

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Patrick Meybohm

**Veränderte Barriereigenschaften der Blut-Hirn-Schranke durch Katecholamine
und Entzündungsmediatoren bei Sauerstoff-Glucose-Entzug *in vitro***

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Cora Ittner

aus Nürnberg

Würzburg, Januar 2023

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

Korreferent: Professor Dr. med. Stefan Störk

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

Diese Arbeit widme ich meinem Bruder Paul.

Dank dir bin ich Ärztin geworden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Blut-Hirn-Schranke	1
1.1.1	Barrierefunktion.....	1
1.1.2	Alterationen der Barriere bei Ischämie und (Neuro-)Inflammation	3
1.2	Takotsubo-Kardiomyopathie	6
1.2.1	Klinik und Pathophysiologie	6
1.2.2	Ischämischer Insult und Takotsubo-Syndrom	9
1.3	Ziel der Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Geräte und Software	11
2.1.2	Substanzen, Puffer und Lösungen	13
2.1.3	Verbrauchsmaterial.....	15
2.1.4	Antikörper.....	17
2.1.5	Real-time RT-PCR-Sonden	18
2.1.6	Labor Kits	18
2.2	Zellkultur	19
2.2.1	Kultivierung von cEND-Zellen <i>in vitro</i>	19
2.2.2	Behandlungsschemata bei Normoxie <i>in vitro</i>	21
2.2.3	Sauerstoff-Glucose-Entzug und Reoxygenierung <i>in vitro</i>	23
2.3	Biochemische Analysen	25
2.3.1	Western Blot.....	25
2.3.1.1	Herstellung von Proteinproben.....	26
2.3.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	27
2.3.1.3	Transfer-Blot	27
2.3.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	29

2.4	Molekularbiologische Analysen	31
2.4.1	Isolation der Ribonukleinsäure	31
2.4.2	cDNA-Herstellung mittels reverser Transkription	31
2.4.3	Quantitative real-time RT-PCR	32
2.5	Statistische Analyse	33
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Veränderungen von cEND-Zellen nach separater Exposition gegenüber Katecholaminen und Entzündungsmediatoren bei Normoxie <i>in vitro</i>	33
3.1.1	Zellmorphologie nach Applikation von Katecholaminen/Entzündungsmediatoren	34
3.1.2	Proteinlevels nach Applikation von Katecholaminen/Entzündungsmediatoren	35
3.1.3	Genexpression nach Applikation von Katecholaminen/Entzündungsmediatoren	38
3.2	Veränderungen von cEND-Zellen durch Exposition gegenüber Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen <i>in vitro</i>	39
3.2.1	Zellmorphologie nach Applikation von Stressfaktoren.....	39
3.2.2	Proteinlevels nach Applikation von Stressfaktoren.....	43
3.2.3	Genexpression nach Applikation von Stressfaktoren.....	47
3.3	Effekte einer Östrogen-Behandlung auf cEND-Zellen <i>in vitro</i>	52
3.3.1	Veränderungen von cEND-Zellen nach getrennter Applikation von Katecholaminen und Entzündungsmediatoren bei Normoxie unter Östrogen- Behandlung.....	52
3.3.1.1	Zellmorphologie	52
3.3.1.2	Proteinlevels	54
3.3.1.3	Genexpression	57
3.3.2	cEND-Zellen nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung	59

3.3.2.1	Zellmorphologie	59
3.3.2.2	Proteinexpression.....	64
3.3.2.3	Genexpression	69
3.4	Ergebnis-Übersichten der untersuchten Protein- und Genexpression	75
4	Diskussion.....	78
4.1	Verwendetes <i>in vitro</i> Modell	78
4.2	Katecholamine und Entzündungsmediatoren bei Normoxie	80
4.3	Sauerstoff-Glucose-Entzug und Reoxygenierung	85
4.4	Östrogen-Behandlung.....	94
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	101

1 Einleitung

1.1 Blut-Hirn-Schranke

1.1.1 Barrierefunktion

Das zentrale Nervensystem (ZNS) hat bezüglich des Schutzes seiner Homöostase eine Sonderstellung im Körper. Diese wird durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) gewährleistet: es handelt sich um eine biologische Barriere zwischen dem das Gehirn perfundierenden Blut sowie dem ZNS selbst. Die BHS ermöglicht die Regulation und Aufrechterhaltung einer geeigneten Mikroumgebung für die unbeeinträchtigte Funktion des Nervengewebes (1, 2). Es handelt sich vorwiegend um eine Diffusionsbarriere für hydrophile Moleküle: es erfolgt keine unselektive Exposition gegenüber im Blut zirkulierenden, potenziell neuroaktiven Substanzen (3). Im ZNS benötigte Stoffe werden mittels spezialisierter Transportsysteme zwischen Blut und Nervengewebe transferiert (4).

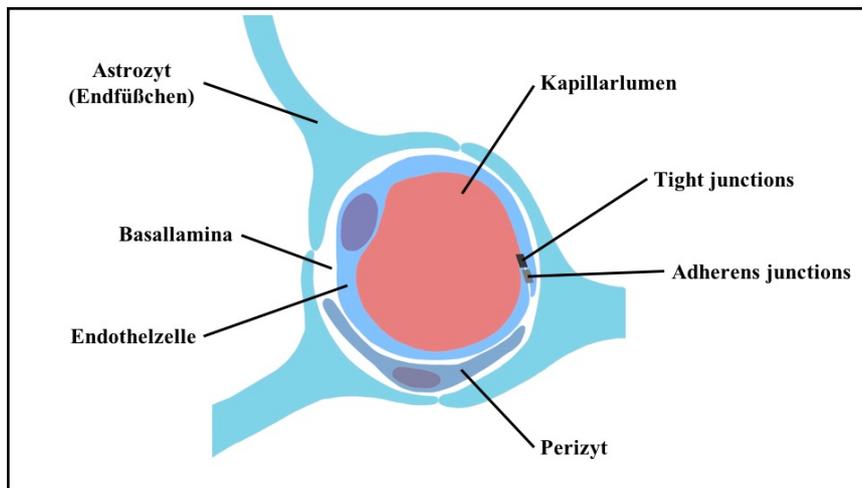


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Gezeigt sind die einzelnen Komponenten der BHS. Die luminal Schicht wird durch Endothelzellen gebildet. Tight junctions sowie Adherens junctions fungieren als Zell-Zell-Verbindungen dieser und somit als parazelluläre Diffusionsbarriere. Das Endothel wird kontinuierlich von der Basallamina umgeben, in welche Perizyten eingebettet sind. Endfüßchen von Astrozyten ummanteln alle Komponenten. Eigene Abbildung, modifiziert nach (1-3, 5).

Morphologisch ist die BHS ein mehrschichtiges Konstrukt, welches als Gesamtes die Barriere zwischen zerebraler Mikrozirkulation und Nervengewebe darstellt (s. Abb. 1).

Die innere, dem Blutmilieu somit unmittelbar angrenzende Schicht, wird durch kontinuierliches Endothel gebildet (6, 7). Hier kleidet jede einzelne Endothelzelle den gesamten Umfang der Kapillare aus. Den Endothelzellen sitzen diskontinuierlich Perizyten auf. Kontinuierlich umgeben werden Endothelzellen sowie Perizyten durch die Basallamina. Hier handelt es sich um extrazelluläre Matrix, welche unter anderem Kollagen Typ IV, Laminin und Fibrillin enthält (4). Die Endothelzellen sind, neben weiteren Adhäsionsmolekülen, über Integrine mit der Basallamina konnektiert (8). Integrine sind Heterodimere aus je einer α - sowie β -Untereinheit, welche transmembran lokalisiert sind und unter anderem an Bestandteile der Extrazellulärmatrix binden (9). Insgesamt umschließen Endfüßchen von Astrozyten alle beschriebenen Komponenten der BHS (2, 5).

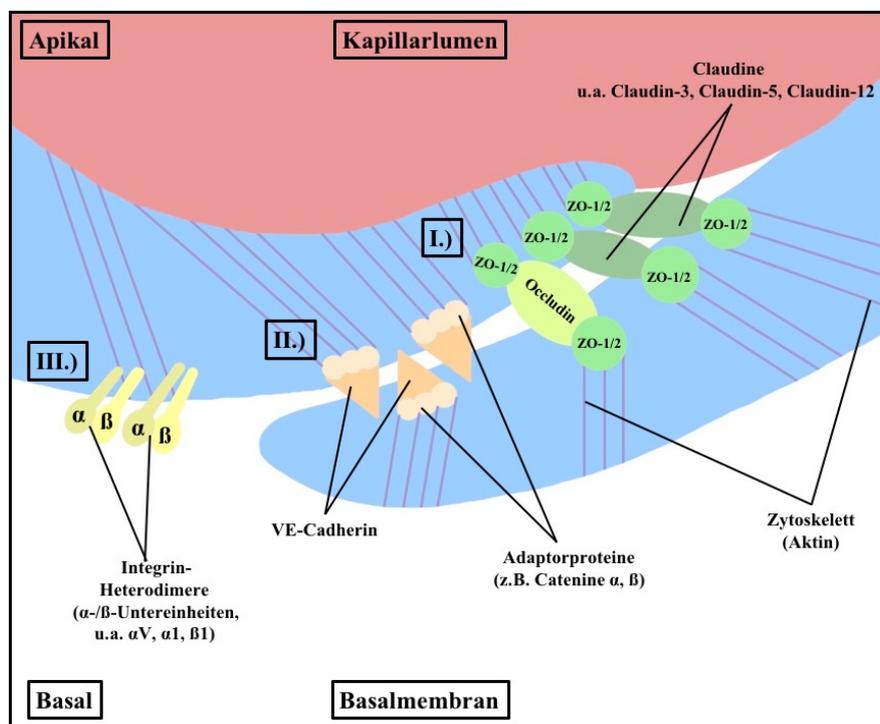


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tight junctions, Adherens junctions und Integrine

Übersicht der endothelialen Zell-Zell-Verbindungen der BHS. I.) Tight junctions: Claudine (u.a. Claudin-3, -5 und -12) sowie Occludin fungieren als Transmembranproteine, welche über Zonula-Occludens-Proteine (ZO-1/2) an das Zytoskelett gekoppelt sind. II.) Adherens junctions: VE-Cadherin durchspannt als Transmembrankomponente die Zellmembran und ist intrazellulär über Adaptorproteine (z.B. Catenine) mit dem Zytoskelett verbunden. III.) Integrine: α - sowie β -Untereinheit der Integrin-Heterodimere durchspannen die Zellmembran, bilden Heterodimere und dienen als Adhäsionsmoleküle für verschiedene Liganden. Eigene Abbildung, modifiziert nach (1, 5, 8, 10).

Essentiell zur Aufrechterhaltung der BHS sind die Zell-Zell-Verbindungen der Endothelzellen (11) (s. Abb. 2). Diese werden apikal durch Tight junctions sowie basal durch Adherens junctions gebildet (1). Es handelt sich um eine Art „Protein-Klettverschluss“. Die unselektive parazelluläre Passage im Blut gelöster Substanzen wird durch diesen verhindert (5). Unter Tight junctions, auch Zonula occludens genannt (8), werden verschiedene Proteine subsummiert, welche interagieren und in ihrer Gesamtheit eine effektive Barriere schaffen. Transmembranproteine durchspannen die Zellmembran und sind über Adaptorproteine mit dem Zytoskelett gekoppelt (1). Wichtige Vertreter der Transmembranproteine sind Claudin-5, Claudin-12 und Occludin, wobei als Adaptoren die Zonula-Occludens-Proteine ZO-1 sowie ZO-2 genannt werden können (5). Basal der Tight junctions befinden sich, zur mechanischen Unterstützung dieser, Adherens junctions (8). Hier bildet das Vascular-Endothelial-Cadherin (VE-Cadherin) die Transmembrankomponente und bindet über mehrere Adaptormoleküle ebenfalls an das Zytoskelett (5). Insgesamt sind die Endothelzellen der zerebralen Mikrozirkulation über den beschriebenen zweistufigen „Protein-Klettverschluss“ fest miteinander „vernietet“.

1.1.2 Alterationen der Barriere bei Ischämie und (Neuro-)Inflammation

Die suffiziente Funktion des ZNS hängt maßgeblich von der Integrität der BHS ab (11). Insgesamt ist diese ein komplexes und zugleich hocheffektives Barriersystem. Die Vulnerabilität gegenüber variablen Noxen kann einen BHS-Zusammenbruch mit weitreichenden Folgen für das ZNS verursachen. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, Alterationen der einzelnen BHS-Komponenten unter pathologischen Bedingungen zu betrachten.

85% aller Schlaganfälle sind ischämischer Genese und überwiegen somit deutlich den hämorrhagischen Insult (12, 13). Global betrachtet handelt es sich um ein häufiges und bedeutsames Krankheitsbild: im Jahr 2016 war der ischämische Hirninfarkt, nach der ischämischen Herzkrankheit, die weltweit häufigste Todesursache (14). Pathophysiologisch liegt der akuten zerebralen Ischämie die Okklusion einer das Hirn perfundierenden Arterie zu Grunde (15). Dies führt zur unmittelbaren Unterbrechung der zerebralen Sauerstoff- sowie Glucose-Versorgung (13). Der arterielle Verschluss kann durch variable pathophysiologische Mechanismen bedingt sein. Beispiele sind die Entstehung auf dem Boden einer Arteriosklerose mit konsekutiver Thrombusbildung oder

das Einschweben eines Blutgerinnsels (12). Hier sei die Embolie kardialer Genese bei Vorhofflimmern genannt (16). Letztlich führen Energie- und Sauerstoffmangel im betroffenen Hirnareal zum neuronalen Zelltod (12). Das den irreversibel geschädigten „Kern“ umgebende Gewebe wird als Penumbra bezeichnet und ist in der Akutsituation noch reversibel durch die vorherrschende Ischämie kompromittiert (17). Die Penumbra ist das Zielgewebe der aktuell als Goldstandard geltenden Reperfusionstherapie (18).

Im Folgenden werden die Zell-Zell-Verbindungen der BHS unter ischämischen Bedingungen sowie bei Inflammation betrachtet. Die Öffnung der BHS im Rahmen einer induzierten Ischämie wurde mehrfach durch *in vivo* Experimente gezeigt, wobei als Versuchstiere Ratten sowie Mäuse verwendet wurden (19-25). Der BHS-Kollaps und die hieraus resultierende Störung der ZNS-Homöostase bei einem ischämischen Insult kann zu einer aggravierten Schädigung des zentralen Nervengewebes führen (26). Ferner ergibt sich durch den Barriere-Zusammenbruch sowohl das Risiko eines vasogenen Hirnödems als auch der Transformation des Insults von ischämisch zu hämorrhagisch (13, 26). Die BHS wird auf verschiedenen Ebenen kompromittiert: Durch den ischämisch bedingten Energiemangel können die Endothelzellen die Homöostase der Ionen-Flüsse zwischen Intra- und Extrazellulärraum nicht aufrechterhalten, was in einem zytotoxischen Ödem resultiert. Integrine, die das Endothel physiologisch mit der Extrazellulärmatrix der Basalmembran verbinden (8), sowie Tight junctions und Adherens junctions werden in ihrer Funktion beeinträchtigt. Es folgt eine unkontrollierte parazelluläre Passage (13, 26). Dies spiegelt sich *in vitro* in einer sinkenden transendothelialen elektrischen Resistenz (TER) eines Monolayers zerebraler Endothelzellen nach Hypoxie wider (27). Die zerebrale Ischämie aktiviert Mikroglia sowie Astrozyten, woraus eine Neuroinflammation resultiert (28). In deren Rahmen werden proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet (26, 28). Als Beispiele dieser Zytokin-Familie werden der Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) sowie Interleukin-6 genauer betrachtet: *In vitro* zeigten die mit TNF- α behandelten murinen Endothelzell-Linien cEND sowie cerebEND, cerebraler beziehungsweise cerebellärer Genese, sowohl eine herabgesetzte Gen- sowie Proteinexpression von Claudin-5 und Occludin als auch eine verminderte TER des Zellmonolayers (29, 30). Weiter beeinflusste TNF- α die Genexpression von Integrinen: Integrine sind Heterodimere aus einer α - sowie β -Untereinheit (9). Beispielhaft sei das endothelial exprimierte Heterodimer Integrin- α V β 3 genannt, welches unter anderem

Fibrinogen, von Willebrand Faktor und Vitronectin bindet (9, 31). Über die Interaktion mit Integrin- α V β 3 vermittelt Vitronectin die Zellmigration sowie -adhäsion und ist in den Prozess der Angiogenese eingebunden (32, 33). *In vitro* wurde die Integrinuntereinheit- α V nach TNF- α Applikation hochreguliert (30). Die Integrinuntereinheit- α 1 hingegen, Teil des Kollagen Typ IV und Laminin bindenden Integrin- α 1 β 1 (9), wurde vermindert exprimiert (30). Ebenfalls wurde *in vitro* gezeigt, dass Interleukin-6 die Gen- sowie Proteinexpression von Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin sowie die TER von Endothelzellen relevant reduziert (34). Auch Sauerstoff- und Glucoseentzug *in vitro* setzten die TER herab (20). Ferner wurden Occludin, Claudin-5 und ZO-1 nach simulierter Ischämie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vermindert exprimiert (19, 35, 36). Neben der ischämisch induzierten Neuroinflammation kann ein bestehendes systemisches Entzündungsgeschehen die Auswirkungen eines Insults verstärken: *In vivo* wurde gezeigt, dass systemisch applizierte proinflammatorische Zytokine bei simultaner Induktion einer zerebralen Ischämie das Volumen des Infarktareals, das konsekutive Hirnödeme sowie das resultierende neurologische Defizit deutlich aggravierten. Des Weiteren wurde, verglichen mit der alleinigen Ischämie, eine durch die Inflammation reduzierte Claudin-5-Expression detektiert (37). Die strukturelle BHS-Schädigung durch eine systemische Entzündung ist auch unabhängig von einem Infarktgeschehen bekannt (38, 39). Es wurde eine verringerte Expression der Junctionsproteine Claudin-5, Occludin und ZO-1 sowie die Apoptose-Induktion der Endothelzellen gezeigt (40).

Neben den experimentellen Ergebnissen konnten bei Patient:innen mit ischämischen Insult unter anderem erhöhte Occludin-Level sowie zirkulierende Endothelzellen der zerebralen Mikrozirkulation im peripheren Blut nachgewiesen werden. Hier handelt es sich um mögliche Korrelate eines ischämisch bedingten BHS-Schadens. Insbesondere Occludin könnte als zukünftiger Biomarker in Blutproben für einen Zusammenbruch der BHS dienen (41). Die beeinträchtigte BHS-Integrität kann ebenfalls bildmorphologisch sowohl mittels Computer- als auch Magnetresonanztomographie detektiert werden. Nach intravenöser Applikation von Kontrastmittel wird die Extravasation dessen in das umliegende Hirngewebe als Korrelat einer BHS-Schädigung apparent (13). Auch bei Patient:innen, welche im Rahmen einer Sepsis neu aufgetretene kognitive Störungen präsentierten, konnten in der Magnetresonanztomographie eine erhöhte Durchlässigkeit

der BHS beobachtet werden (42). Der Barriere-Zusammenbruch durch eine systemische Entzündung wurde somit ebenso mittels Bildgebung gezeigt.

Zusammenfassend ist die Alteration der BHS als wichtige Komponente des pathophysiologischen Prozesses im Rahmen eines ischämischen Insults zu betrachten. Inflammatorische Vorgänge, sowohl lokal als auch systemisch, können die biologische Barriere weiter kompromittieren und zentralnervöse Schäden aggravierern.

1.2 Takotsubo-Kardiomyopathie

1.2.1 Klinik und Pathophysiologie

Klinisch präsentiert sich die Takotsubo-Kardiomyopathie (TKM) ähnlich einem akuten Koronarsyndrom (ACS) mit plötzlich einsetzenden Symptomen wie Thoraxschmerzen, Dyspnoe, Übelkeit und/oder einer kardiogenen Synkope (43). Es ist jedoch keine koronarangiographisch nachweisbare, relevante Stenose der Koronararterien ursächlich (44). Es liegt eine Ischämie des Myokards vor (45), welche allerdings nicht deutlich dem Versorgungsgebiet einer Koronararterie zugeordnet werden kann (46). Circa 2% aller im Rahmen einer notfallmäßigen Koronarangiographie behandelten ACS werden final als Takotsubo-Syndrom (TTS) diagnostiziert (47). Im Elektrokardiogramm können infarkttypische Alterationen wie ST-Strecken-Hebungen auftreten (43). Während eines TTS zeigt das Herz eine transiente linksventrikuläre Dysfunktion mit reduzierter Ejektionsfraktion (48). Bei über 80% ist der linke Ventrikel systolisch apikal balloniert (43, 46). Eine daraus resultierende Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes ist möglich (46, 49). Mittels Echokardiographie, Kardio-Magnetresonanztomographie oder Lävokardiographie kann dieses charakteristische Bild der apikalen Ballonierung nachgewiesen werden (44, 48). Seltener betrifft die kinetische Dysfunktion den rechten Ventrikel (46). Während sich bildmorphologisch eine ausgedehnte kardiale Wandbewegungsstörung zeigt, ist laborchemisch, im Vergleich zu einem Myokardinfarkt, allenfalls ein mäßiger Anstieg der Biomarker eines akuten Myokardschadens detektierbar (43, 47).

Lückenlos beschrieben ist die Ätiologie der TKM bisher nicht (49). Insgesamt wird aktuell ein Zusammenspiel aus systemischem Katecholaminesturm, Östrogenmangel und einem auslösenden Stressor angenommen (50). Patient:innen mit TKM zeigten, verglichen mit dem Patient:innenkollektiv des ACS, signifikant erhöhte Plasma-

Katecholaminlevels im Sinne gesteigerter Noradrenalin-, Adrenalin- und Dopaminkonzentrationen (47). Bei etwa zwei Drittel der Erkrankten konnte ein vorausgehender physischer und/oder psychischer Stressor ermittelt werden (43). Hier seien beispielhaft größere Operationen, Chemotherapien, Infektionen oder emotionale Trigger genannt (47, 49, 51, 52). Aus diesem Grund wird die TKM auch als Syndrom des gebrochenen Herzens („broken heart syndrome“) bezeichnet (49). Auf den Organismus einwirkender Stress führt zur komplexen Aktivierung des zentralen sowie autonomen Nervensystems, was schließlich in einer gesteigerten Katecholamin-Ausschüttung resultiert. Dies kann sowohl systemisch als auch lokal an kardialen Nervenendigungen der sympathischen Innervation stattfinden (47). Über gesteigerte Katecholaminlevels werden aktuell diverse Aspekte der bekannten Pathogenese des TTS erklärt: Die apikale Ballonierung scheint aus der Verteilung myokardialer β -Adrenozeptoren zu resultieren. Es konnte gezeigt werden, dass β_1 -Rezeptoren quantitativ vermehrt basal vertreten sind, wobei apikal β_2 -Rezeptoren überwiegen (53). Zwar werden β_2 -Rezeptoren nicht primär in Kardiomyozyten exprimiert, sondern beispielsweise im Gefäßendothel, vermitteln aber dennoch adrenerge Effekte auf das Myokard (54). Bei supraphysiologischen Adrenalin-Konzentrationen kommt es an β_2 -Rezeptoren zu einer modifizierten Stimulus-Antwort: die G-Protein-Kopplung verlagert sich von einer G_s - (stimulatorisch) zu einer G_i -Kopplung (inhibitorisch) (55). Hieraus ergibt sich eine lokalisierte, kardiodepressive Wirkung des Adrenalins, woraus die apikale Hypokinesie zu resultieren scheint. Dies konnte im Tiermodell gezeigt werden (53). Ebenfalls wurde die apikale Ballonierung des linken Ventrikels bei Patient:innen nach intravenöser Katecholamingabe beobachtet (56). Weiter ist eine direkte kardiotoxische Wirkung der Katecholamine annehmbar (49, 50). Dies wurde an Myokardbiopsien von Patient:innen mit TTS demonstriert. Histologisch zeigten sich deutliche Größenunterschiede der Kardiomyozyten sowie eine Reduktion der kontraktile Elemente (48). Die akute Ischämie des Myokards wird auf eine Dysfunktion der Mikrozirkulation zurückgeführt (57), wobei der Katecholamin Sturm über α_1 -Rezeptoren mikrovaskuläre Spasmen verursacht (58).

90% aller TKM-Patient:innen sind weiblich (43). Fast 80% der Erkrankten sind Frauen älter als 50 Jahre (43), vorwiegend mit postmenopausalem Hormonstatus (44). Dieser ist durch absinkende systemische Östrogen-Spiegel gekennzeichnet (59, 60). Eine positive Wirkung einer Östrogen-Supplementierung auf Blutdruck und Herzfrequenz bei

Stressinduktion wurde im Tierversuch an ovariectomierten Ratten gezeigt (61). Ferner sind Östrogen-Effekte auf den Gefäßtonus im Sinne einer reduzierten endothelialen Dysfunktion bekannt (47, 50). Perimenopausale Patientinnen präsentierten unter Östrogen-Supplementation signifikant niedrigeren Katecholaminspiegel bei Stressexposition (62).

Schließlich ist die systemische Inflammation sowie die lokale Entzündung des Myokards als pathophysiologische Komponente eines TTS zu erwähnen. Im Tierversuch wurden nach Induktion eines TTS sowohl die Infiltration von Entzündungszellen des Herzmuskels als auch erhöhte proinflammatorische Zytokine im Plasma der Versuchstiere gezeigt (63). Ebenso wurden im Tierversuch nach physischer Stressinduktion durch Adrenozeptorblockade verminderte Levels proinflammatorischer Zytokine detektiert (64). Gupta et al. führten in einem Review aktueller Literatur als Indikatoren einer beteiligten Inflammation histologische Korrelate eines entzündlichen Geschehens in Myokardbiopsien von TKM-Patient:innen sowie erhöhte Plasmakonzentration von Interleukin-6 und -10 auf. Dies schien mit einer erhöhten Sterblichkeit im Krankheitsverlauf assoziiert zu sein (49). Scally et al. zeigten in einer prospektiven multizentrischen Studie erhöhte Interleukin-6-Plasmalevels sowie die entzündliche Infiltration des Myokards durch Makrophagen bei Patient:innen mit akuter TKM (65). Santoro et al. beschrieben ein systemisches Entzündungsgeschehen im Rahmen eines TTS und eines ACS. Die prädominanten inflammatorischen Mediatoren differierten, wobei die TKM mit einem höheren TNF- α -Level einherging und das ACS mit einem höheren Interleukin-6-Level (66). Eine retrospektive klinische Studie von Vogelstein et al. legte auch im klinischen Kontext die Kopplung des adrenergen Systems mit einer systemischen Inflammation nahe. Die medikamentöse α_1 -Rezeptorblockade reduzierte sowohl Morbidität als auch Mortalität bei systemischer Hyperinflammation (67). Ebenso ist die Myokarditis adrenerger Genese als lokale Entzündungsreaktion bei erhöhten Katecholaminspiegeln bereits beschrieben (68). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Behandlung einer Kultur von respiratorischen Epithelzellen mit Epinephrin zu einem Sekretionsanstieg der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 sowie TNF- α führte (69). Insgesamt ist anzunehmen, dass ein Katecholamin Sturm Trigger einer lokalen sowie systemischen Inflammation sein kann.

1.2.2 Ischämischer Insult und Takotsubo-Syndrom

Das simultane Auftreten eines ischämischen Insults und einer TKM ist mehrfach publiziert (70-73). Im Folgenden wird die Pathophysiologie im Kontext des zeitlich eng gekoppelten Beginns beleuchtet. Neben diesem ist auch das versetzte Eintreten eines ischämischen Insults nach einem TTS innerhalb eines Organismus beschrieben (74). Eine strikte Sequenz des Auftretens der beiden Pathologien scheint es nicht zu geben: es wurde sowohl der Beginn eines TTS nach bereits aufgetretenem ischämischen Schlaganfall publiziert sowie vice versa, teils konnte die genaue Chronologie und somit die „Henne-Ei-Frage“ nicht geklärt werden (73). Folgt der Beginn einer TKM auf einen bereits stattgehabten Insult, so fügt sich dieser Hergang in die bereits in Kapitel (Kap.) 1.2.1 beschriebene pathophysiologische Achse ein. Umgekehrt ist als plausible Entität ein kardioembolisches Geschehen im Sinne eines sich im hypokinetischen linken Ventrikel bildenden, nach zentral abgeschwemmtem Thrombus beschrieben. Es ist nicht abschließend geklärt, ob es sich um die Hauptursache eines auf ein TTS folgenden Insults handelt oder um eine mögliche pathophysiologische Sequenz von Mehreren (75).

Patient:innen, welche simultan ein TTS sowie einen ischämischen Insult präsentieren, weisen folgende klinische Merkmale auf: die Mehrheit ist weiblich, fortgeschrittenen Alters, hat laborchemisch elevierte Entzündungsparameter und einen initial höheren NIHSS (72, 73). Der NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) ist ein numerisches Scoring-Instrument der Neurologie zur klinischen Kategorisierung der Schwere eines Insults (76). Insgesamt wurden gravierendere neurologische Defizite sowie eine höhere innerklinische Sterblichkeitsrate gezeigt (70, 73). Neuroanatomisch dominiert die Affektion der Inselrinde beziehungsweise peri-insulärer Bereiche (72, 73).

Insgesamt kann die klinische Konstellation aus ischämischem Insult und TTS als durch die Hirn-Herz-Achse gekoppelt betrachtet werden (70). Die Hirn-Herz-Achse beschreibt die Verschaltung des zentralen autonomen Netzwerks, welches unter anderem die Inselrinde und den Hypothalamus inkludiert, mit dem kardiovaskulären System (77). Es handelt sich um eine Achse der supraspinalen Regulation des vegetativen Nervensystems (78). Die Einheit, im Rahmen derer die Schlaganfall-Herz-Interaktion stattfindet, ist bidirektional und noch nicht vollständig verstanden (79). Sowohl im Tierversuch als auch in Humanstudien wurde mehrfach die kardiale Responsivität auf eine zentrale

Stimulation beziehungsweise Schädigung der Inselrinde gezeigt. Es sind sowohl die Modulation von Kreislaufparametern wie Herzfrequenz und Blutdruck als auch kardiale Rhythmus-, Reizleitungs- sowie Erregungsrückbildungsstörungen beschrieben. Besonders zu betonen ist eine konsekutive myokardiale Dysfunktion, genauer linksventrikuläre Wandbewegungsstörungen, bei Ischämie der Inselrinde (77). Das simultane Auftreten von ischämischem Schlaganfall und TKM könnte somit über die Inselrinde gekoppelt sein (72): Als grundlegender Mechanismus wird die autonome Dysregulation, eine parasymphatische Hypo- beziehungsweise sympathische Hyperaktivität, durch die kortikale Beeinträchtigung angenommen. Neben der Ischämie kann auch die zentrale Verarbeitung von emotionalem Stress über die Inselrinde zu einem gesteigerten Sympathikotonus mit entsprechender kardiovaskulärer Antwort führen (70, 77).

Die BHS wird unter ischämischen Bedingungen kompromittiert (vgl. Kap. 1.1.2). Auch eine Beeinträchtigung der regelrechten kardialen Funktion, wie beispielsweise durch einen herzchirurgischen Eingriff, beeinträchtigt die Integrität der BHS: sowohl eine passager reduzierte Perfusion als auch eine ausgelöste systemische Entzündung kann für die Öffnung der BHS verantwortlich sein (80). Vice versa führt die durch einen ischämischen Insult ausgelöste Neuroinflammation zur BHS-Schädigung, wobei lokal freigesetzte Entzündungsmediatoren systemisch wirksam werden können (28, 81). Eine kardiale Schädigung durch systemische Entzündungsgeschehen ist bekannt (82-84). Insgesamt ist die BHS somit als wichtige Komponente der Hirn-Herz-Achse anzusehen und in pathophysiologische Überlegungen zu integrieren.

1.3 Ziel der Arbeit

Das simultane Auftreten von ischämischem Schlaganfall und TTS ist eine relevante, bisher nicht ausreichend verstandene klinische Konstellation. Die BHS ist bidirektional in den pathologischen Prozess eingebunden und wird durch diesen maßgeblich geschädigt. Die Homöostase des ZNS ist beeinträchtigt, Katecholamine sowie Entzündungsmediatoren erreichen ungehindert das bereits durch die Ischämie kompromittierte neuronale Gewebe. Umgekehrt kann die lokale Neuroinflammation systemisch wirksam werden und das bereits beeinträchtigte Herz weiter schädigen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Auswirkungen wichtiger potentieller Noxen, denen die BHS im Rahmen oben geschilderter Konstellation ausgesetzt ist: Sauerstoff-Glucose-Mangel, wie im Rahmen eines ischämischen Insults, elevierte Katecholaminlevels sowie lokale Neuroinflammation beziehungsweise systemische Entzündungsgeschehen. Ferner wurde die Fragestellung integriert, ob und in welchem Ausmaß der postmenopausale Hormonstatus zur gesteigerten Perzeptivität der BHS gegenüber einer Schädigung durch die genannten Faktoren beiträgt. Der Fokus lag auf Alterationen der Zell-Zell-Verbindungen der BHS, den Tight junctions und Adherens junctions, sowie zwei Vertretern der Integrin- α -Familie. Es wurde ein breites Spektrum untersuchter Zielproteine gewählt, um einen umfassenden Einblick zu gewähren.

Insgesamt soll diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der BHS-Veränderungen im Kontext des zeitgleichen Auftretens von TKM und ischämischem Schlaganfall beitragen. Die durchgeführten *in vitro* Versuche können eine experimentelle Grundlage bieten, um in Zukunft die pathogenetischen Hintergründe weiter zu erforschen. Darauf aufbauend könnten Therapiekonzepte entwickelt werden. Gemäß des „from bench to bedside“-Konzeptes ist somit eine klinische Anwendung, basierend auf den experimentellen Ergebnissen im Sinne der Optimierung von aktuellen Behandlungsstrategien, das Langzeitziel weiterer Forschung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

In Tab. 1 aufgeführte Geräte sowie Softwares wurden für die Durchführung der Versuche verwendet.

Tabelle 1: Geräte und Softwares

Gerät/Software	Firma/Entwickler
Absorbance microplate reader	Tecan
AlphaView Software	ProteinSimple/Bio-Techne
Elektrophoresekammer XCell SureLock™ Mini Cell	Thermo Fisher Scientific

Gerät/Software	Firma/Entwickler
FluorChem FC2 MultiImager II	AlphaInnotech
Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000	Keyence
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Thalheimer
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc
Heizblock DB-series	Techne
ImageJ Software (Version 1.52a)	Wayne Rasband
Inkubator C60	Labotec
Inkubator Forma Steri-Cult	Thermo Fisher Scientific
Inkubator Heracell™ 150i CO ₂	Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss
Magellan™ Software (Version 7.2)	Tecan
Magnetrührer	Labinco
Mini-Vortexer	A. Hartenstein
Mini-Zentrifuge/Vortex Microspin FV-2400	Biosan
NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
PCR-Maschine StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Power Pack	Biometra
Rüttelplatte Duomax 1030 (verwendet bei 4°C)	Heidolph
Rüttelplatte Vibrax® (verwendet bei RT)	IKA
StepOnePlus™ Software v2.3	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer comfort (1,5 ml)	Eppendorf
Thermozykler (2720)	Thermo Fisher Scientific
Transfertank	Peqlab Biotechnologie

Gerät/Software	Firma/Entwickler
Ultraschall Homogenisator Sonopuls GM 3080	BANDELIN electronic
Wärmeplatte	Medite
Wasserbad	LAUDA-GFL
Zentrifuge 5418 R	Eppendorf
Zentrifuge Perfect Spin P	Peqlab Biotechnologie
Zentrifuge Thermo Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Substanzen, Puffer und Lösungen

In Tab. 2 sind alle verwendeten Substanzen aufgeführt. Tab. 3 sowie Tab. 4 zeigen das jeweilige Mischungsverhältnis für die angesetzten Puffer und Lösungen.

Tabelle 2: Substanzen

Substanz	Firma/Katalognummer
17 β -Östradiol (E2)	Sigma-Aldrich/E2758
Aqua (H ₂ O, destilliert)	B. Braun/00088992
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich/B5525
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich/A7906
cOmplete™ ULTRA Protease Inhibitor Cocktail	Roche/5892970001
DMEM–high glucose (Dulbecco’s modified Eagle’s Medium – high glucose 4500 mg/l)	Sigma-Aldrich/D5796
DMEM–no glucose (Dulbecco’s modified Eagle’s Medium – no glucose)	Thermo Fisher Scientific/11966025
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich/D4540
Dopamine hydrochloride	Sigma-Aldrich/H8502
Epinephrin	Sigma-Aldrich/E4250
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Carl Roth/7332
FCS (Fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich/F7524
Gelatine	Sigma-Aldrich/C3662

Substanz	Firma/Katalognummer
Glycerol	Thermo Fisher Scientific/17904
Glycin	AppliChem/131340
Interleukin-6 (Maus)	Thermo Fisher Scientific/PMC0064
Kollagen-IV	Sigma-Aldrich/C5533
L-Glutamin	Merck/K0283
Luminol	Sigma-Aldrich/A8511
Magermilchpulver	AppliChem/A0830
MEM Vitamin Solution (100x)	Sigma-Aldrich/M6895
Methanol	Honeywell (Riedel-de Haën)/34885
Mountant Permaflour	Thermo Fisher Scientific/TA-030-FM
Natrium-Pyruvat	Gibco/11530396
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich/31434
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth/6785.1
NEAA (Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x)	Sigma-Aldrich/M7145
Norepinephrin	Sigma-Aldrich/A7257
Normal Schweineserum (Normal Swine Serum Blocking Solution)	Vector Laboratories/S-4000-20
NP-40 (Surfact-Amps™)	Thermo Fisher Scientific/85124
Nukleasefreies Wasser	Thermo Fisher Scientific/AM9937
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific/26619
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	Sigma-Aldrich/D8537
PCA (p-Coumaric acid)	Sigma-Aldrich/C9008
Penicillin/ Streptomycin	Merck/A2213
Salzsäure (HCl, 1M)	Carl Roth/K025
SDS (Natriumdodecylsulfat)	AppliChem/A1112
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich/D6750
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich/M6250

Substanz	Firma/Katalognummer
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher Scientific/4444557
TNF- α (Maus)	Sigma-Aldrich/T7539
Tris PUFFERAN®	Carl Roth/5429
Trypsin-EDTA Solution	Biochrom/L2143
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich/P1379
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich/216763

Tabelle 3: Puffer

4x Lämmli-Puffer	RIPA-Puffer
<ul style="list-style-type: none"> - 0,004% Bromophenol Blue - 6% β-Mercaptoethanol - 40% Glycerol - 8% SDS - 250 mM Tris HCl (pH 6,8) 	<ul style="list-style-type: none"> - 150 mM NaCl - 1% NP-40 - 0,1% SDS - 0,5% Sodium deoxycholate - 50 mM Tris (pH 8,0)

Tabelle 4: Lösungen

ECL-I -Lösung	ECL-II-Lösung
<ul style="list-style-type: none"> - 25 ml Tris (pH 8,8) - 2,3 ml PCA gelöst (784 mg PCA-Pulver in 53 ml DMSO) - 5 ml Luminol gelöst (5 g Luminolpulver in 113 ml DMSO) - auf 250 ml mit H₂O aufgefüllt. 	<ul style="list-style-type: none"> - 25 ml Tris (pH 8,8) - 160 μl H₂O₂ - auf 250 ml mit H₂O aufgefüllt.

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Im Folgenden werden in Tab. 5 alle benötigten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Material	Firma
24-Well-Platte	Thermo Fisher Scientific
6-Well-Platte	Thermo Fisher Scientific
96-Well-Platte	Thermo Fisher Scientific
Blottingvlies	Peqlab Biotechnologie (Tankblotset)
Deckgläschen (12 mm Durchmesser)	R. Langenbrinck
Elektrische Pipette	Greiner Bio-One™
Insulinspritze Omnican®40	B. Braun
MicroAmp™ 96-Well-Platte	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
Objekträger (76x26 mm)	R. Langenbrinck
Pasteurpipette (Glas)	Brand
Pipette 10 µl	Eppendorf
Pipette 100 µl	Eppendorf
Pipette 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitze 0,5-20 µl (Biosphere®)	Sarstedt
Pipettenspitze 100-1000 µl (Biosphere®)	Sarstedt
Pipettenspitze 2-100 µl (Biosphere®)	Sarstedt
PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid)	Bio-Rad Laboratories
Röhrchen (15 ml)	Greiner Bio-One™
Röhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One™
Serologische Pipette (10 ml)	Greiner Bio-One™
Serologische Pipette (25 ml)	Greiner Bio-One™
Serologische Pipette (5 ml)	Greiner Bio-One™
Serologische Pipette (50 ml)	Greiner Bio-One™
Tubes (0,2 ml)	Sarstedt
Tubes (1,5 ml)	Sarstedt

Material	Firma
Blottingpapier (580x580 mm; selbst zugeschnitten)	A. Hartenstein
Zellkulturflasche T-25 (mit Filter)	Sarstedt
Zellkulturflasche T-75 (mit Filter)	Sarstedt
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt

2.1.4 Antikörper

Für Western-Blot und Immunfluoreszenzfärbung eingesetzte Primärantikörper sowie deren Verdünnung werden in Tab. 6 beschrieben. Die benötigten Sekundärantikörper sind in Tab. 7 gelistet.

Tabelle 6: Primärantikörper

Primärantikörper	Firma/Katalognummer	Verdünnung/Einsatz
Anti-Claudin-5 (Alexa fluor)	Thermo Fisher Scientific/352588	1:500/Immunfluoreszenzfärbung
Anti-Claudin-5 Maus	Thermo Fisher Scientific/35-2500	1:500/Western-Blot
Anti-Occludin Meerschweinchen	Acris/358-504	1:200/Western-Blot
Anti-β-Aktin-HRP	Sigma-Aldrich/A3854	1:25.000/Western-Blot
Anti-VE-Cadherin Ratte (laboreigener Hybridoma-Überstand)	Hergestellt nach Hybridoma-Methode (85)	Unverdünnt/Western-Blot
Anti-ZO-1 Hase	Thermo Fisher Scientific/40-2300	1:500/Western-Blot/Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Firma/Katalognummer	Verdünnung/Einsatz
Anti-Hase IgG	Cell Signaling Technology/7074S	1:3000/Western-Blot
Anti-Hase IgG (Alexa fluor 594, Esel)	Thermo Fisher Scientific/A21207	1:2000/Immunfluoreszenzfärbung
Anti-Maus IgG	Roche/12015218001	1:3000/Western-Blot
Anti-Meerschweinchen IgG	Santa Cruz Biotechnology/sc2438	1:5000/Western-Blot
Anti-Ratte IgG	Thermo Fisher Scientific/61-9520	1:5000/Western-Blot

2.1.5 Real-time RT-PCR-Sonden

Für die real-time RT-PCR verwendete Sonden sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tabelle 8: PCR-Sonden

PCR-Sonde	Firma/Katalognummer
Calnexin (Canx)	Thermo Fisher Scientific/Mm00500330_m1
Claudin-5	Thermo Fisher Scientific/Mm00727012_s1
Integrin- $\alpha 1$ (Itg $\alpha 1$)	Thermo Fisher Scientific/Mm01306375_m1
Integrin- αV (Itg αV)	Thermo Fisher Scientific/Mm00434486_m1
Occludin	Thermo Fisher Scientific/Mm00500912_m1
VE-Cadherin	Thermo Fisher Scientific/Mm00486938_m1
ZO-1	Thermo Fisher Scientific/Mm00493699_m1

2.1.6 Labor Kits

Eine Auflistung der verwendeten Labor-Kits findet sich in Tab. 9. Alle Kits wurden stets streng gemäß Hersteller-Angaben eingesetzt.

Tabelle 9: Angewandte Laborkits

Labor Kit	Anwendungsbereich	Firma/Katalognummer
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	cDNA-Herstellung mittels reverser Transkription	Thermo Fisher Scientific/4368814
NucleoSpin® RNA	Isolation der Ribonukleinsäure	Macherey-Nagel/740955
NuPAGE™-System - NuPAGE™ 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gel, 17-well - NuPAGE™ LDS Sample Buffer - NuPAGE™ Antioxidant - NuPAGE™ Sample Reducing Agent - NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer - NuPAGE™ Transfer Buffer	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese/Transfer-Blot	Thermo Fisher Scientific/ - NP0329 - NP0007 - NP0005 - NP0009 - NP0001 - NP0006
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Herstellung der Proteinproben	Thermo Fisher Scientific/23225

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von cEND-Zellen *in vitro*

Alle Versuche wurden mit cEND-Zellen durchgeführt. Es handelt sich um eine immortalisierte Endothelzelllinie aus dem murinen Zerebrum. Die Zellen wurden bereits hinreichend beschrieben und mehrfach *in vitro* untersucht (86-88). cEND sind Endothelzellen der BHS, welche in ständigem, direktem Kontakt zum Blutmilieu stehen (6). Als Zielproteine wurden Claudin-5 (Cldn-5), Occludin (Ocln), Zonula-Occludens-Protein-1 (ZO-1) und VE-Cadherin (VE-Cad.) sowie die Integrinuntereinheiten Integrin- $\alpha 1$ (Itg $\alpha 1$) und Integrin- αV (Itg αV) gewählt. Alle Zielproteine werden von cEND-Zellen exprimiert (29, 30, 86, 89). Ebenfalls wurden bereits Östrogenrezeptoren an cEND nachgewiesen (88).

Die Arbeit mit cEND wurde durchgehend unter einer Sterilbank (HERAsafe®, Thermo Fisher Scientific) und auf einer Wärmeplatte (Medité) durchgeführt. Initial erfolgte das Auftauen der in einem Stickstofftank eingefrorenen Zellen. Die aufgetauten Zellen wurden mit 10 ml im Wasserbad (LAUDA-GFL) erwärmtem Kulturmedium (s. Tab. 10) versetzt in eine Kulturflasche (T-25) verbracht. Um ein adhärentes Wachstum als Monolayer zu ermöglichen, wurde der Boden aller Kulturflaschen mit 0,5%-iger Gelatine beschichtet (30 Minuten Inkubation mit 15 ml Gelatine gefolgt von sorgfältigem Absaugen der überschüssigen Lösung). Die Kultivierung von cEND erfolgte im Inkubator Forma Steri-Cult (37°C, 95% relative Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂). Alle zwei bis drei Tage wurde das Kulturmedium abgesaugt und 8 ml frisches Medium hinzugegeben. Nach einer Woche konnte zur quantitativen Vermehrung der Zellen das sog. Splitting im Verhältnis 1:2 durchgeführt werden. Mit dem Lichtmikroskop wurde das konfluent gewachsene Zell-Monolayer auf seine Integrität kontrolliert. Ergaben sich keine Auffälligkeiten, wurde das Nährmedium abgesaugt und zwei Mal mit 15 ml gewärmtem PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurden 2 ml warmes Trypsin auf diese gegeben. Dieser circa vierminütige Vorgang wurde engmaschig lichtmikroskopisch kontrolliert. Die gelösten cEND-Zellen wurden mit 38 ml Kulturmedium versetzt, um die Trypsin-Aktivität zu stoppen. Jeweils 20 ml der Zellsuspension wurden in eine beschichtete Kulturflasche (T-75) pipettiert. Die weitere Kultivierung wurde zyklisch in Kulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² mit je 20 ml Volumen durchgeführt.

Zur experimentellen Behandlung von cEND erfolgte das „Aussäen“ mit anschließender Differenzierung. Die wie beschrieben erzeugte Zellsuspension wurde in Well-Platten (Lochplatten) „ausgesät“. In Gelatine-beschichtete (3 ml pro Well) 6-Well-Platten wurden je 2,6 ml Zellsuspension in ein Well pipettiert. Nach einwöchiger Kultivierung, wobei alle zwei bis drei Tage das Kulturmedium (3 ml pro Well) gewechselt wurde, konnten die cEND-Zellen differenziert werden: Das Kulturmedium wurde abgesaugt, zweimalig mit 3 ml warmem PBS pro Well gewaschen und schließlich 3 ml Differenzierungsmedium (s. Tab. 10) über 24 Stunden appliziert. Durch das Differenzierungsmedium wurde mittels Serum-Reduktion eine stabile Phase von cEND zur weiteren Behandlung erreicht (86).

Tabelle 10: Medien zur Kultivierung von cEND

Kulturmedium	Differenzierungsmedium
<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml DMEM-Medium (high glucose) - 50 ml FCS - 10 ml L-Glutamin - 10 ml MEM Vitamin-Kit - 10 ml NEAA - 10 ml Natrium-Pyruvat - 2,5 ml Penicillin/Streptomycin (50 U/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml DMEM-Medium (high glucose) - 5 ml FCS - 2,5 ml Penicillin/Streptomycin (50 U/ml)

2.2.2 Behandlungsschemata bei Normoxie in vitro

Die differenzierten cEND-Zellen wurden im Inkubator in verschiedenen Versuchsaufbauten mit Entzündungsmediatoren (TNF- α und Interleukin-6), Katecholaminen (Dopamin, Epinephrin und Norepinephrin) und 17 β -Östradiol (E2), stellvertretend für Östrogene (90), behandelt. Alle Substanzen wurden gelöst und mit Differenzierungsmedium mittels Verdünnungsreihe auf eine gewählte Endkonzentration verdünnt (s. Tab. 11). Sofern es sich bei dem verwendeten Lösungsmittel nicht um Differenzierungsmedium handelte, wurde die entsprechende Konzentration des Lösungsmittels den Kontrollen zugegeben.

Tabelle 11: Substanzen zur Behandlung von cEND

Substanz	Lösungsmittel	Endkonzentration
Dopamin	Differenzierungsmedium	150 μ M (91)
Epinephrin	0,5 M HCl	1 μ M (69)
Norepinephrin	0,5 M HCl	1 μ M (69)
TNF- α	Differenzierungsmedium	100 nM (29)
Interleukin-6	100 mM Essigsäure	5 pg/ml (92)
17 β -Östradiol (E2)	Ethanol	10 nM (93, 94)

Unter der Inkubationsbedingung „Normoxie ohne Glucose-Entzug“, welche im Folgenden der Übersichtlichkeit halber lediglich als „Normoxie“ bezeichnet wird,

erfolgten drei verschiedene Versuchsreihen. Nach Zell-Differenzierung wurde über weitere 24 Stunden mit E2 vorbehandelt. Den Kontrollen wurde die korrespondierende Konzentration Ethanol zugesetzt. Im Anschluss wurden je nach Versuchsaufbau Katecholamine und/oder Entzündungsfaktoren appliziert (vgl. Abb. 3).



Abbildung 3: Allgemeines Behandlungsschema bei Normoxie

I.) Kultivierte cEND-Zellen wurden für 24 h differenziert. II.) Es erfolgte die Vorbehandlung mit E2 über 24h. III.) Je nach Versuchsaufbau wurden über 4h beziehungsweise 24h Katecholamine (KAT) und/oder Entzündungsfaktoren (INF) appliziert. Die mit E2 vorbehandelten Proben erhielten weiterhin E2. Nach Versuchsende wurden die Proben der konsekutiven Analyse zugeführt.

Es erfolgte die getrennte Behandlung mit Katecholaminen oder Entzündungsfaktoren über 24 Stunden (s. Abb. 4). Es wurden 3 ml Differenzierungsmedium pro Well verwendet.

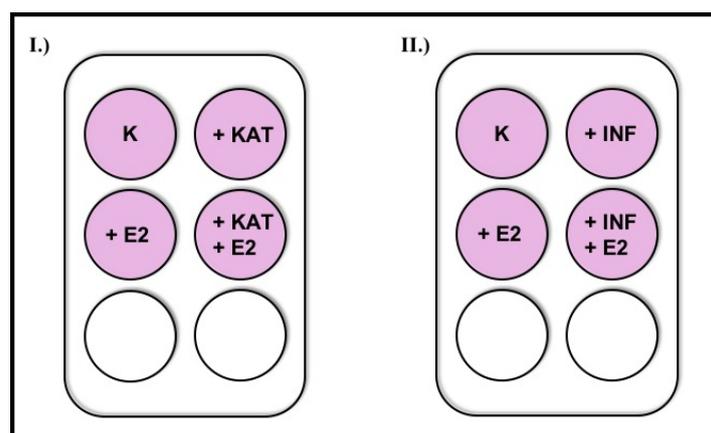


Abbildung 4: Schema der separaten Behandlung mit Katecholaminen/Entzündungsfaktoren bei Normoxie

Schematisch dargestellt sind 6-Well-Platten. **I.)** Behandlungsschema mit Katecholaminen (24h): Applikation von Katecholaminen (+ KAT), E2 (+ E2) sowie KAT und E2 in Kombination (+ KAT + E2). **II.)** Behandlungsschema mit Entzündungsfaktoren (24h): Applikation von Entzündungsfaktoren (+ INF), E2 (+ E2) sowie INF und E2 in Kombination (+ INF + E2). Eine unbehandelte Kontrolle (K) diene jeweils als Referenz. Die Analyse erfolgte nach 24 h. Die pinke Färbung symbolisiert das Differenzierungsmedium.

Die simultane Applikation von Katecholaminen sowie Entzündungsfaktoren erfolgte über zwei verschiedene Zeitintervalle: über vier sowie 24 Stunden. Für den vierstündigen Versuchsansatz wurden pro Well 1,5 ml Differenzierungsmedium verwendet. Dies diente der späteren Vergleichbarkeit mit den Proben nach Sauerstoff-Glucose-Entzug *in vitro* (s. Kap. 2.2.3). Über 24 Stunden wurden 3 ml je Well beibehalten.

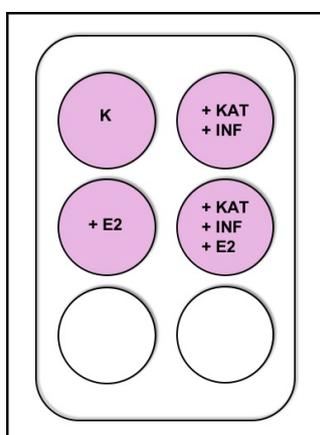


Abbildung 5: Schema der simultanen Behandlung mit Katecholaminen und Entzündungsfaktoren

Schematisch dargestellt ist eine 6-Well-Platte bei der simultanen Behandlung mit Katecholaminen und Entzündungsfaktoren (+ KAT + INF) sowie E2 (+ KAT + INF + E2). Weiter wurde eine mit E2 behandelte Probe (+ E2) beziehungsweise eine unbehandelte Kontrolle (K) parallel inkubiert. Es wurden zwei Zeitintervalle untersucht: die Analyse erfolgte nach 4h beziehungsweise 24h. Die pinke Färbung symbolisiert das Differenzierungsmedium.

2.2.3 Sauerstoff-Glucose-Entzug und Reoxygenierung *in vitro*

Um die Konditionen eines ischämischen Schlaganfalls zu simulieren, wurde das Modell des Sauerstoff-Glucose-Entzugs *in vitro* über vier Stunden, auf Englisch als Oxygen Glucose Deprivation (OGD) bezeichnet, gewählt. Hier handelt es sich um einen bereits etablierten Versuchsaufbau (20, 35, 95). Der Zeitraum des OGD über vier Stunden deckt sich mit der klinischen Erkenntnis, dass erste BHS-Schäden nach einer circa vierstündigen Ischämie apparent werden (26). Die pathophysiologische Konstellation des Glucose- sowie Sauerstoffmangels werden mittels glukosefreien Mediums und Hypoxie-Kammer imitiert. Klinisch wird in der Akutversorgung eines ischämischen Schlaganfalls, nach Ausschluss von Kontraindikationen, primär die systemische Thrombolyse und/oder Thrombektomie zur Reperfusion angestrebt (15, 18). Die relevante Konstellation einer auf die stattgehabte Ischämie folgenden Reoxygenierung wurde ebenfalls *in vitro* untersucht. Hierfür erfolgte nach Entzug von Sauerstoff und

Glucose eine erneute Bereitstellung über 20 Stunden. Der Übersichtlichkeit halber wird im Folgenden diese Inkubationsbedingung kompakt als „Reoxygenierung“ bezeichnet. Es handelt sich um einen etablierten Versuchsaufbau (36).



Abbildung 6: Behandlungsschema bei Sauerstoff-Glucose-Entzug

I.) Differenzierung von cEND über 24 h. **II.)** Vorbehandlung mit E2 über 24 h. **III.)** Über vier Stunden erfolgte der Sauerstoff- Glucose-Entzug (OGD). Je nach Versuchsgruppe wurden Katecholamine (KAT) sowie Entzündungsmediatoren (INF) appliziert. Die mit E2 vorbehandelten Proben erhielten weiterhin E2. Eine Versuchsgruppe wurde direkt analysiert, eine weitere wurde der Reoxygenierung über weitere 20 Stunden zugeführt.

Nach Differenzierung von cEND (s. Kap. 2.2.1) erfolgte das Absaugen des Differenzierungsmediums sowie ein zweimaliger Waschvorgang mit gewärmtem PBS. Pro Well wurden anschließend 1,5 ml glukosefreies OGD-Medium (DMEM-Medium no glucose) hinzugegeben. Unter folgenden Bedingungen wurden die Zellen über vier Stunden inkubiert (Inkubator C60, Labotec): 1% O₂, 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit. Nach Ablauf des Zeitintervalls erfolgte direkt die Ernte zur weiteren Analyse oder die Reoxygenierung. Zur Reoxygenierung wurde das OGD-Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 3 ml glukosehaltiges Differenzierungsmedium pro Well pipettiert. Die Inkubation für 20 weitere Stunden wurde unter normoxischen Bedingungen durchgeführt: 37°C, 95% relative Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ (Inkubator Forma Steri-Cult). Wie in Abb. 6 dargestellt, wurden unter OGD-Bedingungen sowie während der Reoxygenierung ebenfalls Katecholamine (KAT), Entzündungsfaktoren (INF) und E2 appliziert. Das Behandlungsschema ist in Abb. 7 gezeigt.

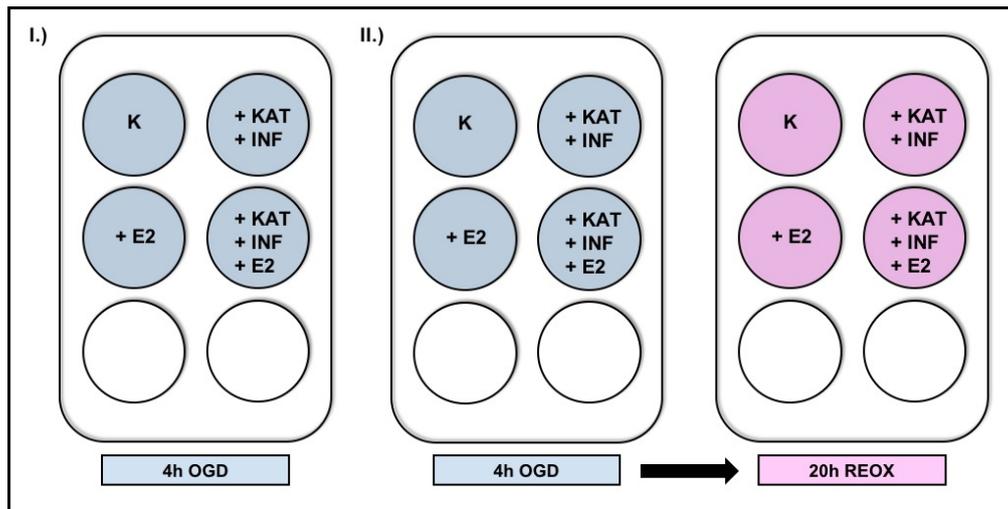


Abbildung 7: Behandlungsschema mit Katecholaminen und Entzündungsfaktoren bei Sauerstoff-Glucose-Entzug mit Reoxygenierung

Schematisch dargestellt sind 6-Well-Platten. **I.)** Simultane Behandlung mit Katecholaminen (KAT) und Entzündungsfaktoren (INF) bei OGD (Sauerstoff-Glucose-Entzug) für 4 h: Applikation von KAT und INF (+ KAT + INF), E2 (+ E2) sowie KAT, INF und E2 in Kombination (+ KAT + INF + E2). Die Analyse erfolgte nach 4 h. **II.)** 20 h Reoxygenierung (OGD + REOX) nach 4 h OGD: Gleiches Behandlungsschema wie bei I.) mit anschließendem Mediumwechsel auf Differenzierungsmedium zur Reoxygenierung über 20 h. Die Analyse erfolgte nach insgesamt 24 h. Eine unbehandelte Kontrolle (K) diente jeweils als Referenz. Die blaue Färbung symbolisiert OGD-Medium, die pinke die Verwendung von Differenzierungsmedium.

Die in Kap. 2.2.2 sowie Kap. 2.2.3 beschriebenen Versuche wurden stets simultan bei Normoxie unter Glucosezugabe beziehungsweise unter Sauerstoff-Glucose-Entzug mit Reoxygenierung durchgeführt. So konnten in der statistischen Auswertung nicht nur Effekte der einzelnen Behandlungssubstanzen, sondern auch der variablen Inkubationsbedingungen untersucht werden. Der Übersichtlichkeit halber wird im Folgenden die simultane Applikation von Katecholaminen und Entzündungsmediatoren als Behandlung mit „Stressfaktoren“ bezeichnet.

2.3 Biochemische Analysen

2.3.1 Western Blot

Um Proteinlevels nach Abschluss der jeweiligen Experimente bestimmen zu können, wurden Western Blots durchgeführt. Als Zielproteine wurden Vertreter der Junctionsprotein-Familie gewählt: Claudin-5, Occludin, ZO-1 und VE-Cadherin (vgl. Tab. 6).

2.3.1.1 Herstellung von Proteinproben

Nach Abschluss eines Versuchsprotokolls wurden die Well-Platten aus dem Inkubator entnommen und direkt auf Eis verbracht. Hier erfolgte das sorgfältige Absaugen des Mediums sowie zweimalig ein Waschvorgang mit kaltem PBS (4°C). Pro Well wurden 100 µl RIPA-Puffer sowie 13 µl Protease Inhibitor Cocktail (Roche) hinzugegeben, um die Zellyse herbeizuführen. Mit einem Zellschaber konnten die adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Wells gelöst werden. Mittels Pipette (1000 µl, Eppendorf) erfolgte der Transfer in ein 1,5 ml Tube je Well. Die Proben wurden entweder direkt analysiert oder zunächst bei -80°C gelagert. Um valide Proteinproben zu erhalten, erfolgte die Sonifikation dieser. Diese gewährleistete das „Aufbrechen“ der einzelnen Zellbestandteile. Mittels Ultraschall Homogenisator (BANDELIN electronic) wurde zehn Mal für je 0,5 s bei 20 W sonifiziert. Um zur Proteinbestimmung Proben frei von restlichen Zellbestandteilen zu erhalten, wurden diese eine Minute mit 11.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pipette in ein neues 1,5 ml Tube überführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Zunächst wurde in eine 96-Well-Platte gemäß der Verdünnungsreihe des Herstellers ein BSA-Proteinstandard pipettiert. Anschließend wurde für jede Probe ein Triplet mit jeweils 23 µl Wasser vorgelegt, worin mittels Pipette je 2 µl Probenmaterial eingespült werden konnten. Nachfolgend wurden 200 µl BCA-Reagenz (Verhältnis Reagenz A zu Reagenz B 50:1) pro Well hinzugegeben. Es folgte die Inkubation (Inkubator Forma Steri-Cult) der 96-Well-Platte bei 37°C für 30 min. Die Quantifizierung der enthaltenen Proteinmengen wurde mit einem Absorptions-Messgerät (Tecan) sowie der kompatiblen Software Magellan™ durchgeführt. Hier wurde die Lichtabsorption der Proben bei 540 nm detektiert. Mittels Vergleiches mit der Absorption des vorgelegten Proteinstandards, konnte die Proteinkonzentration der untersuchten Proben bestimmt werden. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proben von je 40 µl Volumen vorbereitet. Hierfür wurden 12,5 µl 4x Lämmli-Puffer, 5 µl Sample Reducing Agent (NuPAGE™) sowie 32,5 µl Probenmaterial verwendet. Pro Versuchsansatz wurde anhand der niedrigsten enthaltenen Proteinmenge in 32,5 µl die Standardmenge für alle restlichen Proben festgesetzt. Aus diesem Grund wurde von den übrigen Proben lediglich die Menge in µl entnommen, welche der Minimalmenge entsprach. Das restliche Volumen wurde auf 32,5 µl mit RIPA-Puffer aufgefüllt.

2.3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um eine semi-quantitative Bestimmung der enthaltenen Proteine zu ermöglichen, erfolgte die Auftrennung dieser mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Das im Puffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert die Proteine und gewährleistet eine einheitlich negative Ladung dieser. Auf diese Weise können die Proteinproben gemäß ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld separiert werden (96). Die Elektrophorese wurde in der Elektrophoresekammer Xcell SureLock™ Mini Cell durchgeführt. In diese wurden gemäß Anleitung maximal zwei Gele (NuPAGE™ 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gel) eingesetzt. Anschließend wurden für den Laufpuffer 50 ml MOPS SDS Running Buffer (NuPAGE™) mit 950 ml Wasser gemischt. In das äußere Kompartiment der Elektrophoresekammer wurden 600 ml, in das innere Kompartiment 200 ml fertiger Laufpuffer eingefüllt. Dem Puffer des inneren Kompartiments wurden 500 µl Antioxidans (NuPAGE™) zugesetzt. Zur Größenskalierung der späteren Proteinbanden wurden 2 µl gefärbter Proteinmarker vermischt mit 8 µl Lämmli-Puffer inklusive Sample Reducing Agent in die erste Tasche des Gels pipettiert. Anschließend wurden in jede weitere Tasche je 10 µl fertige Proteinprobe geladen, welche zuvor fünf Minuten bei 70°C in einem Heizblock erwärmt worden war. Die Elektrophoresekammer wurde geschlossen und das elektrische Feld (200 V, 120 mA) parallel zur eingespannten Gelmatrix für insgesamt 50 min angelegt. Nach Abschluss des Laufes konnte das zwischen zwei Kunststoff-Platten fixierte Gel entnommen werden. Die Platten wurden auseinandergehelt, um das Gel für das folgende Blotting zugänglich zu machen.

2.3.1.3 Transfer-Blot

Im Transfer-Blot erfolgte mittels elektrischen Feldes die Übertragung der Proteine aus dem Elektrophorese-Gel auf eine Trägermembran. Dies machte die Zielproteine dem späteren immunchemischen Nachweisverfahren zugänglich (97). Zunächst wurde die PVDF-Membran eine Minute in Methanol aktiviert. Anschließend wurden Transfermembran, zwei Blottingvliese sowie zwei Blottingpapiere in fertigen Transferpuffer (50 ml NuPAGE™ Transfer Buffer, 1 ml NuPAGE™ Antioxidant, 100 ml Methanol, 849 ml Wasser) eingetaucht, um Lufteinschlüsse entweichen zu lassen. Um den vollständigen Transfer zu gewährleisten, wurden zwischen Gel und Membran

verbliebene Luftblasen mit einem Plastikspatel ausgestrichen. Das Material wurde, wie in Abb. 8 gezeigt, in eine Blotting-Kassette eingesetzt.

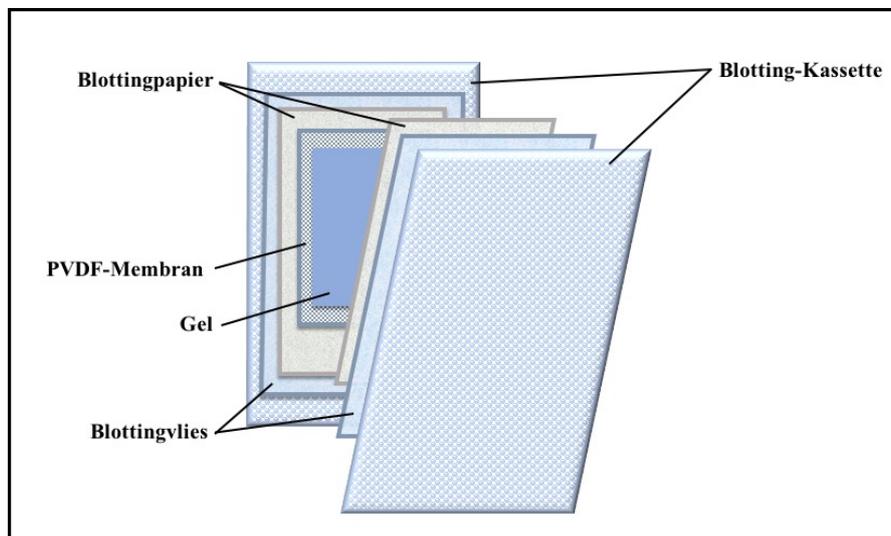


Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer bestückten Blotting-Kassette

Schematisch gezeigt ist der Aufbau einer fertigen Blotting-Kassette. Das benötigte Material wurde für den Proteintransfer von Gel auf PVDF-Membran in folgender Reihenfolge in die Kassette eingesetzt: Blottingvlies, Blottingpapier, PVDF-Membran, Gel, Blottingpapier, Blottingvlies.

Die Blotting-Kassette wurde in einen Tankblotter eingesetzt, welcher auf einem Magnetrührer platziert war. Dieser wurde vollständig mit fertigem Transferpuffer gefüllt. Durch den Anschluss an ein Netzteil (Power Pack, Biometra) wurde ein vertikal zu Membran sowie Gel verlaufendes elektrisches Feld (170 mA, 60 V) angelegt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C. Die PVDF-Membran stand nun für den Färbeprozess zur Verfügung. Durch einstündiges Blocking mit 5% Magermilchpulver gelöst in PBS wurde eine unspezifische Antikörperbindung an die Membran verhindert (96). Die Primäantikörper der Zielproteine wurden in 1% BSA/PBS verdünnt (s. Tab. 6). Lediglich Anti-VE-Cadherin (Hybridoma-Überstand) wurde unverdünnt verwendet. Mit 3 ml der Lösung wurde die Membran in Folie eingeschweißt und mit Klammern gleichmäßig zwischen Glasplatten fixiert. Auf einer Rüttelplatte erfolgte die Inkubation bei 4°C über Nacht. Am folgenden Morgen wurde die Folie entfernt. Alle Arbeitsschritte fanden von nun an in einem Plastikbehälter auf einer Rüttelplatte statt. Es wurde drei Mal ein zehnminütiger Waschvorgang mit 0,1% TWEEN® in PBS durchgeführt. Daraufhin wurde die Membran 20 min mit 5% Magermilchpulver in PBS geblockt. Der

Sekundärantikörper wurde in 1% BSA/ PBS verdünnt (s. Tab. 7) und 15 ml dieser Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) appliziert. Dreimaliges Waschen mit 0,1% TWEEN® in PBS entfernte ungebundene Sekundärantikörper. Mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL) erfolgte schließlich die semi-quantitative Bestimmung der Zielproteine. Die Sekundärantikörper waren an Merrettichperoxidase gebunden, welche Luminol oxidiert. Mittels Bildgebungssystem (FluorChem mit AlphaView software) konnte das bei dieser Reaktion emittierte Licht detektiert werden (98). Die Membran wurde für zwei Minuten lichtgeschützt mit ECL-Lösung (ECL I und ECL II im Verhältnis 50:50) behandelt. Hierauf erfolgte das Einlegen in die FluorChem sowie die photometrische Messung des ausgestrahlten Lichtes. Um diesen Vorgang für jedes Zielprotein wiederholen zu können, wurden zuvor verwendete Antikörper mittels Natriumhydroxid-Lösung entfernt. In folgender Reihenfolge wurde die Membran hierfür gewaschen: fünf Minuten Wasser, fünf Minuten 0,2 M Natriumhydroxid-Lösung, fünf Minuten Wasser, zehn Minuten 0,1% TWEEN® in PBS. Nach erneutem Milchblock über 45 min konnte die Membran erneut mit Primär- sowie Sekundärantikörpern markiert werden. Nach Applikation aller Antikörper gegen die gewählten Zielproteine wurde β -Aktin als Referenzprotein zur Ladungskontrolle gefärbt (96). Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden wurde mittels der Software ImageJ durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte zur statistischen Auswertung auf die gemessenen Werte des β -Aktin.

2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung

Um die morphologische Integrität des Zell-Monolayers der cEND-Zellen beurteilen zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Als Zielproteine wurden Claudin-5 sowie ZO-1 angefärbt. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI verwendet, welches die dort enthaltene Desoxyribonukleinsäure markierte (99). Alle Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Zunächst wurden Deckgläschen (12 mm Durchmesser) zur cEND-Kultivierung vorbereitet: Es erfolgte das Verteilen je eines Deckgläschens pro Well auf eine 24-Well-Platte. Jedes Deckgläschen wurde mit 800 μ l Kollagen-IV bedeckt und zur Beschichtung für zwei Stunden bei 37°C inkubiert (Inkubator Forma Steri-Cult). Im Anschluss wurde der Kollagen-IV-Überstand mittels Glaspipette abgesaugt. Es folgten drei Waschvorgänge mit PBS. Zum Aussäen von cEND wurde 400 μ l Zellsuspension pro Deckgläschen aufgebracht. Die Vorbereitung der

Zellsuspension erfolgte wie beschrieben (vgl. Kap. 2.2.1). Die Pflege der Zellen wurde gemäß Protokoll bis zum Behandlungstag fortgeführt, wobei je Well 800 µl Kulturbeziehungsweise Differenzierungsmedium verwendet wurde. Alle Experimente wurden wie erläutert durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.2 und 2.2.3). Bei Normoxie wurden 800 µl Differenzierungsmedium, unter OGD-Bedingungen 400 µl glukosefreies Medium verwendet.

Nach abgeschlossener Behandlung wurden die 24-Well-Platten aus dem Inkubator entnommen und auf Eis verbracht. Hier erfolgte das Absaugen des Behandlungsmediums mittels Glaspipette sowie ein fünfminütiger Waschvorgang mit kaltem PBS. Zur Fixation des Zell-Monolayers wurde pro Well 750 µl eiskaltes Methanol (-20°C) über zehn Minuten appliziert, welches mit kaltem PBS entfernt wurde. Die Well-Platten wurden vom Eis genommen und für 15 min bei RT mit 1 ml 1%BSA/PBS je Well inkubiert. Es folgte ein einstündiges Blocken mit 500 µl 5% Normal Schweine-Serum in 1% BSA/PBS bei RT. Nach gründlichem Absaugen wurde bei abgedunkeltem Raum 50 µl der 1:500 verdünnten Primäantikörper (in 5% Normal Schweine-Serum in 1% BSA/PBS) gegen Claudin-5 (Alexa fluor) sowie ZO-1 (Hase) auf die Deckgläschen gegeben. Die Inkubation über Nacht wurde unter strengem Lichtabschluss bei 4°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden nicht-gebundene Antikörper mittels dreimaligem Waschvorgang mit PBS über je fünf Minuten bei RT auf einer Rüttelplatte entfernt. Anschließend wurden Sekundäantikörper appliziert: pro Well wurden 300 µl 5% Normal Schweine-Serum in 1% BSA/PBS mit 1:3000 verdünntem DAPI sowie 1:2000 verdünnten Anti-Hase IgG (Alexa fluor) verwendet. Erneut wurden überschüssige Antikörper wie beschrieben mittels Waschens beseitigt. Für das finale Eindecken wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette aus den Well-Platten entnommen. Hier wurde besonders schonend gearbeitet, um artifizielle Schäden des Zell-Monolayers zu vermeiden. Auf jedes Deckgläschen wurde Eindeckmedium (Mountant permaflour) getropft. Es erfolgte das Aufbringen mit der gefärbten Seite auf einen Objektträger. Das Aushärten des Eindeckmediums bei RT benötigte 24 h. Hiernach wurden die Objektträger bei 4°C gelagert. Die mikroskopischen Aufnahmen der Präparate eines Versuchsaufbaus wurden zur Vergleichbarkeit stets am selben Tag und bei gleichen Belichtungseinstellungen angefertigt. Die Belichtungszeiten sind den Abbildungen zu entnehmen.

2.4 Molekularbiologische Analysen

Um Alterationen der Genexpression evaluieren zu können, wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Es wurden als Zielgene Claudin-5, Occludin, ZO-1, VE-Cadherin, Integrin- α 1 sowie Integrin- α V gewählt.

2.4.1 Isolation der Ribonukleinsäure

Zunächst erfolgte die Isolation der durch die cEND-Zellen transkribierten Ribonukleinsäure (RNA). Hierfür wurde das NucleoSpin® RNA-Kit (Macherey-Nagel) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Nach Versuchsabschluss wurden die 6-Well-Platten dem Inkubator entnommen und zwei Mal mit 3 ml sterilem PBS pro Well gewaschen. Nach gründlichem Absaugen des PBS wurden je 350 μ l RA-1-Puffer sowie 3,5 μ l β -Mercaptoethanol appliziert. Mit einem sterilen Zellschaber wurde das Zell-Monolayer gelöst und die Proben in je ein 1,5 ml Tube pipettiert. Zur mechanischen Zelllyse wurden die Proben zehnmalig in einer sterilen Insulinspritze aufgezogen. Das Zelllysate wurde zur Homogenisierung in einen NucleoSpin®-Filter gegeben und eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert (Zentrifuge 5418 R, Eppendorf). Nach Entfernen des Filters wurden 350 μ l Ethanol (70%) zur Verbesserung der Bindungseigenschaften der RNA zugegeben. Es folgte die Überführung in ein neues NucleoSpin®-Filter-Tube, welches die RNA-Säule enthält. Nach Zentrifugation über 30 s bei 11.000 x g, wurden je 350 μ l Membrane Desalting Buffer appliziert. Es wurde erneut 30 s bei 11.000 x g zentrifugiert. Über 15 min erfolgte die Inkubation der RNA-Säule mit 95 μ l rDNAse-Reaktionspuffer inklusive rDNAase (Mischverhältnis 9:1), um vorhandene Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu spalten. Gemäß Herstellerangaben wurden insgesamt drei Waschvorgänge mit den Puffern RA-2 beziehungsweise RA-3 durchgeführt. Zur Trocknung der Filtermembran wurde über zwei Minuten zentrifugiert (11.000 x g). Die RNA-Säulen wurden in neue 1,5 ml Tubes platziert, um die isolierte RNA mit 40 μ l RNase-freiem Wasser durch eine finale Zentrifugation (1 min, 11.000 x g) herauszuwaschen.

2.4.2 cDNA-Herstellung mittels reverser Transkription

Um die real-time Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchführen zu können, musste die zur isolierten RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden (100). Diese reverse Transkription wurde mittels High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

(Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die RNA-Konzentration der Proben wurde photometrisch bei 260/280 nm mittels Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Hierfür wurden jeweils 1,2 µl Probenmaterial eingesetzt. So konnte das notwendige Probenvolumen errechnet werden, um 1 µg Template-RNA pro Reaktionsansatz zu verwenden. Das ermittelte Volumen wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und in einem 0,2 ml Tube mit 10 µl fertigem Mastermix versetzt. Der Mastermix wurde zuvor gemäß Herstellerangabe auf Eis gemischt: es wurden jeweils 2 µl 10x RT Random Primers, 2 µl 10x RT Puffer, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 0,8 µl 25x dNTP Mix (100mM), 1 µl RNase-Inhibitor und 3,2 µl nukleasefreies Wasser verwendet. Pro Tube wurde ein finales Volumen von 20 µl Reaktionsansatz erreicht. Es erfolgte ein kurzes „Abspinnen“ (Mini-Zentrifuge, Biosan) aller Tubes, um das Reaktionsgemisch homogen erwärmen zu können. Anschließend wurden die Proben in einem Thermozykler (Thermo Fisher Scientific) zur cDNA-Synthese platziert. Folgender Temperaturzyklus wurde eingestellt: 25°C für zehn Minuten, 37°C für 120 Minuten, 85°C für fünf Minuten. Final wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt und konnten aus dem Gerät entnommen werden.

2.4.3 *Quantitative real-time RT-PCR*

Die vorgelegte cDNA wurde gemäß dem Prinzip der PCR amplifiziert, wobei gleichzeitig eine Quantifizierung in Echtzeit durchgeführt wurde (101). Auf Eis wurde der TaqMan™ Fast Advanced Master Mix sowie die benötigten PCR-Sonden (vgl. Tab. 8) aufgetaut. Währenddessen wurden die cDNA-Proben mit nukleasefreiem Wasser verdünnt (1:11). Eine Mischung aus Sonden und Mastermix (1:10) wurde gemäß der Probenanzahl in ausreichender Menge hergestellt. Pro Well wurden 11 µl in einer 96-Well-Platte (MicroAmp™) vorgelegt. Je Probe wurde ein Triplet der Sonde eines jeden Zielgens pipettiert. Anschließend konnten pro Well 9 µl verdünnter cDNA eingespült werden. Somit wurde ein finales Volumen von 20 µl Ansatz je Well erreicht. Die 96-Well-Platte wurde mittels Folie (MicroAmp™) sowie Plastikspatel verschlossen. Es folgte eine einminütige Zentrifugation (Zentrifuge Perfect Spin P, Peqlab), um das Reaktionsgemisch gleichmäßig am Boden der Wells zu sammeln. Die Platte wurde in eine PCR-Maschine StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Zunächst erfolgte die Denaturierung über 0:20 min bei 95°C. Im Anschluss wurde folgender Zyklus insgesamt fünfzig Mal durchlaufen: 0:01 min Erhitzen auf 95°C mit anschließender

Abkühlphase über 0:20 min bis 60°C. Hierbei kam es zur Anlagerung der Primer sowie zur Verlängerung der DNA-Stränge (100). Die Amplifizierung der DNA konnte in Echtzeit abgebildet werden. Dies gewährleisteten Sonden des Mastermix: vereinfacht wurde mittels eines Reporterfarbstoffs ein zunehmendes Fluoreszenzsignal erzeugt, welches mit jedem Zyklus zunahm. Für jede Probe wurde so die Überschreitung des sogenannten (sog.) Zyklus-Schwellenwertes (C_T -Wert) angegeben. Umso niedriger der C_T -Wert, umso höher war die initiale Menge cDNA. Auf diese Weise ließ sich eine quantitative Bestimmung der Genexpression durchführen (102). Die Ergebnisse wurden mittels Software (StepOnePlus™ Software v2.3) aufbereitet. Die ausgegebenen Mittelwerte der Triplets wurden auf die bestimmte Genexpression des Haushaltgens Calnexin normalisiert und statistisch ausgewertet.

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 8. Die statistische Signifikanz wurde mittels einfacher ANOVA (One-way ANOVA) mit Tukey-Mehrfachvergleichstest (Tukey's correction for multiple comparison) ermittelt. In den Abbildungen und Tabellen werden die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) gezeigt. Es werden relative Werte bezogen auf eine Kontrolle angegeben. Die statistische Signifikanz wurde ab $p < 0,05$ (*) angenommen. Ferner wurden p-Werte $< 0,01$ mit ** beziehungsweise $< 0,001$ mit *** gekennzeichnet. Wird innerhalb einer Tabelle die statistische Beziehung verschiedener Wertepaare dargestellt, so werden für das Signifikanzniveau weitere Symbole verwendet. Dies ist den Legenden der Tabellen zu entnehmen. Die Anzahl ($n=x$) unabhängiger Wiederholungen eines Versuchsaufbaus ist ebenfalls angegeben. Die statistische Auswertung wurde durch die Verfasserin dieser Arbeit durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Veränderungen von cEND-Zellen nach separater Exposition gegenüber Katecholaminen und Entzündungsmediatoren bei Normoxie *in vitro*

Um mögliche Alterationen von cEND-Zellen durch Katecholamine (KAT) sowie Entzündungsmediatoren (INF) zunächst getrennt zu betrachten, wurden diese bei Normoxie über 24 Stunden separat appliziert (vgl. Kap. 2.2.2).

3.1.1 Zellmorphologie nach Applikation von Katecholaminen/Entzündungsmediatoren

Wie in Kap. 2.3.2 beschrieben, wurden die Tight junction-Proteine Claudin-5 sowie ZO-1 angefärbt und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Abb. 9 zeigt die Zellmorphologie nach getrennter Applikation von KAT sowie INF.

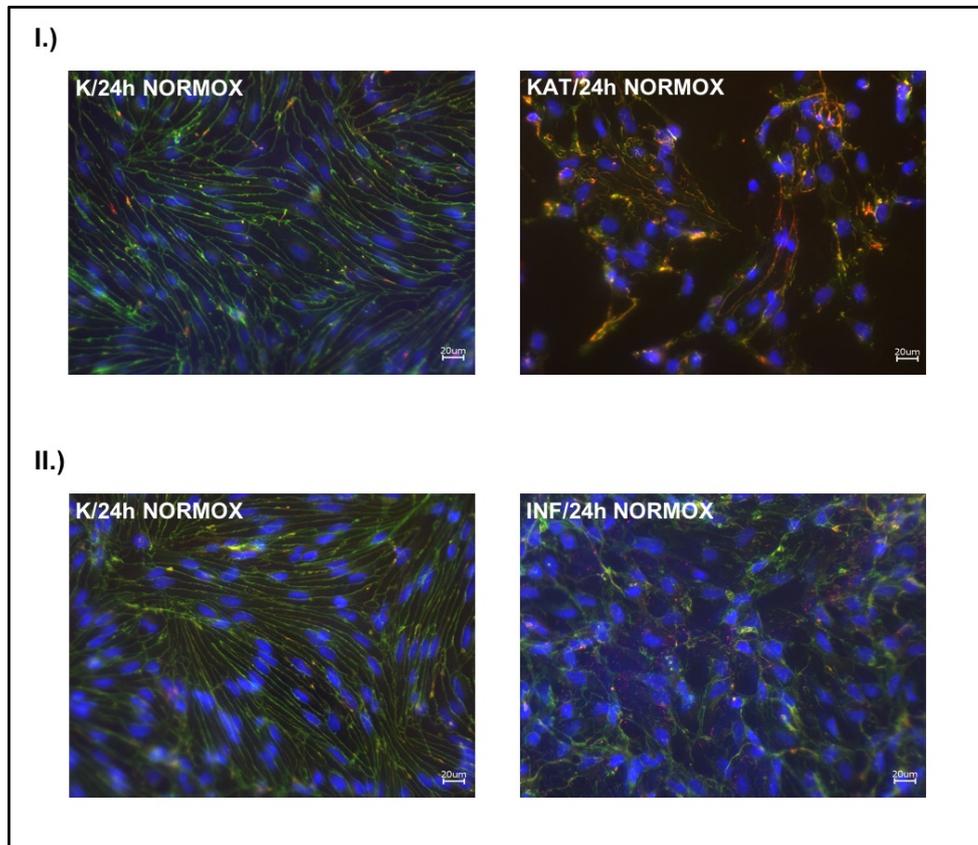


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbungen nach separater Behandlung mit Katecholaminen/Entzündungsmediatoren bei Normoxie

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung nach Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-5 (grün), ZO-1 (rot) sowie der Zellkerne (DAPI, blau) an cEND-Zellen. Zuvor erfolgte die Behandlung mit Katecholaminen (KAT) beziehungsweise Entzündungsmediatoren (INF) bei Normoxie über 24 Stunden (24h NORMOX). Zum Vergleich wurde jeweils eine Kontrolle (K) gefärbt. Die eingefügte Maßstabsleiste umfasst 20 µm. **I.)** Alterierte Zellmorphologie von cEND nach KAT-Applikation bei Normoxie (KAT/24h NORMOX). Die Kontrollfärbung (K/24h NORMOX) präsentiert ein intaktes, kontinuierliches Monolayer aus schlanken Zelleibern, wobei sich nach KAT-Behandlung eine diskontinuierliche, archipelartige Bündelung der Zellen zeigt. **II.)** Alterierte Zellmorphologie von cEND nach INF-Applikation bei Normoxie (INF/24h NORMOX). Die Kontrollfärbung (K/24h NORMOX) präsentiert ein intaktes, kontinuierliches Monolayer aus schlanken Zelleibern, während nach INF-Behandlung ein aufgelockerter Verband aus rundlichen Zellen zu beobachten ist. Belichtungszeiten: Claudin-5 1/5,5s; ZO-1 1,8s; DAPI 0,5s.

Die gefärbten Kontrollen (s. Abb. 9) präsentieren die typische cEND-Morphologie: Die Zellen sind überwiegend spindelförmig und schlank konfiguriert. Sie bilden ein intaktes, kontinuierliches Zellmonolayer ohne erkennbare Defekte (86, 87). Claudin-5 scheint, gemäß seiner histologisch bekannten Position an der Endothelzelle (1, 8), linear entlang der Zell-Zell-Verbindungen lokalisiert. Die erkennbaren Bildkorrelate sind feine, grüne Linien, welche die einzelnen Zellen vollständig einsäumen. Das angefärbte ZO-1 ist gebündelt an der Innenseite der Zellen lokalisiert und scheint als rot fluoreszierendes, kleines Konglomerat den „Claudin-5-Säumen“ von basal anzuliegen. Dies deckt sich ebenfalls mit der bekannten Mikroanatomie (1, 8).

Die KAT-Behandlung über 24 Stunden (s. Abb. 9 I.) KAT/24h NORMOX) führte zu einer deutlichen Verletzung der Integrität des Zellmonolayers. Es lässt sich keine Kontinuität des Zellverbandes mehr beobachten, sondern vielmehr eine archipelartige Bündelung einzelner Zellen. Die typische schlanke Zellform ist überwiegend vorhanden, vereinzelt zeigt sich eine gedrungene Konfiguration. Claudin-5 scheint diskontinuierlich an den Zell-Zell-Verbindungen lokalisiert zu sein. ZO-1 ist ungerichtet versprengt - teils perinukleär, teils gebündelt intrazellulär sowie diffus entlang der Zellgrenzen. Die Applikation von INF über 24 Stunden (s. Abb. 9 II.) INF/24h NORMOX) resultierte im Vergleich zur KAT-Exposition nicht in einer Zerstörung des Zellmonolayers. Es handelt sich weiterhin um einen zusammenhängenden Zellverband. Dieser erscheint aufgelockert. Die Morphologie ist deutlich alteriert: Die einzelnen Zellen präsentieren eine plumpe, rundliche Konfiguration. Das Claudin-5 ist nicht mehr konsequent an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert, sondern bildet einen lockeren, netzartigen Verband. ZO-1 ist als gebündelte Konglomerate erkennbar, welche diffus innerhalb des Zellverbandes liegen. Es konnte insgesamt gezeigt werden, dass die morphologische Integrität des verwendeten *in vitro* Modells der BHS bei Normoxie durch KAT beziehungsweise INF geschädigt wurde.

3.1.2 Proteinlevels nach Applikation von Katecholaminen/Entzündungsmediatoren

Nach getrennter Behandlung mit KAT sowie INF wurden zur Untersuchung der Junctionsprotein-Expression Western Blots durchgeführt (vgl. Kap. 2.3.1). Die statistische Auswertung sowie die Banden jeweils eines repräsentativen Blots sind in Abb. 10 sowie Abb. 11 gezeigt.

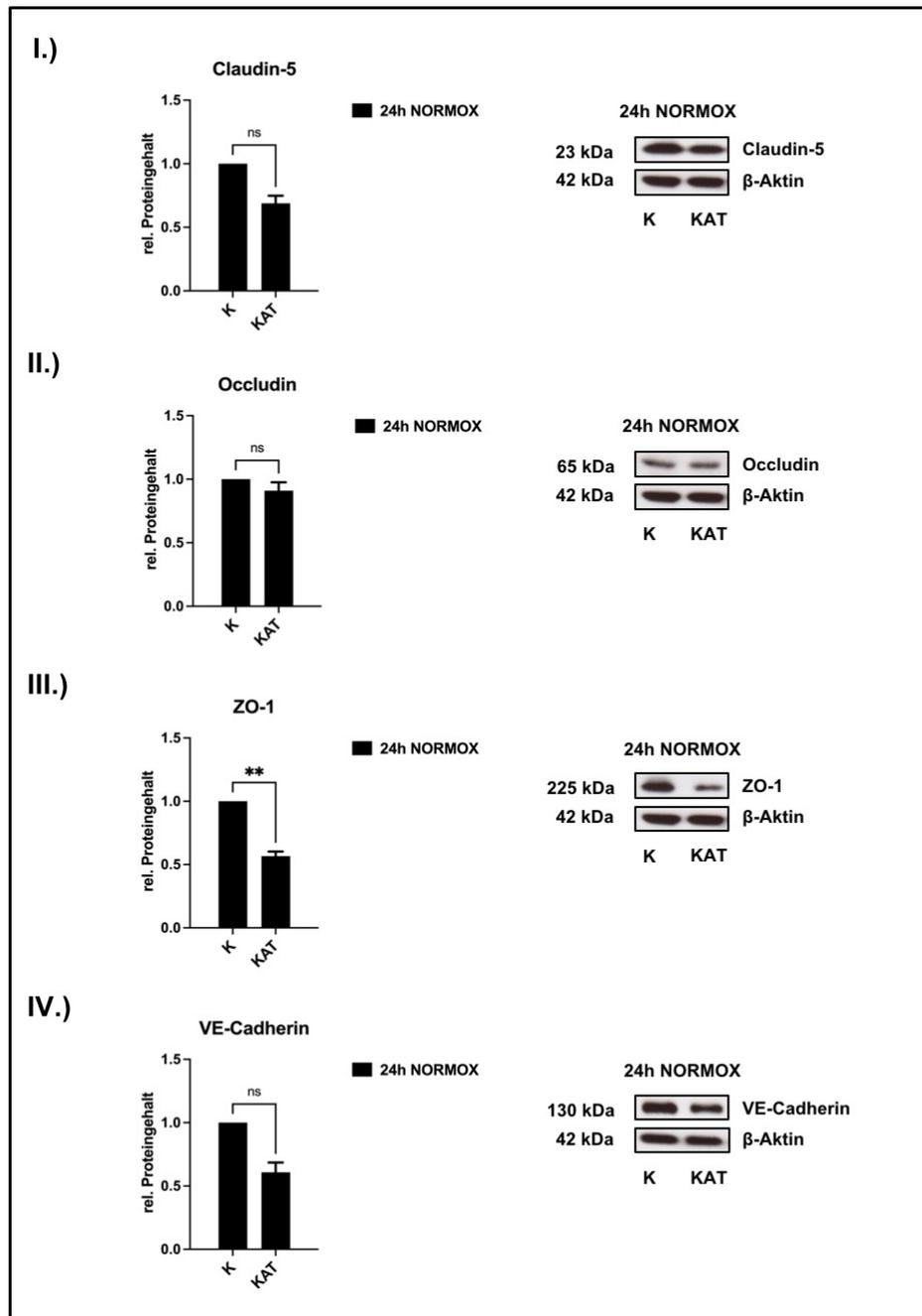


Abbildung 10: Proteinexpression nach Behandlung mit Katecholaminen bei Normoxie

Gezeigt ist die statistische Auswertung des relativen (rel.) Proteingehalts sowie die Banden eines repräsentativen Western Blots zur Bestimmung der quantitativ alterierten Proteinexpression der untersuchten Junctionsproteine. cEND-Zellen wurden über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) mit Katecholaminen (KAT) behandelt. Es erfolgte eine Normalisierung auf β -Aktin, wobei jeweils ein Vielfaches der auf einen Wert von 1 gesetzten Kontrolle (K) dargestellt ist. Statistisch ausgewertet wurden die Mittelwerte \pm SEM von $n=5$ unabhängigen Experimenten. $**p < 0,01$, ns nicht signifikant. **I.)** Proteinexpression von Claudin-5. **II.)** Proteinexpression von Occludin. **III.)** Proteinexpression von ZO-1. **IV.)** Proteinexpression von VE-Cadherin.

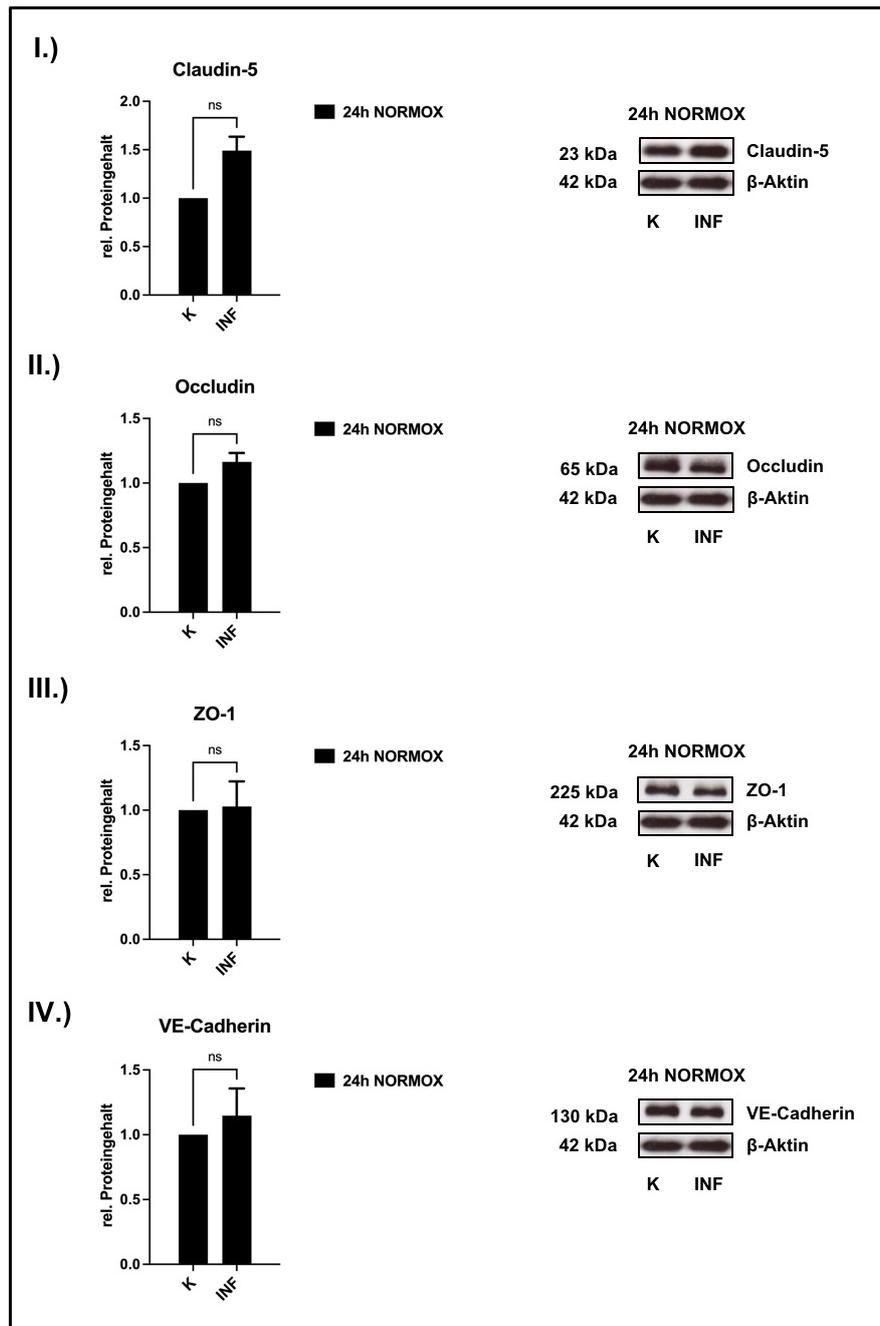


Abbildung 11: Proteinexpression nach Behandlung mit Entzündungsmediatoren bei Normoxie

Gezeigt ist die statistische Auswertung des relativen (rel.) Proteingehalts sowie die Banden jeweils eines repräsentativen Western Blots zur Bestimmung der quantitativ alterierten Proteinexpression der untersuchten Junctionsproteine. cEND-Zellen wurden über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) mit Entzündungsmediatoren (INF) behandelt. Es erfolgte eine Normalisierung auf β -Aktin, wobei jeweils ein Vielfaches der auf einen Wert von 1 gesetzten Kontrolle (K) dargestellt wird. Statistisch ausgewertet wurden die Mittelwerte \pm SEM von $n=5$ unabhängigen Experimenten. ns nicht signifikant. **I.)** Proteinexpression von Claudin-5. **II.)** Proteinexpression von Occludin. **III.)** Proteinexpression von ZO-1. **IV.)** Proteinexpression von VE-Cadherin.

Nach KAT-Applikation über 24 Stunden bei Normoxie wurden keine signifikanten Veränderungen der Proteinlevels von Claudin-5, Occludin sowie VE-Cadherin gezeigt (vgl. Abb. 10 I., II. und IV.). Die Proteinmenge von Claudin-5 und VE-Cadherin nahm auf das $0,69 \pm 0,06$ -fache beziehungsweise das $0,61 \pm 0,08$ -fache ab, allerdings wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Die Proteinexpression von ZO-1 wurde durch KAT signifikant auf das $0,57 \pm 0,04$ -fache reduziert (vgl. Abb. 10 III.).

Die isolierte Behandlung mit INF führte zu keiner signifikanten Alteration des Expressionsverhaltens der untersuchten Proteine (vgl. Abb. 11). Claudin-5 zeigte eine INF-induzierte Steigerung der Expression auf das $1,49 \pm 0,12$ -fache, wobei diese nicht statistisch signifikant war.

3.1.3 Genexpression nach Applikation von Katecholaminen/Entzündungsmediatoren

Nach separater Behandlung mit KAT beziehungsweise INF über 24 Stunden bei Normoxie wurden wie erläutert real-time RT-PCRs durchgeführt (vgl. Kap. 2.4). Die statistische Auswertung ist in Tab. 12 gezeigt.

Tabelle 12: Genexpression nach separater Behandlung mit Katecholaminen/Entzündungsfaktoren bei Normoxie

Gezeigt ist die mittels real-time RT-PCR untersuchte Expression der Zielgene nach getrennter Applikation von Katecholaminen (KAT) beziehungsweise Entzündungsmediatoren (INF) über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX). Alle Werte sind als Vielfaches ihrer korrespondierenden, unbehandelten Kontrollen angegeben, welche auf einen Wert von jeweils 1 gesetzt wurden. Es handelt sich um die errechneten Mittelwerte \pm SEM von n=6 (KAT) sowie n=5 (INF) unabhängigen Experimenten. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ns nicht signifikant.

	<i>K/ 24h NORMOX</i>	<i>KAT/ 24h NORMOX</i>	<i>K/ 24h NORMOX</i>	<i>INF/ 24h NORMOX</i>
Cldn-5	1	0,47 $\pm 0,02$ ***	1	1,18 $\pm 0,21$ ns
Ocln	1	1,05 $\pm 0,11$ ns	1	0,39 $\pm 0,05$ ***
ZO-1	1	0,38 $\pm 0,05$ ***	1	0,52 $\pm 0,05$ ***
VE-Cad.	1	0,55 $\pm 0,02$ ***	1	0,85 $\pm 0,02$ **

	<i>K/ 24h NORMOX</i>	<i>KAT/ 24h NORMOX</i>	<i>K/ 24h NORMOX</i>	<i>INF/ 24h NORMOX</i>
Itga1	1	0,19 ± 0,02 ***	1	0,68 ± 0,15 ns
ItgaV	1	1,82 ± 0,24 *	1	3,31 ± 0,54 **

Die KAT-Behandlung veränderte signifikant die Konzentrationen der messenger-RNA (mRNA) beinahe aller Zielgene. Es konnte eine deutlich reduzierte Genexpression der Junctionsproteine Claudin-5 auf das $0,47 \pm 0,02$ -fache, ZO-1 auf das $0,38 \pm 0,05$ -fache und VE-Cadherin auf das $0,55 \pm 0,02$ -fache detektiert werden. Lediglich die Occludin-Expression wurde nicht modifiziert. Bezüglich der untersuchten Integrinuntereinheiten ergab sich ein auf das $0,19 \pm 0,02$ -fache herabgesetztes mRNA-Level von Integrin- $\alpha 1$, wohingegen Integrin- αV auf das $1,82 \pm 0,24$ -fache induziert wurde. Durch die INF-Applikation wurde die Genexpression von Occludin ($0,39 \pm 0,05$ -fach), von ZO-1 ($0,52 \pm 0,05$ -fach) sowie von VE-Cadherin ($0,85 \pm 0,02$ -fach) signifikant verringert. Weiter resultierte die Behandlung mit INF in einem $3,31 \pm 0,54$ -fach gesteigerten mRNA-Level von Integrin- αV . Von Claudin-5 sowie Integrin- $\alpha 1$ konnten keine relevanten Alterationen auf mRNA-Ebene gezeigt werden.

3.2 Veränderungen von cEND-Zellen durch Exposition gegenüber Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen *in vitro*

Sowohl die Effekte des nachgebildeten Katecholaminsturms als auch der simulierten Neuroinflammation, beziehungsweise systemischen Entzündung, auf die Endothelzellen der BHS *in vitro* wurden getrennt untersucht. Daraufhin erfolgte die gemeinsame Behandlung mit den genannten Stressfaktoren (SF) bei Normoxie über vier sowie 24 Stunden (vgl. Kap. 2.2.2). Des Weiteren wurde ein akut eintretender Sauerstoff- sowie Glucose-Mangel mit folgender Reoxygenierungsphase *in vitro* imitiert (vgl. Kap 2.2.3).

3.2.1 Zellmorphologie nach Applikation von Stressfaktoren

Nach SF-Applikation unter den beschriebenen, variablen Inkubationsbedingungen, erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen mittels Anfärbens der Tight junction-Proteine Claudin-5 und ZO-1 sowie der Zellkerne (vgl. Kap. 2.3.2). Repräsentative Färbungen werden in Abb. 12 gezeigt.

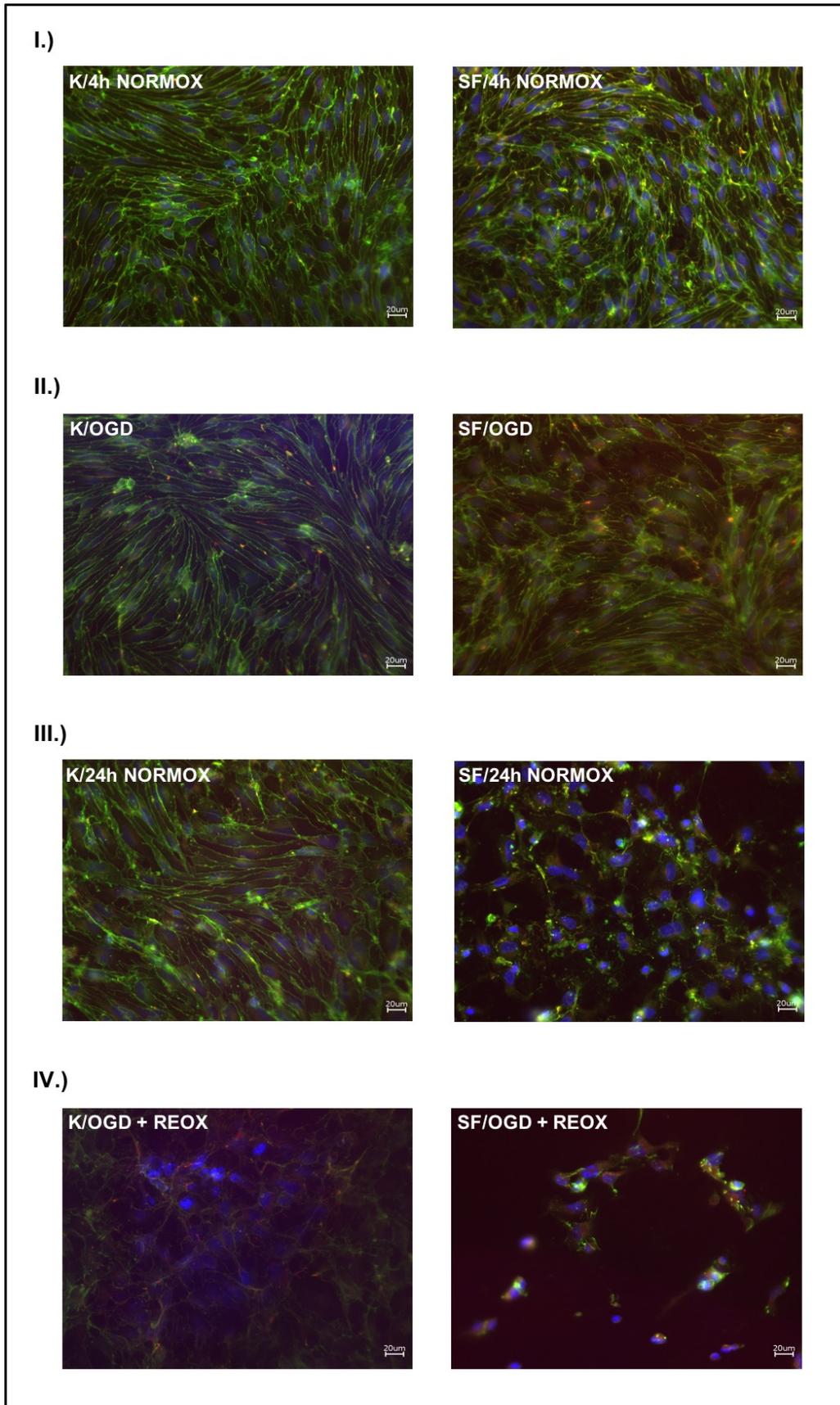


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbungen nach Behandlung mit Stressfaktoren

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen durch das Immunfluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung nach Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-5 (grün), ZO-1 (rot) und der Zellkerne (DAPI, blau) an cEND-Zellen. Zuvor erfolgte die Behandlung mit Stressfaktoren (SF) bei variablen Inkubationsbedingungen. Zum Vergleich wurde jeweils eine unbehandelte Kontrolle (K) bei gleicher Inkubationsbedingung gefärbt. Die eingefügte Maßstabsleiste umfasst 20 µm. **I.)** Zellmorphologie von cEND nach SF-Applikation über vier Stunden bei Normoxie (SF/4h NORMOX) im Vergleich zu einer parallel inkubierten Kontrolle (K/4h NORMOX). Die Kontrollfärbung präsentiert ein intaktes, kontinuierliches Monolayer aus schlanken Zelleibern, wobei sich nach SF-Behandlung ein aufgelockerter Verband kugelig konfigurierter Zellen zeigt. **II.)** Zellmorphologie von cEND nach SF-Applikation bei Sauerstoff-Glucose-Entzug über vier Stunden (SF/OGD) im Vergleich zu einer parallel inkubierten Kontrolle (K/OGD). Die Kontrollfärbung präsentiert ein intaktes, kontinuierliches Monolayer aus schlanken Zelleibern, während nach SF-Behandlung deutliche Defektareale erkennbar sind. **III.)** Zellmorphologie von cEND nach SF-Applikation über 24 Stunden bei Normoxie (SF/24h NORMOX) im Vergleich zu einer parallel inkubierten Kontrolle (K/24h NORMOX). Die Kontrollfärbung präsentiert ein intaktes, kontinuierliches Monolayer aus schlanken Zelleibern, wohingegen nach SF-Behandlung lediglich einzelne Zellkonglomerate zu beobachten sind. **IV.)** Zellmorphologie von cEND nach SF-Applikation bei OGD mit anschließender Reoxygenierung über 20 Stunden (SF/OGD + REOX) im Vergleich zu einer parallel inkubierten Kontrolle (K/OGD + REOX). Die Kontrollfärbung präsentiert eine netzartige Claudin-5-Formation mit zentral gehäuftten Nuclei, nach SF-Behandlung sind lediglich einzelne Konglomerate der angefärbten Komponenten zu sehen. Belichtungszeiten: Claudin-5 1/12s; ZO-1 2s; DAPI 1/3s.

Das Zellmonolayer zeigt in den beiden Kontrollfärbungen bei Normoxie sowie nach OGD das bereits in Kap. 3.1.1 erläuterte, regelrechte Wachstumsmuster (s. Abb. 12 I.) K/4h NORMOX, II.) K/OGD, III.) K/24h NORMOX). Die Zellen sind schlank konfiguriert und bilden einen intakten Verband (86, 87). Die gefärbten Tight junction-Proteine Claudin-5 und ZO-1 sind mikroanatomisch regelrecht lokalisiert (1, 8): Claudin-5 bildet einen kontinuierlichen Saum, wobei ZO-1 von basal her als kleine Konglomerate an diesen angelagert erscheint.

Die vierstündige SF-Applikation führte zu einer Auflockerung des Zellverbandes (s. Abb. 12 I.) SF/4h NORMOX). Es handelt sich weiterhin um ein intaktes Monolayer, wobei sowohl Claudin-5 als auch ZO-1 gemäß ihrer physiologischen Position entlang der Zellgrenzen lokalisiert sind. Die einzelnen cEND-Zellen präsentieren eine kugelige Konfiguration, der Zellverband erscheint netzartig. Im Gegensatz hierzu ist nach 24 Stunden die Integrität des Zellmonolayers kompromittiert (s. Abb. 12 III.) SF/24h NORMOX). Die Zellen sind als einzelne Konglomerate formiert. Das gefärbte Claudin-5 bildet punktuelle Ansammlungen sowie vereinzelt retikuläre Strukturen. ZO-1 ist

willkürlich versprengt. Mehrere Zellkerne liegen frei, ohne lückenlose Umhüllung durch einen Claudin-5-Saum. Das morphologische Schädigungsausmaß durch SF bei Normoxie scheint somit zeitabhängig zu sein: Das cEND-Monolayer wurde nach vier Stunden SF-Applikation lediglich moderat gelockert, wohingegen nach 24 Stunden eine deutliche Zerstörung dessen vorlag. Ferner ist, im Vergleich zur getrennten Behandlung mit KAT beziehungsweise INF über 24 Stunden (vgl. Abb. 9), der Effekt bei gemeinsamer Applikation aus morphologischer Sicht deutlich ausgeprägter.

Nach vierstündiger OGD-Behandlung ohne SF-Applikation lässt sich keine Alteration der cEND-Morphologie verzeichnen (s. Abb. 12 II.) K/OGD). Im Gegensatz dazu zeigt die Kontrollfärbung nach Reoxygenierung eine deutliche Schädigung des cEND-Monolayers (s. Abb. 12 IV.) K/OGD + REOX). Dies wird sowohl im Vergleich mit der über 24 Stunden bei Normoxie inkubierten Kontrolle (s. Abb. 12 III.) K/24h NORMOX) als auch verglichen mit der Kontrolle bei OGD-Bedingungen erkennbar. Es lässt sich kein zusammenhängender Zellverband identifizieren, vielmehr handelt es sich um eine retikuläre Claudin-5-Formation mit vereinzelt eingelagerten ZO-1-Konglomeraten, zentral gehäuft finden sich mehrere Nuclei. Aus morphologischer Sicht scheint ein „Reoxygenierungsschaden“ des verwendeten *in vitro* Modells der BHS vorzuliegen.

Die SF-Applikation unter OGD-Bedingungen kompromittierte deutlich das cEND-Zellmonolayer (s. Abb. 12 II.) SF/OGD). Der Zellverband ist diskontinuierlich aufgelockert, wobei klare Defektareale erkennbar sind. Einige Zellen präsentieren einen plumpen, rundlichen, ein kleiner Anteil weiterhin den regelrecht spindelförmigen Phänotyp. Sowohl Claudin-5 als auch ZO-1 scheinen innerhalb der Defekte chaotisch versprengt. Bei Betrachtung von Abb. 12 I.) SF/4h NORMOX sowie II.) K/OGD kann der Schluss gezogen werden, dass die SF-Applikation und OGD sich wechselseitig potenzieren. Die Kombination resultierte in einer weitreichenderen Schädigung als die jeweils isolierte Exposition. Die SF-Behandlung bei Reoxygenierung verursachte das drastischste Schädigungsausmaß (s. Abb. 12 IV.) SF/OGD + REOX): Die bekannte cEND-Konfiguration ist nicht mehr erkennbar, lediglich sind einzelne Konglomerate aus Nuclei, Claudin-5 und ZO-1 vorhanden. Aus morphologischer Sicht wird die beschriebene Alteration nach Reoxygenierung durch SF somit verstärkt.

Insgesamt führten SF unter allen Inkubationsbedingungen zu einer morphologischen Störung des cEND-Zellmonolayers. Herausgestellt sei die Komponente der Zeitabhängigkeit, wobei die steigende Expositionsdauer bei Normoxie mit einem zunehmenden Ausmaß des Schadens an dem verwendeten *in vitro* Modell der BHS korrelierte. Weiter schien OGD isoliert keine erhebliche Noxe bezüglich der morphologischen Integrität zu sein. Die additive Behandlung mit SF hingegen resultierte in einem potenzierten Schädigungsausmaß im Gegensatz zu der alleinigen Applikation von SF über vier Stunden bei Normoxie. OGD mit einer Reoxygenierungsphase über 20 Stunden verursachte einen „Reoxygenierungsschaden“. Dieser wurde durch die Behandlung mit SF intensiviert.

3.2.2 Proteinlevels nach Applikation von Stressfaktoren

Zur Evaluation alterierter Zielprotein-Levels unter den variablen Inkubationsbedingungen wurden Western Blots der gewonnenen Proben angefertigt (vgl. Kap. 2.3.1). Abb. 13 sowie Abb. 14 zeigen die Modulation der Proteinexpression.

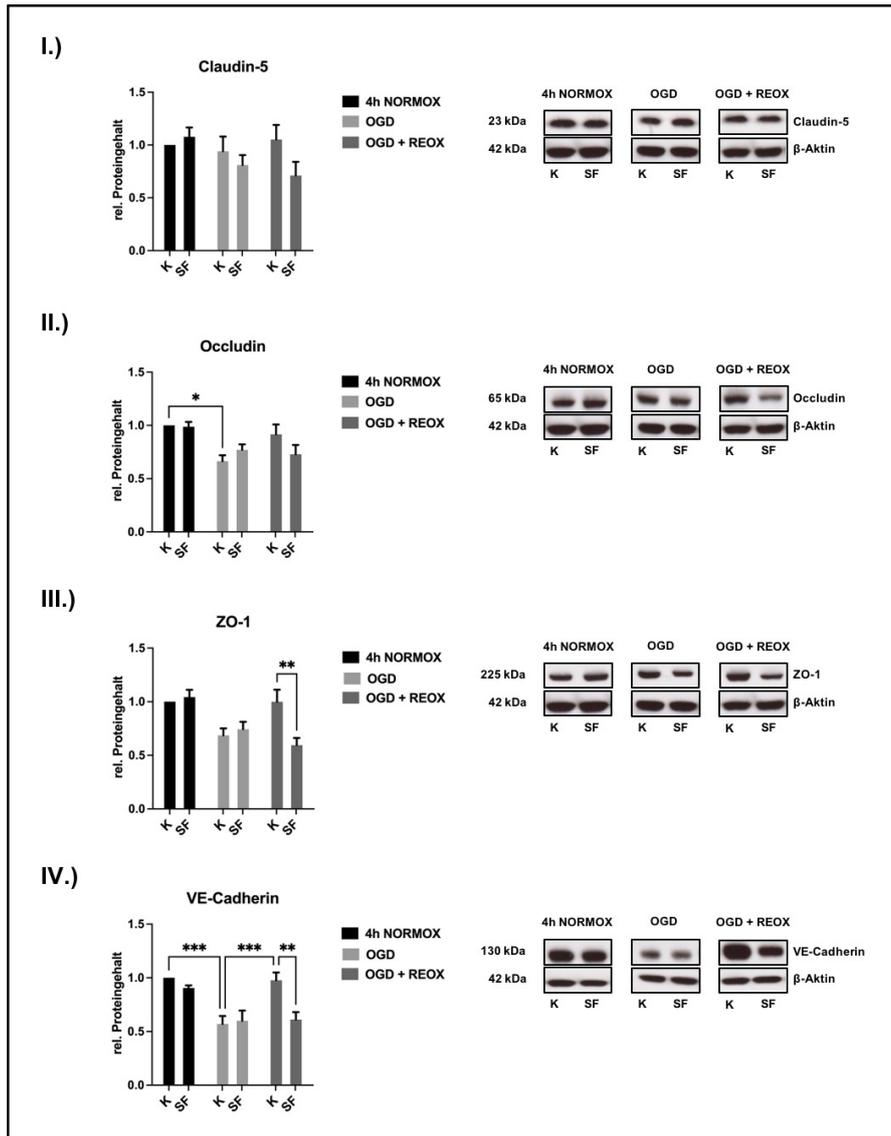


Abbildung 13: Proteinexpression nach Behandlung mit Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen (I)

Gezeigt ist die statistische Auswertung des relativen (rel.) Proteingehalts sowie die Banden eines jeweils repräsentativen Western Blots zur Bestimmung der quantitativ alterierten Proteinexpression der untersuchten Zielproteine. Es wurden cEND-Zellen über vier Stunden bei Normoxie (4h NORMOX), vier Stunden bei Sauerstoff-Glucose-Entzug (OGD) sowie bei anschließender Reoxygenierung über 20 Stunden (OGD + REOX) mit Stressfaktoren (SF) behandelt. Parallel wurde eine unbehandelte Kontrolle (K) jeder Inkubationsbedingung analysiert. Es erfolgte eine Normalisierung auf β -Aktin, wobei ein Vielfaches der auf einen Wert von 1 gesetzten, unbehandelten K bei 4h NORMOX dargestellt ist. Statistisch ausgewertet wurden die Mittelwerte \pm SEM von n=8 unabhängigen Experimenten. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Das Fehlen der Kennzeichnung der statistischen Beziehung steht für einen nicht signifikanten Unterschied. **I.)** Proteinexpression von Claudin-5. **II.)** Proteinexpression von Occludin. **III.)** Proteinexpression von ZO-1. **IV.)** Proteinexpression von VE-Cadherin.

Claudin-5 wurde auf Proteinebene durch keine der geschilderten Inkubationsbedingungen beziehungsweise Behandlungskombinationen alteriert (vgl. Abb. 13 I.). Wie Abb. 13 II.) zeigt, wurde Occludin durch OGD auf das $0,66 \pm 0,06$ -fache reduziert, in Kombination mit SF konnte dies nicht beobachtet werden. Die übrigen Behandlungskonstellationen hatten keinen relevanten Effekt. ZO-1 erfuhr in seiner Expression keine Veränderung innerhalb der untersuchten Zeitspanne über vier Stunden, weder durch OGD noch durch SF beziehungsweise die Kombination (vgl. Abb. 13 III.). Nach Reoxygenierung zeigte ZO-1 eine durch SF signifikant verringerte Expression ($0,59 \pm 0,07$ -facher Proteingehalt) gegenüber der alleinigen Reoxygenierung ($1,0 \pm 0,11$ -facher Proteingehalt). Wie in Abb. 13 IV.) ersichtlich, wurde das Proteinlevel von VE-Cadherin durch OGD signifikant auf das $0,57 \pm 0,07$ -fache reduziert. Nach Reoxygenierung war ein maßgeblicher Anstieg auf das $0,98 \pm 0,07$ -fache, verglichen mit der Inkubation über vier Stunden bei Normoxie, zu beobachten. Dies wurde nach SF-Behandlung nicht detektiert. Ferner resultierte die Applikation von SF innerhalb derselben Inkubationsbedingung auf Proteinebene weder nach vier Stunden Normoxie noch nach OGD in statistisch relevanten Alterationen. Lediglich nach Reoxygenierung wurde die Expression von VE-Cadherin durch SF ($0,61 \pm 0,07$ -facher Proteingehalt), gegenüber der entsprechenden Kontrolle ($0,98 \pm 0,07$ -facher Proteingehalt), signifikant verringert.

Um die Modulation der Proteinexpression über die Zeitspanne von 24 Stunden zu untersuchen, wurden die nach vierstündigem Sauerstoff-Glucose-Entzug mit anschließender Reoxygenierung über 20 Stunden gewonnenen Zelllysate mit denen der nach 24 Stunden bei Normoxie inkubierten Proben verglichen.

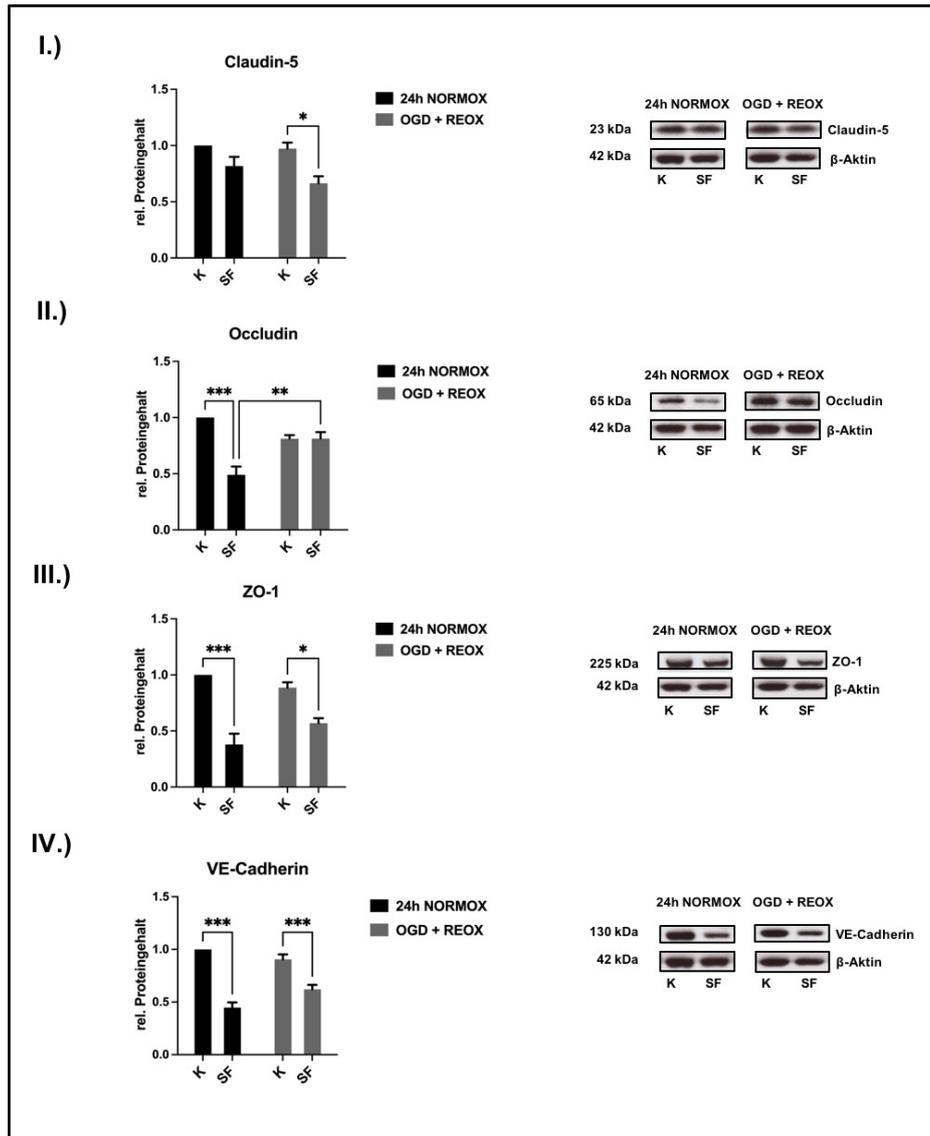


Abbildung 14: Proteinexpression nach Behandlung mit Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen (II)

Gezeigt ist die statistische Auswertung des relativen (rel.) Proteingehalts sowie die Banden eines repräsentativen Western Blots zur Bestimmung der quantitativ alterierten. Es wurden cEND-Zellen über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) sowie über vier Stunden bei Sauerstoff-Glucose-Entzug mit anschließender Reoxygenierung über 20 Stunden (OGD + REOX) mit Stressfaktoren (SF) behandelt. Parallel wurde eine unbehandelte Kontrolle (K) jeder Inkubationsbedingung analysiert. Es erfolgte eine Normalisierung auf β -Aktin, wobei ein Vielfaches der auf einen Wert von 1 gesetzten, unbehandelten K bei 24h NORMOX dargestellt ist. Statistisch ausgewertet wurden die Mittelwerte \pm SEM von n=10 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Das Fehlen der Kennzeichnung der statistischen Beziehung steht für einen nicht signifikanten Unterschied. **I.)** Proteinexpression von Claudin-5. **II.)** Proteinexpression von Occludin. **III.)** Proteinexpression von ZO-1. **IV.)** Proteinexpression von VE-Cadherin.

Die Expression von Claudin-5 wurde durch Reoxygenierung in Kombination mit SF ($0,67 \pm 0,06$ -facher Proteingehalt), verglichen mit der alleinigen Reoxygenierung ($0,97 \pm 0,05$ -facher Proteingehalt), signifikant verringert (vgl. Abb. 14 I.). Claudin-5 zeigte ebenso wie das Tight junction-Protein Occludin (vgl. Abb. 14 II.) in der unbehandelten Kontrolle nach Reoxygenierung keine relevant veränderte Proteinmenge gegenüber der Kontrolle nach 24 Stunden Normoxie. Die SF-Applikation bei 24 Stunden Normoxie führte zu einer verminderten Occludin-Expression ($0,49 \pm 0,07$ -fach). Im Gegensatz dazu, konnte kein signifikanter SF-Effekt nach Reoxygenierung detektiert werden. Die Behandlung mit SF während der Reoxygenierungsphase resultierte in einem Anstieg des relativen Occludin-Gehalts ($0,81 \pm 0,03$ -fach) gegenüber der SF-Applikation bei Normoxie über 24 Stunden ($0,49 \pm 0,07$ -fach). Ein signifikanter Unterschied der ZO-1-Expression nach 24-stündiger Normoxie gegenüber der Reoxygenierung konnte nicht gezeigt werden (vgl. Abb. 14 III.). Die Behandlung mit SF resultierte ebenso in keiner relevanten Alteration zwischen den Inkubationsbedingungen. Innerhalb derselben Inkubationsbedingung führten SF zu einer deutlichen Reduktion des ZO-1-Proteinlevels: bei Normoxie auf das $0,38 \pm 0,1$ -fache, nach Reoxygenierung auf das $0,57 \pm 0,04$ -fache gegenüber eines $0,89 \pm 0,05$ -fachen Proteingehalts nach alleiniger Reoxygenierung. VE-Cadherin zeigte ein analoges Expressionsverhalten (vgl. Abb. 14 IV.): Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Inkubationsbedingungen. Innerhalb der Normoxie-Gruppe resultierte die SF-Behandlung in einem verminderten Proteingehalt ($0,45 \pm 0,05$ -fach). Nach Reoxygenierung zeigte sich der gleiche Trend ($0,62 \pm 0,04$ -facher Proteingehalt SF/OGD + REOX versus (vs.) $0,91 \pm 0,05$ -facher Proteingehalt K/OGD + REOX). Insgesamt konnten folgende Tendenzen beobachtet werden: Der Sauerstoff-Glucose-Entzug führte zu reduzierten Proteinmengen, wobei diese nach anschließender Reoxygenierung erneut anstiegen. Ferner präsentierte sich der signifikante SF-Effekt innerhalb einer Inkubationsbedingung zeitgebunden: nach vierstündiger Applikation, sowohl unter OGD-Bedingungen als auch bei Normoxie, gab es keine relevanten Alterationen. Nach 24 Stunden wurde, bei Normoxie sowie nach Reoxygenierung, zumeist eine signifikante Reduktion der Proteinlevels verzeichnet.

3.2.3 *Genexpression nach Applikation von Stressfaktoren*

Zur Evaluation der Genexpression unter variablen Inkubationsbedingungen wurden real-time RT-PCRs durchgeführt (vgl. Kap. 2.4). Tab. 13 und 14 zeigen mRNA-Levels.

Tabelle 13: Genexpression nach Behandlung mit Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen (I)

Gezeigt ist die mittels real-time RT-PCR untersuchte Expression aller Zielgene nach Applikation von Stressfaktoren (SF) über vier Stunden bei Normoxie (4h NORMOX) sowie nach vier Stunden Sauerstoff-Glucose-Entzug (OGD) mit konsekutiver Reoxygenierung über 20 Stunden (OGD + REOX). Ferner werden die mRNA-Levels der jeweils korrespondierenden Kontrollen (K) dargestellt. Alle Werte sind als Vielfaches der unbehandelten K nach 4h NORMOX angegeben, welche auf einen Wert von 1 gesetzt wurde. Es handelt sich um die errechneten Mittelwerte \pm SEM von n=10 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde bezüglich des jeweiligen Zielgens wie folgt markiert: SF/4h NORMOX sowie K/OGD gegenüber K/4h NORMOX: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. K/OGD + REOX gegenüber K/OGD: §p < 0,05, §§§p < 0,001. SF/OGD gegenüber K/OGD: +p < 0,05, ++p < 0,01, +++p < 0,001. SF/OGD + REOX gegenüber K/OGD + REOX: %%%p < 0,001. SF/OGD gegenüber SF/4h NORMOX: #p < 0,05. SF/OGD + REOX gegenüber SF/OGD: §§p < 0,01, §§§p < 0,001. Findet sich der Übersichtlichkeit halber keine Kennzeichnung der statistischen Beziehung, ist dies als nicht signifikanter Unterschied zu verstehen.

	K/ 4h NORMOX	SF/ 4h NORMOX	K/ ODG	SF/ ODG	K/ ODG + REOX	SF/ ODG + REOX
Cldn-5	1	0,92 \pm 0,05	0,49 \pm 0,07 ***	0,56 \pm 0,11 #	0,88 \pm 0,07 §	0,29 \pm 0,06 %%%
Ocln	1	0,21 \pm 0,02 ***	0,34 \pm 0,06 ***	0,08 \pm 0,02 +	1,12 \pm 0,07 §§§	0,26 \pm 0,05 %%%
ZO-1	1	0,3 \pm 0,02 ***	0,7 \pm 0,08 *	0,33 \pm 0,03 ++	1,26 \pm 0,06 §§§	0,28 \pm 0,1 %%%
VE-Cad.	1	0,73 \pm 0,07	1,56 \pm 0,11 ***	1,06 \pm 0,07 +++ #	1,03 \pm 0,03 §§§	0,41 \pm 0,06 %%% §§§
Itga1	1	0,54 \pm 0,02 ***	0,69 \pm 0,05	0,47 \pm 0,07	1,43 \pm 0,12 §§§	0,05 \pm 0,06 %%% §§
ItgaV	1	3,8 \pm 0,6 *	4,08 \pm 0,72 *	6,5 \pm 1,08	1,0 \pm 0,04 §	1,47 \pm 0,05 §§§

Zunächst wurden die SF-Effekte innerhalb einer Inkubationsbedingung betrachtet: Nach vierstündiger Normoxie wurden die mRNA-Levels von Occludin (0,21 \pm 0,02-fach), ZO-1 (0,3 \pm 0,02-fach) sowie Integrin- α 1 (0,54 \pm 0,02-fach) relevant verringert. Die Expression von Integrin- α V wurde induziert (3,8 \pm 0,6-fach). VE-Cadherin und Claudin-

5 wurden nicht signifikant alteriert. Bei OGD erfuhren Occludin ($0,08 \pm 0,02$ SF/ODG vs. $0,34 \pm 0,06$ K/ODG), ZO-1 ($0,33 \pm 0,03$ SF/ODG vs. $0,7 \pm 0,08$ K/ODG) sowie VE-Cadherin ($1,06 \pm 0,07$ SF/ODG vs. $1,56 \pm 0,11$ K/ODG) eine maßgebliche Reduktion. Die übrigen Zielgene zeigten keinen SF-Effekt bezüglich ihrer Expression. Unter Reoxygenierung applizierte SF führten zu signifikant verringerten mRNA-Levels von Claudin-5 ($0,29 \pm 0,06$ -fach SF/ODG + REOX vs. $0,88 \pm 0,07$ -fach K/ODG + REOX), Occludin ($0,26 \pm 0,05$ -fach SF/ODG + REOX vs. $1,12 \pm 0,07$ -fach K/ODG + REOX), ZO-1 ($0,28 \pm 0,1$ -fach SF/ODG + REOX vs. $1,26 \pm 0,06$ -fach K/ODG + REOX), VE-Cadherin ($0,41 \pm 0,06$ -fach SF/ODG + REOX vs. $1,03 \pm 0,03$ -fach K/ODG + REOX) sowie Integrin- $\alpha 1$ ($0,05 \pm 0,06$ -fach SF/ODG + REOX vs. $1,43 \pm 0,12$ -fach K/ODG + REOX). Das Integrin- αV -Gen wurde in seiner Transkription durch eine SF-Applikation bei Reoxygenierung nicht beeinflusst.

Die mRNA-Levels der Junctionsproteine Claudin-5 ($0,49 \pm 0,07$ -fach), Occludin ($0,34 \pm 0,06$ -fach) sowie ZO-1 ($0,7 \pm 0,08$ -fach) wurden durch OGD, verglichen mit den Proben nach vierstündiger Normoxie, signifikant reduziert. Unter SF-Einfluss konnte eine maßgebliche Modulation der Genexpression nur für Claudin-5 ($0,56 \pm 0,11$ -fach SF/ODG vs. $0,92 \pm 0,05$ -fach SF/NORMOX) gezeigt werden. Durch die Reoxygenierungsphase erfolgte eine Induktion der Expression auf das $0,88 \pm 0,07$ -fache (Claudin-5), das $1,12 \pm 0,07$ -fache (Occludin) sowie das $1,26 \pm 0,06$ -fache (ZO-1), was bei simultaner SF-Applikation nicht beobachtet werden konnte. Das mRNA-Level von VE-Cadherin wurde durch OGD auf das $1,56 \pm 0,11$ -fache hochreguliert, gefolgt von einem Abfall auf das $1,03 \pm 0,03$ -fache nach Reoxygenierung. Dieser Trend bestand auch unter SF-Behandlung weiter: die VE-Cadherin-Expression wurde bei OGD induziert ($1,06 \pm 0,07$ -fach SF/ODG vs. $0,73 \pm 0,07$ -fach SF/4h NORMOX) und durch die folgende Reoxygenierung auf das $0,41 \pm 0,06$ -fache reduziert. Integrin- $\alpha 1$ wurde auf mRNA-Ebene weder durch OGD noch durch die Kombination von OGD und SF alteriert. Die Reoxygenierung ohne SF induzierte einen signifikanten Anstieg des Integrin- $\alpha 1$ -Levels auf das $1,43 \pm 0,12$ -fache (vs. $0,69 \pm 0,05$ -fach K/ODG). Bei simultaner SF-Applikation mit Reoxygenierung wurde die Integrin- $\alpha 1$ -Expression auf das $0,05 \pm 0,06$ -fache (vs. $0,47 \pm 0,07$ -fach SF/ OGD) herunterreguliert. Integrin- αV wurde durch OGD signifikant auf das $4,08 \pm 0,72$ -fache gesteigert, wobei nach Reoxygenierung ein Abfall auf das $1,0 \pm 0,04$ -fache resultierte. Unter SF-Einfluss zeigte sich ebenfalls eine Induktion durch OGD,

allerdings wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Die Reoxygenierung kombiniert mit SF führte zu einer Reduktion des mRNA-Levels von Integrin- α V auf das $1,47 \pm 0,05$ -fache gegenüber der Kombination aus OGD und SF ($6,5 \pm 1,08$ -fach).

Um Alterationen der Genexpression über eine Zeitspanne von 24 Stunden untersuchen zu können, wurden die Proben nach OGD mit Reoxygenierung sowie nach 24 Stunden Normoxie miteinander verglichen (s. Tab. 14). Die RT-PCR-Daten der Reoxygenierung, welche bereits in Tab. 13 gezeigt wurden, wurden erneut herangezogen.

Tabelle 14: Genexpression nach Behandlung mit Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen (II)

Gezeigt ist die mittels real-time RT-PCR untersuchte Expression aller Zielgene nach Applikation von Stressfaktoren (SF) über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) sowie nach vier Stunden Sauerstoff-Glucose-Entzug mit anschließender Reoxygenierung über 20 Stunden (OGD + REOX). Ferner werden die mRNA-Levels der jeweils korrespondierenden Kontrollen (K) dargestellt. Alle Werte sind als Vielfaches der unbehandelten K nach 24h NORMOX angegeben, welche auf einen Wert von 1 gesetzt wurde. Es handelt sich um die errechneten Mittelwerte \pm SEM von n=10 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde bezüglich des jeweiligen Zielgens wie folgt markiert: SF/24h NORMOX und K/OGD + REOX gegenüber K/24h NORMOX: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. SF/OGD + REOX gegenüber K/OGD + REOX: §p < 0,05, §§p < 0,01, §§§p < 0,001. Findet sich der Übersichtlichkeit halber keine Kennzeichnung der statistischen Beziehung, ist dies als nicht signifikanter Unterschied zu verstehen.

	K/ 24h NORMOX	SF/ 24h NORMOX	K/ OGD + REOX	SF/ OGD + REOX
Cldn-5	1	0,25 \pm 0,05 ***	0,87 \pm 0,03	0,33 \pm 0,06 §§§
Ocln	1	0,08 \pm 0,01 ***	1,35 \pm 0,07 ***	0,32 \pm 0,06 §§§
ZO-1	1	0,15 \pm 0,05 ***	1,12 \pm 0,04	0,24 \pm 0,08 §§§
VE-Cad.	1	0,46 \pm 0,05 ***	1,05 \pm 0,03	0,32 \pm 0,01 §§§
Itga1	1	0,19 \pm 0,05 ***	1,32 \pm 0,07 **	0,05 \pm 0,01 §§§
ItgaV	1	1,82 \pm 0,3 **	1,01 \pm 0,04	1,51 \pm 0,12

Die SF-Behandlung über 24 Stunden bei Normoxie resultierte in einer verminderten Genexpression von Claudin-5 ($0,25 \pm 0,05$ -fach), Occludin ($0,08 \pm 0,01$ -fach), ZO-1 ($0,15 \pm 0,05$ -fach), VE-Cadherin ($0,46 \pm 0,05$ -fach) sowie Integrin- $\alpha 1$ ($0,19 \pm 0,05$ -fach). Das mRNA-Level von Integrin- αV wurde auf das $1,82 \pm 0,3$ -fache gesteigert. Nach Reoxygenierung mit zeitgleicher SF-Applikation wurde eine Reduktion der Genexpression aller untersuchten Junktionsproteine sowie von Integrin- $\alpha 1$, verglichen mit der alleinigen Reoxygenierung, beobachtet: von Claudin-5 auf das $0,33 \pm 0,06$ -fache (vs. $0,87 \pm 0,03$ -fach K/OGD + REOX), von Occludin auf das $0,32 \pm 0,06$ -fache (vs. $1,35 \pm 0,07$ -fach K/OGD + REOX), von ZO-1 auf das $0,24 \pm 0,08$ -fache (vs. $1,12 \pm 0,04$ -fach K/OGD + REOX), von VE-Cadherin auf das $0,32 \pm 0,01$ -fache (vs. $1,05 \pm 0,03$ -fach K/OGD + REOX) sowie von Integrin- $\alpha 1$ auf das $0,05 \pm 0,01$ -fache (vs. $1,32 \pm 0,07$ -fach K/OGD + REOX). Integrin- αV wurde nicht relevant alteriert. Die mRNA-Levels von Claudin-5, ZO-1 sowie VE-Cadherin zeigten nach Reoxygenierung, verglichen mit der Inkubation bei Normoxie, keine signifikanten Veränderungen. Dies war sowohl bei simultaner SF-Applikation als auch ohne diese gegeben. Die Genexpression von Occludin ($1,35 \pm 0,07$ -fach) sowie Integrin- $\alpha 1$ ($1,32 \pm 0,07$ -fach) wurde durch die Reoxygenierung, gegenüber der 24-stündigen Normoxie, induziert. Unter SF-Einfluss konnten keine Unterschiede gezeigt werden. Die Genexpression von Integrin- αV wurde durch Reoxygenierung, sowohl mit SF-Behandlung als auch ohne diese, nicht signifikant alteriert.

Die Effekte der variablen Inkubationsbedingungen sowie der SF-Applikation auf die Genexpression der untersuchten Junktionsproteine sind heterogen ausgeprägt. Es konnte eine Zeitgebundenheit der SF-Effekte gezeigt werden. Im Speziellen gilt dies für Claudin-5 und VE-Cadherin: Während nach vierstündiger SF-Applikation bei Normoxie die mRNA-Levels nicht alteriert waren, lag nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion dieser vor. Insgesamt konnte der Trend einer herabgesetzten Genexpression der Junktionsproteine sowie von Integrin- $\alpha 1$ nach OGD beobachtet werden, gefolgt von einem erneuten Anstieg nach Reoxygenierung. VE-Cadherin hingegen wurde durch OGD induziert sowie durch die konsekutive Reoxygenierung supprimiert. Integrin- αV zeigte gegenüber den übrigen Zielgenen weitestgehend entgegengesetzte Tendenzen.

3.3 Effekte einer Östrogen-Behandlung auf cEND-Zellen *in vitro*

Alle beschriebenen Experimente wurden parallel unter E2-Applikation durchgeführt, um die Hypothese eines protektiven Östrogen-Effekts *in vitro* zu untersuchen. Die E2-Behandlung erfolgte wie in Kap. 2.2.2 sowie Kap. 2.2.3 erläutert.

3.3.1 Veränderungen von cEND-Zellen nach getrennter Applikation von Katecholaminen und Entzündungsmediatoren bei Normoxie unter Östrogen-Behandlung

3.3.1.1 Zellmorphologie

Zur Untersuchung einer möglichen E2-induzierten Protektion der regelrechten cEND-Morphologie bei getrennter Behandlung mit KAT sowie INF bei Normoxie wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (vgl. Kap. 2.3.3). Als Vergleichsaufnahmen dienten, die in Kap. 3.1.1 charakterisierten, parallel angefertigten Aufnahmen. In Abb. 15 ist die Morphologie der cEND-Zellen nach Abschluss des beschriebenen Versuchsaufbaus gezeigt.

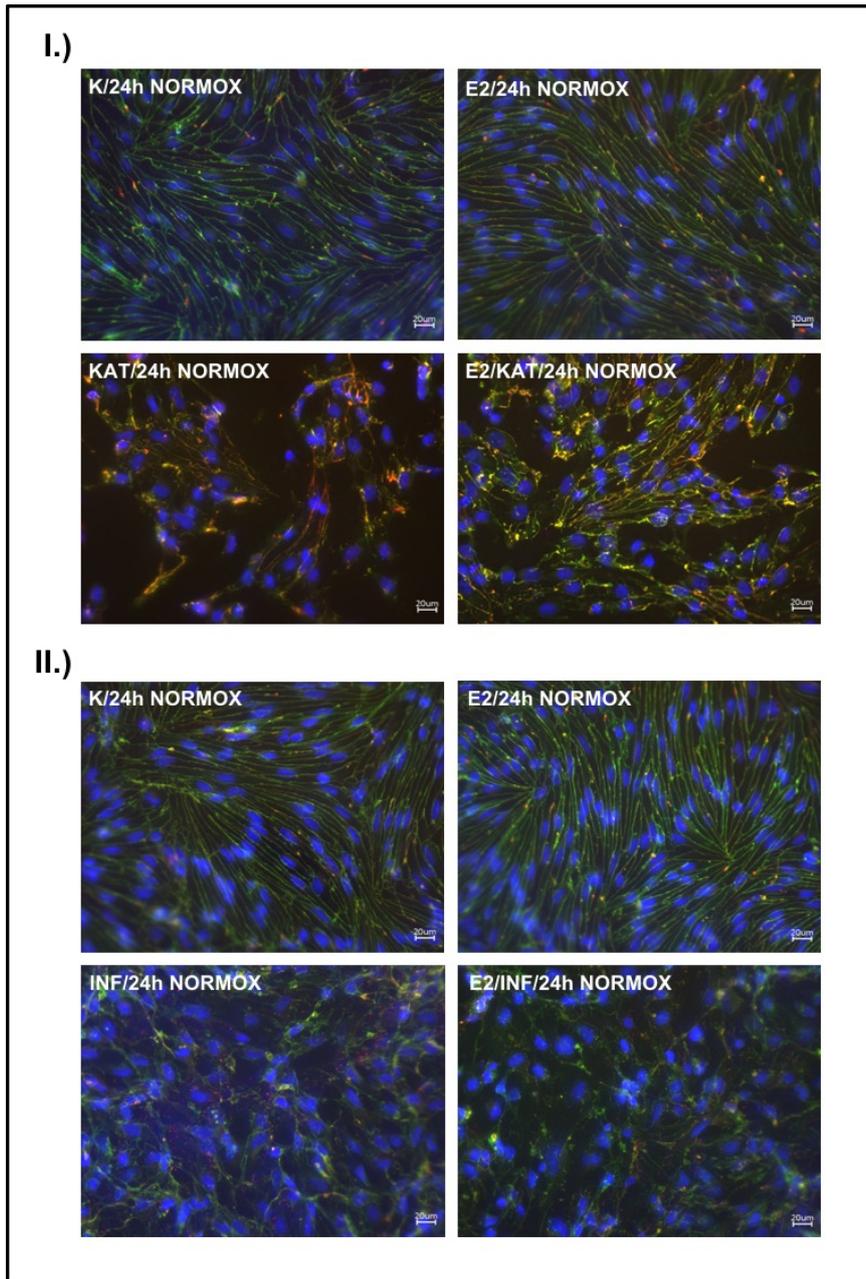


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung nach separater Behandlung mit Katecholaminen/Entzündungsmediatoren unter Östrogen-Applikation bei Normoxie

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen bei 400-facher Vergrößerung von Claudin-5 (grün), ZO-1 (rot) und der Zellkerne (DAPI, blau) an cEND-Zellen. Es erfolgte die separate Behandlung mit Katecholaminen (KAT) sowie Entzündungsmediatoren (INF) bei Normoxie über 24 Stunden (24h NORMOX) unter Östrogen-Applikation (E2). Die eingefügte Maßstabsleiste umfasst 20 μm . **I.)** Zellmorphologie von cEND unter E2-Behandlung (E2/24h NORMOX) sowie nach KAT-Applikation unter E2-Behandlung (E2/KAT/24h NORMOX) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (K/24h NORMOX) sowie der alleinigen KAT-Applikation (KAT/24h NORMOX). K/24h NORMOX sowie E2/24h NORMOX präsentieren ein intaktes, kontinuierliches Monolayer aus schlanken Zelleibern, wobei

KAT/24h NORMOX eine archipelartige Bündelung der Zellen aufweist. E2/KAT/24h NORMOX erscheint zwar ebenso diskontinuierlich, allerdings deutlich dichter als KAT/24h NORMOX. II.) Zellmorphologie von cEND unter E2-Behandlung (E2/24h NORMOX) sowie nach INF-Applikation unter E2-Behandlung (E2/INF/24h NORMOX) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (K/24h NORMOX) sowie der alleinigen INF-Applikation (INF/24h NORMOX). K/24h NORMOX sowie E2/24h NORMOX präsentieren ein intaktes, kontinuierliches Monolayer aus schlanken Zelleibern, während sowohl bei INF/24h NORMOX als auch bei E2/INF/24h NORMOX ein aufgelockerter Verband aus rundlichen Zellen vorliegt. Belichtungszeiten: Claudin-5 1/5,5s; ZO-1 1,8s; DAPI 0,5s.

Unter E2-Applikation über 24 Stunden bei Normoxie zeigt das cEND-Zellmonolayer weiterhin die bereits in Kap. 3.1.1 charakterisierte, regelrechte Konfiguration (s. Abb. 15 I.) E2/24h NORMOX und II.) E2/24h NORMOX). Es sind keine Defekte erkennbar, weiter befinden sich die gefärbten Tight junction-Proteine an ihrer mikroanatomisch korrekten Position. Es sind keine morphologischen Unterschiede zwischen den Kontrollaufnahmen sowie den mit E2 inkubierten Zellen detektierbar. Nach E2-Behandlung erscheint das Fluoreszenzsignal von Claudin-5 insgesamt in beiden Färbungen intensiviert, was als E2-induzierte Verstärkung des vorhandenen Claudin-5-Saumes interpretiert werden kann. Die KAT-Exposition unter E2-Applikation (s. Abb. 15 I.) E2/KAT/24h NORMOX) führte, im Vergleich zur solitären KAT-Applikation (s. Abb. 15 I.) KAT/24h NORMOX), zu einer milderer Schädigung des cEND-Monolayers. Es sind ebenfalls deutliche Defektareale zu erkennen, dennoch erscheint der Zellverband innerhalb der archipelartig formierten Zellgruppen dichter. Weiter präsentieren die überwiegend regelrecht spindelförmigen Zellen einen kräftigen Claudin-5-Saum mit von basal angelagerten ZO-1-Konglomeraten. Dies konnte in der E2-freien Probe nicht beobachtet werden (vgl. Kap. 3.1.1). Im Gegensatz hierzu ist kein E2-Effekt nach INF-Behandlung zu verzeichnen (s. Abb. 15 II.) E2/INF/24h NORMOX): die cEND-Zellen zeigen das gleiche, bereits in Kap. 3.1.1 beschriebene Schädigungsmuster, wie nach alleiniger INF-Applikation (s. Abb. 15 II.) INF/24h NORMOX).

3.3.1.2 Proteinlevels

Nach getrennter Applikation von KAT sowie INF unter E2-Behandlung wurden zur Untersuchung der Junctionsprotein-Expression Western Blots angefertigt (vgl. Kap. 2.3.1). Als Vergleichsdaten wurden die erläuterten Ergebnisse aus Kap. 3.1.2 herangezogen. Die statistische Auswertung sowie die Banden jeweils eines repräsentativen Blots werden in Abb. 16 sowie Abb. 17 gezeigt.

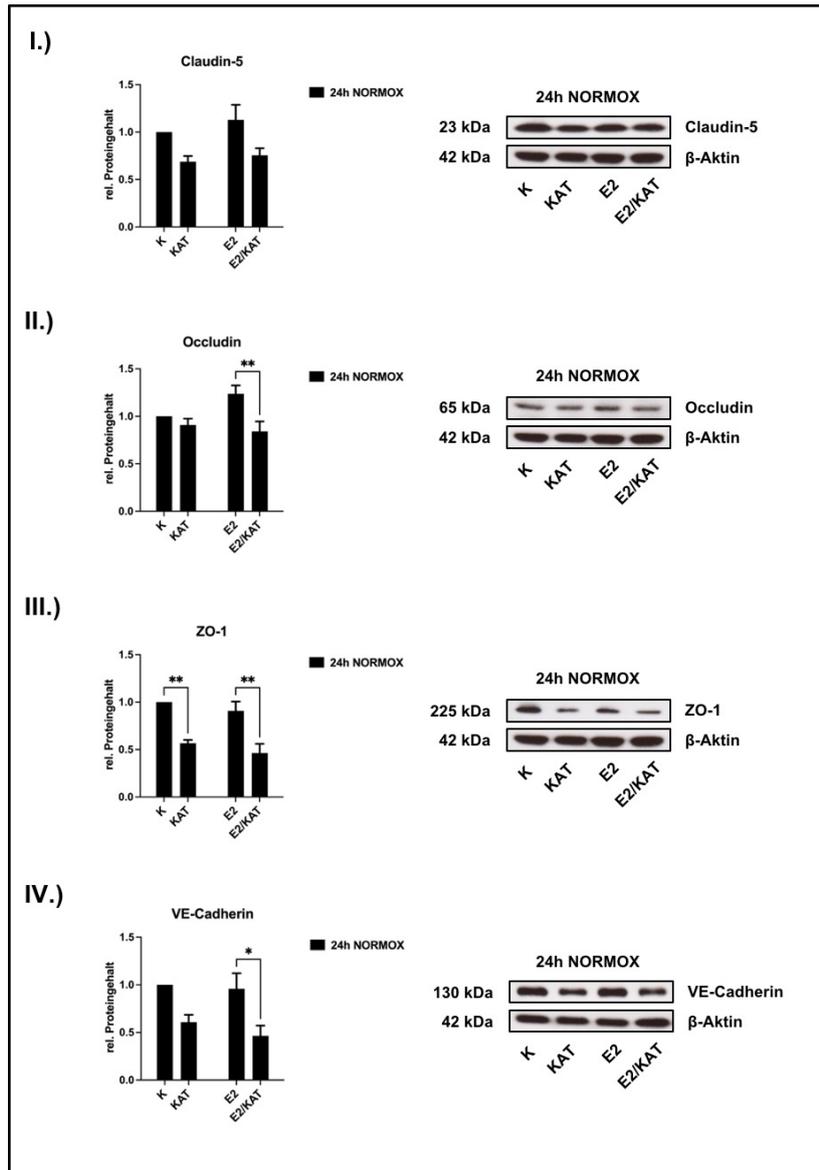


Abbildung 16: Proteinexpression nach Applikation von Katecholaminen unter Östrogen-Behandlung bei Normoxie

Gezeigt ist die statistische Auswertung des relativen (rel.) Proteingehalts sowie die Banden eines repräsentativen Western Blots zur Bestimmung der quantitativ alterierten Proteinexpression der untersuchten Junctionsproteine. cEND-Zellen wurden über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) unter Östrogen-Applikation (E2) mit Katecholaminen (KAT) behandelt. Es erfolgte eine Normalisierung auf β -Aktin, wobei jeweils ein Vielfaches der auf einen Wert von 1 gesetzten Kontrolle (K) dargestellt wird. Statistisch ausgewertet wurden die Mittelwerte \pm SEM von $n=5$ unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Das Fehlen der Kennzeichnung der statistischen Beziehung steht für einen nicht signifikanten Unterschied. **I.)** Proteinexpression von Claudin-5. **II.)** Proteinexpression von Occludin. **III.)** Proteinexpression von ZO-1. **IV.)** Proteinexpression von VE-Cadherin.

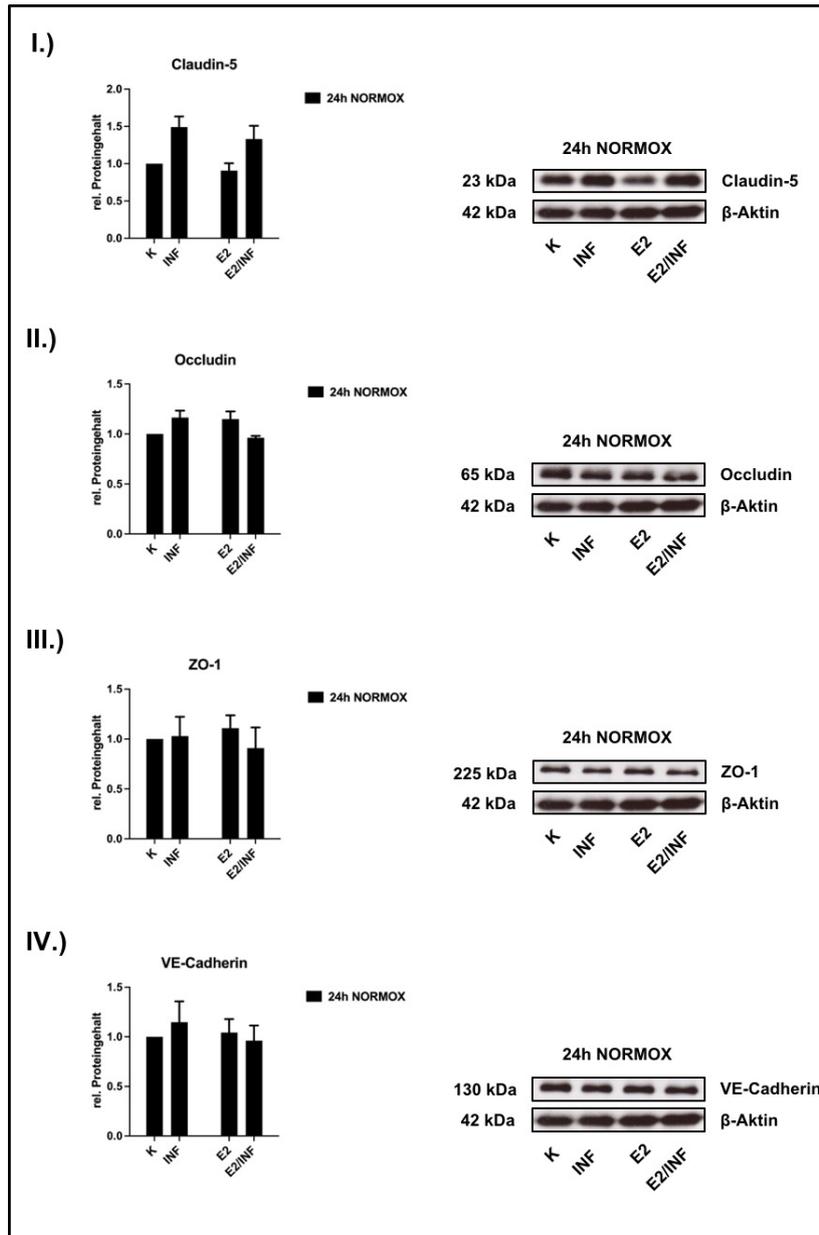


Abbildung 17: Proteinexpression nach Applikation von Entzündungsmediatoren unter Östrogen-Behandlung bei Normoxie

Gezeigt ist die statistische Auswertung des relativen (rel.) Proteingehalts sowie die Banden eines repräsentativen Western Blots zur Bestimmung der quantitativ alterierten Proteinexpression der untersuchten Junctionsproteine. cEND-Zellen wurden über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) unter Östrogen-Applikation (E2) mit Entzündungsmediatoren (INF) behandelt. Es erfolgte eine Normalisierung auf β -Aktin, wobei jeweils ein Vielfaches der auf einen Wert von 1 gesetzten Kontrolle (K) dargestellt wird. Statistisch ausgewertet wurden die Mittelwerte \pm SEM von $n=5$ unabhängigen Experimenten. Das Fehlen der Kennzeichnung der statistischen Beziehung steht für einen nicht signifikanten Unterschied. **I.)** Proteinexpression von Claudin-5. **II.)** Proteinexpression von Occludin. **III.)** Proteinexpression von ZO-1. **IV.)** Proteinexpression von VE-Cadherin.

Die solitäre KAT-Applikation führte lediglich zu einer signifikanten Reduktion der ZO-1-Expression (vgl. Kap. 3.1.2). Bei simultaner E2-Behandlung wurden die Proteinlevels von Occludin ($0,84 \pm 0,1$ -fach E2/KAT/24h NORMOX vs. $1,24 \pm 0,09$ -fach E2/24h NORMOX), ZO-1 ($0,46 \pm 0,1$ -fach E2/KAT/24h NORMOX vs. $0,91 \pm 0,1$ -fach E2/24h NORMOX) sowie VE-Cadherin ($0,46 \pm 0,11$ -fach E2/KAT/24h NORMOX vs. $0,96 \pm 0,16$ -fach E2/24h NORMOX) durch KAT supprimiert. Die Claudin-5-Expression wurde nicht alteriert (vgl. Abb. 16 I.). Insgesamt zeigten sich bei keinem Zielprotein signifikante Unterschiede zwischen der E2-Gruppe und der E2-freien Kontrollgruppe (vgl. Abb. 16). Die INF-Applikation führte unabhängig von der E2-Exposition zu keiner signifikanten Veränderung der Proteinexpression (vgl. Kap. 3.1.2 und Abb. 17).

3.3.1.3 Genexpression

Nach separater Behandlung mit KAT oder INF bei 24h NORMOX wurden real-time RT-PCRs durchgeführt (vgl. Kap. 2.4). Die statistische Auswertung wird in Tab. 15 sowie Tab. 16 gezeigt. Als Vergleichsdaten dienten die Ergebnisse aus Kap. 3.1.3.

Tabelle 15: Genexpression nach Applikation von Katecholaminen unter Östrogen-Behandlung bei Normoxie

Gezeigt ist die mittels real-time RT-PCR untersuchte Expression der Zielgene nach Applikation von Katecholaminen (KAT) über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) unter Östrogen-Behandlung (E2, grau hinterlegt). Alle Werte sind als Vielfaches der unbehandelten, E2-freien Kontrolle (K/24h NORMOX) angegeben, welche auf einen Wert von 1 gesetzt wurde. Es handelt sich um die errechneten Mittelwerte \pm SEM von n=6 unabhängigen Experimenten. KAT/24h NORMOX gegenüber K/24h NORMOX: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. E2/KAT/24h NORMOX gegenüber E2/24h NORMOX: § $p < 0,05$, §§§ $p < 0,001$. Die rot gefärbten Signifikanzniveaus wurden bereits in Kap. 3.1.3 erläutert. Findet sich der Übersichtlichkeit halber keine Kennzeichnung der statistischen Beziehung, ist dies als nicht signifikanter Unterschied zu verstehen.

	K/ 24h NORMOX	KAT/ 24h NORMOX	E2/ 24h NORMOX	E2/KAT/ 24h NORMOX
Cldn-5	1	0,47 $\pm 0,02$ ***	1,0 $\pm 0,06$	0,43 $\pm 0,04$ §§§
Ocln	1	1,05 $\pm 0,11$	0,99 $\pm 0,06$	0,99 $\pm 0,1$
ZO-1	1	0,38 $\pm 0,05$ ***	1,01 $\pm 0,04$	0,36 $\pm 0,06$ §§§

	<i>K/ 24h NORMOX</i>	<i>KAT/ 24h NORMOX</i>	<i>E2/ 24h NORMOX</i>	<i>E2/KAT/ 24h NORMOX</i>
VE-Cad.	1	0,55 ± 0,02 ***	0,99 ± 0,01	0,53 ± 0,03 §§§
Itga1	1	0,19 ± 0,02 ***	0,98 ± 0,07	0,2 ± 0,04 §§§
ItgaV	1	1,82 ± 0,24 *	1,01 ± 0,04	1,68 ± 0,23 §

KAT supprimierten die mRNA-Levels von Claudin-5, ZO-1, VE-Cadherin sowie Integrin- α 1, die Genexpression von Integrin- α V wurde induziert (vgl. Kap. 3.1.3). Innerhalb der E2-Gruppe zeigten sich analoge KAT-Effekt wie in der E2-freien Kontrollgruppe (vgl. Tab. 15): Die Expression von Claudin-5 ($0,43 \pm 0,04$ -fach E2/KAT/24h NORMOX vs. $1,0 \pm 0,06$ -fach E2/24h NORMOX), ZO-1 ($0,36 \pm 0,06$ -fach E2/KAT/24h NORMOX vs. $1,01 \pm 0,04$ -fach E2/24h NORMOX), VE-Cadherin ($0,53 \pm 0,03$ -fach E2/KAT/24h NORMOX vs. $0,99 \pm 0,01$ -fach E2/24h NORMOX) sowie Integrin- α 1 ($0,2 \pm 0,04$ -fach E2/KAT/24h NORMOX vs. $0,98 \pm 0,07$ -fach E2/24h NORMOX) nahm signifikant ab. Das mRNA-Level von Integrin- α V steigerte sich auf das $1,68 \pm 0,23$ -fache (vs. $1,01 \pm 0,04$ -fach E2/24h NORMOX). Die Expression von Occludin veränderte sich nicht signifikant. Insgesamt wurde die Genexpression der untersuchten Junctionsproteine sowie Integrinuntereinheiten durch E2, verglichen mit der E2-freien Kontrollgruppe, nicht alteriert (vgl. Tab. 15).

Tabelle 16: Genexpression nach Applikation von Entzündungsmediatoren unter Östrogen-Behandlung bei Normoxie

Gezeigt ist die mittels real-time RT-PCR untersuchte Expression der Zielgene nach Applikation von Entzündungsmediatoren (INF) über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) unter Östrogen-Behandlung (E2, grau hinterlegt). Alle Werte sind als Vielfaches der unbehandelten, E2-freien Kontrolle (K/ 24h NORMOX) angegeben, welche jeweils auf einen Wert von 1 gesetzt wurde. Es handelt sich um die errechneten Mittelwerte \pm SEM von n=5 unabhängigen Experimenten. INF/24h NORMOX gegenüber K/24h NORMOX: **p < 0,01, ***p < 0,001. E2/INF/24h NORMOX gegenüber E2/24h NORMOX: §§p < 0,01, §§§p < 0,001. Die rot gefärbten Angaben der Signifikanzniveaus wurden bereits in Kap. 3.1.3 erläutert.

Findet sich der Übersichtlichkeit halber keine Kennzeichnung der statistischen Beziehung, ist dies als nicht signifikanter Unterschied zu verstehen.

	<i>K/ 24h NORMOX</i>	<i>INF/ 24h NORMOX</i>	<i>E2/ 24h NORMOX</i>	<i>E2/INF/ 24h NORMOX</i>
Cldn-5	1	1,18 ± 0,21	0,83 ± 0,06	0,89 ± 0,1
Ocln	1	0,39 ± 0,05 ***	0,97 ± 0,09	0,36 ± 0,06 §§§
ZO-1	1	0,52 ± 0,05 ***	1,06 ± 0,08	0,51 ± 0,04 §§§
VE-Cad.	1	0,85 ± 0,02 **	0,94 ± 0,02	0,78 ± 0,05 §§
Itga1	1	0,68 ± 0,15	0,99 ± 0,07	0,63 ± 0,12
ItgaV	1	3,31 ± 0,54 **	0,95 ± 0,07	3,18 ± 0,54 §§

Nach INF-Applikation zeigte sich in Abwesenheit von E2 eine signifikant reduzierte Genexpression von Occludin, ZO-1 sowie VE-Cadherin. Das mRNA-Level von Integrin- α V wurde gesteigert (vgl. Kap. 3.1.3). Die beschriebenen INF-Effekte ohne E2 decken sich mit denen bei E2-Behandlung (vgl. Tab. 16): Occludin ($0,36 \pm 0,06$ -fach E2/INF/24h NORMOX vs. $0,97 \pm 0,09$ -fach E2/24h NORMOX), ZO-1 ($0,51 \pm 0,04$ -fach E2/INF/24h NORMOX vs. $1,06 \pm 0,08$ -fach E2/24h NORMOX) und VE-Cadherin ($0,78 \pm 0,05$ -fach E2/INF/24h NORMOX vs. $0,94 \pm 0,02$ -fach E2/24h NORMOX) präsentierten signifikant supprimierte mRNA-Levels. Claudin-5 und Integrin- α 1 wurden nicht relevant alteriert. Die Genexpression von Integrin- α V wurde auf das $3,18 \pm 0,54$ -fache (vs. $0,95 \pm 0,07$ -fach E2/24h NORMOX) gesteigert. Zwischen den beiden Versuchsgruppen, E2-frei vs. E2-exponiert, zeigt sich erneut kein signifikanter Unterschied.

3.3.2 *cEND-Zellen nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung*

3.3.2.1 Zellmorphologie

Nach SF-Applikation unter den Inkubationsbedingungen Normoxie, OGD sowie Reoxygenierung bei zeitgleicher E2-Exposition erfolgten erneut wie beschrieben Immunfluoreszenzfärbungen (vgl. Kap. 2.3.2). Als Vergleichsaufnahmen dienten die

parallel angefertigten Aufnahmen der E2-freien Kontrollgruppen (vgl. Kap. 3.2.1). In Abb. 18 sowie Abb. 19 ist die Morphologie der cEND-Zellen nach Abschluss des beschriebenen Versuchs gezeigt.

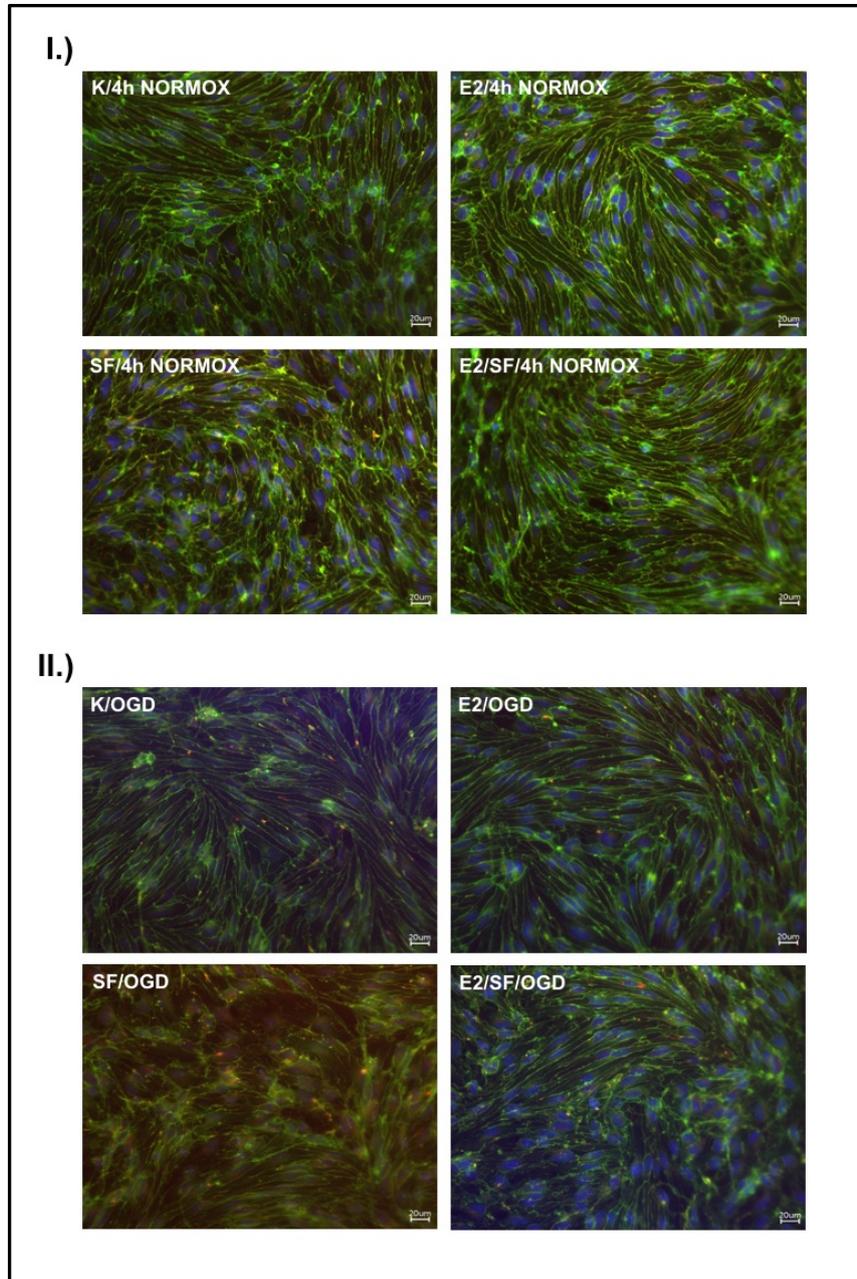


Abbildung 18: *Immunfluoreszenzfärbungen nach Applikation von Stressfaktoren unter Östrogen-Applikation bei variablen Inkubationsbedingungen (I)*

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen bei 400-facher Vergrößerung von Claudin-5 (grün), ZO-1 (rot) und der Zellkerne (DAPI, blau) an cEND-Zellen. Zuvor erfolgte die Behandlung mit Stressfaktoren (SF) unter Östrogen-Applikation (E2). Die eingefügte Maßstabsleiste umfasst 20 µm. **I.)** Zellmorphologie von cEND unter E2-Behandlung über vier Stunden bei Normoxie (E2/4h NORMOX)

sowie nach SF-Applikation über vier Stunden unter E2-Behandlung (E2/SF/4h NORMOX) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nach vier Stunden Normoxie (K/4h NORMOX) sowie der SF-Applikation nach vier Stunden Normoxie (SF/4h NORMOX). K/4h NORMOX sowie E2/4h NORMOX präsentieren intakte, kontinuierliche Monolayer aus schlanken Zelleibern, wobei SF/4h NORMOX einen aufgelockerten Verband kugelig konfigurierter Zellen zeigt. Bei E2/SF/4h NORMOX ist ein dichterer Verband aus spindelförmigen Zellen zu beobachten. **II.)** Zellmorphologie von cEND unter E2-Behandlung über vier Stunden bei Sauerstoff-Glucose-Entzug (E2/OGD) sowie nach SF-Applikation über vier Stunden unter E2-Behandlung (E2/SF/OGD) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle bei OGD (K/4h OGD) sowie der SF-Applikation bei OGD (SF/OGD). K/4h OGD sowie E2/OGD präsentieren ein intaktes, kontinuierliches Monolayer aus schlanken Zelleibern. Bei SF/OGD imponieren deutliche Defektareale, wobei E2/SF/OGD weiterhin einen kontinuierlichen Zellverband zeigt. Belichtungszeiten: Claudin-5 1/12s; ZO-1 2s; DAPI 1/3s.

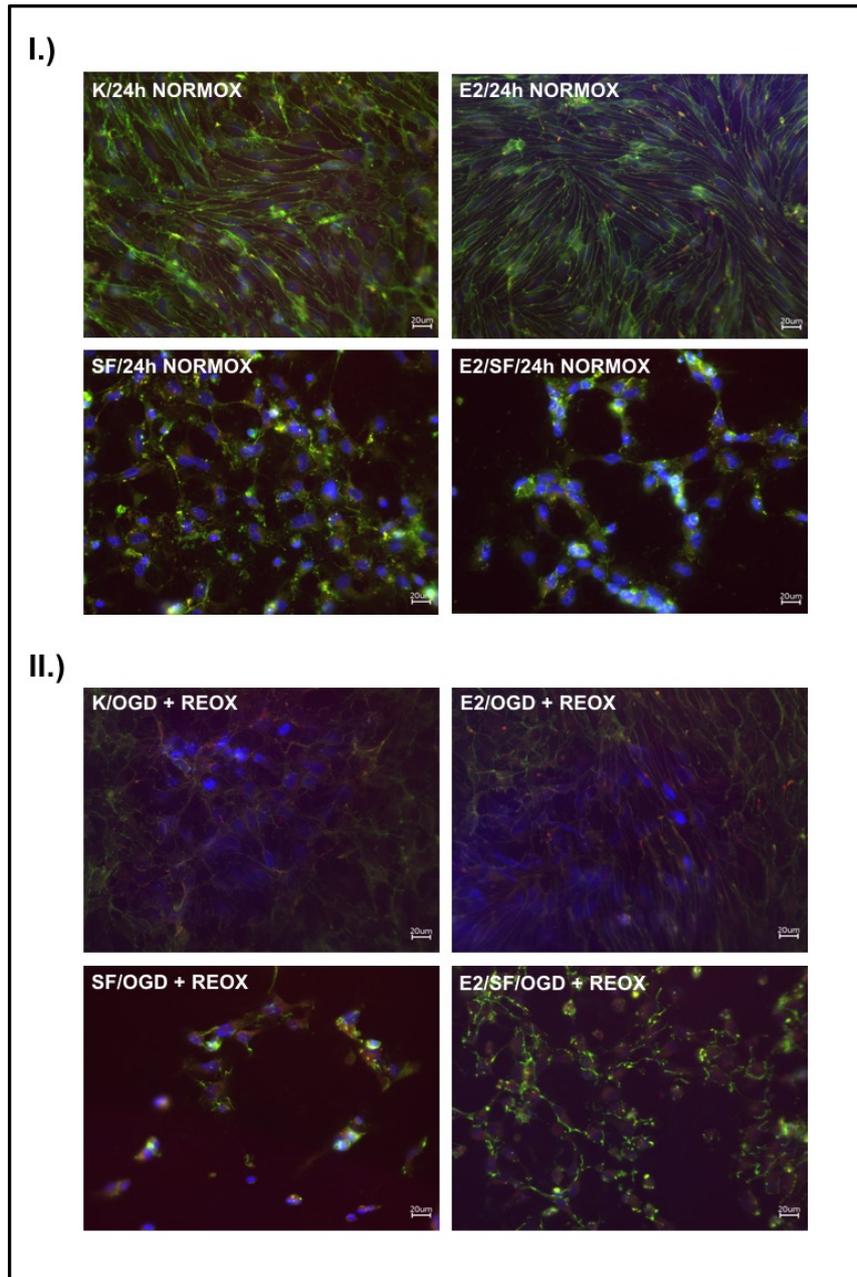


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbungen nach Applikation von Stressfaktoren unter Östrogen-Applikation bei variablen Inkubationsbedingungen (II)

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen bei 400-facher Vergrößerung von Claudin-5 (grün), ZO-1 (rot) und der Zellkerne (DAPI, blau) an cEND-Zellen. Zuvor erfolgte die Behandlung mit Stressfaktoren (SF) unter Östrogen-Applikation (E2). Die eingefügte Maßstabsleiste umfasst 20 µm. **I.)** Zellmorphologie von cEND unter E2-Behandlung über 24 Stunden bei Normoxie (E2/24h NORMOX) sowie nach SF-Applikation unter E2-Behandlung über 24 Stunden bei Normoxie (E2/SF/24h NORMOX) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle bei 24 Stunden Normoxie (K/24h NORMOX) sowie der SF-Applikation bei 24 Stunden Normoxie (SF/24h NORMOX). K/24h NORMOX sowie E2/24h NORMOX präsentieren ein intaktes, kontinuierliches Monolayer aus schlanken Zelleibern, wohingegen

bei SF/24h NORMOX einzelne Zellkonglomerate zu beobachten sind. E2/SF/24h NORMOX lässt lediglich bandförmige Konglomerate der angefärbten Strukturen erkennen. **II.)** Zellmorphologie von cEND unter E2-Behandlung nach Reoxygenierung (E2/OGD + REOX) sowie nach SF-Applikation unter E2-Behandlung nach Reoxygenierung (E2/SF/OGD + REOX) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nach Reoxygenierung (K/OGD + REOX) sowie der SF-Applikation nach Reoxygenierung (SF/24h OGD + REOX). K/OGD + REOX sowie E2/SF/OGD + REOX präsentieren eine netzartige Claudin-5-Formation mit zentral gehäuften Nuclei. Bei SF/24h OGD + REOX und E2/SF/OGD + REOX sind nur einzelne Konglomerate der angefärbten Komponenten zu sehen, wobei E2/SF/OGD + REOX eine dichtere, netzartigen Zellverband aufweist. Belichtungszeiten: Claudin-5 1/12s; ZO-1 2s; DAPI 1/3s.

Morphologisch zeigt sich kein Unterschied zwischen den unbehandelten Kontrollfärbungen und den Aufnahmen der mit ausschließlich E2 inkubierten Proben bei Normoxie (Abb. 18 sowie Abb. 19). Allerdings imponiert nach 4h NORMOX unter E2-Applikation ein verstärktes Fluoreszenzsignal von Claudin-5 entlang der Zell-Zell-Grenzen (s. Abb. 18 I.) E2/4h NORMOX). Nach 24h NORMOX wird kein Unterschied der Fluoreszenzstärke von Claudin-5 zwischen den E2-exponierten sowie den E2-freien Proben beobachtet (s. Abb. 19 I.) E2/24h NORMOX).

OGD allein führte zu keiner morphologischen Alteration verglichen mit der Inkubation bei Normoxie (vgl. Kap. 3.2.1). Es kann das regelrechte phänotypische Aussehen der cEND-Zellen beobachtet werden (vgl. Kap. 3.1.1). Dieses zeigt sich auch nach E2-Behandlung, wobei das Claudin-5-Signal auch hier verstärkt erscheint (s. Abb. 18 II.) E2/OGD). SF verursachten nach 4h NORMOX eine netzartige Auflockerung des Zellmonolayers, wobei die gefärbten Tight junction-Proteine weiterhin regelrecht lokalisiert waren (vgl. Kap. 3.2.1). Die einzelnen Zellen imponierten kugelig deformiert. Unter E2-Applikation (s. Abb. 18 I.) E2/SF/4h NORMOX) ist der SF-Effekt morphologisch moderater ausgeprägt: Die Zellen bilden einen dichten, defektfreien Verband, welcher vorwiegend aus schlanken, spindelförmigen Zellen besteht. Durch eine SF-Expositionsdauer von 24 Stunden wird auch bei E2-Behandlung, wie in Abwesenheit von E2 (vgl. Kap. 3.2.1), eine deutliche Zerstörung des cEND-Monolayers verursacht (s. Abb. 19 I.) E2/SF/24h NORMOX). Es handelt sich lediglich noch um bandförmige Konglomerate aus freiliegenden Nuclei sowie Claudin-5 und ZO-1. Insgesamt präsentiert diese Färbung ein weitreichenderes Schädigungsmaß durch SF über 24 Stunden als ohne E2 (vgl. Abb. 19 I.) SF/24h NORMOX und E2/SF/24h NORMOX).

Nach OGD präsentiert sich unter E2-Applikation, ebenso wie in der korrespondierenden Kontrollfärbung, der regelrechte cEND-Phänotyp als intakter Zellverband (s. Abb. 18 II.) E2/OGD). Die beschriebene, wechselseitige Potenzierung der beiden Noxen OGD und SF scheint durch eine simultane E2-Behandlung abgefedert zu werden: Im Gegensatz zu der in Kap. 3.2.1 charakterisierten Schädigung durch SF-Applikation bei OGD (s. Abb. 18 II.) SF/OGD), kann in Kombination mit E2 weiterhin ein kontinuierliches Zellmonolayer ohne Defektareale beobachtet werden (s. Abb. 18 II.) E2/SF/OGD). Überwiegend zeigen die Zellen regelrecht spindelförmige Zelleiber. Die gefärbten Junctionsproteine befinden sich an der histologisch korrekten Position, wobei alle dargestellten Nuclei von einem kontinuierlichen Claudin-5-Saum umgeben sind.

Nach Reoxygenierung unter E2-Behandlung ist ebenfalls ein „Reoxygenierungsschaden“ erkennbar (s. Abb. 19 II.) E2/OGD + REOX). Ebenso wie nach alleiniger Reoxygenierung wird das Zellmonolayer schwerwiegend zerstört (s. Abb. 19 II.) K/OGD + REOX). Wie in Kap. 3.2.1 charakterisiert, ist in beiden Färbungen ein retikulärer Verband aus Claudin-5 mit eingelagerten ZO-1-Konglomeraten erkennbar. Zentral befindet sich jeweils eine diffuse Ansammlung einzelner Nuclei. Die SF-Exposition bei Reoxygenierung aggravierte den Reoxygenierungsschaden weiter (s. Abb. 19 II.) SF/OGD + REOX). Es sind nur noch Konglomerate aus Nuclei und den gefärbten Tight junction-Proteinen sichtbar. Bei zeitgleicher E2-Behandlung ist das cEND-Monolayer ebenfalls massiv alteriert (s. Abb. 19 II.) E2/ SF/ OGD + REOX): Es imponieren Defektareale sowie eine rundliche Zellkonfiguration. Claudin-5 ist als lockerer, retikulärer Verband erkennbar, wobei die einzelnen Nuclei nicht mehr regelrecht eingesäumt werden. ZO-1 scheint in wolkigen Formationen teils dem Claudin-5 von basal anzuliegen, teils diffus verteilt. Ebenso wie in der E2-freien Probe ist kein zusammenhängender Zellverband identifizierbar (s. Abb. 19 II.) SF/ OGD + REOX), allerdings zeigt sich unter E2-Applikation eine höhere Zelldichte mit einem angedeuteten Claudin-5-Netz.

3.3.2.2 Proteinexpression

Zur Evaluation alterierter Zielprotein-Levels bei simultaner E2-Applikation unter den variablen Inkubationsbedingungen wurden Western Blots der gewonnenen Proben

angefertigt (vgl. Kap. 2.3.1). Abb. 20 sowie Abb. 21 zeigen die Modulation der Proteinexpression verglichen mit der E2-freien Versuchsgruppe (vgl. Kap. 3.2.2).

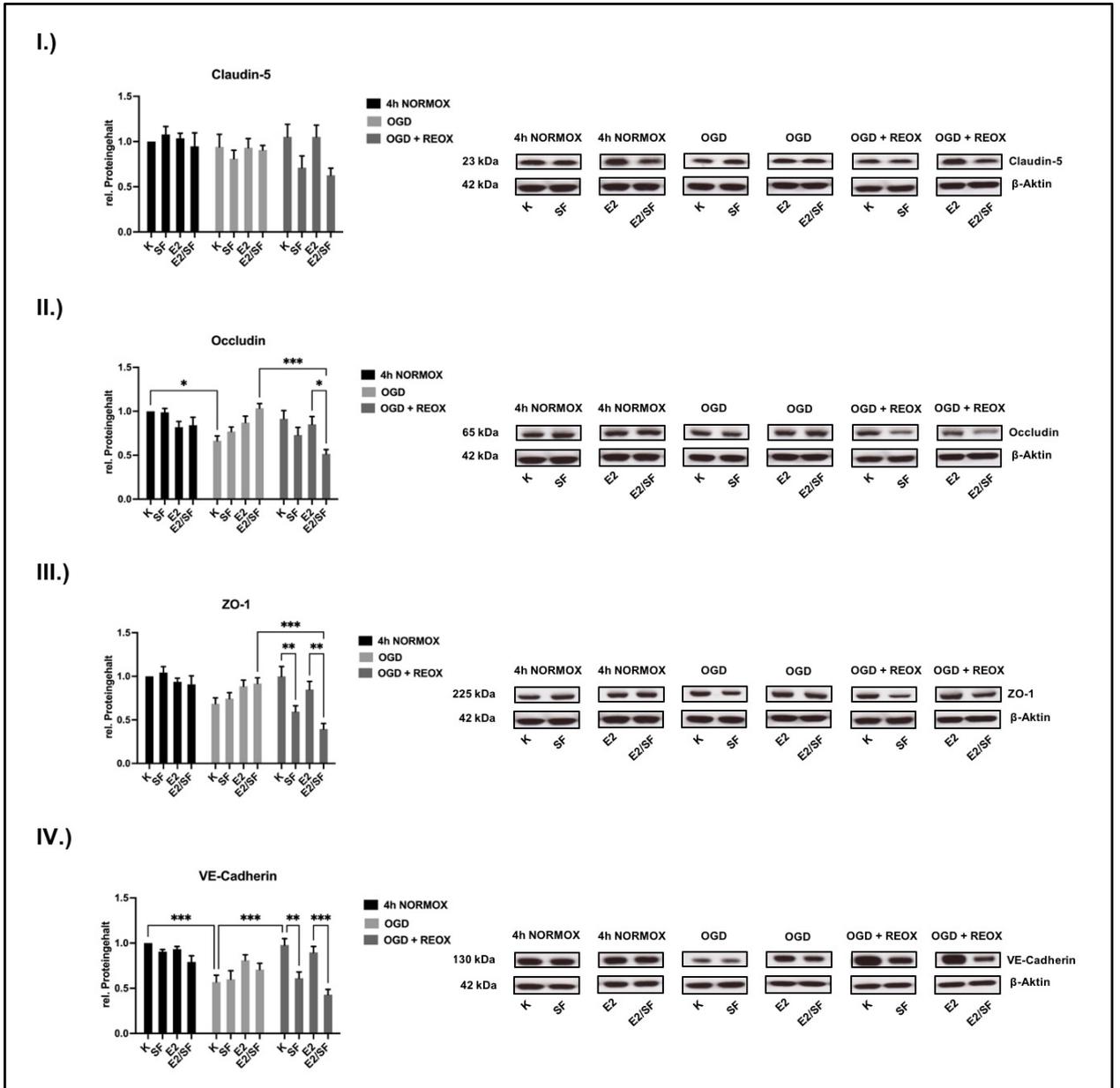


Abbildung 20: Proteinexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung (I)

Gezeigt ist die statistische Auswertung des relativen (rel.) Proteingehalts sowie die Banden jeweils eines repräsentativen Western Blots zur Bestimmung der quantitativ alterierten Proteinexpression der Junctionsproteine. Es wurden Stressfaktoren (SF) für vier Stunden bei Normoxie (4h NORMOX) sowie für vier Stunden bei Sauerstoff-Glucose-Entzug (OGD) mit konsekutiver Reoxygenierung über 20 Stunden (OGD + REOX) unter Östrogen-Behandlung (E2) appliziert. Parallel wurde eine unbehandelte Kontrolle (K) sowie eine lediglich mit E2 behandelte Probe (E2) jeder Inkubationsbedingung analysiert. Statistisch

ausgewertet wurden die Mittelwerte \pm SEM von $n=8$ unabhängigen Experimenten. Es erfolgte eine Normalisierung auf β -Aktin, wobei jeweils ein Vielfaches der auf einen Wert von 1 gesetzten, unbehandelten, E2-freien Kontrolle nach vier Stunden Normoxie (K/4h NORMOX) angegeben ist. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Findet sich der Übersichtlichkeit halber keine Kennzeichnung der statistischen Beziehung, ist dies als nicht signifikanter Unterschied zu verstehen. I.) Proteinexpression von Claudin-5. II.) Proteinexpression von Occludin. III.) Proteinexpression von ZO-1. IV.) Proteinexpression von VE-Cadherin.

Die Proteinexpression von Claudin-5 wurde in diesem Versuchsaufbau, weder unter E2-Behandlung noch ohne diese, signifikant alteriert (s. Abb. 20 I.). In Abwesenheit von E2 wurde das Occludin-Proteinlevel nur durch OGD signifikant reduziert. Die übrigen Behandlungen hatten keinen Effekt (vgl. Kap. 3.2.2). Bei E2-Applikation war, verglichen mit der Kontrolle nach 4h NORMOX, keine maßgebliche Veränderung durch OGD detektierbar. Im Gegensatz dazu war ein signifikanter SF-Effekt bei Reoxygenierung zu verzeichnen: der relative Proteingehalt wurde auf das $0,52 \pm 0,05$ -fache, verglichen mit der alleinigen Reoxygenierung ($0,85 \pm 0,09$ -fach) beziehungsweise mit der SF-Applikation bei OGD ($0,87 \pm 0,07$ -fach), reduziert. Weitere relevante Veränderungen der Occludin-Expression konnten nicht gezeigt werden (s. Abb. 20 II.). ZO-1 wurde bei simultaner E2-Behandlung weder durch OGD noch durch die vierstündige SF-Applikation, sowohl bei Normoxie als auch bei OGD, maßgeblich modifiziert. Die Reoxygenierungsphase führte ebenfalls zu keiner Alteration. Signifikant reduziert wurde ZO-1 durch die SF-Behandlung bei Reoxygenierung, wobei der Proteingehalt auf das $0,4 \pm 0,06$ -fache verglichen mit der solitären Reoxygenierung ($0,85 \pm 0,09$ -facher Proteingehalt) supprimiert wurde (s. Abb. 20 III.). Insgesamt präsentierte ZO-1 im vorliegenden Versuchsaufbau unter E2-Behandlung dasselbe Verhalten wie in der E2-freien Kontrollgruppe (vgl. Kap. 3.2.2). Ohne E2 zeigte VE-Cadherin eine durch OGD reduzierte Expression, gefolgt von einem Anstieg nach Reoxygenierung. In Kombination mit SF konnte dies nicht gezeigt werden. Ein signifikanter SF-Effekt wurde lediglich nach Reoxygenierung detektiert: die VE-Cadherin-Expression wurde signifikant verringert (vgl. Kap. 3.2.2). Unter E2-Applikation hatte OGD keine maßgeblichen Auswirkungen auf VE-Cadherin, ferner folgte kein Anstieg nach Reoxygenierung. Analog zur E2-freien Versuchsgruppe zeigte sich ein signifikanter SF-Effekt nach Reoxygenierung: der

relative Proteingehalt wurde durch SF auf das $0,43 \pm 0,06$ -fache (vs. $0,9 \pm 0,07$ -facher Proteingehalt bei E2/OGD + REOX) supprimiert (s. Abb. 20 IV.).

Insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der E2-exponierten sowie der E2-freien Versuchsgruppe.

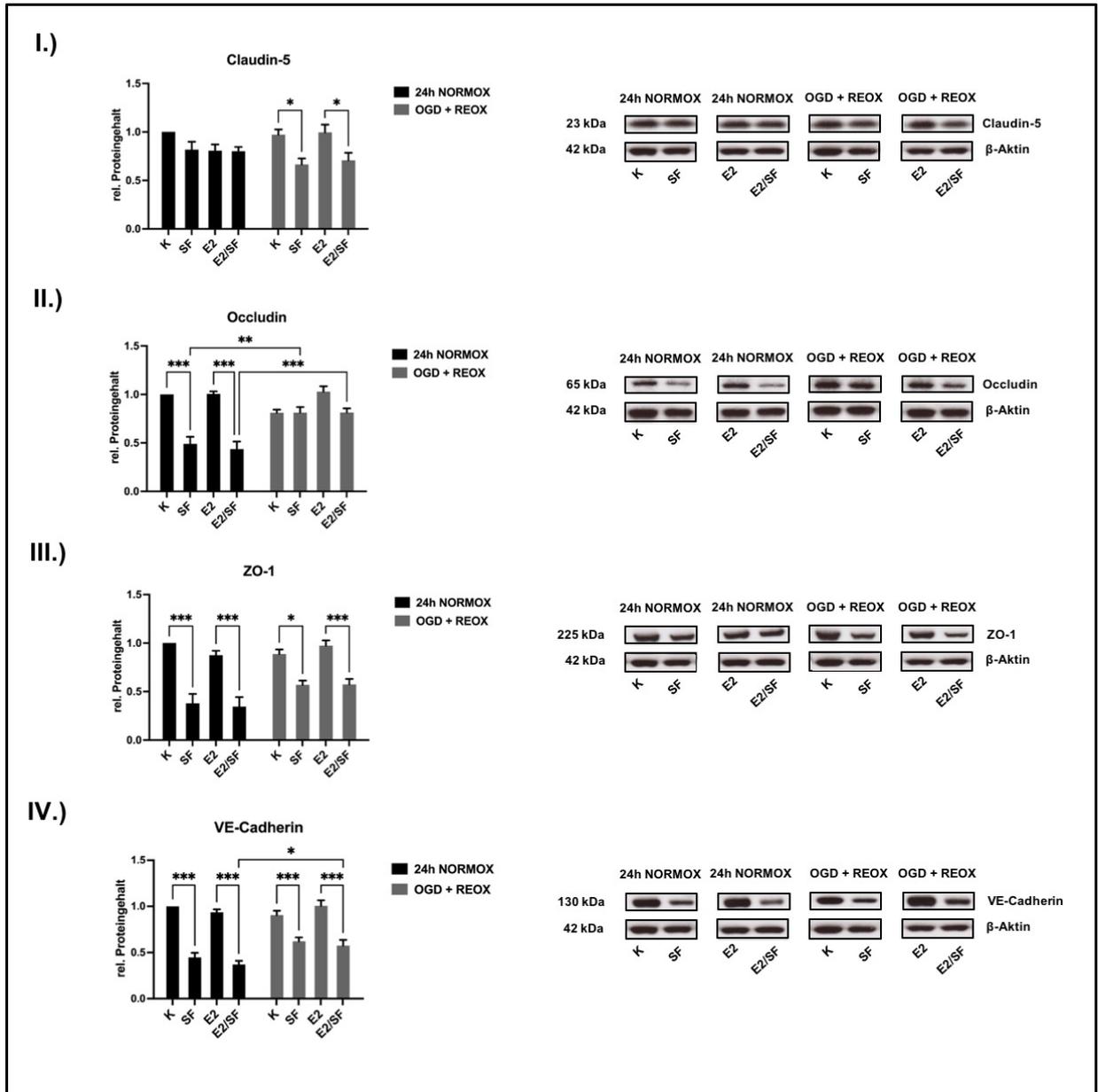


Abbildung 21: Proteinexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung (II)

Gezeigt ist die statistische Auswertung des relativen (rel.) Proteingehalts sowie die Banden eines repräsentativen Western Blots zur Bestimmung der quantitativ alterierten Proteinexpression der Junctionsproteine. Es wurden Stressfaktoren (SF) für 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) sowie bei

Reoxygenierung (OGD + REOX) unter Östrogen-Behandlung (E2) appliziert. Parallel wurde eine unbehandelte Kontrolle (K) sowie eine lediglich mit E2 behandelte Probe (E2) jeder Inkubationsbedingung analysiert. Statistisch ausgewertet wurden die Mittelwerte \pm SEM von n=8 unabhängigen Experimenten. Es erfolgte eine Normalisierung auf β -Aktin, wobei jeweils ein Vielfaches der auf einen Wert von 1 gesetzten unbehandelten, E2-freien Kontrolle nach 24 Stunden Normoxie (K/24h NORMOX) angegeben ist. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Findet sich der Übersichtlichkeit halber keine Kennzeichnung der statistischen Beziehung, ist dies als nicht signifikanter Unterschied zu verstehen. **I.)** Proteinexpression von Claudin-5. **II.)** Proteinexpression von Occludin. **III.)** Proteinexpression von ZO-1. **IV.)** Proteinexpression von VE-Cadherin.

Ein SF-Effekt auf die Claudin-5-Expression innerhalb der variablen Inkubationsbedingungen zeigte sich ohne E2 lediglich nach Reoxygenierung (vgl. Kap. 3.2.2). Unter E2-Applikation konnte ein analoges Expressionsverhalten gezeigt werden (s. Abb. 21 I.): Nach Reoxygenierung präsentierte sich nach SF-Behandlung ein reduzierter Claudin-5-Proteingehalt ($0,71 \pm 0,08$ -fach E2/SF/OGD + REOX vs. $1,0 \pm 0,08$ -fach E2/OGD + REOX). In Abwesenheit von E2 zeigte Occludin keine Alteration nach Reoxygenierung. Bei 24h NORMOX verringerte die SF-Applikation den Proteingehalt maßgeblich, wobei dieser Effekt nach Reoxygenierung nicht gezeigt wurde. Die Occludin-Expression stieg durch die Kombination aus SF und Reoxygenierung, verglichen mit der SF-Behandlung bei 24h NORMOX, signifikant an (vgl. Kap. 3.2.2). Bei simultaner E2-Behandlung zeigten sich analoge Trends: Lediglich bei 24h NORMOX wurde Occludin auf das $0,44 \pm 0,08$ -fache Proteinlevel supprimiert (vs. $1,01 \pm 0,03$ -fach E2/24h NORMOX). Innerhalb der Reoxygenierung konnte dies nicht gezeigt werden. Die Kombination aus SF und Reoxygenierung ($0,81 \pm 0,04$ -facher Proteingehalt) resultierte in einer Induktion der Proteinexpression verglichen mit der SF-Applikation bei 24h NORMOX ($0,44 \pm 0,08$ -facher Proteingehalt) (s. Abb. 21 II.). ZO-1 wurde ohne E2 nach Reoxygenierung gegenüber der 24h NORMOX nicht relevant alteriert. Ein signifikanter SF-Effekt im Sinne eines reduzierten Proteingehalts wurde nach beiden Inkubationsbedingungen gezeigt (vgl. Kap. 3.2.2). Bei E2-Exposition war das Expressionsverhalten deckungsgleich: Die SF-Applikation führte sowohl bei Normoxie ($0,35 \pm 0,1$ - E2/SF/24h NORMOX vs. $0,88 \pm 0,04$ -fach E2/24h NORMOX) als auch bei Reoxygenierung ($0,57 \pm 0,06$ -fach E2/SF/OGD + REOX vs. $0,97 \pm 0,06$ -fach E2/OGD + REOX) zu supprimierten Proteinlevels. Unterschiede zwischen den Inkubationsbedingungen Normoxie und Reoxygenierung konnten nicht detektiert werden

(s. Abb. 21 III.). Innerhalb der E2-freien Gruppe zeigte VE-Cadherin ein vergleichbares Expressionsmuster wie ZO-1: Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den nach 24h NORMOX sowie nach Reoxygenierung gewonnenen Proben zu verzeichnen. Die Applikation von SF resultierte nach beiden Inkubationsbedingungen in einem verringerten Proteingehalt (vgl. Kap. 3.2.2). Unter E2-Applikation konnte ebenfalls ein signifikanter SF-Effekt im Sinne einer supprimierten Proteinexpression beobachtet werden. Dies galt sowohl für 24h NORMOX ($0,37 \pm 0,04$ - E2/SF/24h NORMOX vs. $0,94 \pm 0,03$ -fach E2/24h NORMOX) als auch nach Reoxygenierung ($0,57 \pm 0,06$ -fach E2/SF/OGD + REOX vs. $1,01 \pm 0,06$ -fach E2/OGD + REOX). Im Gegensatz zu der E2-freien Versuchsgruppe konnte hier, ebenso wie bei Occludin, ein signifikanter Anstieg des Proteingehalts von VE-Cadherin nach Reoxygenierung in Kombination mit SF ($0,57 \pm 0,06$ -facher Proteingehalt), verglichen mit der Konstellation aus 24h NORMOX mit SF ($0,37 \pm 0,04$ -facher Proteingehalt), gezeigt werden (s. Abb. 21 IV.).

Wie schon nach Auswertung der in Abb. 20 gezeigten Ergebnisse, konnte auch mittels der Daten aus Abb. 21 kein signifikanter Unterschied zwischen der mit E2 behandelten gegenüber der E2-freien Vergleichsgruppe detektiert werden.

3.3.2.3 Genexpression

Bei simultaner E2-Applikation unter den variablen Inkubationsbedingungen wurde erneut die Expression der gewählten Zielgene untersucht (vgl. Kap. 2.4). Tab. 17 sowie 18 zeigen die Modulation der mRNA-Levels verglichen mit der E2-freien Versuchsgruppe (vgl. Kap. 3.2.3).

Tabelle 17: Genexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung (I)

Gezeigt ist die mittels real-time RT-PCR untersuchte Expression aller Zielgene nach Applikation von Stressfaktoren (SF) über vier Stunden bei Normoxie (4h NORMOX) sowie nach vier Stunden Sauerstoff-Glucose-Entzug (OGD) mit konsekutiver Reoxygenierung über 20 Stunden (OGD + REOX) unter Östrogen-Behandlung (E2, grau hinterlegt). Ferner werden die mRNA-Levels der jeweils korrespondierenden Kontrollen (K) dargestellt. Alle Werte sind als Vielfaches der unbehandelten, E2-freien K nach vier Stunden Normoxie (K/4h NORMOX) angegeben, welche auf einen Wert von 1 gesetzt wurde. Es handelt sich um die errechneten Mittelwerte \pm SEM von n=10 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde bezüglich des jeweiligen Zielgens wie folgt markiert: SF/4h NORMOX und K/OGD gegenüber K/4h NORMOX: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. K/OGD + REOX gegenüber K/OGD: §p < 0,05, §§§p < 0,001. SF/OGD gegenüber K/OGD: †p < 0,05, ††p < 0,01, †††p < 0,001. SF/OGD

+ REOX gegenüber K/OGD + REOX: %%%p < 0,001. SF/OGD gegenüber SF/4h NORMOX: #p < 0,05. SF/OGD + REOX gegenüber SF/OGD: \$\$p < 0,01, \$\$\$p < 0,001. E2/SF/4h NORMOX gegenüber E2/4h NORMOX: @@p < 0,01, @@@p < 0,001. E2/OGD gegenüber E2/4h NORMOX: ^^^p < 0,001. E2/SF/OGD gegenüber E2/OGD: ©p < 0,05. E2/SF/OGD gegenüber E2/SF/4h NORMOX: ®p < 0,05. E2/OGD + REOX gegenüber E2/OGD: !p < 0,05, !!p < 0,01, !!!p < 0,001. E2/SF/OGD + REOX gegenüber E2/OGD + REOX: °°°p < 0,001. E2/SF/OGD + REOX gegenüber E2/SF/OGD: °°°p < 0,001. Die Signifikanzniveaus der E2-freien Proben (rot gefärbt) wurden in Kap. 3.2.3/Tab. 13 dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber findet sich keine Kennzeichnung statistisch nicht signifikanter Unterschiede.

	K/ 4h NORMOX	SF/ 4h NORMOX	E2/ 4h NORMOX	E2/SF/ 4h NORMOX	K/ OGD	SF/ OGD	E2/ OGD	E2/SF/ OGD	K/ OGD + REOX	SF/ OGD + REOX	E2/ OGD + REOX	E2/SF/ OGD + REOX
Cldn-5	1	0,92 ± 0,05	0,83 ± 0,06	0,6 ± 0,05	0,49 ± 0,07 ***	0,56 ± 0,11 #	0,62 ± 0,07	0,57 ± 0,08	0,88 ± 0,07 §	0,29 ± 0,06 %%%	0,98 ± 0,09 !	0,34 ± 0,09 °°°
Ocln	1	0,21 ± 0,02 ***	0,93 ± 0,04	0,21 ± 0,02 @@@	0,34 ± 0,06 ***	0,08 ± 0,02 +	0,29 ± 0,05 ^^^	0,13 ± 0,03	1,12 ± 0,07 \$\$\$	0,26 ± 0,06 %%%	1,06 ± 0,07 !!!	0,22 ± 0,04 °°°
ZO-1	1	0,3 ± 0,02 ***	0,9 ± 0,03	0,31 ± 0,04 @@@	0,7 ± 0,08 *	0,33 ± 0,03 ++	0,62 ± 0,08	0,32 ± 0,03	1,26 ± 0,06 \$\$\$	0,28 ± 0,1 %%%	1,24 ± 0,07 !!!	0,32 ± 0,1 °°°
VE-Cad.	1	0,73 ± 0,07	0,9 ± 0,02	0,71 ± 0,08	1,56 ± 0,11 ***	1,06 ± 0,07 +++ #	1,37 ± 0,06 ^^^	1,04 ± 0,06 © ®	1,03 ± 0,03 \$\$\$	0,41 ± 0,06 %%%	1,0 ± 0,01 !!	0,53 ± 0,09 °°° iii
Itga1	1	0,54 ± 0,02 ***	0,92 ± 0,04	0,51 ± 0,03 @@	0,69 ± 0,05	0,47 ± 0,07	0,63 ± 0,06	0,51 ± 0,06	1,43 ± 0,12 \$\$\$	0,05 ± 0,06 %%%	1,45 ± 0,13 !!	0,25 ± 0,09 °°°
ItgaV	1	3,8 ± 0,6 *	0,93 ± 0,03	3,54 ± 0,58	4,08 ± 0,72 *	6,5 ± 1,08	3,63 ± 0,64	6,31 ± 1,07 ®	1,0 ± 0,04 §	1,47 ± 0,05 \$\$\$	1,01 ± 0,03	1,52 ± 0,12 iii

In Tab. 17 sind die Ergebnisse nach 4h NORMOX, OGD sowie Reoxygenierung aufgeführt. Zunächst wurden die SF-Effekte innerhalb der einzelnen Inkubationsbedingungen charakterisiert. In der E2-freien Versuchsgruppe konnten folgende Trends gezeigt werden (vgl. Kap. 3.2.3): Nach vierstündiger Normoxie war die Genexpression von Occludin, ZO-1 sowie Integrin- α 1 durch SF signifikant reduziert, wohingegen eben diese von Integrin- α V induziert wurde. Claudin-5 und VE-Cadherin wurden nicht maßgeblich alteriert. Die SF-Behandlung kombiniert mit OGD verringerte die mRNA-Levels von Occludin, ZO-1 und VE-Cadherin. Nach abgeschlossener Reoxygenierung mit simultaner SF-Applikation wurden alle Zielgene, mit Ausnahme von

Integrin- α V, in ihrer Expression, verglichen mit den mRNA-Levels nach alleiniger Reoxygenierung, signifikant reduziert. In der E2-exponierten Versuchsgruppe zeigten sich folgende SF-Effekte innerhalb derselben Inkubationsbedingung: Ebenfalls sank nach 4h NORMOX die Expression von Occludin ($0,21 \pm 0,02$ -fach E2/SF/4h NORMOX vs. $0,93 \pm 0,04$ -fach E2/4h NORMOX), ZO-1 ($0,31 \pm 0,04$ -fach E2/SF/4h NORMOX vs. $0,9 \pm 0,03$ -fach E2/4h NORMOX) sowie Integrin- α 1 ($0,51 \pm 0,03$ -fach E2/SF/4h NORMOX vs. $0,92 \pm 0,04$ -fach E2/4h NORMOX). Claudin-5 und VE-Cadherin wurden nicht maßgeblich verändert. Die Integrin- α V-Expression wurde, ebenso wie ohne E2, induziert, allerdings wurde keine statistische Signifikanz erreicht ($3,54 \pm 0,58$ -fach E2/SF/4h NORMOX vs. $0,93 \pm 0,03$ -fach E2/4h NORMOX). In der OGD-Gruppe wurde durch SF das mRNA-Level von VE-Cadherin ($1,04 \pm 0,06$ -fach E2/SF/4h NORMOX vs. $1,37 \pm 0,06$ -fach E2/4h NORMOX) supprimiert. Die übrigen Zielgene wurden nicht signifikant alteriert. Analog zur E2-freien Versuchsgruppe wurde unter E2-Einfluss bei SF-Applikation unter Reoxygenierung die Expression aller Zielgene, ausgenommen von Integrin- α V, reduziert: Claudin-5 auf das $0,34 \pm 0,09$ -fache (vs. $0,98 \pm 0,09$ -fach E2/OGD + REOX), Occludin auf das $0,22 \pm 0,04$ -fache (vs. $1,06 \pm 0,07$ -fach E2/OGD + REOX), ZO-1 auf das $0,32 \pm 0,1$ -fache (vs. $1,24 \pm 0,07$ -fach E2/OGD + REOX), VE-Cadherin auf das $0,53 \pm 0,09$ -fache (vs. $1,0 \pm 0,01$ -fach E2/OGD + REOX) sowie Integrin- α 1 auf das $0,25 \pm 0,09$ -fache (vs. $1,45 \pm 0,13$ -fach E2/OGD + REOX).

Im Folgenden wurden die Veränderungen der mRNA-Levels durch die einzelnen Inkubationsvarianten verglichen. In Abwesenheit von E2 wurden Claudin-5, Occludin sowie ZO-1 durch OGD auf mRNA-Ebene signifikant supprimiert, gefolgt von einer induzierten Genexpression nach Reoxygenierung. Bei SF-Applikation war diese Undulation nicht vorhanden. Lediglich konnte eine signifikant verminderte Claudin-5-Expression durch die Kombination aus OGD und SF, verglichen mit der SF-Behandlung bei 4h NORMOX, gezeigt werden (vgl. Kap. 3.2.3). Bei simultaner E2-Exposition fiel lediglich das mRNA-Level von Occludin durch OGD auf das $0,29 \pm 0,05$ -fache (vs. $0,93 \pm 0,04$ -fach E2/4h NORMOX). Die Expression der übrigen Junctionsproteine sowie von Integrin- α 1 wurde zwar reduziert, allerdings wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Ein relevanter Anstieg nach Reoxygenierung konnte bei Claudin-5 ($0,98 \pm 0,09$ -fach E2/OGD + REOX vs. $0,62 \pm 0,07$ -fach E2/OGD), Occludin ($1,06 \pm 0,07$ -fach E2/OGD + REOX vs. $0,29 \pm 0,05$ -fach E2/OGD) und ZO-1 ($1,24 \pm 0,07$ -fach E2/OGD + REOX vs.

0,62 ± 0,08-fach E2/OGD) beobachtet werden. Unter SF-Einfluss wurde bei Claudin-5, Occludin und ZO-1 kein signifikanter Unterschied zwischen den korrespondierenden Proben nach 4h NORMOX, OGD sowie Reoxygenierung gezeigt. In der E2-freien Versuchsgruppe zeigte VE-Cadherin, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von SF, eine relevante Induktion der Genexpression durch OGD gefolgt von einem Abfall nach Reoxygenierung (vgl. Kap. 3.2.3). Unter E2-Behandlung konnte dieser wellenförmige Verlauf ebenfalls beobachtet werden: Ohne SF-Einfluss wurde das mRNA-Level von VE-Cadherin durch OGD signifikant auf das 1,37 ± 0,06-fache (vs. 0,9 ± 0,02-fach E2/4h NORMOX) gesteigert, gefolgt von einer Reduktion auf das 1,0 ± 0,01-fache nach Reoxygenierung. Bei simultaner SF-Behandlung zeigte sich der gleichförmige Verlauf einer Induktion durch OGD auf das 1,04 ± 0,06-fache (vs. 0,71 ± 0,08-fach E2/SF/ 4h NORMOX) sowie einer Suppression nach Reoxygenierung auf das 0,53 ± 0,09-fache. In der E2-freien Versuchsgruppe wurde Integrin- α 1 durch OGD, sowohl mit als auch ohne SF, nicht alteriert. Nach Reoxygenierung ohne SF zeigte sich die Induktion der Genexpression. Die Kombination aus Reoxygenierung und SF resultierte hingegen in einem signifikant reduzierten mRNA-Level (vgl. Kap. 3.2.3). Bei E2-Exposition stieg die Integrin- α 1-Expression nach Reoxygenierung ohne SF auf das 1,45 ± 0,13-fache an (vs. 0,63 ± 0,06-fach E2/OGD). Zwischen den übrigen korrespondierenden Proben der einzelnen Inkubationsbedingungen wurde kein signifikanter Unterschied des mRNA-Levels von Integrin- α 1 gezeigt. In Abwesenheit von E2 wurde Integrin- α V durch OGD induziert, gefolgt von einem Abfall nach Reoxygenierung. In Kombination mit SF konnte ein ähnlicher Trend beobachtet werden, wobei lediglich die reduzierte Expression nach Reoxygenierung statistisch signifikant war (vgl. Kap. 3.2.3). Bei simultaner E2-Behandlung zeigten sich analoge Tendenzen: Ohne SF wurde die Genexpression durch OGD induziert sowie nach anschließender Reoxygenierung herunterreguliert, wobei keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Bei SF-Applikation wurde das mRNA-Level von Integrin- α V durch OGD auf das 6,31 ± 1,07-fache gesteigert (vs. 3,54 ± 0,58-fach E2/SF/4h NORMOX). Die Reoxygenierung resultierte in Kombination mit SF in einer auf das 1,52 ± 0,12-fache supprimierten Expression. Signifikante Unterschiede

zwischen den korrespondierenden Proben der mit E2 behandelten sowie der E2-freien Versuchsgruppe konnten nicht ermittelt werden (s. Tab. 17).

Tabelle 18: Genexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung (II)

Gezeigt ist die mittels real-time RT-PCR untersuchte Expression aller Zielgene nach Applikation von Stressfaktoren (SF) über 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) sowie bei Reoxygenierung (OGD + REOX) unter Östrogen-Behandlung (E2, grau hinterlegt). Ferner werden mRNA-Levels der jeweils korrespondierenden Kontrollen (K) dargestellt. Alle Werte sind als Vielfaches der unbehandelten, E2-freien K nach 24 Stunden Normoxie (K/24h NORMOX) angegeben, welche auf einen Wert von 1 gesetzt wurde. Es handelt sich um die errechneten Mittelwerte \pm SEM von n=10 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde bezüglich des jeweiligen Zielgens wie folgt markiert: SF/24h NORMOX und K/OGD + REOX gegenüber K/24h NORMOX: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. SF/OGD + REOX gegenüber K/OGD + REOX: §p < 0,05, §§p < 0,01, §§§p < 0,001. E2/SF/24h NORMOX gegenüber E2/24h NORMOX: ¨p < 0,05, ¨¨¨p < 0,001. E2/SF/OGD + REOX gegenüber E2/OGD + REOX: ¨¨¨p < 0,001. E2/OGD + REOX gegenüber E2/24h NORMOX: %%%p < 0,001. Die Signifikanzniveaus der E2-freien Proben (rot gefärbt) wurden in Kap. 3.2.3/Tab. 14 dargestellt. Findet sich der Übersichtlichkeit halber keine Kennzeichnung der statistischen Beziehung, ist dies als nicht signifikanter Unterschied zu verstehen.

	K/ 24h NORMOX	SF/ 24h NORMOX	E2/ 24h NORMOX	E2/SF/ 24h NORMOX	K/ OGD + REOX	SF/ OGD + REOX	E2/ OGD + REOX	E2/SF/ OGD + REOX
Cldn-5	1	0,25 \pm 0,05 ***	0,84 \pm 0,04	0,20 \pm 0,04 µµµ	0,87 \pm 0,03	0,33 \pm 0,06 §§§	0,97 \pm 0,07	0,34 \pm 0,08 ###
Ocln	1	0,08 \pm 0,01 ***	0,94 \pm 0,04	0,1 \pm 0,02 µµµ	1,35 \pm 0,07 ***	0,32 \pm 0,06 §§§	1,3 \pm 0,1 %%%	0,28 \pm 0,06 ###
ZO-1	1	0,15 \pm 0,05 ***	0,95 \pm 0,03	0,09 \pm 0,03 µµµ	1,12 \pm 0,04	0,24 \pm 0,08 §§§	1,1 \pm 0,04	0,26 \pm 0,08 ###
VE-Cad.	1	0,46 \pm 0,05 ***	0,96 \pm 0,02	0,47 \pm 0,05 µµµ	1,05 \pm 0,03	0,32 \pm 0,01 §§§	1,02 \pm 0,02	0,55 \pm 0,09 ###
Itga1	1	0,19 \pm 0,05 ***	0,98 \pm 0,02	0,2 \pm 0,05 µµµ	1,32 \pm 0,07 **	0,05 \pm 0,01 §§§	1,35 \pm 0,09 %%%	0,23 \pm 0,08 ###
ItgaV	1	1,82 \pm 0,3 **	0,98 \pm 0,03	1,74 \pm 0,21 µ	1,01 \pm 0,04	1,51 \pm 0,12	1,03 \pm 0,07	1,58 \pm 0,2

In Tab. 18 sind die Ergebnisse nach 24h NORMOX sowie Reoxygenierung aufgeführt. Ohne E2 wurde die Expression fast aller Zielgene durch die SF-Applikation bei 24h NORMOX signifikant reduziert. Das mRNA-Level von Integrin- α V präsentierte ein gegenläufiges Verhalten (vgl. Kap. 3.2.3). Unter E2 Behandlung zeigten sich analoge Trends. Die Genexpression aller Junctionsproteine sowie von Integrin- α 1 wurde maßgeblich verringert: von Claudin-5 auf das $0,20 \pm 0,04$ -fache (vs. $0,84 \pm 0,04$ -fach E2/24h NORMOX), von Occludin auf das $0,1 \pm 0,02$ -fache (vs. $0,94 \pm 0,04$ -fach E2/24h NORMOX), von ZO-1 auf das $0,09 \pm 0,03$ -fache (vs. $0,95 \pm 0,03$ -fach E2/24h NORMOX), von VE-Cadherin auf das $0,47 \pm 0,05$ -fache (vs. $0,96 \pm 0,02$ -fach E2/24h NORMOX) sowie von Integrin- α 1 auf das $0,2 \pm 0,05$ -fache (vs. $0,98 \pm 0,02$ -fach E2/24h NORMOX). Die Integrin- α V-Expression wurde entgegengesetzt auf das $1,74 \pm 0,21$ -fache (vs. $0,98 \pm 0,03$ -fach E2/24h NORMOX) induziert. Nach Reoxygenierung wurde in der E2-freien Versuchsgruppe ein relevanter SF-Effekt, im Sinne einer Reduktion der Genexpression verglichen mit der alleinigen Reoxygenierung, auf alle Junctionsproteine sowie Integrin- α 1 beobachtet. Integrin- α V wurde nicht signifikant alteriert (vgl. Kap. 3.2.3). In Anwesenheit von E2 waren die Ergebnisse deckungsgleich: Das mRNA-Level von Claudin-5 sank auf das $0,34 \pm 0,08$ -fache (vs. $0,97 \pm 0,07$ -fach E2/OGD + REOX), von Occludin auf das $0,28 \pm 0,06$ -fache (vs. $1,3 \pm 0,1$ -fach E2/OGD + REOX), von ZO-1 auf das $0,26 \pm 0,08$ -fache (vs. $1,1 \pm 0,04$ -fach E2/OGD + REOX), von VE-Cadherin auf das $0,55 \pm 0,09$ -fache (vs. $1,02 \pm 0,02$ -fach E2/OGD + REOX) sowie von Integrin- α 1 auf das $0,23 \pm 0,08$ -fache (vs. $1,35 \pm 0,09$ -fach E2/OGD + REOX). Die signifikante Induktion der Integrin- α V-Expression wurde nicht gezeigt. Innerhalb der E2-freien Versuchsgruppe stiegen die mRNA-Levels von Occludin sowie Integrin- α 1 nach Reoxygenierung verglichen mit 24h NORMOX an. Dieser Effekt wurde nur in Abwesenheit von SF beobachtet. Die Expression der übrigen Junctionsproteine sowie von Integrin- α V wurde nicht alteriert (vgl. Kap. 3.2.3). Bei simultaner E2-Behandlung zeigten sich analoge Ergebnisse: OGD + REOX führte zu einem Anstieg der Genexpression von Occludin auf das $1,3 \pm 0,1$ -fache (vs. $0,94 \pm 0,04$ -fach E2/24h NORMOX) sowie von Integrin- α 1 auf das $1,35 \pm 0,09$ -fache (vs. $0,98 \pm 0,02$ -fach E2/24h NORMOX). Bei SF-Applikation konnte dies nicht beobachtet werden. Die mRNA-Levels von Claudin-5, ZO-1, VE-Cadherin sowie Integrin- α V waren nach OGD + REOX sowohl mit SF als auch ohne diese, im Vergleich zu 24h NORMOX nicht maßgeblich

verändert. Signifikante Unterschiede zwischen den korrespondierenden Proben der mit E2 behandelten sowie der E2-freien Versuchsgruppe wurden nicht gezeigt (s. Tab. 18).

3.4 Ergebnis-Übersichten der untersuchten Protein- und Genexpression

Im Folgenden sind alle Ergebnisse der in dieser Arbeit untersuchten Protein- sowie Genexpression schematisch aufbereitet.

Tabelle 19: Übersicht Proteinexpression nach separater Applikation von Katecholaminen und Entzündungsmediatoren bei Normoxie

Übersicht der Proteinexpression basierend auf Abb. 10/11/16/17. cEND-Zellen wurden 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) mit Katecholaminen (KAT) oder Entzündungsmediatoren (INF) behandelt, wobei dies parallel unter Östrogen-Applikation (E2) erfolgte. Horizontal sind die Zielproteine Claudin-5 (Cldn-5), Occludin (Ocln), Zonula-Occludens-Protein-1 (ZO-1) sowie VE-Cadherin (VE-Cad.) aufgetragen, links vertikal die Inkubationsbedingung 24h NORMOX sowie die applizierten Substanzen/Kontrollen (K). Ist in der Zelle einer Probe eine weitere Probe notiert, so kennzeichnet dies den signifikanten Unterschied des relativen Proteingehalts zu eben dieser. Reduzierte Proteinlevels sind mit (-) markiert. Das Fehlen signifikanter Alterationen wurde mit (=) gekennzeichnet.

		Cldn-5	Ocln	ZO-1	VE-Cad.
24h NORMOX	K	=	=	=	=
	KAT	=	=	- K/24h NORMOX	=
	E2	=	=	=	=
	E2/KAT	=	- E2/24h NORMOX	- E2/24h NORMOX	- E2/24h NORMOX
24h NORMOX	K	=	=	=	=
	INF	=	=	=	=
	E2	=	=	=	=
	E2/INF	=	=	=	=

Tabelle 20: Übersicht Genexpression nach separater Applikation von Katecholaminen und Entzündungsmediatoren bei Normoxie

Übersicht der Genexpression basierend auf Tab. 12/15/16. cEND-Zellen wurden 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) mit Katecholaminen (KAT) oder Entzündungsmediatoren (INF) behandelt, wobei dies parallel unter Östrogen-Applikation (E2) erfolgte. Horizontal sind die Zielgene Claudin-5 (Cldn-5), Occludin (Ocln), Zonula-Occludens-Protein-1 (ZO-1), VE-Cadherin (VE-Cad.) sowie die Integrinuntereinheiten $\alpha 1$ (Itg $\alpha 1$) und αV (Itg αV) aufgetragen, links vertikal die Inkubationsbedingung 24h NORMOX sowie die applizierten Substanzen/Kontrollen (K). Ist in der Zelle einer Probe eine weitere Probe notiert, so kennzeichnet dies den signifikanten Unterschied der Genexpression zu eben dieser.

Supprimierte Genexpressionen wurde mit (-) markiert, induzierte hingegen mit (+). Das Fehlen signifikanter Alterationen wurde mit (=) gekennzeichnet.

		Cldn-5	Ocln	ZO-1	VE-Cad.	Itga1	ItgaV
24h NORMOX	K	=	=	=	=	=	=
	KAT	--- K/24h NORMOX	=	--- K/24h NORMOX	--- K/24h NORMOX	--- K/24h NORMOX	+ K/24h NORMOX
	E2	=	=	=	=	=	=
	E2/KAT	--- E2/24h NORMOX	=	--- E2/24h NORMOX	--- E2/24h NORMOX	--- E2/24h NORMOX	+ E2/24h NORMOX
24h NORMOX	K	=	=	=	=	=	=
	INF	=	--- K/24h NORMOX	--- K/24h NORMOX	-- K/24h NORMOX	=	++ K/24h NORMOX
	E2	=	=	=	=	=	=
	E2/INF	=	--- E2/24h NORMOX	--- E2/24h NORMOX	-- E2/24h NORMOX	=	++ E2/24h NORMOX

Tabelle 21: Übersicht Proteinexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen

Übersicht der Proteinexpression basierend auf Abb. 13/14/20/21. cEND-Zellen wurden vier Stunden bei Normoxie (4h NORMOX) oder Sauerstoff-Glucose-Entzug (OGD), 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) sowie bei OGD mit 20 Stunden Reoxygenierung (OGD + REOX) mit Stressfaktoren (SF) behandelt, wobei dies parallel unter Östrogen-Applikation (E2) erfolgte. Horizontal sind die Zielproteine Claudin-5 (Cldn-5), Occludin (Ocln), Zonula-Occludens-Protein-1 (ZO-1) sowie VE-Cadherin (VE-Cad.) aufgetragen, links vertikal die Inkubationsbedingung sowie die applizierten Substanzen/Kontrollen (K). Ist in der Zelle einer Probe eine weitere Probe notiert, so kennzeichnet dies den signifikanten Unterschied zu eben dieser. Reduzierte Proteinlevels wurden mit (-) markiert, gesteigerte hingegen mit (+). Das Fehlen signifikanter Alterationen wurde mit (=) gekennzeichnet.

		Cldn-5	Ocln	ZO-1	VE-Cad.
4h NORMOX	K	=	=	=	=
	SF	=	=	=	=
	E2	=	=	=	=
	E2/SF	=	=	=	=
OGD	K	=	- K/4h NORMOX	=	--- K/4h NORMOX
	SF	=	=	=	=
	E2	=	=	=	=
	E2/SF	=	=	=	=
24h NORMOX	K	=	=	=	=
	SF	=	--- K/24h NORMOX	--- K/24h NORMOX	--- K/24h NORMOX
	E2	=	=	=	=
	E2/SF	=	=	=	=
OGD + REOX	K	=	=	=	+++ K/OGD
	SF	- K/OGD + REOX	++ SF/24h NORMOX	-- K/OGD + REOX	-- K/OGD + REOX
	E2	=	=	=	=
	E2/SF	=	- E2/OGD + REOX --- E2/SF/OGD	-- E2/OGD + REOX --- E2/SF/OGD	--- E2/OGD + REOX

Tabelle 22: Übersicht Genexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen

Übersicht der Genexpression basierend auf Tab. 13/14/17/18. cEND-Zellen wurden vier Stunden bei Normoxie (4h NORMOX) oder Sauerstoff-Glucose-Entzug (OGD), 24 Stunden bei Normoxie (24h NORMOX) sowie bei OGD mit 20 Stunden Reoxygenierung (OGD + REOX) mit Stressfaktoren (SF) behandelt, wobei dies parallel unter Östrogen-Applikation (E2) erfolgte. Horizontal sind die Zielproteine Claudin-5 (Cldn-5), Occludin (Ocln), Zonula-Occludens-Protein-1 (ZO-1), VE-Cadherin (VE-Cad.) sowie die Integrinuntereinheiten $\alpha 1$ (Itg $\alpha 1$) und αV (Itg αV) aufgetragen, links vertikal die Inkubationsbedingung sowie die applizierten Substanzen/Kontrollen (K). Ist in der Zelle einer Probe eine weitere Probe notiert, so kennzeichnet dies den signifikanten Unterschied zu eben dieser. Reduzierte Genexpressionen wurden mit (-) markiert, induzierte hingegen mit (+). Das Fehlen signifikanter Alterationen wurde mit (=) gekennzeichnet.

		Cldn-5	Ocln	ZO-1	VE-Cad.	Itg $\alpha 1$	Itg αV
4h NORMOX	K	=	=	=	=	=	=
	SF	=	--- K/4h NORMOX	--- K/4h NORMOX	=	--- K/4h NORMOX	+ K/4h NORMOX
	E2	=	=	=	=	=	=
	E2/SF	=	--- E2/4h NORMOX	--- E2/4h NORMOX	=	-- E2/4h NORMOX	=
OGD	K	--- K/4h NORMOX	--- K/4h NORMOX	- K/4h NORMOX	+++ K/4h NORMOX	=	+ K/4h NORMOX
	SF	- SF/4h NORMOX	- K/OGD	-- K/OGD	--- K/OGD + SF/4h NORMOX	=	=
	E2	=	--- E2/4h NORMOX	=	+++ E2/4h NORMOX	=	=
	E2/SF	=	=	=	- E2/OGD + E2/SF/4h NORMOX	=	+ E2/SF/4h NORMOX
24h NORMOX	K	=	=	=	=	=	=
	SF	--- K/24h NORMOX	--- K/24h NORMOX	--- K/24h NORMOX	--- K/24h NORMOX	--- K/24h NORMOX	++ K/24h NORMOX
	E2	=	=	=	=	=	=
	E2/SF	--- E2/24h NORMOX	--- E2/24h NORMOX	--- E2/24h NORMOX	--- E2/24h NORMOX	--- E2/24h NORMOX	+ E2/24h NORMOX
OGD + REOX	K	+ K/OGD	+++ K/OGD +++ K/24h NORMOX	+++ K/OGD	--- K/OGD	+++ K/OGD ++ K/24h NORMOX	- K/OGD
	SF	--- K/OGD + REOX	--- K/OGD + REOX	--- K/OGD + REOX	--- K/OGD + REOX --- SF/OGD	--- K/OGD + REOX -- SF/OGD	--- SF/OGD
	E2	+ E2/OGD	+++ E2/OGD +++ E2/24h NORMOX	+++ E2/OGD	-- E2/OGD	+ + E2/OGD +++ E2/24h NORMOX	=
	E2/SF	--- E2/OGD + REOX	--- E2/OGD + REOX	--- E2/OGD + REOX	--- E2/OGD + REOX --- E2/SF/OGD	--- E2/OGD + REOX	--- E2/SF/OGD

4 Diskussion

4.1 Verwendetes *in vitro* Modell

Das zeitgleiche Auftreten von ischämischem Schlaganfall und TTS ist ein über die Hirn-Herz-Achse gekoppeltes Krankheitsgeschehen (70). Der BHS kommt dabei eine zentrale Rolle zu. Dies ergibt sich aus ihrer anatomischen Lokalisation sowie der (patho-)physiologischen Sonderstellung im menschlichen Körper (vgl. Kap. 1.1). Aus diesem Grund ist die Untersuchung der BHS-Integrität im Kontext der beschriebenen klinischen Konstellation bedeutsam.

Das verwendete *in vitro* Modell der BHS bestand aus einer immortalisierten Monokultur muriner Endothelzellen des Zerebrums. Es wurde gewählt, da es sich um eine weitreichend erforschte Zelllinie handelt, welche alle untersuchten Junctionsproteine sowie Integrinuntereinheiten exprimiert (29, 30, 86, 89). Daneben wurde die cEND-Zelllinie bereits unter OGD-Bedingungen sowie nach Reoxygenierung untersucht (20, 35, 36, 95). Ferner wurde experimentell die Expression von Östrogen-Rezeptoren gezeigt (88). Aus diesem Grund konnten die Versuche unter der Annahme durchgeführt werden, dass eine Perzeptivität der Zellen gegenüber Östrogen gegeben ist sowie mögliche Effekte der verschiedenen Inkubationsbedingungen apparent werden würden. Grundsätzlich handelt es sich bei der cEND-Zelllinie um ein *in vitro* Modell der BHS, in welchem lediglich das zerebrale Endothel vertreten ist. Die übrigen Komponenten wie Astrozyten und Perizyten fehlen. Es wird somit nur ein Teil der sog. Neurovaskulären Einheit abgebildet, welche per definitionem unter anderem Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten sowie Neuronen umfasst (1, 11). Sowohl Perizyten als auch Astrozyten tragen maßgeblich zur Aufrechterhaltung der BHS-Integrität bei (2, 5). Bei Cokultur der cerebellären murinen Endothelzelllinie cerebEND mit Astrozyten präsentierte sich sowohl eine veränderte Permeabilität der Barriere nach OGD als auch eine modifizierte Genexpression von Tight junction-Proteinen. Es sei betont, dass in Abwesenheit von Astrozyten überwiegend analoge Tendenzen der untersuchten Parameter detektiert wurden, diese aber in ihrer Intensität unter Astrozyten-Einfluss deutlich zunahmen (95). Die Behandlung von cEND-Zellen mit dem Kulturmedium einer Astrozyten-Zelllinie, welches durch Astrozyten sekretierte Faktoren enthielt, führte zu signifikant erhöhten Calciumlevels nach OGD. Dies wurde als Marker einer schädigenden Alteration

angesehen (35). Ferner wurde in einem *in vitro* Modell humaner Hirnendothelzellen gezeigt, dass die simultane Kultivierung mit Astrozyten sowie Perizyten die TER des Zellmonolayers maßgeblich steigerte (103). Insgesamt scheinen zerebrale Endothelzellen bezüglich ihres zellulären Phänotyps auf das *in vivo* herrschende Mikromilieu innerhalb der neurovaskulären Einheit angewiesen zu sein (104). In dieser Arbeit wurde ein erstes *in vitro* Modell der Konstellation aus der Exposition gegenüber Katecholaminen und Entzündungsmediatoren kombiniert mit einem Sauerstoff-Glucose-Entzug etabliert. Als Basis hierfür bot sich die cEND-Zelllinie an, da diese als Monokultur bereits hinreichend erforscht wurde. Weiter ermöglichten die etablierten Protokolle zur Kultivierung eine sichere Bereitstellung ausreichender Zellmengen, um die Bandbreite der Versuchskonstellationen realisieren zu können. Zukünftig könnten weitere Experimente mit Cokulturen die gewonnenen Erkenntnisse erweitern und zeigen, inwiefern die Ergebnisse mit weiteren Zellen der neurovaskulären Einheit reproduzierbar sind.

Für diese Arbeit wurde *in vitro* eine Pathologie der Humanmedizin an einer Endothelzelllinie murinen Ursprungs simuliert (86). Dass sich zum menschlichen Körper analoge, pathophysiologische Vorgänge im Tierversuch finden, wurde mehrfach gezeigt (63, 64, 77). Als klare Limitation des verwendeten *in vitro* Modells ergibt sich die Isolation aus dem Kontext des gesamten Organismus und somit beispielsweise eine ausbleibende Interaktion mit dem Immunsystem (105). cEND-Zellen weisen endotheliale Marker der BHS sowie morphologische Eigenschaften primärer Hirnendothelzellen auf (87). Somit konnte die Zelllinie verwendet werden, um zunächst spezifisch Morphologie, Zell-Zell-Verbindungen und Integrinuntereinheiten zu untersuchen. Generell eignen sich *in vitro* Modelle eines ischämischen Schlaganfalls, um molekulare Erkenntnisse zu gewinnen (105). Im weiteren Verlauf könnten die Durchführung der Experimente an humanen Endothelzellen sowie analoge Versuchsprotokolle *in vivo* weiteren Aufschluss geben.

Bei den gewählten Analysemethoden Immunfluoreszenzfärbung, Western Blot und real time RT-PCR handelt es sich um Instrumente zur Deskription des „Ist-Zustands“ der Zielstrukturen. Es konnten nur indirekt Rückschlüsse auf die tatsächlichen Barriere-Eigenschaften des Modells gezogen werden, basierend auf der etablierten Annahme, dass die gewählten Targets integrale Bestandteile zur Aufrechterhaltung der BHS darstellen. Die Untersuchung des TER (29, 30) oder Zytotoxizitäts-Tests (MTT-Tests) (106) stellen

beispielhaft weitere Methoden dar, um die Kenntnisse möglicher Alterationen des verwendeten Modells im Rahmen der durchgeführten Versuchen zukünftig zu erweitern.

4.2 Katecholamine und Entzündungsmediatoren bei Normoxie

Das als Grundlage der *in vitro* Experimente betrachtete Patient:innenkollektiv zeigte laborchemisch elevierte Entzündungsmarker sowie erhöhte Plasma-Katecholaminspiegel (47, 72, 73). Klinische Publikationen legten des Weiteren ein schlechteres neurologisches Outcome als nach solitärem ischämischen Insult dar (70, 73). Auf Basis der Integration der BHS als wichtige Komponente in die Hirn-Herz-Achse wurde die Hypothese aufgestellt, dass essentielle Alterationen der BHS im Rahmen des erläuterten Krankheitsgeschehens stattfinden könnten.

In dieser Arbeit wurden drei mögliche Säulen einer BHS-Schädigung bei kombiniertem ischämischen Insult und TKM betrachtet: Katecholamine/Entzündungsmediatoren, Sauerstoff-Glucose-Entzug sowie das Fehlen beziehungsweise systemisch reduzierte, weibliche Sexualhormone. Stufenweise erfolgte die *in vitro*-Exposition beginnend bei der Behandlung mit Katecholaminen/Entzündungsmediatoren, über den additiven Sauerstoff-Glucose-Entzug bis hin zu einer parallelen Östrogen-Applikation. Die zunächst getrennte/teilweise kombinierte Behandlung diente der gezielten Evaluation einzelner Zielstrukturen. So konnte ein umfassendes Bild molekularer Veränderungen nach getrennter sowie kombinierter Exposition gegenüber der einzelnen Noxen gezeichnet werden. Dies wurde als wichtiger Ansatz erachtet, da so ein umfassenderes Verständnis des pathophysiologischen Prozesses sowie ein möglicher Grundstein zukünftiger therapeutischer Strategien geschaffen werden konnte. Ein resultierendes Therapiekonzept wäre zum Beispiel die Anwendung spezifischer Antikörper gegen einzelne Faktoren zur Reduktion des Schädigungsausmaßes. Dies könnte zunächst an dem vorliegenden *in vitro* Modell erforscht werden und würde dieses somit zur Erprobung eines möglichen Therapieansatzes nutzbar machen. Generell ist anzumerken, dass die Simulation der Entzündung sowie des Katecholaminsturms, im Vergleich zu der realen Situation im menschlichen Körper, nur vereinfacht imitiert werden konnte. Unabhängig von der Versuchskonstellation, erfolgte stets eine abrupt beginnende Exposition, gefolgt von einem linearen Verlauf der Konzentrationen bis zum Ende des untersuchten Zeitintervalls. Dies entsprach nicht der (patho-)physiologischen Realität *in*

vivo. Die Kinetik ist vielmehr ein dynamischer Vorgang: Es kommt durchaus, getriggert durch physischen oder psychischen Stress, zum plötzlichen Katecholaminanstieg im Blut (107), womit dieser Aspekt *in vitro* realitätsähnlich abgebildet wurde. Allerdings werden Katecholamine unter anderem zügig durch die Enzyme Katechol-O-Methyltransferase sowie die Monoaminoxidase biochemisch inaktiviert und in weiteren Schritten abgebaut (108). Hieraus resultiert eine kurze Plasma-Halbwertszeit von wenigen Minuten (109). Des Weiteren können beispielsweise Temperaturschwankungen oder verrichtete körperliche Arbeit die Ausschüttung situativ beeinflussen (110). In logischer Konsequenz wäre kein derart stabiles Konzentrations-Plateau im menschlichen Körper vorhanden, wie in den Versuchsaufbauten. Bei anhaltendem Stress würde im Mittel zwar ein stetig erhöhtes Katecholaminniveau erreicht werden, allerdings wäre auf Grund der beschriebenen Faktoren eine Undulation annehmbar. Bezüglich der *in vitro* verwendeten Konzentrationen sei Folgendes bemerkt: In Ruhephasen liegt die Plasmakonzentration von Adrenalin im menschlichen Organismus bei circa 0,05 ng/ml sowie von Noradrenalin bei circa 0,2 ng/ml (111). Die Plasmakonzentration von Dopamin wird als äquivalent zu eben dieser von Adrenalin angenommen (109, 112). Eine Aktivierung auf physischer oder psychischer Ebene, sowohl situativ als auch durch zu Grunde liegende Pathologien, steigert die Plasma-Katecholaminlevels beziehungsweise die Quantität deren Metaboliten um ein Vielfaches (107, 109, 113-115). Für die durchgeführten Versuche wurden zur Simulation eines Katecholaminsturms deshalb supraphysiologische Konzentrationen verwendet, welche in ihrem relativen Verhältnis zueinander allerdings nicht der biologischen Realität entsprachen (vgl. Kap. 2.2.2). Zur Etablierung eines ersten Modells der untersuchten pathologischen Konstellation, wurde auf bereits für *in vitro* Studien verwendete Katecholaminkonzentrationen zurückgegriffen (69, 91). Dies erleichterte die primäre Untersuchung der Effekte auf die Barriere-Eigenschaften von cEND. Eine systematische Konzentrations- sowie Zeitreihe der Katecholaminbehandlung wäre zukünftig sinnvoll, um mögliche Unterschiede der Effekte auf die untersuchten Zielstrukturen zu evaluieren.

Als Korrelat der Entzündung wurde *in vitro* ein „Zytokinsturm“ simuliert, wobei die proinflammatorischen Zytokine TNF- α sowie Interleukin-6 appliziert wurden (116). Die verwendete Konzentration von TNF- α wurde publizierten *in vitro* Experimenten entlehnt (29). Eine Entzündung, sowohl im Rahmen einer Neuroinflammation als auch als

systemisches Geschehen, ist ein facettenreiches System, in welchem zahlreiche Komponenten interagieren. Der Auslöser kann sowohl endogen als auch exogen sein (117). Generell wird die inflammatorische Kaskade durch einen Trigger angestoßen, vom Organismus prozessiert und mündet schließlich über Mediatoren in einer Immunantwort (118). Insgesamt handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel aus Immunzellen, humoralen Faktoren, wie Zytokinen und Chemokinen, und einer lokalen, beispielsweise des Endothels, sowie systemischen Reaktion (117, 119). *In vitro* wurde in dieser Arbeit somit lediglich ein Teilaspekt (Zytokine) einer Entzündung abgebildet. Dennoch eignete sich dieser aus verschiedenen Gründen zu einer validen Simulation der dem Modell zu Grunde liegenden pathologischen Konstellation: Das klinisch untersuchte Patient:innenkollektiv zeigte elevierte Entzündungsmarker, unter anderem ein erhöhtes hs-CRP (hoch-sensitives C-reaktives Protein) (73). Da Interleukin-6 die hepatische Liberation von C-reaktivem Protein induziert (119), war dieses somit ein geeignetes proinflammatorisches Zytokin. Des Weiteren wurden bei TTS-Patient:innen laborchemisch erhöhte Interleukin-6-Werte publiziert (49). Insgesamt ist die systemische Wirksamkeit von TNF- α sowie Interleukin-6 bei ausreichender Konzentration beschrieben und das Endothel als mögliche Effektor-Struktur bekannt (117, 118). Ferner bilden diese Zytokine eine plausible Quervernetzung der untersuchten Aspekte „Katecholamin Sturm“ und „Entzündung“, da die adrenerge Stimulation der Sekretion von TNF- α und Interleukin-6 angenommen werden kann (vgl. Kap. 1.2.1) (67, 69).

Bei getrennter Applikation von KAT sowie INF über 24 Stunden bei Normoxie konnte morphologisch eine Schädigung des cEND-Zellmonolayers beobachtet werden (vgl. Kap. 3.1.1). Der KAT-Effekt war deutlicher, im Sinne einer weitreichenderen Zerstörung des Monolayers, ausgeprägt. Auf Proteinebene wurde ZO-1 durch KAT signifikant reduziert, die übrigen Zielproteine wurden weder durch KAT noch durch INF alteriert (vgl. Kap. 3.1.2). Die mRNA-Levels von ZO-1 sowie VE-Cadherin wurden durch KAT und INF maßgeblich verringert. Die Genexpression von Claudin-5 sowie Integrin- α 1 wurde nur durch KAT signifikant supprimiert, wobei eben diese von Occludin lediglich durch INF reduziert wurde. Integrin- α V wurde auf mRNA-Ebene gleichsam von KAT sowie INF induziert (vgl. Kap. 3.1.3). Insgesamt unterscheiden sich KAT und INF in ihren Effekten auf cEND: Nach KAT-Applikation ergab sich eine gegenläufige Imbalance der evaluierten α -Integrine, welche durch INF nicht gezeigt werden konnte. Sowohl auf Gen-

als auch auf Proteinebene wurden unterschiedliche molekulare Zielstrukturen an cEND-Zellen identifiziert.

Bei regelrechter Integrität können Katecholamine die BHS nicht passieren (108). Unter der Prämisse, dass erhöhte Katecholaminlevels die Durchlässigkeit der BHS steigern, würde das ZNS ungeschützt mit diesen in Kontakt kommen. Die Toxizität von Adrenalin, Noradrenalin sowie Dopamin beziehungsweise deren Metaboliten auf Neuroglia und neuronales Gewebe wurde bereits mehrfach gezeigt (120-122). Somit ergibt sich die Annahme, dass sich Katecholamine durch die beschriebenen Alterationen der Zell-Zell-Kontakte der BHS einen Weg in das ZNS bahnen könnten, wo weitere schädigende Effekte dieser zu erwarten wären.

Eine herabgesetzte Proteinexpression von Claudin-5 und Occludin, die reduzierte Genexpression von Occludin und Integrin- α 1 sowie eine Induktion der Genexpression von Integrin- α V nach der *in vitro* Behandlung von cEND mit TNF- α (10 nM) wurde publiziert (29, 30). Dies konnte nur in Teilen reproduziert werden: Es wurde lediglich die supprimierte Genexpression von Occludin sowie die Induktion eben dieser von Integrin- α V gezeigt. Mögliche zu Grunde liegende Faktoren sind die differierenden Einwirkzeiten von TNF- α über fünf (29) beziehungsweise acht (30) Stunden gegenüber 24 Stunden in dieser Arbeit. Es kann die Hypothese einer Zeitabhängigkeit des TNF- α -Effekts aufgestellt werden, wobei eine Schädigung nach einem kürzerem Zeitintervall apparent werden würde, allerdings im Verlauf kompensiert würde. Hier könnte eine Untersuchung mehrerer Zeitintervalle der TNF- α -Applikation Aufschluss geben. Des Weiteren erfolgte die Serum-Reduktion vor der Behandlung von cEND für die vorliegenden Versuche über 24 Stunden im Gegensatz zu einer Inkubation über drei Tage (29, 30). Förster et al. zeigten bereits alterierte Barriere-Eigenschaften von cEND, im Speziellen veränderte TER-Werte, bei unterschiedlichen Intervallen der Serum-Reduktion (86). Inwiefern die Dauer der vorangehenden Serum-Reduktion die Perzeptivität der untersuchten Zielstrukturen gegenüber TNF- α beeinflusst, müsste in weiteren Experimenten evaluiert werden. *In vitro* wurde bereits gezeigt, dass Interleukin-6 über 24 Stunden appliziert, die Gen- sowie Proteinexpression von Claudin-5, Occludin und VE-Cadherin von cEND-Zellen signifikant reduzierte (34). Hier wurde ein Vielfaches der Interleukin-6-Konzentration verwendet, verglichen mit derer für die Experimente dieser Arbeit. Eine

Konzentrationsreihe könnte zeigen, ab welcher Konzentration Effekte eintreten und inwiefern sich diese unterscheiden.

Die simultane Behandlung mit KAT und INF im Sinne einer SF-Applikation bei Normoxie wurde über vier sowie 24 Stunden durchgeführt. Hier zeigte sich in den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen (vgl. Kap. 3.2.1) eine deutliche Zeitabhängigkeit der SF-Effekte: nach vier Stunden konnte eine Auflockerung des Zellmonolayers detektiert werden, wohingegen nach 24 Stunden eine Auflösung in eine netzartige Zellformation zu beobachten war. Die zeitgebundene Komponente der SF-Effekte spiegelte sich auch in der Protein- sowie Genexpression wider: Nach vier Stunden konnten keine Alterationen detektiert werden. Nach 24 Stunden waren die Proteinlevels von Occludin, ZO-1 sowie VE-Cadherin signifikant reduziert. Nach 24 Stunden Normoxie wurde durch KAT lediglich das Proteinlevel von ZO-1 supprimiert, wobei INF keine signifikanten Effekte hatten. Das Zusammenspiel aus Katecholamin Sturm und Entzündung scheint die BHS *in vitro* somit stärker zu kompromittieren als das isolierte Auftreten. Auf mRNA-Ebene wurden nach vier Stunden Occludin und ZO-1 durch SF verringert, wohingegen nach 24-stündigem Intervall alle Junctionsproteine signifikant supprimiert wurden. Die untersuchten Integrinuntereinheiten waren nach SF-Applikation bezüglich ihrer Genexpression nicht zeitgebunden. Nach beiden Intervallen wurde Integrin- α 1 supprimiert, wobei Integrin- α V induziert wurde. Hier zeigte sich, ebenfalls wie nach solitärer KAT-Applikation, eine gegenläufige Imbalance der α -Integrine.

Es ist ersichtlich, dass die Kombination aus KAT und INF, verglichen mit der getrennten Behandlung, ausgeprägtere Effekte auf die Expression der untersuchten Junctionsproteine sowie Integrinuntereinheiten hatte. Ein weitreichenderes Schädigungsausmaß des BHS-Endothels bei simultan erhöhten Katecholaminspiegeln sowie Entzündungsparametern erscheint plausibel. Insgesamt sprechen die generierten Ergebnisse dafür, dass eine Schädigung der BHS durch Katecholamine sowie Entzündungsmediatoren bei Normoxie stattfinden kann. Die für die Integrität der Barriere unabdinglichen Junctionsproteine (1, 11, 123) wurden sowohl auf Protein- als auch auf Genexpressionsebene kompromittiert. Dies zeigte sich auch in den korrespondierenden Immunfluoreszenzfärbungen. Werden die Zell-Zell-Verbindungen der Endothelzellen der zerebralen Mikrozirkulation gestört, resultiert ein unselektives Eintreten potentiell neurotoxischer Substanzen sowie weiterer im Blut gelöster Komponenten. So können

bereits bestehende Pathologien wie zum Beispiel Gewebeschäden eines ischämischen Insults aggraviert werden (13, 26, 124). Die Untersuchung der Integrinuntereinheiten $\alpha 1$ und αV bildete eine mögliche veränderte Interaktion der Endothelzellen mit der Extrazellulärmatrix beziehungsweise dem diese umgebenden Mikromilieu ab. Integrine sind elementare Bestandteile der regelrechten Physiologie des ZNS, so war das Fehlen von Integrin- αV im Tierexperiment nicht mit dem Leben vereinbar, wobei die Individuen meist an einer zerebralen Blutung verstarben (125, 126). In humanem Lungengewebe wurde im Rahmen einer Sepsis die gesteigerte Expression des Heterodimers Integrin- $\alpha V\beta 3$ detektiert (127). Des Weiteren wurde an humanen Gewebeproben gezeigt, dass entzündlich aktive Herde einer Multiplen Sklerose ebenfalls verstärkt Integrin- αV exprimierten (128). Integrin- $\alpha 1$ bildet einen integralen Bestandteil der stabilen Konnektion von Endothel und der extrazellulären Matrix (9). Somit kann Integrin- $\alpha 1$ als Komponente der regelrechten BHS-Architektur angesehen werden. Die gezeigte gegenläufige Genexpression der untersuchten Integrinuntereinheiten nach KAT- sowie SF-Applikation kann wie folgt interpretiert werden: Die Induktion von Integrin- αV kann als Korrelat einer entzündlichen Aktivierung des Endothels angesehen werden. Die Suppression von Integrin- $\alpha 1$ kann hingegen als Einschränkung der endothelialen Vernetzung mit der Extrazellulärmatrix gewertet werden. Dies würde sich in logischer Konsequenz negativ auf die Integrität der BHS sowie die zentralnervöse Homöostase *in vivo* auswirken.

Insgesamt sind zukünftig weitere Experimente notwendig, um das in dieser Arbeit vorgestellte Modell der *in vitro* SF-Applikation zu verfeinern. Ein Fokus sollte auf Verdünnungs- sowie Zeitreihen liegen. So könnte eine mögliche Kinetik der Veränderungen der gewählten Zielstrukturen im Kontext verschiedener Zeitintervalle sowie Konzentrationen der applizierten Substanzen hinreichend evaluiert werden.

4.3 Sauerstoff-Glucose-Entzug und Reoxygenierung

Nach Untersuchung der Effekte von KAT und INF auf cEND-Zellen bei Normoxie, erfolgte die Integration des Sauerstoff-Glucose-Entzugs in das *in vitro*-Modell. Es wurde die Konfrontation der BHS mit den Noxen während einer zerebralen Ischämie simuliert. Wie in Kap. 1.3 erläutert, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das gebündelte Einwirken der SF kombiniert mit einem Sauerstoff-Glucose-Entzug in einer

weitreichenderen Schädigung der BHS resultieren könnte (70, 73). Da eine Reperfusionstherapie, nach Ausschluss von Kontraindikationen, den aktuellen Goldstandard in der Akutbehandlung eines ischämischen Schlaganfalls darstellt (18), wurde diese ebenfalls *in vitro* nachgebildet. Hier wurden die Strukturelemente der BHS nach erneuter Bereitstellung von Sauerstoff sowie Glucose untersucht. Da es sich bei einem ischämischen Schlaganfall um die plötzliche Okklusion einer zerebralen Arterie handelt (15, 18), wurde der abrupte Beginn des Sauerstoff-Glucose-Entzugs im Rahmen des OGD-Versuchs realitätsnah abgebildet (vgl. Kap. 2.2.3). Bei der anschließend simulierten Reperfusion wurde erneut zügig Sauerstoff und Glucose bereitgestellt. Dies entsprach der Realität bei mechanischer Rekanalisation (18), bei systemischer Thrombolyse mittels appliziertem Gewebeplasminogenaktivator liegt tendenziell eine dynamischere Wiederherstellung der Perfusion vor (129). Gemäß der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, wird ab Symptombeginn einer zerebralen Ischämie ein Zeitfenster von viereinhalb Stunden für die systemische Thrombolyse, sowie von sechs Stunden für die mechanische Rekanalisation empfohlen (130). Ausnahmen sollen an dieser Stelle nicht weiter erläutert werden. Die experimentelle Relation von „Ischämiedauer“ bis zu Beginn der „Reperfusion“ spiegelt somit theoretisch die klinischen Handlungsempfehlungen wider. Eine frühestmögliche Wiederherstellung der Perfusion sollte angestrebt werden (18). Das *in vitro* gewählte Zeitintervall lag, besonders im Hinblick auf die pharmakologische Thrombolyse, im oberen Bereich des klinisch empfohlenen Zeitfensters. Hieraus resultiert folgende Limitation der durchgeführten Experimente: Da lediglich vier Stunden OGD untersucht wurden, konnten keine eventuellen Unterschiede der evaluierten Zielstrukturen nach „Reperfusion“ in Abhängigkeit von der vorausgegangenen „Ischämie-Periode“ beurteilt werden. In klinischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen einem kürzeren Intervall bis zum Beginn reperfundierender Maßnahmen und einem besseren neurologisch funktionellem Outcome gezeigt (131, 132). Insgesamt ist die Alteration der BHS nach ischämischem Insult ein dynamischer Prozess (26). Jiao et al. zeigten *in vivo* eine sich über die Dauer der Reperfusion verändernde Kinetik, sowohl bezüglich der Gen- sowie Proteinexpression untersuchter Junktionsproteine als auch der BHS-Permeabilität (19). Die Untersuchung, inwiefern Alterationen der Zielstrukturen bei dem vorliegenden *in vitro* Modell zeitabhängig sind, wäre ein weiterer Ansatz zur Verfeinerung dessen. Hier

stunden verschiedene Intervalle von OGD beziehungsweise Reoxygenierung sowie variable Kombinationen dieser im Vordergrund.

In den angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen zeigten sich nach OGD keine morphologischen Korrelate einer Schädigung des cEND-Monolayers (vgl. Kap. 3.2.1). Nach konsekutiver Reoxygenierung konnte eine Störung des Zellverbandes im Sinne des Übergangs zu einer retikulär aufgelockerten Formation beobachtet werden. Da die über 24 Stunden bei Normoxie inkubierte Vergleichsprobe einen regelrechten Phänotyp präsentierte, konnte hier von einem „Reperfusionsschaden“ ausgegangen werden. Die SF-Applikation aggravierte diesen. Die Behandlung mit SF bei OGD resultierte in einer deutlichen Störung der morphologischen Integrität. Das Ausmaß des SF-Effektes bei OGD übertraf eben diesen bei Normoxie, obwohl zwischen OGD allein und der Kontrollfärbung bei Normoxie kein relevanter Unterschied erkennbar war. Basierend auf den Immunfluoreszenzfärbungen kann die Hypothese der gegenseitigen Potenzierung von SF und OGD angenommen werden.

Die Protein- beziehungsweise Genexpression der Junctionsproteine zeigte nach den verschiedenen Inkubationsbedingungen ein heterogenes Verhaltensmuster (vgl. Kap. 3.2.2 sowie Kap. 3.2.3). Auf Proteinebene wurden durch OGD lediglich Occludin sowie VE-Cadherin verringert exprimiert. Chen et al. zeigten bei der *in vitro* Untersuchung einer humanen Endothelzelllinie (HBMEC) nach OGD ebenfalls eine verminderte Gesamtproteinmenge von VE-Cadherin (133). Die reduzierte Proteinexpression von Occludin nach vier Stunden OGD-Behandlung an cEND-Zellen, mit einer zeitgleich nicht signifikanten Alteration von Claudin-5, wurde bereits von Salvador et al. publiziert (35). Durch Neuhaus et al. wurden bei der Untersuchung des gesamten Zelllysats nach OGD-Behandlung der cerebellären Endothelzelllinie cerebEND analoge Ergebnisse dargestellt (95). Ferner wurde das beschriebene Expressionsmuster von Occludin nach OGD *in vitro* an einer weiteren murinen Hirn-Endothelzelllinie (bEND3) gezeigt (134). Das in dieser Arbeit vorliegende Ergebnis konnte somit schon vormals konsistent an mehreren Zelllinien detektiert werden. *In vivo* ist der signifikante Abfall von VE-Cadherin, Occludin sowie ZO-1 nach induzierter Ischämie publiziert (21). Engelhardt et al. konnten an zerebralen Ratten-Endothelzellen (RBE4) *in vitro* bei der sequentiellen Untersuchung verschiedener Hypoxie-Intervalle von bis zu 48 Stunden keine Alteration der Proteinlevels von Claudin-5 sowie Occludin detektieren. ZO-1 zeigte hier erst nach 48

Stunden eine signifikant reduzierte Expression (27). Dies legt nahe, dass erst die Kombination aus Sauerstoff- und Glucose-Entzug in einer Suppression des Occludin-Proteinlevels resultiert, wobei die alleinige Hypoxie keinen Effekt zu haben scheint. ZO-1 könnte in seiner Reaktivität gegenüber einer Hypoxie zeitgebunden sein, wobei dies in den durchgeführten Experimenten gegebenenfalls nicht apparent wurde, da keine OGD-Periode von 48 Stunden untersucht wurde. Unter Sauerstoff-Glucose-Entzug hatten SF keinen relevanten Effekt auf die Zielproteine. Dies stützt die Annahme, dass der SF-Effekt zeitgebunden zu sein scheint. Eine vierstündige Einwirkdauer erscheint nicht auszureichend, um relevante Alterationen auf Proteinebene zu verursachen (vgl. Kap. 4.2).

Die mRNA-Levels von Claudin-5, Occludin und ZO-1 wurden durch OGD signifikant reduziert. Neuhaus et al. zeigten analoge Ergebnisse nach der OGD-Behandlung von cerebEND *in vitro* (95). Dies steht in direktem Gegensatz zu den von Salvador et al. veröffentlichten Ergebnissen, wobei OGD allein keinen maßgeblichen Effekt auf die Genexpression von Claudin-5 sowie ZO-1 an cEND-Zellen hatte (35). Auch Kleinschnitz et al. konnten keine relevante Alteration der mRNA-Levels von Claudin-5 sowie Occludin durch OGD detektieren (20). *In vivo* hingegen wurde analog zu den vorliegenden Ergebnissen eine signifikante Reduktion der Expression von Occludin und ZO-1 nach induzierter Ischämie gezeigt (21). Die Genexpression von VE-Cadherin wurde durch OGD induziert, was im Gegensatz zu der quantitativ verminderten Proteinexpression stand. Neuhaus et al. konnten bei der Untersuchung von cerebEND-Zellen nach OGD keine signifikante Alteration von VE-Cadherin auf mRNA-Ebene zeigen (95). Yu et al. detektierten *in vivo* die reduzierte Transkription des VE-Cadherin-Gens nach Ischämie (21). Innerhalb der Inkubationsbedingung OGD verringerte die additive Behandlung mit SF die Expression von Occludin, ZO-1 sowie VE-Cadherin auf mRNA-Ebene. Der SF-Effekt wurde hier schon nach vier Stunden Einwirkdauer apparent, was auf Proteinebene nicht gegeben war. Nach SF-Applikation bei OGD, verglichen mit der SF-Applikation bei vierstündiger Normoxie, zeigte sich eine Reduktion von Claudin-5. Das mRNA-Level von VE-Cadherin stieg hingegen an. Die Hypothese der wechselseitigen Potenzierung der Effekte von Sauerstoff-Glucose-Entzug und SF kann somit lediglich bezüglich des untersuchten Zielgens Claudin-5 angenommen werden. Auf Proteinebene konnte dies nicht gezeigt werden. In den angefertigten

Immunfluoreszenzfärbungen wurde die alterierte Lokalisation von Claudin-5 und ZO-1 innerhalb des cEND-Zellmonolayers sowie die deutliche Auflockerung dessen detektiert. Liu et al. publizierten, bei quantitativ stabilen Proteinlevels nach OGD-Behandlung zerebraler Endothelzellen, eine Umverteilung von Claudin-5 auf subzellulärer Ebene sowie die veränderte Lokalisation innerhalb des Zellmonolayers mittels Immunfluoreszenzfärbung (134). cEND-Zellen zeigten die Kombination aus stabiler Proteinexpression gepaart mit der beschriebenen morphologischen Alteration nach OGD lediglich unter SF-Einfluss, wobei nach OGD allein die morphologische Integrität nicht beeinflusst wurde.

Die simulierte Reperfusion ließ die Proteinexpression von VE-Cadherin, verglichen mit OGD allein, ansteigen. Der Effekt wurde durch SF eliminiert, wobei dies als störender Einfluss auf die Erholung der Adherens junctions interpretiert werden kann. Keines der untersuchten Zielproteine zeigte eine alterierte Expression nach Reoxygenierung, verglichen mit den Ergebnissen nach 24 Stunden Normoxie. *In vivo* wurden nach erfolgter Reperfusion gesunkene Proteinlevels von Claudin-5, Occludin sowie ZO-1 detektiert (19). Wicha et al. zeigten *in vivo* einen zeitabhängigen Abfall des Proteinlevels von Occludin, welcher nicht nach 24 Stunden, sondern erst nach 48 Stunden Reperfusion signifikant war. Claudin-5 war nach beiden Zeitintervallen verringert (22). VE-Cadherin, ZO-1 sowie Claudin-5 wurden auf Proteinebene gleichsam durch SF im Rahmen der Reoxygenierung verringert. Lediglich VE-Cadherin und ZO-1 zeigten diesen Effekt auch bei 24-stündiger Normoxie. Dies suggeriert eine gesteigerte Perzeptivität von Claudin-5 gegenüber SF durch die Inkubationsbedingung OGD + REOX. Im Umkehrschluss kann angenommen werden, dass SF erst die Ausbildung beziehungsweise Aufrechterhaltung eines „Reperfusionsschadens“ auf Proteinebene ermöglichen. Dies deckt sich mit den erläuterten Ergebnissen der korrespondierenden Immunfluoreszenzfärbungen. *In vivo* konnten McColl et al. ebenfalls reduzierte Proteinlevels von Claudin-5 nach acht beziehungsweise 24 Stunden Reperfusionsphase bei induzierter systemischer Inflammation zeigen. Ferner wurden hier reduzierte Claudin-5-Signale in Immunfluoreszenzfärbungen unter entzündlichem Einfluss nach Reoxygenierung detektiert (37). Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit vorliegenden *in vitro* Ergebnissen. Unter SF-Behandlung konnte ein signifikanter Anstieg der Proteinexpression von Occludin nach Reoxygenierung, verglichen mit der Inkubation über 24 Stunden bei

Normoxie, beobachtet werden. In Abwesenheit von SF wurde dies nicht detektiert. Ferner wurde Occludin als einziges Zielprotein nach SF-Applikation innerhalb der Inkubationsbedingung Reoxygenierung nicht signifikant reduziert, während dies bei 24-stündiger Normoxie gezeigt wurde. McColl et al. zeigten ein stabiles Occludin-Proteinlevel bei Reoxygenierung unter inflammatorischem Einfluss (37). Es ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die induzierte Occludin-Expression im Rahmen der Kombination aus SF und Reoxygenierung einen protektiven Effekt auf die Architektur der BHS haben könnte. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Neuroinflammation bei ischämischem Insult einen positiven Effekt auf die Occludin-Expression im Rahmen einer Reperfusionstherapie haben könnte. Zur Überprüfung dieser Annahme, könnte ein entsprechendes Tierexperiment durchgeführt werden.

Auf mRNA-Ebene konnte die nach OGD mittels Reoxygenierung induzierte Genexpression von Claudin-5, Occludin sowie ZO-1 gezeigt werden. Salvador et al. publizierten hingegen ein unverändertes mRNA-Level von Occludin beziehungsweise eine Reduktion dessen von Claudin-5 nach Reoxygenierung von cEND-Zellen (35). Die Genexpression von VE-Cadherin wurde in dem vorliegenden *in vitro* Experiment maßgeblich supprimiert. Dies steht in direktem Gegensatz zu dem beschriebenen Anstieg der relativen Proteinmenge. Unter SF-Einfluss konnte auf mRNA-Ebene lediglich die supprimierte Expression von VE-Cadherin beobachtet werden. Die übrigen Junctionsproteine wurden nicht alteriert, was als relevanter SF-Effekt im Sinne einer ausbleibenden Aktivierung der Genexpression nach Reoxygenierung gewertet werden kann. Es ist somit anzunehmen, dass SF eine mögliche Erholung der BHS verhindern.

Die SF-Applikation innerhalb der Inkubationsbedingung OGD mit konsekutiver Reoxygenierung auf mRNA-Ebene zeigte analoge Ergebnisse zu den SF-Effekten nach 24 Stunden Normoxie. Gemessen an den mRNA-Levels nach 24-stündiger Normoxie, resultierte die Reoxygenierung in einer stabilen Genexpression von Claudin-5 sowie von ZO-1 beziehungsweise in einer Induktion dieser von Occludin. Bei simultaner Behandlung mit SF wurde dies nicht gezeigt. Erneut ergibt sich die Annahme einer durch SF eingeschränkten Erholung des BHS-Modells. Die Untersuchung der relativen Proteinmenge von Occludin ergab das zuvor beschriebene, exakt gegenläufige Ergebnis im Sinne einer solitären Induktion in Anwesenheit von SF. Ein Erklärungsansatz für die vorliegende Divergenz zwischen der Protein- und Genexpression von Occludin wäre eine

unterschiedliche Kinetik der Transkription des Occludin-Gens in An- beziehungsweise Abwesenheit von SF. Hierauf wird im Folgenden näher eingegangen: *In vivo* beobachteten Jiao et al. nach Induktion einer zweistündigen zerebralen Ischämie eine signifikant reduzierte Genexpression von Claudin-5, Occludin sowie ZO-1 nach variablen Reperfusionintervallen (19). Gertz et al. hingegen beschrieben die gesteigerte Genexpression von Occludin, Claudin-5 sowie VE-Cadherin *in vivo* nach zerebraler Ischämie über 30 Minuten gefolgt von verschiedenen Zeitspannen der Reperfusion (135). Hier wird die bereits erläuterte Notwendigkeit deutlich, das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* Modell nach mehreren OGD- beziehungsweise Reoxygenierungsphasen zu untersuchen.

Die evaluierten Integrinuntereinheiten zeigten heterogene Genexpressionsmuster: Es wurde die Induktion der Transkription des Integrin- α V-Gens durch OGD, gefolgt von einer Suppression nach Reoxygenierung gezeigt. Unter SF-Applikation wurden ähnliche Trends beobachtet, allerdings war lediglich der Abfall nach Reoxygenierung signifikant. Die gegenseitige Potenzierung der Effekte von OGD sowie SF konnte hier nicht beobachtet werden. Die Induktion der Integrin- α V-Expression durch OGD kann als entzündliche Aktivierung der Endothelzellen im Rahmen der „Ischämie“ betrachtet werden (vgl. Kap. 4.2). Die konsekutive Suppression nach Reoxygenierung untermauert diese Annahme und kann im Umkehrschluss als mögliches Korrelat der Regeneration betrachtet werden. Abumiya et al. publizierten ebenfalls den quantitativen mRNA-Anstieg von Integrin- α V in Gefäßen der zerebralen Mikrozirkulation affektierter Hirnareale nach Simulation eines ischämischen Insults *in vivo* (136). Innerhalb dieses, beziehungsweise eines weiteren ähnlichen Versuchsaufbaus, konnte die gesteigerte Expression des Integrin-Heterodimers α V β 3 nach Ischämie gezeigt werden (136, 137). Das vorliegende *in vitro* Modell schien sich bezüglich der Reagibilität der Genexpression von Integrin- α V auf einen Sauerstoff-Glucose-Entzug vergleichbar zu *in vivo* Modellen zu verhalten. Integrin- α 1 wurde durch OGD vermindert exprimiert, allerdings wurde keine statistische Signifikanz erreicht. *In vivo* wurde ebenso die verminderte Integrin- α 1-Expression nach zerebraler Ischämie gezeigt (138). Durch Reoxygenierung wurde das mRNA-Level von Integrin- α 1 signifikant gesteigert. Dies kann als Indiz eines Regenerationsprozesses gewertet werden, da die Endothelzellen so mit höherer Wahrscheinlich über beispielsweise Integrin- α 1 β 1 mit Komponenten der extrazellulären

Matrix einen intakten Verbund bilden könnten. In Anwesenheit von SF wurde die Induktion der Genexpression von Integrin- α 1 in eine signifikante Suppression dieser konvertiert. Dies kann als SF-induzierter „Reperfusionsschaden“ *in vitro* angesehen werden, da in Konsequenz eine ausreichende Vernetzung mit der extrazellulären Matrix unterbunden würde (vgl. Kap. 4.2).

Die Genexpression und somit die finale Proteinexpression sind ein hochkomplexer Prozess, welcher variablen regulatorischen Einflüssen unterliegt (139, 140). Die detektierten Divergenzen zwischen Gen- sowie Proteinexpression zeigten auf, dass das vorliegende *in vitro* Modell über zusätzliche Zeitintervalle hinweg beziehungsweise bezüglich weiterer Zielstrukturen zu untersuchen ist. Im Besonderen bieten sich hier Mediatoren an, deren Einfluss auf die Expression von Junctionsproteinen beziehungsweise Integrinuntereinheiten unter den evaluierten Konditionen bereits gezeigt wurde. Beispielhaft seien hier die MMP-2/9 (Matrix Metalloproteinase-2/9) sowie der HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) genannt. MMPs sind Proteasen, welche in variablen pathologischen Prozessen vertreten sind. Hier stehen unter anderem Erkrankungen im Vordergrund, welche auf einem inflammatorischen Geschehen sowie der Zerstörung extrazellulärer Matrix basieren (141). Die MMP-2/9 wurden *in vivo* als vermittelnde Faktoren einer herabgesetzten Expression von Tight junction-Proteinen bei induzierter Ischämie identifiziert (134, 142). Eine verstärkte MMP-9-Sekretion durch cEND-Zellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen ist ebenfalls publiziert worden (30). *In vivo* wurde eine verstärkte MMP-9-Expression nach Ischämie/Reperfusion detektiert (22-24). HIF ist ein Transkriptionsfaktor, welcher reagibel gegenüber hypoxischen Zuständen ist und konsekutiv in diesen vermehrt exprimiert wird (139). Die HIF-1-abhängige Degradierung junctionaler Proteine der BHS im Rahmen einer Hypoxie konnte *in vitro* bereits gezeigt werden (27). Das Zusammenspiel aus alterierter Genexpression, tatsächlicher Veränderung der relativen Proteinmengen sowie der Kinetik der jeweiligen Alterationen könnte mittels der beschriebenen Mediatoren genauer untersucht werden.

Bei Interpretation der vorliegenden Ergebnisse wurden Veränderungen der untersuchten Zielstrukturen nach Reoxygenierung als „Reperfusionsschaden“ bezeichnet. Dieser Begriff wurde zur Umschreibung eines supprimierenden Effekts durch die erneute Bereitstellung von Sauerstoff sowie Glucose *in vitro* verwendet. Generell ist die

Schädigung des Organismus und/oder einzelner Organsysteme bei Reperfusion nach vorheriger Ischämie über verschiedene Mechanismen bekannt (143). Über diese pathophysiologischen Kaskaden kann auch die mögliche zerebrale Schädigung nach Wiederherstellung des Blutflusses im Rahmen eines ischämischen Insults erklärt werden, wobei hier besonders die weitere Öffnung der BHS mit möglicher hämorrhagischer Transformation sowie einem vasogenen Hirnödem genannt seien (144). *In vivo* konnte die progrediente Öffnung der BHS nach induzierter Ischämie mit folgender Reperfusion gezeigt werden (22-24). Ferner präsentierten sich nach Wiederherstellung des Blutflusses Korrelate eines Hirnödems (23). Insgesamt kann somit nach Reperfusionstherapie keine *Restitutio ad Integrum* der BHS angenommen werden. Dies spiegeln auch die hier gezeigten Ergebnisse der teils weiteren Suppression untersuchter Zielstrukturen nach Reoxygenierung *in vitro* wider.

Das wiederkehrend analoge Verhalten der untersuchten Zielstrukturen in den durchgeführten *in vitro* Experimenten zu bereits publizierten *in vivo* Ergebnissen kann als Qualitätsmerkmal gewertet werden. Trotz der bereits beschriebenen Limitationen (vgl. Kap. 4.1), bietet das vorliegende *in vitro* Modell somit eine valide Grundlage für die weitere Verwendung im Rahmen der *in vitro* Schlaganfall-Forschung im Kontext eines TS. Die Ergebnisse können als richtungsweisend betrachtet werden und als Basis für das Design von folgenden *in vivo* Experimenten dienen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die untersuchten Inkubationsbedingungen sowie applizierten Substanzen in heterogenen Veränderungen der Gen- sowie Proteinexpression der evaluierten Junctionsproteine und Integrinuntereinheiten resultierten. Es kann keine stringente Linie der ausschließlichen Suppression oder Induktion gezeichnet werden. Vielmehr ist jede einzelne Inkubationsbedingung sowie die Kombination dieser mit SF und ihre Auswirkungen auf die einzelnen Zielstrukturen individuell zu betrachten. Insgesamt kann dennoch postuliert werden, dass sowohl der Sauerstoff-Glucose-Entzug als auch Katecholamine/Entzündungsmediatoren einen degradierenden Effekt auf die untersuchten Zielstrukturen der BHS zu haben scheinen. Die biologische Barriere wird somit insgesamt angegriffen. Die Kombination scheint sich zu potenzieren und verursacht tendenziell ein gesteigertes Schädigungsausmaß. Eine konsekutive Reoxygenierungsphase kann in einer Regeneration oder einem „Reperfusionsschaden“ resultieren, wobei dies von der

betrachteten Zielstruktur abhängig zu sein scheint. Gemessen an der Morphologie von cEND-Zellen nach erfolgter Reoxygenierung, scheint hier der „Reperfusionsschaden“ zu dominieren, In Anwesenheit von SF wird eine mögliche „Erholung“ überwiegend unterbunden, wobei ein „Reperfusionsschaden“ vornehmlich aggraviert wird. Insgesamt sollte das etablierte Modell dieser Arbeit zukünftig verfeinert werden, um die tatsächliche Konstellation *in situ* experimentell realitätsnäher abbilden zu können. Hier wäre zum einen die Evaluation der realen Konzentrationen von Katecholaminen und Entzündungsmediatoren, sowie eventuell auch deren zeitgebundene Dynamik während des pathophysiologischen Prozesses, in Serumproben von Patient:innen vorzuschlagen. Zum anderen wäre die gezielte Identifikation weiterer proinflammatorischer Marker notwendig, um deren Einfluss auf die Integrität der BHS untersuchen zu können. Hierauf basierend wäre die Simulation des „pathologischen Milieus“, mit welchem die biologische Barriere *in situ* konfrontiert zu sein scheint, sowie dessen Konsequenzen auf die Homöostase des ZNS detailgetreuer *in vitro* erforschbar.

4.4 Östrogen-Behandlung

Wie bereits in Kap. 1.2.1 dargelegt, ist das als Basis für die *in vitro* Experimente betrachtete Patient:innenkollektiv überwiegend weiblichen Geschlechts, fortgeschrittenen Alters sowie postmenopausal. Durch das Erreichen der Menopause sinkt der systemische Östrogen-Spiegel langfristig ab (59, 60). Die unabdingliche Integration der BHS in die Hirn-Herz-Achse im Rahmen pathophysiologischer Überlegungen wurde bereits in Kap. 1.2.2 erläutert. Darauf beruhend wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Östrogen-Mangelzustand eine gesteigerte Perzeptivität der BHS gegenüber schädigenden Effekten von Katecholaminen, Entzündungsmediatoren sowie einem Sauerstoff-Glucose-Entzug erzeugen könnte. Dass Östrogen die regelrechte Funktion der BHS unterstützt sowie Alterationen im Rahmen der Exposition gegenüber Noxen abmildert, wurde bereits mehrfach publiziert. Cipolla et al. detektierten eine Öffnung der BHS nach Ovariectomie *in vivo*, wobei diese unter Östrogen-Behandlung abgemildert wurde (145). Eine maßgebliche Reduktion der Occludin-Levels in murinen Hirngewebe-Proben nach Ovariectomie *in vivo* publizierten Kang et al. (146). Da die Ovarien den hauptsächlichen Bildungsort der weiblichen Sexualhormone darstellen (147), ist die Ovariectomie *in vivo* ein häufig genutztes, etabliertes Modell zur Induktion eines Östrogen-Entzugs. *In vitro* zeigten Burek et al. die

E2-induzierte Steigerung der Expression von Claudin-5 an cEND- sowie cerebEND-Zellen. Auch ein relevanter Anstieg der TER konnte gemessen werden (88). Bei simulierter Ischämie wurden Östrogen-Effekte auf die BHS ebenfalls bereits nachgewiesen: Uzum et al. konnten die gesteigerte Permeabilität der BHS nach Ischämie mit anschließender Reperfusion an ovariektomierten Ratten zeigen, während eine Östrogen-Supplementation diese abschwächte (25). Konkordant hierzu detektierten Lu et al. eine reduzierte BHS-Öffnung nach Ischämie bei Verabreichung eines Östrogen-Rezeptor-Agonisten *in vivo*. Occludin sowie Claudin-5 wurden auf Proteinebene verstärkt exprimiert (148). Na et al. sowie Shin et al. veröffentlichten analoge *in vitro* Ergebnisse, wobei die murine Hirnendothelzelllinie bEnd.3 unter E2-Behandlung bei OGD mit Reoxygenierung untersucht wurde. In Anwesenheit von E2 wurde die parazelluläre Permeabilität reduziert, die TER gesteigert sowie die Proteinexpression von Claudin-5 sowie Occludin induziert (94, 149). Basierend auf den erläuterten Publikationen kann ein protektiver Effekt von Östrogen auf die regelrechte Funktion der BHS im Allgemeinen beziehungsweise im Speziellen auch unter ischämischen Bedingungen angenommen werden. Es wurden direkte Effekte auf die Expression von Tight junction-Proteinen gezeigt, weshalb diese als Östrogen-Zielstrukturen betrachtet werden können. Die Junctionsproteine stellten somit geeignete Marker zur Evaluation der BHS im Rahmen der durchgeführten *in vitro* Experimente dar. Maggioli et al. konnten nach Applikation proinflammatorischer Zytokine eine durch Östrogen reduzierte Durchlässigkeit der BHS *in vivo* sowie eine gesteigerte TER *in vitro* detektieren (150). Durch Choi et al. wurde eine OGD-induzierte Expression des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 β gezeigt, welche durch eine vorangehende Behandlung mit E2 supprimiert werden konnte (151). Dies suggeriert ebenfalls einen schützenden Östrogen-Effekt auf die Architektur der BHS im Rahmen eines (neuro-)inflammatorischen Geschehens.

Alle in dieser Arbeit ausgewerteten Experimente wurden parallel unter E2-Applikation durchgeführt, um E2-induzierte Unterschiede der Expression untersuchter Zielstrukturen evaluieren zu können (vgl. Kap. 3.3). Basierend auf den Merkmalen des geschilderten Patient:innenkollektivs sowie den *in vitro* und *in vivo* Studien zu Östrogen-Effekten auf die BHS, wurde die Hypothese einer möglichen Protektion auf molekularer Ebene untersucht.

Bei Betrachtung der Zellmorphologie zeigte cEND nach vierstündiger Normoxie sowie nach OGD unter E2-Behandlung weiter ein regelrecht konfiguriertes Zellmonolayer, wobei sich ein verstärktes Fluoreszenzsignal von Claudin-5 entlang der Zellgrenzen zeigte. Dies kann als E2-induzierte Stärkung der BHS gewertet werden, sowohl bei Normoxie als auch nach Sauerstoff-Glucose-Entzug. Somit konnte hier mittels Immunfluoreszenz die Reagibilität von cEND-Zellen im Sinne einer Protektion gegenüber simulierter Ischämie gezeigt werden. Nach KAT-Behandlung konnte in Anwesenheit von E2 eine dezent abgemilderte Schädigung des cEND-Monolayers gezeigt werden, wobei weiterhin eine deutliche Störung des Zellverbandes vorlag. Die morphologischen Effekte von INF allein wurden durch E2 nicht alteriert. Nach vierstündiger Exposition gegenüber SF bei Normoxie konnte eine milde, protektive E2-Wirkung im Sinne des Erhalts der regelrechten Zellkonfiguration beobachtet werden. Nach 24 Stunden wurde keine Protektion durch E2 mehr festgestellt, wobei die SF-induzierte, morphologische Schädigung weitreichender als in Abwesenheit von E2 zu sein schien. Hier kann eine Zeitabhängigkeit des E2-Effektes vermutet werden, wobei kurzfristig über das Zeitintervall von vier Stunden ein Schutz gegenüber SF zu verzeichnen war. Nach Exposition über 24 Stunden kehrte sich dies um, wobei hier eine gesteigerte Perzeptivität der mit E2 konditionierten cEND-Zellen gegenüber SF vorliegen könnte. Dies würde bedeuten, dass die Kombination aus Dauer des Östrogen-Entzugs/der Östrogen-Exposition sowie des Katecholaminsturms/der Entzündung erst entscheidet, wie der Effekt auf die BHS aussehen könnte. Zur weiteren Untersuchung der möglichen zeitgebundenen Komponente der E2-Wirkung, sollte zukünftig eine Versuchsreihe über variable Intervalle hinweg erfolgen. Von besonderem Interesse wäre hier ein möglicher, zeitlicher Wendepunkt, an dem die initiale Protektion in eine Verstärkung des Schädigungsausmaßes konvertiert.

OGD resultierte in Anwesenheit von E2 ebenso wie in Abwesenheit dessen in keiner sichtbaren Alteration der regelrechten Zellmorphologie. Bei Applikation von SF hingegen wurde die SF-induzierte Auflockerung des cEND-Monolayers durch E2 deutlich eingedämmt. Hier lag nach simulierter Ischämie, wie auch in Abwesenheit von SF, ein protektiver E2-Effekt auf die cEND-Morphologie vor. Hier kann die Hypothese eines Östrogen-Schutzes gegenüber KAT/INF unter ischämischen Bedingungen *in vitro* angenommen werden. Nach abgeschlossener Reoxygenierungsphase zeigte sich keine

morphologische Differenz zwischen E2-freien und E2-exponierten Proben. In Anwesenheit von E2 wurde die SF-induzierte Kompromittierung des Zellverbandes sichtbar abgemildert. Hier konnte eine Protektion durch E2 über ein Zeitintervall von 24 Stunden beobachtet werden, im Gegensatz zu der Immunfluoreszenzfärbung nach SF-Exposition bei 24h NORMOX. Dieses Ergebnis könnte implizieren, dass ein E2-induzierter Schutz hier erst durch eine initiale OGD-Episode beziehungsweise durch die folgende Reoxygenierung getriggert wurde. Übertragen würde dies bedeuten, dass ein Östrogen-exponierter Organismus erst bezüglich der Erhaltung einer intakten BHS bei anhaltendem Katecholamin Sturm/Entzündung profitiert, wenn ein Ischämie-beziehungsweise Reperfusionseignis stattfindet. Um diese Annahmen zu überprüfen, könnte die Untersuchung von cEND nach verschiedenen Zeitspannen der SF-Exposition im Kontext von OGD + REOX weiteren Erkenntnisgewinn bringen. Ferner müssten *in vivo* Studien die Übertragbarkeit auf einen lebendigen Organismus prüfen.

Insgesamt konnte zu jeder Zeit ein weitestgehend analoges Expressionsverhalten der Junctionsproteine sowie Integrinuntereinheiten in Anwesenheit von E2 zu eben diesem in Abwesenheit von E2 beobachtet werden. Alle E2-exponierten Proben wurden mit ihren korrespondierenden E2-freien Kontrollen verglichen, wobei sich keine statistisch relevanten Unterschiede zeigten. Innerhalb der Versuchsgruppen variierten teilweise die Signifikanzniveaus. Die Ergebnisse der erläuterten Publikationen bezüglich einer induzierten Expression von Claudin-5 sowie Occludin wurden nicht reproduziert. Burek et al. publizierten zwar eine E2-induzierte Claudin-5-Expression, sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene, allerdings lediglich innerhalb eines Behandlungsintervalls von 24 Stunden. Nach über 24 Stunden wurde die Tendenz eines erneuten Abfalls des Claudin-5-Proteinlevels gezeigt (88). In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten erfolgte zunächst eine E2-Vorbehandlung über 24 Stunden. Erst im Anschluss wurde, unter fortlaufender E2-Applikation, die Exposition gegenüber der verschiedenen Inkubationsbedingungen sowie KAT und INF initiiert. Daraus resultierend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die E2-induzierte Alteration der Tight junction-Expression bei Normoxie zeitgebunden und nach Ablauf eines Intervalls von über 24 Stunden nicht mehr detektierbar sein könnte. Diese Vermutung wird durch die charakterisierten Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen gestützt. In der erwähnten Publikation von Shin et al. wurden die zerebralen Endothelzellen 48 Stunden mit E2 (1

nM) vorbehandelt, woraufhin der Sauerstoff-Glucose-Entzug erfolgte (149). Na et al. hingegen führten keine Konditionierung mit E2 durch, sondern initiierten die E2-Behandlung (10 nM) erst mit Beginn des Sauerstoff-Glucose-Entzugs über sechs Stunden mit anschließender Reoxygenierung über eine Stunde (94). Hier besteht ein zu den Experimenten dieser Arbeit differierendes Verhältnis aus der E2-Applikationsdauer beziehungsweise der verwendeten E2-Konzentration. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der zukünftigen Untersuchung, inwiefern verschiedene Zeitintervalle der anfänglichen E2-Exposition/-Konditionierung die Responsivität von cEND-Zellen gegenüber den folgenden Behandlungen beeinflussen.

Wie bereits beschrieben, variierten die Effekte der Behandlungskonstellationen innerhalb des E2-freien beziehungsweise des E2-exponierten Probenkollektivs. Nach KAT-Applikation über 24 Stunden wurde auf Proteinebene lediglich ZO-1 supprimiert. Unter simultaner E2-Behandlung wurden hingegen Occludin, ZO-1 sowie VE-Cadherin signifikant reduziert (vgl. Kap. 3.3.1.2). Hier wird eine gesteigerte Perzeptivität von cEND gegenüber der schädigenden KAT-Effekte unter E2-Exposition suggeriert. Bezüglich der Proteinexpression bei 24-stündiger KAT-Behandlung ist somit nicht nur die aufgestellte Hypothese eines protektiven E2-Effekts abzulehnen, sondern basierend auf den vorliegenden Ergebnissen sogar eine gegenteilige Tendenz annehmbar. In der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich in Anwesenheit von E2 eine Abmilderung des morphologischen KAT-Effektes (vgl. Kap. 3.3.1.1). Dies steht nicht im Widerspruch zur Proteinexpression, da das angefärbte, für die Beurteilung der Morphologie maßgebliche Claudin-5 auf Proteinebene nicht alteriert wurde. Ohne E2 wurde die quantitative Expression des Adherens junction-Proteins VE-Cadherin durch OGD supprimiert, woraufhin eine erneute Induktion nach Reoxygenierung folgte. Diese Undulation wurde durch E2 „geglättet“, wobei keine signifikanten Alterationen durch die genannten Inkubationsbedingungen gezeigt wurden. Auch das Occludin-Proteinlevel blieb unter E2-Applikation nach OGD stabil, während eine Reduktion dessen in Abwesenheit von E2 erfolgte. Innerhalb der reoxygenierten Versuchsgruppe wurde die Occludin-Expression durch SF lediglich bei E2-Exposition supprimiert, sowohl verglichen mit der alleinigen Reoxygenierung als auch mit der SF-Applikation bei OGD (vgl. Kap. 3.3.2.2). Hier präsentierte sich somit eine heterogene E2-Wirkung im Sinne einer Protektion gegenüber OGD sowie einer gesteigerten Perzeptivität bezüglich eines „Reperfusionsschadens“ bei

kombinierter SF-Exposition. Eine mögliche schützende Wirkung von E2 könnte im Rahmen der Messung der TER oder eines MTT-Tests (vgl. Kap. 4.1) genauer evaluiert und anschließend mit den Veränderungen der Junctionsproteine korreliert werden. So würde sich ein umfassenderes Bild ergeben.

Eine klare Limitation der durchgeführten *in vitro* Behandlung mit E2 ist die statische Konzentration sowie der plötzliche Beginn dieser. Physiologisch präsentieren geschlechtsreife, weibliche Erwachsene je nach Zeitpunkt ihres Zyklus schwankende Östrogen-Konzentrationen, wobei nur ein geringer Prozentsatz tatsächlich frei in biologisch aktiver Form vorliegt. Des Weiteren setzt mit der Geschlechtsreife nicht die plötzliche Überschwemmung des Organismus mit weiblichen Sexualhormonen ein, vielmehr steigen diese dynamisch über die Pubertät hinweg (152). Dies wurde *in vitro* nicht nachgebildet. Lediglich konnte auf eine von Burek et al. etablierte E2-Konzentration zurückgegriffen werden, wobei eine Titration dieser bezüglich der maximalen Responsivität der Claudin-5-Expression an cerebEND-Zellen erfolgt war (88). Konzentrations- sowie Zeitreihen könnten weitere Informationen über die Reagibilität des verwendeten *in vitro* Modells liefern. Ferner wurde die untersuchte, immortalisierte murine Endothelzelllinie initial aus neugeborenen Individuen weiblichen sowie männlichen Geschlechts im Alter von wenigen Tagen isoliert (87). Um das Modell entsprechend des zu Grunde liegenden Patient:innenkollektivs zu präzisieren, könnten folgende Faktoren vor Gewinnung der Zellen aus dem murinen Cerebrum berücksichtigt werden: die Verwendung primär weiblicher Tiere, das Heranziehen der Mäuse bis zu einem höheren Alter vor Euthanasie, eine Ovariectomie für einen *in vivo* induzierten Östrogen-Entzug sowie die *in vivo* Induktion einer TKM. So könnte das BHS-Modell gemäß der untersuchten pathophysiologischen Konstellation konditioniert werden. Zunächst wäre die primäre Untersuchung von eventuellen Unterschieden der Expression von Junctionsproteinen sowie der Barriereigenschaften zwischen „naiven“ cEND-Zellen und präkonditionierten cEND-Zellen notwendig. Im Anschluss sollten die Effekte der verschiedenen Inkubationsbedingungen sowie von KAT/INF evaluiert werden.

5 Zusammenfassung

Als klinisches Modell für die in der hier vorgelegten Dissertationsschrift durchgeführten Experimente diente das simultane Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls und eines Takotsubo-Syndroms. Diese Pathologien können als über die Hirn-Herz-Achse gekoppelt verstanden werden, in die die Blut-Hirn-Schranke (BHS) als funktionale Komponente integriert ist. Das klinisch-neurologische Outcome dieser Patient:innen scheint signifikant schlechter zu sein als nach solitärem ischämischen Insult. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die BHS in besonderem Maße kompromittiert sein könnte. Das prädominant weibliche, postmenopausale Patient:innenkollektiv präsentierte laborchemisch erhöhte Katecholaminspiegel sowie Entzündungsparameter. Diese Konditionen wurden unter Sauerstoff-Glucose-Entzug (OGD) *in vitro* simuliert und resultierende Veränderungen an einem etablierten BHS-Modell aus murinen cEND-Zellen untersucht. Die Evaluation der BHS-Integrität erfolgte anhand von spezifischen Junctionsproteinen sowie Integrinuntereinheiten. Alle Experimente wurden parallel unter Östrogen-Applikation (E2) durchgeführt, um eine mögliche BHS-Protektion durch weibliche Sexualhormone zu untersuchen. Ziel war es, Konsequenzen der erläuterten Pathologien auf die BHS auf molekularer Ebene zu verstehen. Es zeigten sich heterogene Effekte mit folgenden Tendenzen: Die getrennte Applikation von Katecholaminen (KAT) sowie Entzündungsmediatoren (INF) führte gegenüber der simultanen Behandlung jeweils zu einem geringeren BHS-Schaden. Generell schien dieser zeitgebunden, wobei sich das Ausmaß gewissermaßen proportional zur Einwirkdauer verhielt. Auswirkungen von OGD sowie einer Reoxygenierung potenzierten sich mit den Effekten von KAT/INF. Überwiegend kompromittierten OGD und KAT/INF die BHS-Architektur, wobei die Reoxygenierung teils eine „Erholung“ zuließ oder in einem „Reperfusionsschaden“ mündete. Eine Protektion durch E2 war morphologisch nachweisbar, speziell gegenüber OGD, KAT/INF sowie einem „Reperfusionsschaden“. Auf Ebene der Gen- sowie Proteinexpression konnte dies jedoch nicht konsistent gezeigt werden. Insbesondere im Hinblick auf die Erforschung der pathologischen Konstellation *in situ* und deren molekularer Ziele sind weitere Untersuchungen notwendig, die auf den hier dargestellten Ergebnissen aufsetzen können. Aus dem umfassenderen Verständnis der Pathophysiologie ließen sich möglicherweise neue Therapiekonzepte zur Protektion der BHS ableiten.

6 Literaturverzeichnis

1. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(1):a020412.
2. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;38:2-6.
3. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Zentralnervensystem. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, editors. *Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage* ed: Georg Thieme Verlag; 2019.
4. Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ. The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *J Neurochem.* 2009;111(2):291-314.
5. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005;57(2):173-85.
6. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007;100(2):158-73.
7. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Gefäße der Mikrozirkulation. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, editors. *Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage* ed: Georg Thieme Verlag; 2019.
8. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Zellkontakte. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, editors. *Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage* ed: Georg Thieme Verlag; 2019.
9. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007;8(5):215.
10. Estevez B, Shen B, Du X. Targeting integrin and integrin signaling in treating thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(1):24-9.
11. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* 2013;19(12):1584-96.
12. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20).
13. Bernardo-Castro S, Sousa JA, Brás A, Cecília C, Rodrigues B, Almendra L, et al. Pathophysiology of Blood-Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Front Neurol.* 2020;11:594672.
14. GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(5):439-58.
15. Lin MP, Liebeskind DS. Imaging of Ischemic Stroke. *Continuum (Minneapolis).* 2016;22(5, Neuroimaging):1399-423.
16. Schleberger R, Rillig A, Kirchhof P, Metzner A, Reissmann B. [Update atrial fibrillation: the 2020 ESC guidelines and recent data on early rhythm control]. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol.* 2021;32(2):257-63.
17. Liu S, Levine SR, Winn HR. Targeting ischemic penumbra: part I - from pathophysiology to therapeutic strategy. *J Exp Stroke Transl Med.* 2010;3(1):47-55.
18. Ringleb P, Veltkamp R, Schwab S, Bendszus M, Hacke W. Zerebrale Durchblutungsstörungen: Ischämische Infarkte. In: Hacke W, editor. *Neurologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 179-240.
19. Jiao H, Wang Z, Liu Y, Wang P, Xue Y. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *J Mol Neurosci.* 2011;44(2):130-9.

20. Kleinschnitz C, Blecharz K, Kahles T, Schwarz T, Kraft P, Gobel K, et al. Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome. *Stroke*. 2011;42(4):1081-9.
21. Yu H, Wang P, An P, Xue Y. Recombinant human angiopoietin-1 ameliorates the expressions of ZO-1, occludin, VE-cadherin, and PKC α signaling after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J Mol Neurosci*. 2012;46(1):236-47.
22. Wicha P, Tocharus J, Janyou A, Jittiwat J, Chaichompoo W, Suksamrarn A, et al. Hexahydrocurcumin alleviated blood-brain barrier dysfunction in cerebral ischemia/reperfusion rats. *Pharmacol Rep*. 2020;72(3):659-71.
23. Guo P, Jin Z, Wu H, Li X, Ke J, Zhang Z, et al. Effects of irisin on the dysfunction of blood-brain barrier in rats after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Brain Behav*. 2019;9(10):e01425.
24. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 1998;29(10):2189-95.
25. Uzum G, Bahçekapılı N, Baltacı AK, Mogulkoc R, Ziyilan YZ. Pre- and post-estrogen administration in global cerebral ischemia reduces blood-brain barrier breakdown in ovariectomized rats. *Acta Physiol Hung*. 2015;102(1):60-6.
26. Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018;315(3):C343-c56.
27. Engelhardt S, Al-Ahmad AJ, Gassmann M, Ogunshola OO. Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2014;229(8):1096-105.
28. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;316(2):C135-c53.
29. Silwedel C, Forster C. Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli. *J Neuroimmunol*. 2006;179(1-2):37-45.
30. Forster C, Kahles T, Kietz S, Drenckhahn D. Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol*. 2007;580(Pt.3):937-49.
31. Nemeth JA, Nakada MT, Trikha M, Lang Z, Gordon MS, Jayson GC, et al. Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. *Cancer Invest*. 2007;25(7):632-46.
32. Schwartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(5):539-44.
33. Deutzmann R, Bruckner P. Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 931-51.
34. Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelha M, Rosner J, Schneider UC, et al. Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Transl Stroke Res*. 2018;9(6):631-42.
35. Salvador E, Burek M, Forster CY. Stretch and/or oxygen glucose deprivation (OGD) in an in vitro traumatic brain injury (TBI) model induces calcium alteration and inflammatory cascade. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:323.

36. Gibson CL, Srivastava K, Sprigg N, Bath PM, Bayraktutan U. Inhibition of Rho-kinase protects cerebral barrier from ischaemia-evoked injury through modulations of endothelial cell oxidative stress and tight junctions. *J Neurochem.* 2014;129(5):816-26.
37. McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J Neurosci.* 2008;28(38):9451-62.
38. Danielski LG, Giustina AD, Badawy M, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F, et al. Brain Barrier Breakdown as a Cause and Consequence of Neuroinflammation in Sepsis. *Mol Neurobiol.* 2018;55(2):1045-53.
39. Jacob A, Alexander JJ. Complement and blood-brain barrier integrity. *Mol Immunol.* 2014;61(2):149-52.
40. Huang X, Hussain B, Chang J. Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms. *CNS Neurosci Ther.* 2021;27(1):36-47.
41. Li W, Pan R, Qi Z, Liu K. Current progress in searching for clinically useful biomarkers of blood-brain barrier damage following cerebral ischemia. *Brain Circulation.* 2018;4(4):145-52.
42. Sharshar T, Carlier R, Bernard F, Guidoux C, Brouland JP, Nardi O, et al. Brain lesions in septic shock: a magnetic resonance imaging study. *Intensive Care Med.* 2007;33(5):798-806.
43. Templin C, Ghadri JR, Diekmann J, Napp LC, Bataiosu DR, Jaguszewski M, et al. Clinical Features and Outcomes of Takotsubo (Stress) Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015;373(10):929-38.
44. Said SM, Saygili E, Rana OR, Genz C, Hahn J, Bali R, et al. Takotsubo Cardiomyopathy: What we have Learned in the Last 25 Years? (A Comparative Literature Review). *Curr Cardiol Rev.* 2016;12(4):297-303.
45. Lüscher TF, Templin C. Is takotsubo syndrome a microvascular acute coronary syndrome? Towards of a new definition. *Eur Heart J.* 2016;37(37):2816-20.
46. Y-Hassan S, Tornvall P. Epidemiology, pathogenesis, and management of takotsubo syndrome. *Clin Auton Res.* 2018;28(1):53-65.
47. Pelliccia F, Kaski JC, Crea F, Camici PG. Pathophysiology of Takotsubo Syndrome. *Circulation.* 2017;135(24):2426-41.
48. Nef HM, Möllmann H, Kostin S, Troidl C, Voss S, Weber M, et al. Tako-Tsubo cardiomyopathy: intraindividual structural analysis in the acute phase and after functional recovery. *Eur Heart J.* 2007;28(20):2456-64.
49. Gupta S, Gupta MM. Takotsubo syndrome. *Indian Heart J.* 2018;70(1):165-74.
50. Balkin DM, Cohen LS. Takotsubo syndrome. *Coron Artery Dis.* 2011;22(3):206-14.
51. Budnik M, Kucharz J, Wiechno P, Demkow T, Kochanowski J, Górska E, et al. Chemotherapy-Induced Takotsubo Syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1114:19-29.
52. Okura H. Update of takotsubo syndrome in the era of COVID-19. *J Cardiol.* 2021;77(4):361-9.
53. Paur H, Wright PT, Sikkil MB, Tranter MH, Mansfield C, O'Gara P, et al. High levels of circulating epinephrine trigger apical cardiodepression in a β 2-adrenergic receptor/Gi-dependent manner: a new model of Takotsubo cardiomyopathy. *Circulation.* 2012;126(6):697-706.
54. Post SR, Hammond HK, Insel PA. Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:343-60.

55. Heubach JF, Ravens U, Kaumann AJ. Epinephrine activates both Gs and Gi pathways, but norepinephrine activates only the Gs pathway through human beta2-adrenoceptors overexpressed in mouse heart. *Mol Pharmacol.* 2004;65(5):1313-22.
56. Abraham J, Mudd JO, Kapur NK, Klein K, Champion HC, Wittstein IS. Stress cardiomyopathy after intravenous administration of catecholamines and beta-receptor agonists. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(15):1320-5.
57. Vitale C, Rosano GM, Kaski JC. Role of Coronary Microvascular Dysfunction in Takotsubo Cardiomyopathy. *Circ J.* 2016;80(2):299-305.
58. Ghadri JR, Wittstein IS, Prasad A, Sharkey S, Dote K, Akashi YJ, et al. International Expert Consensus Document on Takotsubo Syndrome (Part I): Clinical Characteristics, Diagnostic Criteria, and Pathophysiology. *Eur Heart J.* 2018;39(22):2032-46.
59. Nelson HD. Menopause. *Lancet.* 2008;371(9614):760-70.
60. Köhrle J, Schomburg L, Schweizer U. Steroidhormone – Produkte von Nebennierenrinde und Keimdrüsen. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 495-511.
61. Ueyama T, Ishikura F, Matsuda A, Asanuma T, Ueda K, Ichinose M, et al. Chronic estrogen supplementation following ovariectomy improves the emotional stress-induced cardiovascular responses by indirect action on the nervous system and by direct action on the heart. *Circ J.* 2007;71(4):565-73.
62. Komesaroff PA, Esler MD, Sudhir K. Estrogen supplementation attenuates glucocorticoid and catecholamine responses to mental stress in perimenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(2):606-10.
63. Wilson HM, Cheyne L, Brown PAJ, Kerr K, Hannah A, Srinivasan J, et al. Characterization of the Myocardial Inflammatory Response in Acute Stress-Induced (Takotsubo) Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci.* 2018;3(6):766-78.
64. Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Greenwood BN, et al. Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience.* 2005;135(4):1295-307.
65. Scally C, Abbas H, Ahearn T, Srinivasan J, Mezincescu A, Rudd A, et al. Myocardial and Systemic Inflammation in Acute Stress-Induced (Takotsubo) Cardiomyopathy. *Circulation.* 2019;139(13):1581-92.
66. Santoro F, Costantino MD, Guastafierro F, Triggiani G, Ferraretti A, Tarantino N, et al. Inflammatory patterns in Takotsubo cardiomyopathy and acute coronary syndrome: A propensity score matched analysis. *Atherosclerosis.* 2018;274:157-61.
67. Vogelstein JT, Powell M, Koenecke A, Xiong R, Fischer N, Huq S, et al. Alpha-1 adrenergic receptor antagonists for preventing acute respiratory distress syndrome and death from cytokine storm syndrome. *ArXiv.* 2020.
68. Roghi A, Pedrotti P, Milazzo A, Bonacina E, Bucciarelli-Ducci C. Adrenergic myocarditis in pheochromocytoma. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2011;13(1):4.
69. Ali A, Diebel L, Liberati D. Stress hormone epinephrine increases IgA transport across respiratory epithelial surfaces. *J Am Coll Surg.* 2014;218(3):450-8.
70. Nagai M, Dote K, Kato M, Sasaki S, Oda N, Kagawa E, et al. The Insular Cortex and Takotsubo Cardiomyopathy. *Curr Pharm Des.* 2017;23(6):879-88.
71. Dande AS, Pandit AS, Galin ID. Takotsubo cardiomyopathy followed by neurogenic stunned myocardium in the same patient: gradations of the same disease? *Cardiology.* 2011;118(3):175-8.

72. Yoshimura S, Toyoda K, Ohara T, Nagasawa H, Ohtani N, Kuwashiro T, et al. Takotsubo cardiomyopathy in acute ischemic stroke. *Ann Neurol*. 2008;64(5):547-54.
73. Jung JM, Kim JG, Kim JB, Cho KH, Yu S, Oh K, et al. Takotsubo-Like Myocardial Dysfunction in Ischemic Stroke: A Hospital-Based Registry and Systematic Literature Review. *Stroke*. 2016;47(11):2729-36.
74. Morris NA, Chen ML, Adejumo OL, Murthy SB, Kamel H, Merkler AE. Stroke Risk Following Takotsubo Cardiomyopathy. *Neurohospitalist*. 2020;10(4):277-80.
75. Ding KJ, Cammann VL, Szawan KA, Stähli BE, Wischnewsky M, Di Vece D, et al. Intraventricular Thrombus Formation and Embolism in Takotsubo Syndrome: Insights From the International Takotsubo Registry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(1):279-87.
76. Mattle H, Fischer U. Schweregradeinteilung der zerebrovaskulären Ischämien. In: Mattle H, Fischer U, editors. *Kurzlehrbuch Neurologie*. 5., überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2021.
77. Nagai M, Hoshide S, Kario K. The insular cortex and cardiovascular system: a new insight into the brain-heart axis. *J Am Soc Hypertens*. 2010;4(4):174-82.
78. Wischmeyer E, Gründer S. Supraspinale Einflüsse auf das vegetative Nervensystem. In: Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A, Markwardt F, et al., editors. *Taschenlehrbuch Physiologie*. 2., überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2015.
79. Battaglini D, Robba C, Lopes da Silva A, Dos Santos Samary C, Leme Silva P, Dal Pizzol F, et al. Brain-heart interaction after acute ischemic stroke. *Crit Care*. 2020;24(1):163.
80. Merino JG, Latour LL, Tso A, Lee KY, Kang DW, Davis LA, et al. Blood-brain barrier disruption after cardiac surgery. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34(3):518-23.
81. Anrather J, Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics*. 2016;13(4):661-70.
82. Van Linthout S, Tschöpe C. Inflammation - Cause or Consequence of Heart Failure or Both? *Curr Heart Fail Rep*. 2017;14(4):251-65.
83. Carrillo-Salinas FJ, Ngwenyama N, Anastasiou M, Kaur K, Alcaide P. Heart Inflammation: Immune Cell Roles and Roads to the Heart. *Am J Pathol*. 2019;189(8):1482-94.
84. Díaz HS, Toledo C, Andrade DC, Marcus NJ, Del Rio R. Neuroinflammation in heart failure: new insights for an old disease. *J Physiol*. 2020;598(1):33-59.
85. Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, et al. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci*. 1997;110 (Pt 5):583-8.
86. Forster C, Silwedel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, et al. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol*. 2005;565(Pt 2):475-86.
87. Burek M, Salvador E, Forster CY. Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model. *J Vis Exp*. 2012(66):e4022.
88. Burek M, Arias-Loza PA, Roewer N, Forster CY. Claudin-5 as a novel estrogen target in vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):298-304.
89. Blecharz KG, Drenckhahn D, Forster CY. Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(6):1139-49.

90. Kämmerer U, Garnier Y, Singer D. Physiologie der weiblichen Geschlechtsorgane. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, editors. Physiologie. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2019.
91. Dukes AA, Van Laar VS, Cascio M, Hastings TG. Changes in endoplasmic reticulum stress proteins and aldolase A in cells exposed to dopamine. *J Neurochem*. 2008;106(1):333-46.
92. Shao YY, Lin H, Li YS, Lee YH, Chen HM, Cheng AL, et al. High plasma interleukin-6 levels associated with poor prognosis of patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2017;47(10):949-53.
93. Burek M, Steinberg K, Forster CY. Mechanisms of transcriptional activation of the mouse claudin-5 promoter by estrogen receptor alpha and beta. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;392(1-2):144-51.
94. Na W, Lee JY, Kim WS, Yune TY, Ju BG. 17 β -Estradiol Ameliorates Tight Junction Disruption via Repression of MMP Transcription. *Mol Endocrinol*. 2015;29(9):1347-61.
95. Neuhaus W, Gaiser F, Mahringer A, Franz J, Riethmüller C, Förster C. The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:352.
96. Jensen EC. The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012;295(3):369-71.
97. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2015;1312:17-30.
98. Haan C, Behrmann I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods*. 2007;318(1-2):11-9.
99. Russell WC, Newman C, Williamson DH. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*. 1975;253(5491):461-2.
100. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 1999;26(1):112-22, 24-5.
101. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 2020;69(4):317-25.
102. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):986-94.
103. Hatherell K, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Pilkington GJ. Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods*. 2011;199(2):223-9.
104. Urich E, Lazic SE, Molnos J, Wells I, Freskgård PO. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS One*. 2012;7(5):e38149.
105. Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):245-61.
106. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
107. Silbernagl S, Despopoulos jr A, Draguhn A. Catecholamine, adrenerge Übertragung und Adrenozeptoren. In: Silbernagl S, Despopoulos jr A, Draguhn A,

editors. Taschenatlas Physiologie. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2018.

108. May P, Becker C-M, Bock HH. Nervensystem. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 968-94.

109. Goldstein DS. Catecholamines 101. Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society. 2010;20(6):331-52.

110. Deutzmann R. Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R, editors. Duale Reihe Biochemie. 4. Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2016.

111. Staiger H, Stefan N, Kellerer M, Häring H-U. Glucagon und Katecholamine – Gegenspieler des Insulins. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 458-65.

112. Rubí B, Maechler P. Minireview: new roles for peripheral dopamine on metabolic control and tumor growth: let's seek the balance. Endocrinology. 2010;151(12):5570-81.

113. Aygun N, Uludag M. Pheochromocytoma and Paraganglioma: From Clinical Findings to Diagnosis. Sisli Etfal Hastan Tip Bul. 2020;54(3):271-80.

114. Andersen A, Jørgensen PG, Knop FK, Vilsbøll T. Hypoglycaemia and cardiac arrhythmias in diabetes. Ther Adv Endocrinol Metab. 2020;11:2042018820911803.

115. Rocca A, Pignat JM, Berney L, Jöhr J, Van de Ville D, Daniel RT, et al. Sympathetic activity and early mobilization in patients in intensive and intermediate care with severe brain injuries: a preliminary prospective randomized study. BMC Neurol. 2016;16(1):169.

116. Heinrich PC, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Mediatoren. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 407-10.

117. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008;454(7203):428-35.

118. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. Cell. 2010;140(6):771-6.

119. Ansorge S, Täger M. Immunologie. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 893-930.

120. Khorchid A, Fragoso G, Shore G, Almazan G. Catecholamine-induced oligodendrocyte cell death in culture is developmentally regulated and involves free radical generation and differential activation of caspase-3. Glia. 2002;40(3):283-99.

121. Burke WJ, Li SW, Chung HD, Ruggiero DA, Kristal BS, Johnson EM, et al. Neurotoxicity of MAO metabolites of catecholamine neurotransmitters: role in neurodegenerative diseases. Neurotoxicology. 2004;25(1-2):101-15.

122. Rosenberg PA. Catecholamine toxicity in cerebral cortex in dissociated cell culture. J Neurosci. 1988;8(8):2887-94.

123. Chow BW, Gu C. The molecular constituents of the blood-brain barrier. Trends Neurosci. 2015;38(10):598-608.

124. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. Physiol Rev. 2019;99(1):21-78.

125. del Zoppo GJ, Milner R. Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(9):1966-75.

126. Sheppard D. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol.* 2000;19(3):203-9.
127. Singh B, Janardhan KS, Kanthan R. Expression of angiostatin, integrin alphavbeta3, and vitronectin in human lungs in sepsis. *Exp Lung Res.* 2005;31(8):771-82.
128. Sobel RA, Hinojoza JR, Maeda A, Chen M. Endothelial cell integrin laminin receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol.* 1998;153(2):405-15.
129. Geisslinger G, Menzel S, Gudermann T, Hinze B, Ruth P, Mutschler E. *Mutschler Arzneimittelwirkungen : Pharmakologie – Klinische Pharmakologie – Toxikologie*: Hirzel Verlag; 2019.
130. Ringelb P. KM, Jansen O., et al. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls, S2e-Leitlinie, 2021, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 08.12.2021)
131. Prabhakaran S, Castonguay AC, Gupta R, Sun CJ, Martin CO, Holloway W, et al. Complete reperfusion mitigates influence of treatment time on outcomes after acute stroke. *J Neurointerv Surg.* 2017;9(4):366-9.
132. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brodt TG, Toni D, Grotta JC, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet.* 2010;375(9727):1695-703.
133. Chen J, Sun L, Ding GB, Chen L, Jiang L, Wang J, et al. Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation Induces Human Brain Microvascular Endothelial Cell Hyperpermeability Via VE-Cadherin Internalization: Roles of RhoA/ROCK2. *J Mol Neurosci.* 2019;69(1):49-59.
134. Liu J, Jin X, Liu KJ, Liu W. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage. *J Neurosci.* 2012;32(9):3044-57.
135. Gertz K, Kronenberg G, Uhlemann R, Prinz V, Marquina R, Corada M, et al. Partial loss of VE-cadherin improves long-term outcome and cerebral blood flow after transient brain ischemia in mice. *BMC Neurol.* 2016;16(1):144.
136. Abumiya T, Lucero J, Heo JH, Tagaya M, Koziol JA, Copeland BR, et al. Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(9):1038-50.
137. Okada Y, Copeland BR, Hamann GF, Koziol JA, Cheresch DA, del Zoppo GJ. Integrin alphavbeta3 is expressed in selected microvessels after focal cerebral ischemia. *The American journal of pathology.* 1996;149(1):37-44.
138. Tagaya M, Haring HP, Stuijver I, Wagner S, Abumiya T, Lucero J, et al. Rapid loss of microvascular integrin expression during focal brain ischemia reflects neuron injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21(7):835-46.
139. Müller M, Graeve L. Translation – Synthese von Proteinen. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 600-14.
140. Brix J, Koch H-G, Heinrich PC. Transkription und Prozessierung der RNA. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 567-87.

141. Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics*. 2010;4(3):194-201.
142. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(4):697-709.
143. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-67.
144. Sun MS, Jin H, Sun X, Huang S, Zhang FL, Guo ZN, et al. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:3804979.
145. Cipolla MJ, Godfrey JA, Wiegman MJ. The effect of ovariectomy and estrogen on penetrating brain arterioles and blood-brain barrier permeability. *Microcirculation*. 2009;16(8):685-93.
146. Kang HS, Ahn HS, Kang HJ, Gye MC. Effect of estrogen on the expression of occludin in ovariectomized mouse brain. *Neurosci Lett*. 2006;402(1-2):30-4.
147. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Weibliche Geschlechtsorgane. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, editors. *Taschenlehrbuch Histologie*. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2019.
148. Lu D, Qu Y, Shi F, Feng D, Tao K, Gao G, et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER-1) ameliorates blood-brain barrier permeability after global cerebral ischemia in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;477(2):209-14.
149. Shin JA, Yoon JC, Kim M, Park EM. Activation of classical estrogen receptor subtypes reduces tight junction disruption of brain endothelial cells under ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2016;92:78-89.
150. Maggioli E, McArthur S, Mauro C, Kieswich J, Kusters DHM, Reutelingsperger CPM, et al. Estrogen protects the blood-brain barrier from inflammation-induced disruption and increased lymphocyte trafficking. *Brain Behav Immun*. 2016;51:212-22.
151. Choi JS, Kim SJ, Shin JA, Lee KE, Park EM. Effects of estrogen on temporal expressions of IL-1beta and IL-1ra in rat organotypic hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci Lett*. 2008;438(2):233-7.
152. Pedain C. Hypothalamisch-hypophysär-gonadale Steuerung der Sexualfunktion. In: Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al., editors. *Duale Reihe Physiologie*. 3., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2016.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACS	Akutes Koronarsyndrom
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Cldn	Claudin
Cldn-5	Claudin-5
cm ²	Quadratcentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
E2	17 β -Östradiol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
g	Gramm
h	Stunde(n)
INF	Entzündungsmediatoren (TNF- α , Interleukin-6)
Itg α 1	Integrin- α 1
Itg α V	Integrin- α V
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
KAT	Katecholamine (Epinephrin, Norepinephrin, Dopamin)
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar

MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger-RNA
n	Anzahl der Wiederholungen eines Experiments
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NORMOX	Normoxie
Ocln	Occludin
OGD	Sauerstoff-Glucose-Entzug (Oxygen Glucose Deprivation) über vier Stunden <i>in vitro</i>
OGD + REOX	Reoxygenierung über 20 Stunden nach zuvor vier Stunden OGD <i>in vitro</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
rel.	Relativ
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SF	Stressfaktoren (Katecholamine und Entzündungsmediatoren)
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TER	Transendotheliale elektrische Resistenz
TKM	Takotsubo-Kardiomyopathie
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TTS	Takotsubo-Syndrom
V	Volt
VE-Cad.	Vascular-Endothelial-Cadherin

vgl.	vergleiche
vs.	versus
W	Watt
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula-Occludens-Protein
ZO-1	Zonula-Occludens-Protein-1
ZO-2	Zonula-Occludens-Protein-2
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tight junctions, Adherens junctions und Integrine.....	2
Abbildung 3: Allgemeines Behandlungsschema bei Normoxie.....	22
Abbildung 4: Schema der separaten Behandlung mit Katecholaminen/Entzündungsfaktoren bei Normoxie.....	22
Abbildung 5: Schema der simultanen Behandlung mit Katecholaminen und Entzündungsfaktoren.....	23
Abbildung 6: Behandlungsschema bei Sauerstoff-Glucose-Entzug.....	24
Abbildung 7: Behandlungsschema mit Katecholaminen und Entzündungsfaktoren bei Sauerstoff-Glucose-Entzug mit Reoxygenierung.....	25
Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer bestückten Blotting-Kassette.....	28
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbungen nach separater Behandlung mit Katecholaminen/Entzündungsmediatoren bei Normoxie.....	34
Abbildung 10: Proteinexpression nach Behandlung mit Katecholaminen bei Normoxie	36
Abbildung 11: Proteinexpression nach Behandlung mit Entzündungsmediatoren bei Normoxie	37
Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbungen nach Behandlung mit Stressfaktoren.....	40
Abbildung 13: Proteinexpression nach Behandlung mit Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen (I).....	44
Abbildung 14: Proteinexpression nach Behandlung mit Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen (II)	46
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung nach separater Behandlung mit Katecholaminen/Entzündungsmediatoren unter Östrogen-Applikation bei Normoxie..	53

Abbildung 16: Proteinexpression nach Applikation von Katecholaminen unter Östrogen-Behandlung bei Normoxie.....	55
Abbildung 17: Proteinexpression nach Applikation von Entzündungsmediatoren unter Östrogen-Behandlung bei Normoxie.....	56
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbungen nach Applikation von Stressfaktoren unter Östrogen-Applikation bei variablen Inkubationsbedingungen (I).....	60
Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbungen nach Applikation von Stressfaktoren unter Östrogen-Applikation bei variablen Inkubationsbedingungen (II)	62
Abbildung 20: Proteinexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung (I)	65
Abbildung 21: Proteinexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung (II).....	67

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Softwares	11
Tabelle 2: Substanzen.....	13
Tabelle 3: Puffer	15
Tabelle 4: Lösungen	15
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial.....	16
Tabelle 6: Primärantikörper.....	17
Tabelle 7: Sekundärantikörper.....	18
Tabelle 8: PCR-Sonden	18
Tabelle 9: Angewandte Laborkits.....	19
Tabelle 10: Medien zur Kultivierung von cEND	21
Tabelle 11: Substanzen zur Behandlung von cEND	21
Tabelle 12: Genexpression nach separater Behandlung mit Katecholaminen/Entzündungsfaktoren bei Normoxie.....	38
Tabelle 13: Genexpression nach Behandlung mit Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen (I).....	48
Tabelle 14: Genexpression nach Behandlung mit Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen (II)	50
Tabelle 15: Genexpression nach Applikation von Katecholaminen unter Östrogen- Behandlung bei Normoxie.....	57
Tabelle 16: Genexpression nach Applikation von Entzündungsmediatoren unter Östrogen-Behandlung bei Normoxie.....	58
Tabelle 17: Genexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung (I)	69
Tabelle 18: Genexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen unter Östrogen-Behandlung (II).....	73

Tabelle 19: Übersicht Proteinexpression nach separater Applikation von Katecholaminen und Entzündungsmediatoren bei Normoxie	75
Tabelle 20: Übersicht Genexpression nach separater Applikation von Katecholaminen und Entzündungsmediatoren bei Normoxie	75
Tabelle 21: Übersicht Proteinexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen.....	76
Tabelle 22: Übersicht Genexpression nach Applikation von Stressfaktoren bei variablen Inkubationsbedingungen.....	77

IV Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Förster für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, das herausfordernde Projekt, aus welchem diese Arbeit entstand, den steten Austausch und die immer konstruktive Kritik. Nur durch dieses Gesamtpaket kann ich nun eine fertige Dissertation vorlegen. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Störk bedanken, der durch seine langjährige Erfahrung und seinen „klinischen Blick“ auf mein Projekt mein Betreuungskomitee erst komplett gemacht hat. Besonders bei der finalen Korrektur sowie der Einbettung der *in vitro*-Ergebnisse in den klinischen Kontext, hätte mir ohne ihn eine wichtige Instanz gefehlt. Vom ersten Tag der experimentellen Laborarbeit bis zum Abschluss dieser Arbeit hat mich meine Betreuerin Frau PD Dr. Burek praktisch sowie menschlich zu jeder Zeit bedingungslos unterstützt. Ihre Geduld, Hilfsbereitschaft und fachliche Kompetenz sind außergewöhnlich. Gosia, ich danke dir!

Meine Hochachtung gilt Frau A. Neuhoff sowie Frau E. Wilken, die immer wieder aufs Neue Doktorand:innen durch den Dschungel des praktischen Arbeitens im Labor lotsen, hierbei nie die Geduld verlieren und stets eine angenehme Atmosphäre schaffen. Dank ihnen konnte ich in kürzester Zeit die notwendigen Methoden erlernen und habe hierbei immer die größtmögliche Unterstützung erhalten. Mit euch gab es für jedes Problem eine Lösung!

Schließlich danke ich allen Menschen, die mich über die Jahre meines Studiums sowie meiner Promotion hinweg unterstützt haben und auch jetzt immer für mich da sind. Besonders Alexandra, Chantalle und Simon möchte ich für ihre grenzenlose Liebe und Freundschaft danken.

V Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Veröffentlichungen

1. Ittner C, Burek M, Störk S, Nagai M, Förster CY. Increased Catecholamine Levels and Inflammatory Mediators Alter Barrier Properties of Brain Microvascular Endothelial Cells in vitro. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:73.
2. Smetak M, Ittner C, Burek M, Nagai M, Förster C. Effects of blood exposure, increased catecholamine levels and inflammatory mediators on brain microvascular endothelial cell integrity in vitro. *Annals of Clinical and Laboratory Research.* 2021; 9(3), 344.

Kongressteilnahmen

1. Ittner C, Burek M, Störk S, Nagai M, Förster CY. Effects of increased catecholamine levels and inflammatory mediators on brain microvascular endothelial cells under oxygen glucose deprivation conditions. 22. International Symposium on Signal Transduction on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers, 11.-13.09.2019, Würzburg.
2. Smetak M, Ittner C, Burek M, Nagai M, Förster C. Effects of blood exposure, increased catecholamine levels and inflammatory mediators on brain microvascular endothelial cell integrity in vitro. *World Heart Congress and Traditional Medicine 2020*, 12.-13.03.2020, Osaka, Japan.