

Aus dem Institut für Pathobiochemie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Meprin α und die Auswirkung auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Carsten Wenz
aus Mainz

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 07. Oktober 2025

Nachnutzungslizenz: Namensnennung (CC-BY-4.0)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Blut-Hirn-Schranke	4
2.1.1 Geschichte der BHS-Forschung	4
2.1.2 Körperbarrieren und Gefäße	5
2.1.3 Aufbau und Funktion der BHS	6
2.1.4 Transport über die BHS	11
2.1.5 Verlust der BHS-Integrität	12
2.2 Meprin α	13
2.2.1 Aufbau und Struktur	13
2.2.2 Expression und Substrate	14
2.2.3 Regulation, Inhibition und Aktivierung	15
2.2.4 Funktionen	16
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Eukaryotische Zellen	19
3.1.2 Bakterien, Plasmide und Primer	19
3.1.3 Reagenzien	20
3.1.4 Geräte und Laborhilfsmittel	31
3.1.5 Software und Datenbanken	32
3.2 Methoden	33
3.2.1 Zellbiologische Methoden	33
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	46
3.2.3 Generelle Methoden zur Arbeit mit DNA	50
3.2.4 Mikrobiologische Methoden	53
3.2.5 Analysen und Statistiken	54
4 Ergebnisse	55
4.1 Herstellung des pLBCX_mep1a_C Vektors	55
4.1.1 Klonierung von Mep1a in den pLBCX-Vektor	55
4.1.2 Überprüfung der Expression durch transiente Transfektion von Hek 293T	57
4.2 Stabile Transfektion von pLBCX_mep1a_C in bEnd.3 Zellen	58
4.2.1 Überprüfung der Expression	58
4.3 Aktivitätsmessung der stabil transfizierten bEnd.3-Zellen (bEnd.3_mep1a_C)	59
4.4 Analyse der TJ-Proteine innerhalb der bEnd.3_mep1a_C Zellen	61
4.5 Analyse der Barriereintegrität der bEnd.3+Mep1a_C Zellen	62
4.5.1 TEER-Messung	62

4.5.2	FITC-Dextran Assay	64
5	Diskussion.....	65
5.1	Einordnung der Forschungsergebnisse	65
5.2	Potenzielle Fehler und veränderte Mechanismen in den bEnd.3_mep1a_C Zellen 67	
5.3	Auswirkungen der Dysregulation der BHS auf verschiedene Erkrankungen	70
6	Zusammenfassung.....	72
7	Literaturverzeichnis	73
8	Anhang	86
8.1	Vektormap der bEnd.3_mep1a_C Zellen.....	86
9	Danksagung.....	87
10	Tabellarischer Lebenslauf	88

Abkürzungsverzeichnis

AD- Alzheimer Erkrankung

AZ - Astrozyten

BHS - Blut-Hirn-Schranke

BM - Basalmembran

bzw. - beziehungsweise

EZ - Endothelzellen

EZMP – Extrazelluläre Matrixproteine

FITC - Fluorescein isothiocyanate

NVU - Neurovaskuläre Einheit

PZ - Perizyten

TEER - transendothelialer elektrischer Widerstand

TJ - Tight Junction

WT – Wildtyp

ZNS - Zentrales Nervensystems

ZO-1,-2,-3 - Zonula occludens 1,-2,-3

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke	6
Abbildung 2: Aufbau der Tight-Junctions	8
Abbildung 3: Aufbau und Struktur Meprin α	14
Abbildung 4: Stabile Transfektion der bEnd.3-Zellen mit einem retroviralen Gentransfer.....	38
Abbildung 5: Virale Verdünnungsreihe	41
Abbildung 6: Aufbau des in vitro Modells der BHS.....	43
Abbildung 7: Prinzip des Aktivitätsassays.....	46
Abbildung 8: Validierung des doppelten Verdau und der PCR.....	55
Abbildung 9: Validierung der Insertion des mep1a Konstruktes in den pLBCX Vektor	56
Abbildung 10: Validierung der Expression des pLBCX_mep1a_C Vektors in HEK 293T Zellen	57
Abbildung 11: Überprüfung der Meprin α Expression in den stabil transfizierten bEnd3. Zellen	58
Abbildung 12: Aktivitätsmessungen der bEnd.3_mep1a_C Zellen.....	60
Abbildung 13: Analyse der TJ-Proteine innerhalb der bEnd.3_mep1a_C Zellen.....	62
Abbildung 14: Bestimmung der TEER-Werte der bEnd.3mep1a_C Zellen.....	63
Abbildung 15: Messung der parazellulären Durchlässigkeit durch einen FITC-Dextran Assay	64
Abbildung 16: Expressionsweg Meprin α innerhalb der bEnd.3_mep1a_C Zellen.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substrate Meprin as:.....	15
Tabelle 2: Eukaryotische Zellen.....	19
Tabelle 3: Übersicht Bakterien.....	19
Tabelle 4: Übersicht Plasmide.....	19
Tabelle 5: Übersicht Primer.....	20
Tabelle 6: Übersicht Enzyme.....	21
Tabelle 7: Primäre Antikörper.....	24
Tabelle 8: Sekundäre Antikörper.....	24
Tabelle 9: Transiente Transfektion der HEK-Zellen.....	36
Tabelle 10: Transiente Transfektion der bEnd.3 Zellen.....	36
Tabelle 11: Transfektion der HEK GP-293 Verpackungszelllinie.....	39
Tabelle 12: Protein-Konzentrationsbestimmung.....	47
Tabelle 13: Restriktion des Expressionsvektors pLBCX.....	51
Tabelle 14: Komponenten PCR-Amplifikation.....	52
Tabelle 15: PCR-Amplifikation (Konditionen im Thermocycler).....	52
Tabelle 16: Komponenten der Ligation.....	53

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts gab es erste Studien zu den uns heute als Proteasen bekannten Proteinen. Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurden immer mehr Proteasen entdeckt, charakterisiert und in Familien klassifiziert. So wurde vor mehr als 40 Jahren eine Unterklasse der Metalloproteasen, die Astazin-Familie bekannt. Dieser gehört auch die in der Dissertation thematisierte Protease Meprin α an. Meprin α , so wie viele andere dieser charakterisierten Proteasen, sind uns zwar heute bekannt allerdings noch wenig erforscht und somit auch ihre Funktionen und Auswirkungen weitgehend unbekannt (1,4).

Proteasen zeichnen sich durch präzises und spezifisches schneiden von Proteinen aus. Dieser als Proteolyse bezeichnete Vorgang spielt in allen Phasen des Zellebens und Kompartimenten der Zelle eine Rolle und dient von Modifikation Prä-Proproteinen bis hin zur Zerstörung der Proteinstrukturen. So nehmen Proteasen Einfluss auf Lokalisation und Aktivität der Enzyme. Sie sind somit ein Schlüsselfaktor für die Gesundheit und Lebensfähigkeit der Zellen. Weiter können Proteasen über transkriptionelle, post-translationale und weitere Prozesse hoch reguliert sein. Wenn dieses Gleichgewicht aus den Fugen gerät, kann das fatale Folgen für die Zellen haben und somit zu pathologischen Veränderungen im Organismus führen. Es ist bekannt, dass Proteasen in vielen verschiedenen Krankheiten von großer Bedeutung sind. Bestandteil vieler klinischer Studien sind daher Themen, die sich mit einem besseren Verständnis und möglichen therapeutischen Ansätzen der Proteasen beschäftigen (2-4).

Die Meprin α Protease gehört zu der Astazin-Familie der Zink-Metalloendopeptidasen (5). Diese zählen zu den Endopeptidasen welche im Vergleich zu den Exopeptidasen ihre Funktion innerhalb der Körperstrukturen ausführen. Meprin α wurde entdeckt, da es vor allem in Epithelzellen der Niere und des Intestinaltraktes exprimiert wird (17-20). Heute weiß man, dass Meprin α noch in anderen Geweben exprimiert wird und in einigen Pathologien wie kolorektalen Karzinomen, akutes Nierenversagen, Sepsis und weiteren modulatorischen und inflammatorischen Prozessen von Bedeutung ist (6-9). Außerdem ist bekannt, dass es in Endothelzellen im Bereich der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ebenfalls vermehrt gebildet wird. Dort scheint es in der Lage zu sein einige extra- und intrazellulär gelegene Proteine, die zur Integrität der Barriere beitragen, beeinflussen zu können (1).

Die BHS dient als physiologische Barriere zwischen Gehirn und Blut. So reguliert sie den Austausch zwischen beiden Kompartimenten und beschützt so das Gehirn vor schädlichen Substanzen. Eine Barriere, wie sie die BHS darstellt, gibt es im menschlichen Körper in den unterschiedlichsten Geweben wie z.B: die Blut-Harn-Schranke, im Magendarmtrakt oder der Haut. Die BHS setzt sich aus den Perizyten, Astrozyten, einer Basalmembran (BM) und den Endothelzellen zusammen. Der regulierte Transport verschiedener Stoffe gelingt sowohl aktiv als auch passiv über Kanäle, Transporter-Systeme oder durch Diffusion. Diese Diffusion wird bestimmt durch die Zell-Zellkontakte zwischen den Endothelzellen, den Tight Junctions (TJ). Sie formen eine kontinuierliche Barriere, die verhindert, dass Toxine, Pathogene und Immunzellen in das Gehirn gelangen oder es zu einer Elektrolyt Dysbalance kommt. Diese TJ-Kontakte sind somit für die Integrität der BHS von maßgeblicher Bedeutung. Unter physiologischen Umständen ist die Permeabilität sehr gering und damit verbunden der transendotheliale elektrischer Widerstand (TEER) hoch (10-13). Der TEER ist ein Maß für die elektrische Leitfähigkeit über eine Zellschicht hinweg. Er dient als Indikator für die Integrität und Dichtigkeit von Zellbarrieren. Hierbei gilt, je höher der TEER-Wert, desto dichter die Zellschicht und desto niedriger die Permeabilität (10-13).

Sinkt der TEER aufgrund von Dysbalancen in dem System führt das zu einer höheren Permeabilität der Barriere. Somit gelangen Toxine und Pathogene in das Gehirn und können fatale Folgen anrichten. Bei vielen der Neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B: Multiple Sklerose, Parkinson und Alzheimer, ist dies zu beobachten (10,14,15,16).

Somit ist es von großer Bedeutung für diese Erkrankungen zu verstehen, wie es zum Verlust der Integrität der BHS kommt. Da Meprin α an der BHS sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Umständen exprimiert wird und Einfluss auf die BHS nimmt, könnte es potenziell am Pathomechanismus dieser Erkrankungen mitwirken und stellt möglicherweise ein therapeutisches Ziel dar (1).

In der folgenden Dissertation geht es darum, die Zusammenhänge zwischen Meprin α und der BHS genauer zu untersuchen. Hierbei wird auf die Fähigkeit des Enzyms, Proteinstrukturen wie TJ und Extrazellulärematrixproteine (EZMP) schneiden zu können und den damit verbundenen Einfluss auf die Integrität der BHS beziehungsweise (bws.) den TEER eingegangen (1). Weiter wird der Wirkort Meprin α s anhand intrazellulärer Aktivität genauer untersucht. Diese Untersuchungen gelingen durch

Überexpression des Enzymes in Mausendothelzellen und Aufbau eines *in vitro* BHS-Modells. So wurden das Expressionslevel der TJ-Proteine untersucht, die Aktivität Meprin α bestimmt und Versuche zur Integrität der BHS (Widerstands-Messung, Permeabilität gegenüber biologischen Markern) durchgeführt.

Diese Arbeit untersucht somit die bislang wenig erforschten Effekte von Meprin α auf die TJ und EZMP der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Durch den Einsatz eines angepassten *in vitro* Modells werden mögliche Einflüsse auf die Barrierefunktion unter realitätsnahen Bedingungen analysiert. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten Ansatzpunkte für die Entwicklung therapeutischer Strategien bieten, die eine Stabilisierung der BHS insbesondere bei neurodegenerativen Erkrankungen mit erhöhter Barrierepermeabilität unterstützen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Blut-Hirn-Schranke

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Auswirkungen von Meprin α auf die BHS. Daher ist es von großer Wichtigkeit im folgenden Abschnitt zunächst auf den allgemeinen Aufbau und die einzelnen Funktionen der Bestandteile, die zur Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Blut und Gehirn beitragen, einzugehen.

2.1.1 Geschichte der BHS-Forschung

Weit vor, den als ersten Experimente an der BHS bezeichneten Veröffentlichung Ehrlichs, schrieb ein Londoner namens Humphrey Ridley in seiner 1695 erschienen Publikation über eine Impermeabilität der Blutgefäße im Gehirn gegenüber einer injizierten Substanz in den Blutkreislauf (21). Allerdings verstand er damals die Physiologie dahinter nicht. Ungefähr 150 Jahre später beschrieb ein Franzose namens Claude Bernard die Wichtigkeit der Homöostase und beschrieb sie als eine stabile innere Umgebung. Damit war er der Erste, der die Bedeutung einer Homöostase des Körpers für Gesundheit und Krankheit erkannte (22).

1885 veröffentlichte dann der deutsche Forscher Paul Ehrlich seine Experimente zur Färbung der Organe. Hierbei injizierte er einen Farbstoff in das Peritoneum und stellte fest, dass sich der Farbstoff auf alle Organe außer dem Gehirn und dem Rückenmark verteilte (23,24). Kurze Zeit später gelang es, dem Studenten Paul Ehrlichs, Edwin Goldmann den Farbstoff Tryptan-Blau direkt in den Liquor Raum zu injizieren. Hierbei sammelte sich der Farbstoff nur im Gehirn und Rückenmark an. Weiter gelang es ihm beim Injizieren dieses Farbstoffes in das Blutsystem, Abbauprodukte dieses Farbstoffes im Gehirn nachzuweisen. Dies bewies eine definitive Kompartimentierung des Gehirns gegenüber dem restlichen Körper. Allerdings vermuteten Beide, dass der Zugang zum Gehirn nur über den Liquor Raum am Plexus Choroideus möglich sei (25). Max Lewandowsky verwendete 1900 erstmals den Begriff der BHS. Er vermutete, dass die Hirnkapillaren verantwortlich für die selektiven Permeabilitätseigenschaften sind. Er beobachtete in seinen Experimenten die Wirkung von Ferrocyanid auf das ZNS nach intrathekaler Injektion, wobei nach intravenöser Injektion keinerlei Wirkung zu sehen war (26).

In den folgenden Jahren war dieses Thema ein großer Bestandteil der Forschung. Allerdings wurden erst mit Entdeckung des Elektronenmikroskops weitere Fortschritte

erzielt. 1969 konnten die Forscher Brightman und Reese nach intravenöser und intrathekaler Gabe von dem Protein horseradish peroxidase (HRP) unter elektronenmikroskopischer Beobachtung feststellen, dass dessen Diffusion an der luminalen Seite durch die damit entdeckten TJ-Proteine geblockt wurde. Im weiteren Verlauf stellten sie auch fest, dass im Vergleich zu anderen Kapillaren im Körper die Abstände zwischen den Endothelzellen in den Kapillaren der Hirngefäße signifikant kleiner sind als in anderen Bereichen des Körpers. Somit machten sie die vermehrten TJ-Proteine der Endothelzellen verantwortlich für die nicht stattfindende Diffusion des HRP in das Gehirn (27,28,29). Darauf aufbauend wurden in den nächsten Jahren die weiteren Bestandteile und Transporter-Moleküle der Bluthirnschranke entdeckt und charakterisiert, welche zur Komplexität und Vielfalt der BHS beitragen. Für das Verständnis der BHS werden im Folgenden Die Bestandteile und deren Funktionen erläutert.

2.1.2 Körperbarrieren und Gefäße

Im menschlichen Körper gibt es eine Vielzahl verschiedener Barrieren. Solche befinden sich immer dort, wo zwei Kompartimente aufeinandertreffen. Es gibt verschiedene Barrieren, wie z.B: die Hautbarriere oder die zwischen Lumen des Magendarmtraktes und dessen Wand (35,36). So gibt es auch die Barrieren, die die Blutbestandteile von verschiedenen Organen trennen. Solch eine Barriere befindet sich immer dort, wo der Austausch von Gas und Nährstoffen zwischen Blut und Gewebe stattfindet, den Kapillaren. Kapillaren sind sehr kleine Blutgefäße die sich wie ein Netz im Gewebe verteilen, und so eine große Austauschfläche generieren. Deshalb bezeichnet man diesen Bereich auch als Kapillarbett. So haben sie zur Aufgabe das Gewebe mit den benötigten Stoffen wie Sauerstoff oder Glukose zu versorgen, Produkte aus dem Gewebe im Körper zu verteilen und Abfallstoffe aus den Geweben zu transportieren (34). Dieser Austausch wird über die jeweilige Blut-Organ-Barriere reguliert. Je nach Funktion des Gewebes sind diese Kapillaren und Barrieren unterschiedlich in ihrer Permeabilität und Regulation. So ist die Durchlässigkeit der Blut-Leber-Schranke z.B. sehr hoch, da dort viele Stoffe metabolisiert werden (31,32,33). Im Bereich der BHS ist es hingegen wichtig, dass die Permeabilität sehr gering und der Transport stark reguliert ist, um das Gehirn gegenüber einer Vielzahl schädlicher Stoffe zu schützen (30).

2.1.3 Aufbau und Funktion der BHS

Die BHS verhindert, dass Krankheitserreger, Blutzellen, neurotoxische Plasmabestandteile und weitere Moleküle in das Gehirn gelangen. Gleichzeitig kontrolliert die BHS den Transport von Molekülen in und aus dem zentralen Nervensystem (ZNS). Dies hält die chemische Zusammensetzung des neuronalen Milieus aufrecht, die für die richtige neuronale Funktion erforderlich ist (30,37). Für die Aufrechterhaltung dieser Homöostase sind einige Bestandteile verantwortlich die in Abbildung 1 aufgeführt sind. Im Einzelnen setzt sich die BHS zunächst aus den Kapillaren umkleidenden Endothelzellen mit ihren Zell-Zell Kontakten den TJ zusammen. So wird verhindert das Stoffe frei über diese Schranke diffundieren können. Daraufhin folgt eine BM, deren Bestandteile hauptsächlich von den Endothelzellen und den Perizyten gebildet werden. Funktionell dient die BM vor allem als Zellanker und zur strukturellen Stabilität. Weiter besteht die BHS aus den Astrozyten und Perizyten welche modulatorische Funktionen erfüllen und der BM und den Endothelzellen aufliegen. Zusammen mit der Mikroglia und den Neuronen bilden die Bestandteile die Neurovaskuläre Einheit (NVU). Der regulierte Transport verschiedener Stoffe gelingt sowohl aktiv als auch passiv über Kanäle, Transporter-Systeme oder Diffusion (11).

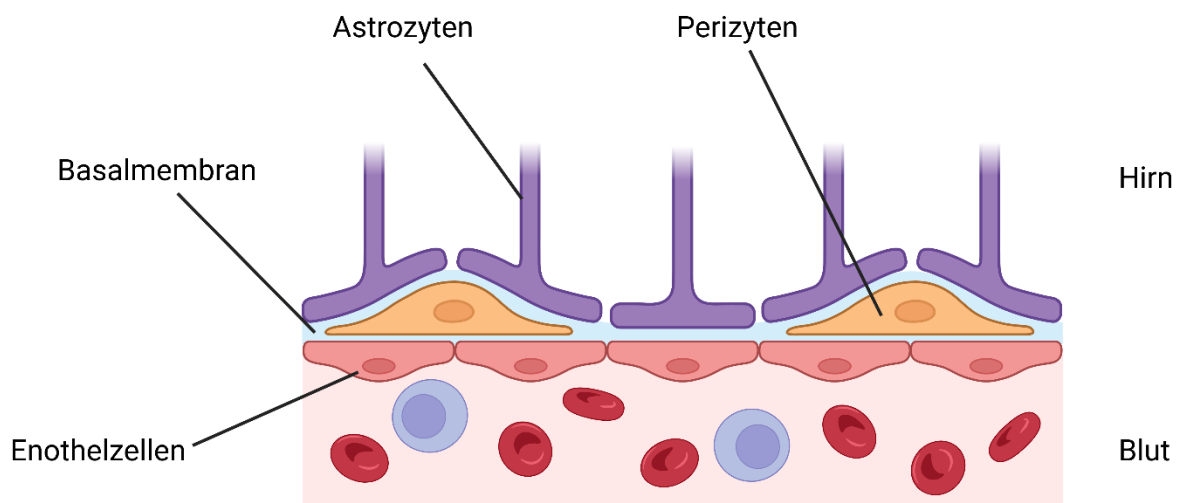


Abbildung 1: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Dargestellt sind die Endothelzellen, welche die Kapillare umkleiden und über die TJs miteinander verbunden sind. Umgeben sind diese von einer Basalmembran, Perizyten und Astrozyten. Gemeinsam bilden sie die BHS, die den Durchtritt pathogener Substanzen verhindert. (Erstellt mit <https://BioRender.com>)

2.1.3.1 Endothelzellen

Endothelzellen bilden die innerste Schicht von Blutgefäßen aus. Je nach Größe und Funktion des Blutgefäßes können sie mehrschichtig oder als Einzelzellschicht vorliegen. In den Kapillaren besteht die Wand der Blutgefäße nur aus einer Einzelzellschicht (31). Diese Einzelzellschicht kann je nach Körperregion unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Die EZ der BHS sind im Vergleich z.B. zu Muskel-EZ deutlich dünner, flacher und somit weniger als ein Mikrometer dick (38). Weiter weisen die EZ eine deutlich vermehrte Bildung von TJ-Proteinen auf, welche so die EZ zusammenhalten, den Parazellularraum sehr eng gestalten und eine Diffusion hydrophiler Moleküle zwischen Blut und Gehirn verhindern (27,28,39). Kleine hydrophobe Moleküle hingegen können bis zu einer Größe von 400 kDa frei diffundieren (41). Weiter sorgt die freie Diffusion von Sauerstoff in das Gehirn und Kohlenstoffdioxid umgekehrt für einen funktionierenden Gehirnetabolismus und die Einstellung eines passenden PHs im Liquor, den Neuronen und anderen Zellen der NVU. Desweiteren sorgt die Beständigkeit der TJs für eine Polarisierung zwischen der apikalen und basolateralen Seite der EZ (siehe Abbildung 2) (40). Andere Moleküle wie Glukose und Aminosäuren müssen über regulierte Transporter aufgenommen und abgegeben werden. An der Herstellung dieser Transporter sind ebenfalls die EZ beteiligt (42).

2.1.3.2 Tight Junction

TJ-Proteine gehören zu den Zell-Zell Verbindungen. Sie liegen an der apikalen Seite der EZ und verbinden diese miteinander. Dies dient zur Bildung einer Barriere, welche dafür sorgt, dass nur bestimmte Stoffe über die Barriere gelangen können. Hierbei können die TJ je nach Gewebe unterschiedlich stark ausgeprägt sein und so einen unterschiedlichen hohen TEER über der Barriere generieren. Die hohe Expression an der BHS führt so zu einem hohem TEER über der BHS. Weiter dient es als Art Zaun, der dadurch eine Polarisierung der apikalen gegenüber der basalen Seite schafft (27,28,10-13). TJs sind aus 2 Gruppen Molekülen aufgebaut. Zum einen die Transmembranproteine die aus 3 verschiedenen Gruppen bestehen können: Claudin, Occludin und den JAMs (junction adhesions molecules) (43,45). Zum anderen aus den Ankerproteinen, wie Zonula occludens 1,-2,-3 (ZO1,-2-3), welche die Transmembranproteine mit dem Zytoskelett der Zelle verbinden (44) (Abbildung 2). Im Gehirn sind Claudin 1,-5 und Occludin ein maßgeblicher Bestandteil der TJs (46,47).

Deswegen wird im weiteren Verlauf auf die in dieser Dissertation untersuchten Proteine Occludin, Claudin-5 und ZO-1 genauer eingegangen.

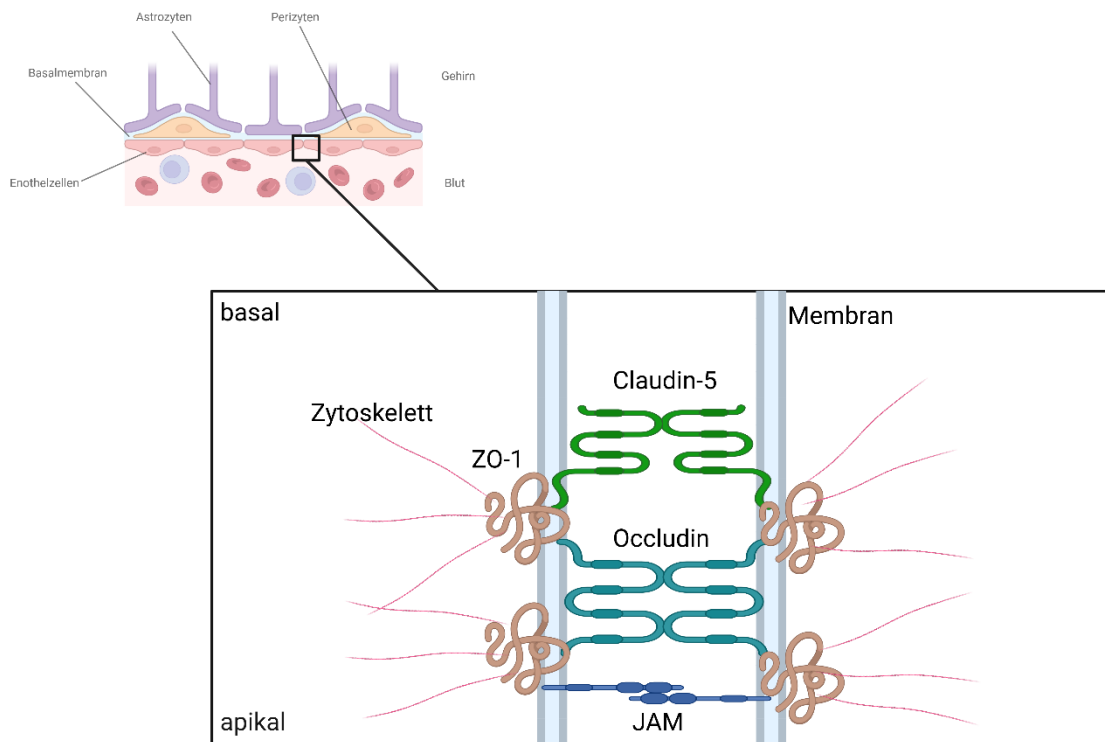


Abbildung 2: Aufbau der Tight-Junctions

Das Bild zeigt zwei Enothelzellen mit ihren jeweiligen Membranen und ihren Verbindungen über die TJs. Hierbei werden an der apikalen Seite der Zellen die Transmembranproteine (JAM, Occludin, Claudin-5) über die Ankerproteine (ZO1,-2-3) mit dem Zytoskelett verbunden. (Erstellt mit <https://BioRender.com>)

2.1.3.2.1 Claudin-5

Unter die Klasse der Claudine zählen mehr als 25 verschiedene Transmembranproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 23-34 kDa (48,49). Claudine sind Phosphorproteine mit vier transmembran Domänen die über ihr Carboxyl-Ende an den Ankerproteinen ZO-1,-2-3 mit dem Zytoskelett verbunden sind (50-55). Es ist bekannt, dass im Gehirn Claudin-1 und -5 neben Occludin einen Großteil der Komponenten in den TJs ausmacht. In einigen *in vitro* Studien gibt es Hinweise darauf, dass Claudine für die Bildung der parazellulären Barriere wesentlich sind. Es wurde gezeigt, dass die Zerstörung von Claudinen, die Barrierefunktionen von Nierenzellen des Hundes verringert (50,56-59). Weiter wurde gezeigt, dass das Fehlen von Claudin-5 in den TJ-Komplexen genetisch veränderter Mäuse zu einer stark

beeinträchtigten und undichten BHS geführt hat (60). Die doppelte Ausschaltung von Claudin-5 mit Occludin erhöhte ebenfalls die Permeabilität (61). Allerdings führt ein Mangel an Claudin 5 nicht nur zu einer Erhöhung der Permeabilität der BHS, sondern spielt auch in vielen pathologischen Prozessen wie toxischem Schaden, Inflammation, Tumorzellmigration und Traumata eine entscheidende Rolle (62,63). Somit ist es von Interesse herauszufinden, ob Claudin-5 ein potenzielles Substrat Meprin α ist und wie es sich auf die Integrität der BHS und mögliche resultierende pathologische Prozesse auswirkt.

2.1.3.2.2 Occludin

Occludin ist ein 65 kDa schweres Phosphorprotein (64). Es besitzt ebenfalls, wie die Claudine, vier Domänen zeigt allerdings keinerlei Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz mit den Claudinen. Die Domänen unterteilen sich in zwei zytoplasmatische und zwei transmembrane Domänen. Zu den zytoplasmatischen Domänen zählt das kurze NH₂-Ende und das lange COOH-Ende, welches als Bindungsstelle für zytoplasmatische Proteine wie den ZO-Proteinen fungiert sowie eine entscheidende Rolle in der Formation der Barriere darstellt. Weiter dienen beide zur Protein-Protein Interaktion. Die erste der zwei transmembran Domänen vermittelt hingegen Kontakt zwischen den benachbarten Zellen, während die zweite für die genaue Positionierung des Occludins in den TJs verantwortlich ist (64,65). Occludin wird in EZ des Zentralen Nervensystems (ZNS) sehr viel stärker exprimiert als in EZ nicht neuronalen Gewebes. Dies hat zu der Annahme geführt, dass Occludin für die Permeabilität der BHS sehr wichtig ist (42). Allerdings führten Experimente in Occludin knock-out Mäusen zur Ausbildung regulärer und funktionierender BHS. Weiter wiesen diese Mäuse aber schwerwiegende Defekte wie u. a. chronische Gastritis, Schwerhörigkeit, Hirnabklärungen und männliche Unfruchtbarkeit auf. Diese Defekte kann man auf epi- und endotheliale Barrierestörungen zurückführen. (66,67). So geht man heutzutage im Gegensatz zu den Claudinen, die die mechanische Schließung des Parazellularraumes bewirken, bei Occludin von einer regulatorischen Funktion aus. Diese bezieht sich vor allem auf die Formatierung und Positionierung der TJ. (68-72). Zusammen bilden Claudine und Occludin Heterodimere aus, die so die beschriebene parazelluläre Barriere gemeinsam mit den Ankerproteinen ausbilden (73). Weiter wurde gezeigt, dass Occludin ein Substrat des in dieser Dissertation behandelten Enzymes Meprin α ist. In dieser Arbeit wurde dies überprüft und mögliche Auswirkungen untersucht (74).

2.1.3.2.3 ZO-1

ZO-1 gehört mit 225 kDa zu den größten TJ-Proteinen und ist Teil der Gruppe der Ankerproteine, welche als Funktion die Verbindung zwischen den Transmembranproteinen und dem Zytoplasma haben. Es verbindet also Moleküle wie Claudin-5 und Occludin mit den Molekülen des Zytoskeletts z.B: Aktin. Weiter zählt ZO-1 wie Occludin zu den regulatorischen Proteinen der BHS. Ähnlich wie Occludin führt ZO-1 über den Protein-Protein-Kontakt dazu, dass sich die Proteine innerhalb der TJ richtig positionieren und so eine effiziente, einwandfreie funktionsfähige BHS darstellen (75-78).

2.1.3.3 Basalmembran

Die BM kann in zwei Unterteile gliedern: die innere vaskuläre BM, welche dem Gefäß direkt aufliegt und die äußere parenchymale BM, die auch als Glia limitans perivascularis bezeichnet wird und über der vaskulären Membran liegt. Die parenchymale BM wird hauptsächlich von den Astrozyten sezerniert, während die vaskuläre BM eine extrazelluläre Matrix ist, die von den EZ und Perizyten gebildet wird. Sie bestehen aus einer Vielzahl von Molekülen wie Kollagen vom Typ IV, Laminin, Nidogen, Proteoglykane mit Heparinsulfat und andere Glykoproteine. Diese Basalmembranen dienen nicht nur als Anker für zahlreiche Signalprozesse im Gefäßsystem, sondern stellen auch eine zusätzliche Barriere dar, die Moleküle und Zellen überwinden müssen, bevor sie in das Nervengewebe gelangen (79,80).

2.1.3.4 Perizyten

Perizyten (PZ) aus dem ZNS entstammen im Vergleich zu PZs in anderen Geweben aus der Neuralleiste, welches ihnen einzigartige Funktionen zusprechen lassen (81). Darüber hinaus weisen die Kapillaren des ZNS die höchste PZ-Deckung aller Gewebe auf, mit einem geschätzten Verhältnis von EZ zu PZ zwischen 1:1 und 3:1, während das Verhältnis im Muskel 100:1 beträgt (82). Dies zeigt die Wichtigkeit und den Einfluss auf die BHS. Die PZs umgeben die Kapillaren mit ihren langen Fortsätzen und teilen sich die BM mit den EZ. Weiter bilden sie mit den EZ direkte Synapsen artige Kontakte über N-Cadherin und Connexine. Dies ermöglicht den Austausch zwischen Gas-Molekülen, Metaboliten, Second-Messenger und RNA (83). Weiter kommt den Perizyten eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Integrität der BHS, bei der Angiogenese und der Stabilität der Kapillaren zu (83,84). Die PZ erfüllen noch viele weitere wichtige Funktionen zu denen unter anderem Regulation des Blutflusses, Resistenzverstärkung der EZ, Abtransport toxischer Metabolite und Unterstützung der

strukturellen Integrität der BHS gehören (85-88). Die Bedeutung der PZs kann man anhand einiger neurologischer Erkrankungen wie Alzheimer, amyotrophe laterale Sklerose (ALS) und Schlaganfällen, wo die Degeneration und Verletzung der PZs Teil des pathologischen Geschehens sind, abschätzen (84,85,89,90). Somit ergibt sich für die PZ eine regulatorische Funktion auf die BHS bei deren Fehlen es zu schwerwiegenden pathologischen Prozessen kommt.

2.1.3.5 Astrozyten

Den Astrozyten (AZ) kommt wie den PZ eine regulatorische Funktion an der BHS zu. Die AZ zählen zu den Gliazellen und erfüllen verschiedene Aufgaben im ZNS wie Kompartimentierung des Nervengewebes, Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase und des pH-Wertes sowie die Aufnahme und Verarbeitung von Neurotransmittern durch Bereitstellung energiereicher Substrate für die Neuronen (91). Es ist bekannt das im Gegensatz zu den PZ die AZ nicht an der Entwicklung der BHS beteiligt sind, allerdings spielen sie dennoch eine wichtige Rolle für die Integrität. Über die AZ-Füße, welche einen Großteil der Kapillaren umgeben, stellen die AZ eine Verbindung zwischen den vaskulären und neuronalen Anteilen der BHS her (92,93). Hierüber sezernieren die AZ-Bestandteile der BM und EZM und sind über Ionentransporter im Gasaustausch beteiligt (93,94). Weiter wurde gezeigt, dass ein Fehlen der AZ an der BHS zur Erhöhung der Permeabilität geführt hat, welches auf die Wichtigkeit der AZ auf die BHS und somit auch allgemein auf die Regulation des ZNS und Neuroinflammatorische Prozesse bei neurodegenerativen Erkrankungen schließen lässt (95-97).

2.1.4 Transport über die BHS

Wie bereits beschrieben gelangen aufgrund der geringen Permeabilität nur kleine lipophile Moleküle passiv über die BHS. Diese geringe Durchlässigkeit der TJ ermöglicht es den Transportsystemen der EZ, die Bewegung von Ionen und Molekülen zwischen dem Blut und dem Gehirn zu steuern. Es gibt zwei Haupttypen von Transportern, die von EZs des ZNS exprimiert werden: Efflux-Transporter und Nährstofftransporter. Die Efflux-Transporter befinden sich größtenteils an der luminalen Membran der EZ und transportieren aktiv, das bedeutet unter Hydrolyse von ATP, Stoffe gegen ihr Konzentrationsgefälle aus dem Gehirn in das Blut und schützen so unter anderem das ZNS vor der Akkumulation schädlicher Stoffe (37,98). Die Nährstofftransporter hingegen sind in der Lage wichtige Nährstoffe entlang ihres

Konzentrationsgefälles in das Gehirn zu transportieren und es so mit lebenswichtigen Energiequellen zu versorgen (99).

Die Forschung an den Transportern und ihrer Substrate ist von großer Bedeutung, sowohl um den Stoffwechsel und die Funktion des Gehirns zu verstehen als auch um Angriffspunkte für die Verabreichung von Medikamenten durch die BHS zu finden.

2.1.5 Verlust der BHS-Integrität

Viele pathologische Zustände des Zentralnervensystems, wie Multiple Sklerose, hypoxischer und ischämischer Insult, Parkinson- und Alzheimer-Krankheit, Hirntumore, zeigen eine Dysfunktion der BHS (102-106). Ursache ist die Öffnung der TJ, die von leichten reversiblen Veränderungen bis hin zu einem chronischen Zusammenbruch der BHS reichen kann. Auch Veränderungen in den Transportsystemen und Enzymen, zu denen auch die Metalloprotease Meprin α zählt, können Ursache eines BHS-Zusammenbruchs sein (100).

In Folge der hohen Durchlässigkeit für Plasmabestandteile, Immunzellen, Toxine und viele weiterer schädlicher Stoffe kommt es zum Verlust der Homöostase und einer Neuroinflammation, welche neurodegenerative Prozesse in Gang setzen kann. Bis heute ist noch nicht geklärt, ob der Verlust der Integrität der BHS-Ursache oder Folge für die Neuroinflammation und den daraus resultierenden Prozessen ist (101). Fest steht aber das aus den genannten Gründen, es von großer Wichtigkeit ist Zusammenhänge zwischen Enzymveränderungen und den TJs sowie die Zusammenhänge zwischen dem Verlust der BHS-Integrität und Neurodegenerativen Erkrankungen genauer unter die Lupe zu nehmen.

2.2 Meprin α

2.2.1 Aufbau und Struktur

Meprin α gehört zu der Astazinfamilie, eine Untereinheit der Metalloproteasen. Meprin α wird im Menschen in einem Gen auf dem Chromosom 6 codiert. Organisiert ist es in insgesamt 14 Exons und 13 Introns auf eine Länge von 40 kb (Kilobasen) (5,107-109).

Aufgebaut ist Meprin α , wie in Abbildung 3, beginnend N-Terminal mit einem Signalpeptid (S), welches das Protein in das raue endoplasmatische Retikulum leitet. Daran schließt sich ein Propeptid (PRO) an, welches proteolytisch im Verlauf abgespalten werden muss, um das Enzym zu aktivieren. Darauf folgt eine Protease-Domäne (KAT), die nach Aktivierung als katalytisches Zentrum dient (1,110,111). Die MAM-Domäne (Meprin, A5 Protein, Rezeptor Protein Tyrosin-Phosphatase μ) (MAM) spielt eine Rolle bei Zelladhäsion, Protein-Protein Interaktionen und Signaltransduktion (112,113). Einer ähnlichen Funktion kommt die TRAF-Domäne (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor) (TRAF) nach (114,115). Die „inserted“-Domäne (I), enthält eine „Furin-cleavage site“, was bedeutet, das Meprin α hier durch Furin von der Membran geschnitten werden kann, und unter Verlust der noch Folgenden Domänen in den Extrazellularraum abgegeben wird. Dazu gehört die EGF-Domäne (EGF), die Transmembran- Domäne (TM), welche Meprin α in der Membran verankert, und noch eine Zytoplasmische-Domäne (C), die den C-Terminus von Meprin α bildet (117,1).

Außerhalb der Zelle kann Meprin α einzeln vorliegen oder sich mit mehreren anderen Meprin α Enzymen zu einer höheren Struktur durch nicht kovalente Bindungen zusammenschließen und so die größte bisher bekannte Protease bilden (118,119). Meprin α kann aber auch membran-gebunden als Homodimer vorliegen. Dieses Homodimer wird durch eine Disulfid-Brücke zwischen den jeweiligen MAM-Domänen stabilisiert, wie in Abbildung 3 dargestellt (1). Weiter kann es auch als Heterodimer zusammen mit Meprin β vorliegen. Die Stabilisierung erfolgt dabei durch zwei Disulfid-Brücke zwischen den Enzymen auf Höhe der MAM-Domäne und einer auf Höhe der TRAF-Domäne (110).

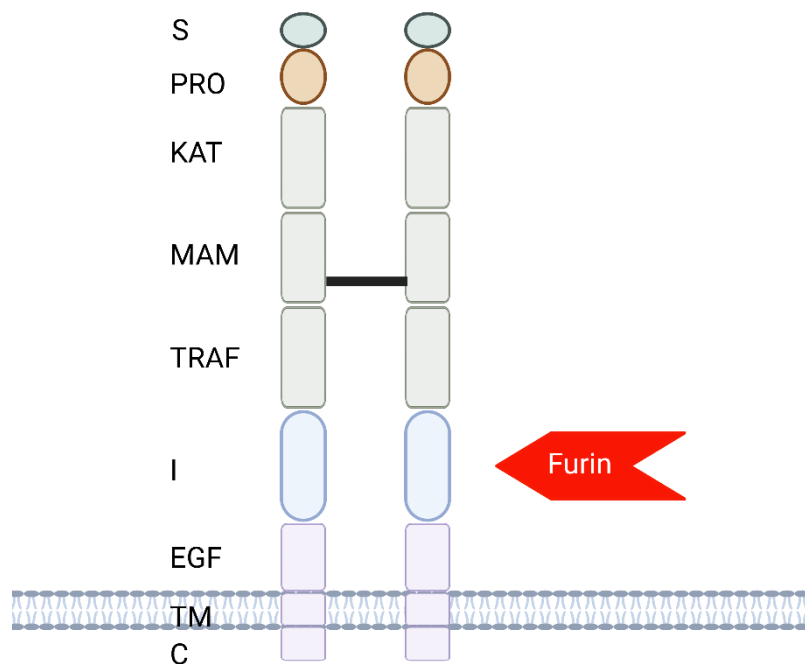


Abbildung 3: Aufbau und Struktur Meprin α
 (Erstellt mit <https://BioRender.com>)

2.2.2 Expression und Substrate

Die Expression Meprin α wurde ursprünglich in der Niere und im Intestinal Trakt beobachtet. Heute ist bekannt das Meprin α noch in vielen weiteren Geweben exprimiert wird und aktiv ist (120). So wird es vermehrt in der Leber, Dickdarm sowie in der Haut exprimiert (121,122). Weiter kann sich das Expressionsmuster von Meprin α unter entzündlichen oder regenerativen Bedingungen verändern, was auf eine dynamische Regulation und Beteiligung an Gewebereparaturprozessen hindeutet (122). Außerdem ist bekannt, dass es in Endothelzellen an der BHS vermehrt gebildet wird und nicht nur hier auf eine Vielzahl an Substraten wirkt (120-123). In der folgenden Tabelle sind einige dieser Substrate aufgelistet, allerdings ist dieses Themengebiet noch nicht vollständig erforscht, sodass vermutlich noch einige Substrate in den folgenden Jahren dazukommen werden (123).

Insulin, Bradykinin, Angiotensin II	Mouse kidney meprin A	124
Luliberin oder „Luteinizing-hormone-releasing hormone“, Bradykinin, Substanz P	Rat kidney meprin A	125, 126
TGF- α	Rat kidney meprin A	127
Parathormon (PTH)	Rat kidney meprin A	128
Collagen IV, Laminin, Fibronectin, Gelatin, Nidogen	Rat kidney meprin A	129, 130
Katalytische Untereinheit von Protein Kinase A	Rat kidney meprin A	131
Laminin 1 and Laminin 5	Recombinant homomeric human meprin A	132
Bombesin, Neurotensin, LHRH, Bradykinin, „ α -melanocyte-stimulating hormone“ (α -MSH), Substanz P, PTH-Fragment 13–34, Valosin, vasoaktives intestinales Peptide, Angiotensin I	Mouse meprin A ($\alpha\beta$)	133
Cerulein, Secretin, Glucagon, Gastrin-releasing peptide (GRP)-(14–27), Neuropeptid Y, SCCK8NH ₂	mouse meprin A	133
Collagen IV, Nidogen-1, Fibronectin	Human recombinant homomeric meprin A	134
Pro-IL-1 β	Rat meprin A, recombinant homomeric rat meprin A,	135
GRP, Glucagon, Ghrelin, PTH, Secretin, LHRH, Substanz P, Bradykinin, Neurotensin, and α -MSH	Recombinant human homomeric meprin A and mouse meprin A	136
Prozessierung von Procollagen III	homomeric meprin A	137
Villin and Aktin	mouse homomeric meprin A	138

Tabelle 1: Substrate Meprin α s:

Nachgeahmt aus Quelle (8). Dargestellt sind Substrate Meprin α S, welche Isoform Meprin α verwendet wurde und die dazugehörige Quelle.

2.2.3 Regulation, Inhibition und Aktivierung

Die Biosynthese und der post-translationale Prozess sind streng reguliert. Bei diesem spielen Glykosylierung, Phosphorylierung, Disulfid-Brücken Bildung und verschiedene Interaktionen mit Chaperonen eine wichtige Rolle, da sie zur Stabilisierung und Regulierung beitragen (143,110). Weiter gilt die post-translationale Regulation als wichtiges Instrument, mit dem Zellen rasch auf veränderte Bedingungen reagieren

können, und zugleich eine zusätzliche Kontrollstufe für die Gene bietet (139,140). Dieser Regulationsmechanismus wird durch RNA-bindende Proteine (RBPs) sowie durch spezielle regulatorische Sequenzelemente im 3'-UTR, einem nicht translatierten Bereich der Ziel-mRNA, vermittelt (141,142). Weiter spielen Inhibitoren bei der Regulation eine Rolle. Sowohl Fetuin-A als auch Cystatin C gelten als endogene Inhibitoren, bedeutet, dass sie physiologisch im menschlichen Körper vorkommen. Sie gehören beide zur Cystatin-Superfamilie der Protease Inhibitoren, was auf eine gemeinsame Rolle dieser Protein-Gruppe bei der Regulation von Meprin-Metalloproteasen hindeutet (143). Die Aktivierung von Meprin α geschieht durch proteolytische Abspaltung des Propeptids durch Trypsin-ähnliche Proteasen (143,148). Hier wird besonders Plasmin als möglicher Aktivator in der Literatur beschrieben (149,150). Als wichtigster exogener, also synthetisch hergestellter Inhibitor von Meprin α gilt Actinonin (110). Auch hier Bedarf es weiterer Forschung, um Inhibitoren zu finden und potenzielle Ziele für eine Therapie zu identifizieren.

2.2.4 Funktionen

Im folgenden Abschnitt werden einige Beispiele angeführt, bei denen die Aktivität von Meprin α von Bedeutung ist. Hierbei wird auf die jeweilige Funktion und die pathologische Konsequenz von Meprin α innerhalb des spezifischen Gewebes genauer eingegangen.

2.2.4.1 Inflammation (am Beispiel Chronische entzündliche Darmerkrankungen)

Chronische entzündliche Darmerkrankungen (CED), wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, sind langanhaltende Entzündungen des Magen-Darm-Trakts, die durch eine diffuse Infiltration von Leukozyten in die Darmschleimhaut und eine Fehlregulierung des mukosalen Immunsystems gekennzeichnet sind (134). Neuere Ansätze haben gezeigt, dass Meprin α ein Risikogen darstellt, welches die Erkrankung negativ beeinflussen kann. Banerjee konnte in einer Studie zeigen, dass Meprin α genetisch mit CED assoziiert ist (145). Während einer intestinalen Entzündung wird die mRNA-Expression von Meprin α im Epithel herunterreguliert, was durch den Homeobox-Transkriptionsfaktor CDX2 vermittelt wird (145). Mäuse, denen Meprin α fehlte, zeigten in einem DSS (Dextransulfat)-induzierten Colitis-Modell eine schwerere Entzündung und stärkere intestinale Schädigungen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (145). Weiter

gibt es Hinweise darauf, dass Meprin α das Immunumfeld moduliert, indem sie proinflammatorische Zytokine wie Interleukine, die ebenfalls mit CED assoziiert sind, prozessiert und aktiviert (144). So kommt im Interstitium Meprin α voraussichtlich eine eher schützende Rolle zu, da erst niedrigere Meprin α Levels zu vermehrter Inflammation führten.

2.2.4.2 Niere (am Beispiel Sepsis)

In Mäusen und Ratten macht Meprin α bis zu 5% der gesamten Pinselzellmembranproteine aus, was auf eine wichtige physiologische Rolle diese Proteasen in der Nierenfunktion der Nagetiere hindeutet (146). Bei der Sepsis kommt es bei bis zu 20-50% der Fälle zu einem akuten Nierenversagen, welches die Mortalität der Sepsis verdoppelt (122). Dies zeigt die Bedeutung, die dem Nierenversagen bei der Sepsis zukommt. Physiologisch wird Meprin α am Tubuluslumen exprimiert. Bei der Sepsis mit akuten Nierenversagen kommt es in Folge von Immunmodulatorischen Prozessen, wie die vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Proteinen, zur Umverteilung der Expression von Meprin α zur basolateralen Seite der Tubuluszellen. Dies führt zum Abbau von Schlüsselkomponenten der Basalmembran sowie die Spaltung von Zelladhäsionsmolekülen was zu strukturellen Schäden und erhöhter Leukozyten Infiltration führt (134,147). Desweiteren fördert Meprin α zusätzlich die Entzündungsreaktion, indem sie proinflammatorische Zytokine aktiviert oder freisetzt (130). So zeigten sich in einigen experimentellen Modellen, dass Mäuse ohne Meprin α besser vor Nierenschädigungen geschützt sind und es zu einer geringeren Leukozyteninfiltration kommt. Weiter zeigten die Experimente, das Actinonin die vermehrte Ausschüttung von IL1- β in der frühen Phase des akuten Nierenversagens reduzierte und so ein Zusammenhang durch die Blockade Meprin α s durch Actinonin vermutet wird. Dies stellt sogar einen potenziellen therapeutischen Ansatz dar, der weiter erforscht werden sollte und unterstreicht hier die Bedeutung Meprin α s (6).

2.2.4.3 Alzheimer Erkrankung

Die Alzheimer-Erkrankung (AD) ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung und spielt die Hauptursache für Demenz weltweit. Sie betrifft Millionen von Menschen und stellt eine erhebliche Belastung für das Gesundheitswesen, die Gesellschaft und die betroffenen Familien dar. Die Erkrankung ist charakterisiert durch einen fortschreitenden Verlust kognitiver Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Sprache,

exekutiver Funktionen und der Fähigkeit, alltägliche Aktivitäten auszuführen. Diese klinischen Symptome sind das Ergebnis komplexer neuropathologischer Veränderungen im Gehirn, die sich über Jahrzehnte entwickeln können. Historisch gesehen wurde die AD durch zwei Hauptmerkmale definiert. Zum einen die extrazelluläre Akkumulation von Amyloid- β (A β)-Plaques und zum anderen durch die intrazelluläre Bildung von neurofibrilären Bündeln aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Diese pathologischen Merkmale wurden erstmals von Alois Alzheimer im Jahr 1906 beschrieben und bilden seitdem die Grundlage des pathologischen Verständnisses der Erkrankung (151). Die Amyloid-Hypothese besagt, dass die Akkumulation von A β , einem Peptid, das durch die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) entsteht, der primäre Auslöser der Krankheitskaskade ist (152). Die Tau-Hypothese hingegen betont die Rolle der Tau-Pathologie, bei der das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau hyperphosphoryliert wird, was zu dessen Aggregation und zum Verlust der neuronalen Integrität führt (153).

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Verständnis der AD jedoch erheblich erweitert. Neben den klassischen Merkmalen der A β - und Tau-Pathologie wurden weitere pathophysiologische Mechanismen identifiziert, die zur Entstehung und Progression der Erkrankung beitragen. Dazu gehörten chronische Neuroinflammation, mitochondriale Dysfunktionen, synaptische Schädigung und zerebrovaskuläre Dysfunktionen (154). So zeigten Studien, dass zerebrovaskuläre Veränderungen oft bereits in präklinischen Studien der Erkrankung auftreten und möglicherweise sogar den Beginn der A β - und Tau-Pathologie vorantreiben (155,156).

Deshalb rückt neben vaskulären Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Diabetes und Hyperlipidämie insbesondere die Rolle der BHS in den Fokus der Forschung. Teil dieser Forschung ist auch das Enzym Meprin α , da es durch Expression in den Endothelzellen der BHS und seinem spezifischen Substratmuster wie unter 2.2.2. aufgeführt potenziell auf die Integrität der BHS negativ Einfluss nehmen kann. Dies würde dann zu den in 2.1.5. aufgezeigten Folgen führen und wie hier beschrieben zu der Entstehung der AD beitragen. Trotz einiger Fortschritte in der Grundlagenforschung und der Entwicklung neuer Biomarker bleibt die AD eine therapeutische Herausforderung. Bisherige Therapien zielen vor allem auf die Linderung der Symptome ab, während krankheitsmodifizierende Behandlungen noch in der Entwicklung sind. Deshalb ist die Forschung in diesem Bereich sehr wichtig und von hoher Relevanz.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Eukaryotische Zellen

<u>Zelllinie</u>	<u>Zelltyp</u>	<u>Referenzen</u>
bEnd.3	vom Gehirn abgeleitete Endothelzellen	Hallmann, 2000
bEnd.3 + Mep1a	vom Gehirn abgeleitete Endothelzellen	Selbsterstellung
Bend.3 + GFP	vom Gehirn abgeleitete Endothelzellen	Selbsterstellung
HEK 293 T	Humane embryonale Nierenzellen	Cannon and Strittmatter, 1993
HEK GP 293	Humane embryonale Nierenzellen	

Tabelle 2: Eukaryotische Zellen

3.1.2 Bakterien, Plasmide und Primer

Übersicht Bakterien

Stable Competent E. Coli DH5α	New England BioLabs, Frankfurt
-------------------------------	--------------------------------

Tabelle 3: Übersicht Bakterien

Übersicht Plasmide

pLBCX	Clontech™, Mountain View, USA
pLBCX_eGFP	AG-Pietrzik
pLBCX_mep1a_C	AG-Pietrzik, Carsten Wenz
pcDNA4_mep1a	AG-Becker-Pauly, Biochemie Uni Kiel

Tabelle 4: Übersicht Plasmide

Übersicht Primer

<u>Name</u>	<u>Sequenz von 5' zu 3'</u>	<u>Restriktionsseite</u>
BGL2 fwd	TTT TAG ATC TGC CAC CAT GGC TTG GAT TAG A	Bgl2
new_CIAL_Primer	AAA AAT CGA TTC ACT TGT CGT CGT CGT CC	Clal
Mep1a_8_fw	AGC AGC TGT ACC GAT TAA GTA TCT	
Mep1a_8_rv	TGA AAG AGG TCC AAG CCT GC	
Mep1a_Middle_fw	GCG ACA AGC TTC AGA GCC CTC GAT TCT ACA	
Mep1a_Middle_rv	CTG GAG ATG TGT GCG ACT TCG AGG TAG TGA	
Mep1a_End_fw	CCC AGT GCC TAG ATG CAT GGC TGG CAC ATT	
Mep1a_End_rv	CTC AGA GGA AAG CAA ATG CTG TGC AGC CTG	
flag_tag_fw	GTG GGA ACC TAT CAT ACG GAC	
pLBCX_Mep1a_end_rv	CTG ATG GTT CTC TAG AAA CT	
pLBCX_Mep1a_middle_fw	GTG GAA TGA TTC AGG GCA CC	

Tabelle 5: Übersicht Primer

3.1.3 Reagenzien

Antibiotika

Blasticidin (10 mg/ml)

Penicillin (10000 Einheiten)/Streptomycin (10 mg/ml)

Ampicillin (100 µg/ml)

Transfektionsreagenzien

Polyethylenimine (PEI)

Poly-D-Lysine

Chloroquine

Polybrene

Lipofectamine (2000)

Übersicht Enzyme

Enzyme	Puffer	Hersteller
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Phusion HF Buffer (5x) 10 mM dNTPs	New England BioLabs
CIP	CutSmart Buffer (10x)	New England BioLabs
T4 DNA Ligase	T4 DNA Ligase Buffer (10x)	New England BioLabs
Bgl2	NEBuffer r3.1 (10x)	New England BioLabs
ClaI	rCutSmart Buffer (10x)	New England BioLabs

Tabelle 6: Übersicht Enzyme

Medien und Lösungen für die Zellkultur

Medium

„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM)

Gibco, Karlsruhe

Waschpuffer

„Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline“ (DPBS)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Ablösen von konfluenten Zellen

TrypZean SOLUTION (1x)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Complete Medium für HEK 293T und bEnd.3 Zellen

„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM)

Sigma-Aldrich, Steinheim

10% fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Paisley, Scotland
1% Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
1% Glutamax (100x, 200 mM)	Gibco, Karlsruhe

Complete Medium für HEK GP 293 Zellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
10% fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Paisley, Scotland
1% Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2% Glutamax (100x, 200 mM)	Gibco, Karlsruhe
1% Natrium-Pyruvat (100 mM)	Gibco, Karlsruhe

Medium zur transienten Transfektion

OPTI-MEM®	Gibco, Karlsruhe
1% Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Gefriermedium

Complete Medium	
10% DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim

Coating-Lösung für die TEER-Messung

400 µl Typ 4 Kollagen (1 mg/ml) Sigma-Aldrich,
 Steinheim

500 µl VE H2O

100 µl Fibronectin (1 mg/ml) Sigma-Aldrich, Steinheim

Stimulationsmedium für die TEER-Messung

OPTI-MEM® Gibco, Karlsruhe

Hydrokortison Sigma-Aldrich, Steinheim

L-Glutamin Gibco, Karlsruhe

Medium für den FITC-Dextran Assay

Phenolrotfreies DMEM Sigma-Aldrich, Steinheim

10% fetales Kälberserum (FCS) Gibco Paisley, Scotland

75 µg/ml 4kDa FITC Dextran (25 mg/ml)

Antikörper für Western Blot, Antikörperaufnahme und Transport

Primäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Isotyp/Klon	Organismus	Konzentration
Aktin	Aa20-33 (N-Terminus)	Monoklonal	Kaninchen	13,7 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)
Flag (M2)	DYKDDDDK	Monoklonal	Maus	0,5 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)
Mep1a		Monoklonal	Kaninchen	0,5 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)

Occludin (OC-3F10)	~aa150 (C-Terminus)	Monoklonal	Maus	0,5 µg/ml in TBS-T, NaN ₃ (0,02%)
Claudin-5	C-Terminus	Monoklonal	Kaninchen	0,25 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)
ZO-1	aa1446-1748	Monoklonal	Kaninchen	0,37-0,74 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Isotyp/Klon	Organismus	Konzentration
Maus	Maus-Antikörper	Monoklonal	Affe	0,08 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)
Kaninchen	Kaninchen-Antikörper	Monoklonal	Ziege	1 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)
Hänchen	Hänchen-Antikörper	Monoklonal	Affe	1,8 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)
Maus	Maus-Antikörper	Monoklonal	Hänchen	0,01 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)
Kaninchen	Kaninchen-Antikörper	Monoklonal	Hänchen	0,02 µg/ml in TBS-T/Milch, NaN ₃ (0,02%)
IRDye 800CW Maus	Maus-Antikörper	Monoklonal	Ziege	1:15000 in TBS-T, NaN ₃ (0,02%)
IRDye 800CW Kaninchen	Kaninchen-Antikörper	Monoklonal	Ziege	1:15000 in TBS-T, NaN ₃ (0,02%)

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper

Chemikalien

Azeton	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
Ampillicin	Sigma Aldrich, Steinheim
Acryllamid/Bis Solution 29:1	BioRad Laboratories
Biozym Le Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Blasticidin	InvivoGen, Frankreich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroquine	Sigma Aldrich, Steinheim
complete™ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
DPBS	Gibco, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Gel loading Dye Purple (6x), no SDS	New England BioLabs Inc, Frankfurt
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hydrokortison	Sigma Aldrich, Steinheim
Immobilon® Western Kit	EMD Milipore Corporation, Burlington
Isopropanol	Merck, Darmstadt

Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare Life Science,
Nonidet P40 (NP40)	Merck, Darmstadt
	KG, Düren
PageRuler™Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Pierce™BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Polybrene	Merck, Darmstadt
Polyethylenimine	Polysciences, Warrington
Poly-D-lysine	InvivoGen, Toulouse France
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti®Load	Roth, Karlsruhe
Prestained Protein Ladder – Broad	Abcam, Cambridge
molecular weight	
Natriumazid (NaN_3)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad Laboratories
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Roti®Load	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe

Tween20	Roth, Karlsruhe
1 kb DNA Leiter	New England BioLabs, Frankfurt

Lösungen, Puffer und ergänzende Materialien

Zellyse

NP 40 Lysepuffer

NaCl	150 mN
Tris-OH pH 8.0	50 mM
Nonidet P40	1% v/v
NaN ₃	0,02%
EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail	

PBS

NaCl	1.37 M
KCL	0,0027 M
KH ₂ PO ₄	0,1 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M

SDS-PAGE

Roti®Load (4x)

Resolving Puffer 4%

Tris Base, pH 8,8 1,5 M

0,4% SDS

Stacking Puffer pH 6.8

Tris, pH 6,8 0,6 M

0,4% SDS

Running Puffer (10x)

Tris Base 0,25 M

SDS 1%

Glycin 1,92 M

Sammelgel

Stacking Puffer pH 6.8 625 µl

Acrylamid 40% (29:1) 312 µl

Water 1,563 ml

APS 10% 25 µl

TEMED 2,5 µl

Trenngel

10%-Gel

Resolving Puffer pH 8.8 2,5 ml

Acrylamid 40% (29:1) 2,5 ml

Water 5 ml

APS 10% 100 µl

TEMED 10 µl

Western-Blot

Blotting Puffer (1x)

Tris base	250 mM
Glycine	1.92 M
Methanol	20%

Tris gepufferte Salzlösung (TBS)

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Tris-Base	25 mM, pH 7,4

TBS-Tween (TBS-T)

0,1% Tween20 in TBS

Blockierungspuffer

5% Milchpulver in TBS-T

Blotting Membran

Nitrocellulose Blotting Membran Amersham™Protan™ 0,2 µm NC

HRP und Substrate

Immobilon® Western HRP Substrat	EMD Milipore Corporation
Luminol Reagenz	
Immobilon® Western HRP Substrat	EMD Milipore Corporation
Peroxid Lösung	

Ermittlung der Protein-Konzentration

Pierce™BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, Rockford

DNA-Gelelektrophorese

Agarose-Gel

Biozym LE Agarose	1%
TAE (1x)	ad 100 ml
Ethidium bromid	0,0001%

1x TAE

Tris	0,4 M
EDTA	0,01M
Essigsäure	0,2 M
dH ₂ O	ad 1000 ml

Transformation für NEB® -stable Competent *E. Coli*

NEB 10-beta/Stable Outgrowth Medium	New England BioLabs, Frankfurt
NEB® -stable Competent <i>E. Coli</i>	New England BioLabs, Frankfurt

Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur

LB Medium^{Amp}

LB Medium pH 7.5
Ampicillin (100 µg/ml)

LB-Agar^{Amp}

LB Medium pH 7.5
1,5% Agar

Ampicillin (100 µg/ml)

3.1.4 Geräte und Laborhilfsmittel

BioRad power Pac 300	BioRad, Munich
CO2-Inkubator (HERACell 240i)	New Brunswick, Edison, USA,
CellZcope	Nano Analytics, Münster
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Falcons	GreinerBio One GmbH, Frickenhausen
Gefrierschrank	-80°C Heraeus -20°C Liebherr
Glas Pipetten	Hirschmann®Techcolor, Germany
Glasplatten	BioRad Munich
Handschuhe	StarLab International GmbH
Inkubator	Edmund Bübler
Kryo-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, Denmark
LAS 3000 FujiFilm	Fuji Japan
Lichtmikroskop	Olympus
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Mikrowelle	Micromaxx, Real
Mini Zentrifuge	Starlab International GmbH
Mini-PROTEAN®	BioRad, Munich
NALGENECryo1°C Gefriercontainer	Thermo Fisher Scientific, Swords
Pasteur Pipetten	Roth, Karlsruhe

pH-Meter	inoLab, Weilheim
Pipetten 1 µl-1 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Starlab International GmbH
Pipettierhilfe	IBS integra biosciences
Plastikpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttler	Infors, Boltmingen Schweiz
Sterilbank	Nunc, Wiesbaden
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Transparente Membraneinsätze	Sarstedt, Nümbrecht
Vortexer VWR	VWR International buvba
Varioskan LUX multimode microplate reader	
Vakuumpumpe	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco California
Wasserbad GFL1086	<i>Mettler PL1200GFL</i> , Burgwedel
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellspachtel	Sarstedt; Newton
Zentrifuge Biofuge stratos	Hereaus, Hanau
Zentrifuge universal 32	Hettich; Tuttlingen
Zentrifuge Mikro 200	Hettich; Tuttlingen

3.1.5 Software und Datenbanken

ChemiDoc MP	BioRad Laboratories
Excel 2016	Microsoft
ImageJ	Open Source
Intas Gel Imager Instruments	Intas Science Imaging GmbH

Power Point 2016	Microsoft
Word 2016	Mircosoft
BioRender	
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc.
Skant Software 6.0.2.3	

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung immortalisierter eukaryotischer Zellen

Die Arbeiten mit Zellen wurden alle unter einer Steril Bank in einem S2-zertifizierten Labor abgehalten. Die Materialien wurden nach Benutzung mit 70%igem Ethanol behandelt, autoklaviert oder waren Einmalmaterialien. Die Zellen wurden in 2-15cm großen Kulturschalen in einem Inkubator mit 5% CO₂-Hehalt und 95%-Luftfeuchtigkeit bei 37°C kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig kontrolliert unter einem Mikroskop kontrolliert.

3.2.1.1.1 Revitalisierung kryokonservierter Zellen

Um Zellen in Kultur nehmen zu können muss man kryokonservierte Zellen aus dem Labor revitalisieren. Hierbei ist zunächst darauf zu achten, dass die Zellen eine möglichst niedrige Passage Zahl haben, da sie mit höherer Passage Zahl die Fähigkeit verlieren TJ-proteine ausbilden zu können (171). Die kryokonservierten Zellen werden in flüssigem Stickstoff gelagert, woraus man sie zunächst nimmt und das Kryoröhrchen, in dem sich die Zellen befinden, in ein 37°C warmes Wasserbad legt. Unmittelbar nachdem sie aufgetaut sind, pipettiert man die Zellen in ein vorbereitetes 15ml Falcon gefüllt mit 10 ml erwärmtem Kulturmedium und zentrifugiert die Zellsuspension für 4 Minuten bei 1200 x g. Den Überstand saugt man mittels einer Vakuumpumpe ab, um die sich am Boden des Gefäßes befindlichen Zellen vom für die Zellen toxischen 10%igem Dimethylsulfoxid (DMSO)-Kulturmedium-Lösung, in

dem die Zellen kryokonserviert wurden, zu befreien. Anschließend werden die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 6cm Kulturschale überführt und in Kultur genommen.

3.2.1.1.2 Medium Wechsel

Alle 2 Tage muss bei den Zellen das Medium gewechselt werden. Dafür saugt man das Medium mittels einer Vakuumpumpe ab. Anschließend gibt man 1-2 ml 1x PBS auf die Schale. Nach 1-2 Minuten saugt man dies ebenfalls ab. Dies dient dazu mortalisierte Zellen und Medium Reste zu entfernen. Nun gibt man 10 ml des je nach Zellart geeigneten Kulturmediums dazu und stellt die Kulturschale in den Inkubator.

3.2.1.1.3 Passagieren von adhärenenten Zellen

Wenn die Zellkulturschale zu 80% mit Zellen bedeckt ist, können die Zellen nicht mehr wachsen, da sie keinen Platz mehr haben bzw. keine neuen Zellkontakte mehr ausbilden können. Dies hat zur Folge das die Zellen mit der Zeit absterben (172). Um dem entgegenzuwirken, passagiert man die Zellen zu diesem Zeitpunkt. Dafür geht man zunächst vor wie bei 3.2.2.2. Nachdem man das PBS abgesaugt hat, unterscheiden sich die Vorgehensweisen für die verschiedenen Zellarten. Die Hek239T-Zellen lassen sich mittels auf und ab pipettieren von Kulturmedium durch den entstehenden Druck ablösen. Anschließend werden die Zellen in ein 15 ml Flacon überführt und 1:10 geteilt. Das bedeutet es wird 1ml der Zellsuspension und 9 ml frisches Kulturmedium zusammen auf eine neue Kulturschale pipettiert. Die bEnd.3- und HEK-GP-Zellen lassen sich aufgrund der Zellmatrix- und Zell-Zell-Kontakten nicht von der Platte lösen. Dafür gibt man die im menschlichen Verdauungstrakt vorkommende Serinprotease in Form einer 1x Trypsin/EDTA-Lösung (1-2 ml) auf die Schale. Die Lösung ist in der Lage diese Zellverbindungen zu spalten. Unter mikroskopischer Beobachtung verweilt das Trypsin 1-5 Minuten auf den Zellen. Anschließend lassen sich die Zellen mithilfe einer Pipette lösen. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml Flacon wird sie für 4 Minuten bei 1200 x g zentrifugiert, und das für die Zellen schädliche Trypsin anschließend abgesaugt. Nach Resuspension mit frischem Kulturmedium können die Zellen wie oben beschrieben auf eine neue Kulturschale aufgeteilt werden.

3.2.1.1.4 Kryokonservation der Zellen

Manche Zellarten werden nur für einige Experimente benötigt. Deshalb werden sie nach Beendigung dieses Experiments eingefroren um sie so lange haltbar zu halten. Dieses Verfahren nennt sich Kryokonservation. Hierbei werden die Zellen bei Temperaturen von -180°C in flüssigem Stickstoff in einer 10%haltigem DMSO-Kulturmedium-Lösung konserviert. Das DMSO ist bei diesem Prozess so wichtig, da es die Ausbildung von Eiskristallen verhindert und somit die Zellen schützt (173). Für die Durchführung wird eine konfluente 10 cm Kulturschale benötigt, also eine Schale, die ungefähr zu 80% mit Zellen bedeckt ist. Hier geht man zunächst vor wie in 3.2.2.3. bis zur Resuspension. Bei diesem Schritt resuspendiert man die Zellen mit 1ml der DMSO-Kulturmedium-Lösung und überführt die Suspension in ein Kryoröhrchen. Daraufhin stellt man das Kryoröhrchen zunächst in den auf 37°C erwärmten Mr.Frosty und lässt diesen für 2-3 Stunden bei -80 Grad Gefrierschrank, ehe man das Kryoröhrchen im flüssigen Stickstofftank unterbringt.

3.2.1.1.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte automatisiert mit dem Zellzähler „Invitrogen countess 3“. Dafür wurden $20\ \mu\text{l}$ der zu bestimmenden Zellsuspension mit $20\ \mu\text{l}$ Trypanblau in ein 1ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nach kurzer Resuspension wurden $2 \times 10\ \mu\text{l}$ des Ansatzes in einen Countess Kammerobjektträger pipettiert und in den Zellzähler befördert. Der Mittelwert der beiden berechneten Zellzahlen wurde für die Bestimmung der endgültigen Zellzahl verwendet.

3.2.1.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von HEK 293T Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Polyethylenimine (PEI). Hierfür wurden zunächst 24 h vor der Transfektion zwischen $4-6 \times 10^5$ Zellen auf eine 6cm Schale ausgesät. Für die Transfektion werden zwei Ansätze benötigt. Für den ersten Ansatz pipettiert man $1\ \mu\text{g}$ DNA in $30\ \mu\text{l}$ Opti-MEM. Für den zweiten Ansatz $4\ \mu\text{l}$ PEI in $30\ \mu\text{l}$ Opti-MEM. Dies wird 10 Minuten inkubiert, ehe es in einem Eppendorfreagenzgefäß zusammen gemischt wird und nun weitere 15 Minuten inkubiert wird. Daraufhin gibt man das Ganze zu den Zellen. Nach 4-6h muss das Medium gewechselt werden, weil das PEI sonst negative

Auswirkungen auf die Zellen hat (174). Nach 24h Stunden wird dann eine Zell Lyse durchgeführt.

		Pro 6cm Schale
	Zellen	4-6 x 10 ⁵
Ansatz 1	DNA	1 µg
	Opti-MEM	20 µl
Ansatz 2	PEI	4 µl
	Opti-MEM	30 µl
	Medium	2 ml

Tabelle 9: Transiente Transfektion der HEK-Zellen

Für die transiente Transfektion der bEnd.3 Zellen wird das Transfektionsreagenz Lipofectamine (2000) verwendet. Hier werden zwischen 5-8 x 10⁵ Zellen 24 h bevor der Transfektion auf einer 6cm Schale ausgesät. Für die Transfektion benötigt man ebenfalls zwei Ansätze wie folgt beschrieben. Für Ansatz eins werden 2 µg DNA mit 125 µl Opti-MEM gemischt. Für den zweiten 5 µl Lipofectamine (2000) mit 125 µl Opti-MEM. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit werden die beiden Ansätze in zusammengeführt und für weitere 20 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wird es über die Zellen gegeben. Ein Medium Wechsel sollte nach 24 h erfolgen. Nach 48-72 h erfolgt hier die Zell Lyse.

		Pro 6cm Schale
	Zellen	5-8 x 10 ⁵
Ansatz 1	DNA	2 µg
	Opti-MEM	125 µl
Ansatz 2	Lipofectamine (2000)	4 µl
	Opti-MEM	125 µl
	Medium	2 ml

Tabelle 10: Transiente Transfektion der bEnd.3 Zellen

3.2.1.3 Stabile Transfektion der bEnd.3 Zellen mittels retroviraler Transfektion

3.2.1.3.1 Prinzip der Methode

Transfektion allgemein bedeutet, das Einbringen von Fremd-DNA in ein Genom mittels eines Vektors. Hält dies nur vorübergehend spricht man von einer transienten Transfektion, wie in 3.2.2. beschrieben. Stabile Transfektion, also das die Fremd-DNA dauerhaft in das Genom integriert wird und nicht durch Zellteilung wieder verloren geht, erreicht man durch retroviralen Gentransfer. Die in dieser Arbeit beschriebenen mit Mep1a stabil transfizierten bEnd.3 Zellen wurden mit dieser Methode hergestellt. Um infektiöse replikationsinkompetente Partikel verpacken zu können benötigen Retroviren verschiedene Gene: gag, pol und env. Um keine unkontrollierte Virusproduktion zu bekommen, wurde in dieser Methode ein Gentransfersystem bestehend aus drei Komponenten erstellt, welches die oben genannten Gene enthält. Als erstes benötigt man eine Verpackungszelllinie, die HEK GP2 293 Zellen. Diese enthalten das Gen pol, welches wichtige Enzyme, wie die reverse Transkriptase liefert, und das gag Gen welches das Kapsid des Virus kodiert. Desweiteren benötigt man einen Expressionsvektor, der die DNA von Mep1a, Transkriptions- und Prozessierungsenzyme und das für die spätere Selektion entscheidende „packaging signal Ψ “, ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Blasticidin enthält. Das Helfer Plasmid VSV-g („envelope glycoprotein vesicular stomatitis virus“) enthält das Gen env, welches für das Glykoprotein der Virushülle codiert und so ein Eindringen in die zu transfizierenden Zellen mittels Plasmamembrantransfusion gewährleistet. Für die Herstellung des Viruspartikels sind somit alle 3 Komponenten essenziell. Die Verpackungszelllinie wird im Verlauf mit dem Helfer Plasmid und dem Expressionsvektor der Mep1a codiert, transfiziert. Anschließend werden die Viruspartikel produziert und in das umgebende Medium abgegeben. Dieses Medium mit den dann enthaltenen Virus Partikeln wird nach 60 h geerntet und daraufhin die Zielzellen beimpft.

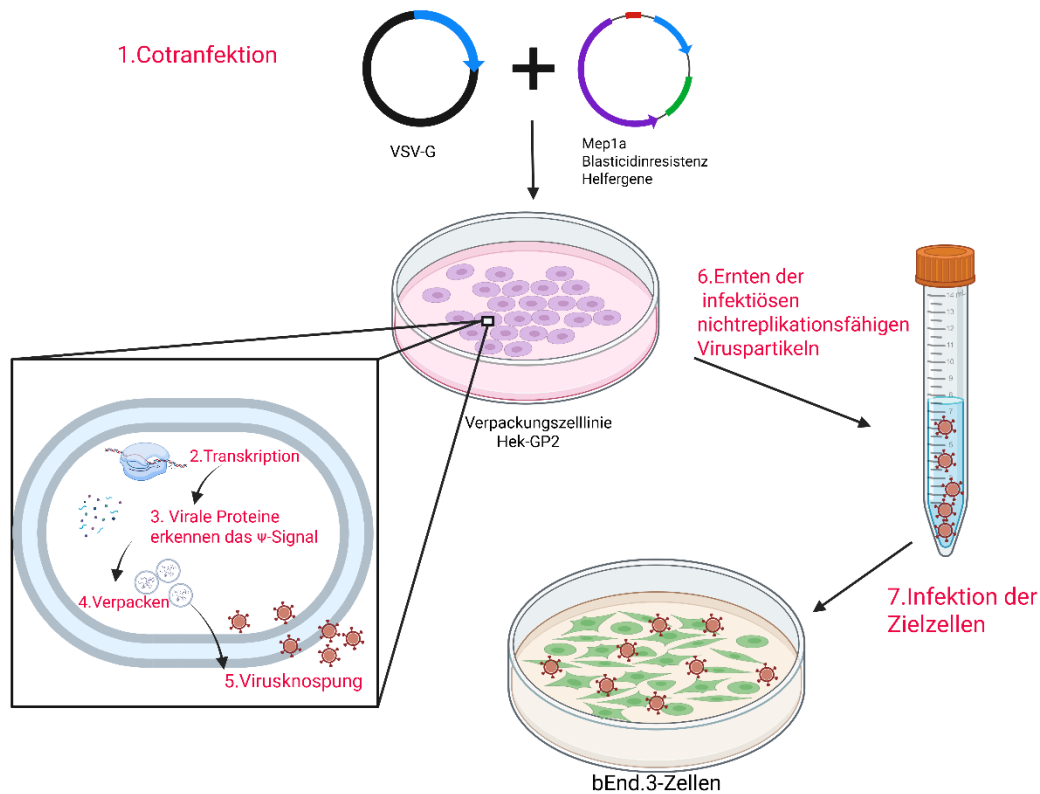


Abbildung 4: Stabile Transfektion der bEnd.3-Zellen mit einem retroviralen Gentransfer

Cotransektion der Verpackungszelllinie HEK GP2 293, welche das pol Gen enthält, mit dem Helferplasmid VSV-g mit dem Gen env und dem Expressionsvektor. Dieser enthält Helfergene, die DNA Mepirin α s und eine Blasticidinresistenz. 2.-4. Herstellung des Virus und Verpackung. 5.-6. Virus wird aus der Zelle freigesetzt. Überstand wird mit Virus anschließend entnommen. 7. Beimpfung der bEnd.3-Zellen mit dem Virus. (Erstellt mit <https://BioRender.com>)

3.2.1.3.2 Titration des Antibiotika-Stocks („kill curve“)

Verwendet wurde eine „Abtötungskurve“, um die optimale Konzentration von Blasticidin für die klonale Selektion zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden bEND.3-Zellen mit einer Zelldichte/Well von $4,5 \times 10^5$ in eine 6-Well-Platte mit 2 ml Kulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Blasticidin-Konzentrationen (0,3, 4, 5, 6, 10 $\mu\text{g/ml}$) 14 Tage lang behandelt. Gewechselt wurde das Kulturmedium alle 2-3 Tage und täglich die Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet. Um die richtige Antibiotikakonzentration für die stabil transfizierten bEND.3-Zellen auszuwählen wurde die Konzentration verwendet, bei denen nach 5

Tagen ein signifikanter Zelltod und innerhalb von 14 Tagen ein vollständiger Zelltod beobachtet wurde.

3.2.1.3.3 Transfektion der HEK GP-293 Verpackungszelllinie

Um Viruspartikel zu erzeugen, plattieren Sie GP2-HEK293T-Zellen auf mit Poly-D-Lysin beschichtete 10-cm-Platten (Verfahren wie oben beschrieben, verwenden sie 4 ml einer 1:2000-Lösung pro Platte), sodass die Zellen bei der Transfektion am nächsten Tag konfluent (60-80% der Platte mit Zellen bedeckt) sind. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gegen Medium mit 25 µM Chloroquin ausgetauscht. Chloroquin erhöht die Konstrukt-/Vektoraufnahme in die virusproduzierenden Zellen, indem es durch Neutralisation des pH-Wertes die lysosomale DNA-Enzyme hemmt (175). So kann die Effizienz der Transfektion um das 2-3x fache erhöht werden. Vor der Transfektion wurde das Medium (DMEM, serumfrei) erneut gewechselt und die Zellen wurden mit 5 µg retroviralem Expressionsplasmid (pLBCX Mep1b) und 5 µg pVSV-G-Plasmid (10 µg Gesamt-DNA) co-transfiziert. Verwendet wurde Polyethylenimin (PEI) als Transfektionsreagenz und die Transfektion wie folgt ausgeführt. Geben Sie 10 µg Gesamt-DNA (5 µg pVSVG + 5 µg pLBCX Mep1b) in das Reaktionsgefäß mit 300 µl serumfreiem DMEM (Lösung A). 40 µl PEI in das Reaktionsgefäß geben, das 300 µl serumfreies DMEM (Lösung B) enthält. Die beiden Lösungen wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit einem Vortex-Mischer kombiniert und gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transfektionsmischung zu den HEK-GP2 293T-Zellen gegeben.

		Menge pro Schale
	Zellen	4,5 x 10 ⁶
Ansatz 1	Opti-MEM	300 µl
	DANN	10 µg (5 µg+5 µg)
Ansatz 2	Opti-MEM	300 µl
	PEI	40 µl
	Medium	10 ml

Tabelle 11: Transfektion der HEK GP-293 Verpackungszelllinie

3.2.1.3.4 Konzentrieren und Ernten des viralen Überstands

Aufgrund der Möglichkeit der Bildung infektiöser Viruspartikel ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Zellkulturarbeiten unter S-2-Bedingungen durchgeführt. Es werden ausschließlich Einwegkunststoffe verwendet und alle potenziell kontaminierten Geräte und Materialien werden sofort mit 70 % Ethanol und UltraSol™ desinfiziert. Der Abfall wird in separaten Behältern gesammelt und einzeln autoklaviert. Das Medium wurde nach 4-6 h gewechselt. Nach 24 h beim Medium Wechsel erfolgte zur Konzentration des Virus eine Reduktion des Mediums auf 6 ml statt 10 ml. Nach 60-65 h Stunden wird der Überstand, indem nun der Virus enthalten ist mit einer Pipette in ein 15 ml Falcon überführt und für 4 Minuten bei 1200 x g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand unter Zunahme einer Spritze durch ein 0,45 µm Zellulose Acetat Filter gespritzt. Der nun gefilterte Überstand enthält das Virus und wurde im Folgenden für das Beimpfen der Zielzellen und die Titer Bestimmung genutzt.

3.2.1.3.5 Bestimmung des viralen Titers

Virustiter werden bestimmt, um die Lebensfähigkeit des Virusstamms sicherzustellen und die maximale Anzahl an Zielzellen zu bestimmen, die von einer bestimmten Virusmenge infiziert werden können. Darüber hinaus können geeignete Transduktionsbedingungen für die verwendeten Zelllinien bestimmt werden, indem die Anzahl der Viruspartikel pro Zelle (MOI) gemessen wird. Um die Virustiter zu bestimmen, wurden zunächst 1×10^3 Zellen/Well der Zielzelllinie, in dem Fall bEnd.3-Zellen, in eine 6-Well-Platte mit 2 ml Kulturmedium gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen Medium mit Polybrene (6 µg/ml) ausgetauscht. Durchgeführt wurde eine serielle Verdünnung des virushaltigen Überstands in Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:100.000 vor. Anschließend werden die ausgesäten bEnd.3 Zellen mit 150 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe infiziert. Das Pipettierschema ist unten dargestellt. (Abbildung 5) Nach 48 h erfolgt dann der Beginn der Selektion mit Blastocidin. Dies wird so lange fortgeführt, bis alle Zellen der Kontrolle abgestorben sind. Nach Beendigung der Selektion werden die Zellen mit 0,1% Kristallviolett für 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Kolonien mit dem ImageJ gezählt und anschließend konnte man mit Hilfe der unten aufgeführten Formel den viralen Titer bestimmen.

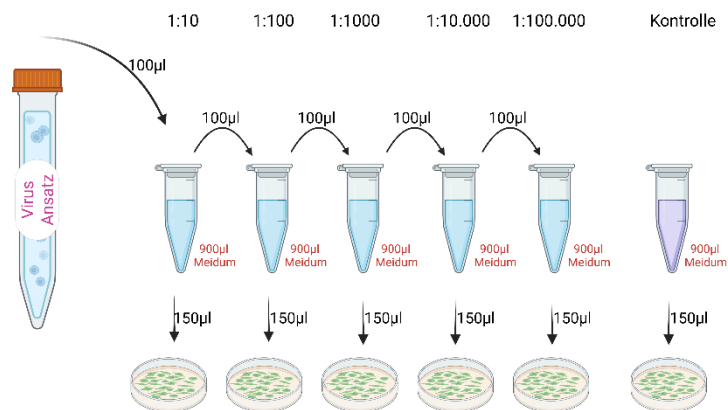


Abbildung 5: Virale Verdünnungsreihe

Sechs Eppendorf-Reaktionsgefäße werden mit jeweils 900 µl Medium befüllt. In das erste Gefäß werden 100 µl des virusenthaltenden Überstandes gegeben und sorgfältig vermisch (resuspendiert). Anschließend werden 100 µl dieser Mischung in das zweite Gefäß pipettiert und ebenfalls resuspendiert. Dieser Schritt wird für jedes weitere Gefäß wiederholt. Durch dieses Vorgehen entsteht eine serielle Zehnerverdünnung, die bis zur Verdünnungsstufe 1:100000 reicht. (Erstellt mit <https://BioRender.com>)

Formel

$$\frac{\text{Kolonien}}{\text{Volumen}} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{TU}}{\text{ml}} \text{ (Transduktionseinheiten/ml)}$$

3.2.1.3.6 Infektion der Zielzellen mit retroviralen Partikeln

Am Tag vor der Infektion wurden $4,5 \times 10^5$ bEnd.3 Zellen auf einer 6 cm Schale ausgesät. Am nächsten Tag sollten 50-60% der Platte bedeckt sein, um eine optimale Aufnahme der Partikel zu gewährleisten. Unmittelbar vor der Impfung wurde das Medium abgesaugt und 1 ml 6 µg/ml Polybrene-haltigem Medium zu den bEnd.3 Zellen gegeben. Anschließend wurde je nach errechnetem viralem Titer die Menge an

viralem Überstand aus 3.2.3.5 zu den Zellen pipettiert (hier 1 ml/well). 24 h nach Beimpfung wurde das Medium durch 2 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Medium gesondert mittels Natriumhypochlorit inaktiviert wird, da es noch infektiöse Partikel enthalten kann. Weitere 48 h Stunden später begann die Selektion mit 5 µg/ml Blastocidin. Alle 48 h erfolgte ein Medium Wechsel, bis die Negativkontrolle vollständig abgestorben war. Im Anschluss wurde die Expression des Mep1a-Gens mit einer Western-Blot-Analyse überprüft.

3.2.1.4 BHS *in vitro* Modell

3.2.1.4.1 Kultivierung der Endothelzellen und Aufbau des *in vitro* Blut-Hirn-Schrankenmodells

Der Aufbau, der *in vitro* BHS wurde im cellZscope bei 37°C, 5%CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit simuliert. Dafür wurden in den cellZscope 24-well Transwell Kulturschaleneinsätze (Porengröße 0.4 µm; Oberfläche, 33.6 mm²) eingesetzt. Diese wurden mit 0,4 mg/mL Collagen IV und 0,1 mg/mL Fibronectin beschichtet, da beide physiologisch in der BHS verankert sind und somit den Aufbau der *in vitro* BHS begünstigen. Anschließend wurden 35000 Zellen meiner stabil transfizierten Zelllinie bEnd.3_mep1a_C pro Well in 12 der 24 Wells ausgesät. Die übrigen wurden mit einer Negativkontrolle (bend.3_GFP) befüllt. Gibt man nun Medium sowohl in den luminalen Teil des cellZscopes als auch in die Transwells erhält man nach Ausbildung einer Einzelzellschicht der bEnd.3-Zellen (Endothelzellen) eine simulierte BHS. Der abluminale Teil spiegelt die Blutseite wider, der luminale Teil die des Gehirns. Nun kann man mit Hilfe des cellZscopes die Barriereigenschaften der verschiedenen Zellen unter physiologischen Bedingungen wie folgt untersuchen.

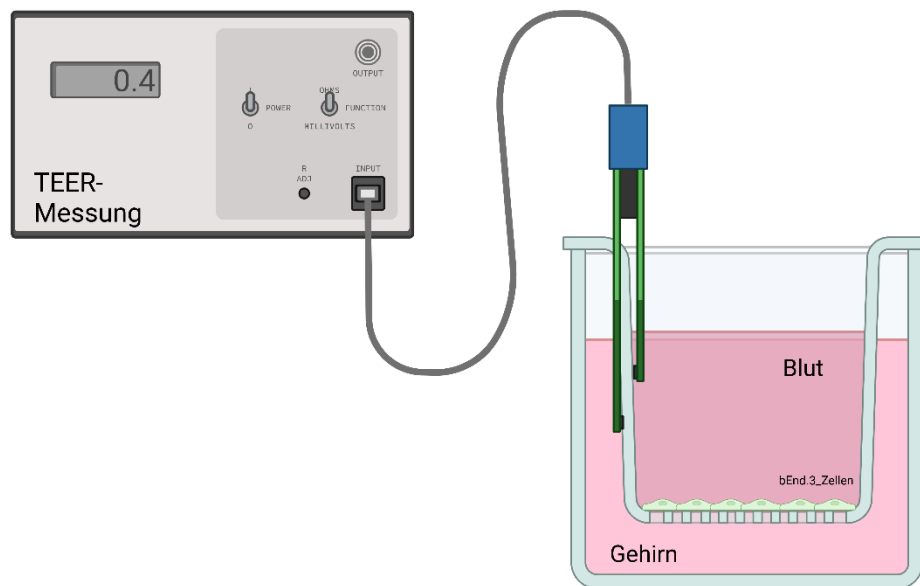


Abbildung 6: Aufbau des in vitro Modells der BHS

Zur Modellierung der BHS wird eine Einzelzellschicht aus den bEnd.3_mpe1a_C Zellen auf einem durchlässigen Transwell-Einsatz kultiviert. Dadurch entstehen zwei getrennte Kompartimente: ein luminales (oberes: welches die Seite des Blutes simuliert) und ein abluminales (unteres) welches die Gehirnseite simuliert). Das CellZscope-Gerät ermöglicht mittels fest integrierter Elektroden in beiden Kompartimenten die Messung des TEER, der ein Indikator für die Integrität der Zellbarriere ist. (Erstellt mit <https://BioRender.com>)

3.2.1.4.2 CellZscope Impedanzspektroskopie

Der CellZscope ist in der Lage unter physiologischen Bedingungen sowohl den transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) als auch die Kapazität der Zellschicht auf den Transwells durch Impedanzspektroskopie über die Zeit zumessen. Hierbei ist der TEER-Wert ein Maß für die Dichtigkeit und Barrierefunktion der Zellschicht, die in erster Linie durch die TJs bestimmt wird. Das bedeutet, wenn mehr TJs vorhanden sind ist die Dichtigkeit und die Funktion gut und hoch und der TEER-Wert ebenfalls. Die Kapazität hingegen ist hoch, wenn die Zellen nur gering konfluent sind. Kapazität ist also insofern wichtig, da sie angibt, ob die Zellen konfluent sind, also Kontakt zu ihren Nachbarzellen haben und somit auch TJs Ausbildung. Daher ist es auch entscheidend gleichzeitig die Kapazität als auch den TEER-Wert zu prüfen, um einen geeigneten Starzeitpunkt für seine Messungen zu finden. Nachdem die Zellen ausgesät wurden, wartet man bis die Kapazität bei $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ liegt. Zudem Zeitpunkt

wechselt man das Medium zu dem (in Medien und Lösungen für die Zellkultur beschrieben) Stimulationsmedium für die TEER-Messungen. Das in dem Medium enthaltene Hydrokortison verstärkt die TJ-Ausbildung noch einmal. 18 h nach Medium Wechsel können die Messungen über einen Zeitraum von 24 h beginnen. Daraufhin wurden die Werte zwischen den beiden Gruppen verglichen und ausgewertet.

3.2.1.4.3 Fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran Assay

Um einen FITC-Dextran Assay durchzuführen, geht man zunächst vor wie in 3.2.4.1. und 3.2.4.2. Das heißt man baut sich ein *in vitro* Modell der Bluthirnschranke im cellZscope. Nachdem die Kapazität um die 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ liegt und das Stimulationsmedium 18 h Stunden auf den Zellen war, kann man mit dem Assay anfangen. Wichtig ist zu beachten, dass die folgenden Schritte alle im Dunkeln stattfinden. Dies ist wichtig, da sonst das FITC-Dextran mit dem Licht reagieren könnte und so die Werte verfälschen würde. Zuerst stellt man eine Arbeitslösung her, die wir benötigen. Dafür werden 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des FITC-Dextrans in phenolrotfreies DMEM+ 10%FCS gegeben. Wichtig ist auch hier auf phenolrotfreies DMEM zu achten, da es sonst zu unerwünschten Reaktion mit dem Dextran kommen kann. Im nächsten Schritt wird das Medium im luminalen-Part durch das phenolrotfreie DMEM+ 10%FCS ersetzt (950 μl). Das Medium des abluminalen-Parts wird mit unserer Arbeitslösung befüllt (350 μl). Nach 2 h Stunden wurde sowohl aus dem abluminalen- als auch dem luminalen- Teil ein Doppelansatz mit je 150 μl entnommen und auf eine 96-well Platte pipettiert. Nun kann man in dem Varioskan LUX multimode microplate reader die Werte auswerten und miteinander vergleichen.

3.2.1.5 Zell Lyse

Für die Zell Lyse wurden transient oder stabil transfizierte Zellen auf eine 6 cm Kulturschale ausgesät. Je nach gewünschtem Zeitpunkt beginnt man die Zell Lyse,

indem das Medium wechselt und einmal mit 4°C 1x PBS gewaschen wird. Das Vorgehen für das Ablösen der Zellen unterscheidet sich nun. Bei Hek-Zellen gibt man nun die Schale auf Eis, 500 µl 4°C 1x PBS hinzu und löst die Zellen unter Zunahme eines Zellspachtels ab. Diesen Vorgang wiederholt man und pipettiert die entstandene Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß. Da sich bEnd.3-Zellen nicht so einfach ablösen, inkubiert man die Zellen 500 µl Trypsin für 2-3 Minuten. Anschließend löst man die Zellen ebenfalls mit einem Zellspachtel ab und wiederholt den Vorgang mit PBS wie bei den Hek-Zellen. Hierauf folgte eine Zentrifugation bei 7000 RPM 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und 60µl eines Protease-Inhibitor haltigem NP40 hinzugegeben. Das Zellpellet wurde durch 3-maliges vortexen (alle 10 Minuten) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubationsphase auf Eis wurde die Suspension für 20 Minuten bei 4°C und 14000RPM zentrifugiert. Der Überstand, der nun die Proteine der Zellen enthält wurde in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und das Pellet bestehend aus Zellresten verworfen.

3.2.1.6 Aktivitätsassay

Die Aktivitätsassays wurden alle von [REDACTED] FS (Institut für Biochemie, Unit for Degradomics of the Protease Web, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Deutschland) im Rahmen der Kollaboration der Arbeitsgruppen durchgeführt. Da die Ergebnisse der Aktivitätsassays zum besseren Verständnis Teil dieser Dissertation sind wird im Folgenden auf Methode die Methode eingegangen.

Um die Aktivität von Mep1a zu messen, wurde ein Substrat (P4-Substrat: (mca)-HVANDPIW-(dnp)), welches proteolytisch von Mep1a gespalten wird, mit einem Fluorophor (dnp = 2,4-dinitrophenyl) und einem Quencher (mca = (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl) versehen. Der Quencher sorgt dafür, dass so lange das Fluorophor in räumlicher Nähe, also das Peptid zusammenhängt, zum Quencher ist es kein Signal abgibt. Erst wenn das Peptid proteolytisch gespalten wird, kann ein Fluoreszenzsignal detektiert werden und so die Aktivität des Mep1a quantifiziert werden. (Abbildung 7). Für die Durchführung wird zunächst eine in 3.2.1.2. beschriebene transiente Transfektion mit Mep1a und eine anschließende Zell Lyse (3.2.1.5.) durchgeführt bzw. die Zellemembran und der Überstand isoliert. Zuerst werden die Proben in PBS verdünnt. PBS dient hier als Puffer. Nun wird die Probe mit Trypsin aktiviert und anschließend das P4-Substrat hinzugefügt. Die Messung wird

anschließend im Tecan Spark multimode microplate durchgeführt. Extinktion bei 320 nm und Emission bei 405 nm werden alle 30 Sekunden gemessen (120 Minuten bei 37°C). Die Steigung der Fluoreszenzintensität im linearen Bereich wird bestimmt, nachdem alle Proben auf Leerkontrolle mit PBS normiert wurden. Diese Steigung korrespondiert mit der Aktivität von Meprin α in Δ RFU/min.

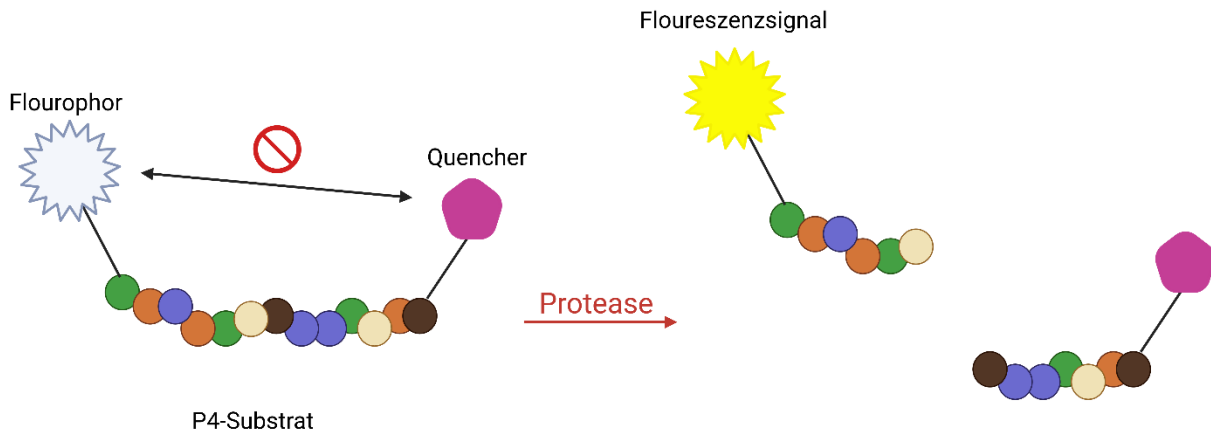


Abbildung 7: Prinzip des Aktivitätsassays

Zur Bestimmung der Meprin α Aktivität wurden die verschiedenen Proben (Lysat, Zellmembran und Überstand) verwendet. Als Substrat diente ein spezifisches, fluorogenes Peptid (P4-Substrat). Die Fluoreszenz wurde bei 37 °c über einen Zeitraum von 120 Minuten alle 30 Sekunden mittels Spektrophotometrie gemessen. Für die Auswertung wurden die Steigungen aus identischen linearen Abschnitten der Reaktionskurven herangezogen und miteinander verglichen. (Erstellt mit <https://BioRender.com>)

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Protein-Konzentrationsbestimmung der eukaryotischen Zellen erfolgte mittels eines BCA Mikrotiterplatten Proteinassays. Dafür wurden 5 μ l der in 3.2.1.5. gewonnenen Proben und eine, in der Abbildung gezeigten Standardreihe mit 1ml einer BCA-Lösung 30 Minuten bei 60°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die optische Dichte mit einem Doppelansatz bei einer Wellenlänge von 560 nm ermittelt und daraus ein Mittelwert erstellt. Die Proteinkonzentration der Proben kann mithilfe der Standardreihe berechnet werden.

	H ₂ O (µl)	BSA Standard 1 mg/ml
1	50	0
2	45	5
3	40	10
4	35	15
5	30	20
6	25	25

Tabelle 12: Protein-Konzentrationsbestimmung

3.2.2.2 SDS-Page und Western Blot

3.2.2.2.1 SDS-Page allgemein

Eine SDS-Page (Abkürzung für Sodium dodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis) wird benötigt, um die Proteine der verschiedenen Proben (bEnd.3 und HEK 293 T Zell Lysate) zu untersuchen. Nach einer vorherigen Denaturierung wurden die Proteine gemäß ihrer molekularen Masse in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt. Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden durch Erhitzen und Versetzen mit Probenpuffern unterbunden, was die Auftrennung allein nach Molekülmasse behindert hätte. Ein Bestandteil des Probenpuffers war Mercaptoethanol, welches in der Lage ist, die Disulfidbrücken zu verringern. Außerdem bestand das Puffer aus dem stark negative geladene Detergens Natriumdodecylsulfat (auch SDS genannt), dass die Eigenladung der Proteine überdeckte und sie gleichmäßig negativ machte. Aufgrund ihres Molekulargewichts konnten die Proteine nun durch den Aufbau eines eindimensionalen elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Das Trennmedium war ein Gel aus Polyacrylamid. Der Grad der Vernetzung der Bausteine und somit die Trennfähigkeit des Gels wurde durch den Polyacrylamidgehalt bestimmt. Große Proteine wurden abgebremst, während kleinere Proteine schneller und somit weiter im Gel wanderten. Dieses Prinzip besagt, dass kleinere Proteine besser auf trennbar sind, je höher der Acrylamidanteil ist und umgekehrt. Die hier verwendeten diskontinuierlichen Gelsysteme bestanden aus zwei Komponenten: einem engporigen Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung stattfand, und einem großporigen Sammelgel, auf das die Proteine aufgetragen wurden.

3.2.2.2.2 Probenvorbereitung und Beladen der Gele

Die Taschen der Gele wurden mit 20 µl eines Proteingemisches beladen. Hierfür wurde die gewünschte Menge Protein (15-25 µg) mit dem 4x Roati Load versehen in

einem Eppendorf-Reaktionsgefäß. Von dem 4x Roati Load wurden bei einer Gesamtmenge von 20 µl nun 5 µl verwendet. Anschließend wurde bis 20 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Zur Denaturierung der Proteine wurde das Gemisch bevor das Gel beladen wird, noch bei 95°C auf einem Schüttler gemixt. Nach Abkühlung wurden die Taschen dann befüllt.

3.2.2.2.3 Elektrophorese Bedingungen

Nach Anschluss der Kathode und Anode an die Spannungsquelle, wurde bis die Proben zum Trenngel gelangten eine Spannung von 70 V eingestellt. Anschließend wurde die Spannung 120 V erhöht. Nun wurde gewartet, bis die Proben das Ende des Gels erreichten. Dies dauerte zwischen 45-75 Minuten.

3.2.2.2.4 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran

Um die aufgetrennten Proteine quantifizieren zu können, muss im Anschluss eine Western Blot Analyse durchgeführt werden. Dafür muss man die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies geschieht in einer Blotting Kammer, bei der ein elektrisches Feld senkrecht zur Membran aufgebaut wird. Zunächst wird diese Membran mit 2 Filterpapieren in das Blotting Puffer getaucht und anschließend zusammen mit dem Gel in eine Blotting Kammer gelegt. Der Transfer der Proteine findet nun über einer konstanten Spannung von 85 V auf Eis statt, um eine Überwärmung der Kammer zu verhindern. Bei diesem Prozess bleiben die Proteine an der Membran aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen haften. Außerdem wird das SDS hierbei ausgewaschen und die Proteine bekommen so wieder ihre vorherige Ladung und können ihre sekundär und tertiär Struktur wieder einnehmen. Dies ermöglicht im Anschluss eine spezifische Antikörper Detektion.

3.2.2.2.5 Anfärben der Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S

Im Anschluss an den Proteintransfer überprüft man, ob dieser funktioniert, hat mit Hilfe von Ponceau S. Ponceau S färbt alle auf der Membran befindlichen Proteine nach 2-3 Minuten Inkubationszeit rötlich an. Nun kann die Membran zurechtgeschnitten werden. Anschließend wird durch wiederholtes Waschen mit 1 TBS/T der Farbstoff entfernt.

3.2.2.2.6 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Im Anschluss an die Ponceau S Färbung wurde die Membran in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS/T für eine Stunde inkubiert. Das Milchprotein sorgt dafür das potenzielle Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, und so die spezifischen Antikörper auch nur an der richtigen Stelle spezifisch binden.

3.2.2.2.7 Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

Nach der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen, wurde der gewünschte Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Durch 3-maliges Waschen mit TBS/T am nächsten Tag wurden unspezifische Bindungen gelöst. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper, der für den chemilumineszenten Nachweis von Proteinen mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase verbunden ist, neu angesetzt und über die Membran gegeben. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde auf dem Schüttler für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurden zwei zusätzliche Waschschrte mit TBS-T für jeweils zehn Minuten und ein letzter Waschschrte mit TBS für zehn Minuten durchgeführt. Die Analyse des Proteingehalts erfolgt mithilfe einer Chemilumineszenz-Methode. Eine Meerrettichperoxidase-Substrat-Peroxid-Lösung wird mit der gleichen Menge an HRP-Substrat gemischt und auf die Membran aufgetragen, damit sie vollständig bedeckt ist. Danach war es möglich, die Aufnahme mit dem "ChemiDoc Imaging System" durchzuführen.

3.2.2.2.8 Quantifizierung der Bandenintensität

Das Programm ImageJ wurde verwendet, um die Signalstärkeunterschiede der verschiedenen aufgetragenen Proben auszuwerten und zu quantifizieren. Dieses Programm misst die dunklen Pixel der Proteinbanden im Vergleich zu einem vorgegebenen Hintergrund. Folglich wurden die Banden Intensitäten in eine bestimmte Anzahl von Bildpunkten umgewandelt. Um den Vergleich zwischen den verschiedenen Proben zu ermöglichen, wurde stets dieselbe Menge an Protein auf ein Gel aufgetragen. Außerdem wurde eine Normalisierung auf das Strukturprotein β -Aktin durchgeführt, welches von allen Zellen gleich stark exprimiert wird. Wie bereits

erwähnt, wurde die Membran nach der Ponceau Färbung mithilfe eines Größenmarkes in verschiedene Teile geschnitten, um die Schnitte mit verschiedenen Antikörpern zu inkubieren und anschließend durch Immunodetektion zu analysieren. Für die Analyse wurden die Banden der Kontrollproben auf hundert Prozent gesetzt und die entsprechenden Partnerproben in Beziehung gesetzt.

3.2.3 Generelle Methoden zur Arbeit mit DNA

3.2.3.1 Agarose-Gel gießen

Um DNA der Länge nach aufzutrennen, wird ein Agarose-Gel verwendet. Hierfür wird 1x TAE-Puffer mit Agarose unter Erhitzen gemischt, bis die Agarose sich vollständig gelöst hat. Anschließend wird damit eine horizontale Gelkammer befüllt und mit Ethidiumbromid versetzt. Außerdem wird ein Taschenkamm in der Nähe des Minuspols eingesetzt und nach Trocknen des Gels wieder entfernt, um so Taschen zu generieren, die nun mit unserer aufzutrennenden DNA befüllt werden können.

3.2.3.2 Auftrennung von Plasmid-DNA in einem Agarose-Gel

Nach Herstellung des oben beschriebenen Gels wird nun eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um die DNA ihrer Größe nach aufzutrennen. Die Taschen wurden mit den DNA-Proben befüllt, nachdem diese mit 6x Ladepuffer versetzt wurden. Als Marker fungierte eine 1 kb DNA-Leiter. Anschließend wurde die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde unter 120 V für 40 Minuten durchgeführt. Die Auswertung fand mit Hilfe des „Intas Gel Imager“ statt.

3.2.3.3 Klonierung des Mep1a-Gens in den Expressionsvektor pLBCX

3.2.3.3.1 Allgemein zu den Methoden

Die nachfolgenden Methoden dienen dem besseren Verständnis der Vorgehensweise der in 3.2.3.1. beschriebenen stabilen Transfektion und der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse. Um eine stabile Transfektion zu ermöglichen, benötigt man einen Expressionsvektor, der ein für die spätere Selektion wichtiges Selektionsgen trägt. In meinem Fall war dies der Vektor pLBCX. Allerdings enthielt dieser pLBCX Vektor nicht das Gen für mep1a. Die folgenden Methoden zielten darauf ab, das Meß1a-Gen,

welches in einem anderen Vektor vorhanden war (pcDNA4_mep1a), in den pLBCX-Vektor zu klonen.

3.2.3.3.2 Restriktion des Expressionsvektors pLBCX

Zuerst muss man den Expressionsvektor verdauen. Das bedeutet, dass man mit Hilfe von Restriktionsenzymen einen kleinen Teil DNA aus dem Plasmid entfernt. Die hier verwendeten Restriktionsenzyme waren Clal und Bgl2. Ein Teil der Sequenz der Enzyme wurde auch bei den selbst hergestellten Primern, die in der PCR-Amplifikation des Mep1a-Gens verwendet wurden, eingebaut. So gelang es in der Ligation die beiden Enden später zu verbinden. Um eine Religation des verdauten pLBCX-Vektors zu verhindern, wurden die generierten 5'-Enden mit "Calf Intestinal Phosphatase" (CIP) dephosphoryliert. Die Restriktion wurde wie folgt ausgeführt.

Komponenten	25 µl Reaktion	Endkonzentration
Nuclease-freies Wasser	Bis 25 µl	
10X CutSmart Buffer	2,5 µl	1x
Plasmid DNA (0,76µg/µl)	2,63 µl	2 µg
Clal	2 µl	20 Einheiten/ug DNA
Bgl2	2 µl	20 Einheiten/ug DNA
CIP	1.25 µl	2 Einheiten

Tabelle 13: Restriktion des Expressionsvektors pLBCX

Die Plasmid-DNA, wurde mit Puffer (10x CutSmart Buffer), den entsprechenden Restriktionsenzymen und der CIP in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und mit dH2O auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Danach wurde der Restriktionsansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

3.2.3.3.3 PCR-Amplifikation

Die Amplifikation des pcDNA4_mep1a Vektors erfolgte durch PCR ("Polymerase chain reaction"). Dem folgendem Schema ist die Durchführung zu entnehmen. Die Reaktion fand auf Eis und in einem Mikroreaktionsgefäß statt.

Komponenten	50 µl Reaktion	Endkonzentration
Nuklease-freies Wasser	Bis 50 µl	
5x Phusion HF Puffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	200 µM
10 µM BGL2 fwd	2,5 µl	0,5 µM
10 µM New_CIAL-Primer	2,5 µl	0,5 µM
Template DNA (2µg/µl)	2 µl (einer 0,35 µl 1:100 Verdünnung)	7 ng
DMSO	1,5 µl	3%
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	1 Einheit/50 µl PCR

Tabelle 14: Komponenten PCR-Amplifikation

In der kommenden Tabelle sind die Kondition für die einzelnen Zyklen im Thermocycler gezeigt.

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	98°C	30 Sekunden
30 Zyklen	98°C	10 Sekunden
	70°C*	20 Sekunden
	72°C	20 Sekunden pro kb
Elongation	72°C	7 Minuten
Pause	4-10°C	

Tabelle 15: PCR-Amplifikation (Konditionen im Thermocycler)

*Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach dem verwendeten Primer

3.2.3.3.4 Ligation

Bei der Ligation wurden nun die beiden hergestellten Produkte miteinander zu einem Vektor verbunden. Zum einen der verdaute pLBCX Vektor, welcher durch die CIP linearisiert vorliegt und zum anderen das amplifizierte Mpe1a_Gen. Die Reaktion wurde auf Eis wie folgt durchgeführt.

Komponenten	20 µl Reaktion
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	2 µl
Vektor DNA pLBCX	50 ng
Insert DNA Mep1a	66,82 ng (Verhältnis 1:3)
Nuklease-freies Wasser	bis 20 µl
T4-DNA Ligase	1 µl

Tabelle 16: Komponenten der Ligation

3.2.3.4 Sequenzierung

Ein Sequenzierungsansatz bestand aus 600 ng DNA und 10 µM des zugehörigen Primers. Der Ansatz wurde daraufhin mit dH₂O auf 7 µl aufgefüllt. Durchgeführt wurde die Sequenzierung im Anschluss von der StarSEQ GmbH an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

3.2.3.5 DNA-Sequenzalignment

DNA-Sequenzalignments wurden mit Hilfe des Programms „Basic Alignment Search Tool (BLAST)“ durchgeführt.

3.2.4 Mikrobiologische Methoden

3.2.4.1 Agarplatten gießen

Es wurden Agarplatten verwendet, um transformierte E.coli zu kultivieren. In der Mikrowelle wurden 300 ml LB-Medium mit Agar erhitzt, bis das Medium flüssig wurde. Nachdem es auf 55°C abkühlte, wurde Ampicillin (100 g/ml) in das flüssige Medium

hinzugefügt und schnell in Selektionsplatten gegossen. Nun wurde gewartet, bis das flüssige Medium trocken und fest war. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte bei 4°C.

3.2.4.2 Transformation von Bakterien

Eine Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA wurde durchgeführt, um die Plasmid-DNA anschließend zu vervielfältigen. Um dies zu erreichen, wurde E.coli-Bakterien aus dem -80°C Gefrierschrank genommen und für zehn Minuten auf Eis gehalten. Im Anschluss wurden 100 ng DNA dazu gegeben. Die Bakterien und die DNA wurden durch kurzes Schnicken miteinander vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für die DNA-Aufnahme einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Nach einer weiteren 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde die E.coli-Bakterien in 950 µl NEB 10-beta/Stabilisierungsmedium in einem Schüttler für 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Daraufhin können 50-100 Milliliter der Bakterien auf vorgewärmten Selektionsplatten ausgestrichen werden und bei 37°C inkubiert werden. Nach 14-20 Stunden sind sichtbare Kolonien auf der Platte gewachsen.

3.2.4.3 Preparation von Plasmid-DNA

Um eine Bakterienkultur anzupflanzen, wurde eine einzelne Kolonie, die auf den Selektionsplatten gewachsen war (in 3.2.4.2. beschrieben), mit einer Pipettenspitze gepickt und in ein Röhrchen mit 4 ml LB-Medium, das mit Ampicillin (100 g/ml) versetzt war, gegeben. Die Röhrchen wurden über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 µl dieser Bakterienkultur in einen Kolben mit 150ml LB-Medium, das mit Ampicillin (100 g/ml) verdünnt wurde, transferiert. Es folgte eine weitere Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler. Danach wurde die Präparation der Plasmid-DNA mit dem "High Pure Plasmid Isolation kit" (hergestellt von Roche AppliedScience, Mannheim, Germany) durchgeführt. Im Anschluss konnte mit Hilfe des Nanodrop Gerätes die Konzentration der DNA bestimmt

3.2.5 Analysen und Statistiken

Die Graph Pad Prism 8 Software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) wurde verwendet, um alle statistischen Analysen und Graphen dieser Arbeit zu erzeugen. Ein ungepaarter t-Test wurde verwendet, um die Messwerte zu analysieren. Ein p-Wert unter 0,05 wurde hierbei als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung des pLBCX_mep1a_C Vektors

4.1.1 Klonierung von Mep1a in den pLBCX-Vektor

Für die Herstellung des pLBCX_mep1a_C-Vektors wurde zuerst die Mep1a-DNA Sequenz in den Vektor pLBCX kloniert. Hierfür wurde die DNA aus einem anderen Vektor mittels PCR vervielfältigt und der pLBCX-Vektor in einem doppelten Verdau durch die Restriktionsenzyme CIAL und Bgl2 geschnitten. Die Banden 1-4 in Abbildung 8 zeigen den doppelten Verdau des pLBCX-Vektors (5588 Basenpaare), in 5 und 6 kann man die gelungene PCR anhand der Bande auf Höhe der 2318 Basenpaaren großen Mep1a-DNA erkennen.

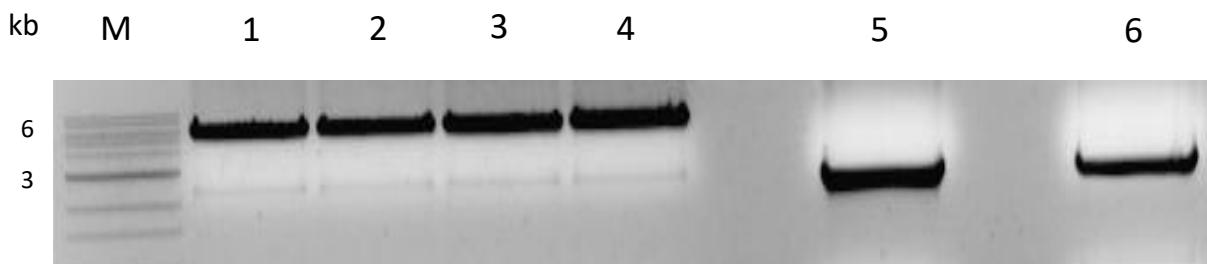


Abbildung 8: Validierung des doppelten Verdau und der PCR

Nach dem Verdau und der Vervielfältigung der mep1a DNA wurden die Ansätze auf ein 10% Agarose-Gel aufgetragen und nach ca. 40 Minuten unter Verwendung von UV-Licht ausgewertet. Als Molekulargewichtsmarker diente eine 1kb DNA-Leiter. Die Banden 1-4 zeigen den pLBCX-Vektor nach dem doppelten Verdau mit einer erwarteten Größe von 5588 Basenpaare (5,588 kb). Die Banden 5 und 6 zeigen die 2318 Basenpaare (2,318 kb) große Mep1a-DNA nach gelungener Vervielfältigung durch eine PCR.

Im Anschluss wurden die Ansätze durch eine Ligation verbunden wodurch der pLBCX_mep1a_C Klon entstand. Anschließend wurden E.coli DH5α Bakterien mit den Ligationsansätzen transformiert und anschließend auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die entstandenen Kolonien der Klone wurden am nächsten Tag von den Platten mit Hilfe einer Pipette entnommen und in LB-Medium angeimpft. Anschließend wurde die DNA mittels Mini-Präparation aufbereitet und durch einen doppelten Verdau abermals

Ergebnisse

überprüft. In der unten aufgeführten Abbildung zeigt sich in 1,5,6 nur eine Bande auf der Höhe des pLBCX-Vektors (5588 Basenpaare). Dies zeigt hier, dass die Mep1a DNA nicht aufgenommen wurde. In 2,3 und 4 zeigt sich nach dem doppelten Verdau durch die Restriktionsenzyme CIAL und Bgl2 eine weitere Bande auf Höhe des Mep1a DNA (2318 Basenpaare) welche als Bestätigung für die gelungene Klonierung stehen.

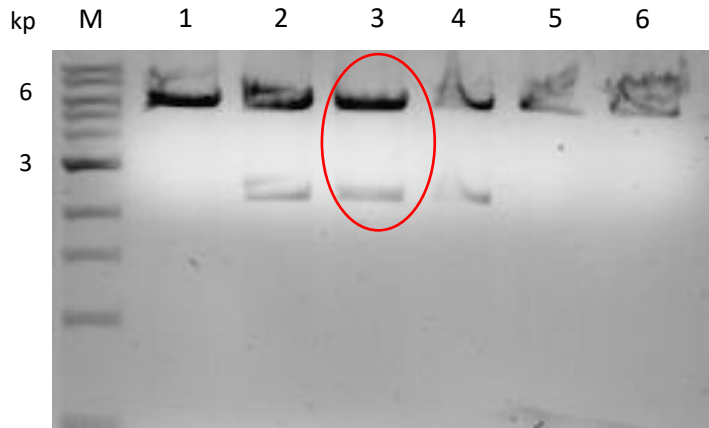


Abbildung 9: Validierung der Insertion des mep1a Konstruktes in den pLBCX Vektor

Zu sehen ist der doppelte Verdau der aufbereiteten Klon-DNA nach der Minipräparation. Nach Verdau wurden die Proben auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen und anschließend mit einer 1 kb DNA-Leiter, welche als molekularer Gewichtsmarker diente, ausgewertet.

Anschließend wurde die DNA aufgereinigt und daraufhin das entstandene Konstrukt via Sanger Sequenzierung auf die korrekte Anzahl und Abfolge der Basenpaare überprüft. Hierfür wurde der Ansatz 3, welcher in der obigen Abbildung rot markiert ist, verwendet.

4.1.2 Überprüfung der Expression durch transiente Transfektion von Hek 293T

Nach erfolgreicher Insertion und Aufbereitung des hergestellte pLBCX_mep1a_C Vektors wurden HEK 293T-Zellen mit dem Vektor transient transfiziert, um die richtige und vollständige Expression sicher zu stellen. Zur Kontrolle diente ein leerer pLBCX-Vektor. In den beiden Ansätzen der mit dem pLBCX_mep1a_C Vektor transfizierten Zellen konnten im Vergleich zu den Zellen mit dem leeren Vektor zwei separate Banden nach Detektion mit dem mep1a-Antikörper bei circa 100 kDa festgestellt werden. Somit konnte bestätigt werden, dass Mep1a in den transient transfizierten Zellen exprimiert wird und die Klonierung ebenfalls vollständig war.

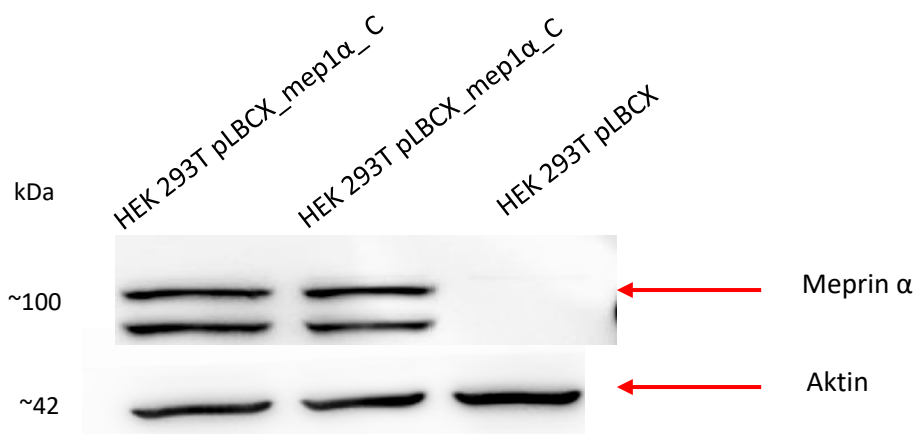


Abbildung 10: Validierung der Expression des pLBCX_mep1a_C Vektors in HEK 293T Zellen

Die HEK 293 T Zellen wurden in einem Doppelansatz mit pLBCX_mep1a_C und einfach mit einem leeren pLBCX Vektor zur Kontrolle transient transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion lysiert. Je 20 μ g der Zell Lysate wurden auf ein 10% Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit Anti-Mep1a Antikörper und Anti-Aktin Antikörper als Ladekontrolle inkubiert. „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (10-180 kDa) diente als Molekulargewichtsmarker.

4.2 Stabile Transfektion von pLBCX_mep1a_C in bEnd.3 Zellen

4.2.1 Überprüfung der Expression

Nach der Selektion und anschließendem Wachstum der Zellen wurde die Expression des Meprin α Enzymes überprüft. Hierfür wurde eine Lyse mit anschließender Gelelektrophorese und einem Western Blot durchgeführt. Zur Negativkontrolle diente eine mit dem pLBCX_GFP-Vektor stabil transfizierte bEnd.3 Zelllinie. Nach Inkubation mit dem Anti-mep1a Antikörper konnten bei den beiden Ansätzen aus der bEnd.3_pLBCX_mep1a_C Zelllinie im Gegensatz zu der Negativkontrolle zwei separate Banden auf Höhe circa 90 kDa detektiert werden. Somit wurde die Expression Meprin α in den bEnd.3_pLBCX_mep1a_C Zellen detektiert. Dabei liegt das Molekulargewicht in den stabil transfizierten bEnd.3 Zellen circa 10 kDa niedriger als in den transient transfizierten HEK 293T Zellen.

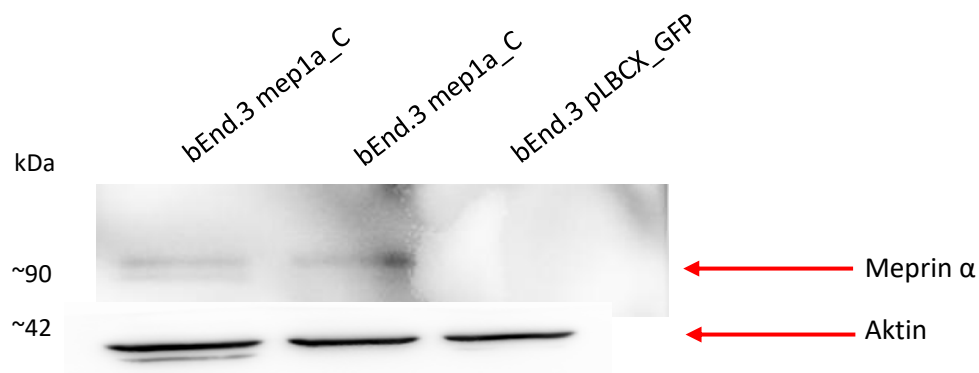


Abbildung 11: Überprüfung der Meprin α Expression in den stabil transfizierten bEnd3. Zellen

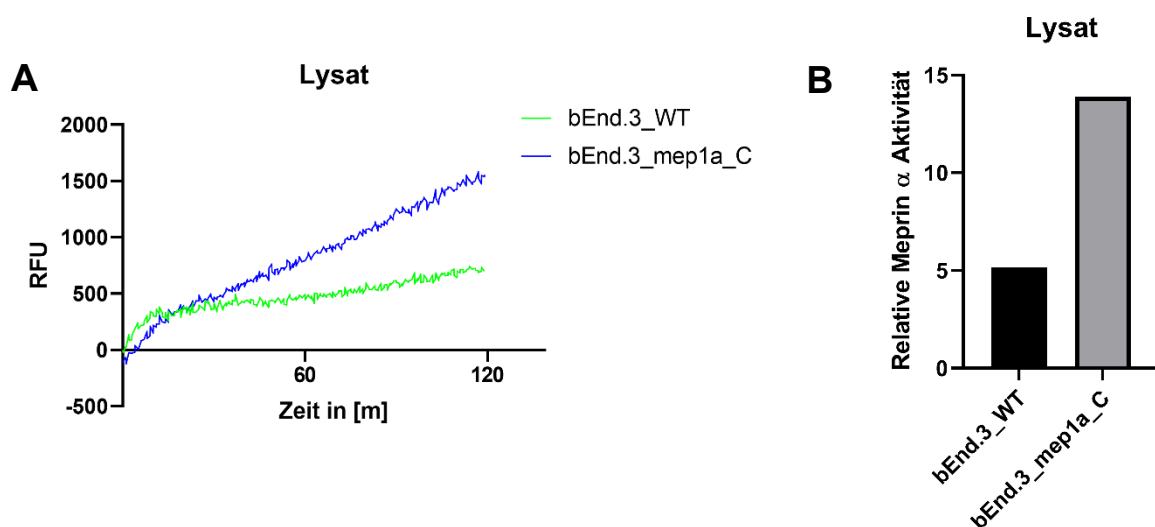
Es wurden 5×10^5 von bEnd.3_pLBCX_mep1a_C Zellen in einem Doppelansatz und eine Negativkontrolle der bEnd.3_pLBCX_GFP-Zelllinie einfach auf eine 6 cm Petrischale ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat lysiert. Je 25 μ g der Zell Lysate wurden auf ein 10% Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit Anti-Mep1a Antikörper und Anti-Aktin Antikörper als Ladekontrolle inkubiert. „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (10-180 kDa) diente als Molekulargewichtsmarker.

4.3 Aktivitätsmessung der stabil transfizierten bEnd.3-Zellen (bEnd.3_mep1a_C)

Die Aktivitätsassays wurden von ██████████ FS (Institut für Biochemie, Unit for Degradomics of the Protease Web, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Deutschland) im Rahmen der Kollaboration der Arbeitsgruppen durchgeführt. Da die Ergebnisse der Aktivitätsassays essenziell für diese Arbeit sind, sind sie im Folgenden aufgeführt. Die Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgten selbstständig.

Die Aktivität wurde auf der Zelloberfläche, im Überstand der Zellen und im Lysat der Zellen gemessen. Hierbei wurden die Aktivitäten Meprin α in bEnd.3_mep1a_C Zellen im Vergleich zu Wild Typ (WT) bEnd.3 Zellen (bEnd.3_WT), die als Kontrolle dienten, gemessen. Wie in den folgenden Graphen zu sehen, ist nur im Lysat eine vermehrte Aktivität Meprin α messbar gewesen (Abbildung 12: A, B). Hier ist die Meprin α Aktivität in den bEnd.3_mep1a_C Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen stark erhöht. Auf der Zelloberfläche und im Überstand wurde keine erhöhte Expression gezeigt (Abbildung 12: C-F). Mögliche Ursachen und Folgen werden in der Diskussion besprochen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den bEnd.3_mep1a_C Zellen, Meprin α nur innerhalb der Zelle aktiv ist. Dies ist für die folgenden Experimente wichtig zu beachten.



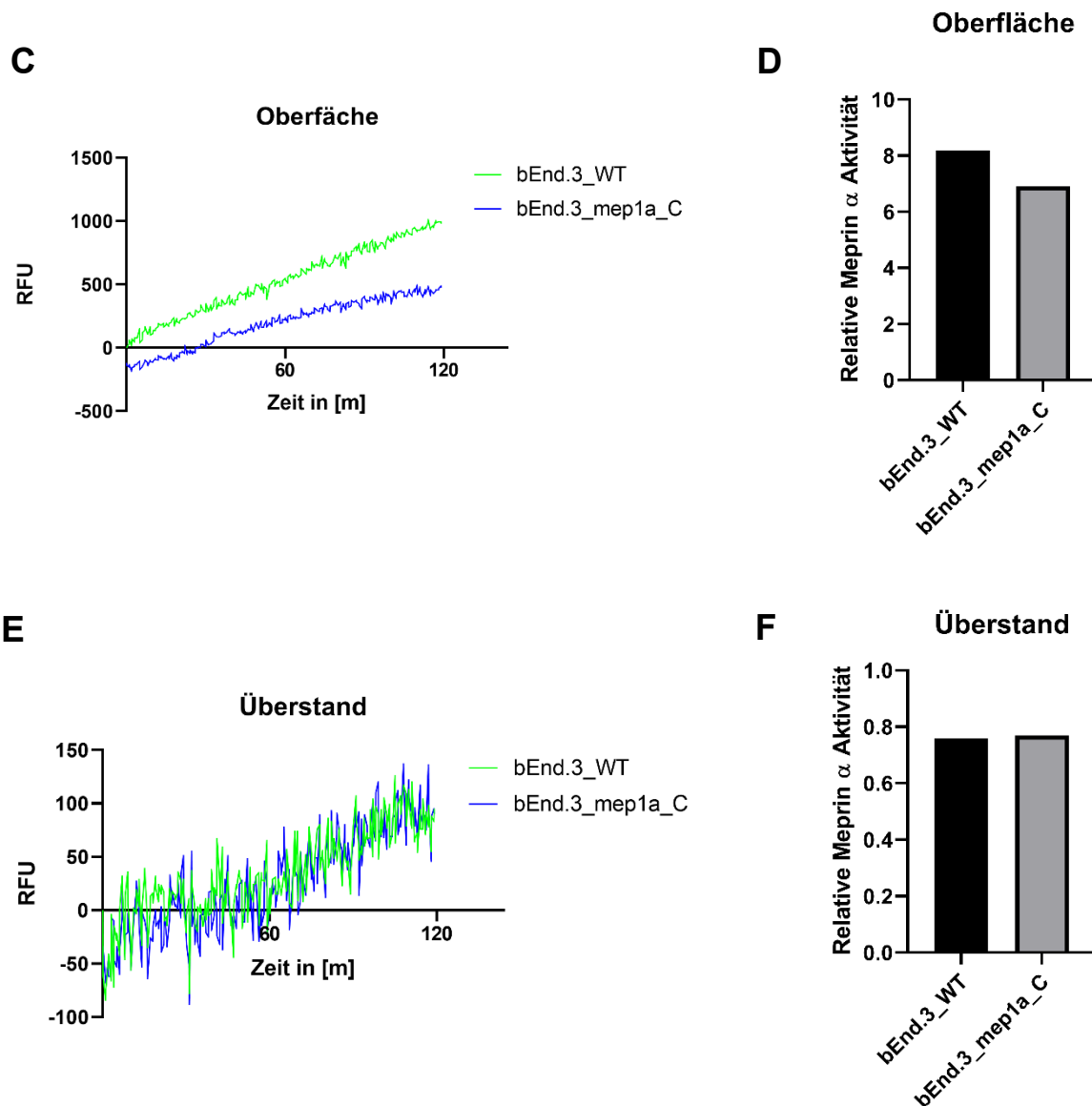


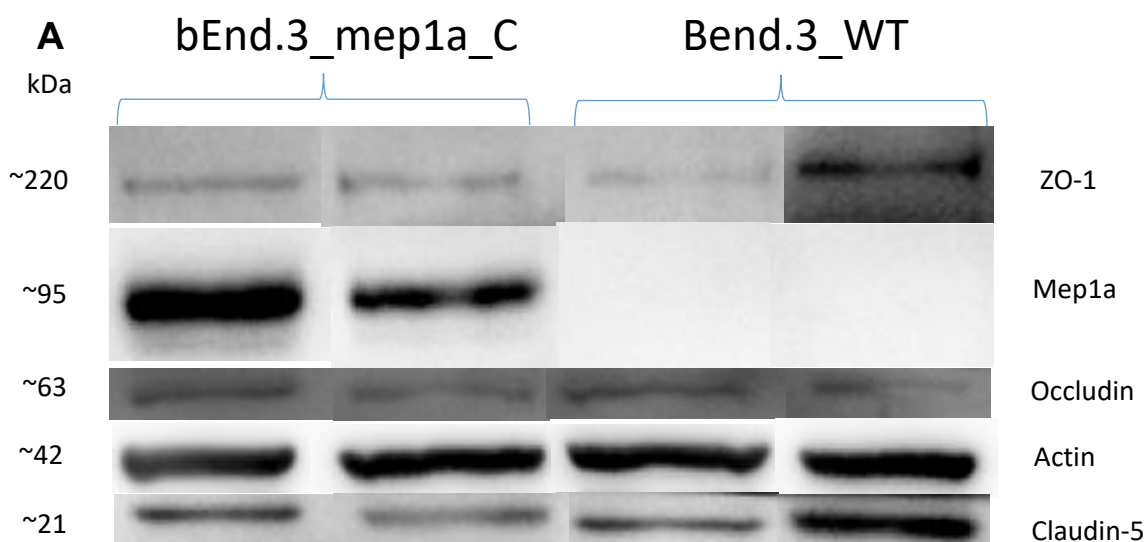
Abbildung 12: Aktivitätsmessungen der bEnd.3_mep1a_C Zellen

Gemessen wurden die Aktivitäten innerhalb der Zelle (A, B), auf der Zelloberfläche (C, D) und außerhalb der Zelle (E, F). Zu sehen ist jeweils in A, C, und E auf die Aktivität Meprin α zur Zeit in relativen Fluoreszenz Einheiten (RFU). Verglichen wurden hierbei die bEnd.3-mep1a_C Zellen mit Wild-Typ bEnd.3 Zellen (WT). Gemessen wurde alle 30 Sekunden über 2 Stunden. In den Graphen B, D und F wurde aus den dazugehörigen Aktivitätsgraphen (A, C, E) die Steigung berechnet, die mit der relativen Meprin α Aktivität gleich zusetzen ist. Somit sieht man in den Graphen auf der y-Achse die Relative Meprin α Aktivität und auf der x-Achse die beiden Zelllinien.

4.4 Analyse der TJ-Proteine innerhalb der bEnd.3_mep1a_C Zellen

Es ist bekannt, dass Meprin α in der Lage ist Zell-Adhäsion- und EZM-Proteine zu spalten. Außerdem wird es im Gehirn im Vergleich zu anderen Geweben verstärkt exprimiert. Weiter wurde in der Literatur Occludin als ein Substrat Meprin α deklariert (1,10-13). Deshalb wurde in dieser Arbeit überprüft, ob Meprin α in der Lage ist Occludin und weitere TJ-Proteine wie Claudin-5 und ZO-1 zu spalten. Dafür wurde eine Hirnendothelzelllinie hergestellt, welche selbst in der Lage ist, TJ-Proteine zu produzieren und Meprin α überexprimiert, die bEnd.3_mep1a_C Zellen. Die Aktivitätsmessungen ergaben eine erhöhte Aktivität von Meprin α innerhalb der Zelle nicht aber auf Zelloberfläche und außerhalb der Zelle. Verglichen wurden die Zellen mit einer bEnd.3 Zelllinie, die eine physiologische Expression der TJ-Proteine und des Meprin α widerspiegelt und so als wild Typ bEnd.3 Zellen als Kontrolle dienen.

Wie in der Abbildung 13 zu sehen, ergab sich in der Bestimmung der Proteine durch einen Immunoblot sowohl im Western Blot keine sichtbaren als auch in der quantitativen Bestimmung keine signifikanten Veränderungen in den Protein Leveln im Vergleich zu den bEnd.3_WT-Zellen.



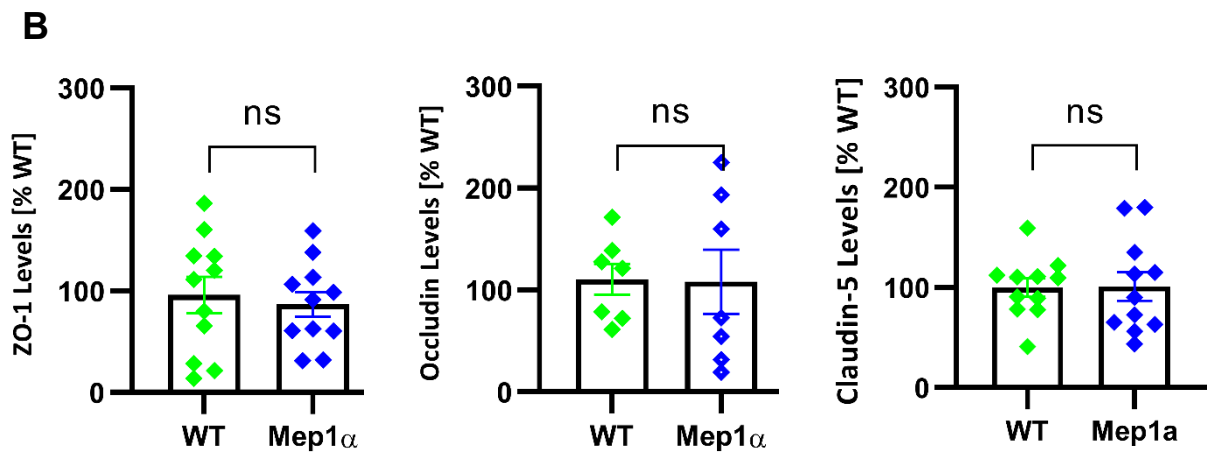


Abbildung 13: Analyse der TJ-Proteine innerhalb der bEnd.3_mep1a_C Zellen

A: Es wurden 5×10^5 von bEnd.3_pLBCX_mep1a_C Zellen und eine Kontrolle der bEnd.3_pLBCX_GFP-Zelllinie auf eine 6cm ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat lysiert. Je 25 μ g der Zell Lysate wurden in einem Doppelansatz auf ein 10% Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit Anti-Mep1a, Anti-ZO-1, Anti-Occludin und Anti-Claudin-5 Antikörper und Anti-Aktin Antikörper als Ladekontrolle inkubiert. „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (10-180kDa) diente als molekularer Gewichtsmarker. Der abgebildete Blot dient als repräsentatives Ergebnis der durchgeführten Blots. **B:** Die quantitative Bestimmung der Proteinlevel erfolgte im Anschluss an den Immunoblot durch eine densitometrische Bestimmung mit Hilfe des Programms ImageJ. Anschließend wurden die Werte der Kontrolle (bEnd.3_WT) als 100% gewertet und die jeweiligen Werte der bEnd.3_mep1a_C Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Daten sind mit Mittelwert \pm Standardabweichung in Dotplots aufgeführt. Zur Bestimmung der Proteinlevel wurden für Claudin n=11, für Occludin n=7 und für ZO-1 n=11 biologische Replikate benutzt. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte T-Test und als Signifikanzniveau $p < 0.05$ verwendet.

4.5 Analyse der Barriereintegrität der bEnd.3+Mep1a_C Zellen

4.5.1 TEER-Messung

Nachdem die bekannte Zelllinie auf mögliche Substrate bei den TJ untersucht wurde, wurde im Folgenden die Barriereintegrität untersucht. Dafür wurde wie unter 3.2.1.4.2. beschreiben eine *in vitro* BHS generiert, welche eine physiologische BHS simuliert, und mit Hilfe des Cellzscope Gerätes eine Impedanzspektroskopie zur Bestimmung der jeweiligen TEER-Werte durchgeführt. Ein hoher TEER-Wert spricht hier für eine hohe Dichtigkeit und niedrige Permeabilität.

Meprin α scheint in der Lage zu sein bestimmte EZM und TJ-Proteine schneiden zu können (10-13). Nachdem für die obige Zelllinie nur eine intrazelluläre Meprin α

Aktivität und kein Einfluss auf die TJ-Proteine festgestellt wurde, war es von großem Interesse zu sehen, wie sich Meprin α auf die gesamte Integrität der Barriere verhält und ob die Hypothese, dass Meprin α nur membrangebunden und außerhalb der Zelle in der Lage ist die Proteine schneiden zu können, befürwortet werden kann.

Nachdem die TEER-Werte der bEnd.3_mep1a_C Zellen und deren Kontrolle (bEnd.3_WT) über einen Tag beobachtet wurde, wurden die Werte nach 24h miteinander verglichen. Hierbei stellte sich ein hoher TEER-Wert für beide Gruppen ein, der so eine niedrige Permeabilität bestätigt (10-13). Weiter war, in der Abbildung 14 zusehen, kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen.

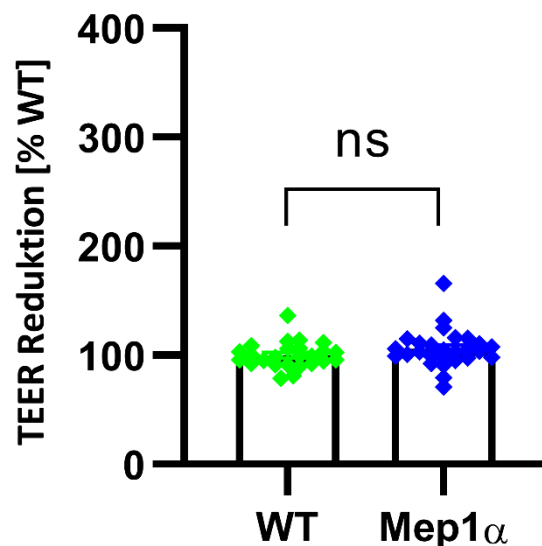


Abbildung 14: Bestimmung der TEER-Werte der bEnd.3mep1a_C Zellen

Nachdem die beiden Zelllinien auf Kulturschaleneinsätzen ausgesät wurden, wurden sie im CellZcope Gerät platziert. Nachdem die Kapazität bei ungefähr 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ lag wurden die TEER-Werte über 24 h beobachtet und anschließend nach verglichen. Hierbei wurden die Werte der Kontrolle (bEnd.3_WT) als 100% gewertet und die jeweiligen Werte der bEnd.3_mep1a_C Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Daten sind mit Mittelwert \pm Standardabweichung in Dotplots aufgeführt. Zur Bestimmung der TEER-Werte wurden für bEnd.3_mep1a_C Zellen $n=27$ und für die Kontrolle $n=25$ biologische Replikate benutzt. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte T-Test und als Signifikanzniveau $p < 0.05$ verwendet.

4.5.2 FITC-Dextran Assay

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Barriereintegrität stellte der FITC Dextran Assay dar. Das verwendete FITC-Dextran ist ein kleines hydrophiles Molekül, welches unter physiologischen Umständen nicht frei über die BHS diffundieren kann. Weiter spielt es unter physiologischen Bedingungen an der BHS keine Rolle und ist weder ein Ligand noch ein Substrat eines Rezeptors, Transporters oder Enzyms. Somit ist die Diffusion durch die BHS auf parazelluläre Durchlässigkeit zurückzuführen und eignet sich so zur Überprüfung der Integrität.

Nach Messung der Fluoreszenzintensitäten wurden die abluminalen Werte mit den luminalen Werten ins Verhältnis gesetzt und anschließend die bEnd.3_mep1a_C Zellen mit der Kontrollgruppe (bEnd.3_WT) verglichen. Hierbei kamen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede heraus.

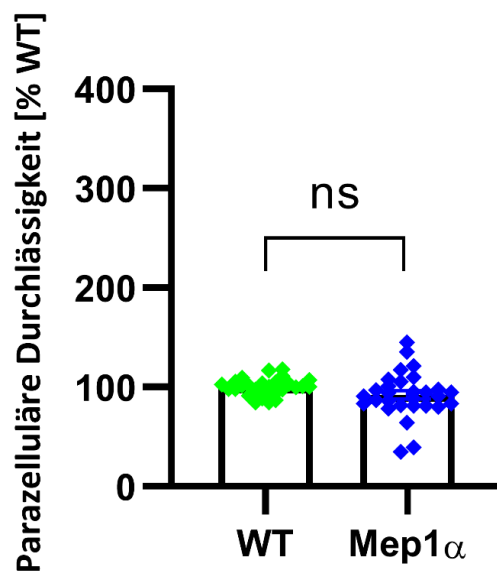


Abbildung 15: Messung der parazellulären Durchlässigkeit durch einen FITC-Dextran Assay

Nachdem die beiden Zelllinien auf Kulturschaleneinsätzen ausgesät wurden, wurden sie im CellZcope Gerät platziert. Nachdem die Kapazität bei ungefähr $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ lag wurden FITC-Dextran zu der luminalen Seite der *in vitro* BHS gegeben. Nach 2 Stunden wurden die Fluoreszenzintensitäten auf luminaler und abluminaler Seite mit Hilfe Varioskan LUX multimode microplate reader des gemessen, ins Verhältnis gesetzt und anschließend die beiden Gruppen miteinander verglichen. Hierbei wurden die Werte der Kontrolle (bEnd.3_WT) als 100% gewertet und die jeweiligen Werte der bEnd.3_mep1a_C Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Daten sind mit Mittelwert \pm Standardabweichung in Dotplots aufgeführt. Zur Bestimmung der parazellulären Durchlässigkeit wurden für bEnd.3_mep1a_C Zellen $n=29$ und für die Kontrolle $n=29$ biologische Replikate benutzt. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte T-Test und als Signifikanzniveau $p < 0.05$ verwendet.

5 Diskussion

5.1 Einordnung der Forschungsergebnisse

Die Metalloprotease Meprin α wird an der BHS unter physiologischen, als auch pathologischen Bedingungen exprimiert und ist dort in der Lage einige EZMP's und Bestandteile der BHS zu spalten (1). In dieser Arbeit wurden Mausendothelzellen (bEnd.3) mithilfe eines retroviralen Gentransfers mit Meprin α transfiziert. Anhand dieser neuen Zelllinie (bEnd.3_mep1a_C) wurden die Auswirkungen auf TJ-Proteine sowie die allgemeine Wirkung Meprin α s auf die BHS in einem *in vitro* Modell untersucht. Wie bereits unter 2.2 beschrieben, spielt Meprin α in verschiedenen Prozessen wie Inflammation, chronisch entzündlichen Krankheiten und neurodegenerativen Erkrankungen aufgrund seines Substratprofils eine wichtige Rolle. So wurde auch an der BHS bereits ein Einfluss Meprin α s nachgewiesen. Zum Beispiel fanden Bao und Kollegen (2013) in Permeabilitäts- und TEER-Messungen eine erhöhte Durchlässigkeit von Molekülen, die sonst nicht die BHS passieren, und einen verminderten Widerstand an einem *in vitro* BHS-Modell bei Überexpression Meprin α s im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (74). Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit in ähnlichen Versuchen nicht bestätigt werden. So konnten in dieser Studie weder in der TEER-Messung (4.5.1.) noch in einem FITC-Dextran-Assay (4.5.2.) Unterschiede zwischen der Meprin α überexprimierenden Zelllinie (bEnd.3_mep1a_C) und einer Kontrollgruppe (bEnd.3_WT) beobachtet werden. Bao konnte auch zeigen, dass das TJ Protein Occludin ein Substrat des Meprin α s ist und es dadurch seiner Funktion als Regulatorprotein der BHS nicht mehr nachgehen kann (74). Dies wurde in dieser Dissertation ebenfalls versucht durch eine Bestimmung der TJ-Proteine Claudin-5, Occludin und ZO-1 mittels eines Immunoblots zu bestätigen. Auch hier konnten keine signifikanten Beobachtungen zwischen der bEnd3-mep1a_C Zellen und den bEnd.3_WT-Zellen aufgezeigt werden.

Um dieser Diskrepanz der Ergebnisse in Literatur und dieser Studie nachzugehen, wurden die unter 4.3 gezeigten Aktivitätsmessungen durchgeführt. Hier ergab sich in den bEnd.3_mep1a_C lediglich innerhalb der Zelle eine signifikant erhöhte Aktivität Meprin α s im Vergleich zur Kontrolle. Membrangebunden und außerhalb der Zelle konnte keine erhöhte Aktivität des Enzymes nachgewiesen werden. Dies beweist, dass diese Zellen zwar Meprin α produzieren und dieses auch aktiviert wird, allerdings nicht in die Membran eingebracht bzw. über den sekretorischen Weg aus der Zelle

herausgelangen kann. Unter physiologischen Umständen unterliegt Meprin α vielen posttranslationalen Modifikationen durch zum Beispiel Phosphorylierung und Glykosylierung. Anschließend wird Meprin α durch Trypsin-ähnliche Proteasen aktiviert, um daraufhin membrangebunden zu wirken oder über den sekretorischen Weg aus der Zelle hinausbefördert zu werden (116-119,143,148). Dies konnte durch die Aktivitätsmessungen für die bEnd.3_mep1a_C Zellen nur bedingt bestätigt werden. In den bEnd.3_mep1a_C Zellen geschieht wohl eine intrazelluläre Aktivierung. Allerdings gibt es außerhalb der Zelle als auch membrangebunden keine vermehrte Aktivität. Wie bereits beschrieben, haben Studien gezeigt, dass Meprin α Auswirkungen auf die BHS bei *in vitro* Versuchen hat. In den hier durchgeführten Experimenten konnte dies nicht bestätigt werden. Allerdings war in der hier verwendeten Zelllinie Meprin α lediglich intrazellulär vermehrt aktiv. Dies lässt den Entschluss zu, dass die intrazelluläre Aktivität Meprin α s keine Auswirkungen auf die Integrität der BHS und die TJ-Proteine hat. Die Effekte einer Meprin α Überexpression *in vitro* müssen also membrangebunden oder außerhalb der Zelle geschehen. Zudem muss weiter diskutiert werden, warum in den Aktivitätsmessungen keine weitere Aktivität messbar war und welche Prozesse innerhalb oder außerhalb der Zelle zur Unterbindung der Aktivität Meprin α s an der Membran und außerhalb geführt haben.

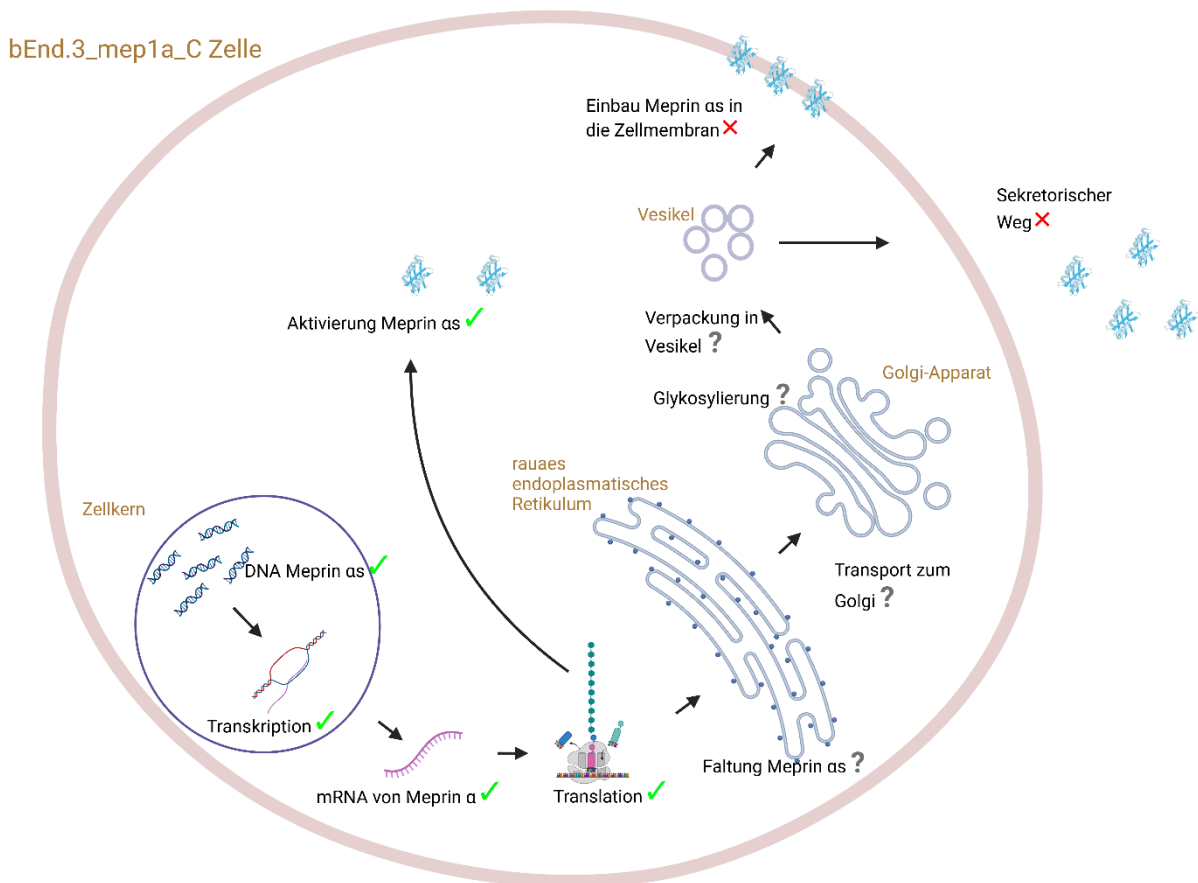


Abbildung 16: Expressionsweg Meprin α innerhalb der bEnd.3_mep1a_C Zellen

Die Abbildung zeigt den Expressionsweg Meprin α innerhalb der bEnd.3_mep1a_C Zellen. Angefangen im Zellkern mit der DNA Meprin α und der Transkription bis hin zum Einbau in die Membran bzw. dem sekretorischen Weg. Die „grünen Haken“ hinter den Stationen bedeuten, dass dieser Schritt vermeintlich innerhalb der Zelllinie funktioniert. Die grau dargestellten „?“ deuten darauf hin, dass dieser Prozess vermutlich nicht den physiologischen Gegebenheiten entspricht. Dies könnte dazu führen, dass der sekretorische Weg sowie der Einbau in die Membran gestört sind. Entsprechend ist dieser Schritt mit einem roten „X“ gekennzeichnet, das auf eine mögliche Fehlfunktion hinweist. Darauf lässt sich aufgrund der lediglich intrazellulären Aktivität in 4.3., und der nicht vorhandenen membrangebundenen und extrazellulären Aktivität, schließen. Mögliche Ursachen hierfür werden unter 5.2. diskutiert. (Erstellt mit <https://BioRender.com>)

5.2 Potenzielle Fehler und veränderte Mechanismen in den bEnd.3_mep1a_C Zellen

Zuerst ist es wichtig Fehler bei den Aktivitätsmessungen selbst auszuschließen. Hierfür wurden die Experimente wiederholt, Protokolle noch einmal überarbeitet und Störfaktoren ausgeschlossen, um so valide Ergebnisse zu generieren. Daran schließt sich nun also die Frage an, weshalb in den transfizierten Zellen Meprin α lediglich intrazellulär aktiv ist. Dadurch, dass der retrovirale Gentransfer sehr anfällig für Fehler ist und Meprin α sehr vielen posttranslationalen Modifikationen unterliegt, können hierbei einige Prozesse innerhalb der Zelle betroffen sein, die zu den beobachteten Resultaten führen.

Allgemein könnte die Zelle durch den Gentransfer oder andere Einflussfaktoren unter Stress stehen und es dadurch zu gestörten Abläufen innerhalb und außerhalb der Zelle kommen. Intrazellulär könnten auch veränderte Glykosylierungs-Effekte eine Rolle spielen. Dafür sprechen die durchgeführten Experimente 4.1.2. und 4.2.1. In den HEK-Zellen wurden die zwei separaten Banden von Meprin α im Western Blot bei ungefähr 100 kDa gemessen. In den transfizierten bEnd.3_mep1a_C Zellen hingegen wurden die zwei separaten Banden von Meprin α bei ungefähr 90 kDa, also 10 kDa geringer als in den HEK-Zellen detektiert. Dies kann auf eine unterschiedliche Glykosylierung hindeuten. In der Literatur ist beschrieben, dass das Glykangerüst Auswirkungen auf

die Stabilität, Lokalisation und die Aktivität des Enzyms nehmen kann (176). So könnte es also sein, dass durch beschriebene Prozesse Meprin α innerhalb der Zelle falsch lokalisiert ist und weiter nicht an die Membran transportiert bzw. in sekretorische Vesikel verpackt werden kann, um aus der Zelle transportiert zu werden. Dies könnte eine Erklärung für die intrazelluläre Aktivität sein. Hier könnten Immunfluoreszenzexperimente zur genauen Lokalisation Meprin α s im Vergleich zu WT-Zellen Aufschluss geben. Durch beschriebene Prozesse könnte es auch zur Instabilität des Enzyms kommen, sodass Meprin α zwar aus der Zelle gelangt, aufgrund seiner Instabilität aber sehr schnell abgebaut wird und somit keine vermehrte Meprin α Aktivität an der Membran oder außerhalb gemessen werden kann.

Weiter in Betracht zu ziehen ist ein eventuell verstärkter intrazellulärer und extrazellulärer Abbau durch eine erhöhte Aktivität einer Protease, die in der Lage ist, Meprin α zu proteolysieren (8). Hierfür in Frage kommen, könnte die Protease Furin, die unter physiologischen Gegebenheiten Meprin α aktiviert und von der Zellmembran in den Extrazellulärraum spaltet (157). Bei Überexpression Meprin α s hingegen könnte eine vermehrte Spaltung Meprin α s durch Furin, zur Instabilisierung des Enzyms beitragen. Durch die Überexpression, die wie in 4.2.1. beschrieben in den verwendeten Zellen (bEnd.3_mep1a_C) vorliegt, und fehlerhafte Glykosylierung, könnte auch eine Autoproteolyse von Meprin α selbst geschehen. Dies ist für Meprin α bisher noch nicht beschrieben, allerdings gibt es andere Proteasen, wie Procerain und Procerain B, die aufgrund struktureller Veränderungen, durch Änderung der Umgebung, zur Autoproteolyse neigen (177). Durch Überprüfung einer Autoproteolyse und Veränderung der Umgebung der Zellen könnte man so eventuell Unterschiede in der Aktivität Meprin α s erkennen. Zur Überprüfung, ob eine vermehrte Protease Aktivität vorliegt, könnten Versuche durchgeführt werden, bei denen Proteaseinhibitoren auf die Zellen gegeben werden und anschließend die Experimente aus dieser Dissertation wiederholt werden. Hierbei könnten eventuelle Effekte Meprin α s auf die *in vitro* BHS festgestellt werden, wie sie auch in der Literatur beschrieben sind.

Umgekehrt haben Proteaseinhibitoren die Funktion, die Zellen vor vermehrter Proteaseaktivität zu schützen. Diese Funktion ist unter physiologischen Bedingungen, entscheidend für den Erhalt der Zelle. In verschiedenen Pathologien, wie zum Beispiel, entzündlichen oder degenerativen Prozessen, kann diese Funktion aufgrund von Aktivierung verschiedener Entzündungsmediatoren die Unterdrückung der Protease Funktionen nicht mehr gewährleisten. So kommt es dann zu einer verstärkten Aktivität

und zum Abbau von Proteinen (6,135,158-159). Weiter ist beschrieben, dass Meprin α in solche Prozesse verwickelt ist (135,6). Somit wäre es sehr interessant zu beobachten, wie sich die verwendete Zelllinie in entzündlichem Milieu verändert und, ob sich die Aktivität Meprin α s unterscheidet bzw. ob Veränderung an der Integrität der BHS nachzuweisen sind. Dies kann durch Inkubation der Zellkultur mit Entzündungsmediatoren, wie Zytokinen simuliert werden. Im Anschluss sollten wiederholende Experimente, wie in dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt werden. Dies könnte helfen Meprin α und dessen Wirkungsweise besser zu verstehen und anhand neu gewonnener Kenntnisse die Forschung intensivieren.

Eine weitere Möglichkeit ist eine verstärkte Endozytose des Meprin α s. Hierbei würde der sekretorische Weg physiologisch funktionieren. Anschließend würde durch vermehrten Einbau eines Endozytoseliganden, der in der Lage ist, Meprin α in die Zelle zu befördern, Meprin α in die Zelle transportiert werden. Ein vergleichbares Prinzip zeigt sich bei der Liganden induzierten Endozytose des asialoglycoprotein-Rezeptors in Hepatozyten. Hier steigert sich die Endozytoserate nach Ligandenbindung signifikant (178). Hierbei könnten ebenfalls bei Experimenten mit einem solchen Ligandeninhibitor Effekte auf die BHS sichtbar werden.

Auch Meprin β spielt bei dem Transport des Meprin α s und dessen Einbau in die Membran eine Rolle. Oft liegen beide als Heterodimere in der Zellmembran vor (1). Hier könnten Quantifizierungen mittels Immunoblot sowie Co-Transfektionen mit Meprin α interessante Aufschlüsse über die Rolle Meprin β auf die Lokalisation und Aktivität Meprin α s geben.

5.3 Auswirkungen der Dysregulation der BHS auf verschiedene Erkrankungen

Die BHS stellt als hochselektive Barriere nicht nur einen Schutzmechanismus für das Gehirn dar, sondern spielt wie bereits beschrieben auch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese vieler neurologischer Erkrankungen. Meprin α fungiert dabei offensichtlich als ein molekularer Mediator, der durch seine proteolytische Aktivität die Integrität der BHS beeinflusst und so an der Entstehung entzündlicher sowie neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Multipler Sklerose beteiligt ist (1).

Bei der Alzheimer-Erkrankung kommt es bereits im frühen Krankheitsstadium zu charakteristischen Veränderungen der BHS. Klinische Studien zeigen auf, dass Patienten eine erhöhte Permeabilität der BHS aufwiesen, die mit der Akkumulation von Amyloid- β Plaques und neuroinflammatorischen Prozessen korreliert (160). Weiter wurde in post-mortem Untersuchungen eine erhöhte Expression Meprin α in den Endothelzellen von Alzheimer Patienten nachgewiesen (160). Dies legt nahe, dass die Protease durch den Abbau von TJ-Proteinen wie Occludin und weiteren EZMP die Barrierefunktion schwächt. Unterstützt wird die Hypothese durch *in vitro* Studien, die zeigen, dass Meprin α in der Lage ist diese Proteine zu spalten und so die parazelluläre Durchlässigkeit zu erhöhen (74,1). So wird der Eintritt schädlicher Substanzen ins Gehirn, sowie damit einhergehend die Neuroinflammation gefördert und es kommt zur Entstehung der Pathologie und dessen Progress. Darüber hinaus trägt Meprin α weiter indirekt zur Neuroinflammation bei, indem es in modulatorischen Funktionen bei Spaltung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 β , eine Rolle spielt (8).

Nicht nur bei Alzheimer, sondern auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen scheint Meprin α eine Rolle mitzuwirken. Bei der Parkinson-Krankheit beispielsweise könnte die Protease durch Schädigung der BHS den Eintritt von α -Synuclein-Aggregaten aus der Peripherie ins Gehirn ermöglichen (161). Ähnliche Mechanismen werden bei der Multiplen Sklerose diskutiert, wo eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS die Migration autoaggressiver Immunzellen ins ZNS erleichtert (162).

Aufgrund der gezeigten Abnahme der Integrität der BHS durch Meprin α , ist es somit ein vielversprechender Bestandteil der aktuellen Forschung. Die Hemmung Meprin α

wäre ein Ansatz zur Stabilisierung der BHS bei neurodegenerativen Erkrankungen. Dahingehend werden in den neuesten Studien Inhibitoren gesucht, die in der Lage sind, das Enzym zu hemmen. Es gibt einige neue Studien in denen gezeigt wurde, dass Actinonin zu einer deutlichen Verbesserung des Phänotyps in Maus- und Rattenmodellen bei Sepsis geführt hat (163-167). Weiter reduzierten die breitwirkenden Metalloprotease Inhibitoren Marimastat und GW333 die Symptome in murinen Sepsis-Modellen (168). Diese Ergebnisse sind sehr vielversprechend, allerdings gibt es immer wieder Probleme in klinischen Studien mit solchen Inhibitoren aufgrund zu starker Nebenwirkungen (167,169). Dies zeigt, dass die Spezifität des Inhibitors unter anderem sehr wichtig ist. 2023 veröffentlichten L. Eltaib & A.A. Alzain ihre Ergebnisse zu den beiden neuen Inhibitoren ZINC000008790788 und ZINC000095099469, die in der Lage sind sowohl Meprin α als auch β zu inhibieren. Zusätzlich weisen diese eine hohe Selektivität, sowie nur eine geringe Zytotoxizität nach (170). Angesichts dieser Ergebnisse und der Bedeutung neuroinflammatorischer und -degenerativer Erkrankungen ist die weitere Entwicklung und Testung neuartiger und potenter Therapiestrategien von großer Bedeutung (169).

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen im wesentlichen zum Verständnis dieser komplexen Zusammenhänge bei. Sie zeigen, dass intrazelluläres Meprin α allein nicht ausreicht, um die BHS-Integrität zu beeinträchtigen. Erst die sekretierte oder membrangebundene Form scheinen kritisch zu sein. Die allgemeine Entwicklung der Forschung zur Metalloprotease ist sehr positiv zu werten, allerdings bedarf es hier nun weiterer Untersuchungen, um den beschriebenen Erkenntnissen weiter nachzugehen. Wie bereits unter 5.2. thematisiert wären unter anderem Experimente mit solchen Inhibitoren und der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie sehr interessant und würden zum Verständnis der Zelllinie sowie Meprin α weiter beitragen.

6 Zusammenfassung

Die Dissertation untersucht die Rolle der Metalloprotease Meprin α an der BHS, einer physiologischen Barriere, die das Gehirn vor schädlichen Substanzen schützt und so die Homöostase zwischen Gehirn und Blut erhält. Meprin α , ein Enzym der Astazin-Familie, ist bekannt für seine Fähigkeit Proteine wie TJ-Proteine und EZMP zu spalten, was die Integrität der BHS beeinflussen kann. Die Arbeit zielte darauf ab, diese Auswirkungen Meprin α s auf die BHS genauer zu untersuchen und im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen wie die Alzheimer Erkrankung, bei denen eine Dysfunktion der BHS beobachtet wird, zu untersuchen.

Hierfür wurde eine stabile Zelllinie (bENd.3_mep1a_C) durch retroviralen Gentransfer erzeugt, die Meprin α verstärkt exprimiert. Daraufhin wurde die Aktivität des Enzyms in verschiedenen Zellkompartimenten gemessen, und der Einfluss auf die TJ-Proteine (Occludin, Claudin-5, ZO-1) sowie die Barriereintegrität mittels TEER-Messungen und FITC-Dextran-Assays analysiert. Hierbei wurden keine signifikanten Veränderungen in den Protein Leveln der TJ-Proteine oder der Barriereintegrität im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. Diese Ergebnisse passten nicht zu den in der Literatur Beschriebenen. In den Aktivitätsmessungen fand sich allerdings lediglich intrazelluläre Aktivität Meprin α s. Dies könnte auf posttranslationale Modifikationen oder Fehler im Expressionssystem zurückzuführen sein.

In der Zusammenschau deuten die Ergebnisse somit darauf hin, dass der proteolytische Effekt von Meprin α auf die BHS membrangebunden oder extrazellulär erfolgen muss, da intrazelluläre Aktivität allein keine Auswirkungen in den Experimenten zeigte. Die Arbeit unterstreicht insgesamt die Komplexität der Meprin α Regulation und liefert Ansatzpunkte für weitere Forschung, insbesondere zur Rolle des Enzyms in entzündlichen und neurodegenerativen Prozessen.

7 Literaturverzeichnis

1. Broder C, Becker-Pauly C. The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J.* 2013 Mar 1;450(2):253-64. doi: 10.1042/BJ20121751. PMID: 23410038; PMCID: PMC3573791.
2. Bond JS. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. *J Biol Chem.* 2019;294(5):1643-51.
3. Bhagwat SR, Hajela K, Kumar A. Proteolysis to Identify Protease Substrates: Cleave to Decipher. *Proteomics.* 2018;18(13):e1800011.
4. Lopez-Otin C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem.* 2008;283(45):30433-7
5. Hahn D, Illisson R, Metspalu A, Sterchi EE. Human N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid hydrolase (human meprin): genomic structure of the alpha and beta subunits. *Biochem J.* 2000 Feb 15;346 Pt 1(Pt 1):83-91. PMID: 10657243; PMCID: PMC1220826.
6. Wang Z, Herzog C, Kaushal GP, Gokden N, Mayeux PR. Actinonin, a meprin A inhibitor, protects the renal microcirculation during sepsis. *Shock.* 2011 Feb;35(2):141-7. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181ec39cc. PMID: 20577148; PMCID: PMC3265793.
7. Minder P, Bayha E, Becker-Pauly C, Sterchi EE. Meprin α transactivates the epidermal growth factor receptor (EGFR) via ligand shedding, thereby enhancing colorectal cancer cell proliferation and migration. *J Biol Chem.* 2012 Oct 12;287(42):35201-35211. doi: 10.1074/jbc.M112.368910. Epub 2012 Aug 24. PMID: 22923609; PMCID: PMC3471737.
8. Kaushal GP, Haun RS, Herzog C, Shah SV. Meprin A metalloproteinase and its role in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013 May 1;304(9):F1150-8. doi: 10.1152/ajprenal.00014.2013. Epub 2013 Feb 20. PMID: 23427141; PMCID: PMC3651633.
9. Roff AN, Panganiban RP, Bond JS, Ishmael FT. Post-transcriptional regulation of meprin α by the RNA-binding proteins Hu antigen R (HuR) and tristetraprolin (TTP). *J Biol Chem.* 2013 Feb 15;288(7):4733-43. doi: 10.1074/jbc.M112.444208. Epub 2012 Dec 26. PMID: 23269677; PMCID: PMC3576078.
10. Nehra G, Bauer B, Hartz AMS. Blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease: From discovery to clinical relevance. *Pharmacol Ther.* 2022 Jun;234:108119. doi: 10.1016/j.pharmthera.2022.108119. Epub 2022 Jan 30. PMID: 35108575; PMCID: PMC9107516.
11. Dunton AD, Göpel T, Ho DH, Burggren W. Form and Function of the Vertebrate and Invertebrate Blood-Brain Barriers. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 9;22(22):12111. doi: 10.3390/ijms222212111. PMID: 34829989; PMCID: PMC8618301.
12. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS.* 2020 Nov 18;17(1):69. doi: 10.1186/s12987-020-00230-3. PMID: 33208141; PMCID: PMC7672931.
13. Knox EG, Aburto MR, Clarke G, Cryan JF, O'Driscoll CM. The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Mol Psychiatry.* 2022 Jun;27(6):2659-2673. doi: 10.1038/s41380-022-01511-z. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35361905; PMCID: PMC9156404.
14. Schreiner TG, Romanescu C, Popescu BO. The Blood-Brain Barrier-A Key Player in Multiple Sclerosis Disease Mechanisms. *Biomolecules.* 2022 Apr 2;12(4):538. doi: 10.3390/biom12040538. PMID: 35454127; PMCID: PMC9025898.

15. Noe CR, Noe-Letschnig M, Handschuh P, Noe CA, Lanzenberger R. Dysfunction of the Blood-Brain Barrier-A Key Step in Neurodegeneration and Dementia. *Front Aging Neurosci*. 2020 Jul 24;12:185. doi: 10.3389/fnagi.2020.00185. PMID: 32848697; PMCID: PMC7396716.
16. Wu YC, Sonninen TM, Peltonen S, Koistinaho J, Lehtonen Š. Blood-Brain Barrier and Neurodegenerative Diseases-Modeling with iPSC-Derived Brain Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 19;22(14):7710. doi: 10.3390/ijms22147710. PMID: 34299328; PMCID: PMC8307585.
17. Beynon RJ, Shannon JD, Bond JS. Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *Biochem J*. 1981 Dec 1;199(3):591-8. doi: 10.1042/bj1990591. PMID: 7041888; PMCID: PMC1163414.
18. Barnes K, Ingram J, Kenny AJ. Proteins of the kidney microvillar membrane. Structural and immunochemical properties of rat endopeptidase-2 and its immunohistochemical localization in tissues of rat and mouse. *Biochem J*. 1989 Dec 1;264(2):335-46. doi: 10.1042/bj2640335. PMID: 2690825; PMCID: PMC1133587.
19. Sterchi EE, Green JR, Lentze MJ. Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine. *Clin Sci (Lond)*. 1982 May;62(5):557-60. doi: 10.1042/cs0620557. PMID: 7042181.
20. Sterchi EE, Green JR, Lentze MJ. Nonpancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA peptide) in the rat small intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1983;2(3):539-47. doi: 10.1097/00005176-198302030-00024. PMID: 6352892.
21. Britton J, Brayley E. *Beauties of England and Wales; or Delineations Topographical, Historical and Descriptive of each county. Part I. XII.* London: Thomas Maiden; 1900. [[Google Scholar](#)]
22. Holmes F. *Claude Bernard and Animal Chemistry: The Emergence of a Scientist.* Boston: Harvard University Press; 1974. [[Google Scholar](#)]
23. Bäumler E. *Paul Ehrlich, scientist for life.* New York: Holmes & Meier; 1984. [[Google Scholar](#)]
24. Ehrlich P. *Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus Eine farbenanalytische Studie.* Berlin; 1885. [[Google Scholar](#)]
25. THE LATE PROFESSOR EDWIN GOLDMANN'S INVESTIGATIONS ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM BY VITAL STAINING. *Br Med J*. 1913 Oct 4;2(2753):871-3. PMID: 20766814; PMCID: PMC2345891.
26. Partridge WM. A Historical Review of Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2022 Jun 16;14(6):1283. doi: 10.3390/pharmaceutics14061283. PMID: 35745855; PMCID: PMC9229021.
27. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. 1967 Jul;34(1):207-17. doi: 10.1083/jcb.34.1.207. PMID: 6033532; PMCID: PMC2107213.
28. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*. 1969 Mar;40(3):648-77. doi: 10.1083/jcb.40.3.648. PMID: 5765759; PMCID: PMC2107650.
29. Liddel SA. Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids Barriers CNS*. 2011 Jan 18;8(1):2. doi: 10.1186/2045-8118-8-2. PMID: 21349150; PMCID: PMC3039834.

30. Montagne A, Zhao Z, Zlokovic BV. Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? *J Exp Med*. 2017 Nov 6;214(11):3151-3169. doi: 10.1084/jem.20171406. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29061693; PMCID: PMC5679168.
31. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007 Feb 2;100(2):174-90. doi: 10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae. PMID: 17272819.
32. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017 Nov 6;27(21):R1147-R1151. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019. PMID: 29112863; PMCID: PMC5897118.
33. Adeva-Andany MM, Pérez-Felpete N, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C, Pazos-García C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep*. 2016 Nov 29;36(6):e00416. doi: 10.1042/BSR20160385. PMID: 27707936; PMCID: PMC5293555.
34. Poole DC, Copp SW, Ferguson SK, Musch TI. Skeletal muscle capillary function: contemporary observations and novel hypotheses. *Exp Physiol*. 2013 Dec;98(12):1645-58. doi: 10.1113/expphysiol.2013.073874. Epub 2013 Aug 30. PMID: 23995101; PMCID: PMC4251469.
35. Harris-Tryon TA, Grice EA. Microbiota and maintenance of skin barrier function. *Science*. 2022 May 27;376(6596):940-945. doi: 10.1126/science.abo0693. Epub 2022 May 26. PMID: 35617415.
36. Pellegrini C, Fornai M, D'Antongiovanni V, Antonioli L, Bernardini N, Derkinderen P. The intestinal barrier in disorders of the central nervous system. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2023 Jan;8(1):66-80. doi: 10.1016/S2468-1253(22)00241-2. Epub 2022 Nov 2. PMID: 36334596.
37. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):21-78. doi: 10.1152/physrev.00050.2017. PMID: 30280653; PMCID: PMC6335099.
38. Coomber BL, Stewart PA. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res*. 1985 Jul;30(1):99-115. doi: 10.1016/0026-2862(85)90042-1. PMID: 4021842.
39. Westergaard E, Brightman MW. Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J Comp Neurol*. 1973 Nov 1;152(1):17-44. doi: 10.1002/cne.901520103. PMID: 4765853.
40. Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):467-76. doi: 10.1387/ijdb.103224sl. PMID: 21769778.
41. Pardridge WM. Blood-brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: a new model for small molecule CNS drug discovery. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(8):1059-72. doi: 10.1517/14728222.2015.1042364. Epub 2015 May 2. PMID: 25936389.
42. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Jan 5;7(1):a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412. PMID: 25561720; PMCID: PMC4292164.
43. Quiros M, Nusrat A. RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial Apical Junctional Complex. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 Dec;36:194-203. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.003. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25223584; PMCID: PMC5054512.
44. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Apr;2(4):285-93. doi: 10.1038/35067088. PMID: 11283726.

45. Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jan;2(1):a002907. doi: 10.1101/cshperspect.a002907. PMID: 20182608; PMCID: PMC2827901.
46. Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H, Wolburg H. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 2000 Sep;100(3):323-31. doi: 10.1007/s004010000180. PMID: 10965803.
47. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol.* 1999 Oct 4;147(1):185-94. doi: 10.1083/jcb.147.1.185. PMID: 10508865; PMCID: PMC2164984.
48. Piontek J, Krug SM, Protze J, Krause G, Fromm M. Molecular architecture and assembly of the tight junction backbone. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2020 Jul 1;1862(7):183279. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183279. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32224152.
49. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):631-45. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.10.018. Epub 2007 Oct 25. PMID: 18036336.
50. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1998 Oct 19;143(2):391-401. doi: 10.1083/jcb.143.2.391. PMID: 9786950; PMCID: PMC2132845.
51. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):511-6. doi: 10.1073/pnas.96.2.511. PMID: 9892664; PMCID: PMC15167.
52. Briehl MM, Miesfeld RL. Isolation and characterization of transcripts induced by androgen withdrawal and apoptotic cell death in the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol.* 1991 Oct;5(10):1381-8. doi: 10.1210/mend-5-10-1381. PMID: 1723140.
53. Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Cell Biol.* 1997 Mar 24;136(6):1239-47. doi: 10.1083/jcb.136.6.1239. PMID: 9087440; PMCID: PMC2132509.
54. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 1998 Jun 29;141(7):1539-50. doi: 10.1083/jcb.141.7.1539. PMID: 9647647; PMCID: PMC2132999.
55. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol.* 1999 Nov 15;147(4):891-903. doi: 10.1083/jcb.147.4.891. PMID: 10562289; PMCID: PMC2156154.
56. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol.* 2001 Apr 16;153(2):263-72. doi: 10.1083/jcb.153.2.263. PMID: 11309408; PMCID: PMC2169456.
57. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest.* 2001 May;107(10):1319-27. doi: 10.1172/JCI12464. PMID: 11375422; PMCID: PMC209303.
58. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 2005 Jul;321(1):89-96. doi: 10.1007/s00441-005-1101-0. PMID: 16158492.

59. Hou J, Gomes AS, Paul DL, Goodenough DA. Study of claudin function by RNA interference. *J Biol Chem*. 2006 Nov 24;281(47):36117-23. doi: 10.1074/jbc.M608853200. Epub 2006 Oct 3. PMID: 17018523.
60. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 2003 May 12;161(3):653-60. doi: 10.1083/jcb.200302070. PMID: 12743111; PMCID: PMC2172943.
61. Hashimoto Y, Shirakura K, Okada Y, Takeda H, Endo K, Tamura M, Watari A, Sadamura Y, Sawasaki T, Doi T, Yagi K, Kondoh M. Claudin-5-Binders Enhance Permeation of Solutes across the Blood-Brain Barrier in a Mammalian Model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017 Nov;363(2):275-283. doi: 10.1124/jpet.117.243014. Epub 2017 Aug 17. PMID: 28819070.
62. Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS*. 2019 Jan 29;16(1):3. doi: 10.1186/s12987-019-0123-z. PMID: 30691500; PMCID: PMC6350359.
63. Jia W, Lu R, Martin TA, Jiang WG. The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (review). *Mol Med Rep*. 2014 Mar;9(3):779-85. doi: 10.3892/mmr.2013.1875. Epub 2013 Dec 18. PMID: 24366267.
64. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88. doi: 10.1083/jcb.123.6.1777. PMID: 8276896; PMCID: PMC2290891.
65. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Jun;286(6):C1213-28. doi: 10.1152/ajpcell.00558.2003. PMID: 15151915.
66. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 2000 Dec;11(12):4131-42. doi: 10.1091/mbc.11.12.4131. PMID: 11102513; PMCID: PMC15062.
67. Kitajiri S, Katsuno T, Sasaki H, Ito J, Furuse M, Tsukita S. Deafness in occludin-deficient mice with dislocation of tricellulin and progressive apoptosis of the hair cells. *Biol Open*. 2014 Jul 25;3(8):759-66. doi: 10.1242/bio.20147799. PMID: 25063198; PMCID: PMC4133728.
68. Fujimoto K. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci*. 1995 Nov;108 (Pt 11):3443-9. doi: 10.1242/jcs.108.11.3443. PMID: 8586656.
69. Furuse M, Fujimoto K, Sato N, Hirase T, Tsukita S, Tsukita S. Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures. *J Cell Sci*. 1996 Feb;109 (Pt 2):429-35. doi: 10.1242/jcs.109.2.429. PMID: 8838666.
70. Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, Tsukita S. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol*. 1997 Jul;73(3):222-31. PMID: 9243183.
71. McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci*. 1996 Sep;109 (Pt 9):2287-98. doi: 10.1242/jcs.109.9.2287. PMID: 8886979.
72. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol*. 1997 Jun 16;137(6):1393-401. doi: 10.1083/jcb.137.6.1393. PMID: 9182670; PMCID: PMC2132539.

73. Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Mar;4(3):225-36. doi: 10.1038/nrm1055. PMID: 12612641
74. Bao J, Yura RE, Matters GL, Bradley SG, Shi P, Tian F, Bond JS. Mepripin A impairs epithelial barrier function, enhances monocyte migration, and cleaves the tight junction protein occludin. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013 Sep 1;305(5):F714-26. doi: 10.1152/ajprenal.00179.2012. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23804454; PMCID: PMC3761208.
75. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* 1999 Dec 13;147(6):1351-63. doi: 10.1083/jcb.147.6.1351. PMID: 10601346; PMCID: PMC2168087.
76. Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):27979-88. doi: 10.1074/jbc.M002363200. PMID: 10856295.
77. Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J.* 2002 Nov;16(13):1835-7. doi: 10.1096/fj.02-0121fje. Epub 2002 Sep 19. PMID: 12354695.
78. Müller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbergenov DI, Huber O, Blasig IE, Krause G. The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem.* 2005 Feb 4;280(5):3747-56. doi: 10.1074/jbc.M411365200. Epub 2004 Nov 16. PMID: 15548514.
79. Del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Koziol JA. Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem Soc Trans.* 2006 Dec;34(Pt 6):1261-6. doi: 10.1042/BST0341261. PMID: 17073798.
80. Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010 Oct;10(10):712-23. doi: 10.1038/nri2852. PMID: 20865019.
81. Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jun;27(6):1248-58. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.141069. Epub 2007 Mar 22. PMID: 17379839.
82. Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J.* 1993 Aug;7(11):1031-8. doi: 10.1096/fasebj.7.11.8370472. PMID: 8370472.
83. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011 Aug 16;21(2):193-215. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001. PMID: 21839917.
84. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci.* 2011 Oct 26;14(11):1398-1405. doi: 10.1038/nn.2946. PMID: 22030551; PMCID: PMC4020628.
85. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 2014 Apr 3;508(7494):55-60. doi: 10.1038/nature13165. Epub 2014 Mar 26. PMID: 24670647; PMCID: PMC3976267.
86. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 2006 Oct 12;443(7112):700-4. doi: 10.1038/nature05193. Epub 2006 Oct 1. PMID: 17036005; PMCID: PMC1761848.

87. Sagare AP, Bell RD, Zhao Z, Ma Q, Winkler EA, Ramanathan A, Zlokovic BV. Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2932. doi: 10.1038/ncomms3932. Erratum in: *Nat Commun.* 2023 Oct 3;14(1):6151. PMID: 24336108; PMCID: PMC3945879.
88. Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R. Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB J.* 2002 Aug;16(10):1274-6. doi: 10.1096/fj.01-0814fje. Epub 2002 Jun 21. PMID: 12153997.
89. Baloyannis SJ, Baloyannis IS. The vascular factor in Alzheimer's disease: a study in Golgi technique and electron microscopy. *J Neurol Sci.* 2012 Nov 15;322(1-2):117-21. doi: 10.1016/j.jns.2012.07.010. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22857991.
90. Sengillo JD, Winkler EA, Walker CT, Sullivan JS, Johnson M, Zlokovic BV. Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2013 May;23(3):303-10. doi: 10.1111/bpa.12004. Epub 2012 Nov 28. PMID: 23126372; PMCID: PMC3628957.
91. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8. Epub 2009 Dec 10. PMID: 20012068; PMCID: PMC2799634.
92. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 2010 Nov 25;468(7323):562-6. doi: 10.1038/nature09513. Epub 2010 Oct 13. PMID: 20944625; PMCID: PMC3241506.
93. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;287:1-41. doi: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00001-3. PMID: 21414585.
94. Yao Y, Chen ZL, Norris EH, Strickland S. Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nat Commun.* 2014 Mar 3;5:3413. doi: 10.1038/ncomms4413. PMID: 24583950; PMCID: PMC3992931.
95. Stewart PA, Wiley MJ. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. *Dev Biol.* 1981 May;84(1):183-92. doi: 10.1016/0012-1606(81)90382-1. PMID: 7250491.
96. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature.* 1987 Jan 15-21;325(6101):253-7. doi: 10.1038/325253a0. PMID: 3543687.
97. Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci.* 2013 May;14(5):311-21. doi: 10.1038/nrn3484. Epub 2013 Apr 18. Erratum in: *Nat Rev Neurosci.* 2013 Jun;14(6):451. PMID: 23595014; PMCID: PMC4431630.
98. Miller DS. Regulation of ABC transporters blood-brain barrier: the good, the bad, and the ugly. *Adv Cancer Res.* 2015;125:43-70. doi: 10.1016/bs.acr.2014.10.002. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25640266.
99. Teixeira MI, Lopes CM, Amaral MH, Costa PC. Current insights on lipid nanocarrier-assisted drug delivery in the treatment of neurodegenerative diseases. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020 Apr;149:192-217. doi: 10.1016/j.ejpb.2020.01.005. Epub 2020 Jan 23. PMID: 31982574.
100. Moya ML, Triplett M, Simon M, Alvarado J, Booth R, Osburn J, Soscia D, Qian F, Fischer NO, Kulp K, Wheeler EK. A Reconfigurable In Vitro Model for Studying the Blood-Brain Barrier. *Ann Biomed Eng.* 2020 Feb;48(2):780-793. doi: 10.1007/s10439-019-02405-y. Epub 2019 Nov 18. PMID: 31741228.

101. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006 Sep;1(3):223-36. doi: 10.1007/s11481-006-9025-3. Epub 2006 Jul 6. PMID: 18040800.
102. Correale J, Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity.* 2007 Mar;40(2):148-60. doi: 10.1080/08916930601183522. PMID: 17453713.
103. Kaur C, Ling EA. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res.* 2008 Feb;5(1):71-81. doi: 10.2174/156720208783565645. PMID: 18289024.
104. Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplant.* 2007;16(3):285-99. doi: 10.3727/000000007783464731. PMID: 17503739.
105. Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain.* 2006 Jan;129(Pt 1):18-35. doi: 10.1093/brain/awh682. Epub 2005 Nov 29. PMID: 16317026.
106. Bronger H, König J, Kopplow K, Steiner HH, Ahmadi R, Herold-Mende C, Keppler D, Nies AT. ABCG drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res.* 2005 Dec 15;65(24):11419-28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1271. PMID: 16357150.
107. Jiang W, Kumar JM, Matters GL, Bond JS. Structure of the mouse metalloprotease meprin beta gene (Mep1b): alternative splicing in cancer cells. *Gene.* 2000 May 2;248(1-2):77-87. doi: 10.1016/s0378-1119(00)00143-8. PMID: 10806353.
108. Bond JS, Beynon RJ. The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci.* 1995 Jul;4(7):1247-61. doi: 10.1002/pro.5560040701. PMID: 7670368; PMCID: PMC2143163.
109. Gorbea CM, Marchand P, Jiang W, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bond JS. Cloning, expression, and chromosomal localization of the mouse meprin beta subunit. *J Biol Chem.* 1993 Oct 5;268(28):21035-43. PMID: 8407940.
110. Sterchi EE, Stöcker W, Bond JS. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2008 Oct;29(5):309-28. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.002. Epub 2008 Aug 22. PMID: 18783725; PMCID: PMC2650038.
111. Beckmann G, Bork P. An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends Biochem Sci.* 1993 Feb;18(2):40-1. doi: 10.1016/0968-0004(93)90049-s. PMID: 8387703.
112. Zondag GC, Koningsstein GM, Jiang YP, Sap J, Moolenaar WH, Gebbink MF. Homophilic interactions mediated by receptor tyrosine phosphatases mu and kappa. A critical role for the novel extracellular MAM domain. *J Biol Chem.* 1995 Jun 16;270(24):14247-50. doi: 10.1074/jbc.270.24.14247. Erratum in: *J Biol Chem* 1995 Oct 13;270(41):24621. PMID: 7782276.
113. Aricescu AR, Hon WC, Siebold C, Lu W, van der Merwe PA, Jones EY. Molecular analysis of receptor protein tyrosine phosphatase mu-mediated cell adhesion. *EMBO J.* 2006 Feb 22;25(4):701-12. doi: 10.1038/sj.emboj.7600974. Epub 2006 Feb 2. PMID: 16456543; PMCID: PMC1383555.
114. Cheng G, Cleary AM, Ye ZS, Hong DI, Lederman S, Baltimore D. Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science.* 1995 Mar 10;267(5203):1494-8. doi: 10.1126/science.7533327. PMID: 7533327.
115. Zapata JM, Martínez-García V, Lefebvre S. Phylogeny of the TRAF/MATH domain. *Adv Exp Med Biol.* 2007;597:1-24. doi: 10.1007/978-0-387-70630-6_1. PMID: 17633013.

116. Ishmael FT, Shier VK, Ishmael SS, Bond JS. Intersubunit and domain interactions of the meprin B metalloproteinase. Disulfide bonds and protein-protein interactions in the MAM and TRAF domains. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13895-901. doi: 10.1074/jbc.M414218200. Epub 2005 Feb 4. PMID: 15695509.
117. Grünberg J, Luginbühl U, Sterchi EE. Proteolytic processing of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase precursor is not a prerequisite for correct sorting in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells. *FEBS Lett.* 1992 Dec 21;314(3):224-8. doi: 10.1016/0014-5793(92)81476-3. PMID: 1468552.
118. Becker C, Kruse MN, Slotty KA, Köhler D, Harris JR, Rösmann S, Sterchi EE, Stöcker W. Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol Chem.* 2003 May;384(5):825-31. doi: 10.1515/BC.2003.092. PMID: 12817480.
119. Bertenshaw GP, Norcum MT, Bond JS. Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J Biol Chem.* 2003 Jan 24;278(4):2522-32. doi: 10.1074/jbc.M208808200. Epub 2002 Oct 23. PMID: 12399461.
120. Becker-Pauly C, Höwel M, Walker T, Vlad A, Aufenvenne K, Oji V, Lottaz D, Sterchi EE, Debela M, Magdolen V, Traupe H, Stöcker W. The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol.* 2007 May;127(5):1115-25. doi: 10.1038/sj.jid.5700675. Epub 2007 Jan 4. PMID: 17195012.
121. Jefferson T, Čaušević M, auf dem Keller U, Schilling O, Isbert S, Geyer R, Maier W, Tschickardt S, Jumpertz T, Weggen S, Bond JS, Overall CM, Pietrzik CU, Becker-Pauly C. Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *J Biol Chem.* 2011 Aug 5;286(31):27741-50. doi: 10.1074/jbc.M111.252718. Epub 2011 Jun 6. PMID: 21646356; PMCID: PMC3149364.
122. Lottaz D, Hahn D, Müller S, Müller C, Sterchi EE. Secretion of human meprin from intestinal epithelial cells depends on differential expression of the alpha and beta subunits. *Eur J Biochem.* 1999 Jan;259(1-2):496-504. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00071.x. PMID: 9914532.
123. Wichert R, Scharfenberg F, Colmorgen C, Koudelka T, Schwarz J, Wetzel S, et al. Meprin beta induces activities of A disintegrin and metalloproteinases 9, 10, and 17 by specific prodomain cleavage. *FASEB J.* 2019;33(11):11925-40.
124. Butler PE, McKay MJ, Bond JS. Characterization of meprin, a membrane-bound metalloendopeptidase from mouse kidney. *Biochem J.* 1987 Jan 1;241(1):229-35. doi: 10.1042/bj2410229. PMID: 3105525; PMCID: PMC1147547.
125. Kenny AJ, Ingram J. Proteins of the kidney microvillar membrane. Purification and properties of the phosphoramidon-insensitive endopeptidase ('endopeptidase-2') from rat kidney. *Biochem J.* 1987 Jul 15;245(2):515-24. doi: 10.1042/bj2450515. PMID: 3117045; PMCID: PMC1148152.
126. Stephenson SL, Kenny AJ. The metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of peptides by the phosphoramidon-insensitive rat kidney enzyme 'endopeptidase-2' and by rat microvillar membranes. *Biochem J.* 1988 Oct 1;255(1):45-51. doi: 10.1042/bj2550045. PMID: 2461706; PMCID: PMC1135188.
127. Sterchi EE, Naim HY, Lentze MJ. Biosynthesis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid hydrolase: disulfide-linked dimers are formed at the site of synthesis in the rough endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys.* 1988 Aug 15;265(1):119-27. doi: 10.1016/0003-9861(88)90377-3. PMID: 3261962.

128. Choudry Y, Kenny AJ. Hydrolysis of transforming growth factor-alpha by cell-surface peptidases in vitro. *Biochem J.* 1991 Nov 15;280 (Pt 1)(Pt 1):57-60. doi: 10.1042/bj2800057. PMID: 1741757; PMCID: PMC1130599.
129. Kaushal GP, Walker PD, Shah SV. An old enzyme with a new function: purification and characterization of a distinct matrix-degrading metalloproteinase in rat kidney cortex and its identification as meprin. *J Cell Biol.* 1994 Sep;126(5):1319-27. doi: 10.1083/jcb.126.5.1319. PMID: 8063866; PMCID: PMC2120165.
130. Walker PD, Kaushal GP, Shah SV. Meprin A, the major matrix degrading enzyme in renal tubules, produces a novel nidogen fragment in vitro and in vivo. *Kidney Int.* 1998 Jun;53(6):1673-80. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00949.x. PMID: 9607199.
131. Chestukhin A, Muradov K, Litovchick L, Shaltiel S. The cleavage of protein kinase A by the kinase-splitting membranal proteinase is reproduced by meprin beta. *J Biol Chem.* 1996 Nov 22;271(47):30272-80. doi: 10.1074/jbc.271.47.30272. PMID: 8939981.
132. Köhler D, Kruse M, Stöcker W, Sterchi EE. Heterologously overexpressed, affinity-purified human meprin alpha is functionally active and cleaves components of the basement membrane in vitro. *FEBS Lett.* 2000 Jan 7;465(1):2-7. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01712-3. PMID: 10620696.
133. Bertenshaw GP, Turk BE, Hubbard SJ, Matters GL, Bylander JE, Crisman JM, Cantley LC, Bond JS. Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):13248-55. doi: 10.1074/jbc.M011414200. Epub 2001 Jan 22. PMID: 11278902.
134. Kruse MN, Becker C, Lottaz D, Köhler D, Yiallourous I, Krell HW, Sterchi EE, Stöcker W. Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem J.* 2004 Mar 1;378(Pt 2):383-9. doi: 10.1042/BJ20031163. PMID: 14594449; PMCID: PMC1223953.
135. Herzog C, Haun RS, Kaushal V, Mayeux PR, Shah SV, Kaushal GP. Meprin A and meprin alpha generate biologically functional IL-1beta from pro-IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb 20;379(4):904-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.161. Epub 2009 Jan 7. PMID: 19135030; PMCID: PMC3702385.
136. Bylander JE, Bertenshaw GP, Matters GL, Hubbard SJ, Bond JS. Human and mouse homo-oligomeric meprin A metalloendopeptidase: substrate and inhibitor specificities. *Biol Chem.* 2007 Nov;388(11):1163-72. doi: 10.1515/BC.2007.156. PMID: 17976009.
137. Kronenberg D, Bruns BC, Moali C, Vadon-Le Goff S, Sterchi EE, Traupe H, Böhm M, Hulmes DJ, Stöcker W, Becker-Pauly C. Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly? *J Invest Dermatol.* 2010 Dec;130(12):2727-35. doi: 10.1038/jid.2010.202. Epub 2010 Jul 15. PMID: 20631730.
138. Onger EM, Anyanwu O, Reeves WB, Bond JS. Villin and actin in the mouse kidney brush-border membrane bind to and are degraded by meprins, an interaction that contributes to injury in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 Oct;301(4):F871-82. doi: 10.1152/ajprenal.00703.2010. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21795642; PMCID: PMC3191804.
139. Khabar KS. The AU-rich transcriptome: more than interferons and cytokines, and its role in disease. *J Interferon Cytokine Res.* 2005 Jan;25(1):1-10. doi: 10.1089/jir.2005.25.1. PMID: 15684617.
140. Abdelmohsen K, Kuwano Y, Kim HH, Gorospe M. Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biol Chem.* 2008 Mar;389(3):243-55. doi: 10.1515/BC.2008.022. PMID: 18177264; PMCID: PMC8481862.

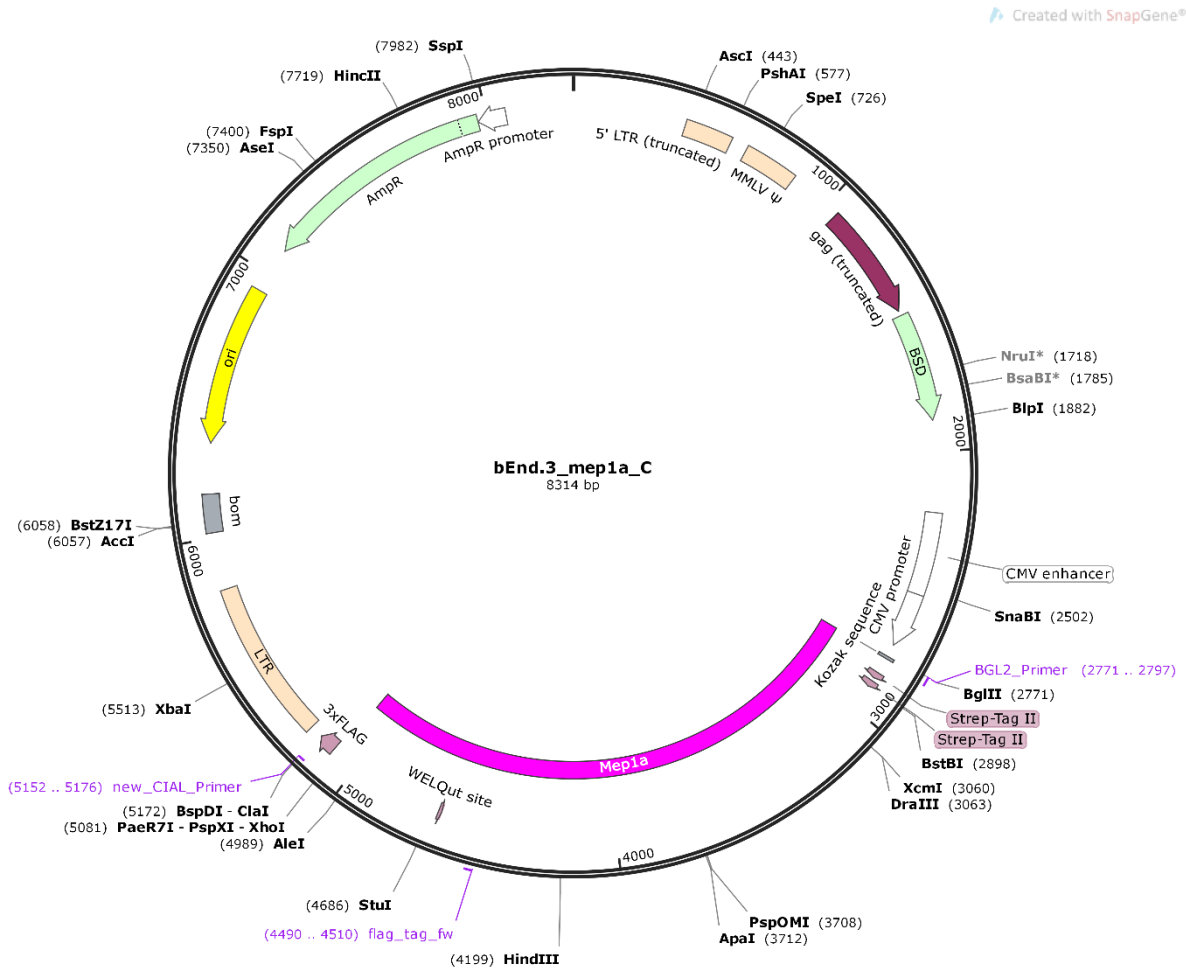
141. Kishore S, Lubner S, Zavolan M. Deciphering the role of RNA-binding proteins in the post-transcriptional control of gene expression. *Brief Funct Genomics*. 2010 Dec;9(5-6):391-404. doi: 10.1093/bfgp/elq028. Epub 2010 Dec 1. PMID: 21127008; PMCID: PMC3080770.
142. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 3;33(22):7138-50. doi: 10.1093/nar/gki1012. PMID: 16391004; PMCID: PMC1325018.
143. Grünberg J, Dumermuth E, Eldering JA, Sterchi EE. Expression of the alpha subunit of PABA peptide hydrolase (EC 3.4.24.18) in MDCK cells. Synthesis and secretion of an enzymatically inactive homodimer. *FEBS Lett*. 1993 Dec 13;335(3):376-9. doi: 10.1016/0014-5793(93)80422-q. PMID: 8262186.
144. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res*. 2007 Apr;149(4):173-86. doi: 10.1016/j.trsl.2006.11.009. PMID: 17383591.
145. Banerjee S, Oneda B, Yap LM, Jewell DP, Matters GL, Fitzpatrick LR, Seibold F, Sterchi EE, Ahmad T, Lottaz D, Bond JS. MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol*. 2009 May;2(3):220-31. doi: 10.1038/mi.2009.3. Epub 2009 Mar 4. PMID: 19262505; PMCID: PMC2670347.
146. Craig SS, Reckelhoff JF, Bond JS. Distribution of meprin in kidneys from mice with high- and low-meprin activity. *Am J Physiol*. 1987 Oct;253(4 Pt 1):C535-40. doi: 10.1152/ajpcell.1987.253.4.C535. PMID: 3310653.
147. Walker PD, Kaushal GP, Shah SV. Presence of a distinct extracellular matrix-degrading metalloproteinase activity in renal tubules. *J Am Soc Nephrol*. 1994 Jul;5(1):55-61. doi: 10.1681/ASN.V5155. PMID: 7948783.
148. Johnson GD, Bond JS. Activation mechanism of meprins, members of the astacin metalloendopeptidase family. *J Biol Chem*. 1997 Oct 31;272(44):28126-32. doi: 10.1074/jbc.272.44.28126. PMID: 9346968.
149. Ohler A, Debela M, Wagner S, Magdolen V, Becker-Pauly C. Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol Chem*. 2010 Apr;391(4):455-60. doi: 10.1515/BC.2010.023. PMID: 20128684.
150. Rösmann S, Hahn D, Lottaz D, Kruse MN, Stöcker W, Sterchi EE. Activation of human meprin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *J Biol Chem*. 2002 Oct 25;277(43):40650-8. doi: 10.1074/jbc.M206203200. Epub 2002 Aug 19. PMID: 12189145.
151. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*. 1907;64(1-2):146-8.
152. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256(5054):184-5.
153. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.
154. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015;14(4):388-405.
155. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(12):723-38.
156. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(3):133-50.

157. Sterchi EE, Stöcker W, Bond JS. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2008 Oct;29(5):309-28. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.002. Epub 2008 Aug 22. PMID: 18783725; PMCID: PMC2650038
158. Heuberger DM, Schuepbach RA. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thromb J.* 2019 Mar 29;17:4. doi: 10.1186/s12959-019-0194-8. Erratum in: *Thromb J.* 2019 Nov 6;17:22. doi: 10.1186/s12959-019-0212-x. PMID: 30976204; PMCID: PMC6440139.
159. Sandholm L. Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1986 Jan;13(1):19-26. doi: 10.1111/j.1600-051x.1986.tb01409.x. PMID: 2418067.
160. Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY, Amezcua L, Harrington MG, Chui HC, Law M, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron.* 2015 Jan 21;85(2):296-302. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.032. PMID: 25611508; PMCID: PMC4350773.
161. Kuan WL, Stott K, He X, Wood TC, Yang S, Kwok JCF, Hall K, Zhao Y, Tietz O, Aigbirhio FI, Vernon AC, Barker RA. Systemic α -synuclein injection triggers selective neuronal pathology as seen in patients with Parkinson's disease. *Mol Psychiatry.* 2021 Feb;26(2):556-567. doi: 10.1038/s41380-019-0608-9. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31758091; PMCID: PMC7850975.
162. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, Hernández-Navarro VE, Sánchez-López AL, Alatorre-Jiménez MA. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res.* 2014 Nov;45(8):687-97. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.11.013. Epub 2014 Nov 26. PMID: 25431839.
163. Wang Z, Herzog C, Kaushal GP, Gokden N and Mayeux PR (2011) Actinonin, a meprin a inhibitor, protects the renal microcirculation during sepsis. *Shock* 35, 141–147.
164. Herzog C, Haun RS, Kaushal V, Mayeux PR, Shah SV and Kaushal GP (2009) Meprin A and meprin α generate biologically functional IL-1 β from pro-IL-1 β . *Biochem Biophys Res Commun* 379, 904–908.
165. Holly MK, Dear JW, Hu X, Schechter AN, Gladwin MT, Hewitt SM, Yuen PST and Star RA (2006) Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int* 70, 496–506.
166. Chepurnova DA, SamoiloVA EV and Fesenko G (2021) Korotaeva reduced expression of extracellular matrix proteins in the heart and kidneys of rats with endotoxemia under the effect of actinonin. *Bull Exp Biol Med* 170, 744–747.
167. Rahn S, Becker-Pauly C. Meprin and ADAM proteases as triggers of systemic inflammation in sepsis. *FEBS Lett.* 2022 Mar;596(5):534-556. doi: 10.1002/1873-3468.14225. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34762736.
168. Tsuji F, Oki K, Okahara A, Suhara H, Yamanouchi T, Sasano M, Mita S and Horiuchi M (2002) Differential effects between marimastat, a TNF- α converting enzyme inhibitor, and anti-TNF- α antibody on murine models for sepsis and arthritis. *Cytokine* 17, 294–300.
169. Peterson JT (2004) Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev* 9, 63–79.
170. Eltaib L, Alzain AA. Discovery of dual-target natural inhibitors of meprins α and β metalloproteases for inflammation regulation: pharmacophore modelling, molecular docking, ADME prediction, and molecular dynamics studies. *SAR QSAR Environ Res.* 2023 Nov 13:1-23. doi: 10.1080/1062936X.2023.2277425. Epub ahead of print. PMID: 37955603.

171. Hladky, S.B., Barrand, M.A. Fluid and ion transfer across the blood–brain and blood–cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles. *Fluids Barriers CNS* **13**, 19 (2016).
172. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 7th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2016.
173. Karlsson JOM, Toner M. Mechanisms of cryoprotection in freezing and vitrification solutions: Prevention of ice formation and stabilization of cell membranes. *Cryobiology*. 1996;33(1):1-18. doi:10.1006/cryo.1996.0010.
174. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Aug 1;92(16):7297–301. doi:10.1073/pnas.92.16.7297.
175. Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P. Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res*. 1996 May 1;225(2):186–94. doi:10.1006/excr.1996.0168.
176. Boon L, Ugarte-Berzal E, Vandooren J, Opdenakker G. Glycosylation of matrix metalloproteases and tissue inhibitors: present state, challenges and opportunities. *Biochem J*. 2016 Jun 1;473(11):1471-82. doi: 10.1042/BJ20151154. PMID: 27234584; PMCID: PMC4888457.
177. Gaurav Srivastava, Neeraj Gaur, Ravindra D. Makde, Sahayog N. Jamdar, Autoproteolysis of Procerain and Procerain B mediated by structural changes, *Phytochemistry*, Volume 196, 2022, 113086, ISSN 0031-9422,
178. Bider MD, Spiess M. Ligand-induced endocytosis of the asialoglycoprotein receptor: evidence for heterogeneity in subunit oligomerization. *FEBS Lett*. 1998 Aug 28;434(1-2):37-41. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00947-8. PMID: 9738447.

8 Anhang

8.1 Vektormap der bEnd.3_mep1a_C Zellen



9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Seine offene, freundliche und stets hilfsbereite Art haben mich während der gesamten Promotionszeit begleitet und wesentlich zu einem produktiven und angenehmen Arbeitsumfeld beigetragen.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. rer. nat. [REDACTED] bedanken, die mich während meiner Forschungsarbeit engagiert betreut hat. Sie war mir eine große Hilfe bei der Planung und Durchführung der Experimente, stand mir jederzeit mit fachlichem Rat und menschlicher Unterstützung zur Seite. Ihre Geduld, ihre Bereitschaft mir bei Unsicherheiten weiterzuhelfen, und ihr stets offenes Ohr haben meine Arbeit maßgeblich erleichtert. Hierfür bin ich sehr dankbar.

Ebenso will ich mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe für die kollegiale und hilfsbereite Zusammenarbeit sowie für die gemeinsamen Ausflüge und Abende bedanken, die dafür gesorgt haben, dass ich immer wieder gerne ins Labor zum Arbeiten gekommen bin.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und an mich geglaubt haben. Ohne ihren Rückhalt, ihre Geduld und Ermutigung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Praktika

01-04/2025 .	3. Tertial des Praktischen Jahres im Gesundheitszentrum Mainz (Allgemeinmedizin)
09-12/2024	2. Tertial des Praktischen Jahres in der HSK (Innere Medizin)
05-09/2024	1. Tertial des Praktischen Jahres in der HSK Wiesbaden (Chirurgie)
09/2023	Famulatur in der Praxis „OrthoDocs“ bei Dr.Hennen in Nieder-Olm (Orthopädie und Unfallchirurgie)
03/2023 .	Famulatur auf der Onkologie der Kinderklinik Universitätsklinikum Mainz
09/2022	Famulatur auf der Chest-Pain-Unit im Universitätsklinikum Mainz
09/2021	Famulatur in der Allgemeinmedizin (Dr. Regner, Mainz)
03/2020	Pflegepraktikum in der Universitätsmedizin Mainz
07-09/2019	Pflegepraktikum im Katholischen Klinikum Mainz
06/2017	Praktikum im Max-Planck-Institut für Chemie in Mainz
06/2016 .	Sozialpraktikum im Kindergarten „Wiese Kunterbunt“ in Klein-Winternheim

Bildungsweg

2021-2025: .	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Pathobiochemie Mainz in der Alzheimerforschung
2024	Praktisches Jahr an der Dr. Horst Schmidt Klinik in Wiesbaden
04/2024	Abschluss des 2. Staatsexamen innerhalb des Medizinstudiums
2021-heute: .	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Pathobiochemie Mainz in der Alzheimerforschung
08/2020:	Abschluss des 1. Staatsexamen innerhalb des Medizinstudiums
2018-heute:	Medizinstudium an der Johannes-Guttenberg-Universität Mainz

2010-2018: Willigis-Gymnasium Mainz (G8-Abitur)

2006-2010: Grundschule Martinus-Schule Mainz-Oberstadt

Sprachkenntnisse

Latein (Latinum)

Englisch B2/C1

Hobbys/Interessen

Fußball, Tischtennis und Musizieren