

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

Der Einfluss von Meprin  $\beta$  auf die Barriereigenschaften der Blut-Hirnschranke

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

Vorgelegt von

Markus Gindorf  
aus Trier

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	1
2	Abkürzungsverzeichnis .....	5
3	Abbildungsverzeichnis.....	7
4	Tabellenverzeichnis .....	8
5	Einleitung / Ziel der Dissertation.....	9
6	Literaturdiskussion .....	11
6.1	Mep1b .....	11
6.1.1	Struktur .....	11
6.1.2	Substrate und Spezifität.....	12
6.1.3	Expression und Regulation.....	13
6.1.4	Funktionen von Mep1b .....	14
6.2	Blut-Hirnschranke.....	21
6.2.1	Historische Entwicklung des BHS-Konzeptes.....	21
6.2.2	Blutgefäße des ZNS .....	22
6.2.3	Funktion und Aufbau/Bestandteile der BHS .....	23
6.2.4	Zusammenbruch der BHS .....	28
6.2.5	Verfahren zur Untersuchung der BHS Integrität .....	29
7	Material und Methoden.....	32
7.1	Reagenzien .....	32
7.1.1	Chemikalien.....	32
7.1.2	Antibiotika .....	35
7.1.3	Antikörper .....	35
7.1.4	Plasmide.....	36
7.1.5	Enzyme.....	36
7.1.6	Puffer und Lösungen .....	36
7.2	Geräte und Laborhilfsmittel .....	39
7.3	Verbrauchsmaterialien .....	41

7.4	Eukaryotische Zellen .....	42
7.5	Tiere und Tierhaltung .....	42
7.6	Software .....	43
7.7	Zellbiologische Methoden.....	43
7.7.1	Kultivierung immortalisierter Zellen.....	43
7.7.2	Stabile Transfektion von b.End.3 Zellen mittels retroviraler Infektion ....	43
7.7.3	Isolierung und Kultivierung primärer Maus- und Schweinehirnkapillarendothelzellen .....	47
7.7.4	Behandlung der Hirnendothelzellen mit löslichem Mep1b .....	48
7.7.5	BHS <i>in vitro</i> Modell .....	48
7.7.6	Isolation der Hirngefäße .....	50
7.7.7	Aktivitätsassays .....	51
7.8	In vivo Methoden.....	52
7.8.1	Isolierung von Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) .....	52
7.8.2	Messung des Hirnwassergehaltes .....	52
7.8.3	Bestimmung der Ventrikelgröße .....	53
7.9	Proteinbiochemische Methoden .....	53
7.9.1	Zellextraktion und Western Blot Analyse .....	53
7.10	Statistische Auswertung.....	54
8	Ergebnisse .....	55
8.1.1	Erniedrigte Expression des TJ Proteins Claudin-5 in Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellen .....	55
8.1.2	Herabgesetzte Barrierenintegrität in Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellen	56
8.1.3	Erhöhte TJ Proteinlevel in Gehirnkapillaren von Mep1b KO Mäusen ....	57
8.1.4	Erhöhter TER in primären Maushirnendothelzellen von <i>Mep1b</i> <sup>-/-</sup> Mäusen	61
8.1.5	Lösliches Mep1b ist in der Lage die Claudin-5 Expression <i>in vitro</i> zu reduzieren .....	62

8.1.6	Reduzierter IgG-Gehalt in Liquor von Mep1b KO Mäusen .....	63
8.1.7	Signifikante Veränderung des Hirnwassergehaltes in Mep1b KO Mäusen 65	
9	Diskussion .....	67
9.1	Mep1b als neuer Regulator der BHS Integrität.....	67
9.2	Auswirkungen der Mep1b Überexpression in bEnd.3 Zellen.....	69
9.3	Beeinflussung der TJ Proteine durch Mep1b und potenzielle Mechanismen 71	
9.3.1	Occludin.....	71
9.3.2	Claudin-5 u. ZO-1 .....	73
9.4	Endotheliales vs. Nichtendotheliales Mep1b, was ist für die Effekte auf die BHS verantwortlich? .....	74
9.5	Auswirkungen der TJ Dysregulation/BHS Beeinträchtigung durch Mep1b und potenzielle Bedeutung für andere Erkrankungen.....	76
9.5.1	Mep1b und Inflammation .....	77
9.5.2	Mep1b im Zusammenhang mit Gehirngefäßerkrankungen und Alzheimer 78	
9.6	Auswirkungen von Mep1b auf den Hirnwassergehalt .....	80
10	Zusammenfassung .....	83
11	Anhang .....	I
11.1	Zellbiologische Methoden .....	I
11.1.1	Kultivierung immortalisierter Zellen .....	I
11.2	Proteinbiochemische Methoden.....	III
11.2.1	Zellyse .....	III
11.2.2	Protein-Konzentrationsbestimmung .....	III
11.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	IV
11.2.4	Gießen der Gele.....	IV
11.2.5	Probenvorbereitung und Beladen der Gele .....	V
11.2.6	Elektrophorese Bedingungen .....	V

11.2.7	Westernblotanalyse .....	V
12	Danksagung .....	VIII
13	Tabellarischer Lebenslauf .....	IX
14	Literaturverzeichnis .....	XI

## **2 Abkürzungsverzeichnis**

A $\beta$  – Amyloid- $\beta$

AD – Alzheimer Erkrankung, Morbus Alzheimer

ADAMs – Disintegrin und Metalloproteinasen

ALS – Amyotrophe Lateralsklerose

AP-1 – Aktivator Protein-1

APP – Amyloidvorläuferprotein

BHS – Blut-Hirnschranke

CAA – zerebrale Amyloid Angiopathie

CSF – cerebrospinale Flüssigkeit, Liquor

ECM – extrazelluläre Matrix

ECGF – Endothelzellwachstumszusatz

FAD – Familiäre Alzheimererkrankung

Fra-2 – Fos-related antigen 2

HD – Chorea Huntington

HMK – Hochmolekularer-Multiprotein-Komplex

ISF – interstitielle Flüssigkeit

IPAH – idiopathische pulmonale arterielle Hypertension

KLK – Kallikrein-related Peptidases

KO - Knockout

Mep1b – Meprin  $\beta$

Mep1b KO – Meprin  $\beta$  knockout

MMP – Matrix Metalloprotease

MS – Multiple Sklerose

NVU – Neurovaskuläre Einheit

PD – Morbus Parkinson

PDS – plasma derived bovine serum = aus Plasma gewonnenes Rinderserum

pMBCECs – primäre Maushirnendothelzellen

SVD – Small vessel disease

TBS – Tris-gepufferte Salzlösung

TBS-T – Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20

TER – transendothelialer elektrischer Widerstand

TJ – Tight Junction

u.a. -- unter anderem

v.a. – vor allem

VSV – vesikuläres Stomatitis-Virus

WT - Wildtyp

ZNS – Zentrales Nervensystem



### 3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Mep1b	11
Abbildung 2: Übersicht der Funktionen von Mep1b	17
Abbildung 3: APP Prozessierung durch Mep1b	20
Abbildung 4: Aufbau und Komponenten der BHS und TJs	25
Abbildung 5: Stabile Transfektion von Mep1b in bEnd.3 Endothelzellen mittels retroviraler Infektion	43
Abbildung 6: Messung von TER und Permeabilität im BHS <i>in vitro</i> Modell	47
Abbildung 7: Prinzip des Aktivitätsassays zur Untersuchung von Proteasensubstraten	50
Abbildung 8: Erniedrigte Expression des TJ-Proteins Claudin-5 in Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellen	53
Abbildung 9: Herabgesetzte Barrierenintegrität in Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellen	54
Abbildung 10: Erhöhte TJ Proteinlevel in Hirnkapillaren von Mep1b KO Mäusen	56
Abbildung 11: Erhöhte Mep1b Aktivität in Hirngefäßen von Mep1b WT Mäusen	57
Abbildung 12: Die zweite extrazelluläre Occludinschleife wird von Mep1b <i>in vitro</i> geschnitten	58
Abbildung 13: Erhöhter TER in primären Hirnendothelzellen von Mep1b KO Mäusen	60
Abbildung 14: Reduktion der Claudin-5 Expression in Endothelzellen durch Behandlung mit löslichem Mep1b	61
Abbildung 15: Reduzierter IgG-Gehalt in Liquor von Mep1b KO Mäusen	62
Abbildung 16: Erniedrigter Hirnwassergehalt in Mep1b KO Mäusen	64
Abbildung 17: Auswirkungen der Mep1b Expression auf die Integrität der BHS im Tiermodell	67
Abbildung 18: Mep1b zeigt starke Expression in HMP aus Mausgehirnen, der $\gamma$ -Sekretase Proteine enthält, während Hauptteil von Bace-1 im NMP läuft	79
Abbildung 19: Verhältnis von Hirnwassergehalt und Hirnschwellung	81

## 4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mep1b Substratübersicht.....	13
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Primärantikörper.....	35
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.....	35
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Plasmide.....	36
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Enzyme.....	36
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien in der Zellkultur.....	37
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen in Gelelektrophorese und Western Blot.....	38
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Puffer in der Proteinbiochemie.....	39
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Zelllinien.....	42
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Mauslinien.....	42
Tabelle 11: Pipettierschema BCA Proteinbestimmung.....	Anhang III

## 5 Einleitung / Ziel der Dissertation

Das stabile und präzise Schneiden von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen. Dieser als Proteolyse bezeichnete Vorgang wird von entsprechenden Enzymen, den Proteasen, katalysiert. Durch die proteolytische Aktivierung oder Inaktivierung von Zytokinen, Hormonen, Wachstumsfaktoren oder anderen Enzymen werden grundlegende zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose gesteuert. Dysregulationen der proteolytischen Aktivität und Expression gehen dagegen mit verschiedenen Krankheitszuständen einher. Inwiefern verschiedene Proteasen und ihre Substrate als klinische Therapieansatzpunkte in gewissen Krankheiten fungieren können, ist aktuell Gegenstand vieler klinischer Studien, jedoch wurden von den insgesamt 570 bekannten humanen Proteasen bisher nur einige wenige nähergehend untersucht. Aus diesem Grund gibt es aktuell nur ein begrenztes Maß an Wissen bezüglich potenzieller Substrate und ausgeübten Funktionen. Daher ist es umso wichtiger einzelne Proteasen genau in diesen beiden Bereichen zu erforschen, da mit der Entwicklung und Anwendung von spezifischen Enzyminhibitoren vielversprechende therapeutische Ansätze für etwaige Dysregulationen zur Verfügung stehen (1-3).

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich nun mit solch einer bisher noch wenig untersuchten Protease, Mep1b (Mep1b). Diese Metalloprotease wurde ursprünglich durch ihre hohe Expression in Niere und Darm entdeckt, weshalb sich die Forschung zunächst auf Funktionen und Effekte in diesen Organen beschränkte. Mittlerweile wurde aber ein viel umfangreicheres Expressionsmuster für Mep1b entdeckt, so dass von einer Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen ausgegangen werden kann. Unter anderem wurde beispielsweise eine Beteiligung in der Bindegewebssynthese, in inflammatorischen Vorgängen und der Neurodegeneration beschrieben (4). Obwohl ansonsten über die physiologischen Rollen von Mep1b in vielen Fällen noch wenig bekannt ist, konnte in mehreren Studien ein Zusammenhang der Mep1b Aktivität mit der Integrität von physiologischen Barrieren in Niere, Darm und Haut beobachtet werden. Als extrazelluläre Protease ist Mep1b in der Lage Komponenten der extrazellulären Matrix in verschiedenen Geweben zu schneiden und darüber hinaus auch Zell-Adhäsionsmoleküle zu prozessieren, die als direkte Zellkontakte essenziell für die Integrität dieser Zellbarrieren sind (4-8).

Solche physiologischen Barrieren gibt es in vielen Geweben des Körpers, und zwar immer dort, wo der Austausch zwischen zwei Kompartimenten reguliert werden muss. So werden Schranken zwischen dem Blut und anderen Organen beispielsweise als, Blut-Hoden, Blut-Harn (Niere) oder Blut-Hirnschranke bezeichnet, aber im Prinzip stellen auch alle anderen Epithelien wie die Haut oder die Darmschleimhaut physiologische Körperbarrieren dar, die den Übertritt von Stoffen und Pathogenen regulieren und so eine Schutzfunktion übernehmen (9-13).

Kommt es zu Störungen oder einem vollständigen Zusammenbruch dieser Schranken, führt dies zu fatalen Folgen, was beispielsweise für die Blut-Hirnschranke (BHS) ausführlich untersucht wurde. Diese reguliert den molekularen Austausch zwischen Blut und Gehirn und schützt die empfindlichen Nervenzellen vor Pathogenen und Toxinen aus dem Blutkreislauf. Spezielle Zell-Adhäsionskontakte, die sogenannten Tight Junctions (TJ), sorgen für einen hohen elektrischen Widerstand und eine niedrige endotheliale Durchlässigkeit der BHS, indem sie den parazellulären Raum der benachbarten Hirnendothelzellen verschließen. Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Krankheit, Parkinson und Multiple Sklerose kommt es als gemeinsames Merkmal zu einem Zusammenbruch der BHS, die mit der Zerstörung der TJs einhergeht (14-17).

Interessanterweise wurde für Mep1b eine erhöhte Transkription in den Gehirnen von Patienten mit nachgewiesener Alzheimer Erkrankung beschrieben. Darüber hinaus zeigt Mep1b aber auch unter physiologischen Bedingungen eine erhöhte Transkriptionsrate im Gehirn, verglichen mit den meisten anderen Organen, was den Gedanken nahelegt, dass Mep1b eventuell auch für zerebrale Zell-Adhäsionsangelegenheiten von Bedeutung sein könnte (18, 19). Angesichts der Kombination aus der Fähigkeit Zell-Adhäsionsmoleküle zu spalten, physiologische Barrieren zu beeinflussen und einer erhöhten Transkriptionsrate im Gehirn stellt sich nun die Frage, ob Mep1b auch einen Effekt auf die TJs des Hirnendothels ausübt und somit die Integrität der BHS beeinflusst. Diese Hypothese ist der Ausgangsgedanke dieser Dissertation und wurde im Folgenden sowohl *in vitro* in Mep1b überexprimierenden Maus-Hirnendothelzellen als auch *in vivo* in Mep1b knockout (Mep1b KO) Mäusen untersucht. Hierfür wurde sowohl die Proteinexpression verschiedener TJ Proteine und deren potenzielle Prozessierung durch Mep1b als auch die Integrität der BHS mithilfe diverser Experimente (u.a. *in vitro* BHS-Modell, Widerstandsmessung, Permeabilität gegenüber biologischen Markern) analysiert.

## 6 Literaturdiskussion

### 6.1 Meprin $\beta$

#### 6.1.1 Struktur

Die Metalloprotease Mep1b ist ein Mitglied der Familie der Zinkendopeptidasen. Als dimeres Typ I Transmembranprotein fungiert Mep1b als extrazelluläre Protease an der Zelloberfläche (20). Typ I Transmembranproteine durchspannen die gesamte Zellmembran und setzen sich aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer zytosolischen Domäne zusammen, wobei der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus im Zytosol liegt (21). Der Aufbau von Mep1b ist in der Abbildung 1 schematisch dargestellt. An dem im Zytoplasma liegenden kleinen C-terminalen Schwanz schließt sich eine Transmembrandomäne an, die die Protease in der Zellmembran verankert. Darauf folgen mehrere extrazelluläre Domänen. Die Dimerisierung der Protease wird hierbei durch eine Disulfidbrücke zwischen den beiden MAM-Domänen (Meprin A5 Protein Tyrosinphosphatase  $\mu$ ) vermittelt. N-Terminus befinden sich abschließend eine Proteasen-Domäne, die essenziell für die Prozessierungsfunktion des Enzyms ist und ein Propeptid (22).

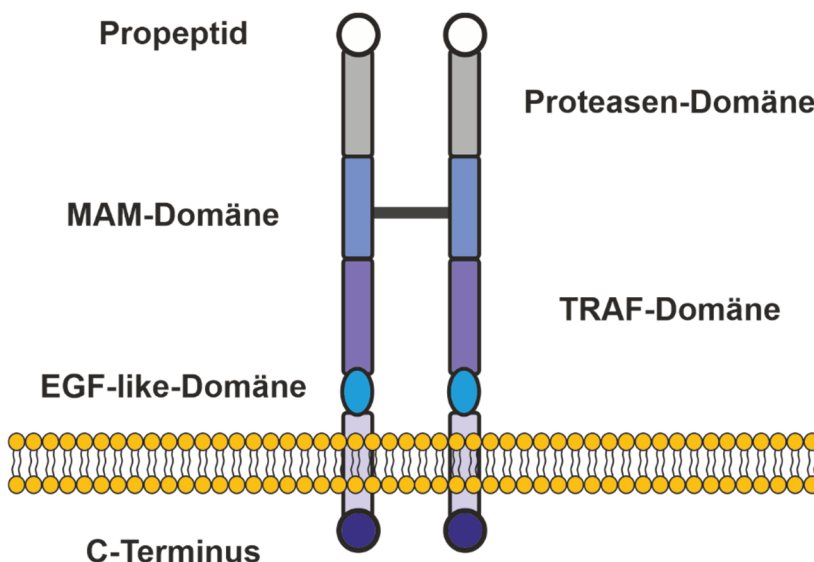


Abbildung 1: Struktur von Mep1b, in Anlehnung an (23)

Da Mep1b wie viele andere Proteasen als inaktives Zymogen exprimiert wird, muss es erst durch das Abspalten des Propeptides aktiviert werden, damit es voll funktionsfähig

ist. Diese Aufgabe wird für membrangebundenes Mep1b von der Serinprotease Matriptase-2 übernommen (24). In erster Linie liegt Mep1b physiologisch im oben beschriebenen membrangebundenen Zustand vor, jedoch kann das Enzym auch durch andere Proteasen wie ADAM 10 und 17 von der Zelloberfläche getrennt werden und dann als lösliche Protease agieren (5). Als Aktivatoren für lösliches Mep1b wurden bisher Trypsin und die Kallikrein-related Peptidases (KLK) 4,5 und 8 beschrieben (25).

### 6.1.2 Substrate und Spezifität

Mep1b nimmt neben der oben beschriebenen Struktur auch hinsichtlich seiner Substratspezifität eine einzigartige Stellung unter den extrazellulären Proteasen ein, da diese besonders stark ausgeprägt ist (24). Interessanterweise können hierbei membrangebundenes und lösliches Mep1b eine unterschiedliche Substratspezifität aufweisen. So wird beispielsweise der Interleukin-6 Rezeptor von membrangebundenem Mep1b prozessiert, während die lösliche Form dazu nicht im Stande ist (26). Ein weiterer Hinweis für die hohe Spezifität von Mep1b ist die Beobachtung, dass das Enzym eine ausgeprägte Präferenz für negativ geladene Aminosäuren im Schnittstellenbereich seiner Substrate zeigt (23). So unterscheidet sich Mep1b durch diese Substratspezifität zum Beispiel von den Matrix Metalloproteasen (MMPs), die unspezifisch fast alle Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) schneiden (20). In Tabelle 1 ist eine Übersicht an Mep1b Substraten, die bisher in der Literatur beschrieben worden sind, aufgelistet. Jedoch gibt es mehr als 100 zusätzliche potenzielle Substrate für die Metalloprotease, so dass sich diese Übersicht mit hoher Wahrscheinlichkeit in den nächsten Jahren vergrößern wird (27).

<b>Substrate</b>	<b>Referenz</b>		<b>Substrate</b>	<b>Referenz</b>
ADAM 9	(5)		Kollagen I	(28) (29)
ADAM10	(5)		Kollagen IV	(30)
ADAMTS-1	(5)		Laminin	(31)
APP	(18)		MMP1	(5)
BMP-1	(5)		MMP7	(5)
Cerulein	(32)		Mucin 2	(33)
CD99	(34)		Neuropeptid Y	(32)
E-Cadherin	(8)		Nidogen 1	(35)

Fibronectin	(30)		Orcokinin	(32)
Gastrin	(32)		Osteopontin	(32)
Gastrin 17	(32)		PCSK9	(5)
GRP-(14-27)	(32)		Peptide YY	(32)
Glucagon	(32)		Procollagen III	(29)
IL-1 $\beta$	(36)		proKLK7	(25)
IL-6	(37)		sCCK8NH2	(32)
IL-6-Rezeptor	(26)		Sekretin	(32)
IL-18	(38)		Tenascin-C	(7)
Kinetensin	(32)			

**Tabelle 1: Mep1b Substratübersicht**

### 6.1.3 Expression und Regulation

Mep1b wurde ursprünglich in den 1980er Jahren durch seine hohe Expression in Niere und Darm entdeckt, weshalb sich die Forschung zunächst auf gewebespezifische Effekte beschränkte. In einer Studie von Sterchi et. al wurde damals bei Patienten eine unerwartete proteolytische Aktivität im Darm gefunden, obwohl diesen zuvor das Pankreas und somit auch dessen Verdauungsenzyme entfernt worden waren (39). Die verantwortliche neue Metalloprotease Mep1b konnte zudem von einer anderen Forschungsgruppe in einer hohen Konzentration in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus von Mausnieren nachgewiesen werden, wo Mep1b 5% aller Membranproteine ausmacht (40, 41). Mittlerweile wurde aber ein über Niere und Darm hinausgehendes Expressionsmuster für Mep1b beschrieben, so dass von einer Beteiligung an einer Vielzahl von verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ausgegangen werden kann. Zu den Mep1b exprimierenden Geweben zählen die Haut, das Gehirn, Immunzellen wie Leukozyten oder Makrophagen, aber auch glatte Gefäßmuskulatur oder Endothelzellen (4, 20).

Als wichtiger Regulator der Mep1b Expression wurde der Transkriptionsfaktor Aktivator Protein-1 (AP-1) beschrieben (20). Sowohl in glatter Gefäßmuskulatur als auch in Immun-, Epithel- und Endothelzellen konnte in transgenen Fos-related antigen 2 (Fra-2) Mäusen eine erhöhte Mep1b Expression nachgewiesen werden (20, 42, 43). Fra-2 ist hierbei ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1, der die Mep1b

Expression induziert. Generell wird die AP-1 Expression und Aktivierung wiederum durch verschiedene Signalkaskaden angestoßen, an deren Anfang externe Stimulatoren wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine stehen. Aktivierte AP-1 Komplexe gelangen dann nach ihrer Phosphorylierung aus dem Zytoplasma in den Zellkern und induzieren dort die Expression von Mep1b und anderen AP-1 Zielgenen. Neben Mep1b reguliert AP-1 viele verschiedene zelluläre Prozesse wie Apoptose, Zellproliferation, Wundheilung und Krebs (20, 44). Daher ist es auch nachvollziehbar, dass Dysregulationen der Mep1b Expression oft mit pathologischen Umständen wie Neurodegeneration, Fibrose oder chronischen Entzündungen verbunden sind (4).

Neben der transkriptionellen Regulation ist es bei Proteasen jedoch auch wichtig, auf die wirkliche katalytische Effizienz des Substratumsatzes zu achten. Die proteolytische Aktivität einer Protease korreliert nämlich nicht eins zu eins mit ihrer Expressionsrate (23). Ein gutes Beispiel liefert hierbei die Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins (APP). Dieses wird sowohl durch Mep1b als auch durch das Enzym Bace-1 geschnitten, wobei Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) Peptide entstehen, die nach der Amyloid-Hypothese als einer der Hauptfaktoren für die Entstehung der Alzheimer Erkrankung angesehen werden (6, 45, 46). Sowohl für Mep1b als auch Bace-1 wurden erhöhte Expressionslevel in der Alzheimererkrankung beschrieben, wobei Bace-1 sowohl bei Gesunden als auch bei Alzheimerpatienten deutlich höhere Konzentrationen im Gehirn aufweist (19, 23, 47). Interessanterweise konnte aber *in vitro* gezeigt werden, dass Mep1b eine mehr als 100-fach höhere katalytische Effizienz gegenüber APP-Peptidsubstraten im Vergleich zu Bace-1 besitzt, was darauf hindeutet, dass die alleinige Betrachtung der Expressionslevel für die Funktionsanalyse von Proteasen oft nicht ausreichend ist (48).

#### **6.1.4 Funktionen von Mep1b**

Im folgenden Abschnitt wird nun auf einige der bekannten physiologischen Funktionen von Mep1b eingegangen (s. Abbildung 2). Darüber hinaus werden Erkrankungen und pathologische Prozesse aufgezeigt, die mit einer Dysregulation der Mep1b Expression einhergehen. Mep1b nimmt unter anderem eine essenzielle Rolle in der Bindegewebssynthese ein und ist an der Regulation der Barrierefunktion der intestinalen Schleimschicht beteiligt (6, 29, 33). Die Protease verfügt über eine proinflammatorische Aktivität und zeigt neben einer wichtigen Rolle in Fibroseerkrankungen eine Assoziation mit Pathologien, die mit einer



Funktionseinschränkung physiologischer Barrieren einhergehen (chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Nierenversagen, Alzheimer, Krebs) (23, 48-50).

#### **6.1.4.1 Kollagensynthese und Erkrankungen des Bindegewebes**

Eine der wenigen gut beschriebenen physiologischen Funktionen von Mep1b stellt die Rolle der Protease in der Kollagensynthese dar. Hier induziert das Enzym die Entstehung der Kollagenfibrillen, indem es die N- und C- terminalen Prodomänen des fibrillären Prokollagen I u. III abspaltet (29, 51). Im Gegensatz zu anderen Kollagenprozessierenden Enzymen, die jeweils auf eine Prodomänenseite beschränkt sind, kann Mep1b an beiden Enden des Prokollagens agieren und somit unabhängig die Kollagensynthese vorantreiben. Diese Prozessierung ist essenziell für ein geordnetes Ablaufen des Kollagensyntheseprozesses, weshalb eine Dysregulation in der Mep1b Expression auch mit Erkrankungen des Bindegewebes assoziiert ist (20, 23).

So zeigen beispielsweise Mep1b KO Mäuse einen reduzierten Kollagengehalt in der Haut, der mit einer herabgesetzten Zugfestigkeit einhergeht (29). Dieser Phänotyp zeigt große Parallelen zum Ehlers-Dahnlos-Syndrom, bei dem ein Defekt der Kollagensynthese unter anderem ebenfalls in einer massiven Dehnbarkeit der Haut resultiert (23, 52). Eine Mep1b Überexpression führt dagegen zu einer massiven Vermehrung von ECM und konnte sowohl bei fibrotischen Prozessen der Haut (Keloide) als auch der Lunge (idiopathische pulmonale arterielle Hypertension = IPAH) beobachtet werden (42, 51). Keloide sind fibrotische Tumoren, die durch massive Ablagerungen von Kollagenfasern (v.a. Typ I u. III) entstehen und als hypertrophe Narben erscheinen (53). Bei der IPAH handelt es sich dagegen um eine Erkrankung des pulmonalen Gefäßsystems, die als Folge eine Lungenfibrose auftritt. Als Entstehungsfaktoren werden neben einer erhöhten ECM Produktion auch inflammatorische Prozesse gesehen (20, 54). Interessanterweise konnte in Lungen von IPAH Patienten eine Überexpression von Fra-2 detektiert werden, dass wie oben beschrieben als Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktors die Mep1b Expression stimuliert (23).

Neben Procollagen ist Mep1b zudem auch in der Lage andere Bestandteile der ECM des Bindegewebes zu schneiden (7, 30, 55) . Durch diese Prozessierung können proinflammatorische Fragmente entstehen, die den Fibrosierungsprozess weiter verstärken (20). Da Mep1b aber auch unabhängig hiervon proinflammatorische Zytokine aktivieren kann und so auch generell zu Entzündungsgeschehen beiträgt, nimmt die Protease in Fibroseerkrankungen eine regulierende Schlüsselrolle ein, da

sie sowohl Einfluss auf den Beginn (chronische Entzündung) als auch die Progression der Erkrankung (erhöhte ECM Bildung + Generierung proinflammatorischer Fragmente) hat (23, 56). Fibrose und Inflammation verstärken sich dementsprechend gegenseitig, weshalb die Entwicklung und Anwendung von Mep1b Inhibitoren als eine vielversprechende Therapieoption von Fibroseerkrankungen wie IPAH oder Keloiden angesehen wird (23).

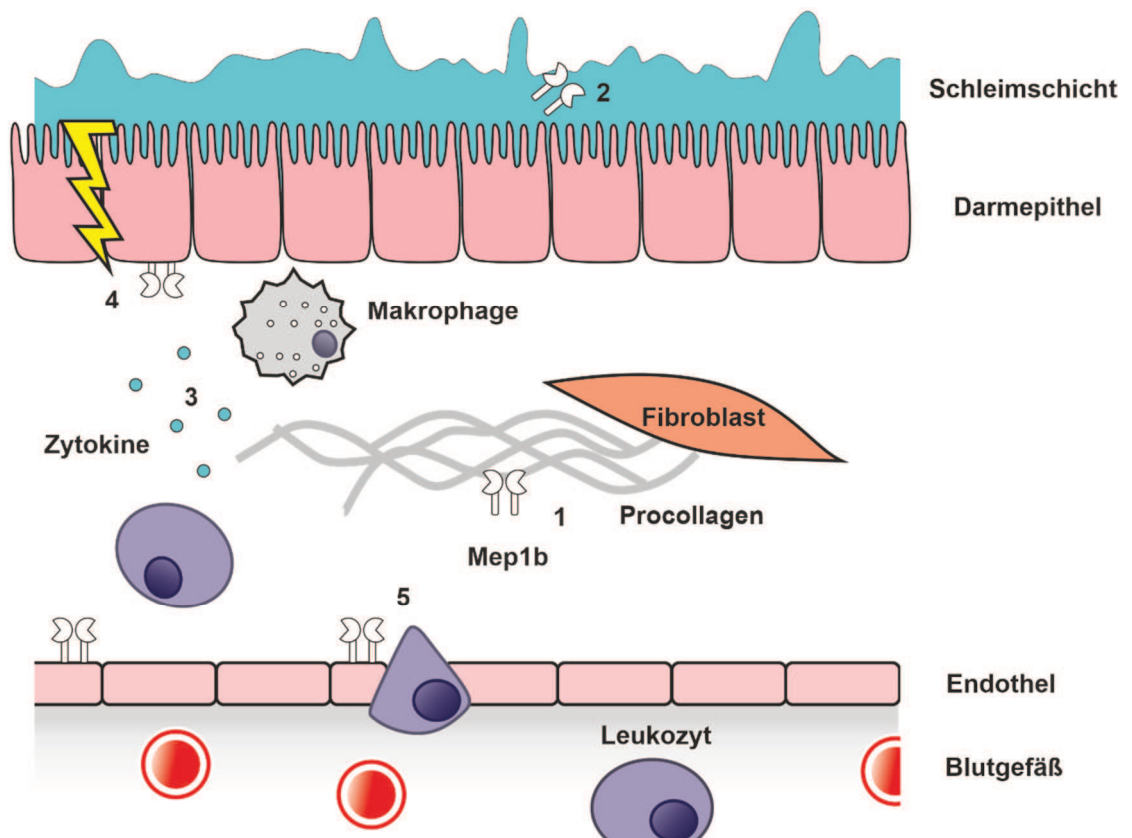
#### **6.1.4.2 Chronische Entzündung**

Chronische Entzündungen gehen oft mit zusätzlichen Erkrankungen wie Krebs oder Fibrosen einher (23). Für beide Pathologien wurde eine erhöhte Mep1b Expression beschrieben, was darauf hindeutet, dass die Protease hier einen vielfältigen Einfluss ausübt (4, 20). Mep1b ist in der Lage die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Makrophagen (Interleukin-1 $\beta$ , 6 und 18) oder Epithelzellen der Haut (Interleukin-8) zu induzieren (56, 57). Diese können dann zu einer zytokinvermittelten Immunantwort führen, bei der es zu einer Rekrutierung von Immunzellen in das entzündete Gewebe kommt. Hierfür müssen sich die Immunzellen im Rahmen der sogenannten Diapedese aus dem Blut durch transendotheliale Migration zwischen den dicht gepackten Endothelzellen der Blutgefäße in das dahinter liegende Gewebe zwängen (58).

Mep1b unterstützt diese Zellmigration in mehrerlei Hinsicht. Einerseits schneidet es das Adhäsionsprotein cd99 der Leukozyten *in vitro* und führte so in Studien zu einer Induktion der transendothelialen Leukozytenmigration (34). Andererseits erleichtert die Protease durch die Prozessierung von ECM und Zell-Adhäsionsproteinen und dem daraus resultierenden Verlust von Zell-Kontakten den Durchtritt der Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe (23, 59). So berichteten Crisman et al. beispielsweise, dass die Fähigkeit durch die ECM zu wandern in Leukozyten von Mep1b KO Mäusen gegenüber WT Kontrollen signifikant verschlechtert war (59).

Mep1b vermittelte Immunantworten wurden bereits in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) oder im akutem Nierenversagen beobachtet (4). Interessanterweise übernimmt Mep1b im Darm physiologisch eigentlich eine Schutzfunktion, indem die Protease das Ablösen der luminalen Schleimschicht unterstützt und somit einem bakteriellen Überwuchs des Darmepithels entgegenwirkt (33). Diese Aufgabe kann jedoch nur von löslichem Mep1b erfüllt werden, da membrangebundenes Mep1b über keinen Zugang zu den Schnittstellen der Mucusproteine verfügt (27).

Kommt es jedoch zu einem inflammatorischen Geschehen, wie beispielsweise bei Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, stimuliert Mep1b dagegen auf der basalen Seite des Darmepithels den Entzündungsprozess, indem es den Interleukin-6 Rezeptor spaltet und somit eine inflammatorische Signalkaskade auslöst (26). Auch in der Niere, die neben dem Darm die höchste Mep1b Expression aufweist, wird die Protease in Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen gebracht. Mep1b zeigt hier eine Korrelation mit Harnwegsinfekten und übt eine nephrotoxische Wirkung im Rahmen eines akuten Nierenversagens bei Nagetieren aus (4, 50). Die akute Nierenschädigung wird hierbei im Experiment durch eine Minderperfusion des Nierengewebes erzeugt, die zu einer unmittelbaren inflammatorischen Immunantwort führt (60). Interessanterweise verschiebt sich auch in diesem Rahmen der Ort der Mep1b Expression von der eigentlich physiologischen apikalen zur basolateralen Seite der proximalen Nierentubuluszellen (31, 61). Hier spaltet die Protease dann verschiedene Bestandteile der ECM (Laminin, Nidogen) und Zell-Adhäsion-Moleküle (E-Cadherin, Tenascin-C) und führt so neben einer Schädigung der tubulären Basalmembran zu einer erhöhten Leukozytenmigration ins entzündete Gewebe (4, 7, 30, 31). Anhand dieser aufgeführten Beispiele zeigt sich, dass Mep1b eine vielfältige Rolle in inflammatorischen Prozessen einnehmen kann.



**Abbildung 2: Übersicht der Funktionen von Mep1b, in Anlehnung an (23).**

1 Kollagensynthese und ECM Umsatz mit Generierung proinflammatorischer Fragmente, 2 Ablösen der intestinalen luminalen Schleimschicht, 3 Beteiligung an inflammatorischen Prozessen in Darm und Niere mit Wechsel der Expression von apikal nach basal, 4 Generierung proinflammatorischer Zytokine die Immunzellen aktivieren, 5 Erleichterung der transendothelialen Migration von Immunzellen durch Spaltung von Zell-Kontakten und ECM

### 6.1.4.3 Alzheimer Erkrankung

Wie bereits weiter oben beschrieben, wird Mep1b auch mit der Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht. Bevor jedoch genauer auf die potenzielle Rolle der Protease in der Pathologie eingegangen wird, werden an dieser Stelle zunächst einige Grundlagen zur Erkrankung aufgeführt, um das Verständnis zu erleichtern.

Morbus Alzheimer („Alzheimer´s Disease“, AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die überwiegend im höheren Alter auftritt und mit einer progressiven Abnahme der kognitiven Leistung einhergeht. Obwohl die Erkrankung bereits 1906 zum ersten Mal von ihrem Entdecker Alois Alzheimer beschrieben wurde, ist bisher weder die genaue Ursache der Erkrankung bekannt noch gibt es eine wirksame kausale Therapie (62, 63). Man unterscheidet bei der Alzheimer Erkrankung zwischen

einer häufigen sporadischen und einer sehr seltenen familiären Form (FAD), die weniger als 0,5% aller AD Fälle ausmacht. Während Patienten mit der sporadischen Form Symptome meistens erst ab dem 65. Lebensjahr (late onset AD) entwickeln, zeigen sich diese bei der FAD schon häufig zwischen dem 30.-55. Lebensjahr (early onset AD) (64, 65). Die genaue Ätiologie der sporadischen Form ist bisher weiterhin unbekannt. Es wird jedoch von einem Zusammenspiel aus 70% genetischen und 30% Umweltfaktoren ausgegangen. Das APOE Gen, das die drei verschiedenen Ausprägungen  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  und  $\epsilon 4$  einnehmen kann, wird hierbei als größte Risikofaktor für die sporadische AD angesehen, da sowohl heterozygote als auch homozygote  $\epsilon 4$  Träger gegenüber Nichtträgern ein mehrfach erhöhtes Risiko aufweisen Alzheimer zu bekommen (62). Der FAD liegt dagegen ein autosomal-dominanter Erbgang zugrunde. Hierbei sind Gene betroffen, die bei einer Mutation zu einer gesteigerten Prozessierung von APP führen (64). Im Rahmen dieser Prozessierung werden vermehrt A $\beta$ -Peptide durch zwei aufeinanderfolgende Enzymschnitte des APP durch eine  $\beta$ - und eine  $\gamma$ -Sekretase generiert (s. Abbildung 3). Die A $\beta$ -Peptide, die aus 40 oder 42 Aminosäuren bestehen sammeln sich extrazellulär an und bilden die alzheimer typischen Amyloidplaques (62). Durch die Ausbildung von Poren können A $\beta$ -Peptide unter anderem die Neuronen schädigen und demnach eine neurotoxische Wirkung entfalten (66).

Bis heute kann die definitive Alzheimer-Diagnose erst post mortem durch den neuropathologischen Nachweis intrazellulärer Tau-Fibrillen, die aus hyperphosphoryliertem Tau-protein bestehen und besagten extrazellulären A $\beta$  Amyloidplaques gestellt werden. Nach der heute unter Wissenschaftlern weit verbreiteten Amyloid-Hypothese, sind sowohl die Tau-fibrillen als auch die beobachtete Neurodegeneration in den Gehirnen der AD Patienten jedoch nur sekundäre Folgeprozesse, die durch eine Ansammlung pathologischer A $\beta$ -Formen angestoßen werden. Ein Ungleichgewicht zwischen A $\beta$ -Produktion und Clearance wird für diese Akkumulation verantwortlich gemacht und als Ausgangspunkt der Alzheimer Erkrankung gesehen (62, 63, 67).

Wie bereits oben erwähnt wird die Protease Bace-1, die als  $\beta$ -Sekretase fungiert, für den Hauptteil der A $\beta$ -Produktion verantwortlich gemacht. An dieser Stelle kommt nun Mep1b ins Spiel, das ebenfalls in der Lage ist APP als  $\beta$ -Sekretase zu schneiden und somit A $\beta$  zu generieren (6) (s. Abbildung 3). Obwohl es in viel geringeren Konzentrationen im Gehirn als Bace-1 vorzuliegen scheint, kann Mep1b APP mit einer

um mehr als 100-fach höheren katalytischen Effizienz prozessieren (48). Darüber hinaus erfolgt der Mep1b Schnitt im Gegensatz zu Bace-1 bereits im Golgi-Apparat und an der Zelloberfläche während Bace-1 APP erst nach endosomaler Internalisierung prozessieren kann (19, 47). Ein weiteres Indiz für eine potenziell wichtige Rolle von Mep1b in der APP-Prozessierung, stellt die Beobachtung dar, dass in den Hirnen von AD Patienten neben den normalen A $\beta$ -Formen auch N-Terminal trunkierte A $\beta$ -Peptide detektiert wurden, die nicht durch Bace-1, aber sehr wohl durch Mep1b, generiert werden können. Diese N-Terminal trunkierten A $\beta$ -Formen zeigen eine stärkere Tendenz zur Aggregation und wirken somit womöglich sogar neurotoxischer als normale A $\beta$ -Formen (48).

Interessanterweise zeigte sich bei der Analyse einer Alzheimer protektiven APP-Mutation (APP A673T), dass sowohl die APP-Prozessierung durch Bace-1 als auch durch Mep1b stark vermindert ist, was zumindest eine zusätzliche Beteiligung von Mep1b neben Bace-1 an der Alzheimer Entstehung vermuten lässt (6). Womöglich wurde dieser Effekt sogar lange unterschätzt beziehungsweise sogar übersehen, da eine bestimmte APP-Mutation (APP<sup>swe</sup>), die vielfach zur Analyse der Alzheimer-Erkrankung im Mausmodell eingesetzt wird, die Produktion N-Terminal trunkierter A $\beta$ -Peptide durch Mep1b unterbindet und so die Protease massiv in ihrer Funktion einschränkt (19) (s. Abbildung 3). Angesichts erhöhter Mep1b mRNA und Expressionslevel in den Gehirnen von AD Patienten stellt Mep1b somit bei weiterhin ausbleibenden Therapieerfolgen von Bace-1-Inhibitorstudien eine weitere vielversprechende Option für die Behandlung der Alzheimer Erkrankung dar (19, 22, 68).

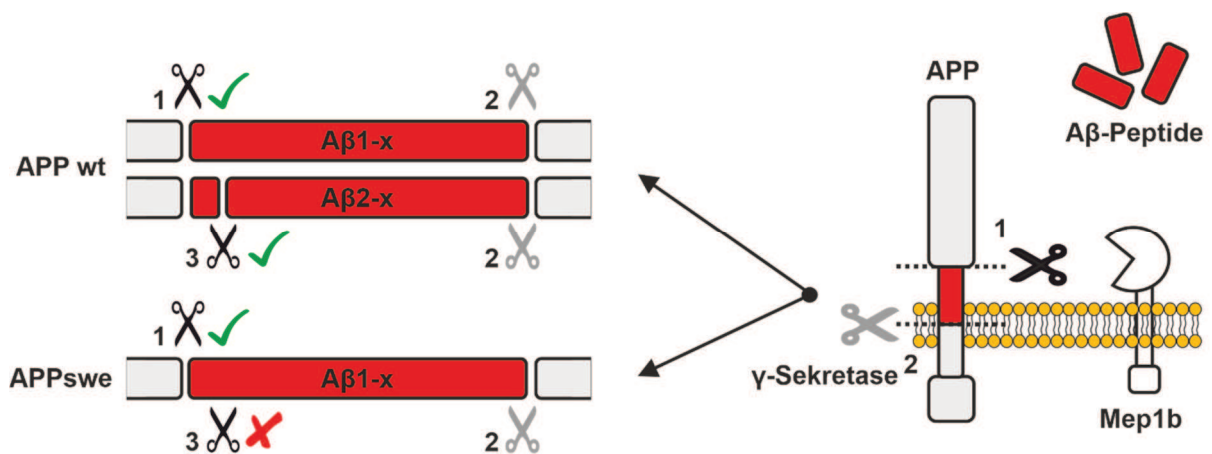


Abbildung 3: APP Prozessierung durch Mep1b, in Anlehnung an (6)

Beschriftung: 1: APP Schnittstelle für Mep1b und Bace-1, Generierung von A $\beta$ 1-x Peptidformen, 2: APP Schnittstelle für  $\gamma$ -Sekretase, 3: zusätzliche APP Schnittstelle für Mep1b, Generierung von N-Terminal trunkierten A $\beta$ 2-x Peptidformen. In der Abbildung ist die APP-Prozessierung durch Mep1b im APPwt und der FAD Mutation APP<sup>sw</sup>e dargestellt. APP wird durch Mep1b und die  $\gamma$ -Sekretase geschnitten, so dass die extrazellulären A $\beta$ -Peptide entstehen, die als Hauptpathogen der AD gesehen werden. Mep1b ist in der Lage eine ungekürzte und eine n-terminal trunkierte A $\beta$ -Form zu bilden. Zu beachten ist, dass die Generierung von N-Terminal trunkierten A $\beta$ 2-x Peptidformen durch Mep1b in der APP<sup>sw</sup>e Mutation nicht möglich ist.

## 6.2 Blut-Hirnschranke

Unabhängig von der Alzheimer-Erkrankung zeigt Mep1b auch generell im Gehirn eine erhöhte Transkription gegenüber den meisten anderen Organen (18). Wie im Funktionskapitel beschrieben ist die Protease in der Lage Zell-Adhäsionsproteine in verschiedenen Geweben zu zerschneiden und weist zudem eine Assoziation mit Erkrankungen auf, die mit einer Beeinträchtigung von Barrierefunktionen einhergehen (4-8). Darüber hinaus konnte im Rahmen der idiopathischen Pulmonalen arteriellen Hypertonie (IPAH) eine erhöhte Mep1b Expression in Endothelzellen gepaart mit einer vaskulären Pathologie beobachtet werden (20).

Angesichts dieser Expression in Gehirn und Endothelzellen in Kombination mit neurodegenerativen und vaskulären Pathologien und der Fähigkeit Zell-Adhäsionsproteine zu schneiden, stellt sich nun unweigerlich die Frage, ob Mep1b auch einen Einfluss auf die Zell-Adhäsionsproteine der Blut-Hirnschranke (BHS) ausübt. Deren Integrität hängt in erster Linie von der Dichtigkeit der Endothelzellen in den Hirngefäßen ab. Die Endothelzellen werden durch spezielle Zell-Adhäsionsmoleküle, die sogenannten Tight Junctions (TJ), eng miteinander verbunden und regulieren so den Austausch zwischen Blut und zentralem Nervensystem (ZNS) (14-17).

In der vorliegenden Dissertation wurde genau dieser potenzielle Einfluss von Mep1b auf die BHS in verschiedenen Experimenten analysiert. Im Folgenden werden nun die Grundlagen und Besonderheiten der BHS erklärt und Möglichkeiten aufgezeigt, die BHS im Labor zu untersuchen.

### 6.2.1 Historische Entwicklung des BHS-Konzeptes

Hinweise auf eine Barriere, die den Austausch von Molekülen zwischen Blut und Hirn reguliert, wurden erstmals 1885 von dem Berliner Mediziner Paul Ehrlich beschrieben.

Dieser wollte ursprünglich den Sauerstoffverbrauch verschiedener Organe im Mausmodell ermitteln und verwendete hierfür spezielle Farbstoffe, die ihre Farbe abhängig von ihrem oxidativen Status ändern. Nach intravenöser Injektion der Farbstoffe, beobachtete er jedoch, dass das Gehirn und Rückenmark ungefärbt blieben, während alle anderen Organe eine gleichmäßige Färbung zeigten. Ehrlich vermutete hier eine verminderte oder fehlende Affinität des ZNS für die verwendeten Farbstoffe. Eine wirkliche Barriere spielte in seinen Überlegungen aber noch keine Rolle, weshalb er mit seinen Experimenten lediglich den Grundstein für das Konzept der BHS gelegt hat (69, 70).

Es sollte weitere 15 Jahre dauern, bis ein Student Ehrlichs Lewandowsky 1900 zum ersten Mal die Hirngefäße in den Blickpunkt rückte. Im Gegensatz zu Ehrlich führte er die unterschiedliche Anfärbbarkeit des ZNS darauf zurück, dass die Hirnkapillaren als eine Barriere für bestimmte Moleküle fungieren und diese auf irgendeine bis dato unbekannte Art zurückhalten. In den folgenden Jahren nahmen sich viele Forschungsgruppen diesem Thema an und in den 1920er Jahren wurde erstmals der Begriff einer BHS von Stern und Gaultier eingeführt (71). Jedoch verhinderte die begrenzte Auflösung der verwendeten Lichtmikroskope ein weitergehendes Verständnis über den Aufbau dieser Barriere. Erst mit der Entwicklung des Elektronenmikroskops wurde es möglich die ultrastrukturellen Merkmale der Hirnkapillaren zu begutachten. So zeigten Reese und Karnovsky 1967, dass die Endothelzellen der Hirnkapillaren durch kontinuierliche Gürtel an Zelladhäsionskontakten, den TJs, so eng miteinander verbunden sind, dass der interzelluläre Spalt versiegelt und eine parazelluläre Durchlässigkeit gegenüber bestimmten Molekülen verhindert wird. Im Gegensatz zu endothelialen TJs in anderen Organen, wiesen die zerebralen TJs einen deutlich geringeren interzellulären Abstand auf, was die Forscher als Erklärung für die erhöhte Dichtigkeit der endothelialen Barriere im Gehirn anführten. Seitdem wurden viele weitere wichtige Bestandteile und Funktionen der BHS beschrieben, so dass die heutige Vorstellung nochmals deutlich an Komplexität zugenommen hat (69, 70, 72).

### **6.2.2 Blutgefäße des ZNS**

Wie bereits vor 100 Jahren zum ersten Mal beschrieben, bestehen auch nach heutiger Auffassung gravierende Unterschiede zwischen den Blutgefäßen im Gehirn und denen in der Peripherie. Im Allgemeinen werden Blutgefäße benötigt, um die Organe und verschiedenen Gewebe des Körpers einerseits mit Sauerstoff und Nährstoffen zu



versorgen und andererseits Kohlendioxid und metabolische Abfallprodukte wieder abzuführen (73). Man unterscheidet hierbei verschiedene Kategorien an Blutgefäßen. Während Arterien für eine suffiziente Perfusion der Organe verantwortlich sind und die Venen das desoxygenierte Blut wieder zurück zu Herz und Lunge transportieren, findet der eigentliche Gas und Nährstoffaustausch genau dazwischen in einem verzweigten Kapillarnetz statt (74).

Bei Kapillaren handelt es sich um die kleinsten Blutgefäße und sie unterscheiden sich je nach zugrundeliegendem Gewebe stark in ihrer Durchlässigkeit gegenüber gelösten Substanzen. Während in der Leber die Kapillaren große Lücken in ihrer Wand aufweisen und somit eine nahezu ungehinderte Passage ermöglichen, stellen die Kapillaren des ZNS die Maximalform an Undurchlässigkeit und Integrität im menschlichen Körper dar (73, 75).

Obwohl das Gehirn nur 2% des gesamten Körpergewichts ausmacht, ist es für ca. 20% des gesamten Glucose und Sauerstoffverbrauchs verantwortlich (76). Da das Gehirn jedoch nicht über eine Art Energiespeicher wie beispielsweise die Leber verfügt, muss eine permanente Versorgung über eine große Anzahl an Kapillaren sichergestellt werden. Die Gesamtheit aller Hirngefäße entspricht einer Strecke von ca. 644 km, wobei die Kapillaren hierbei für 85% der Gesamtlänge verantwortlich sind und eine endotheliale Oberfläche von bis zu 12 m<sup>2</sup> zur Verfügung stellen (77, 78). Damit diese Fläche trotz des eng versiegelten Endothels zum dringend benötigten Nährstoffaustausch verwendet werden kann, wird der Transport über die BHS durch spezialisierte Carrier und Transporter ermöglicht (76). Unter den vielen biologischen Barrieren im menschlichen Körper, stellt die BHS somit wohl eine der spezifischsten und am strengsten kontrollierten Schranken dar (79).

### **6.2.3 Funktion und Aufbau der BHS**

Die BHS reguliert den molekularen Austausch zwischen Blut und Gehirn und trägt zur Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS bei (14). Indem sie das Gehirn vor Pathogenen und toxischen Agenzien schützt, ist die BHS essenziell für eine normale Neuronenfunktion. Die Nervenzellen des ZNS sind auf eine stabile Zusammensetzung der interstitiellen Hirnflüssigkeit angewiesen, die im besten Fall nur wenig durch Veränderungen in der Peripherie beeinflusst wird. Dies ermöglicht ein ungestörtes Abfließen von synaptischer Übertragung, Informationsprozessierung und neuronaler Konnektivität (69, 76). Die BHS garantiert somit eine einzigartige ZNS Umgebung, die sich durch eine unterschiedliche Ionenkomposition, einen spezialisierten

Neurotransmitterpool, niedrige Proteinkonzentrationen und eine verminderte Invasion von inflammatorischen Zellen und Molekülen auszeichnet (80).

Strukturell gesehen umfasst die BHS die Endothelzellen der Blutgefäße, Perizyten und Astrozyten (s. Abbildung 4). Diese Komponenten werden in ihrer Gesamtheit zusammen mit den zu schützenden Neuronen auch als Neurovaskuläre Einheit (NVU) bezeichnet (15, 81). Die Endothelzellen kleiden hierbei als kontinuierliche Membran die Hirnkapillaren aus und werden von wandständigen Perizyten und astrozytären Zellfortsätzen umgeben (76). Alle Bestandteile der NVU haben dementsprechend einen wichtigen Anteil an einer funktionalen BHS, wobei jeder Zelltyp unterschiedliche Aufgabenbereiche übernimmt (80).

### **6.2.3.1 Perizyten und Astrozyten**

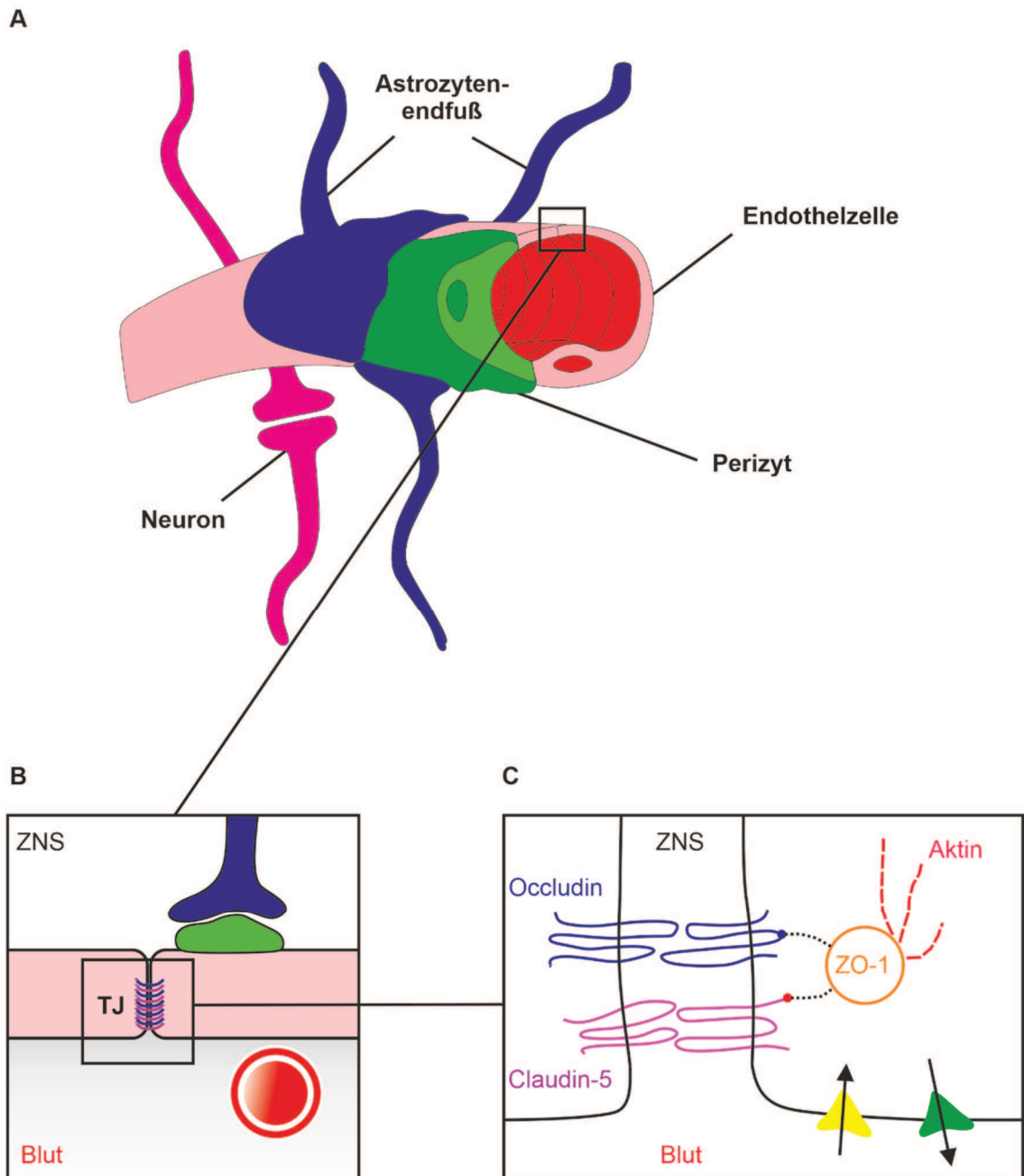
Die Perizyten, die die Endothelzellen direkt umschließen, werden als Hauptmodulatoren der NVU angesehen (69). Auf der einen Seite spielen sie eine wichtige Rolle bei der Bildung der BHS während der Embryonalentwicklung, auf der anderen werden sie aber auch für die Aufrechterhaltung einer gesunden und robusten BHS im Erwachsenenalter benötigt. So zeigen Mäuse mit einem KO des „pericytes in platelet-derived growth factor“, der für die Rekrutierung der Perizyten an die BHS benötigt wird, eine gravierende Beeinträchtigung der Barrierefunktion mit dysfunktionalen Zell-Kontakten, erhöhter Gefäßdurchlässigkeit und embryonaler Letalität (79).

Den anderen regulatorischen Zelltyp der BHS stellen die Astrozyten dar. Hierbei handelt es sich um Gliazellen, die mit ihren Zellfortsätzen Neurone mit Hirngefäßen verbinden können. Sie erfüllen eine wichtige Kommunikationsfunktion, indem sie in der Lage sind, durch die neurovaskuläre Vernetzung die Hirndurchblutung an die metabolischen Bedürfnisse der Neurone anzupassen (73). Ursprünglich wurde den Astrozyten auch eine Bedeutung in der Entwicklung der BHS zugesprochen, jedoch konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass dieser Zelltyp während der BHS Formation noch gar nicht an den Hirngefäßen präsent ist, was sie von den Perizyten unterscheidet (79). Jedoch werden die Astrozyten und ihre sezernierten Faktoren nach abgeschlossener Bildung der BHS ebenso als essenziell für die Aufrechterhaltung der Barrierenintegrität gesehen und so verwendet man beispielsweise in einigen *in vitro* BHS-Modellen Astrozyten, um die Barriereigenschaften von Endothelzellen zu verbessern (73, 80).

### 6.2.3.2 Endothelzellen und TJs

Während somit Perizyten und Astrozyten regulatorische Funktionen innerhalb der NVU übernehmen, manifestieren sich die wirklichen Schrankeneigenschaften, die die BHS grundlegend ausmachen, in erster Linie in den Endothelzellen, die als prinzipielle Barriere-Einheit fungieren (73, 79). Endothelzellen kleiden generell als innerste Schicht die Blutgefäße aus. Während bei Arterien oder Venen diese Schicht aus mehreren Zellen besteht, ist es bei Kapillaren in der Regel nur eine einzige Zelle, die sich in das Gefäßlumen vorwölbt (82). Die Endothelzellen der BHS verfügen nun im Vergleich zur Peripherie über besondere Eigenschaften. Zum einen werden sie durch besonders stark ausgeprägte TJs miteinander verbunden, so dass die parazelluläre Durchlässigkeit der Endothelzellschicht gegenüber gelösten Stoffen stark limitiert wird. Zum anderen ermöglichen spezifische BHS-Transporter in den Endothelzellen einen kontrollierten transzellulären Transport von benötigten ausgewählten Stoffen. So entsteht eine polarisierte Einzelzellschicht mit einem luminalen und abluminalen Kompartiment, bei der der Übertritt verschiedener Stoffe streng reguliert und kontrolliert werden kann, solange die TJs intakt sind (73, 79) (s. Abbildung 4).

Die TJs sind Zell-Adhäsionskontakte, die die Endothelzellen über verschiedene Proteine miteinander verbinden. Man unterscheidet hierbei zwei Hauptgruppen. Die transmembranen Adhäsionsproteine wie Claudin-5 oder Occludin, die den Bereich zwischen den ECs überwinden und ihre zytoplasmatischen Ankerproteine wie ZO-1, die den gesamten Komplex im Zytoskelett befestigen (69). Durch den Verschluss des parazellulären Spaltes der angrenzenden Endothelzellen, sorgen die TJs für den hohen elektrischen Widerstand und die gleichzeitig niedrige endotheliale Permeabilität der BHS und werden so oft auch als anatomisches Korrelat der Barriere bezeichnet (14, 15, 17).



**Abbildung 4: Aufbau und Komponenten der BHS und TJs, in Anlehnung an (69, 79).**

**A** Aufbau einer Kapillare im ZNS und Zelltypen der NVU. **B** Die Hirnendothelzellen werden von Perizyten und Astrozyten umgeben und untereinander durch dichte Gürtel an TJs miteinander verbunden, so dass eine dichte Schranke, die BHS, entsteht. **C** Die TJs sind aus spezifischen TJ Proteinen aufgebaut. Occludin und Claudin-5 verschließen als transmembrane Proteine den parazellulären Spalt und werden durch ZO-1 mit dem Aktinzytoskelett der Endothelzellen verbunden. BHS-spezifische Efflux- und Influxtransporter fungieren als zusätzliche Regulationseinheit des molekularen Austausches.

### **6.2.3.3 TJ Proteine**

#### **6.2.3.3.1 Claudin-5**

Die Claudinfamilie umfasst 24 Mitglieder deren Molekulargewicht zwischen 20-27 kDa liegt. Strukturell gesehen bestehen sie aus vier Transmembrandomänen, einem intrazellulären C-Terminalen Schwanz und zwei extrazellulären Schleifen, die eine Dimerbildung mit anderen Claudinen ermöglichen, um den parazellulären Spalt zu schließen. Über ihren intrazellulären C-Terminus können die Claudine an die pdz-1 Domäne des Ankerproteins ZO-1 binden, so dass eine Verankerung im Zytoskelett hergestellt wird. Je nach Ursprungsgewebe werden unterschiedliche Claudinformen exprimiert, so dass verschiedene Dichtigkeitsgrade von TJs möglich sind (69, 73). In den Hirnendothelzellen der BHS zeigt Claudin-5 eine mehr als 100-fach höhere Expression als jede andere Claudinart und wird deshalb hier als dominierende Isoform betrachtet. Es wird als essenziell für die Aufrechterhaltung der BHS gesehen, indem es einen stärkeren Versiegelungsgrad des Endothels verglichen mit anderen Geweben ermöglicht (83, 84). Ein Verlust von Claudin-5 ist dagegen in vielen neurodegenerativen und akuten ZNS Erkrankungen mit einem Zusammenbruch der BHS assoziiert, was seine Bedeutung für die Integrität der Barriere hervorhebt (77)

#### **6.2.3.3.2 Occludin**

Occludin wurde 1993 von Furuse und Kollegen (85) als erstes TJ Protein entdeckt und zeigt folgenden Aufbau: Es besteht aus jeweils einem intrazellulären N- und C-Terminus, vier Transmembrandomänen, drei zytoplasmatischen Domänen und zwei extrazellulären Schleifen. Über den langen C-Terminus bindet Occludin an die gk Domäne des ZO-1 Proteins. Diese Interaktion sorgt so für eine Verankerung Occludins mit dem Zytoskelett und wird für eine korrekte Lokalisation der TJ Komplexe benötigt (69, 84). Da eine Überexpression Occludins zu einem erhöhten transendothelialen Widerstand und einer erniedrigten Permeabilität der BHS führt, wurde lange angenommen, dass Occludin für eine funktionale BHS essenziell ist (69). Jedoch zeigten Occludin KO Mäuse morphologisch unveränderte TJs, wobei man davon ausgeht, dass die Occludin Funktion durch ein anderes Adhäsionsprotein namens Tricellulin teilweise übernommen wurde (84). Dennoch wiesen die Occludin KO Mäuse einen komplexen Phänotyp auf, der sich in Infertilität, postnataler Wachstumsverzögerung und Hirnverkalkung manifestierte. So schreibt man heute Occludin im Gegensatz zu Claudin-5, das mehr für die wirkliche Versiegelung des parazellulären Spaltes benötigt wird, eine eher regulierende Funktion auf die TJ-

Komplexe zu. In erster Linie handelt es sich dabei um Aufgaben wie die korrekte Positionierung der TJ-Komplexe oder Einflüsse auf die Endotheldifferenzierung (69, 77, 86)

#### **6.2.3.4 BHS Transportsysteme**

Mit Ausnahme von Gasen (z.B. O<sub>2</sub> oder CO<sub>2</sub>) und kleinen lipophilen Molekülen (<400 kDa) ist ein molekularer Austausch über die BHS nur mittels endothelständigen Transportsystemen möglich. Hierbei unterscheidet man in zwei Hauptkategorien Efflux von Nährstofftransportern. Nährstofftransporter ermöglichen die Aufnahme bestimmter Nährstoffe (z.B. Glucose oder Aminosäuren) aus dem Blut, während Effluxtransporter ungewünschte Substanzen entgegen ihrem Konzentrationsgefälle aus den Endothelzellen zurück ins Blut schleußen können. So übernehmen sie eine Art zusätzliche Schutzfunktion der BHS und ermöglichen eine noch spezifischere Regulation des molekularen Austausches (73, 77) (s. Abbildung 4).

Ein bekanntes Beispiel für einen solchen Effluxtransporter stellt der Multi-drug-resistance-transporter-1, der auch P-Glykoprotein genannt wird, dar. Dieser wird neben Endothelzellen beispielsweise auch von bestimmten Tumorarten exprimiert und ermöglicht eine Resistenz gegenüber verschiedenen Medikamenten, in dem die Substanzen aktiv über den Transporter wieder aus der Tumorzelle ausgeschleußt werden (87).

#### **6.2.4 Zusammenbruch der BHS**

Bei einem Zusammenbruch der BHS kommt es zu einer strukturellen Zerstörung der TJs. Dieses Phänomen konnte bei einer Vielzahl verschiedener ZNS-Erkrankungen beobachtet werden. Darunter finden sich sowohl akute als auch chronische neurodegenerative Erkrankungen wie AD, Parkinson, Huntington, Multiple Sklerose oder ALS (14-16). Die Öffnung der BHS erhöht die parazelluläre Durchlässigkeit der Endothelzellschicht und ermöglicht den ungehinderten Einstrom neurotoxischer Pathogene aus dem Blut in das ZNS. Immunzellen und Mediatoren, die normal nicht die BHS passieren können, erlangen Zugang zum Gehirn und führen dort zu einer Neuroinflammation, die wiederum neurodegenerative Prozesse anstößt (76, 88). Bei Schlaganfällen oder traumatischen Hirnverletzungen resultiert der ungestörte massive Einstrom hämatogener Flüssigkeit über die geöffnete BHS in einem erhöhten Hirnwassergehalt. Dieser manifestiert sich oft in Form eines Hirnödems, dessen Ausmaß meistens über die Prognose der Patienten entscheidet. Faktoren, die zu einer

solchen Beeinträchtigung der BHS führen können, gibt es viele, darunter Zytokine, Proteinkinasen oder auch Metalloproteasen (84, 89).

Obwohl in einigen Erkrankungen wie AD oder Multipler Sklerose bereits in frühen Krankheitsstadien Beeinträchtigungen der BHS entdeckt werden konnten, ist in vielen Fällen bisher nicht klar ob der BHS Zusammenbruch Ursache oder Effekt der Neuropathologie ist, oder ob sich beide Prozesse gegenseitig verstärken (76). Deshalb ist es umso wichtiger potenzielle BHS regulierende Substanzen zu untersuchen, um die Forschung bezüglich neuer Behandlungsverfahren, die einen frühzeitigen Wiederverschluss der BHS ermöglichen, voranzutreiben (84).

### **6.2.5 Verfahren zur Untersuchung der BHS Integrität**

Da die BHS für viele Medikamente eine unüberwindbare Barriere darstellt, der Bedarf an Neuropharmaka seit Jahren jedoch ansteigt, wurden seit 1970 viele verschiedene Modelle entwickelt, um die Integrität und Durchlässigkeit der BHS auch *in vitro* testen zu können. Diese Modelle können auch unabhängig von Medikamentenstudien für die Analyse der BHS Funktion und Stabilität in verschiedenen Krankheitsmodellen genutzt werden und sind demnach auch ein geeignetes Instrument, um die Fragestellung dieser Dissertation zu überprüfen. Prinzipiell muss an dieser Stelle betont werden, dass keines dieser *in vitro* Modelle, die physiologische BHS des Körpers in ihrer Komplexität zur Gänze abbilden kann, dennoch sind auch die vereinfachten Modelle in der Lage je nach Fragestellung wichtige und verlässliche Informationen zu liefern (90, 91).

Hierbei sollten jedoch die grundlegenden Eigenschaften der BHS angemessen im Modell abgebildet werden. Dies wären in erster Linie eine niedrige parazelluläre Durchlässigkeit, eine ähnliche Endothelmorphologie mit den BHS typischen Transportern und TJs und zusätzlich im besten Fall ein unkomplizierter Aufbau mit geringem Konstruktionsaufwand (92). Eine solche einfache und oft verwendete Option, stellt das endotheliale Monolayer-Modell dar. Hirnendothelzellen, die auch in der physiologischen BHS das Kernstück der Barriere bilden, werden dabei als konfluente Einzelzellschicht auf durchlässigen Zellkultureinsätzen (z.B. Transwells) in Lochplatten kultiviert (s. Abbildung 6). Durch die Einsätze kommt es wie in der physiologischen BHS, zu einer Polarisierung zwischen einer luminalen (Blut) und abluminalen (ZNS) Seite, die von einer Endothelzellschicht getrennt wird. Da die Kultureinsätze aus einer Membran bestehen, die den Austausch kleiner Moleküle

erlaubt, wird dieser wie in der echten BHS in erster Linie durch die Dichtigkeit der TJs der Endothelzellen bestimmt (73, 79, 80, 91).

Um zu überprüfen, ob die Endothelzellen während ihrer Kultivierung auch wirklich eine geschlossene Schicht mit dichten TJs ausbilden, wird zur Kontrolle der transendotheliale Widerstand (TER) gemessen. Der TER ist einerseits ein direkter Marker für die Dichtigkeit des Endothelmonolayers, gibt andererseits aber auch Aufschluss über die parazelluläre Durchlässigkeit und Barrierenintegrität. Hohe TER Werte sind mit einer erhöhten Dichtigkeit des Endothels und einer niedrigeren Permeabilität der Barriere assoziiert und umgekehrt (93, 94).

Unter den vielen Möglichkeiten den TER zu bestimmen, stellt die Impedanzspektroskopie das verlässlichste Verfahren dar, da es in einem automatisierten Messgerät (z.B. cellzcope) mit festen Elektroden erfolgen kann und nicht wie mobile Lösungen von der Elektrodenposition abhängig ist oder die Gefahr besteht, durch direkten Strom die Endothelzellen bei der Messung zu schädigen. Das nicht invasive Verfahren ermöglicht eine kontinuierliche Überwachung des TERs, so dass ein geeigneter Zeitpunkt für die Bestimmung der Durchlässigkeit am *in vitro* Modell gewählt werden kann (95).

Die Analyse der Permeabilität der *in vitro* Barriere gegenüber niedermolekularen hydrophilen Tracer Substanzen wie beispielsweise radioaktiv markierter Saccharose, Inulin, Albumin oder Mannitol stellt eine weitere wichtige Methode zur Überprüfung der Barrierenintegrität dar (93). Während der TER eher Aussagen über die Leitfähigkeit der Barriere gegenüber geladenen Ionen liefert, gibt die Permeabilität Informationen über den Fluss nicht geladener Substanzen und die Porengröße der TJs (95). Da sich beide Parameter aber entgegengesetzt verhalten, können sie prinzipiell als zwei Seiten derselben Medaille angesehen werden und sollten bei der Verwendung von *in vitro* Modellen stets zusammen erhoben werden (90).

Generell verfügen alle endothelialen Monolayer Modelle über den oben beschriebenen Aufbau, jedoch können verschiedene Arten an Hirnendothelzellen verwendet werden. Man unterscheidet immortalisierte Hirnendothelzelllinien von primären Hirnendothelzellen, die frisch aus verschiedenen Versuchstieren (z.B. u.a. Maus, Ratte, Rind, Schwein) isoliert werden können. Immortalisierte Hirnendothelzellelinien wie die häufig verwendete bEnd.3 haben den Vorteil, dass sie gesichert TJ Proteine (z.B. Occludin, Claudin 5, ZO-1), Nährstoff- und Effluxtransporter exprimieren und



dabei verhältnismäßig einfach zu kultivieren sind. Sie können bereits fertig gekauft werden und erreichen normal nach 3-4 Tagen Kultivierung einen stabilen TER. Die Werte und Barrierendichtigkeit sind jedoch im Vergleich zu frischen primären Hirnendothelzellen niedriger, da immortalisierte Zellen etwas weniger TJs ausbilden. Die primären Zellen können zudem die Verhältnisse der BHS um einiges realistischer darstellen, da viele ihrer Fähigkeiten genetisch programmiert sind. Von Nachteil ist aber, dass sie erst in aufwändigem Verfahren aus den Gehirnen isoliert werden müssen und deutlich anspruchsvoller in der Kultivierung sind. Da nur ein geringer Teil des Gehirns aus Endothelzellen besteht, ist hier zudem eine große Anzahl an Versuchstieren nötig, um eine ausreichende Zellmenge zu erhalten, was sowohl ethisch als auch kostentechnisch zu hinterfragen ist (90, 91, 93).

Mittlerweile wurden aber noch deutlich kostenintensivere und komplexere BHS *in vitro* Modelle entwickelt, die neben Endothelzellen auch andere Zellen der NVU wie Perizyten und oder Astrozyten enthalten und dementsprechend als Coculture oder Triculture Modelle bezeichnet werden. Aufgrund der verbesserten Abbildung der BHS Zusammensetzung sind die Barrieren dieser Modelle um einiges dichter und realistischer. Jedoch gilt auch für diese aufwändigeren Modelle, dass die beobachteten Ergebnisse stets mit *in vivo* Markern, wie beispielsweise die Permeabilität gegenüber Substanzen aus dem Blut in die ISF oder umgekehrt, kombiniert werden sollten, da selbst das beste *in vitro* Modell, nie perfekt die *in vivo* Verhältnisse abbilden kann (80, 93).

Angesichts der Tatsache, dass in dieser Dissertation ein erstmaliger Einfluss einer Protease auf die BHS untersucht wurde, wurde in den durchgeführten Experimenten ein einfaches endotheliales Monolayer Modell mit immortalisierten bEnd.3 und primären Maushirnendothelzellen verwendet, dass durch die Analyse weiterer *in vivo* Marker unterstützt wurde (s. 7.7.5 BHS *in vitro* Modell). So soll ein angemessenes Verhältnis zwischen aussagekräftigen Untersuchungsverfahren und vertretbaren Kosten und verwendeten Versuchstieren angestrebt werden.

## 7 Material und Methoden

Angesichts der großen Zahl an Methoden, die in dieser Dissertation durchgeführt wurden, werden im folgenden Kapitel nur solche dargestellt, die essenziell für das Verständnis des Ergebnisteils sind. Alle Verfahren dieser Dissertation beruhen entweder auf etablierten Arbeitsvorschriften der AG Pietrzik, Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin der JGU Mainz oder wurden bei erstmaliger Durchführung nach zuvor in der Literatur beschriebenen Anleitungen ausgeführt. Die entsprechenden Literaturverweise sind jeweils angefügt. Experimentelle Techniken oder Methoden, die nicht vom Autor selbst durchgeführt wurden, sind als solche gekennzeichnet. Grundlegende Zellkulturtechniken wie die Kultivierung immortalisierter Zellen oder Proteinbiochemische Methoden wie SDS-Page oder Western Blot, die zum Standardrepertoire in einem biochemischen Labor zählen, werden zu einem besseren Leseverständnis nur ausführlich im Anhang aufgeführt (s. 11 Anhang).

### 7.1 Reagenzien

#### 7.1.1 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
40% Acrylamid 19:1 Bis-Acrylamid	Roth, Karlsruhe
40% Acrylamid 29:1 Bis-Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
BCA 200 Protein Assay Kit	Pierce, Bonn
Bis-Tris	Roth, Karlsruhe
Basic fibroblast growth factor (bFGF)	R&D Systems, Wiesbaden
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma, Deisenhofen
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
Collagen IV	Sigma-Aldrich, Steinhilber

Collagenase CLS2	Worthington, Lakewood, USA
Collagenase-Dispase	Roche, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM inkl. Phenolrot	Gibco, Eggenstein
DNase1	Sigma, Schnelldorf
dNTPs	PeqLab, Erlangen
Dextran	Carl Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Gibco, Eggenstein
Endothelzellwachstumszusatz (ECGF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Gibco Paisley, Schottland
Fibronektin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehydlösung (PFA) 4%	Merck,
Gefrierschnittmedium	Thermo Fischer Scientific
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Heparin	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Serva, Heidelberg
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Immobilon <sup>TM</sup> Western HRP Substratreagenz	Millipore, Schwalbach
Inulin-carboxyl, [carboxyl- <sup>14</sup> C]	Perkin Elmer, MA, USA
Isofluran Forene®	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

Kresylviolett	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Ralphs, Kalifornien
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Roche, Mannheim
Percoll	GE Healthcare, München
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	Gibco Paisley, Schottland
Plasma stämmiges Rinderserum	First Link, Birmingham, UK
Poly-L-Ornithin	Sigma, Deisenhofen
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Protease-Inhibitor	Roche, Mannheim
Protein-Marker 10-245 kDa	Abcam, Cambridge
Proten-Marker Pager Rule 10-180 kDa	Thermofischer Scientific
Rinderalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
Roti®-Histofix	Carl Roth
RotiLoad (4x Protein Ladepuffer)	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt
Tris-acetat	Roth, Karlsruhe
Tris-base (Tris-OH)	Roth, Karlsruhe
Tris-hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth, Karlsruhe

Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Gibco Paisley, Schottland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Ultrasol®F	Fresenius Kabi, Bad Homburg

### 7.1.2 Antibiotika

Blasticidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	Alexis, Lörrach

### 7.1.3 Antikörper

#### 7.1.3.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Typ	Verdünnung	Hersteller/Referenz
β-actin	Kaninchen	polyklonal	1:1000 in TBST mit 5% Magermilch	Sigma-Aldrich
Claudin-5	Kaninchen	polyklonal	1:1000 in TBST mit 5% Magermilch	Invitrogen
Meprin β	Kaninchen	polyklonal	1:1000 in TBST mit 5% Magermilch	Eigenproduktion von AG Pietrzik/Becker- Pauly, Ak gegen ein Peptid des extrazellulären Meprin β Anteils
Occludin	Maus	monoklonal	1:1000 in TBST mit 5% Magermilch	Invitrogen
ZO-1	Kaninchen	polyklonal	1:1000 in TBST mit 5% Magermilch	Santa Cruz

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Primärantikörper**

### 7.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen-IgG	HRP	1:1000 in TBST mit 5% Magermilch	Invitrogen
Esel-anti-Maus-IgG	HRP	1:1000 in TBST mit 5% Magermilch	Invitrogen

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

### 7.1.4 Plasmide

DNA-Konstrukte	Beschreibung	Herstellung
pLBCX-Mep1b β	pLBCX Expressionsvektor mit Mep1b-DNA	Mitarbeiterin der AG Pietrzik, Institut für Pathobiochemie, UM der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Plasmide

### 7.1.5 Enzyme

Enzym	Herstellung	EC-Nummer
Rekombinantes Mep1b + Actinonin	(5), Institute of Biochemistry, Christian-Albrechts University, Kiel	EC 3.4.24.63
Kollagenase CLS2	Worthington, Lakewood, NJ, USA	3.4.24.3
DNaseI	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany	3.1.21.1
Collagenase-Dispase	Roche, Mannheim, Germany	3.4.24.3

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Enzyme

### 7.1.6 Puffer und Lösungen

#### 7.1.6.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Alle Bestandteile von Zellkulturmedien wurden entweder bereits verwendungsfertig erworben oder vor dem Gebrauch durch Filtration oder Autoklavieren sterilisiert.

<b>Puffer/Medien</b>	<b>Bestandteile/Inhaltsstoffe</b>
DMEM Komplettmedium (bEnd.3, bEnd.3 + Mep1b, Hek2 GP 293)	DMEM inkl. Phenolrot 10% aktives fötales Kälberserum 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO 90% Komplettmedium
Primäres Maushirnendothelzellmedium	DMEM inkl. Phenolrot 20% aktives fötales Kälberserum 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin 2 mM L-glutamine 4 µg/mL Puromycin 30 µg/ml Endothelzellwachstumszusatz (ECGF)
pEndo	DMEM inkl. Phenolrot 20% aktives fötales Kälberserum 2 mM L-glutamine
PBS (pH 7,4)	137mM NaCl 2,7mM KCl 10mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Anhydrat 1,8mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Trypsin/EDTA in PBS (7,4)	0,05% (w/v) Trypsin 0,02% (w/v) EDTA

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien in der Zellkultur**

### 7.1.6.2 Puffer und Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Bestandteile/Inhaltsstoffe</b>
Blockierungspuffer	1x TBS-T 5% (w/v) Magermilchpulver

1x Laufpuffer (pH 8,3)	192mM Glycin 25mM Tris-Base 0,1% (w/v) SDS
20x Nupage Laufpuffer	50 mM Tris Base 0.1% SDS 1 mM EDTA pH 7.3
Ponceau S	0,5% (w/v) in H2O 1% (v/v) Essigsäure
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,6M Tris-HCL 0,4% (w/v) SD 4x SDS-Probenpuffer 62,5mM Tris-HCl; pH 6,8 10% (v/v) Glycerin 2% (w/v) SDS 0,02% (w/v) Bromphenolblau
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5M Tris 0,4% (w/v) SDS
Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (TBS-T)	1x TBS 0,05% (v/v) Tween20
10x Western-Blot Transfer Puffer	250mM Tris Base 192mM Glycin H2O

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen in Gelelektrophorese und Western Blot**

### 7.1.6.3 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Bestandteile/Inhaltsstoffe</b>
Lysis-Puffer	NP40-Puffer 1x Protease-Inhibitor 1x Phosphatase-Inhibitor
NP40-Puffer	50mM Tris 150mM NaCl 1% NP40



	0,02% NaN <sub>3</sub>
10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS; pH 7,4)	1,37M NaCl 27mM KCl 0,25M Tris-Base H <sub>2</sub> O
Tris-Puffer	50mM Tris (pH 7,4) 150mM NaCl

**Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Puffer in der Proteinbiochemie**

## 7.2 Geräte und Laborhilfsmittel

Cryostat CM1850	Leica Biosystems, Nussloch
CellZcope	Nano Analytics, Münster
Cryostat CM1850	Leica Biosystems, Wetzlar
CO <sub>2</sub> -Brutschränke	New Brunswick, Edison, USA
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Gamma Counter Wizard2	Perkin Elmer, Billerica, USA
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Kipp-Laborschüttler Rocky®	Fröbel Labortechnik, Lindau
Kipp-Laborschüttler Unitwist-RT	UniEquip, Planegg
Kühlschrank +4°C	Liebherr, Kirchdorf
LAS-3000 mini Imager	Fujifilm, Düsseldorf
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop Olympus CKX41	Olympus, Tokio
Magnetrührer MR 3000D	Heidolph, Schwabach
Mehrfachdispenser HandyStep®	Brand, Wertheim

Mikrotiterplatten-Lesegerät Anthos HT III	Thermolabsystems, Egelsbach
Mini Protean III Gel und Transblot System	Biorad, München
Mini Protean III Western Transblot System	Biorad, München
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gelkassetten	Invitrogen, Karlsruhe
Neubauer Zählkammer	
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten 1 µl-1000 µl	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe	Thermo Scientific, Dreiech
Spektrometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Herasafe	Hereaus, Hanau
Sterilbank Safemate 1.2 Vision	Euroclone, Pero, Italien
Spectrophotometer	Tecan, Männedorf, Schweiz
Tri-Carb 2800 TR Liquid Scintillation Analyzer (Flüssigszintillationsmessgerät)	PerkinElmer MA, USA
Vortexer	VWR, Darmstadt
Waage Mettler AE 160	Mettler Toledo, Gießen
Waage Denver Instrument XP-1500	Fisher Scientific, Schwerte
Wallac 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer, Billerica, USA
Wasserbad GFL 1056	GFL, Burgwedel
Xcell II Surelock Elektrophorese-System	Thermofischer Schientific, Waltham
Zentrifuge Biofuge fresco	Hereaus, Hanau

Zentrifuge Biofuge stratos	Hereaus, Hanau
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Hereaus, Hanau
Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Tuttlingen

### 7.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalküvetten Kunststoff	Roth, Karlsruhe
Einweghandschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Einweghandschuhe Nitril	VWR, Darmstadt
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebekulturschalen (Ø 6 cm, 10 cm, 15cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Gewebekulturschalen (6- und 12-Lochplatten)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Glaspipetten 5 ml- 25 ml	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Apogent, Wiesbaden
Mikrotest Platten 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gele	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Parafilm® American National Can™	Neeah, USA
Pipettenspitzen 0,1 µl-1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Plastikpipetten 10 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterile Plastikröhrchen 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Sterile Plastikröhrchen 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Transwelleinsätze (0.4 µm, 33.6 mm²)	Greiner, Frickenhausen

## 7.4 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Zelltyp	Hersteller/Referenz
bEnd.3	Maushirnendothelzelle	(96) Montessano et al. 1990
bEnd.3 + Mep1b	Maushirnendothelzelle	Selbsterstellung/neu hergestellt
HEK-GP2-293	Humane embryonale Nierenzellen	Clontech™, Frankreich

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Zelllinien

## 7.5 Tiere und Tierhaltung

Die verwendeten Mäuse (s. Tabelle 10) wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (TARC) der Johannes-Gutenberg Universität Mainz gehalten. Die Tiere hatten während ihres 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus freien Zugang zu Wasser und Standardfutter. Alle Tierversuche wurden durch das Landesuntersuchungsamt Koblenz, Rheinland-Pfalz unter der Registrierungsnummer G16-1-076 zugelassen. Die Tierversuche wurden entsprechend der europäischen (EU-Directive EU/2010/63), deutschen (Richtlinien zur Pflege und Verwendung von Versuchstieren) und institutionellen Richtlinien (SOP regulations for laboratory animals, Medical University Mainz) zur Pflege und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt. Dies wurde zusätzlich durch Mitarbeiter der Kreisverwaltung Mainz-Bingen, Rheinland-Pfalz überwacht.

Bezeichnung	Herkunft
C57BL/6J	Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA)
Mep1b KO	Institute of Biochemistry, Christian-Albrechts University, Kiel

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Mauslinien

Die C57BL/6 Mäuse wurden von den Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) gekauft und dienen als WT Kontrollmäuse. Die C57BL/6 Maus ist eine der am besten erforschten Mauslinien weltweit und wird standardmäßig in einer Vielzahl an Studien als genetischer Hintergrund verwendet (97). Die Mep1b KO Mäuse, die durch einen Mep1b KO in C57BL/6 Mäusen erzeugt wurden, waren ein freundliches Geschenk von Prof. Christoph Becker-Pauly (Institute of Biochemistry, Christian-Albrechts University, Kiel) (19).

## **7.6 Software**

ADAP

Corel Draw 2020

EndNote X7

GraphPad Prism 8

Image Reader LAS-3000

Image J

Microsoft Office Paket

## **7.7 Zellbiologische Methoden**

### **7.7.1 Kultivierung immortalisierter Zellen**

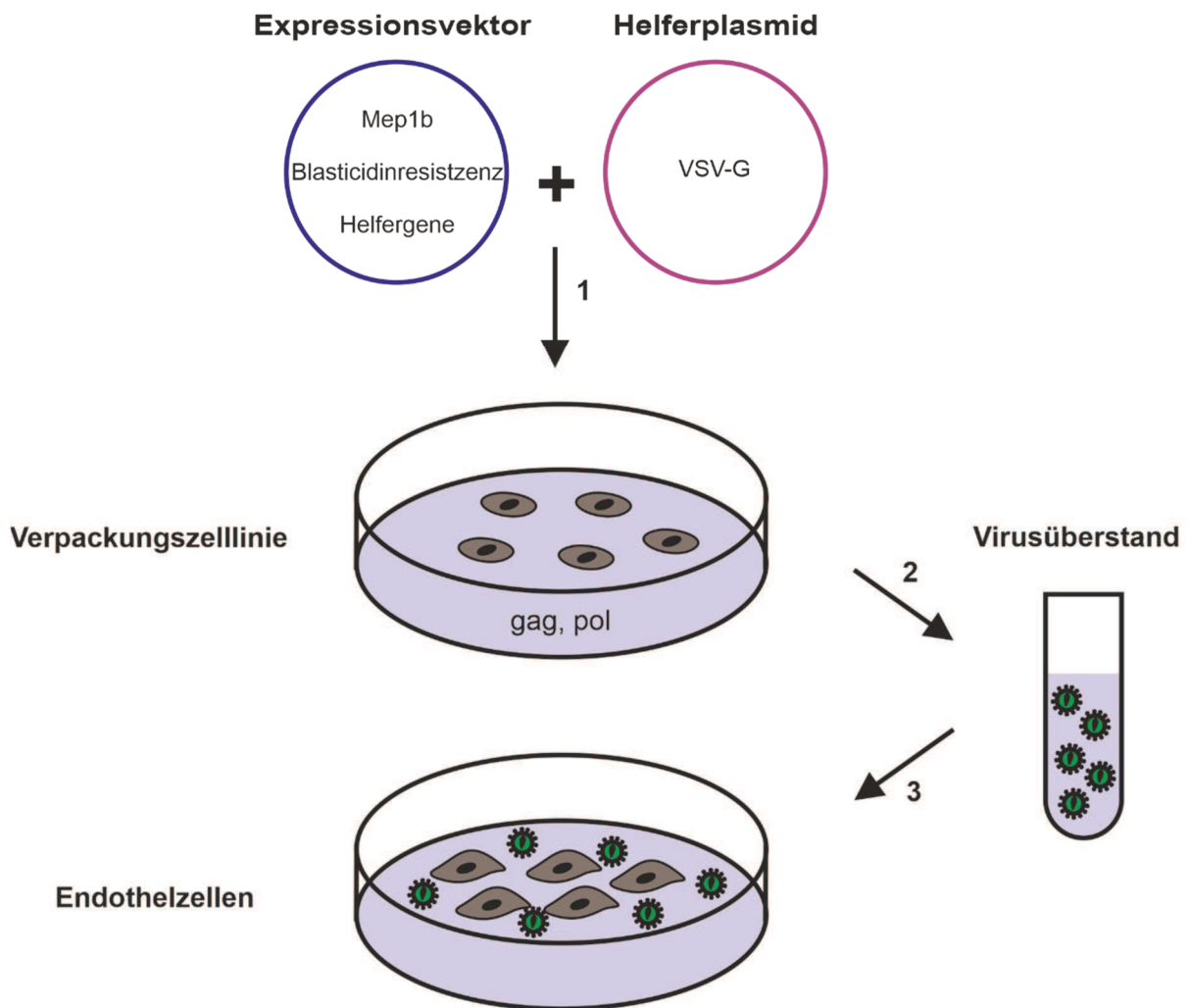
Da die Methoden der Zellkultur eher grundlegende Verfahren darstellen, die zum Verständnis der durchgeführten Experimente nicht unbedingt notwendig sind, wurden diese Kapitel in den Anhang gesetzt, wo das Vorgehen ausführlich nachgelesen werden kann. (s. 11.1.1 Kultivierung immortalisierter Zellen).

### **7.7.2 Stabile Transfektion von b.End.3 Zellen mittels retroviraler Infektion**

#### **7.7.2.1 Hintergrund und Prinzip der Methode**

Unter einer Transfektion versteht man das selektive Einbringen von Fremd-DNA in das Genom gewünschter Zielzellen mithilfe eines Vektors. Besteht die Expression des neu eingebrachten Gens nur für kurze Zeit und geht mit voranschreitenden Zellteilungen verloren, spricht man von einer transienten Transfektion. Wird das Gen dauerhaft in das Genom der Zielzelle integriert, handelt es sich um eine stabile Transfektion (98-100).

Die stabil Mep1b exprimierenden bEnd.3 Zellen dieser Dissertation wurden durch retroviralen Gentransfer hergestellt. Hierbei wurde das Mep1b Gen, in das Genom der bEnd.3 Zellen mittels Retroviren eingebracht. Retroviren sind in der Lage ihr Genom stabil in das Genom einer infizierten Wirtszelle zu integrieren und so ihre viralen Proteine replizieren zu lassen. Retroviren benötigen zur Herstellung und Verpackung der Viruspartikel drei Gene: gag, pol und env. Um eine unkontrollierte Entstehung infektiöser Viruspartikel zu vermeiden, bestand das hier verwendete retrovirale Gentransfersystem aus drei Komponenten: einer Verpackungszelllinie (HEK-GP 293), einem retroviralen Expressionsvektor (pLBCX Mep1b) und einem Helferplasmid (pVSV-G) (s. Abbildung 5). Die Verpackungszelllinie HEK-GP 293 enthält die Gene gag und pol (GP), die für das Kapsid (gag) und diverse Enzyme (u.a. reverse Transkriptase) (pol) des Virus kodieren. Der retrovirale Expressionsvektor liefert die nötigen Helfergene zur Virionenbildung, das Mep1b Gen und ein Resistenzgen für das Antibiotikum Blasticidin. Das Helferplasmid pVSV-G kodiert für das Glykoprotein der Hülle des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G), welches ein Eindringen der Viruspartikel in die Zielzellen durch Plasmamembranfusion ermöglicht. Somit ist nur eine Kombination aus allen Bestandteilen in der Lage infektiöse Mep1b Viruspartikel zu erzeugen, während die Einzelkomponenten nicht dazu im Stande sind. Sobald die Verpackungszelllinie mit retroviralem Vektor und Zielgenvektor transfiziert wird, produziert und sezerniert dieses Viruspartikel in das umgebende Kulturmedium. Nach 48 Stunden wird der Virenüberstand gesammelt und auf die Zielzellen (bEnd.3) gegeben. Das Zielgen wird zusammen mit dem Selektionsmarker in das Genom der infizierten Zielzellen integriert, wodurch eine anschließende Antibiotikaselektion stabil exprimierender Zellklone möglich ist (101-103).



**Abbildung 5: Stabile Transfektion von Mep1b in bEnd.3 Endothelzellen mittels retroviraler Infektion**

**1** Kotransfektion der Verpackungszelllinie (HEK GP-293) mit Expressionsvektor (pLBCX Mep1b) und Helferplasmid (pVSV-G). **2** Verpackungszelllinie ist nun in der Lage vollständigen Retrovirus inklusive Zielgen zu produzieren. Der Virusüberstand wird gesammelt. **3** Infektion der Zielzellen (Endothelzellen bEnd.3) mit dem Virus. Bei erfolgreicher Infektion integrieren die Endothelzellen das gewünschte Zielgen stabil in ihr Genom und sind ab dann in der Lage, das Zielgen stabil zu exprimieren.

### 7.7.2.2 Transfektion der HEK GP-293 Verpackungszelllinie

Um die viralen Partikel herzustellen, wurden GP2-HEK293T-Zellen so auf Poly-L-Ornithin beschichtete 10 cm Platten ausgesät (Vorgehen s.o. mit je 4ml einer 1:2000-Lösung), dass die Konfluenz bei Transfektion am folgenden Tag etwa 60-80% betrug. Zwei Stunden vor Transfektion erfolgte ein Mediumswechsel mit 25  $\mu$ M Chloroquin haltigem Kulturmedium. Chloroquin verbessert die Aufnahme der Konstrukte/Vektoren in die virusproduzierenden Zellen, indem es lysosomale DNAsen hemmt (104). Direkt vor der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt (DMEM, serumfrei) und die Zellen anschließend mit 5  $\mu$ g des retroviralen Expressionsplasmids (pLBCX Mep1b)

und 5 µg des pVSV-G-Plasmid kotransfiziert (10 µg Gesamt-DNA). Polyethylenimin (PEI) wurde als Transfektionsreagenz verwendet und die Transfektion nach folgendem Schema durchgeführt. Die 10 µg Gesamt-DNA (5 µg pVSVG + 5 µg pLBCX Mep1b) wurden mit 300 µl serumfreien DMEM (Lösung A) in ein Reaktionsgefäß gegeben. 40 µl PEI wurden mit 300 µl serumfreien DMEM (Lösung B) in ein Reaktionsgefäß gegeben. Beide Lösungen wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zusammengeführt und mit dem Vortexer vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch auf die GP2-HEK293T-Zellen gegeben.

#### **7.7.2.3 Konzentrieren und Ernten des viralen Überstands**

Da ab diesem Zeitpunkt die Entstehung von infektiösen viralen Partikeln möglich war, erfolgten alle weiteren Zellkulturarbeiten unter S-2 Bedingungen. Es wurden nur noch Einwegplastikartikel verwendet und alle potenziell kontaminierten Geräte und Materialien sofort mit 70%igem Ethanol und UltraSol™ desinfiziert. Der Abfall wurde in gesonderten Behältern gesammelt und getrennt autoklaviert. 6 h nach Transfektion wurde das Medium durch 10 ml und 24 h nach Transfektion durch 5 ml frisches Kulturmedium ersetzt, um einen hohen Viruspartikeltiter im Überstand zu erreichen. 48 h nach Transfektion wurde der Überstand abgenommen und in einem sterilen 15 ml Falcon für 4 min bei 1200 x g zentrifugiert. Der Überstand, der nun die viralen Mep1b Partikel enthielt, wurde zur Infektion der Zielzellen eingesetzt.

#### **7.7.2.4 Infektion der Zielzellen mit retroviralen Partikeln**

Da nur mitotisch aktive Zellen von Retroviren infiziert werden, wurden 24 h vor der Infektion jeweils 500 000 bEnd.3 Zellen pro 6 cm Kulturschale ausgesät, so dass ihre Konfluenz einen Tag später bei ca. 50% lag. Zur Transfektion wurde das Kulturmedium der Zielzellen durch je 2 ml Virenüberstand zusammen mit 500 µl DMEM und 50 µg/ml Polybrene ersetzt. Polybrene ist ein kationisches Polymer, das die Adsorption der Virushülle an die Zielzellen erleichtert und somit die Infektionswahrscheinlichkeit erhöht (105). Nach 24 h Inkubation wurden die infizierten Zellen auf eine 10 cm Kulturschale mit frischem Selektionsmedium (DMEM, fcs, ps, 5µg/ml Blastocidin) passagiert.

#### **7.7.2.5 Blastocidin-Selektion infizierter Zellen**

Die infizierten bEnd.3 Zellen wurden mit Selektionsmedium, das 5µg/ml Blastocidin enthielt, selektioniert. Der Mediumswechsel erfolgte alle 2-3 Tage für einen Zeitraum von zwei Wochen. Die Mep1b Expression wurde anschließend mittels Western Blot



Analyse überprüft (s. 11.2. Proteinbiochemische Methoden). Trotz Selektionsantibiose bestand die Möglichkeit, dass in der Mischzellkolonie Zellen vorhanden waren, die nicht infiziert wurden und die Antibiosebehandlung überlebt hatten. Deshalb wurde im Anschluss an die erste Selektionsphase eine Einzelklonselektion durchgeführt, um einen Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellklon zu erhalten, der als Grundlage für die weiteren Experimente dienen sollte. Hierfür wurde durch entsprechende Verdünnung eine Zelle der infizierten Mischkolonie pro Loch einer 96-Loch Platte ausgesät und anschließend zwei Wochen in Selektionsmedium kultiviert. Da die Wahrscheinlichkeit eine einzige Zelle auszusäen sehr gering ist, wurde mittels Phasenkontrastmikroskops überprüft, ob Zellen im Well enthalten waren. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie auf eine 6 cm Kulturschale und bei erneuter Konfluenz auf eine 10 cm Kulturschale überführt. Nach zweiwöchiger Selektion wurde die Mep1b Expression der Einzelklone mithilfe einer Western Blot Analyse erneut überprüft (s. 11.2 Proteinbiochemische Methoden).

### **7.7.3 Isolierung und Kultivierung primärer Maus- und Schweinehirnkapillarendothelzellen**

Die Isolierung von primären Maushirnkapillarendothelzellen erfolgte nach einem bereits zuvor beschriebenen Standardprotokoll (106), das minimal modifiziert wurde. Es wurden acht bis zwölf Wochen alte Mäuse verwendet (Mep1b KO u. WT), die nach Betäubung mit Isofluran Forene® durch Genickbruch getötet wurden. Dieser Teilschritt wurde in allen Experimenten von Beschäftigten des Instituts für Pathobiochemie, Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Nach Eröffnung des Schädels wurden die Gehirne entnommen und von den Hirnhäuten durch Ausstreichen auf autoklaviertem Filterpapier befreit. Die Gehirncortices wurden getrennt nach Genotyp in einer Kulturschale mit eiskaltem pEndo gesammelt und mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurde das Gewebemediumgemisch homogenisiert und es erfolgte im Anschluss ein einstündiger Verdau zum Gewebsaufschluss mit einem Gemisch aus 0,75 mg/ml Kollagenase CLS2 (Worthington, Lakewood, NJ, USA) und 10 U/ml DNase I (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) in DMEM (Gibco, Darmstadt, Germany), der bei 37 °C auf einem Laborrüttler bei 1000 x g durchgeführt wurde. Das resultierende Pellet wurde in 20% BSA DMEM resuspendiert und bei 1000 x g für 20 Minuten zentrifugiert, um das Myelin zu entfernen. Das Pellet wurde daraufhin mit einem Gemisch aus 1 mg/mL Collagenase-Dispase (Roche, Mannheim, Germany) und 10 U/mL DNase I in DMEM

bei 37 °C auf einem Laborrüttler für eine weitere Stunde verdaut. Die Kapillarendothelzellen wurden dann auf einem 33% Percoll (Percoll (GE Healthcare, Munich, Germany) Gradienten separiert und mit einer sterilen 10 ml Spritze aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Aussaat und Kultivierung der Kapillarendothelzellen im cellZcope Gerät, wie unten beschrieben. Das Kulturmedium bestand aus DMEM mit 20% PDS 100 U/mL Penicillin and 100 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 4 µg/mL Puromycin and 30 µg/ml ECGF, wobei nach vier Tagen in Kultur das Puromycin verworfen wurde.

#### **7.7.4 Behandlung der Hirnendothelzellen mit löslichem Mep1b**

bEnd.3 oder primäre Schweinehirnendothelzellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend rekombinantes Mep1b zum serumfreien Kulturmedium hinzugefügt. Zur Kontrolle diente entweder eine zusätzliche Kultivierung mit dem Mep1b Inhibitor Actinonin (10 µM) oder eine Inkubation ohne Mep1b. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Die Experimente für die primären Schweinehirnendothelzellen wurden hierbei von einem Mitarbeiter durchgeführt und die Ergebnisse zum besseren Verständnis als Zusatz in dieser Dissertation dargestellt.

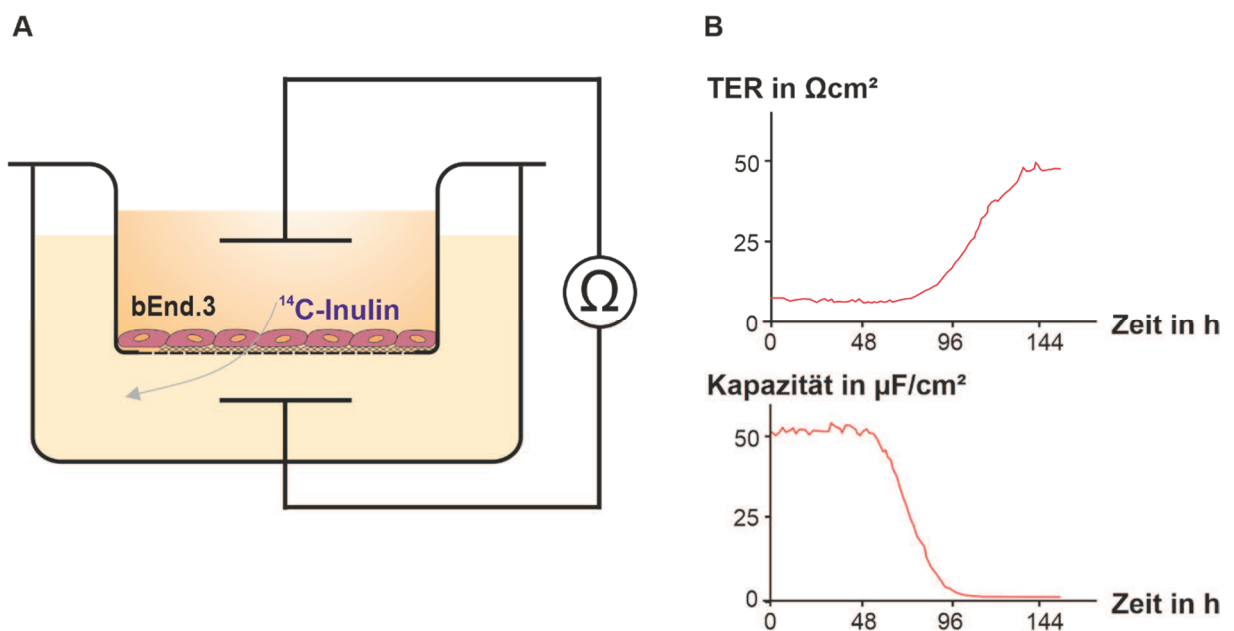
#### **7.7.5 BHS *in vitro* Modell**

##### **7.7.5.1 Kultivierung der Endothelzellen und Aufbau des *in vitro* Blut-Hirnschrankenmodells**

Die Kultivierung der Endothelzellen (bEnd.3 u. bEnd.3 + Mep1b; pMBCS Mep1b WT und KO) zur Untersuchung der Barriereeigenschaften erfolgte bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im cellZcope Gerät, welches ein *in vitro* Modell der BHS darstellt. Hierfür wurden 24-well Transwell Kulturschaleneinsätze (Porengröße 0.4 µm; Oberfläche, 33.6 mm<sup>2</sup>), mit 0,4 mg/mL Collagen IV und 0,1 mg/mL Fibronectin beschichtet und im Anschluss die Zellen auf diesen ausgesät. Collagen IV und Fibronectin sind Bestandteile der ECM und ermöglichen den Endothelzellen einerseits eine stabilere Haftung und andererseits eine Polarisation in luminal (Blut) und abluminale Seite (Hirn) (107, 108). Die Einsätze wurden mit Kulturmedium bedeckt und dann in das ebenfalls mit Kulturmedium gefüllte cellZcope Gerät eingesetzt, so dass zwei Kompartimente entstanden. Dieses obere (Blut) und untere (Hirn) Kompartiment wurden durch die Einzellzellschicht der Endothelzellen, die auf den ECM Proteinen aufliegt, getrennt, was dem Aufbau einer BHS entspricht.

### 7.7.5.2 Cellzscope® Imepedanzspektroskopie

Der Cellzscope® ist ein automatisiertes Gerät zur Messung des TER von Zelllayern unter physiologischen Bedingungen. Es ist in der Lage den transendothelialen elektrischen Widerstand (TER) und die Kapazität der Zellschicht auf den Einsätzen durch Impedanzspektroskopie über die Zeit zu messen. Der TER der Zellen ist ein Marker für die Barrierefunktion und Dichtigkeit der Endothelzellschicht, die in erster Linie von der TJ Ausbildung zwischen den Zellen abhängig ist. Je mehr TJs vorhanden sind, desto dichter ist die Barriere und desto höher sind die gemessenen TER Werte. Die Kapazität misst dagegen die Konfluenz der Monozellschicht. Hier gilt je niedriger die Werte, desto höher ist die vorhandene Konfluenz (s. Abbildung 6). Wichtig hierbei ist das Phänomen, das die Endothelzellen erst ab einer erhöhten Konfluenz, sprich wenn sie unmittelbaren Kontakt zu ihren Nachbarzellen haben, mit der TJ Ausbildung starten. Daher ist es notwendig bei einer Untersuchung der Barrierefunktion mittels TER Wertmessung, die Kapazität gleichzeitig zu überprüfen, um einen Messzeitpunkt mit geeigneter Konfluenz auszuwählen (109).



**Abbildung 6: Messung von TER und Permeabilität im BHS *in vitro* Modell**

**A** Aufbau des BHS *in vitro* Modells. Eine Einzellzellschicht aus bEnd.3 Endothelzellen wird auf einem durchlässigen Transwelleinsatz kultiviert, so dass ein oberes lumenales und unteres abluminales Kompartiment entstehen. Durch Zugabe eines prazellulären Tracers wie Inulin in das lumenale Kompartiment kann die Durchlässigkeit der Schranke überprüft werden. Über die festen Elektroden des Cellzscopegerätes in beiden Kompartimenten kann der TER/Widerstand bestimmt werden. **B** Typischer Verlauf einer TER und Kapazitätsmessung mittels Imepedanzspektroskopie. Mit zunehmender Kultivierungszeit wird die Endothelzellschicht konfluent und beginnt TJs auszubilden, so dass die

Barriere dichter wird. Dies zeigt sich an einem steigenden TER und einer sinkenden Kapazität, deren Messkurven entgegengesetzt verlaufen.

### **7.7.5.3 Messung der Integrität von Endothelzellen**

Die Integrität der pMCBs und bEnd.3 Zellen wurde anhand der Messung des TERs und der Permeabilität gegenüber [ $C^{14}$ ]-Inulin untersucht. Sobald die im cellZcope kultivierten Endothelzellen Kapazitätswerte um die  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  erreichten, was in der Regel nach 4-5 Tagen der Fall war, wurde das Kulturmedium durch serumfreies Kulturmedium DMEM mit 1 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin als Vorbereitung auf die TER und Permeabilitätsmessung ersetzt. Um die TJ Ausbildung der Zellen zu erhöhen und dementsprechend hohe TER-Werte zu erhalten, wurde zusätzlich 550 nM Hydrocortison (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) zum jeweiligen Kulturmedium hinzugefügt und die TER Messung 24 h später durchgeführt. Direkt im Anschluss wurden die Zellen für die Permeabilitätsuntersuchung im Radioaktivlabor verwendet. Das Kulturmedium wurde durch serumfreies DMEM mit 40mM HEPES ersetzt und 1Ci/ml [ $C^{14}$ ]-Inulin wurde in das luminal Kompartiment der Zelleinsätze gegeben. Die [ $C^{14}$ ]-Inulin Emission wurde sowohl im luminalen Kompartiment zum Zeitpunkt 0 und im abluminalen Kompartiment nach 90 min in 10  $\mu\text{l}$  Medium im Tri -Carb2800TRLiquid Szintillations-Analysemessgerät gemessen. Die Permeabilität wurde wie bereits von einer anderen Forschungsgruppe beschrieben durch den apparenten Permeabilitätskoeffizienten ( $P_{\text{app}}$ ) bestimmt (110).  $P_{\text{app}}(\text{cm}/\text{s}) = dQ/(\text{dt} \cdot A \cdot c_0)$ , wobei dQ die Menge des diffundierten [ $C^{14}$ ]-Inulin in der Inkubationszeit, A die Oberfläche des Transwells,  $c_0$  die initiale Inulin Konzentration im luminalen Kompartiment und dt die Inkubationszeit darstellen.

### **7.7.6 Isolation der Hirngefäße**

Die Hirnkapillaren für die TJ Proteinanalyse wurden aus Hirnparenchym von 8- bis 12 wochen-alten Mep1b KO und WT Mäuse nach folgendem Protokoll (111) isoliert, bei dem eine Dextrangradienten-Zentrifugation gefolgt von einer Zellsiebfiltration durchgeführt wurden. Nachdem die Mausgehirne nach Genotyp gepoolt und von der Hirnhaut befreit waren, wurde das Hirngewebe anschließend in eiskaltem PBS, das 2% fetales Rinderserum enthielt, mechanisch mit einem Skalpell und durch sorgfältiges Pipettieren homogenisiert. Das Homogenat wurde mit Dextran (70 kDA) sorgfältig auf Eis vermischt, so dass ein 16% Dextrangemisch entstand. Dieses wurde bei 6000 x g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand, der die Hirnreste ohne die Blutgefäße enthielt verworfen. Das Kapillarpellet am Boden des Zentrifugierröhrchens

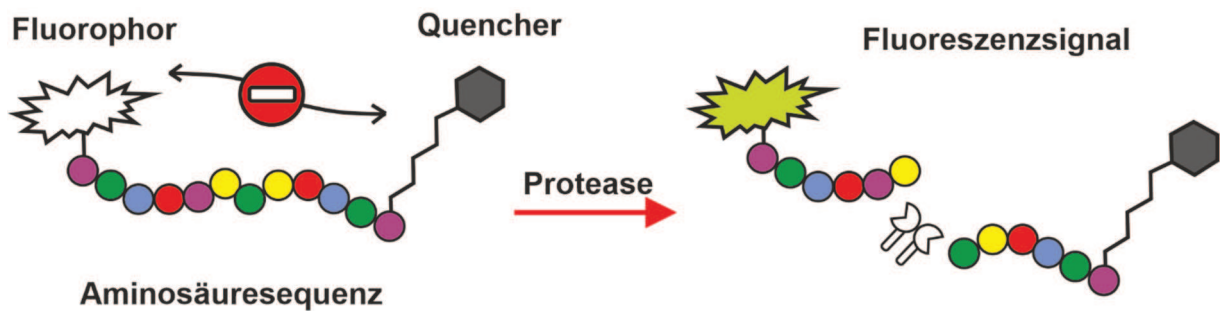
wurde im Anschluss dagegen nacheinander über ein 100 µm und 45 µm Zellsieb mit PBS filtriert. Die Kapillaren, die auf der Oberfläche des 45 µm Zellsiebes zurückgehalten wurden, wurden in PBS gesammelt und für die Immunoblot Analyse der TJ Expression lysiert.

Die Isolation der gesamten Hirngefäße wurde nach einem ähnlichen Protokoll durchgeführt. Das Hirn-PBS-Homogenat wurde hier aber nicht mit Dextran versetzt, sondern bei 1000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 20% BSA-DMEM resuspendiert und ein weiteres Mal bei 1000 x g für 20 Minuten zentrifugiert um die Vaskulatur vom Rest des Gehirnes zu trennen. Das Gefäßpellet am Boden des Zentrifugierröhrchens wurde anschließend mit PBS gewaschen und mittels flüssigen Stickstoffs für die Enzymaktivitätsassays eingefroren.

### **7.7.7 Aktivitätsassays**

Alle Aktivitätsassays wurden von einer Mitarbeiterin des Instituts für Biochemie, Unit for Degradomics of the Protease Web, Christian-Albrechts-University Kiel, Kiel, Deutschland im Rahmen der Kollaboration bezüglich der dieser Dissertation zugrundeliegenden Publikation durchgeführt (112). Die Methoden und Ergebnisse dieser Experimente sind zum besseren Verständnis ebenfalls in dieser Dissertation aufgeführt.

Um die proteolytische Aktivität von Mep1b gegenüber den beiden extrazellulären Schleifen von Occludin zu quantifizieren, wurden zwei fluorogene Peptide hergestellt, die jeweils die entsprechende Aminosäuresequenz der extrazellulären Schleifen von murinem Occludin enthalten und wie folgt aufgebaut sind: ein Fluorophor (7-methyloxycoumarin-4-yl (mca)) ein Quencher (Löscher) (K-ε-2,4-dinitrophenyl [dnp]) (Peptid 1: mca-GYGGYTDPRAA-K-ε-dnp; Peptid 2: mca-GLYVDQYLYHYSVVDPQE-K-ε-dnp; Genosphere Biotechnologies). Dieser Aufbau der Peptide ermöglicht eine Quantifizierung der Enzymaktivität, durch die Interaktion des Fluorophor- und Quencheranteils. Solange diese durch den intakten Peptidanteilverbunden werden, wird die Fluoreszenzemission des Fluorophors durch den Quencher geblockt. Kommt es jedoch zu einer Prozessierung des verbindenden Peptidsubstrates durch eine Aktivität des untersuchten Enzyms, wird der Fluorophor aktiv, so dass ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann, dass mit der Enzymaktivität korreliert (113) (s. Abbildung 7). Für die *in vitro* Aktivitätsmessung wurden die Peptide in einer Konzentration von 20 µM mit 20 nM oder 50 nM rekombinanten Mep1b (114) in 100 µl Totalvolumen in 96-Lochplatten inkubiert.



**Abbildung 7: Prinzip des Aktivitätsassays zur Untersuchung von Proteasensubstraten, in Anlehnung an (113)**

Um die Mep1b Aktivität in Gesamthirngefäßlysaten (150  $\mu$ g in 1% Triton-X/PBS Lysepuffer) zu quantifizieren wurde ein hochspezifisches Mep1b fluorogenes Peptidsubstrat in einer Konzentration von 50  $\mu$ M verwendet (mca-EDEDED-K- $\epsilon$ -dnp; Genosphere Biotechnologies). Die Fluoreszenzintensitäten wurden bei 37°C alle 30s für 120 Minuten mit einem Spektrophotometer detektiert. Für die Datenanalyse wurden Steigungen aus einem gleichen linearen Aktivitätsbereich verglichen.

## 7.8 In vivo Methoden

### 7.8.1 Isolierung von Zerebrospinalflüssigkeit (CSF)

Um den Einfluss von Mep1b auf die Permeabilität der BHS *in vivo* zu untersuchen, wurde die Menge an Immunglobulin G in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) von 8 bis 12 Wochen alten Mep1b KO und WT Mäusen analysiert. Hierfür wurde ein bereits zuvor beschriebenes Standardprotokoll verwendet (49). Die CSF wurde durch Punktion der Cisterna magna gewonnen. Dieser Teilschritt wurde von Beschäftigten des Instituts für Pathobiochemie, Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Anschließend wurde die CSF bei 900 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um sie von Zellresten zu befreien. Pro Maus wurden jeweils 4  $\mu$ l zellfreie CSF mit gleicher Menge 2x RotiLoad (Probenpuffer, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) versetzt. Die Bestimmung der IgG Protein Level in der CSF erfolgte mittels NuPage und anschließender Western Blot Analyse mit sekundären Anti-Maus Antikörpern, die an die IgGs der Maus binden (s. 11.2 Proteinbiochemische Methoden).

### 7.8.2 Messung des Hirnwassergehaltes

Zur weiteren Analyse des Einflusses von Mep1b auf die Integrität der BHS *in vivo*, wurde der Hirnwassergehalt von Mep1b KO und WT Mäusen untersucht. Die Mäuse wurden mit Isofluran Forene® betäubt und durch Genickbruch getötet. Dieser Teilschritt wurde von Beschäftigten des Instituts für Pathobiochemie, Universitätsmedizin Mainz ausgeführt. Das Gehirn wurde dann sofort entnommen und gewogen. Anschließend wurde es über Nacht bei 100°C getrocknet und erneut

gewogen. Der Gehirnwassergehalt wurde berechnet wie folgt: (Masse Gehirn bei Entnahme - Masse Gehirn nach Trocken) \* 100/ Masse Gehirn bei Entnahme. Die netto Veränderung im Gehirnwassergehalt in den Mep1b -/- Mäusen wurde zu dem der Mep1b +/- Mäusen in Relation gesetzt.

### **7.8.3 Bestimmung der Ventrikelgröße**

Acht bis zwölf Wochenalte Mäuse wurde transkardial mit PBS mit 10 U/ml Heparin perfundiert und die Gehirne wurden nach Entnahme in Roti®-Histofix (Carl Roth), das 4 % PFA enthielt, für 24 Stunden gelagert. Anschließend wurden die Gehirne solange in 30% Saccharose inkubiert, bis sie absanken und daraufhin in Cryomedium durch Trockeneis eingefroren. 60 µm Schnitte wurden in Frontalebene mit einem Cryostat angefertigt und anschließend mit Nissl (Cresyl Violet-Färbung) gefärbt (115). Die Größe der lateralen und des dritten Ventrikels wurden mithilfe eines Mikroskops in vergleichbaren koronaren Bereichen/Sektionen bestimmt.

## **7.9 Proteinbiochemische Methoden**

### **7.9.1 Zellextraktion und Western Blot Analyse**

Wie bei den Zellkulturtechniken handelt es sich bei Zellextraktion und Western Blot Analyse um grundlegende Methoden, die in fast jedem Labor prinzipiell ähnlich ablaufen. Deshalb ist das Vorgehen in diesem Kapitel nur in einem Umfang erklärt, der für das Verständnis des Ergebnisteils notwendig ist. Der genaue Ablauf kann bei Bedarf im Anhang (s. 11.2 Proteinbiochemische Methoden) nachgelesen werden.

Zur Analyse der TJ Proteinexpression wurden die bEnd.3 Zellen mit kaltem PBS gewaschen und von den Kulturschalen gekratzt. Sowohl bEnd.3 als auch Hirngefäßpellets wurden für 20 Minuten in Lysepuffer inkubiert. Die Zellysate wurden bei 18,000 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mittels eines BCA Protein Assays bestimmt. Gleiche Mengen an Gesamtprotein wurden mit RotiLoad vermischt und bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Gleiche Proteinmengen für jede Probe (bEnd.3, Hirngefäße, CSF) wurden mittels NuPage auf einem 4-12% Bis-Tris Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose Membran überführt. Nach einer einstündigen Blockierung in TBST, das 5% Magermilchpulver enthielt, wurden die Membranen mit geeigneten primären und sekundären Antikörpern inkubiert und die Proteine über Chemilumineszenz mittels eines LAS-3000mini Detektors erkannt.

## 7.10 Statistische Auswertung

Alle statistische Analysen und Graphen dieser Arbeit wurden mithilfe der Graph Pad Prism 8 Software (GraphPad, La Jolla, CA, USA ) durchgeführt und erstellt. Die Messwerte wurden anhand eines ungepaarten t-Testes oder einem one-way ANOVA gefolgt von einem Turkey´s post hoc Test analysiert. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Unterschiede wurden in den Graphen folgendermaßen dargestellt:

\*  $P \leq 0,05$

\*\* ,  $P \leq 0,01$

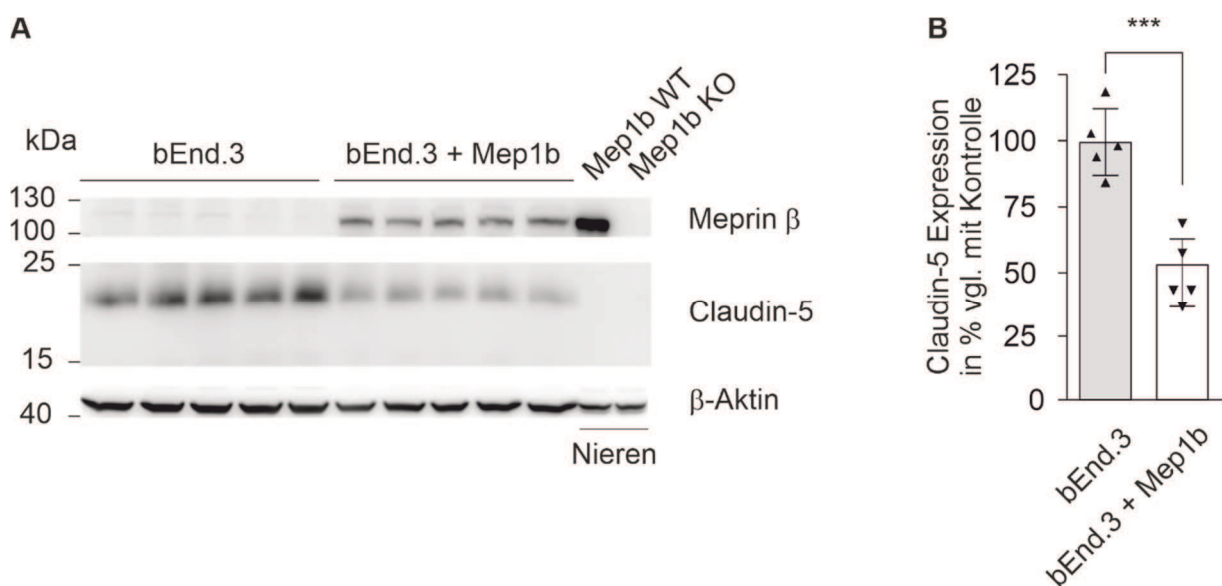
\*\*\* ,  $P \leq 0,005$



## 8 Ergebnisse

### 8.1.1 Erniedrigte Expression des TJ Proteins Claudin-5 in Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellen

Da Mep1b in der Lage ist Zell-Adhäsionsmoleküle in unterschiedlichen Geweben (z.B. Haut, Niere und Darm) zu spalten (4, 5, 7, 8), eine Dysregulation in verschiedenen Krankheiten aufweist (48, 50, 116) und zudem eine erhöhte Transkription im Gehirn verglichen mit den meisten anderen Organen zeigt (18), wurde in dieser Thesis untersucht, ob Mep1b auch einen Effekt auf die TJ Funktion im Hirnendothel hat. Hierfür wurden stabile Mep1b überexprimierende Hirnendothelzellen hergestellt (Mep1b + bEnd.3), die physiologisch TJ Proteine exprimieren (z.B. Claudin-5). Im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen zeigten die Mep1b + bEnd.3 Zellen eine signifikante Reduktion der Claudin-5 Proteinexpression um fast 50% (s. Abbildung 8). Dies legt den Schluss nahe, dass die Mep1b Überexpression zu einer veränderten TJ Zusammensetzung *in vitro* führt.

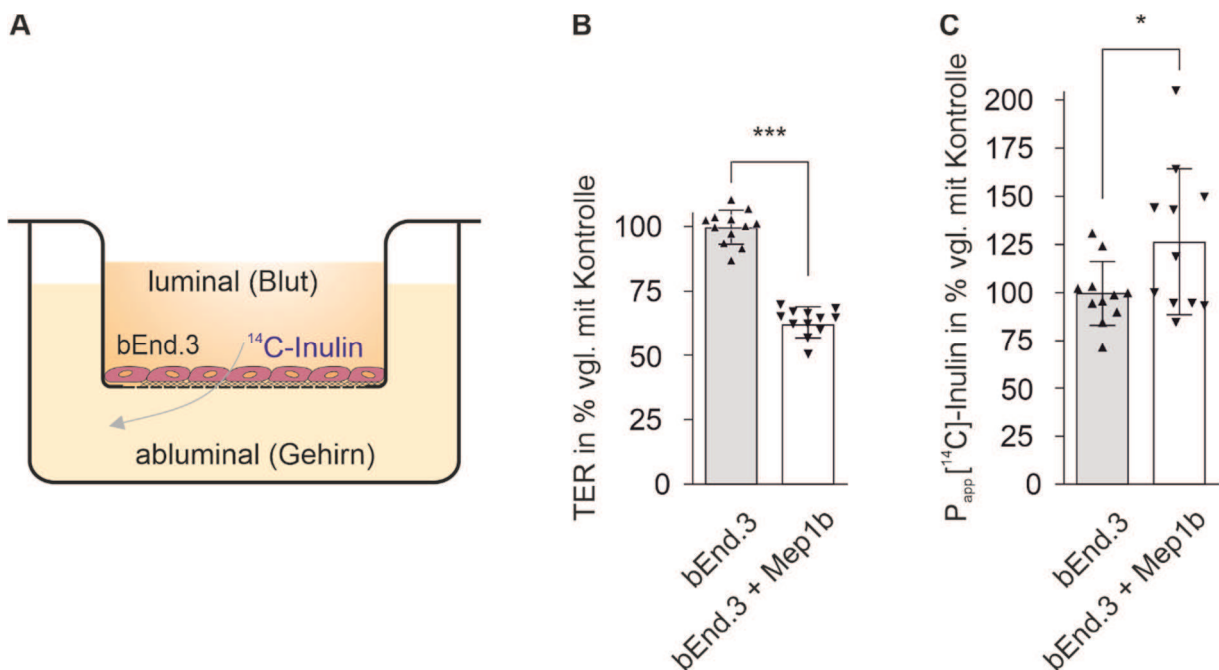


**Abbildung 8: Erniedrigte Expression des TJ-Proteins Claudin-5 in Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellen**

(A) Eine repräsentative Immunodetektion von Mep1b und Claudin-5 in Lysaten von Kontroll-bEnd.3 Zellen und Mep1b+bEnd.3 Zellen. Anti-β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Nierenlysate von Mep1b WT und Mep1b KO Mäusen dienten als Mep1b Positiv- und Negativkontrolle. (B) Die Claudin-5 Expression wurde mittels densitometrischer Analyse von mehreren Western Blots quantifiziert. Die Intensitäten der Kontroll-bend.3 Zellen wurde auf 100% gesetzt und die der bEnd.3+Mep1b Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert ± Standardabweichung von n=5 (bEnd.3) und n=5 (bEnd.3 + Mep1b) biologischen Replikaten. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte T-Test verwendet. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

### 8.1.2 Herabgesetzte Barriereintegrität in Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellen

Die TJs bestimmen maßgeblich die parazelluläre Durchlässigkeit der BHS (93). Angesichts der Beobachtung, dass die Mep1b Überexpression in bEnd.3 Zellen zu einer reduzierten Expression des TJ Proteins Claudin-5 geführt hat, wurde nun untersucht, ob diese erniedrigten TJ Level auch die Barrierefunktion der Zellen beeinflussen. Deshalb wurden Mep1b+bEnd.3 Zellen und die Kontroll-bEnd.3 Zellen auf Kultureinsätze des *in vitro* BHS Modells ausgesät. Sowohl der TER als auch die Kapazität wurden mittels Impedanzspektroskopie mithilfe des CellZcope-Gerätes gemessen (s. Abbildung 9 A). Generell sind hohe TER Werte mit einer erhöhten Dichtigkeit des Endothels und einer geringeren Durchlässigkeit der Barriere verbunden. Daher eignet sich der TER als Indikator zur Bestimmung der BHS Integrität (93, 94). Als die untersuchten bEnd.3 Zellen vergleichbare Kapazitätswerte aufwiesen, was ein Zeichen dafür war, dass die Zellen konfluent waren, konnte eine signifikante Reduktion des TER um fast 40% in den Mep1b+bend.3 Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden (s. Abbildung 9 B).



**Abbildung 9: Herabgesetzte Barriereintegrität in Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellen**

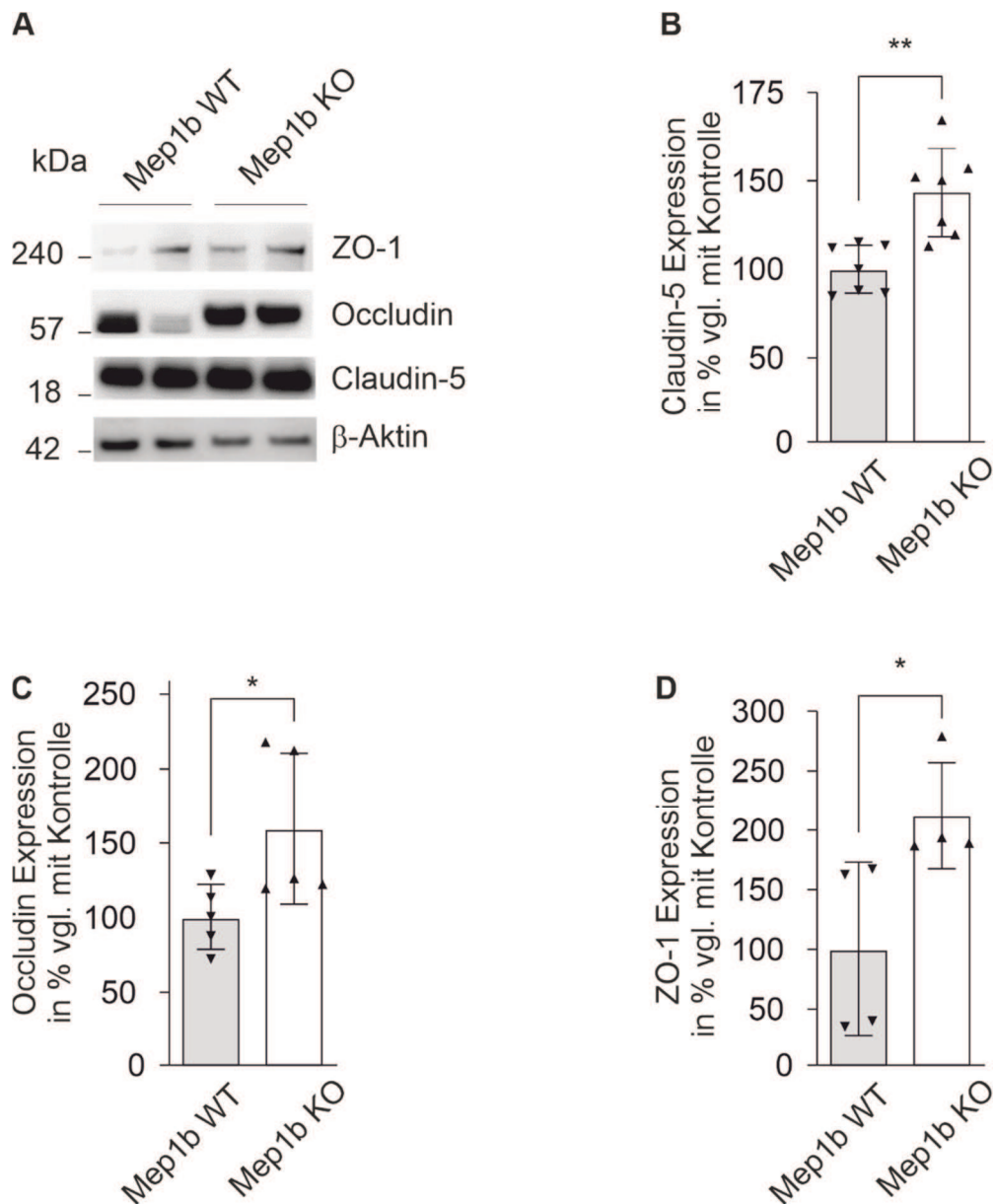
(A) Schematische Darstellung des *in vitro* BHS Modells. Mep1b und Kontroll-bEnd.3 Zellen wurden auf Kultureinsätzen im CellZcope-Gerät kultiviert. TER und Kapazität wurden über die Zeit mittels Impedanz Spektroskopie gemessen. (B) TER Messung von Mep1b+bEnd.3 Zellen im Vergleich zu Kontroll-bEnd.3 Zellen. Die TER Werte der bEnd.3 Zellen wurden auf 100% gesetzt. Die maximalen TER Werte waren  $> 50 \Omega\text{cm}^2$  (bEnd.3) und  $> 30 \Omega\text{cm}^2$  (bEnd.3 + Mep1b). Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von n=12 (bEnd.3) und n=12 (bEnd.3 + Mep1b) biologischen Replikaten Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte T-Test verwendet. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. **(C)** Apparente Permeabilität (Papp) gegenüber [C<sup>14</sup>]-Inulin von Kontroll-bEnd.3 Zellen im Vergleich zu Mep1b+bEnd.3 Zellen. Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von n=11 (bEnd.3) und n=11 (bEnd.3 + Mep1b) biologischen Replikaten. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-test verwendet. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Im abluminalen Kompartiment des Transwells zeigten die Kontroll-bend.3 Zellen nach einer Stunde eine Permeabilität von 0,4965% der eingesetzten Inulinmenge des luminalen Kompartiments und die Mep1b überexprimierenden bEnd.3 0,63%.

Um die Barriereintegrität zusätzlich zu untersuchen, wurde die Permeabilität gegenüber radiomarkiertem [C<sup>14</sup>]-Inulin analysiert. Diese kleine hydrophile Substanz ist ein geeigneter Marker für parazelluläre Diffusion, da es einerseits kein Ligand für Transporter oder endotheliale Rezeptoren darstellt, und andererseits nicht als Substrat für endotheliale Enzyme fungiert (93). Die Mep1b überexprimierenden bEnd.3 Zellen zeigten eine fast 30% höhere Permeabilität gegenüber [C<sup>14</sup>]-Inulin im Vergleich zu den Kontrollzellen (s. Abbildung 9 C). Zusammengefasst sprechen diese Resultate stark dafür, dass die Überexpression von Mep1b nicht nur in einer Reduktion des TJ Proteins Claudin-5 resultiert, sondern auch zusätzlich zu einer herabgesetzten Barrierefunktion in diesen Zellen führt, was sich in dem reduzierten TER und der erhöhten Permeabilität gegenüber [C<sup>14</sup>]-Inulin widerspiegelt.

### **8.1.3 Erhöhte TJ Proteinlevel in Gehirnkapillaren von Mep1b KO Mäusen**

Um zu untersuchen, ob die Mep1b abhängige Reduktion der Claudin-5 Level in den bEnd.3 Zellen ebenso *in vivo* relevant ist, wurden Hirnkapillaren von Mep1b KO und WT Mäusen isoliert und hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer TJ Proteine Claudin-5, Occludin und ZO-1 analysiert. Im Gegensatz zur Mep1b Überexpression in den bEnd.3 Zellen, konnten in den Hirnkapillaren der Mep1b KO Tiere erhöhte TJ Proteinlevel gemessen werden (s. Abb. 10 A-D). Es wurde eine signifikante Erhöhung der Claudin-5 Expression um fast 60% im Vergleich zu den WT Kontrollen detektiert (s. Abb. 10 B). Zusätzlich wurde auch die Expression des zytoplasmatisch assoziierten TJ Proteins ZO-1 durch den Mep1b KO beeinträchtigt und zeigte eine fast 100% erhöhte Abweichung gegenüber den WT Kontrollen (s. Abb. 10 D). In gleicherweise zeigten sich die Expresionslevel des TJ Proteins Occludin in den Mep1b KO Mäusen um fast 100% erhöht (s. Abb. 10 C).

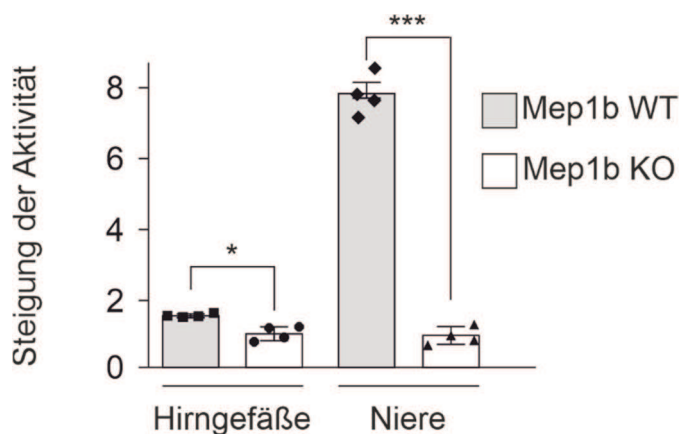


**Abbildung 10: Erhöhte TJ Proteinlevel in Hirnkapillaren von Mep1b KO Mäusen**

Hirnkapillaren wurden von Mep1b KO und WT Mäusen isoliert und anschließend mittels SDS-Page und Immunodetektion hinsichtlich ihrer TJ Proteinexpression analysiert. **(A)** Repräsentative Immunodetektion der TJ Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 in Hirnkapillaren aus Mep1b KO und WT Mäusen. Anti- $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. **(B-D)** Die Expressionlevel der TJ Proteine ZO-1 (B), Occludin (C) und Claudin-5 (D) wurden mittels densitometrischer Analyse von verschiedenen Western Blots analysiert. Die Intensitäten der Mep1b WT Hirnkapillaren wurden als 100% Referenzwert verwendet. Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von  $n=7$  (Mep1b WT) und  $n=7$  (Mep1b KO) (B),  $n=5$  (Mep1b WT) und  $n=5$  (Mep1b KO) (C),  $n=4$  (Mep1b WT) und  $n=7$  (Mep1b KO) (D) biologischen Replikaten. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Obwohl versucht wurde auch die Mep1b Expression in den isolierten Hirnkapillaren der Mep1b KO und WT Mäuse zu analysieren, war es mit mehreren kommerziell

erwerblichen und hausgemachten Antikörpern nicht möglich spezifische Banden zu identifizieren, die dem molekularen Gewicht von Mep1b entsprechen. Um dennoch zu überprüfen ob Mep1b von Zellen der NVU exprimiert wird, wurde in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe um Prof. Becker-Pauly von der Universität in Kiel ein indirektes Vorgehen angewandt. Hierfür wurden Gesamthirngefäße von Mep1b KO und WT Mäusen isoliert und diese hinsichtlich ihrer Mep1b Aktivität mithilfe von Mep1b spezifischen fluorogenen Substraten analysiert. Als Aktivitätskontrollen wurden Nierenlysate von Mep1b KO und WT Mäusen verwendet, da die Niere die höchste Mep1b Expression unter den Organen aufweist. Während die Proben eigenständig gewonnen wurden, wurde der eigentliche Assay in der Universität Kiel von einer dort Beschäftigten durchgeführt. In den Hirngefäßen der WT Mäuse konnte ein leichte aber signifikante Erhöhung der Mep1b Aktivität im Vergleich zu den Mep1b KO Tieren beobachtet werden, die dafür spricht, dass es eine geringe Mep1b Expression in den Hirngefäßen gibt, obwohl diese zuvor in der Western Blot Analyse nicht detektiert werden konnte (s. Abbildung 11).



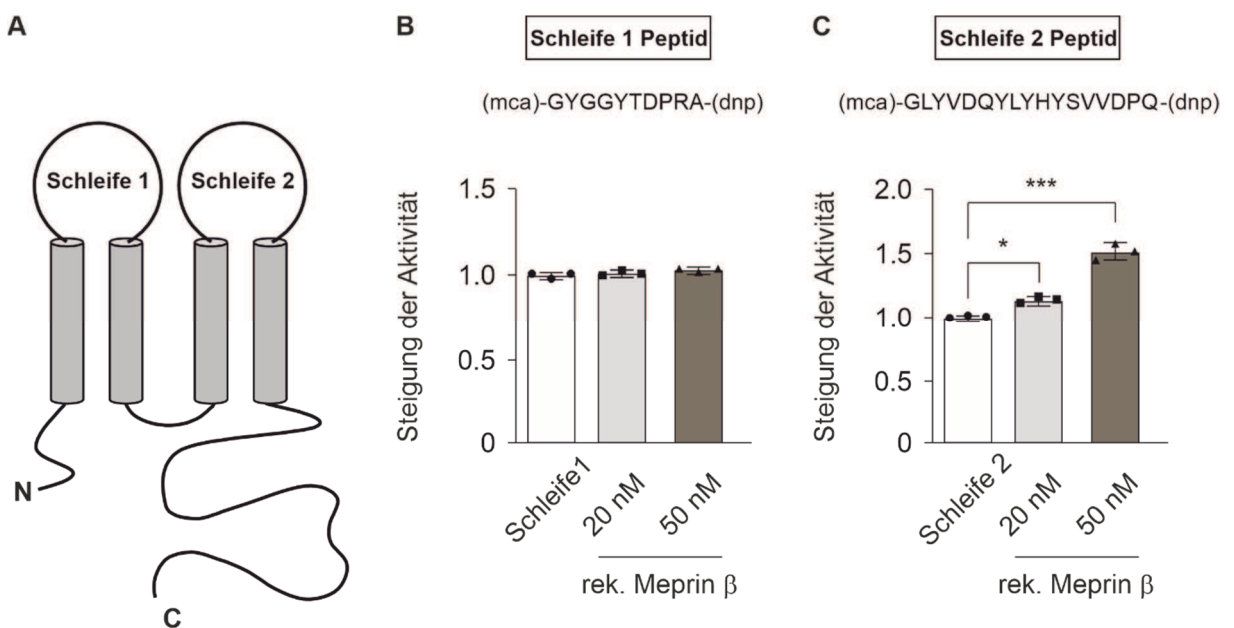
**Abbildung 11: Erhöhte Mep1b Aktivität in Hirngefäßen von Mep1b WT Mäusen**

Der Activity assay wurde mit 150 µg an Hirngefäßen und Nierenlysaten von Mep1b KO und WT Mäusen durchgeführt. Diese wurden jeweils mit 50 µM eines Mep1b spezifischen fluorogenen Peptidsubstrat in 100 µl Totalvolumen in 96-Lochplatten inkubiert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden bei 37°C alle 30s für 120 min mittels eines Spektrophotometers detektiert. Die Intensitäten der Mep1b KO Lysate wurden als 1,0 Referenzwert festgesetzt. Für die Datenanalyse wurde die Steigung einer gleichen linearen Aktivitätsbreite/raums (activity range) verglichen. Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert ± Standardabweichung von n=4 (Mep1b WT) und n=4 (Mep1b KO) biologischen Replikaten. Für die statistische Analyse wurde ein one-way ANOVA gefolgt von einem Tukey's post hoc Test verwendet. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

Interessanterweise zeigte sich in der vorherigen Western-Blot Analyse der Hirnkapillaren neben der fehlenden Mep1b Bande auch eine Auffälligkeit hinsichtlich

des TJ Proteins Occludin. Dessen Bande in den Mep1b KO Mäusen war im Vergleich zum WT nach oben verschoben (s. Abbildung 10 A), was auf einen potenziellen Einfluss von Mep1b auf das proteolytische Schneiden von Occludin unter physiologischen Bedingungen in den WT Mäusen hinweisen könnte. Angesichts der molekularen Masse der detektierten Occludin Bande und der Tatsache das ein Antikörper gegen den C-Terminus des Proteins verwendet wurde, ist am wahrscheinlichsten, dass sich ein solcher Schnitt entweder in der ersten oder der zweiten extrazellulären Schleife des Proteins ereignet.

Um weiter zu untersuchen, ob Occludin ein mögliches direktes Substrat von Mep1b darstellen könnte, wurde erneut in Kooperation mit der Universität Kiel ein Peptide cleavage Assay von Dr. Franka Scharfenberg durchgeführt, dessen Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass nur ein synthetisches Peptid, dass der 2. extrazellulären Occludinschleife entspricht durch Mep1b geschnitten werden kann, während die 1. Occludinschleife durch Mep1b nicht beeinflusst wird (s. Abbildung 12 B u. C). Dieses Ergebnis zeigt die Spezifität des Occludinschnittes durch Mep1b, da nur eine der potenziell möglichen Schnittstellen im Endeffekt durch Mep1b detektiert und prozessiert wurde. Angesichts dieser Ergebnisse und des Western Blots erscheint eine Prozessierung von Occludin *in vivo* durch Mep1b möglich, dennoch können hier andere Effekte wie die Aktivierung anderer Proteasen, die Occludin *in vivo* schneiden, nicht ausgeschlossen werden.



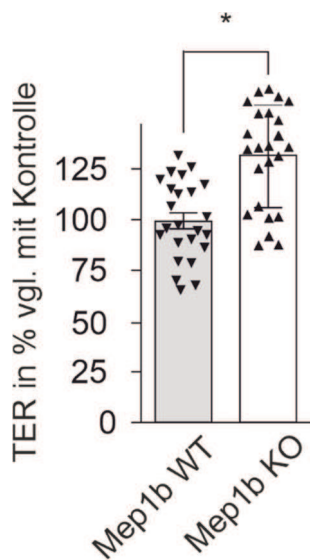
**Abbildung 12: Die zweite extrazelluläre Occludinschleife wird von Mep1b *in vitro* geschnitten**

(A) Schematische Darstellung des Occludinaufbaus. (B, C) Die proteolytische Aktivität von Mep1b gegenüber den beiden extrazellulären Occludinschleifen. Es wurden gequenchete fluorogene Peptide, die die Aminosäuresequenz der ersten (B) und zweiten (C) extrazellulären Schleife Occludins enthalten, synthetisiert. Für die *in vitro* Aktivitätsmessung wurden die Peptide in einer Konzentration von 20  $\mu$ M entweder mit 20 nM oder 50 nM Mep1b in 100  $\mu$ l Totalvolumen in 96-Loch Platten inkubiert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden bei 37°C jede 30 s für 120 min mithilfe eines Spektrophotometer detektiert. Die Intensitäten der Schleifenpeptide ohne Mep1b wurden als Referenzwert auf 100% festgesetzt. Für die Datenanalyse wurde die Steigung eines gleichen linearen Aktivitätsraums/bereiches verglichen. Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Für die statistische Analyse wurde ein one-way ANOVA gefolgt von einem Tukey's post hoc Test verwendet. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

#### 8.1.4 Erhöhter TER in primären Maushirnendothelzellen von Mep1b KO

##### Mäusen

Einfache BHS *in vitro* Modelle wie das in dieser Dissertation verwendete endotheliale Monolayer Modell sind in der Lage wichtige Einblicke in die BHS Physiologie zu geben, indem sie die Messung von Molekültransport (106, 111) und Barriereintegrität ermöglichen (117, 118). Der TER ist hierbei ein Indikator für die Dichtigkeit und Integrität der BHS und direkt von der TJ Ausbildung abhängig. Da in den Hirnkapillaren der Mep1b KO Mäuse eine erhöhte TJ Proteinexpression detektiert wurde, wurde zusätzlich auch die Barriereintegrität in primären Maushirnendothelzellen (pMBCECs) untersucht. Hierfür wurden pMBCECs von Mep1b KO und WT Mäusen isoliert und anschließend im BHS *in vitro* Modell hinsichtlich ihres TERs, wie bereits oben beschrieben (s. 8.1.2), analysiert. In Übereinstimmung mit der zuvor erhöhten TJ Proteinexpression in den Mep1b KO Hirnkapillaren wurden in Mep1b KO pMBCECs um fast 30% signifikant erhöhte TER Werte gegenüber den WT Kontrollen gemessen (s. Abbildung 13), was darauf hinweist, dass die Abwesenheit von Mep1b zu einer dichteren BHS in den Mäusen führt. Da die Mep1b Überexpression und der Mep1b KO zu genau entgegengesetzten Resultaten hinsichtlich TJ Proteinexpression und TER geführt haben, liegt der Schluss nahe, dass Mep1b eine relevante Protease in der Regulation der TJ Zusammensetzung und der Barriereintegrität im Hirnendothel sein könnte.



**Abbildung 13: Erhöhter TER in primären Hirnendothelzellen von Mep1b KO Mäusen**

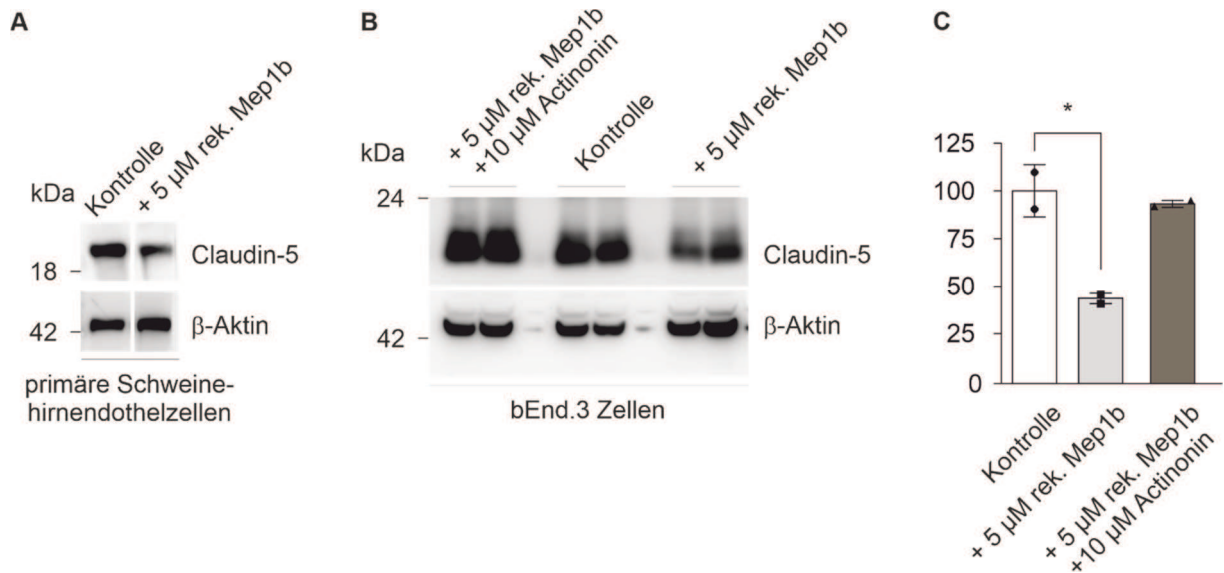
pMBCECs wurden nach der Isolation aus Mep1b KO und WT Mäusen im cellZscope-Gerät auf Transwelleinsätzen kultiviert. Die TER Werte wurden wie zuvor für die bEnd.3 Zellen beschrieben gemessen. TER Messung von Mep1b WT pMBCECs im Vergleich zu Mep1b KO pMBCECs. Die TER Werte der Mep1b WT pMBCECs wurden als Referenzwert auf 100% festgesetzt. Die maximal gemessenen TER Werte waren  $> 50 \Omega\text{cm}^2$  (Mep1b WT) und  $> 65 \Omega\text{cm}^2$  (Mep1b KO). Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von  $n=24$  (Mep1b WT) und  $n=24$  (Mep1b KO) biologischen Replikaten. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte T-Test verwendet. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### 8.1.5 Lösliches Mep1b ist in der Lage die Claudin-5 Expression *in vitro* zu reduzieren

Der Effekt des Mep1b KO auf den TER in pMBCECS von Mep1b KO Mäusen spricht dafür, dass endotheliales Mep1b die TJ Zusammensetzung im Hirnendothel beeinflusst. Jedoch können auch sezernierte Faktoren von anderen Zellen der NVU oder die Komposition der Basalmembran die BHS Integrität beeinflussen (119-122). Um zu analysieren ob auch lösliches Mep1b, das von verschiedenen nichtendothelialen Zellen in die Körperflüssigkeiten sezerniert wird, in der Lage ist die TJ Proteinexpression zu regulieren, wurden primäre Schweinehirnendothelzellen mit  $5 \mu\text{M}$  rekombinanten Mep1b für 24h behandelt. Interessanterweise führte das lösliche Mep1b im Zellkulturmedium zu einer reduzierten Claudin-5 Proteinexpression in den primären Schweinehirnendothelzellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (s. Abbildung 14 A). In gleicher Weise zeigten auch bEnd.3 Zellen, die mit  $5 \mu\text{M}$  rekombinanten Mep1b behandelt wurden, eine signifikante Expressionsreduktion von Claudin-5 um fast 50% verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Dieser Mep1b Effekt auf die Claudin-5 Expression konnte durch die



gleichzeitige Zugabe des Mep1b Inhibitors Actinonin verhindert werden (s. Abbildung 14 B u. C). Die beobachteten Resultate sprechen deshalb dafür, dass nicht nur endotheliales Mep1b sondern auch sezerniertes lösliches Mep1b von anderen Zellen die TJ Proteine im Hirnendothel beeinflussen kann.



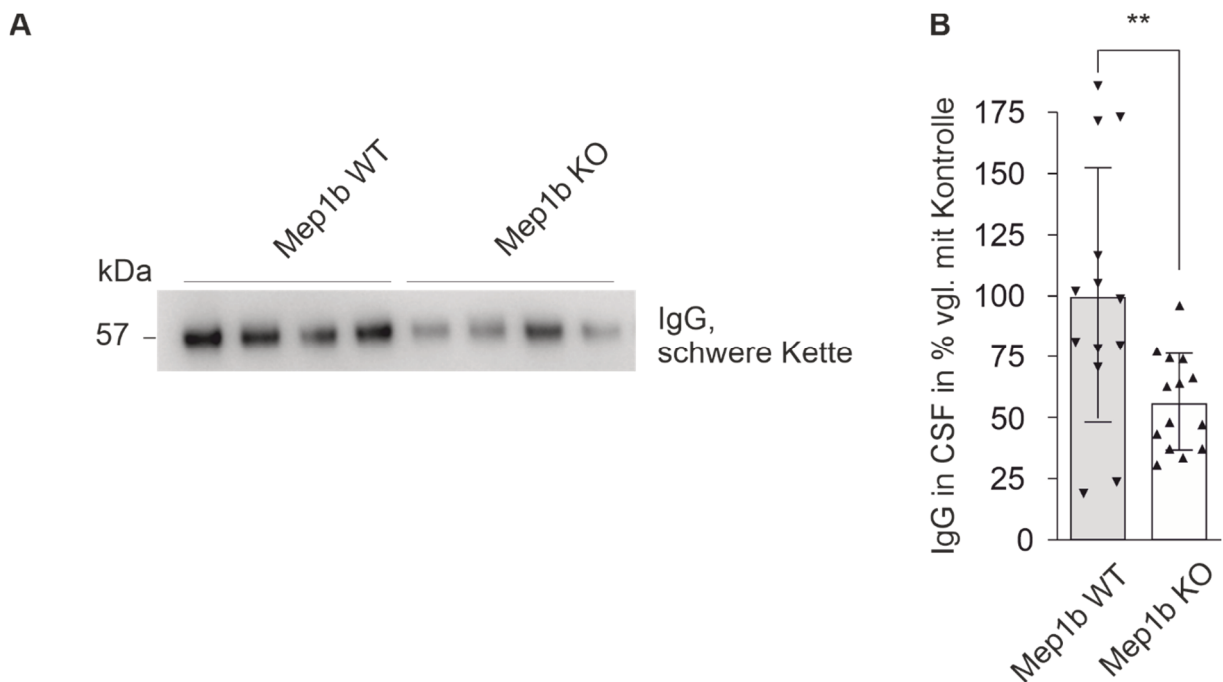
**Abbildung 14: Reduktion der Claudin-5 Expression in Endothelzellen durch Behandlung mit löslichem Mep1b**

(A) Eine Immunodetektion von Claudin-5 in Lysaten von primären Schweinehirnendothelzellen, die zuvor mit 5 μM rekombinanten Mep1b behandelt wurden und unbehandelten Kontrollen. Anti-β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (B) Eine Immunodetektion von Claudin-5 in Lysaten von bEnd.3 Zellen, die zuvor mit 5 μM rekombinanten Mep1b, 5 μM rekombinanten Mep1b und 10 μM Actinonin oder nicht behandelt wurden. Anti-β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (C) Die Claudin-5 Expression in den bEnd.3 Zelle wurde mittels densitometrischer Analyse von mehreren Western Blots quantifiziert. Die Intensitäten der unbehandelten Kontroll-bend.3 Zellen wurde auf 100% gesetzt. Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert ± Standardabweichung von n=2 biologischen Replikaten pro Behandlungsgruppe. Für die statistische Analyse ein one-way ANOVA gefolgt von einem Tukey's post hoc Test verwendet. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

### 8.1.6 Reduzierter IgG-Gehalt in Liquor von Mep1b KO Mäusen

Da in den vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte, dass Mep1b sowohl die TJ Zusammensetzung als auch die Integrität der BHS beeinflusst, stellte sich nun die Frage, ob ein Mep1b KO auch einen Effekt auf die Permeabilität der BHS *in vivo* hat. Hierfür wurden die Proteinlevel der IgG-Antikörper im Liquor gemessen, der durch Punktion der Cisterna magna der Mep1b KO und WT Mäuse gewonnen wurde. IgG Antikörper sind im Normalfall zu groß, um die BHS in großen Mengen zu durchqueren. Deshalb werden sie gemeinhin verwendet, um die Penetration von großen blutstämmigen Molekülen in das Gehirn zu untersuchen (8, 26). Daher wurden die IgG-

Liquorlevel als geeigneter Marker zur *in vivo* Analyse der BHS Permeabilität in den Mep1b KO und WT Mäusen erachtet. Die Liquorflüssigkeit (CSF) umgibt das Gehirn in den Ventrikeln und wird konstant mit der interstitiellen Gehirnflüssigkeit vermischt, indem Liquor in das Hirnparenchym einfließt (8). Deshalb wurde Liquor als repräsentatives Kompartiment zur Analyse der parazellulären Passage von Substanzen aus dem Blut ins ZNS ausgewählt (27). In der Liquoruntersuchung der Mep1b KO Mäuse, wurde eine signifikante Reduktion des IgG- Gehaltes um fast 50% gegenüber den WT Mäusen gemessen (s. Abbildung 15 A u. B). Diese Daten passen mit der zuvor gemessenen erhöhten TJ Proteinexpression und TER Werten überein und weisen darauf hin, dass die gesteigerte Dichtigkeit der BHS in Mep1b KO Mäusen in einer reduzierten Permeabilität gegenüber einem hochmolekularen Protein wie IgG resultiert.



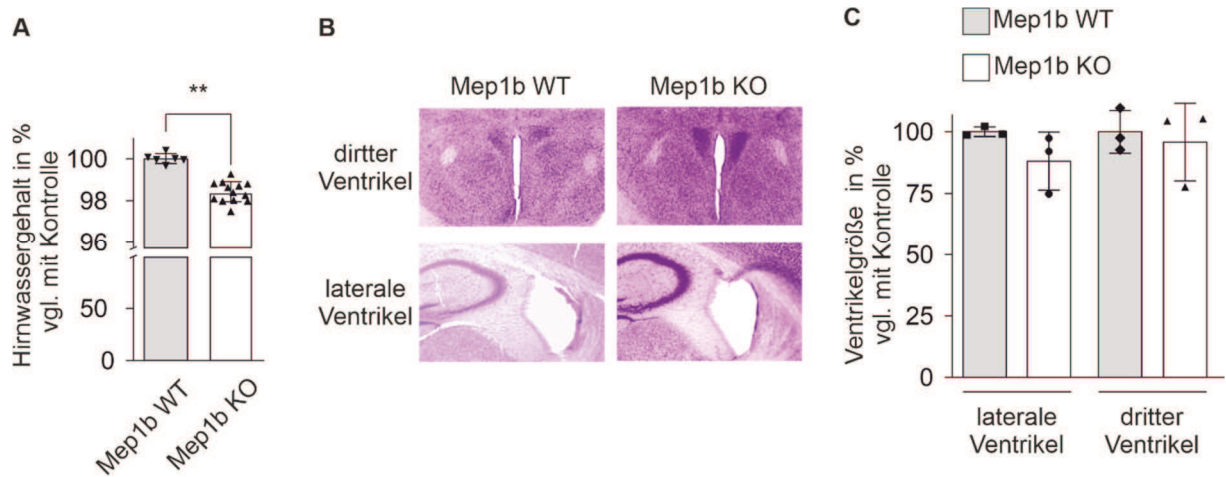
**Abbildung 15: Reduzierter IgG-Gehalt in Liquor von Mep1b KO Mäusen**

Um die Integrität der BHS *in vivo* zu messen, wurden Liquorproben von Mep1b KO und WT Mäusen hinsichtlich ihres IgG-Gehaltes analysiert. **(A)** Eine repräsentative Immunodetektion von IgG im Liquor von Mep1b KO und WT Mäusen. **(B)** Der IgG-Gehalt im Liquor wurde durch densitometrische Analyse von Western Blots gemessen. Die Intensitäten der IgG-Banden der Mep1b WT Liquorproben wurden als Referenzwert auf 100% gesetzt. Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von  $n=13$  (Mep1b WT) und  $n=14$  (Mep1b KO) biologischen Replikaten. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### 8.1.7 Signifikante Veränderung des Hirnwassergehaltes in Mep1b KO Mäusen

Bei einem Zusammenbruch der BHS kommt es zu einer strukturellen Zerstörung der TJs gepaart mit einer erhöhten parazellulären Permeabilität, was ein gemeinsames Merkmal mehrerer ZNS Erkrankungen darstellt. Darunter finden sich sowohl akute als auch chronische neurodegenerative Erkrankungen wie AD, PD, HD, ALS oder MS (15). In Folge hiervon kann es zu einem extensiven Einstrom hämatogener Flüssigkeit in den Extravasalraum kommen. Dies resultiert wiederum in einem erhöhtem Hirnwassergehalt, der als Marker für das Ausmaß von Hirnschwellungen fungiert (14). Da in Mep1b KO Mäusen veränderte BHS Eigenschaften wie die Erhöhung von TJ Proteinen und TER Werten oder die Reduktion der Permeabilität gegenüber blutstämmigen Molekülen beobachtet wurden, wurde nun analysiert, ob der Mep1b KO darüber hinaus auch den Hirnwassergehalt beeinflusst. Hierfür wurde der Hirnwassergehalt von Mep1b KO Mäusen mit WT Tieren verglichen. In den Gehirnen der Mep1b KO Mäuse wurde eine signifikante Abnahme des Hirnwassergehaltes um fast 1,6% verglichen mit den WT Kontrollen gemessen (s. Abbildung 16 A). Diese Differenz von 1,6% ist auch *in vivo* für die Homöostase des Hirnwassergehaltes relevant, da der Hirnwassergehalt eine nahezu exponentielle Relation zu dem Ausmaß von Hirnschwellungen aufweist (89). Daher sprechen die Resultate dafür, dass der KO von Mep1b zu einem reduzierten Hirnwassergehalt führt, was eine Konsequenz der zuvor beobachteten erhöhten Dichtigkeit der BHS in Mep1b KO Mäusen sein könnte.

Um zu untersuchen, ob die Abnahme des Hirnwassergehaltes im Mep1b KO auch mit einer Schrumpfung der Hirnventrikel verbunden ist, wurde in Hirnschnitten von Mep1b KO und WT Mäusen die Größe des dritten und der lateralen Ventrikel bestimmt. In der Analyse konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Mep1b KO und Kontrollmäusen entdeckt werden, was den Schluss nahelegt, dass die Mep1b Expression und die Unterschiede im Hirnwassergehalt wohl nicht die Hirnventrikelmorphologie beeinflussen (s. Abbildung 16 B u. C).



**Abbildung 16: Erniedrigter Hirnwassergehalt in Mep1b KO Mäusen**

**(A)** Um die Integrität der BHS in Mep1b KO und WT Mäusen zu analysieren wurde der Hirnwassergehalt untersucht. Die Gehirne der Mep1b KO und WT Mäuse wurden gewogen und über Nacht bei 100°C getrocknet. Die getrockneten Gehirne wurden danach erneut gewogen und der Hirnwassergehalt wie folgt berechnet:  $(\text{Nasses Gewicht} - \text{Trockenes Gewicht}) \cdot 100 / \text{Nasses Gewicht}$ . Die Nettoveränderung im Hirnwassergehalt der Mep1b<sup>-/-</sup> Mäuse wurde gegenüber dem der WT Tiere, der als 100% Referenzwert fungierte, normalisiert. Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von n=6 (Mep1b WT) und n=13 (Mep1b KO) biologischen Replikaten. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. **(B-C)** Bestimmung der Hirnventrikelgröße von Mep1b KO und WT Mäusen. **(B)** Repräsentative Hirnschnitte von dritten und lateralen Ventrikeln von Mep1b KO und WT Mäusen. **(C)** Die Fläche der lateralen und dritten Ventrikel wurde in vergleichbaren frontalen Ebenen unter dem Mikroskop bestimmt und die Werte zum Mittelwert der WT Mäuse normalisiert. Die Daten sind dargestellt in Dotplots mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von n=3 (Mep1b WT) und n=3 (Mep1b KO) biologischen Replikaten. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

## 9 Diskussion

Die Forschung bezüglich der Metalloprotease Mep1b hat sich seit ihrer Entdeckung Anfang der 1980er Jahre (40) bisher hauptsächlich auf die organspezifischen Funktionen in Niere und Darm fokussiert, da Mep1b in diesen Geweben die höchste Expression aufweist. Neben einer Beteiligung an entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa wurden Mep1b Dysregulationen auch im akuten Nierenversagen beschrieben. Erst in den letzten Jahren konnte ein viel umfangreicheres Expressionsmuster für Mep1b entdeckt werden, so dass auch zusätzliche Bereiche wie die Beteiligung von Mep1b an der Bindegewebsynthese im Rahmen von Fibroseerkrankungen oder eine mögliche Rolle bei der Pathogenese der neurodegenerativen Alzheimer Erkrankung in den Blickpunkt gerückt sind (4, 19, 23, 50). Einer der Hauptausgangspunkte für die Durchführung dieser Dissertation war jedoch, dass Mep1b über die Fähigkeit verfügt in diversen unterschiedlichen Geweben (z.B. Haut, Darm, Niere) Proteine der Zell-Adhäsion zu spalten (4-8). Interessanterweise passt diese Eigenschaft sehr gut zu den beobachteten Dysregulationen der Protease in den oben genannten Erkrankungen, da sowohl die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, das akute Nierenversagen als auch die Alzheimer Erkrankung mit einer Störung der Zell-Adhäsion assoziiert sind und allesamt mit einer Beeinträchtigung einer physiologischen Barriere einhergehen (49, 50, 114). Unabhängig von der Alzheimer Erkrankung wurde zudem auch unter physiologischen Bedingungen eine erhöhte Mep1b Expression im Gehirn im Vergleich zu den meisten anderen Organen beschrieben (18, 19), weshalb sich die Frage stellt, ob Mep1b nicht eventuell auch für zerebrale Zell-Kontaktangelegenheiten der BHS von Bedeutung sein könnte. Aus diesem Grund wurden in dieser Dissertation sowohl der potenzielle Einfluss von Mep1b auf die spezifischen Zell-Adhäsionsproteine des Hirnendothels (TJs) als auch die Auswirkung auf die Integrität der BHS untersucht. Die Resultate der verschiedenen durchgeführten Experimente liefern hierbei ganz klare Anhaltspunkte, dass Mep1b in der Lage ist eine Regulatorfunktion an der BHS zu übernehmen.

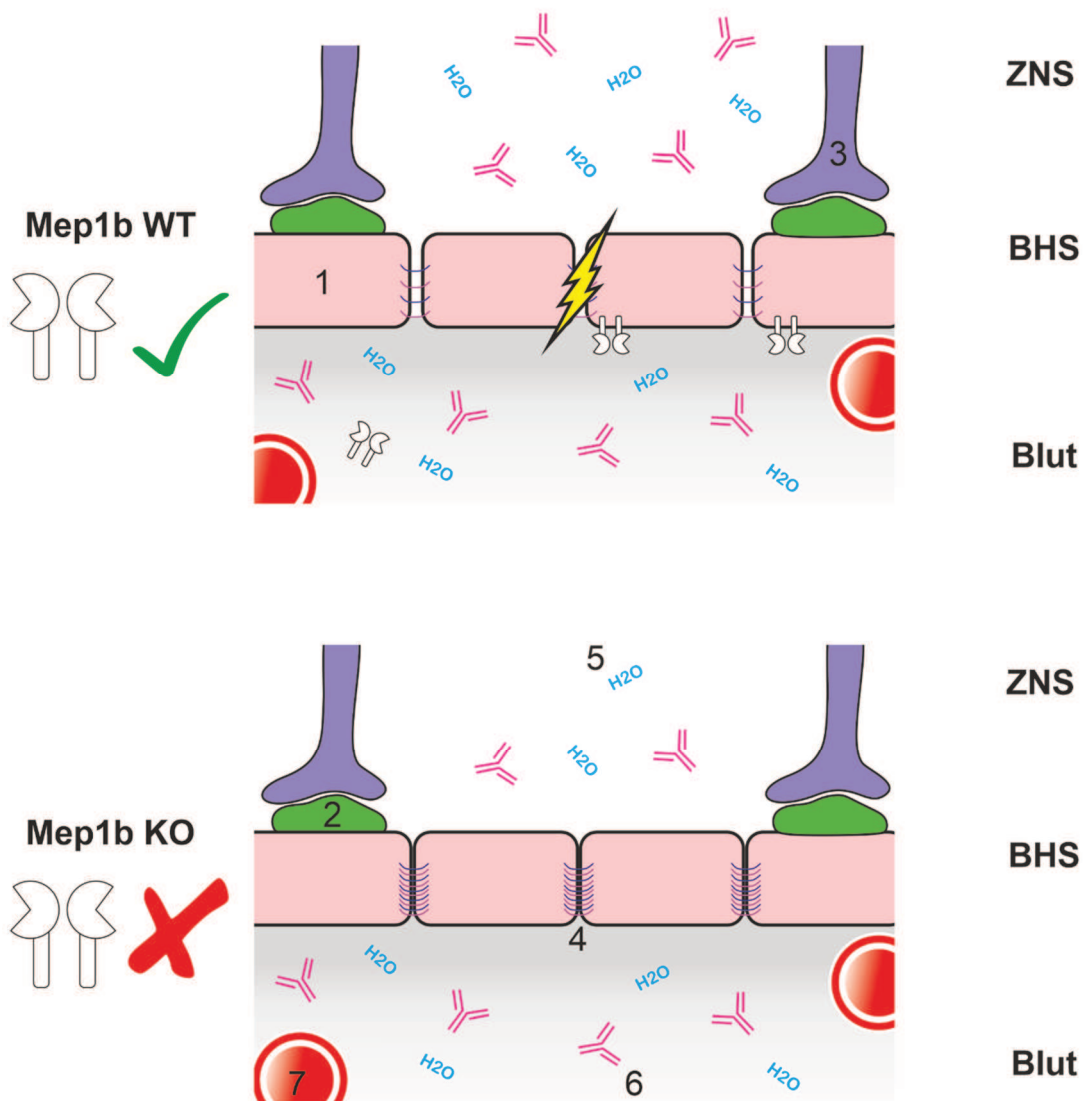
### 9.1 Mep1b als neuer Regulator der BHS Integrität

In der vorliegenden Dissertation konnte aufgezeigt werden, dass eine Mep1b Überexpression in Maushirnendothelzellen (bEnd.3) zu einer Expressionsreduktion des TJ Proteins Claudin-5 führt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den

Ergebnissen aus dem *in vitro* BHS Modell, dass in den bEnd.3 + Mep1b Zellen einen erniedrigten Widerstand (TER) und eine erhöhte Durchlässigkeit gegenüber radioaktiv markiertem [ $C^{14}$ ]-Inulin zeigt. Im Verbund sprechen diese Resultate dafür, dass die BHS durch die Mep1b Überexpression *in vitro* geschädigt wurde.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Mep1b Expression auf die Integrität der BHS auch im Tiermodell anhand von Mep1b KO Mäusen untersucht, wobei einerseits eine erhöhte Expression verschiedener TJ Proteine und gesteigerte TER Werte festgestellt werden konnten und andererseits eine herabgesetzte Durchlässigkeit der BHS, sichtbar an erniedrigten IgG-Antikörpern im CSF und einem reduzierten Hirnwassergehalt, detektiert wurden. Zusammengenommen lässt sich hieraus schließen, dass ein KO der Mep1b Expression in einer dichteren BHS mit gesteigerter Integrität resultiert.

Da die Mep1b Überexpression in der Zellkultur und Mep1b KO im Tiermodell somit direkt entgegengesetzte Effekte hinsichtlich fundamentaler BHS Eigenschaften, wie TJ Proteinexpression, Widerstand und Permeabilität zeigen, deutet dies daraufhin, dass Mep1b als ein neuer Regulator der BHS angesehen werden kann, der einen relevanten Einfluss auf die TJ Zusammensetzung und die Barrierenintegrität des Hirnendothels *in vivo* ausübt.



**Abbildung 17: Auswirkungen der Mep1b Expression auf die Integrität der BHS im Tiermodell**

1 Hirnendothelzelle, 2 Perizyt, 3 Astrozytenfortsatz, 4 TJs, 5 Wassermoleküle, 6 IgG Antikörper. In der Abbildung sind die Auswirkungen der Mep1b Expression auf die Integrität und Durchlässigkeit der BHS dargestellt. Bei fehlender Mep1b Expression im Mep1b KO werden mehr TJ Proteine exprimiert, weshalb die Hirnendothelzellen dichter miteinander verbunden sind, so dass die Durchlässigkeit gegenüber Wasser und IgG-Antikörper aus dem Blut ins ZNS herabgesetzt ist. In den Mep1b WT Tieren ist die TJ Proteinexpression im Vergleich herabgesetzt, so dass es zu einem gesteigerten Durchtritt an IgG-Antikörpern und einem erhöhten Hirnwassergehalt als Folge der weniger dichten BHS kommt.

## 9.2 Auswirkungen der Mep1b Überexpression in bEnd.3 Zellen

Um zu überprüfen, ob eine Mep1b Expression einen Einfluss auf die TJ Funktion *in vitro* ausübt, wurden in dieser Dissertation durch retroviralen Gentransfer Hirnendothelzellen hergestellt, die die Metalloprotease Mep1b stabil überexprimieren (bEnd.3 + Mep1b). Hinsichtlich der Claudin-5 Proteinexpression wurde eine 50-

prozentige Reduktion in den bend.3+ Mep1b Zellen detektiert, die darauf hinweist das Mep1b einen schädlichen Effekt auf die TJ Proteinexpression *in vitro* ausübt. Dieses Resultat wurde in anderen Experimenten von einem erniedrigten TER und einer erhöhten Permeabilität gegenüber einem parazellulären Tracer begleitet.

Ähnliche Beobachtungen wurden von Chen und Kollegen berichtet, die ebenfalls bEnd.3 Zellen verwendeten und diese mit der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) transfizierten. Die MMP-9 Überexpression resultierte in einer erniedrigten Expression der TJ Proteine Claudin-5, Occludin und ZO-1 und einer Schädigung der BHS Permeabilität (123). MMP-9 ist ein Mitglied der Familie der Matrix Metalloproteasen, dass in der Lage ist, die TJ Proteine Occludin und Claudin-5 zu spalten und beispielsweise im Rahmen einer fokalen zerebralen Ischämie zu einer Öffnung der BHS zu führen (124, 125).

Ein weiteres Beispiel für die Schädigung der BHS durch eine Hochregulation der MMP-9 Aktivität wurde von Bell und Kollegen beschrieben (120). Die Forschungsgruppe ersetzte in Mäusen murines APOE durch eine humane Isoform von APOE4, dass einen der wichtigsten genetischen Risikofaktoren für die Alzheimer-Erkrankung darstellt und dessen Träger generell neurovaskuläre Dysfunktionen aufweisen (126, 127). Durch den Vergleich verschiedener transgener APOE Mäuse, konnte gezeigt werden, dass nur bei einem Austausch von murinem APOE durch humanes APOE4 der proninflammatorische CypA-nuclear factor- $\kappa$ B–MMP-9 Signalweg in Perizyten angestoßen und die MMP-9 Expression stimuliert wird. So werden durch die gesteigerte MMP-9 Expression die TJ Proteine Claudin-5, Occludin und ZO-1 gespalten und die BHS geschädigt. Diese Effekte konnten jedoch durch eine Behinderung der MMP-9 Funktion wieder rückgängig gemacht werden. Diese umfasste entweder eine Behandlung mit einem MMP spezifischen Inhibitor oder die spezifische Stilllegung des MMP-9 Gens durch die Zugabe von MMP-9 short interfering RNA in den Hippocampus dieser Mäuse, so dass hier ein ganz klarer Zusammenhang zwischen BHS Integrität und MMP-9 Funktionsniveau gezeigt werden konnte (120, 128).

In der Behandlung der bEnd.3 Zellen mit löslichem Mep1b (s. 8.1.5) konnte durch die Anwendung des spezifischen Mep1b Inhibitors Actinonin ebenfalls die Reduktion des TJ Proteins Claudin-5 wieder rückgängig gemacht werden, was als weitere Parallele zwischen Mep1b und MMP-9 hinsichtlich der Auswirkung auf die TJ Komposition gesehen werden kann.



Leider war in den bEnd.3 Zellen keine weitere Untersuchung der anderen TJ Proteine Occludin und ZO-1 in dieser Dissertation möglich. Im Gegensatz zu den Hirnkapillarlysaten der Mep1b KO und WT Mäuse, wo eine Detektion ohne Probleme möglich war, konnten die verwendeten Antikörper ZO-1 und Occludin in den bEnd.3 Lysaten nicht erkennen, obwohl in der Literatur beschrieben ist, dass bEnd.3 Zellen diese Proteine exprimieren (123). Die Proteinexpressionen aus den Hirnkapillarversuchen und der Ergebnisse des Aktivitätsassays mit den synthetischen extrazellulären Occludinschleifen lassen jedoch vermuten, dass neben Claudin-5 auch Occludin und ZO-1 durch Mep1b in bEnd.3 Zellen beeinflusst werden.

Während die MMP Funktion im Allgemeinen und ihre Rolle in der Schädigung der BHS während eines Schlaganfalls oder bei der Alzheimer Erkrankung (MMP-9, MMP-2) bisher schon intensiv untersucht worden sind, stellt dieses Forschungsfeld für die Metalloprotease Mep1b Neuland dar (4). Da in dieser Dissertation aber die beobachteten Effekte auf die TJ Zusammensetzung durch die Mep1b Überexpression in vielerlei Hinsicht denen der MMP-9 Überexpression ähneln, liegt die Überlegung nahe, dass Mep1b einen vergleichbaren Einfluss auf die Integrität der BHS ausübt, was für eine Vielzahl von Erkrankungen, die mit BHS Schädigung einhergehen von Bedeutung sein könnte (s. 9.5)

### **9.3 Beeinflussung der TJ Proteine durch Mep1b und potenzielle Mechanismen**

Im Gegensatz zu MMP-9, für das klar gezeigt wurde, dass es Occludin und Claudin-5 schneidet (124), konnte der exakte Mechanismus durch den Mep1b die TJ Expression beeinflusst noch nicht entschlüsselt werden. Eine mögliche Variante könnte an dieser Stelle ein direkter Mechanismus sein, bei dem Mep1b direkt die Zell-Adhäsionsproteine spaltet und deshalb die BHS Integrität schädigt.

#### **9.3.1 Occludin**

Vor allem für das TJ Protein Occludin handelt es sich hierbei um eine wahrscheinliche Option. In der Western-Blot Analyse der Hirnkapillaren zeigte sich eine Verschiebung der Occludin spezifischen Bande zwischen Mep1b KO und WT Mäusen. Da in der Abwesenheit von Mep1b die Occludin Bande nach oben verschoben war (s. Abbildung 10A) könnte dies auf ein potenziellen Occludinschnitt durch Mep1b unter physiologischen Bedingungen in den WT Mäusen hinweisen. In dem zusätzlich

durchgeführten Peptide cleavage assay konnte diese Hypothese zusätzlich untermauert werden, da Mep1b *in vitro* in der Lage ist spezifisch die 2. extrazelluläre Schleife von Occludin zu schneiden, während die 1. extrazelluläre Schleife nicht durch Mep1b prozessiert wird. Die molekulare Masse der verschobenen Occludin Bande im Western Blot und die Tatsache, dass ein Antikörper gegen den C-Terminus des Proteins verwendet wurde, legen ebenfalls nahe, dass ein Occludinschnitt durch Mep1b in einer der beiden extrazellulären Schleifen erfolgt, so dass eine Prozessierung von Occludin *in vivo* durch Mep1b möglich und wahrscheinlich erscheint.

Dass Mep1b nur in der Lage ist, die 2. extrazelluläre Schleife von Occludin *in vitro* zu schneiden ist hierbei von besonderer Bedeutung. In einer Studie, in der der Einfluss beider extrazellulärer Schleifen auf die Occludinfunktion im TJ Komplex untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass trunkierte Occludinformen, denen entweder die 2. oder beide Schleifen fehlen, nicht in den TJ Komplexen lokalisiert sind, sondern an der basolateralen Zelloberfläche verbleiben. Ein Verlust der 1. extrazellulären Schleife zeigte dagegen keine Wirkung, so dass diese Resultate dafürsprechen, dass lediglich die zweite extrazelluläre Occludinschleife essenziell für eine zielgerichtete Lokalisation von Occludin in den TJ ist (129, 130).

Sollte sich bestätigen, dass *in vitro* und *in vivo* Einfluss von Mep1b auf Occludin übereinstimmen, wäre eine Prozessierung der 2. extrazellulären Occludinschleife durch Mep1b dementsprechend eine mögliche Erklärung für die beobachteten Mep1b Auswirkungen auf die Integrität der TJ Barriere. Eine Protease, für die ein solcher Zusammenhang beispielsweise bereits beschrieben wurde, stellt die Cysteinproteinase Der p1 (Dermatophagoides pteronyssinus Peptidase 1) dar, die in den Fäkalien der europäischen Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* vorkommt. Durch den Schnitt der extrazellulären Schleifen von Occludin führt die Protease zur Disruption der Integrität der TJ Barriere in Nieren und Lungenepithelzellen in Kombination mit einem Zusammenbruch dieser physiologischen Körperbarrieren und ermöglicht den ungehinderten Durchtritt von Hausstaubmilbenallergenen (129, 131).

Somit gibt es auch andere Proteasen, die Occludin an den extrazellulären Domänen schneiden können. Deshalb ist es denkbar, dass Mep1b anstatt eines direkten Schnittes auch über indirekte Mechanismen, wie die Aktivierung anderer physiologisch vorkommender Proteasen, die Occludinexpression beeinflusst. An dieser Stelle wären

beispielsweise die ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) zu nennen, die unter anderem von den Endothelzellen der Hirnkapillaren exprimiert werden und Occludin *in vivo* schneiden (27, 132).

### **9.3.2 Claudin-5 u. ZO-1**

Eine solche indirekte Wirkung von Mep1b bei denen verschiedene Signalkaskaden durch die Protease aktiviert werden und sich wiederum auf die TJ Proteinexpression auswirken, stellt auch eine wahrscheinliche Option für die TJ Proteine Claudin-5 und ZO-1 dar. Vor allem vor dem Hintergrund, dass es in den durchgeführten Experimenten dieser Dissertation keine Hinweise auf eine direkte Prozessierung dieser beiden TJ Proteine durch Mep1b gab.

Für Claudin-5 könnten hierbei ähnlich wie für Occludin die ADAMs eine Rolle spielen insbesondere der Subtyp ADAM 17. Dieser wird einerseits durch eine Prozessierung durch Mep1b in seiner Aktivität gesteigert, und ist andererseits selbst in der Lage membrangebundenes Mep1b von der Zelloberfläche zu spalten und so in die lösliche Form zu überführen (5, 27). Im Rahmen einer Hypoxie führt ADAM 17 zu einer Reduktion der Claudin-5 Proteinexpression und einer Schädigung des Zusammenhalts der gesamten TJs der BHS (132).

Da in dieser Dissertation gezeigt wurde, dass sowohl membrangebundenes als auch lösliches Mep1b die TJ Proteinexpression reduzieren können, ist es schwierig zu beurteilen, wie sich die Prozessierung durch ADAM 17 und damit die Überführung von membrangebundenen in löslichen Zustand auf den Mep1b Einfluss hinsichtlich der TJ Komplexe auswirken würde. Dennoch liefert diese Beziehung ein gutes Beispiel für die Komplexität der Interaktionen zwischen verschiedenen Proteasen, weshalb in dieser Hinsicht auch häufig vom sogenannten „protease web“ gesprochen wird, was leider jedoch die Zuweisung bestimmter Funktionen zu einer spezifischen Protease erschwert (133).

Die Mep1b Überexpression zeigte in den Hirnkapillaren aber nicht nur einen Effekt auf die transmembranen TJ Proteine Occludin und Claudin-5, die den parazellulären Spalt zwischen den Endothelzellen überbrücken, sondern auch auf das intrazelluläre TJ Protein ZO-1, das den TJ Komplex mit dem Zytoskelett verbindet. Da sowohl membrangebundenes als auch lösliches Mep1b keinen Zugang zum intrazellulären ZO-1 haben, könnte es plausibel sein, dass Mep1b durch die Spaltung von Claudin-5 und/oder Occludin zu einer Internalisierung des gesamten TJ Komplexes inklusive ZO-

1 führt. Ob es sich hierbei um einen schrittweisen Prozess handelt, der mit dem Schnitt eines extrazellulären TJ Proteins wie Occludin beginnt oder eher ein simultaner Mechanismus stattfindet, bei dem die verschiedenen TJ Proteine gleichzeitig beeinträchtigt werden, lässt sich leider nicht mit Gewissheit sagen. Hier werden weitere Studien vonnöten sein, um den exakten Ablauf zu verstehen, wie Mep1b den TJ Komplex in seiner Gesamtheit beeinflusst.

#### **9.4 Endotheliales vs. Nichtendotheliales Mep1b, was ist für die Effekte auf die BHS verantwortlich?**

Angesichts der Effekte, die die Mep1b Expression *in vivo* auf die TJ Komplexe und die Integrität der BHS ausübt, stellt sich nun die Frage, von welchen spezifischen Zellen dieses Mep1b stammt. Inwiefern hier endotheliales Mep1b oder doch sezerniertes Mep1b von anderen Zelltypen hauptverantwortlich ist, kann mit den Ergebnissen dieser Dissertation nicht abschließend beantwortet werden und wird sich erst mit weiteren Forschungsreihen in Zukunft zeigen.

Dennoch wurde beispielsweise in mehreren Studien beschrieben, dass neben Endothelzellen auch Perizyten oder der Aufbau der endothelialen Basalmembran die Integrität der BHS beeinflussen (119-122). Zudem sind auch diverse zirkulierende Zellen aus dem Blut oder lösliches Mep1b aus verschiedenen Körperflüssigkeiten in der Lage die Durchlässigkeit der BHS zu verändern, so dass eine Vielzahl an verschiedenen Mep1b Quellen theoretisch in Frage käme (59).

Dass zumindest endotheliales Mep1b in der Lage ist, die TJ Proteinexpression *in vivo* zu beeinflussen, legen die Resultate der isolierten primären Maushirnendothelzellen von Mep1b KO und WT Mäusen nahe. Durch eine viertägige Kultivierung in Anwesenheit des Antibiotikums Puromycin, wurde sichergestellt, dass alle non-endothelialen Zellen durch das Medikament abgetötet werden, da nur Endothelzellen aufgrund ihrer Effluxtransporter in der Lage sind, sich vor dem Antibiotikum zu schützen (134). Die reinen Endothelzellkolonien zeigten ohne die Anwesenheit anderer Zelltypen dennoch signifikante Unterschiede bezüglich des TER (s. Abb 14). Da sich die verglichenen Zellen nur durch die vorhandene oder nicht vorhandene Mep1b Expression unterscheiden, kann für die beobachteten Effekte demnach nur endotheliales Mep1b verantwortlich sein.

Hier ist es jedoch wichtig zu erwähnen, dass es über den gesamten Zeitraum der Forschungstätigkeit nicht möglich war, Mep1b in den Hirnkapillaren mittels Western Blot nachzuweisen. Trotz der Verwendung verschiedener kommerziell erwerblicher und hausgemachter Antikörper, war es bisher nicht möglich spezifische Mep1b Banden in den Lysaten der Hirnkapillaren oder auch in Gesamthirnlisaten der Mäuse zu detektieren, obwohl dieselben Antikörper beispielsweise in Nierenlysaten Mep1b mit Leichtigkeit erkennen und demnach prinzipiell funktionieren.

Dies ist angesichts der oben beschriebenen Effekte in primären Hirnendothelzellen verwunderlich, gerade vor dem Hintergrund, dass in einer früheren Studie eine Mep1b Transkription im Gehirn durch RT-PCR bestätigt wurde (18). Eine mögliche plausible Erklärung für die fehlende Mep1b Detektion im Western Blot, könnte aber in einer niedrigen Mep1b Expression in den Hirnkapillaren liegen. Einzelzellanalysen von vaskulären Zellen im Gehirn, die die Expression vieler verschiedener bekannter Proteine auflisten, offenbarten, dass nur einige wenige der analysierten endothelialen Zellen Mep1b exprimieren. Die Mep1b Expression war hierbei interessanterweise auf spezifische Subtypen an Endothelzellen begrenzt (Endothelzelle Typ 2 und arterielle Endothelzelle), was eine regionale Heterogenität der Mep1b Expression in den Gefäßen des Gehirns nahelegt, da unterschiedliche Hirnregionen auch verschiedene Arten an Endothelzellen aufweisen (135-137).

Diese Beobachtungen stehen auch mit einer kürzlich veröffentlichten Studie einer anderen Forschungsgruppe im Einklang, die eine generelle aber niedrige Mep1b Transkription durch Hirngefäße beschrieben haben (138). Zusammen mit den Mep1b Aktivitätsdaten, die von isolierten Gesamthirngefäßen gewonnen wurden, und die eine geringe, aber signifikante Erhöhung der Mep1b Aktivität in den Mep1b WT Mäusen gegenüber KO Mäusen zeigte, gibt es somit insgesamt mehrere unabhängige Resultate, die für eine Expression von Mep1b in den Hirngefäßen sprechen, auch wenn sich diese wahrscheinlich eher auf einem niedrigen Niveau befindet und regionale Unterschiede aufweist.

Nichtsdestotrotz liefern die Ergebnisse dieser Dissertation auch Argumente dafür, das lösliches Mep1b aus diversen Körperflüssigkeiten die BHS Integrität *in vivo* ändern kann. In der Analyse der Proteinexpression des TJ Proteins Claudin-5 zeigten sowohl bEnd.3 Zellen als auch primäre Schweinehirnendothelzellen nach einer 24 stündigen Behandlung mit löslichem Mep1b eine signifikante Reduktion der Claudin-5 Expression gegenüber den unbehandelten Kontrollen. In den bEnd.3 Zellen konnte

der Mep1b Effekt auf die Proteinexpression des TJ Proteins sogar durch das Hinzufügen des spezifischen Mep1b Inhibitors Actinonin wieder verhindert werden, wodurch hier ganz klar eine Korrelation zwischen Mep1b Aktivität und Höhe der Claudin-5 Expression aufgestellt werden kann. Somit sprechen diese Ergebnisse dafür, dass auch lösliches Mep1b in der Lage ist die TJ Proteinexpression im Gehirn zu beeinflussen, und da es im Körper viele verschiedene potenzielle Expressionsquellen gibt, könnte das Mep1b theoretisch auch aus nicht endothelialen Zellen des Gehirns oder der Peripherie stammen und über die Passage verschiedener Körperflüssigkeiten wie Blut, ISF (interstitielle Flüssigkeit) oder CSF zu den TJs der Hirnendothelzellen gelangen und dort die Integrität der BHS beeinflussen.

Ein gutes Beispiel für eine Beeinflussung barriereabhängiger Prozesse durch nicht endotheliales Mep1b stellt eine Studie von Crisman und Kollegen dar, bei denen die Forscher gezeigt haben, dass eine Deletion des Mep1b Gens in Leukozyten deren Fähigkeit herabsetzt durch die ECM zu wandern. Diese Fähigkeit benötigen die Leukozyten beispielsweise im Rahmen der transendothelialen Migration, bei denen sich die Leukozyten angezogen von einer Entzündung aus dem Blut durch die Endothelzellen in das dahinterliegende inflammatorische Gewebe zwängen und hierbei dann Zell-Adhäsionsmoleküle und ECM prozessieren müssen (58, 59).

Angesichts der Tatsache, dass sowohl endotheliales als auch nichtendotheliales lösliches Mep1b Effekte auf TJs und BHS zugeschrieben werden können, wird in dieser Dissertation die Auffassung vertreten, dass beide Quellen zur Schädigung der BHS beitragen können.

## **9.5 Auswirkungen der TJ Dysregulation/BHS Beeinträchtigung durch Mep1b und potenzielle Bedeutung für andere Erkrankungen**

Nachdem nun der genaue Mechanismus wie und durch welche Art Mep1b die TJ Proteine und die Integrität der BHS beeinflusst eingehend besprochen wurde, sollen im folgenden Abschnitt die Konsequenzen einer solchen TJ Dysregulation und ihre potenzielle Bedeutung für verschiedene Krankheitsbilder näher betrachtet werden.

Generell handelt es sich bei Claudin-5 und Occludin um die zwei wichtigsten TJ Proteine der Hirnkapillaren. Interessanterweise sind viele verschiedene neurologische Erkrankungen wie beispielsweise Multiple Sklerose, AD, Schlaganfälle, Krebs und Infektionen mit einer Dysregulation dieser beiden Proteine verbunden (80, 139, 140).

Mäuse ohne Occludin haben auf den ersten Blick zwar morphologisch unveränderte TJs, da man davon ausgeht, dass ihre Funktion bei einem isolierten Ausfall im TJ Komplex von anderen Zell-Adhäsionsproteinen teilweise übernommen werden kann, jedoch manifestiert sich bei ihnen ein komplexer Phänotyp, mit postnataler Wachstumsverzögerung, Infertilität und einer Kalzifizierung des Gehirns (84, 86, 141). Die Auswirkungen eines Claudin-5 KO sind dagegen sogar noch gravierender, da die Tiere einerseits bereits zehn Stunden nach der Geburt versterben und andererseits eine massive Beeinträchtigung der BHS aufweisen, die mit einer Durchlässigkeit gegenüber hochmolekularen Molekülen bis zu 800 Dalton einhergeht (142). Schaltet man nun sowohl Claudin-5 als auch Occludin in einem gemeinsamen KO aus, vergrößert sich die Durchlässigkeit der BHS sogar auf Tracer Moleküle mit einer Größe von 3000 bis 10000 Dalton (143). In dieser Dissertation, wurden nun ebenfalls sowohl Claudin-5 als auch Occludin durch die Mep1b Expression beeinflusst, was angesichts der veränderten erhöhten IgG Level im CSF von Mep1b WT gegenüber KO Mäusen dafürspricht, dass diese Schädigung die Hirnpenetration von IgG Antikörpern aus dem Blut über die BHS erhöht.

### **9.5.1 Mep1b und Inflammation**

Die veränderten Liquor IgG-Level könnten jedoch auch mit einer Veränderung der inflammatorischen Prozesse des Gehirns durch die Mep1b Expression in Zusammenhang stehen. Im Allgemeinen ist eine Entzündung des ZNS mit einer erhöhten Zytokin- und Chemokinproduktion assoziiert. Diese führen wiederum einerseits zu einer Rekrutierung von Immunzellen in das ZNS, andererseits kommt es zu einer erhöhten Permeabilität und schließlich dem Zusammenbruch der BHS, gefolgt von der Ausbildung eines Hirnödems (15, 88). Nimmt man alle Resultate der oben beschriebenen Ergebnisse zusammen, gibt es für jedes dieser Phänomene ein Beispiel, bei dem auch die Mep1b Expression in den Hirnendothelzellen vergleichbare Effekte hervorruft. Seien es eine erhöhte BHS Durchlässigkeit mit gestörter TJ Proteinexpression, ein veränderter TER oder auch Auswirkungen auf den Hirnwassergehalt.

Vor diesem Hintergrund könnte der reduzierte IgG-Gehalt im Liquor von Mep1b<sup>-/-</sup> Mäusen dementsprechend auch als ein Marker für eine reduzierte Aktivität des Immunsystems im Vergleich zu den WT Mäusen interpretiert werden. Interessanterweise wurde im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt, dass Mep1b in der Lage ist, proinflammatorische Zytokine

zu aktivieren und freizusetzen (IL-1 $\beta$ , IL-18) und darüber hinaus die intestinale Leukozyteninfiltration durch das Schneiden von Zell-Adhäsions- und ECM-Molekülen zu vermitteln. Im Vergleich zu WT Tieren zeigen Mep1b KO Mäuse eine geringere Empfänglichkeit für chronisch entzündliche Darmerkrankungen und nach einem experimentell induzierten Nierenversagen geringere IL-6 Level und eine verminderte Leukozyteninfiltration in das entzündete Nierengewebe (4, 31, 144).

Dies weist daraufhin, dass ein Mep1b KO zumindest in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und im Zustand des Nierenversagens mit antiinflammatorischen Eigenschaften und reduzierten Entzündungswerten gegenüber WT Tieren einhergeht. Würde man dies ein zu eins auf den in dieser Dissertation beobachteten IgG-Gehalt in Mep1b KO Mäusen übertragen, so könnte dieser auch auf eine geringere inflammatorische Aktivität aufgrund der Abwesenheit von Mep1b zurückzuführen sein. Für eine genauere Aussage müssten hier in weiteren Untersuchungen, die Werte von verschiedenen Entzündungsmarkern in Liquor und Blut untersucht werden. Da die Referenzgruppe der Mep1b KO Mäuse jedoch normale WT Mäuse sind, bei denen nicht wie oben beschrieben Entzündungen wie eine chronisch entzündliche Darmerkrankung oder Nierenversagen induziert wurden, kann hier jedoch ein permanentes Inflammationsgeschehen praktisch ausgeschlossen werden. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass der reduzierte IgG-Gehalt im Liquor von Mep1b KO Mäusen eher eine Konsequenz der erhöhten Dichtigkeit der BHS ist als der einer verminderten Immunaktivität. Inwieweit bei einer erhöhten Mep1 Expression jedoch ein Zusammenhang mit neuroinflammatorischen Prozessen hinsichtlich einer Schädigung der BHS bestehen könnte, müsste in entsprechenden Mep1b überexprimierenden Tiermodellen untersucht werden.

### **9.5.2 Mep1b im Zusammenhang mit Gehirngefäßerkrankungen und Alzheimer**

Angesichts der Tatsache, dass sich nahezu alle Ergebnisse dieser Dissertation vornehmlich um die negativen Effekte der Mep1b Expression auf die TJs und BHS der Hirngefäße drehen, könnten diese dementsprechend vornehmlich für Erkrankungen relevant sein, bei denen genau besagte Strukturen angegriffen werden. Interessanterweise gibt es mit der sogenannten small vessel disease (SVD), wörtlich übersetzt Erkrankung der kleinen (Hirn-)gefäße, eine Krankheit, die bereits mit ihrer Bezeichnung perfekt in diese Kategorie zu passen scheint. Die SVD umfasst verschiedene Krankheitszustände, die mit einer Schädigung von kleinen Arterien und Hirnkapillaren im ZNS verbunden sind und wird als ein wichtiger Faktor für die



Pathogenese von Schlaganfällen und altersverbundenem kognitivem Verfall und Behinderungen angesehen (145, 146).

Es gilt als generell akzeptiert, dass eine Schädigung der BHS eine große Bedeutung bei der Entstehung der SVD einnimmt und unter anderem die MMPs eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung spielen, obwohl der exakte Pathomechanismus bisher weiterhin unbekannt ist (146, 147). Gerade deshalb kann die Analyse von Proteasen wie Mep1b, die in der Lage sind die Integrität der BHS in den Hirnkapillaren zu schädigen, von enormer Relevanz für das Verständnis einer solchen vaskulären Erkrankung des ZNS sein.

Ein weiteres Krankheitsgebiet, das als gemeinsames Merkmal eine Beeinträchtigung der BHS aufweist, stellen die neurodegenerativen Erkrankungen dar (15). Angesichts der neu gewonnen Erkenntnisse bezüglich Mep1b in dieser Dissertation, ist an dieser Stelle vor allem die Alzheimer Erkrankung von besonderem Interesse, da bereits zuvor eine potenzielle Rolle von Mep1b in deren Pathogenese postuliert worden ist (s. 6.1.4.3). Interessanterweise wurde gezeigt, dass bei Alzheimer in bis zu 90% der Fälle die Hirngefäße eine Pathologie aufweisen, wobei auch die Hirnkapillaren im Speziellen betroffen sind (148). Auch hier wird wiederum unter anderem die SVD als möglicher Faktor gesehen, der zu Pathogenese der Alzheimer Erkrankung beiträgt. Vor allem bei der sogenannten zerebralen Amyloid Angiopathie (CAA), eine besondere Form der SVD, kommt es zur Schädigung der kleinen Hirngefäße, indem A $\beta$  Peptide sich hier aktiv anlagern. Die Akkumulation resultiert im weiteren Verlauf in Beeinträchtigungen des Blutflusses und letzten Endes schließlich in der Zerstörung der betroffenen Gefäße (146, 149).

Da Mep1b neben der Produktion von A $\beta$ -Peptiden in der Lage ist die Integrität der BHS wie in dieser Dissertation gesehen negativ zu beeinflussen, könnte die Protease somit an der Dysfunktion der BHS in Alzheimer und CAA beteiligt sein. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass es beispielsweise infolge einer gesteigerten Mep1b Aktivität zu einer erhöhten A $\beta$  Produktion und Akkumulation um die kleinen Hirngefäße kommt. Andererseits wäre es auch denkbar, dass die TJ Proteine direkt durch Mep1b unabhängig von A $\beta$  geschädigt werden. Ob diese Mechanismen dann wiederum unabhängig voneinander ablaufen oder sich sogar noch gegenseitig verstärken würden, wäre natürlich eine weitere interessante Frage. Dennoch bleibt auch nach dieser Dissertation unklar, ob Mep1b überhaupt eine Relevanz für Alzheimer und die SVD hat, da in den oben beschriebenen Ergebnissen lediglich eine generelle

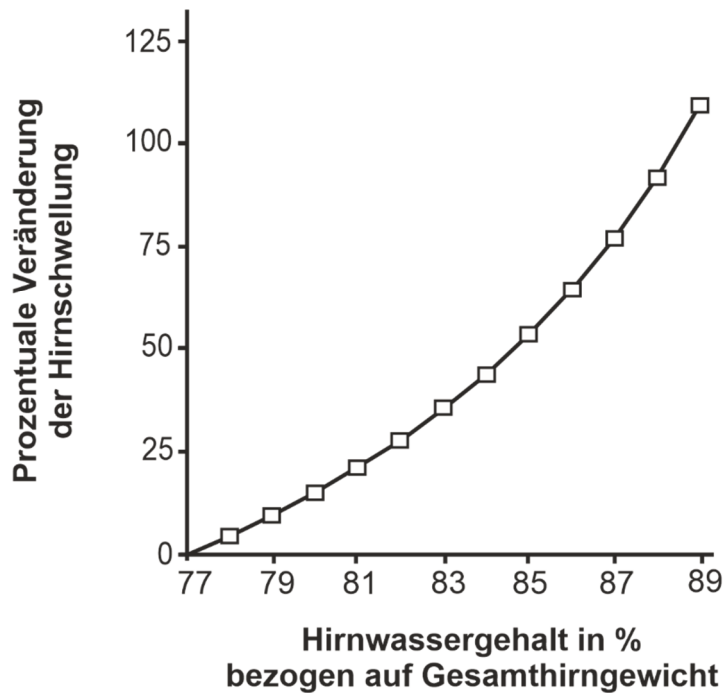
Beeinflussung der BHS durch Mep1b nachgewiesen wurde und keine spezifischen Alzheimer Modelle verwendet wurden.

Zumindest für Alzheimer konnte aber bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Mep1b Transkription in den Gehirnen von entsprechenden Patienten erhöht ist (19, 22). Dennoch findet Mep1b bisher im Vergleich zu anderen Enzymen, die verschiedene A $\beta$  Formen generieren können, nur wenig Beachtung. Ein gutes Beispiel liefert hier eine Studie von Liu und Kollegen, die untersucht hat, ob  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen im Rahmen der APP-Prozessierung miteinander interagieren (150). In Proben von Mausgehirnen konnte die Gruppe durch ein spezielles Chromatographieverfahren einen hochmolekularen Multiprotein Komplex (HMK) entdecken, der aktive  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen enthält, und in der Lage ist APP so zu schneiden, dass eine physiologische A $\beta$  Produktion erfolgt. Obwohl Mep1b im gezeigten Westernblot deutlich in diesem Multiprotein Komplex detektiert wird, wird auf diese Beobachtung im zugehörigen Text des Papers in keiner Weise eingegangen und nur die potenzielle Funktion der ebenfalls enthaltenen  $\beta$ -Sekretase BACE-1 weitergehend untersucht, obwohl diese eine deutlich niedrigere Bandenintensität und weiter gestreute Bandenverteilung zeigt. Angesichts eines solchen Vorgehens ist es nicht verwunderlich, dass Mep1b weiterhin trotz mehreren vielversprechenden Indizien nur eine begrenzte Aufmerksamkeit in der Alzheimerforschung bekommt. Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern zwar keine neuen spezifischen Erkenntnisse zur potenziellen Rolle von Mep1b in der Alzheimererkrankung, die Regulation der BHS ist aber ein Kernpunkt vieler verschiedener zerebraler Krankheiten, darunter gerade auch Alzheimer. Deshalb wird in dieser Thesis die Auffassung vertreten, dass in Zukunft bei solchen Erkrankungen ein Mep1b Einfluss zumindest in Betracht gezogen und weiter erforscht werden sollte.

## **9.6 Auswirkungen von Mep1b auf den Hirnwassergehalt**

Ein weiteres Verfahren mit der die BHS Integrität *in vivo* in dieser Dissertation untersucht wurde, stellt die Analyse des Hirnwassergehalts der Mep1b KO und WT Mäuse dar. Die Messungen ergaben hierbei eine Reduktion von 1,6% des Hirnwassergehaltes in den Mep1b KO Mäusen gegenüber den WT Kontrollen, deren Werte zur Normalisierung genutzt wurden. Diese Differenz ist als markanter Unterschied anzusehen, da solche Abweichungen beispielsweise in Rattengehirnen

nach einem Schlaganfall oder einer traumatischen Hirnverletzung beobachtet werden. Richard Keep und Kollegen beschrieben einen absoluten Unterschied im Hirnwassergehalt von 1,3% zwischen Rattengehirn mit einer fokalen Ischämie gegenüber den Kontrolltieren (89, 151). In der in dieser Dissertation verwendeten Darstellungsform des Hirnwassergehalts, bei der die absolute Differenz nochmals zu dem Hirnwassergehalt der Kontrolltiere in Beziehung gesetzt wird, entspricht das einer Abweichung von 1,68% zu den Kontrollgehirnen, die somit nur geringfügig höher ist, als die 1,6% die zwischen den hier verwendeten Mep1b KO und WT Tieren beobachtet wurde. An dieser Stelle ist es von besonderer Wichtigkeit zu betonen, dass kleine Veränderung des Hirnwassergehaltes große Änderungen hinsichtlich des Hirnvolumens beziehungsweise im pathologischen Zustand hinsichtlich des Grades einer Hirnschwellung widerspiegeln. Die beiden Faktoren Hirnwassergehalt und Hirnvolumen weisen nämlich eine Korrelation auf, die nicht von linearer, sondern von exponentieller Natur ist (s. Abbildung 19). Vor dem Hintergrund, dass ein massives Hirnödem im Normalfall zu einem irreversiblen Neuronenuntergang führt, könnte der beobachtete Einfluss der Mep1b Expression auf den Hirnwassergehalt für eine Vielzahl an Erkrankungen von Interesse sein, die mit einer solchen Volumenverschiebung einhergehen (16, 89).



**Abbildung 19: Verhältnis von Hirnwassergehalt und Hirnschwellung, in Anlehnung an (89)**

Der reduzierte Hirnwassergehalt in den Mep1b Mäusen passt zu den vorherigen Ergebnissen bezüglich Permeabilität und Integrität der BHS. Zusammen weisen alle Resultate auf eine erhöhte BHS Dichtigkeit im Mep1b KO hin, die den parazellulären Wassereinstrom aus dem Blut in das Gehirn herabsetzt. Interessanterweise wurde die Differenz im Hirnwassergehalt nicht von einer signifikanten Veränderung der Ventrikelgröße des Liquorsystems begleitet, was durch die Messung der lateralen und des dritten Ventrikels gemessen wurde (s. Abbildung 16). So gibt es zunächst keine Hinweise, dass der Mep1b KO die Morphologie der Hirnventrikel verändert, und den Hirnwassergehalt über eine Veränderung der Liquormenge beeinflusst.

## 10 Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde erstmalig aufgezeigt, dass es sich bei Mep1b um einen neuen Regulator der TJ Zusammensetzung und der Integrität der BHS handelt. In Mep1b überexprimierenden Maushirnendothelzellen (bEnd.3) wurde im Vergleich zu Kontrollzellen eine Reduktion des TJ Proteins Claudin-5 gemessen. Darüber hinaus zeigte sich in den Mep1b + bEnd.3 Zellen ein erniedrigter TER und eine erhöhte Permeabilität gegenüber dem parazellulären Diffusionsmarker [ $C^{14}$ ]-Inulin. Ein erniedrigter Widerstand in Kombination mit einer erhöhten Durchlässigkeit einer ansonsten streng regulierten und dichten Barriere, sprechen im Verbund stark dafür, dass die Mep1b Überexpression in den bEnd.3 Zellen zu einer relevanten Beeinträchtigung dieser Schrankenfunktion führt.

Die Analyse eines Mep1b KO im Tiermodell zeigte dagegen ein genau entgegengesetztes Bild im Vergleich zur Mep1b Überexpression. In Hirnkapillaren von Mep1b KO Mäusen wurde gegenüber WT Kontrolltieren eine erhöhte Expression der TJ Proteine Claudin-5, ZO-1 und Occludin gemessen. Hierbei sprachen sowohl die Verschiebung der Occludinbande in der Westernblotanalyse als auch der Peptide cleavage assay dafür, dass für Occludin ein direktes Schneiden durch Mep1b *in vivo* möglich und auch wahrscheinlich ist. Obwohl beide extrazellulären Schleifen des Occludinproteins potenzielle Mep1b Schnittstellen enthalten, wurde im Cleavage assay nur die Schleife 2, die essenziell für eine korrekte Lokalisation Occludins im TJ Komplex ist, durch Mep1b prozessiert. Während es somit zumindest für Occludin Anhaltspunkte für eine direkte Prozessierung durch Mep1b gibt, können generell indirekte Mechanismen, wie die Beeinflussung der TJ Proteinexpression durch die Aktivierung anderer Signalkaskaden nicht ausgeschlossen werden, vor allem vor dem Hintergrund, dass es in den durchgeführten Experimenten dieser Dissertation keine Hinweise auf eine direkte Prozessierung der TJ Proteine Claudin-5 und ZO-1 durch Mep1b gab.

Eine weitere Untersuchung der Barrierenintegrität von isolierten primären Maushirnendothelzellen im BHS *in vitro* Modell ergab, dass die TER Werte in den Mep1b KO Mäusen gegenüber den WT Tieren erhöht waren. Passend zu diesem gemessenen erhöhten Widerstand, wies die Permeabilitätsanalyse in den Mep1b KO Mäusen eine erniedrigte Durchlässigkeit auf, was sich einerseits an einem erniedrigten IgG-Gehalt im Liquor und andererseits an einem reduzierten Hirnwassergehalt im Vergleich zu Mep1b KO Mäusen darstellte. Angesichts der Tatsache, dass die

Überexpression und der Knock-out von Mep1b zu genau entgegengesetzten Effekten bezüglich TJ Proteinexpression, Barrierewiderstand und Permeabilität führten, lässt sich hieraus ableiten, dass Mep1b eine wichtige Rolle in der Regulation der TJ Proteine im Hirnendothel übernimmt und somit auch die Dichtigkeit der BHS *in vitro* und *in vivo* beeinflusst. Vor dem Hintergrund, dass sowohl endotheliales als auch nichtendotheliales lösliches Mep1b in der Lage waren, die TJ Proteinexpression zu verändern, wird in dieser Dissertation die Auffassung vertreten, dass beide Mep1b Quellen zur Schädigung der BHS beitragen können.

Da eine Vielzahl an ZNS-Erkrankungen mit einer Dysregulation der BHS einhergeht, könnte in diesem Zusammenhang eine Untersuchung der Mep1b Funktion ein neues vielversprechendes Forschungsfeld darstellen. Zudem handelt es sich bei dieser Dissertation um die erstmalige Beschreibung eines potenziellen Einflusses von Mep1b in der BHS Regulation, so dass in dieser Hinsicht weitere Erkenntnisse mit weiteren Studien zu erwarten sind.

# 11 Anhang

## 11.1 Zellbiologische Methoden

### 11.1.1 Kultivierung immortalisierter Zellen

Die Zellkulturarbeiten wurden in einem S2-zertifizierten Labor unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle in der Zellkultur verwendeten Arbeitsmaterialien waren entweder Einwegartikel oder wurden vor und nach potenzieller Kontamination mit 70%igem Ethanol desinfiziert oder autoklaviert. Die Kulturmedien wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 10 cm Kulturschalen in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit und das Zellwachstum wurde in regelmäßigen Abständen unter einem Phasenkontrastmikroskop begutachtet.

#### 11.1.1.1 Passagieren von adhärenenten Zellen

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen alle 2-4 (HEKGP293) beziehungsweise 5-7 (bEnd.3) Tage passagiert. Der Passagiervorgang stellt hierbei eine Kombination aus Vereinzeln und anschließendem verdünnten Aussäen der Zellen dar. Dies ist notwendig, da die Zellen in einer Einzelzellschicht nur bis zu einer bestimmten Dichtigkeit wachsen können und danach aufgrund von gegenseitiger Hemmung absterben. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium vorsichtig mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen, um das im Medium enthaltene Serum zu entfernen, da dieses das anschließende Ablösen der Zellen durch Trypsin behindert. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellen durch eine ein- bis fünfminütige (HEKGP293) bzw. zehn- bis fünfzehnminütige Behandlung (bEnd.3) mit 2 ml 1x Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst. Die Serinprotease Trypsin, die im Verdauungstrakt physiologisch Proteine schneidet, ist in der Lage die extrazellulären Proteine der Oberflächenmembran zu zerschneiden und führt so zum Auflösen der Zell-Zell- und Zell-Matrik-Kontakte. Das Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale wird somit erleichtert, jedoch kann eine zu große Konzentration oder zu lange Inkubationszeit die Zellen auch schädigen (152). Deshalb wurde der Trypsinierungsvorgang durch die Zugabe von 8 ml Kulturmedium abgebrochen, sobald sich die Zellen durch leichtes Schütteln von der Kulturschale ablösen ließen. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und die resultierende Suspension in der erwünschten Verdünnung in eine neue 10 cm Kulturschale mit

frischem Medium überführt. Um eine gleichmäßige Zellverteilung zu erreichen, wurde die Schale vorsichtig im Kreis geschwenkt. Für die bEnd.3 Zell-Experimente, wurden die Zellen zusätzlich in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und jeweils 50 000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät. Hierbei wurden 10 µl der zuvor hergestellten bEnd.3 Zellsuspension eins zu eins mit einer einprozentigen Trypanblaulösung verdünnt. Dieser Farbstoff kann intakte Zellen nicht infiltrieren, während tote Zellen blau gefärbt werden, wodurch eine Zellzählung vitaler Zellen unter dem Mikroskop mithilfe einer Neubauer-Zellkammer ermöglicht wird (153).

#### **11.1.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von immortalisierten Zellen**

Da die verwendeten Zelllinien nicht permanent in Kultur waren, sondern nur für einige bestimmte Experimente benötigt wurden, war es notwendig einen Teil der Zellen zu kryokonservieren. Kryokonservieren beschreibt hierbei das Einfrieren und Lagern von Zellen bei Temperaturen unter 130°C unter Verwendung von Gefrierschutzsubstanzen. Für einen kurzen Zeitraum können eukaryotische Zellen bei -80°C gelagert werden, langfristig ist jedoch immer eine Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -180°C erforderlich (154). Hierfür wurden konfluente Zellen wie in 11.1.1.1 beschrieben von den Zellkulturschalen mithilfe von Trypsin gelöst und die entstandene Zellsuspension mit frischem Medium in 15 ml Falcons überführt und für 4 min bei 1200 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml frischem 10%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) Kulturmedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. DMSO schützt die Zellen beim Einfrierprozess, indem es die Ausbildung von Eiskristallen verhindert, jedoch hat DMSO selbst auch zytotoxische Eigenschaften (155). Deshalb wurden die Zellen nach Zugabe umgehend in eine auf 4°C gekühlte Einfrierbox mit isopropanolgefüllter Kühlmittelkammer (Mr. Frosty Einfrierhilfe) überführt und dann bei -80°C weggefroren, wodurch eine Abkühlung von ca. 1° C/min erfolgte. Am Folgetag wurden die Zellen schließlich zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **11.1.1.3 Revitalisierung kryokonservierter Zellen**

Um die kryokonservierten Zellen wieder aufzutauen, wurden sie möglichst schnell im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt und unmittelbar in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Durch vierminütige Zentrifugation der Zellsuspension bei 1200 x g und anschließendes Absaugen des Überstandes wurde das zytotoxische



DMSO entfernt. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Kulturschale ausgesät.

## **11.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **11.2.1 Zellyse**

Nach Absaugen der Kulturmediums wurden die Zellen (bEnd.3 u. bEnd.3 + Mep1b) auf Eis gestellt und zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Nach erneutem Zusatz von 1 ml eiskaltem PBS, wurden die Zellen mit einem sterilen Zellspatel vom Boden der Kulturschale abgekratzt und die entstandene Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß (Reaktionsgefäß) überführt. Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen. Sowohl das entstandene Zellpellet der bEnd.3 Zellen als auch das der isolierten Maushirnkapiillaren wurde je nach Größe in 30-100 µl eiskaltem Lysispuffer (NP40-Lysis-Puffer/Proteinase-Inhibitor) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation der Lysate bei 18000 x g und 4°C für 20 min, um die Proteine von Zellresten zu befreien. Der klare, zellkernfreie Überstand wurde abgenommen, für die Proteinbestimmung (s. 11.2.2) genutzt und danach bei bekannter Proteinkonzentration entweder bei -20°C gelagert oder für eine SDS-Gelelektrophorese verwendet.

### **11.2.2 Protein-Konzentrationsbestimmung**

Die Proteinkonzentrationen der Zell- und Maushirnkapillarlysate wurden mithilfe eines BCA-Test-Kits der Firma Pierce bestimmt (156). Hierfür wurden die Lysate 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt (5 µl Lysat in 45 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>). Eine aus bovinem Serumalbumin (BSA) (0-500 µg/ml) angelegte Standardreihe (s. Pipettierschema) diente als Referenz. Im Anschluss wurde sowohl zu den verdünnten Lysaten als auch zur Standardreihe jeweils 1 ml der Reaktionslösung gegeben und die Proben bei 60°C für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktionslösung wurde vorher frisch aus der Lösungen A (BCA) und B (4% CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O) des Reaktions-Kits im Verhältnis 1:50 angesetzt. Nach der Inkubation wurde die Extinktion der Proben bei 562 nm mittels eines Platten-Photometers gemessen und die Proteinkonzentration durch die ADAP Software bestimmt.

<b>Konzentration (µg/µl)</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (µl)</b>	<b>BSA Standard 1 mg/ml (1 µl)</b>
0	50	0
100	45	5

200	40	10
300	35	15
400	30	20
500	25	25

**Tabelle 11: Pipettierschema BCA Proteinbestimmung**

### **11.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Um die Proteine der verschiedenen verwendeten Proben (bEnd.3 Zelllysate, Kapillarendothelzelllysate, CSF-Proben) zu untersuchen, wurde eine SDS-Page (Abkürzung für engl. Sodium dodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis) durchgeführt (157). Nach vorausgegangener Denaturierung wurden die Proteine hierbei entsprechend ihrer molekularen Masse in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Erhitzen und Versetzen mit Probenpuffer, wodurch Protein-Protein Wechselwirkungen unterbunden wurden, die ansonsten die Auftrennung allein nach Molekülmasse behindert hätten. Der Probenpuffer enthielt zum einen  $\beta$ -Mercaptoethanol, das Disulfidbrücken reduzieren kann. Zum anderen war das stark negative geladene Detergens Natriumdodecylsulfat (deutsch für sodium dodecylsulfat, SDS) enthalten, das zusätzlich zur Denaturierung die Eigenladung der Proteine überdeckte, wodurch diese gleichmäßig negativ aufwiesen. Die Proteine konnten nun durch den Aufbau eines eindimensionalen elektrischen Feldes allein aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Als Trennmedium diente hierbei ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Der Anteil an Polyacrylamid definierte den Grad der Vernetzung der Bausteine und somit auch die Trennfähigkeit des Gels. Dieses wirkte so wie eine Art Sieb, das kleinere Proteine schneller und damit auch weiter im Gel wandern ließ, während größere Proteine abgebremst wurden. Nach diesem Prinzip gilt je höher der Acrylamidanteil, desto kleinere Proteine sind auftrennbar und umgekehrt. Die hier verwendeten diskontinuierlichen Gelsysteme bestanden aus zwei Komponenten; einem großporigen Sammelgel, auf das die Proteine aufgetragen wurden und einem engporigen Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgte.

### **11.2.4 Gele**

In den Versuchen wurden vorgefertigte NuPAGE Gradientengele von Invitrogen mit zugehörigem Xcell II Surelock Elektrophorese-System verwendet.

### **11.2.5 Probenvorbereitung und Beladen der Gele**

Die aufzutrennenden Proben wurden vor Gelbeladung mit demselben Volumen 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Nach Abkühlung wurden gleiche Mengen (20 – 100 µg, bei CSF-Proben gesamtes Volumen) der Proben in die Geltaschen aufgetragen/pipettiert.

### **11.2.6 Elektrophorese Bedingungen**

Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden. Zunächst wurde eine konstante Spannung von 70 V angelegt, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten. Nun wurde für das NuPAGE-System die konstante Spannung auf 200 V erhöht. Ein Durchlauf dauert zwischen 60 – 90 min.

### **11.2.7 Westernblotanalyse**

Das Western Blot Verfahren ermöglicht den Transfer von aufgetrennten Proteingemischen einer SDS-Page auf einer Nitrozellulosemembran (158). Hierfür wurde ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel angelegt, um so die Proteine aus der Polyacrylamidmatrix auf die Membran zu überführen. An dieser blieben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Wichtig ist hierbei, dass bei der Übertragung das Auftrennungsmuster der Gelelektrophorese erhalten bleibt. Das SDS, das den Proteinen zuvor angelagert war, wurde bei dem Vorgang ausgewaschen, so dass die Proteine renaturierten und zum Teil ihre Sekundär- und Tertiärstruktur einnehmen konnten. Somit ist durch spezifische Antikörper möglich, die Proteine zu erkennen und nachzuweisen.

#### **11.2.7.1 Nass-Blot-Verfahren**

Für das Nass-Blot-Verfahren wurden zunächst eine Nitrozellulose-Membran und zwei Filterpapiere auf die Größe des Geles zugeschnitten und in Blotting-Puffer getränkt. Das Gel der SDS-Page wurde aus den Glasplatten gelöst und luftblasenfrei zusammen mit den anderen Komponenten in einer Blotkassette geschichtet. Zum Proteintransfer wurde die Kassette in die Elektrophoresekammer eingesetzt und Transferpuffer hinzugefügt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 85 V für 90 min in einer Eiswanne, um eine mögliche Überwärmung der Kammer zu vermeiden.

#### **11.2.7.2 Anfärben der Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S**

Zur Kontrolle des Proteintransfers, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Blot-Vorgang mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S angefärbt. Hierdurch zeigen

sich die Proteinbanden nach einer einminütigen Inkubationszeit rötlich. Überschüssiger Farbstoff wurde mit ddH<sub>2</sub>O entfernt, so dass die Membran anhand der gut sichtbaren Banden, nun für die spätere Antikörperinkubation zugeschnitten werden konnte. Durch fünfminütiges Waschen mit 1 x TBST wurde der Farbstoff vollständig entfernt.

#### **11.2.7.3 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran**

Die Membran wurde nach der Ponceaufärbung für 1 h in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer inkubiert. Dadurch wurde eine unspezifische Bindung der anschließend eingesetzten Antikörper verhindert, da potenzielle Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran durch die Milchproteine abgesättigt wurden.

#### **11.2.7.4 Immunodetektion**

Die zuvor aufgetrennten und übertragenen Proteine wurden durch/mithilfe Immunodetektion visualisiert. Hierbei wurde ein antigenspezifischer Primärantikörper verwendet, der an ein oder mehrere Epitope des gesuchten Proteines band. Durch mehrmaliges Waschen wurden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt und es erfolgte eine Inkubation mit einem enzymgekoppelten sekundären Antikörper. Dieser band an spezifische Bereiche des primären Antikörpers und ermöglichte durch eine enzymabhängige Chemilumineszenzreaktion die Detektion der gesuchten Proteinbanden.

#### **11.2.7.5 Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern**

Nach der Blockierung wurde die Membran mit 5 - 10 ml des gewünschten Primärantikörpers über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein 5-maliges Waschen für 3 Minuten mit TBST. Die Membran wurde nun für 1 h mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut 5 Mal für 3 Minuten mit TBST gewaschen. Alle Waschschritte und Inkubationen wurden auf einem Wipptisch durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und Konzentrationen sind in 7.1.3 angegeben. Da in den CSF-Proben IgG Proteine der Maus nachgewiesen werden sollten, erfolgte hier nur eine Inkubation mit einem sekundär anti-Maus Antikörper, da dieser bereits das Immunglobulin G spezifisch binden kann.

#### **11.2.7.6 Chemilumineszenznachweis**

Alle verwendeten Sekundärantikörper sind mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish peroxidase, HRP) konjugiert. In Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert

dieses Enzym die Oxidation von Luminol, wobei ein lichtemittierendes Produkt entsteht, das am Entstehungsort Lichtquanten emittiert (159). Hierfür wurden die das Reaktionskit von Immobilon Western in einem Verhältnis von 1:1 verwendet und auf den Blot gegeben. Diese Chemilumineszenz-Reaktion kann von dem verwendeten Fujifilm LAS-3000 Imager detektiert werden, so dass die gesuchten Proteinbanden der Nitrocellulosemembran sichtbar werden. Zusätzlich kommt es hierbei zu einer Signalverstärkung, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können. Je nach gesuchtem Protein und Auftragsmenge lag die Expositionszeit zwischen 10 sek und 2 min.

#### **11.2.7.7 Quantifizierung der Bandenintensität**

Zur Auswertung und Quantifizierung der Signalstärkeunterschiede der verschiedenen aufgetragenen Proben wurde das Programm ImageJ verwendet. Dieses Programm misst die dunklen Pixel der Proteinbanden gegen einen festgelegten Hintergrund. Die Bandenintensitäten wurden somit in eine Anzahl von Bildpunkten umgerechnet. Um diese zwischen den verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurde stets dieselbe Proteinmenge auf ein Gel aufgetragen. Zudem erfolgte eine Normalisierung gegen das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin, das von allen Zellen gleich stark exprimiert wird. Hierfür wurde wie bereits oben beschrieben die Membran nach Ponceaufärbung anhand eines Größenmarkes in verschiedene Teile geschnitten, so dass die Schnitte mit verschiedenen Antikörpern inkubiert und anschließend mittels Immunodetektion ausgewertet werden konnten. Für die Auswertung wurden die Banden der Kontrollproben auf 100% gesetzt und die jeweiligen Partnerproben dazu in Relation gesetzt.

## **12 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich während meiner Forschungszeit und bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben. Besonderer Dank geht hierbei an meinen Doktorvater. Dieser hat mich vom ersten Tag an mit seiner positiven und unkomplizierten Art von einer experimentellen Doktorarbeit begeistert und mich zusammen mit den Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe hervorragend betreut. Diesen danke in gleicher Weise, vor allem für die Unterstützung bei der Durchführung der verschiedenen Experimente und insbesondere nochmal für die Hilfe bei der Paperpublikation. Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für das tolle Arbeitsklima und die großartige gegenseitige Hilfe bedanken. Vielen Dank an euch alle! Wir haben viel Zeit zusammen im Labor verbracht und es war mir immer eine große Freude mit euch.

Zudem möchte ich meinen Dank gegenüber den Beschäftigten des Instituts für Pathobiochemie der Universität Kiel äußern, die mir eine große Hilfe bei der Paperpublikation waren. Für die finanzielle Förderung der Promotion geht ein großer Dank an die Studienstiftung des Deutschen Volkes und an die Integrated Research Group des Sonderforschungsbereiches 877 (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Darüber hinaus geht auch ein Dankeschön an den Gutachter für das Erstellen des Zweitgutachtens.


Zu guter Letzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Mama, Papa ohne euch wäre das alles hier gar nicht möglich gewesen. Dankeschön, dass ihr mich immer unterstützt habt und unterstützt.

## 13 Tabellarischer Lebenslauf

**Markus Gindorf**

29.12.1994 in Trier, DE

deutsch



### Ausbildung

10/2015 – 05/2022	Studium der Humanmedizin an der JGU Mainz, <ul style="list-style-type: none"><li>• 1. Staatsexamen August 2017</li><li>• 2. Staatsexamen April 2021</li><li>• 3. Staatsexamen Mai 2022</li></ul>
05/2014 - 08/2014	Ausbildung zum Rettungssanitäter beim DRK-Landesverband RLP
09/2005 - 03/2014	Abitur am Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Schweich,

### Praktika / berufliche Tätigkeit

Ab 08/2022	Assistenzarzt für Allgemeine Innere Medizin in den Zürcher Rehasentren Wald
12/2021 – 04/2022	PJ-Tertial Allgemeinmedizin in Hausarztpraxis Mainz-Finthen
09/2021 - 12/2021	PJ-Tertial Chirurgie im Krankenhaus St. Marienwörth, Bad Kreuznach*
04/2021 - 08/2021	PJ-Tertial Innere Medizin im Krankenhaus St. Marienwörth, Bad Kreuznach* *(Lehrklinik Universitätsmedizin Mainz)
04/2019 - 04/2021	Anstellung als Werkstudent im Drogenhilfezentrum Café Balance, Fachbereich Suchthilfe der Stadt Mainz
08/2020 - 09/2020	Famulatur in der Nephrologie der Universitätsmedizin Mainz

03/2020 - 04/2020	Famulatur in der Allgemeinarztpraxis Praxis Dr. med. Frank Soedradjat in Schweich
09/2019 - 10/2019	Famulatur in der Psychiatrie der Universitätsmedizin Mainz
03/2019 - 04/2019	Famulatur in der Hautklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz
08/2014 - 05/2015	Freiwilliges Soziales Jahr als Rettungssanitäter beim DRK KV Trier-Saarburg e.V., Bereich Rettungsdienst

### **Promotion / Forschung**

10/2017 - 10/2021	Promotion in der AG Pietrzik, Institut für Pathobiochemie Universitätsmedizin Mainz: Grundlagenforschung Blut-Hirnschranke, Publikation im Februar 2020: Gindorf et. al: Meprin $\beta$ : A novel regulator of blood–brain barrier integrity (JCBFM)
-------------------	--

### **Stipendien & Auszeichnungen**

02/2016 - heute	Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes
10/2018 - 03/2020	Promotionsstipendium des integrierten Graduiertenkollegs (IRTG), Christian-Albrecht-Universität Kiel

### **Sonstiges**

Sprachen	Deutsch, Englisch
IT-Fähigkeiten	Microsoft Power Point, Word, Excel; Graph Pad Prism, Inkscape



## 14 Literaturverzeichnis

### Reference list

1. Bhagwat SR, Hajela K, Kumar A. Proteolysis to Identify Protease Substrates: Cleave to Decipher. *Proteomics*. 2018;18(13):e1800011.
2. Bond JS. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. *J Biol Chem*. 2019;294(5):1643-51.
3. Lopez-Otin C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*. 2008;283(45):30433-7.
4. Broder C, Becker-Pauly C. The metalloproteases meprin alpha and meprin beta: unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J*. 2013;450(2):253-64.
5. Jefferson T, Auf dem Keller U, Bellac C, Metz VV, Broder C, Hedrich J, et al. The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin beta and ADAM10. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(2):309-33.
6. Becker-Pauly C, Pietrzik CU. The Metalloprotease Meprin beta Is an Alternative beta-Secretase of APP. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:159.
7. Ambort D, Brellier F, Becker-Pauly C, Stocker W, Andrejevic-Blant S, Chiquet M, et al. Specific processing of tenascin-C by the metalloprotease meprinbeta neutralizes its inhibition of cell spreading. *Matrix Biol*. 2010;29(1):31-42.
8. Huguenin M, Muller EJ, Trachsel-Rosmann S, Oneda B, Ambort D, Sterchi EE, et al. The metalloprotease meprinbeta processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion. *PLoS One*. 2008;3(5):e2153.
9. Mruk DD, Cheng CY. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev*. 2015;36(5):564-91.
10. Kreft ME, Hudoklin S, Jezernik K, Romih R. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma*. 2010;246(1-4):3-14.
11. Obermeier B, Verma A, Ransohoff RM. The blood-brain barrier. *Handb Clin Neurol*. 2016;133:39-59.
12. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*. 2018;50(8):103.
13. Schwartz J, Friedman AJ. Exogenous Factors in Skin Barrier Repair. *J Drugs Dermatol*. 2016;15(11):1289-94.
14. Jiang X, Andjelkovic AV, Zhu L, Yang T, Bennett MVL, Chen J, et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Prog Neurobiol*. 2018;163-164:144-71.
15. Palmer AM. The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):3-12.
16. Prakash R, Carmichael ST. Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol*. 2015;28(6):556-64.
17. Bauer HC, Krizbai IA, Bauer H, Traweger A. "You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier. *Front Neurosci*. 2014;8:392.
18. Jefferson T, Causevic M, auf dem Keller U, Schilling O, Isbert S, Geyer R, et al. Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *J Biol Chem*. 2011;286(31):27741-50.
19. Schonherr C, Bien J, Isbert S, Wichert R, Prox J, Altmeyen H, et al. Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid beta peptides by meprin beta

- depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Mol Neurodegener.* 2016;11:19.
20. Prox J, Arnold P, Becker-Pauly C. Meprin alpha and meprin beta: Procollagen proteinases in health and disease. *Matrix Biol.* 2015;44-46:7-13.
  21. Type I Transmembrane Proteins. In: Offermanns S, Rosenthal W, editors. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 1252-.
  22. Arolas JL, Broder C, Jefferson T, Guevara T, Sterchi EE, Bode W, et al. Structural basis for the sheddase function of human meprin beta metalloproteinase at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(40):16131-6.
  23. Arnold P, Otte A, Becker-Pauly C. Meprin metalloproteases: Molecular regulation and function in inflammation and fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(11 Pt B):2096-104.
  24. Jackle F, Schmidt F, Wichert R, Arnold P, Prox J, Mangold M, et al. Metalloprotease meprin beta is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. *Biochem J.* 2015;470(1):91-103.
  25. 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;391(4):455-60.
  26. Arnold P, Boll I, Rothaug M, Schumacher N, Schmidt F, Wichert R, et al. Meprin Metalloproteases Generate Biologically Active Soluble Interleukin-6 Receptor to Induce Trans-Signaling. *Sci Rep.* 2017;7:44053.
  27. 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.
  28. Biasin V, Wygrecka M, Marsh LM, Becker-Pauly C, Brcic L, Ghanim B, et al. Meprin beta contributes to collagen deposition in lung fibrosis. *Sci Rep.* 2017;7:39969.
  29. Broder C, Arnold P, Vadon-Le Goff S, Konerding MA, Bahr K, Muller S, et al. Metalloproteases meprin alpha and meprin beta are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(35):14219-24.
  30. Kruse MN, Becker C, Lottaz D, Kohler D, Yiallourous I, Krell HW, et al. Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem J.* 2004;378(Pt 2):383-9.
  31. Oneda B, Lods N, Lottaz D, Becker-Pauly C, Stocker W, Pippin J, et al. Metalloprotease meprin beta in rat kidney: glomerular localization and differential expression in glomerulonephritis. *PLoS One.* 2008;3(5):e2278.
  32. Bertenshaw GP, Turk BE, Hubbard SJ, Matters GL, Bylander JE, Crisman JM, et al. Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. *J Biol Chem.* 2001;276(16):13248-55.
  33. Schutte A, Ermund A, Becker-Pauly C, Johansson ME, Rodriguez-Pineiro AM, Backhed F, et al. Microbial-induced meprin beta cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(34):12396-401.
  34. Bedau T, Peters F, Prox J, Arnold P, Schmidt F, Finkernagel M, et al. Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin beta and promotes transendothelial cell migration. *FASEB J.* 2017;31(3):1226-37.

35. Herzog C, Marisiddaiah R, Haun RS, Kaushal GP. Basement membrane protein nidogen-1 is a target of meprin beta in cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol Lett.* 2015;236(2):110-6.
36. Herzog C, Kaushal GP, Haun RS. Generation of biologically active interleukin-1beta by meprin B. *Cytokine.* 2005;31(5):394-403.
37. Keiffer TR, Bond JS. Meprin metalloproteases inactivate interleukin 6. *J Biol Chem.* 2014;289(11):7580-8.
38. Banerjee S, Bond JS. Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *J Biol Chem.* 2008;283(46):31371-7.
39. 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;62(5):557-60.
40. Beynon RJ, Shannon JD, Bond JS. Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *Biochem J.* 1981;199(3):591-8.
41. Craig SS, Reckelhoff JF, Bond JS. Distribution of meprin in kidneys from mice with high- and low-meprin activity. *Am J Physiol.* 1987;253(4 Pt 1):C535-40.
42. Biasin V, Marsh LM, Egemnazarov B, Wilhelm J, Ghanim B, Klepetko W, et al. Meprin beta, a novel mediator of vascular remodelling underlying pulmonary hypertension. *J Pathol.* 2014;233(1):7-17.
43. Eferl R, Hasselblatt P, Rath M, Popper H, Zenz R, Komnenovic V, et al. Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10525-30.
44. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(11):859-68.
45. Sun J, Roy S. The physical approximation of APP and BACE-1: A key event in Alzheimer's disease pathogenesis. *Dev Neurobiol.* 2018;78(3):340-7.
46. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992;256(5054):184-5.
47. Vassar R, Kuhn PH, Haass C, Kennedy ME, Rajendran L, Wong PC, et al. Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J Neurochem.* 2014;130(1):4-28.
48. Bien J, Jefferson T, Causevic M, Jumpertz T, Munter L, Multhaup G, et al. The metalloprotease meprin beta generates amino terminal-truncated amyloid beta peptide species. *J Biol Chem.* 2012;287(40):33304-13.
49. DeMattos RB, Bales KR, Parsadanian M, O'Dell MA, Foss EM, Paul SM, et al. Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid-beta (Abeta) equilibrium in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2002;81(2):229-36.
50. Bond JS, Matters GL, Banerjee S, Dusheck RE. Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer. *FEBS Lett.* 2005;579(15):3317-22.
51. Kronenberg D, Bruns BC, Moali C, Vadon-Le Goff S, Sterchi EE, Traupe H, et al. Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly? *J Invest Dermatol.* 2010;130(12):2727-35.
52. Byers PH, Murray ML. Ehlers-Danlos syndrome: a showcase of conditions that lead to understanding matrix biology. *Matrix Biol.* 2014;33:10-5.
53. Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med.* 2011;17(1-2):113-25.
54. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(12 Suppl S):13S-24S.

55. Herzog C, Marisiddaiah R, Haun RS, Kaushal GP. Basement membrane protein nidogen-1 is a target of meprin beta in cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol Lett.* 2015;236(2):110-6.
56. Li YJ, Fan YH, Tang J, Li JB, Yu CH. Meprin-beta regulates production of pro-inflammatory factors via a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) dependent pathway in macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2014;18(1):77-84.
57. Bergin DA, Greene CM, Sterchi EE, Kenna C, Geraghty P, Belaaouaj A, et al. Activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by a novel metalloprotease pathway. *J Biol Chem.* 2008;283(46):31736-44.
58. Schimmel L, Heemskerk N, van Buul JD. Leukocyte transendothelial migration: A local affair. *Small GTPases.* 2017;8(1):1-15.
59. Crisman JM, Zhang B, Norman LP, Bond JS. Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. *J Immunol.* 2004;172(7):4510-9.
60. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest.* 2004;114(1):5-14.
61. Bylander J, Li Q, Ramesh G, Zhang B, Reeves WB, Bond JS. Targeted disruption of the meprin metalloproteinase beta gene protects against renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(3):F480-90.
62. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018;25(1):59-70.
63. Soria Lopez JA, Gonzalez HM, Leger GC. Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol.* 2019;167:231-55.
64. Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2011;3(1):1.
65. Canevelli M, Piscopo P, Talarico G, Vanacore N, Blasimme A, Crestini A, et al. Familial Alzheimer's disease sustained by presenilin 2 mutations: systematic review of literature and genotype-phenotype correlation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;42:170-9.
66. Arbor SC, LaFontaine M, Cumbay M. Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med.* 2016;89(1):5-21.
67. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides.* 2015;52:1-18.
68. Moussa-Pacha NM, Abdin SM, Omar HA, Alniss H, Al-Tel TH. BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* 2019.
69. Dyrna F, Hanske S, Krueger M, Bechmann I. The blood-brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(4):763-73.
70. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anat Rec B New Anat.* 2006;289(1):3-8.
71. Stern L, Gautier R. II. – Les Rapports Entre Le Liquide Céphalo-Rachidien Et Les éléments Nerveux De L'axe Cerebrospinal. *Arch Int Physiol.* 1922;17(4):391-448.
72. Saunders NR, Dreifuss JJ, Dziegielewska KM, Johansson PA, Habgood MD, Mollgard K, et al. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci.* 2014;8:404.
73. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(1):a020412.
74. Matienzo D, Bordoni B. Anatomy, Blood Flow. *StatPearls. Treasure Island (FL)2020.*
75. Augustin HG, Koh GY. Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. *Science.* 2017;357(6353).

76. 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.
77. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*. 2019;99(1):21-78.
78. Kanungo S, Wells K, Tribett T, El-Gharbawy A. Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Ann Transl Med*. 2018;6(24):474.
79. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J*. 2015;282(21):4067-79.
80. Varatharaj A, Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2017;60:1-12.
81. Lok J, Gupta P, Guo S, Kim WJ, Whalen MJ, van Leyen K, et al. Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res*. 2007;32(12):2032-45.
82. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007;100(2):174-90.
83. Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, Kamoi M, Asashima T, Terasaki T. Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2007;210(1):81-6.
84. Reinhold AK, Rittner HL. Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2017;469(1):123-34.
85. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993;123(6 Pt 2):1777-88.
86. Greene C, Campbell M. Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. *Tissue Barriers*. 2016;4(1):e1138017.
87. Roepe PD. What is the precise role of human MDR 1 protein in chemotherapeutic drug resistance? *Curr Pharm Des*. 2000;6(3):241-60.
88. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 2:136-53.
89. Keep RF, Hua Y, Xi G. Brain water content. A misunderstood measurement? *Transl Stroke Res*. 2012;3(2):263-5.
90. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(5):862-90.
91. He Y, Yao Y, Tsirka SE, Cao Y. Cell-culture models of the blood-brain barrier. *Stroke*. 2014;45(8):2514-26.
92. Gumbleton M, Audus KL. Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci*. 2001;90(11):1681-98.
93. Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcao A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;87(3):409-32.
94. Heidari H, Taylor H. Review Article: Capturing the physiological complexity of the brain's neuro-vascular unit in vitro. *Biomicrofluidics*. 2018;12(5):051502.
95. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*. 2015;20(2):107-26.
96. Montesano R, Pepper MS, Mohle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell*. 1990;62(3):435-45.

97. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic Differences among C57BL/6 Substrains. *Exp Anim.* 2009;58(2):141-9.
98. Stepanenko AA, Heng HH. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutat Res.* 2017;773:91-103.
99. Gutierrez-Granados S, Cervera L, Kamen AA, Godia F. Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. *Crit Rev Biotechnol.* 2018;38(6):918-40.
100. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(8):3173-8.
101. Miller AD. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther.* 1990;1(1):5-14.
102. Sena-Esteves M, Gao G. Production of High-Titer Retrovirus and Lentivirus Vectors. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(4).
103. Emi N, Friedmann T, Yee JK. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 1991;65(3):1202-7.
104. Selden RF. Transfection using DEAE-dextran. *Curr Protoc Immunol.* 2001;Chapter 10:Unit 10 4.
105. Brewer CB. Cytomegalovirus plasmid vectors for permanent lines of polarized epithelial cells. *Methods Cell Biol.* 1994;43 Pt A:233-45.
106. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meissner JN, Schubert N, Di Spiezio A, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid-beta(1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 2016;126(1):123-36.
107. Henrich-Noack P, Nikitovic D, Neagu M, Docea AO, Engin AB, Gelperina S, et al. The blood-brain barrier and beyond: Nano-based neuropharmacology and the role of extracellular matrix. *Nanomedicine.* 2019;17:359-79.
108. Baeten KM, Akassoglou K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol.* 2011;71(11):1018-39.
109. Czupalla CJ, Liebner S, Devraj K. In vitro models of the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol.* 2014;1135:415-37.
110. Grabovac V, Bernkop-Schnurch A. Development and in vitro evaluation of surface modified poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with chitosan-4-thiobutylamidine. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007;33(7):767-74.
111. Storck SE, Hartz AMS, Bernard J, Wolf A, Kachlmeier A, Mahringer A, et al. The concerted amyloid-beta clearance of LRP1 and ABCB1/P-gp across the blood-brain barrier is linked by PICALM. *Brain Behav Immun.* 2018;73:21-33.
112. Gindorf M, Storck SE, Ohler A, Scharfenberg F, Becker-Pauly C, Pietrzik CU. Meprin beta: A novel regulator of blood-brain barrier integrity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020;271678X20905206.
113. Poreba M, Szalek A, Rut W, Kasperkiewicz P, Rutkowska-Wlodarczyk I, Snipas SJ, et al. Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families. *Sci Rep.* 2017;7:43135.
114. Jodal A, Pape F, Becker-Pauly C, Maas O, Schibli R, Behe M. Evaluation of (1)(1)(1)in-labelled exendin-4 derivatives containing different meprin beta-specific cleavable linkers. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123443.
115. Magnain C, Augustinack JC, Reuter M, Wachinger C, Frosch MP, Ragan T, et al. Blockface histology with optical coherence tomography: a comparison with Nissl staining. *Neuroimage.* 2014;84:524-33.
116. Medoro A, Bartollino S, Mignogna D, Marziliano N, Porcile C, Nizzari M, et al. Proteases Upregulation in Sporadic Alzheimer's Disease Brain. *J Alzheimers Dis.* 2019;68(3):931-8.
117. Meister S, Storck SE, Hameister E, Behl C, Weggen S, Clement AM, et al. Expression of the ALS-causing variant hSOD1(G93A) leads to an impaired integrity

- and altered regulation of claudin-5 expression in an in vitro blood-spinal cord barrier model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(7):1112-21.
118. Andrews AM, Lutton EM, Cannella LA, Reichenbach N, Razmpour R, Seasock MJ, et al. Characterization of human fetal brain endothelial cells reveals barrier properties suitable for in vitro modeling of the BBB with syngenic co-cultures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38(5):888-903.
119. Halliday MR, Rege SV, Ma Q, Zhao Z, Miller CA, Winkler EA, et al. Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(1):216-27.
120. Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, et al. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature.* 2012;485(7399):512-6.
121. Shen J, Xu G, Zhu R, Yuan J, Ishii Y, Hamashima T, et al. PDGFR-beta restores blood-brain barrier functions in a mouse model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019;39(8):1501-15.
122. Yao Y. Basement membrane and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019;39(1):3-19.
123. Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH. Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology.* 2009;50(6):1914-23.
124. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(4):697-709.
125. Nag S, Kapadia A, Stewart DJ. Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011;37(1):3-23.
126. Thambisetty M, Beason-Held L, An Y, Kraut MA, Resnick SM. APOE epsilon4 genotype and longitudinal changes in cerebral blood flow in normal aging. *Arch Neurol.* 2010;67(1):93-8.
127. Safieh M, Korczyn AD, Michaelson DM. ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Med.* 2019;17(1):64.
128. Fischer SEJ. RNA Interference and MicroRNA-Mediated Silencing. *Curr Protoc Mol Biol.* 2015;112:26 1 1- 1 5.
129. Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(6):883-917.
130. Medina R, Rahner C, Mitic LL, Anderson JM, Van Itallie CM. Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. *J Membr Biol.* 2000;178(3):235-47.
131. Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest.* 1999;104(1):123-33.
132. Cui D, Arima M, Takubo K, Kimura T, Horiuchi K, Minagawa T, et al. ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function. *Sci Rep.* 2015;5:12796.
133. Fortelny N, Cox JH, Kappelhoff R, Starr AE, Lange PF, Pavlidis P, et al. Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease web. *PLoS Biol.* 2014;12(5):e1001869.
134. Perriere N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem.* 2005;93(2):279-89.

135. He L, Vanlandewijck M, Mae MA, Andrae J, Ando K, Del Gaudio F, et al. Single-cell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types. *Sci Data*. 2018;5:180160.
136. dela Paz NG, D'Amore PA. Arterial versus venous endothelial cells. *Cell Tissue Res*. 2009;335(1):5-16.
137. Vanlandewijck M, He L, Mae MA, Andrae J, Ando K, Del Gaudio F, et al. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*. 2018;554(7693):475-80.
138. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2014;34(36):11929-47.
139. Chiu PS, Lai SC. Matrix metalloproteinase-9 leads to claudin-5 degradation via the NF-kappaB pathway in BALB/c mice with eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *PLoS One*. 2013;8(3):e53370.
140. Zhu JC, Si MY, Li YZ, Chen HZ, Fan ZC, Xie QD, et al. Circulating tight junction proteins mirror blood-brain barrier integrity in leukaemia central nervous system metastasis. *Hematol Oncol*. 2017;35(3):365-73.
141. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell*. 2008;19(11):4687-93.
142. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 2003;161(3):653-60.
143. Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS*. 2019;16(1):3.
144. Banerjee S, Jin G, Bradley SG, Matters GL, Gailey RD, Crisman JM, et al. Balance of meprin A and B in mice affects the progression of experimental inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(2):G273-82.
145. Liu Y, Braidy N, Poljak A, Chan DKY, Sachdev P. Cerebral small vessel disease and the risk of Alzheimer's disease: A systematic review. *Ageing Res Rev*. 2018;47:41-8.
146. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol*. 2010;9(7):689-701.
147. Thrippleton MJ, Backes WH, Sourbron S, Ingrisch M, van Osch MJP, Dichgans M, et al. Quantifying blood-brain barrier leakage in small vessel disease: Review and consensus recommendations. *Alzheimers Dement*. 2019;15(6):840-58.
148. Cullen KM, Kocsi Z, Stone J. Microvascular pathology in the aging human brain: evidence that senile plaques are sites of microhaemorrhages. *Neurobiol Aging*. 2006;27(12):1786-96.
149. Flemmig J, Zamocky M, Alia A. Amyloid beta and free heme: bloody new insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. 2018;13(7):1170-4.
150. Liu L, Ding L, Rovere M, Wolfe MS, Selkoe DJ. A cellular complex of BACE1 and gamma-secretase sequentially generates Abeta from its full-length precursor. *J Cell Biol*. 2019;218(2):644-63.
151. Li J, Li C, Yuan W, Wu J, Li J, Li Z, et al. Mild hypothermia alleviates brain oedema and blood-brain barrier disruption by attenuating tight junction and adherens junction breakdown in a swine model of cardiopulmonary resuscitation. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174596.
152. Koyama S, Wada M, Tamura Y, Ishikawa G, Kobayashi J, Ishikawa Y. Alternating electric field application induced non-contact and enzyme-free cell detachment. *Cytotechnology*. 2019;71(2):583-97.



153. Chan LL, Rice WL, Qiu J. Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227950.
154. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur (E-Book)*. 3. ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011. p. 192.
155. Gholizadeh-Ghaleh Aziz S, Fardyazar Z, Pashaei-Asl F, Rahmati-Yamchi M, Khodadadi K, Pashaiasl M. Human amniotic fluid stem cells (hAFSCs) expressing p21 and cyclin D1 genes retain excellent viability after freezing with (dimethyl sulfoxide) DMSO. *Bosn J Basic Med Sci*. 2019;19(1):43-51.
156. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
157. Ossipow V, Laemmli UK, Schibler U. A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(25):6040-1.
158. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981;112(2):195-203.
159. Sato S, Nakamura K, Nakamura H. Horseradish-Peroxidase-Catalyzed Tyrosine Click Reaction. *Chembiochem*. 2017;18(5):475-8.