stützt die These eines neuroprotektiven Effektes von STVNA in diesem Konzentrationsbereich. 24 h nach 4 h OGD wurden im Western Blot verminderte Expressionslevel in den mit STVNA behandelten Versuchsgruppen im Vergleich zur unbehandelten OGD Kontrollgruppe gemessen. Dieses Expressionsverhalten ist möglicherweise auf

einen Einfluss von STVNA auf das Expressionsverhalten von GLUT1 zurückzuführen und würde sich ebenfalls in einer reduzierten Zellschwellung aufgrund des verminderten Kotransports von Wasser äußern. Zukünftige Analysen müssten diese Vermutung weiter bestätigen. Nach aktuellem Kenntnisstand wurden die Effekte von STVNA auf das Expressionsverhalten von GLUT1 bisher noch nicht untersucht. Der initial starke Anstieg der GLUT1 Expression direkt nach 4 h OGD in der qRT-PCR nahm im Verlauf bis 24 h deutlich ab. Dieser Rückgang der Expression könnte darauf zurückzuführen sein, dass GLUT1 in diesem Zeitraum von anderen Glukosetransportern wie SGLT 1 und SGLT 2 im Zeitverlauf abgelöst wurde (Wais 2012). Ebenfalls gibt es Veröffentlichungen, die dem Transporter Aquaporin-4 einen größeren Anteil als GLUT1 an der Wasserverteilung bei einem zerebralen Ödem zuschreiben (Ishida, Takemori et al. 2006).

4.4 Wirkung von STVNA auf das Zellvolumen

Für das Verfahren der optischen Volumenmessung wurden cerebEND Zellen für 4 h mit 0, 10 und 20 mg/l STVNA und OGD behandelt und anschließend hinsichtlich ihres Zellvolumens vermessen. Der Verlust der Zellvolumenkontrolle während eines Schlaganfalls ist ein häufig beobachtetes Phänomen, das den Verlust von Zellen insbesondere im Bereich der Penumbra zufolge hat (Wilson and Mongin 2018). Nach 4 h OGD wurde eine im Vergleich zur unbehandelten Normoxie Gruppe signifikante Volumenzunahme gemessen, die auf den Verlust der Zellvolumenkontrolle der cerebEND Zellen hinweist (Kempe 2018). Sowohl die Behandlung mit 10 mg/l als auch mit 20 mg/l STVNA während 4 h OGD bewirkte eine Reduktion des Zellvolumens der cerebEND Zellen, sodass von einem neuroprotektiven Effekt ausgegangen werden kann. Die Zellen der BHS sind von entscheidender Bedeutung für die ZNS Homöostase, da sie für den Schutz des ZNS als Barriere und gleichzeitig für die Nährstoffversorgung des ZNS verantwortlich sind. Bei einem Schlaganfall ist diese Funktion gestört und es kommt zum Eintritt von Noxen und durch parazelluläre Diffusion zur Überwässerung mit Verschiebung von Elektrolytkonzentrationen (Abbott, Patabendige et al. 2010). Die in dieser Arbeit in vitro nachgewiesene

Volumenreduktion der cerebEND Zellen durch STVNA nach OGD würde sich in einem *in vivo* Modell möglicherweise als neuroprotektiver Effekt herausstellen. In einem *in vivo* Modell wäre das intrakranielle Volumen durch den Schädelknochen begrenzt weshalb eine Zellschwellung in Verbindung mit einem Hirnödem zum Anstieg des intrakraniellen Drucks führen würde. Sobald der intrakranielle Druck den Blutdruck übersteigt, kommt es zur Minderperfusion und Druckschädigung von Hirnzellen, die nur für kurze Zeit von den Hirnzellen überlebt werden kann (Larsen and Ziegenfuß 2019). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass irreversible Hirnschäden während einer zerebralen Ischämie bereits nach wenigen Minuten beginnen und nach 6h abgeschlossen sind (Zivin 1998). Ebenso konnte bereits nachgewiesen werden, dass perihämatomale Hirnödeme bei intrakraniellen Blutungen mit einem schlechten Outcome der betroffenen Patienten assoziiert sind (Chen, Chen et al. 2021). Insgesamt unterstützt diese Arbeit die bisher veröffentlichten Ergebnisse zu einem neuroprotektiven Effekt von STVNA (Hu, Sun et al. 2016, Zan, Zhang et al. 2018, Zhong, Lu et al. 2019) während und nach zerebral ischämischen Ereignissen in einem *in vitro* Modell der BHS.

5 Zusammenfassung

Durch Hypoxie und Hypoglykämie sind die Endothelzellen der BHS während einer Ischämie akut vital bedroht. Ein Zusammenbruch der Barrierefunktion der BHS hat lebensbedrohliche Komplikationen zur Folge und ist eine häufige Todesursache. Primär eingetretene Hirnschäden können nicht verhindert werden, weswegen die Behandlung sekundärer Hirnschäden im Vordergrund steht. Eine optimale Therapie zur Behandlung von sekundären Hirnschäden konnte bis heute nicht gefunden werden. Ziel dieser Arbeit war der Nachweis eines neuroprotektiven Effektes von STVNA auf cerebEND Zellen der Maus in einem *in vitro* Modell des Schlaganfalls. Mit dem Verfahren zur Herstellung von STVNA konnte ein reines und im Vergleich zu Isosteviol in Wasser gut lösliches Produkt hergestellt werden, das die Anforderungen an eine Versuchssubstanz in einem *in vitro* Modell voll erfüllen konnte. Als *in vitro* Modell wurde das bereits bewährte Verfahren der OGD gewählt (Kleinschnitz, Blecharz et al. 2011, Neuhaus, Burek et al. 2012, Neuhaus, Gaiser et al. 2014). CerebEND Zellen der Maus wurden für 4 h OGD ausgesetzt und anschließend für 4 h und 24 h mit 0, 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA behandelt. Direkt, 4 h und 24 h nach 4 h OGD wurden die jeweiligen Zellen geerntet und mittels Western Blot und qRT-PCR ausgewertet. Es wurden eine erhöhte Expression der Tight-Junction-Proteine Claudin-5 und Occludin, sowie ein stabilisierendes Expressionsverhalten der Transmembranproteine Integrin $\alpha 1$ und Integrin αv nach Behandlung mit STVNA nachgewiesen. Ebenso wurde eine verminderte Expression des Glukosetransporters GLUT 1 beobachtet. Eine Volumenreduktion der cerebEND Zellen durch STVNA, während 4h OGD und gleichzeitiger Behandlung mit STVNA konnte ebenfalls festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Thesen und Ergebnisse der aktuellen Literatur, dass STVNA neuroprotektive Eigenschaften hat (Hu, Sun et al. 2016, Zan, Zhang et al. 2018, Zhang, Lu et al. 2019, Zhong, Lu et al. 2019). Aufgrund seiner bisher *in vivo* und *in vitro* nachgewiesenen Eigenschaften könnte STVNA sowohl in der klinischen als auch präklinischen Versorgung von zerebral ischämischen Ereignissen neue Therapieansätze ermöglichen und sollte weiter erforscht werden.

6 Literaturverzeichnis:

Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof and D. J. Begley (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." *Neurobiol Dis* 37(1): 13-25.

abm. (2019). "Immortalized Mouse Cerebellar Capillary Endothelial Cells." from [https://www.abmgood.com/Immortalized-Mouse-Cerebellar-Capillary-Endothelial-Cells-\(cerebEND\)--T0291.html](https://www.abmgood.com/Immortalized-Mouse-Cerebellar-Capillary-Endothelial-Cells-(cerebEND)--T0291.html).

Anderson, J. M. and C. M. Van Itallie (2009). "Physiology and function of the tight junction." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(2): a002584.

Andronic, J. (2014). Volumenregulatorische Transportwege von anorganischen und organischen Osmolyten in Säugetierzellen Dissertation.

Andronic, J., R. Shirakashi, S. U. Pickel, K. M. Westerling, T. Klein, T. Holm, M. Sauer and V. L. Sukhorukov (2015). "Hypotonic activation of the myo-inositol transporter SLC5A3 in HEK293 cells probed by cell volumetry, confocal and super-resolution microscopy." *PLoS One* 10(3): e0119990.

Antoni, A., T. Heinz and J. Leitgeb (2017). "Polytrauma und begleitendes Schädel-Hirn-Trauma." *Der Unfallchirurg* 120(9): 722-727.

Beier, C. and S. Hoppe (2011). Traumatische Schäden von Gehirn und Rückenmark. *Neurologie: ... in 5 Tagen*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 43-54.

Burek, M., E. Salvador and C. Y. Forster (2012). "Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model." *J Vis Exp*(66): e4022.

Busch MA, K. R. (2017). 12-Monats-Prävalenz von Schlaganfall oder chronischen Beschwerden infolge eines Schlaganfalls in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2(1): 70 – 76. *Journal of Health Monitoring*.

Campbell, B. C. V., D. A. De Silva, M. R. Macleod, S. B. Coutts, L. H. Schwamm, S. M. Davis and G. A. Donnan (2019). "Ischaemic stroke." *Nature Reviews Disease Primers* 5(1): 70.

Chen, Y., H. Beng, H. Su, F. Han, Z. Fan, N. Lv, A. Jovanovic and W. Tan (2019). "Isosteviol prevents the development of isoprenalineinduced myocardial hypertrophy." *Int J Mol Med*.

Chen, Y., S. Chen, J. Chang, J. Wei, M. Feng and R. Wang (2021). "Perihematomal Edema After Intracerebral Hemorrhage: An Update on Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Advances." *Front Immunol* 12: 740632.

CY, S. E. a. F. (2014). The causal contribution of selective blood-brain barrier to glucose transport in brain edema and function deterioration after ischemia and brain injury. . *Adaptation Biology and Medicine New Developments*. Eds.: L.M. Popescu, A.R. Hargens and P.K. Singal. Narosa Publishing House, New Delhi, 7: 213-220. ISBN: 978-81-8487-274-9.

Defilippi, P., V. van Hinsbergh, A. Bertolotto, P. Rossino, L. Silengo and G. Tarone (1991). "Differential distribution and modulation of expression of alpha 1/beta 1 integrin on human endothelial cells." *J Cell Biol* 114(4): 855-863.

del Zoppo, G. J. and R. Milner (2006). "Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(9): 1966-1975.

DSG. (2019). "Erweiterte Bildgebung verlängert das Zeitfenster für eine Schlaganfalltherapie mittels Lyse – „Jede Minute zählt“ gilt weiterhin." from <https://www.dsg-info.de/presse/pressemitteilungen/528-erweiterte-bildgebung-verlaengert-das-zeitfenster-fuer-eine-schlaganfalltherapie-mittels-lyse-jede-minute-zaehlt-gilt-weiterhin.html>.

Duris, K., Z. Splichal and M. Jurajda (2018). "The Role of Inflammatory Response in Stroke Associated Programmed Cell Death." *Curr Neuropharmacol* 16(9): 1365-1374.

Ehrlich, P. (1885). *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Eine farbenanalytische Studie*, Verlag von August Hirschwald.

Espinoza-Rojo, M., K. I. Iturralde-Rodriguez, M. E. Chanez-Cardenas, M. E. Ruiz-Tachiquin and P. Aguilera (2010). "Glucose transporters regulation on ischemic brain: possible role as therapeutic target." *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 10(4): 317-325.

Ferrazzano, G. F., T. Cantile, B. Alcidi, M. Coda, A. Ingenito, A. Zarrelli, G. Di Fabio and A. Pollio (2015). "Is Stevia rebaudiana Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? A Review." *Molecules* 21(1): E38.

Förster, C. (2008). "Tight junctions and the modulation of barrier function in disease." *Histochem Cell Biol* 130(1): 55-70.

Forster, C., M. Burek, I. A. Romero, B. Weksler, P. O. Couraud and D. Drenckhahn (2008). "Differential effects of hydrocortisone and TNFalpha on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier." *J Physiol* 586(7): 1937-1949.

Forster, C., T. Kahles, S. Kietz and D. Drenckhahn (2007). "Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND." *J Physiol* 580(Pt.3): 937-949.

Förster, C., T. Kahles, S. Kietz and D. Drenckhahn (2007). "Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND." *J Physiol* 580(Pt.3): 937-949.

Forster, C., C. Silwedel, N. Golenhofen, M. Burek, S. Kietz, J. Mankertz and D. Drenckhahn (2005). "Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system." *J Physiol* 565(Pt 2): 475-486.

Fromm, M. (2011). *Transport in Membranen und Epithelien. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie.* R. F. Schmidt, F. Lang and M. Heckmann. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 36-48.

Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin Signaling." *Science* 285(5430): 1028-1033.

Goldberg, M. P. and D. W. Choi (1990). "Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose." *Stroke* 21(11 Suppl): lii75-77.

Greene, C., N. Hanley and M. Campbell (2019). "Claudin-5: gatekeeper of neurological function." *Fluids Barriers CNS* 16(1): 3.

Greene, C., J. Kealy, M. M. Humphries, Y. Gong, J. Hou, N. Hudson, L. M. Cassidy, R. Martiniano, V. Shashi, S. R. Hooper, G. A. Grant, P. F. Kenna, K. Norris, C. K. Callaghan, M. D. Islam, S. M. O'Mara, Z. Najda, S. G. Campbell, J. S. Pachter, J. Thomas, N. M. Williams, P. Humphries, K. C. Murphy and M. Campbell (2018). "Dose-dependent expression of claudin-5 is a modifying factor in schizophrenia." *Mol Psychiatry* 23(11): 2156-2166.

Gwag, B. J., D. Lobner, J. Y. Koh, M. B. Wie and D. W. Choi (1995). "Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro." *Neuroscience* 68(3): 615-619.

Hackenberg, K. and A. Unterberg (2016). "Schädel-Hirn-Trauma." *Der Nervenarzt* 87(2): 203-216.

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

Hoppe K, K. W. (2021). "Schädel-Hirn-Trauma: Pathophysiologie und Notfallmanagement." *Anästh Intensivmed* 2021;62:118–127. DOI: 10.19224/ai2021.118."

Hu, H., X. Sun, F. Tian, H. Zhang, Q. Liu and W. Tan (2016). "Neuroprotective Effects of Isosteviol Sodium Injection on Acute Focal Cerebral Ischemia in Rats." *Oxid Med Cell Longev* 2016: 1379162.

Huttner H. et al., I. D. I., S1-Leitlinie, 2018 in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.* Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 13.04.2020)

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* 110(6): 673-687.

Ishida, H., K. Takemori, K. Dote and H. Ito (2006). "Expression of glucose transporter-1 and aquaporin-4 in the cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive rats in relation to the blood-brain barrier function." *Am J Hypertens* 19(1): 33-39.

Jentsch, T. J. (2016). "VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(5): 293-307.

Kempe, C. (2018). Einfluss der „Oxygen Glucose Deprivation“ (OGD) auf den Glukosetransport in Gehirndothelzellen. Würzburg Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik.

Kim, J. S. (2019). "tPA Helpers in the Treatment of Acute Ischemic Stroke: Are They Ready for Clinical Use?" *J Stroke* 21(2): 160-174.

Klatzo, I. (1967). "Neuropathological Aspects of Brain Edema*." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 26(1): 1-14.

Kleinschnitz, C., K. Blecharz, T. Kahles, T. Schwarz, P. Kraft, K. Gobel, S. G. Meuth, M. Burek, T. Thum, G. Stoll and C. Forster (2011). "Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome." *Stroke* 42(4): 1081-1089.

Koepsell, H. (2017). "The Na⁺-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 are targets for the treatment of diabetes and cancer." *Pharmacology & Therapeutics* 170: 148-165.

Koto, T., K. Takubo, S. Ishida, H. Shinoda, M. Inoue, K. Tsubota, Y. Okada and E. Ikeda (2007). "Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells." *Am J Pathol* 170(4): 1389-1397.

Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Methods* 10(3-4): 203-209.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.

Larsen, R. and T. Ziegenfuß (2019). Schädel-Hirn-Trauma und erhöhter intrakranieller Druck. Pocket Guide Beatmung. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 311-317.

Liu, W. Y., Z. B. Wang, Y. Wang, L. C. Tong, Y. Li, X. Wei, P. Luan and L. Li (2015). "Increasing the Permeability of the Blood-brain Barrier in Three Different Models in vivo." *CNS Neurosci Ther* 21(7): 568-574.

MacAulay, N. and T. Zeuthen (2010). "Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters." *Neuroscience* 168(4): 941-956.

Maegele, M., R. Lefering, O. Sakowitz, M. A. Kopp, J. M. Schwab, W.-I. Steudel, A. Unterberg, R. Hoffmann, E. Uhl and I. Marzi (2019). "Inzidenz und Versorgung des mittelschweren bis schweren Sch%odel-Hirn-Traumas." *Dtsch Arztebl International* 116(10): 167-173.

Maher, F., S. J. Vannucci and I. A. Simpson (1994). "Glucose transporter proteins in brain." *Faseb j* 8(13): 1003-1011.

Mendelson, S. J. and S. Prabhakaran (2021). "Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack and Acute Ischemic Stroke: A Review." *Jama* 325(11): 1088-1098.

Momtazi-Borojeni, A. A., S. A. Esmaeili, E. Abdollahi and A. Sahebkar (2017). "A Review on the Pharmacology and Toxicology of Steviol Glycosides Extracted from *Stevia rebaudiana*." *Curr Pharm Des* 23(11): 1616-1622.

Mueckler, M. and B. Thorens (2013). "The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters." *Mol Aspects Med* 34(2-3): 121-138.

Musuka, T. D., S. B. Wilton, M. Traboulsi and M. D. Hill (2015). "Diagnosis and management of acute ischemic stroke: speed is critical." *Cmaj* 187(12): 887-893.

Neuhaus, W., M. Burek, C. S. Djuzenova, S. C. Thal, H. Koepsell, N. Roewer and C. Y. Forster (2012). "Addition of NMDA-receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the upregulation of glucose uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells." *Neurosci Lett* 506(1): 44-49.

Neuhaus, W., F. Gaiser, A. Mahringer, J. Franz, C. Riethmüller and C. Förster (2014). "The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier." *Front Cell Neurosci* 8: 352.

Pan, R., K. Yu, T. Weatherwax, H. Zheng, W. Liu and K. J. Liu (2017). "Blood Occludin Level as a Potential Biomarker for Early Blood Brain Barrier Damage Following Ischemic Stroke." *Scientific Reports* 7(1): 40331.

Park, Y. K. and Y. Goda (2016). "Integrins in synapse regulation." *Nat Rev Neurosci* 17(12): 745-756.

Richardson, S. M., R. Knowles, J. Tyler, A. Mobasheri and J. A. Hoyland (2008). "Expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-3, GLUT-9 and HIF-1alpha in normal and degenerate human intervertebral disc." *Histochem Cell Biol* 129(4): 503-511.

Sastry, S. K. and A. F. Horwitz (1996). "Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response." *Dev Biol* 180(2): 455-467.

Schubert, F. and W. Lalouschek (2006). Schlaganfall. *Klinische Neuropsychologie: Grundlagen — Diagnostik — Rehabilitation*. J. Lehrner, G. Pusswald, E. Fertl, I. Kryspin-Exner and W. Strubreither. Vienna, Springer Vienna: 303-314.

Sebastiani, A., F. Greve, C. Gölz, C. Y. Förster, H. Koepsell and S. C. Thal (2018). "RS1 (Rsc1A1) deficiency limits cerebral SGLT1 expression and delays brain damage after experimental traumatic brain injury." *J Neurochem* 147(2): 190-203.

Shoulson, I. (1998). "DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism." *Ann Neurol* 44(3 Suppl 1): S160-166.

Silwedel, C. and C. Forster (2006). "Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli." *J Neuroimmunol* 179(1-2): 37-45.

Simard, J. M., T. A. Kent, M. Chen, K. V. Tarasov and V. Gerzanich (2007). "Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications." *Lancet Neurol* 6(3): 258-268.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.

Steudel, W. I., F. Cortbus and K. Schwerdtfeger (2005). "Epidemiology and prevention of fatal head injuries in Germany--trends and the impact of the reunification." *Acta Neurochir (Wien)* 147(3): 231-242; discussion 242.

Su, E. J., L. Fredriksson, M. Geyer, E. Folestad, J. Cale, J. Andrae, Y. Gao, K. Pietras, K. Mann, M. Yepes, D. K. Strickland, C. Betsholtz, U. Eriksson and D. A. Lawrence (2008). "Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke." *Nat Med* 14(7): 731-737.

Su, G., A. Atakilit, J. T. Li, N. Wu, M. Bhattacharya, J. Zhu, J. E. Shieh, E. Li, R. Chen, S. Sun, C. P. Su and D. Sheppard (2012). "Absence of integrin $\alpha\beta3$ enhances vascular leak in mice by inhibiting endothelial cortical actin formation." *Am J Respir Crit Care Med* 185(1): 58-66.

Sun, Y., Y. Zeng, Y. Zhu, F. Feng, W. Xu, C. Wu, B. Xing, W. Zhang, P. Wu, L. Cui, R. Wang, F. Li, X. Chen and Z. Zhu (2014). "Application of (68)Ga-PRGD2 PET/CT for $\alpha\beta3$ -integrin imaging of myocardial infarction and stroke." *Theranostics* 4(8): 778-786.

Tagaya, M., H. P. Haring, I. Stuver, S. Wagner, T. Abumiya, J. Lucero, P. Lee, B. R. Copeland, D. Seiffert and G. J. del Zoppo (2001). "Rapid loss of microvascular integrin expression during focal brain ischemia reflects neuron injury." *J Cereb Blood Flow Metab* 21(7): 835-846.

Teasdale, G. and B. Jennett (1974). "Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale." *Lancet* 2(7872): 81-84.

Thirugnanachandran, T., H. Ma, S. Singhal, L. A. Slater, S. M. Davis, G. A. Donnan and T. Phan (2018). "Refining the ischemic penumbra with topography." *Int J Stroke* 13(3): 277-284.

Wais, S. (2012). Die Rolle der Glukosetransporter an der Blut-Hirn-Schranke nach einem Schädel-Hirn-Trauma und deren eventueller Einfluss auf die Entwicklung eines sekundären Hirnödems, Universität Würzburg.

Whitehead, T. P., L. J. Kricka, T. J. Carter and G. H. Thorpe (1979). "Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory." *Clin Chem* 25(9): 1531-1546.

Wilson, C. S. and A. A. Mongin (2018). "Cell Volume Control in Healthy Brain and Neuropathologies." *Curr Top Membr* 81: 385-455.

Wright, E. M., D. D. Loo and B. A. Hirayama (2011). "Biology of human sodium glucose transporters." *Physiol Rev* 91(2): 733-794.

Yew, K. S. and E. M. Cheng (2015). "Diagnosis of acute stroke." *Am Fam Physician* 91(8): 528-536.

Yin, C., Y. Chen, H. Wu, D. Xu and W. Tan (2017). "Attenuation of ischemia/reperfusion-induced inhibition of the rapid component of delayed rectifier potassium current by Isosteviol through scavenging reactive oxygen species." *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859(12): 2447-2453.

Zan, J., H. Zhang, M. Y. Lu, H. M. Beng, K. L. Zhong, X. O. Sun and W. Tan (2018). "Isosteviol sodium injection improves outcomes by modulating TLRs/NF-kappaB-dependent inflammatory responses following experimental traumatic brain injury in rats." *Neuroreport* 29(10): 794-803.

Zhang, H., M. Lu, X. Zhang, Y. Kuai, Y. Mei, Q. Tan, K. Zhong, X. Sun and W. Tan (2019). "Isosteviol Sodium Protects against Ischemic Stroke by Modulating Microglia/Macrophage Polarization via Disruption of GAS5/miR-146a-5p sponge." *Sci Rep* 9(1): 12221.

Zheng, P. P., E. Romme, P. J. van der Spek, C. M. Dirven, R. Willemsen and J. M. Kros (2010). "Glut1/SLC2A1 is crucial for the development of the blood-brain barrier in vivo." *Ann Neurol* 68(6): 835-844.

Zhong, K. L., M. Y. Lu, F. Liu, Y. Mei, X. J. Zhang, H. Zhang, J. Zan, X. O. Sun and W. Tan (2019). "Isosteviol Sodium Protects Neural Cells Against Hypoxia-

Induced Apoptosis Through Inhibiting MAPK and NF- κ B Pathways." *J Stroke Cerebrovasc Dis* 28(1): 175-184.

Zivin, J. A. (1998). "Factors determining the therapeutic window for stroke." *Neurology* 50(3): 599-603

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Gradcelsius
a.d.	aqua ad iniectabilia
Abb.	Abbildung
AJ	Adherens Junction
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cEND	Mikrovaskuläre endotheliale Zelllinie aus der Großhirnrinde von Mäusen
cerebEND	Mikrovaskuläre endotheliale Zelllinie aus der Kleinhirnrinde von Mäusen
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm
G	Gravitationsbeschleunigungen
GLUT1	Glucosetransporter1
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
ICP	Intrakranieller Druck
JAM	Junctional adhesion molecule/ junktionale Adhäsionsmoleküle
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter
M	Molar

MDB	Membrane Desalting Buffer
MEM	Minium Essential Medium
MHBA	Master of Health Business Administration
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
NaOH	Natriumhydroxid
NEA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
NMR	Kernspinresonanzspektrometri
NORM	Normoxie
O ₂	Sauerstoff
OGD	Oxygen-Glucose-Deprivation
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDMS	Polymethylsiloxan
pH	pondus Hydrogenii
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluoride
ppm	parts per million
Prof.	Professor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
rDNase	rekombinante Desoxyribonuklease
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rtPA	recombinant tissue Plasminogen Activator
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate= Natriumlaurylsulfat
sek.	Sekunde
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
STVNA	Isosteviol-Natrium
t	Zeit
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
THF	Tetrahydrofuran
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminoethan
Tween 20	Polyethylen-Sorbitan-Monolaurat
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Groth Factor

x	Mal
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO1	Zona occludens1
ZO2	Zona occludens2
ZO3	Zona occludens3
β-ME	β-Mercaptoethanol
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke ...	3
Abbildung 2: Schematische Grafik zum Aufbau der Tight Junctions der BHS	5
Abbildung 3: Formel zur Herstellung von STVNA.....	15
Abbildung 4: NMR STVNA.....	16
Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer PDMS-Kammer	26
Abbildung 6: Western Blot und desitometrische Analyse von Claudin-5 nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C).....	28
Abbildung 7: Western Blot von Claudin-5 und β-Actin Kontrolle direkt nach 4 h OGD (A) und einer anschließenden Behandlung mit 0 (k), 1, 5, 10 und 20 mg/l STVNA 4 h nach 4 h OGD (B) und 24 h nach 4 h OGD (C) k=Kontrolle.....	28
Abbildung 8: Western Blot und desitometrische Analyse von Occludin nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C).....	30
Abbildung 9: Western Blot von Occludin und β-Actin Kontrolle direkt nach 4 h OGD (A) und einer anschließenden Behandlung mit 0 (k), 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA 4 h nach 4 h OGD (B) und 24 h nach 4 h OGD (C) k=Kontrolle.....	30

Abbildung 10: Western Blot und desitometrische Analyse von GLUT1 nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C).....	31
Abbildung 11: Western Blot von GLUT1 und β -Actin Kontrolle direkt nach 4 h OGD (A) und einer anschließenden Behandlung mit 0 (k), 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA 4 h nach 4 h OGD (B) und 24 h nach 4 h OGD (C) k=Kontrolle.....	31
Abbildung 12: qRT-PCR von Claudin-5 nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C).....	33
Abbildung 13: qRT-PCR von Integrin α 1 und Integrin α v nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C).....	34
Abbildung 14: qRT-PCR von GLUT1 nach 4 h OGD (A) und anschließender Behandlung mit 0, 1, 5, 10, 20 mg/l STVNA für 4 h (B) und 24 h (C).....	35
Abbildung 15: Optische Volumenmessung von cerebEND Zellen nach 4 h OGD und gleichzeitiger Behandlung mit 10 mg/l und 20 mg/l STVNA	37

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Substanzen.....	10
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	11
Tabelle 3: Verwendetes Material	12
Tabelle 4: Verwendete Western Blot Antikörper.....	13
Tabelle 5: Verwendete qRT-PCR Antikörper.....	14
Tabelle 6: Verwendete Kits.....	14
Tabelle 7: Zusammensetzung des Zellkulturmediums	14
Tabelle 8: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums.....	14

Tabelle 9: Verwendetes OGD Medium	14
Tabelle 10: Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers	20
Tabelle 11: Zusammensetzung des Trenngels (12 %).....	20
Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels.....	20
Tabelle 13: Zusammensetzung des RIPA-Puffers.....	21
Tabelle 14: Zusammensetzung des 4X Lämmli-Puffers	21
Tabelle 15: Zusammensetzung der ECL I Lösung	22
Tabelle 16: Zusammensetzung der ECL II Lösung	22
Tabelle 17: Zusammensetzung des Runningpuffers 10X (pH 8,8-9,2).....	23
Tabelle 18: Zusammensetzung des Transferpuffers	23
Tabelle 19: Zusammensetzung für 6,8 µl Mastermix.....	25

10 Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. C. Förster für die Bereitstellung und Betreuung meiner Promotionsarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. med. C. Wunder danke ich für die Betreuung meiner Arbeit als Zweitgutachter und Herrn Prof. Dr. med. M. Löhr für die Betreuung als Drittgutachter.

Ebenfalls möchte ich Frau E. Wilken, Frau A. Neuhoff, Frau PD Dr. rer. nat. M. Burek und Frau Dr. E. Salvador für die stets geduldige und professionelle Unterstützung bei methodischen Fragen danken.

Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe, Herrn PD Dr. V. Soukhoroukov, Paul Güntzel und Christoph Kempe danke ich für die Kooperationen, ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich meiner Familie und Pauline danken, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben.

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde der Lebenslauf entfernt.

12 Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Publikation

Rösing N, Salvador E, Güntzel P, Kempe C, Burek M, Holzgrabe U, Soukhoroukov V, Wunder C, Förster C. Neuroprotective Effects of Isosteviol Sodium in Murine Brain Capillary Cerebellar Endothelial Cells (cerebEND) After Hypoxia. *Front Cell Neurosci.* 2020 Oct 28;14:573950. doi: 10.3389/fncel.2020.573950. PMID: 33192319; PMCID: PMC7655651.

Kongressteilnahmen

3rd Mini-Symposium on The Blood-Brain Barrier from Basic to Clinical Research
Venue: Big Heart Izumo Cultural Hall, Izumo, Shimane, Japan Organizer:
Kentaro Hayashi Advanced Stroke Center Shimane University Hospital March
26th (Fri) & 27th (sat), 2021