

**Etablierung, Charakterisierung und
Anwendung eines *in vitro*-Zellkulturmodells
der Blut-Hirn-Schranke**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften, vorgelegt beim Fachbereich

Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Johann Wolfgang Goethe – Universität

in Frankfurt am Main

von

Dietmar Zenker

aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2001

vom Fachbereich
der Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

VORWORT UND DANKSAGUNGEN

Die vorliegende Arbeit wurde am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/Main unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. H. Rübsamen-Waigmann und Prof. H. Fasold in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. v. Briesen durchgeführt.

Bei Frau Prof. Dr. H. Rübsamen-Waigmann und Prof. H. Fasold bedanke ich mich für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich Frau Prof. Dr. H. Rübsamen-Waigmann für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Georg-Speyer-Haus und für ihre wertvollen Anregungen. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. H. v. Briesen für sein großes Interesse und seine Hilfestellung bei der Bewältigung von Problemen, die sich im Verlauf der Arbeit ergaben.

Herzlichst bedanken möchte ich mich auch bei Frau Karin Becker-Peters, Frau Silke Deckert und Frau Elisabeth Kurunci für ihre Hilfe und technische Unterstützung bei der Laborarbeit, ihren seelisch-moralischen Beistand in den leider öfter vorhandenen schwierigen Phasen der Promotionsarbeit und für die gute und anregende Arbeitsatmosphäre. Dies gilt im übrigen für die gesamte Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. H. v. Briesen und Frau Dr. U. Dietrich.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Sebastian Steininger für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Nanopartikeln bedanken.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mich in der Zeit meiner Promotion unterstützt und mir geholfen haben, die wiederholt vorkommenden Finanzierungslücken während meiner Promotionsarbeit zu überbrücken.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACI	Adenylat-Cyclase-Inhibitor
ADC	<i>AIDS dementia complex</i>
AIDS	erworbenes Immundefizienz-Syndrom (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
BCEC	cerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen (<i>brain capillary endothelial cells</i>)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CM	konditioniertes Medium (<i>conditioned medium</i>)
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukocyten-Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LFA	<i>leukocyte function-associated antigen</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MAC	Makrophage(n)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MO/MAC	Monocyten/Makrophagen
MZA	Muskelzell-Aktin
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PDEI	Phosphodiesterase-Inhibitor
PKC	Protein-Kinase C
PS 80	Polysorbat 80 (Tween 80)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
TEER	Transendothelialer elektrischer Widerstand (<i>transendothelial electrical resistance</i>)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Einheit(en) (<i>unit</i>)
VLA	<i>very late activation antigen</i>
ZO	<i>zonula occludens</i>

INHALTSVERZEICHNIS

1	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	BIOLOGIE UND PHYSIOLOGIE DER BLUT-HIRN-SCHRANKE	3
2.1.1	<i>Einführung</i>	3
2.1.2	<i>Aufbau</i>	4
2.1.3	<i>Eigenschaften und Funktion</i>	6
2.1.4	<i>Mikroumgebung</i>	11
2.1.5	<i>Die Blut-Hirn-Schranke als Ziel von Cytokinen und ihre Interaktion mit Zellen des Immunsystems</i>	13
2.1.5.1	Wirkung von Cytokinen auf cerebrale Endothelzellen	13
2.1.5.2	Wirkung von Cytokinen auf die Blut-Hirn-Schranke	14
2.1.5.3	Monocyten/Makrophagen als Teil des Immunsystems	16
2.1.5.4	Mikroglia.....	17
2.1.5.5	Interaktion von Immunzellen mit der Blut-Hirn-Schranke	19
2.2	DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE BEI AIDS.....	20
2.3	DIE ERFORSCHUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE.....	28
2.3.1	<i>Einführung</i>	28
2.3.2	<i>In vitro-Blut-Hirn-Schranken-Systeme</i>	29
2.3.3	<i>Einfluss externer Faktoren auf die spezifischen Eigenschaften eines in vitro-BHS-Systems</i>	33
2.3.3.1	Problematik der <i>in vitro</i> -Kultivierung primärer BCEC.....	33
2.3.3.2	Einfluss glialer Faktoren auf die BHS-spezifischen Eigenschaften kultivierter BCEC	34
2.3.3.3	Einfluss exogener unphysiologischer Faktoren auf die BHS-spezifischen Eigenschaften kultivierter BCEC	36
2.4	METHODEN ZUR ÜBERWINDUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE IN DER PHARMAKOLOGISCHEN FORSCHUNG	38

3	MATERIAL UND METHODEN	40
3.1	VERWENDETE MATERIALIEN, REAGENZIEN UND GERÄTE.....	40
3.1.1	<i>Zellkultur</i>	40
3.1.1.1	Komplett-Zellkulturmedien.....	40
3.1.1.2	Medienzusätze.....	41
3.1.1.3	Enzyme, Cytokine und Mitogene.....	41
3.1.1.4	Adhäsionsfaktoren	41
3.1.1.5	Zelllinien	42
3.1.2	<i>Signaltransduktions-Reagenzien</i>	42
3.1.3	<i>sonstige Reagenzien</i>	42
3.1.4	<i>Kulturgefäße und Gebrauchsmaterial</i>	43
3.1.5	<i>Geräte</i>	43
3.2	ISOLIERUNG, KULTIVIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG BOVINER UND HUMANER MIKROVASKULÄRER HIRNENDOTHELZELLEN UND ZELLINIEN ...	44
3.2.1	<i>Isolierung von mikrovaskulären Kapillarfragmenten aus bovinem und humanem Hirnmaterial</i>	44
3.2.1.1	Ausgangsmaterial und Vorbereitung.....	44
3.2.1.2	Originales Isolierungs-Protokoll (“MPI-Protokoll”).....	45
3.2.1.3	Etablierung und Optimierung eines alternativen Isolierungs-Protokolls (“Alternativ-Protokoll”)	46
3.2.2	<i>Kultivierung der Hirnendothelzellen</i>	50
3.2.2.1	Beurteilung der Kulturbedingungen.....	50
3.2.2.2	Adhäsionsfaktor	50
3.2.2.3	Wachstumsfaktor	52
3.2.2.4	Kulturmedium	52
3.2.2.5	Zusammenfassung der standardmäßig verwendeten Kulturbedingungen der BCEC	53
3.2.3	<i>Kultivierung der Zelllinien</i>	54
3.2.4	<i>Charakterisierung der Hirnendothelzellen: Immuncytochemische Fluoreszenz-Färbung</i>	54

3.3	ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES <i>IN VITRO</i> -BLUT-HIRN-SCHRANKEN-MODELLS	56
3.3.1	<i>Aufbau des in vitro-Blut-Hirn-Schranken-Modells</i>	56
3.3.2	<i>Charakterisierung des in vitro-Blut-Hirn-Schranken-Modells</i>	57
3.3.2.1	Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (<i>transendothelial electrical resistance</i> , TEER)	57
3.3.2.2	Bestimmung der parazellulären Permeabilität makromolekularer Substanzen (radioaktiver Permeabilitätsassay)	58
3.3.2.3	Einfluss von den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhenden Substanzen und C6-Kokultur auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer.....	60
3.4	EINFLUSS VON MAKROPHAGEN AUF DIE PERMEABILITÄT POSTKONFLUENTER BCEC-MONOLAYER	62
3.4.1	<i>Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut und deren Kultivierung</i>	62
3.4.2	<i>Einfluss unstimulierter und stimulierter Makrophagen verschiedener Differenzierungsgrade auf die Permeabilität boviner und humaner BCEC-Monolayer</i>	63
3.4.3	<i>Einfluss Makrophagen-konditionierten Mediums auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer und Vergleich mit Zelllinien</i>	66
3.4.4	<i>Einfluss HIV-1-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	67
3.4.5	<i>Einfluss konditioniertem Mediums HIV-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	69
3.4.6	<i>Untersuchung der an der Makrophagen-BCEC-Interaktion beteiligten Signaltransduktionswege</i>	70
3.4.6.1	Adenylat-Cyclase-cAMP-Signaltransduktionsweg.....	71
3.4.6.2	Protein-Kinasen.....	72
3.4.6.3	Weitere Signaltransduktions-Mediatoren: Phospholipase C und Ca ²⁺ -Calmodulin..	73
3.5	WEITERE PHYSIOLOGISCHE STUDIEN	74
3.5.1	<i>Einfluss von Serum auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i> 74	
3.5.2	<i>Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	76

3.6	EINFLUSS VON NANOPARTIKELN AUF DIE PERMEABILITÄT POSTKONFLUENTER BCEC-MONOLAYER	77
3.6.1	<i>Herstellung von Polybutylcyanoacrylat-(PBCA)-Nanopartikeln.....</i>	78
3.6.2	<i>Coating der PBCA-Nanopartikel mit Polysorbat 80 (PS 80).....</i>	78
3.6.3	<i>Einfluss verschiedener Nanopartikel-Präparationen auf den TEER postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	79
3.6.4	<i>Einfluss verschiedener Nanopartikel-Präparationen auf die parazelluläre Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayern für ¹⁴C-Sucrose</i>	79
4	ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG	82
4.1	ISOLIERUNG, KULTIVIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG BOVINER UND HUMANER MIKROVASKULÄRER HIRNENDOTHELZELLEN	82
4.1.1	<i>Isolierung von mikrovaskulären Kapillarfragmenten aus bovinem und humanem Hirnmaterial.....</i>	82
4.1.2	<i>Optimierung der Kulturbedingungen der mikrovaskulären Hirndothelzellen.....</i>	84
4.1.2.1	Adhäsionsfaktor	84
4.1.2.2	Medium	86
4.1.3	<i>Charakterisierung der Hirndothelzellen: Immuncytochemische Fluoreszenz-Färbung.....</i>	89
4.1.3.1	von-Willebrand-Faktor (vWF)	89
4.1.3.2	Zonula occludens-1 (ZO-1).....	91
4.1.3.3	Glattes Muskelzell-Aktin (MZA).....	93
4.2	CHARAKTERISIERUNG DES <i>IN VITRO</i> -BLUT-HIRN-SCHRANKEN-MODELLS	94
4.2.1	<i>Transendothelialer elektrischer Widerstand (transendothelial electrical resistance, TEER) des in vitro-Blut-Hirn-Schranken-Modells.....</i>	94
4.2.2	<i>Parazelluläre Permeabilität des in vitro-Blut-Hirn-Schranken-Modells für Makromoleküle und Relation mit dem TEER</i>	94
4.2.3	<i>Einfluss von den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhenden Substanzen und C6-Kokultur auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer.....</i>	97
4.3	EINFLUSS VON MAKROPHAGEN AUF DIE PERMEABILITÄT POSTKONFLUENTER BCEC-MONOLAYER	99
4.3.1	<i>Einfluss von Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC- Monolayer bei Kokultur und Vergleich mit Zelllinien.....</i>	99

4.3.2	<i>Einfluss Makrophagen-konditionierten Mediums (CM) auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer und Vergleich mit Zelllinien</i>	102
4.3.3	<i>Einfluss proinflammatorisch stimulierter Makrophagen verschiedener Differenzierungsgrade auf die Permeabilität postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer bei Kokultur</i>	104
4.3.4	<i>Einfluss proinflammatorisch stimulierter Makrophagen verschiedener Differenzierungsgrade auf die Permeabilität postkonfluenter <u>humaner</u> BCEC-Monolayer bei Kokultur</i>	109
4.3.5	<i>Einfluss HIV-1-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	111
4.3.6	<i>Einfluss konditionierten Mediums HIV-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	115
4.3.7	<i>Untersuchung der an der Makrophagen-BCEC-Interaktion beteiligten Signaltransduktionswege</i>	119
4.3.7.1	Adenylat-Cyclase-cAMP-Signaltransduktionsweg	119
4.3.7.1.1	Adenylat-Cyclase-Aktivator Forskolin und Phosphodiesterase-Inhibitor (PDEI) RO 20-1724	119
4.3.7.1.2	Adenylat-Cyclase-Inhibitor (ACI) SQ22536	124
4.3.7.2	Protein-Kinasen	128
4.3.7.2.1	Protein-Kinase-C-Aktivator <i>1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol</i> (OAG)	128
4.3.7.2.2	Protein-Kinase-Inhibitoren H-7 und H-8	129
4.3.7.3	Weitere Signaltransduktionsmediatoren: Phospholipase C und Ca ²⁺ -Calmodulin	134
4.4	WEITERE PHYSIOLOGISCHE STUDIEN	136
4.4.1	<i>Einfluss von Serum auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	136
4.4.2	<i>Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	141
4.5	EINFLUSS VON NANOPARTIKELN AUF DIE PERMEABILITÄT POSTKONFLUENTER BCEC-MONOLAYER	143
4.5.1	<i>Einfluss verschiedener Nanopartikel-Präparationen auf den TEER postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	143
4.5.2	<i>Einfluss verschiedener Nanopartikel-Präparationen auf die parazelluläre Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer für ¹⁴C-Sucrose</i>	145

5	DISKUSSION	148
5.1	ISOLIERUNG, KULTIVIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG BOVINER UND HUMANER MIKROVASKULÄRER HIRNENDOTHELZELLEN	148
5.2	DAS <i>IN VITRO</i> -BLUT-HIRN-SCHRANKEN-ZELLKULTURMODELL	153
5.3	EINFLUSS VON MAKROPHAGEN AUF DIE PERMEABILITÄT POSTKONFLUENTER BCEC-MONOLAYER	158
5.3.1	<i>Einfluss von Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter boviner und humaner BCEC-Monolayer</i>	<i>158</i>
5.3.2	<i>Einfluss proinflammatorisch stimulierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	<i>161</i>
5.3.3	<i>Einfluss Makrophagen-konditioniertem Mediums (MAC-CM) auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer und Vergleich mit Zelllinien.....</i>	<i>162</i>
5.3.4	<i>Einfluss HIV-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer</i>	<i>164</i>
5.3.5	<i>Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege an der Makrophagen- BCEC-Interaktion</i>	<i>166</i>
5.3.6	<i>Schlussfolgerungen und Bewertung.....</i>	<i>169</i>
5.4	EINFLUSS VON SERUM AUF DIE PERMEABILITÄT POSTKONFLUENTER BCEC-MONOLAYER.....	171
5.5	EINFLUSS VON NANOPARTIKELN AUF DIE PERMEABILITÄT POSTKONFLUENTER BCEC-MONOLAYER	174
5.6	ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG UND PERSPEKTIVEN	177
6	ZUSAMMENFASSUNG	178
7	BIBLIOGRAFIE.....	181
8	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	198
9	CURRICULUM VITAE.....	199

1 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine seit über 100 Jahren bekannte physiologische Barriere, die eine der stärksten Barrieren im Körper von Wirbeltieren darstellt und den freien Austausch von Stoffen und Immunzellen zwischen Blutgefäßsystem und Gehirn kontrolliert oder verhindert. Dies sorgt für die Aufrechterhaltung und Regulation der definierten und empfindlichen neuronalen Mikroumgebung des Hirnparenchyms, und darüber hinaus schützt die BHS das Gehirn vor neurotoxischen Substanzen und Krankheitserregern. Somit stellt die BHS letztendlich sicher, dass die Nervenzellen des Gehirns und somit das Gehirn selbst ihre normalen Funktionen ausüben können.

Die strukturelle Basis der BHS stellen die cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (*brain capillary endothelial cells*, BCEC) dar, die sich grundlegend von Endothelzellen aus peripheren Geweben unterscheiden und durch ihre speziellen Eigenschaften den trans- und parazellulären Stofffluss stark limitieren. Die BHS-spezifischen Charakteristiken des cerebralen Endothels werden durch seine Mikroumgebung moduliert, die sich aus verschiedenen Zelltypen des Hirnparenchyms zusammensetzt. Unklar ist nach wie vor, in welchem Maße die unterschiedlichen Zelltypen an der Modulation der BHS involviert sind und welche Interaktionen hierfür notwendig sind, sowie die Art der dabei vermittelnden Faktoren und beteiligten Signaltransduktions-Mechanismen.

Ungeachtet ihrer wichtigen biologischen Funktion stellt die BHS die pharmakologische Forschung vor besondere Herausforderungen bei der Entwicklung von Arzneimitteln, die ihre Wirkung im Gehirn entfalten sollen, da zahlreiche wirksame Agenzien die BHS nicht überwinden können. Dies erfordert die Entwicklung von Strategien, Arzneistoffe gezielt in das Gehirn zu bringen (*brain targeting*), sowie die Entwicklung von Testsystemen, mit deren Hilfe die Hirngängigkeit neuentwickelter Arzneistoffe und die Funktionalität von Arzneistoff-Trägersystemen zur Überwindung der BHS möglichst effizient geprüft werden können.

Die beschriebenen Sachverhalte zeigen die Wichtigkeit der BHS und ihre Erforschung für die verschiedensten Disziplinen, die über die Neurowissenschaften hinaus auch die Bereiche Physiologie, Pathologie, Medizin und Pharmakologie beinhalten. *In vitro*-Systeme spielen dabei eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der biochemischen und physiologischen Eigenschaften der BHS. Insbesondere Zellkultursysteme mit isolierten primären BCEC stellen ein einfaches und flexibles experimentelles System dar, um die spezifischen Eigenschaften der BHS, ihre Regulation und Physiologie unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen *in vitro* zu untersuchen. Darüber hinaus sind sie in der pharmakologischen Forschung als alternativ zum Tierversuch einsetzbare Testsysteme bei der Entwicklung von im Zentralnervensystem wirkenden Arzneistoffen bedeutend.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein *in vitro*-Zellkultursystem der BHS zu etablieren und für physiologische und pharmakologische Studien zu verwenden. Folgende Fragestellungen wurden unter Anwendung dieses BHS-Modells näher untersucht:

1. Führt die Interaktion von Makrophagen mit postkonfluenten cerebralen Endothelzellen zu einer Beeinflussung ihrer BHS-spezifischen Barrierefunktion ?
2. Führt eine proinflammatorische Stimulation oder eine Infektion der Makrophagen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) zu einer Änderung ihres auf die cerebralen Endothelzellen ausgeübten Einflusses ?
3. Welche Signaltransduktions-Mechanismen sind an der Interaktion zwischen Makrophagen und cerebralen Endothelzellen involviert ?
4. Welchen Einfluss haben Nanopartikel, die als potentielle *brain targeting*-Trägersysteme für Arzneistoffe diskutiert werden, auf die Barriere-Eigenschaften postkonfluenter cerebraler Endothelzellen ?

2 EINLEITUNG

2.1 Biologie und Physiologie der Blut-Hirn-Schranke

2.1.1 Einführung

Die Entdeckung einer Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Hirngewebe erfolgte bereits vor mehr als 100 Jahren durch den Mikrobiologen Paul Ehrlich, der die Erfahrung machte, dass in die Blutbahn von Wirbeltieren injizierte Vitalfarbstoffe sehr schnell nahezu alle Organe und Gewebe durchdrangen und anfärbten, mit Ausnahme des Gehirns, das seine blasse cremefarbene Erscheinung beibehielt. Diese Beobachtung führte später zur Definition und Prägung des Begriffs „*Blut-Hirn-Schranke*“ (BHS) (Goldmann 1913). Frühe elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass die BHS durch Endothelzellen gebildet wird, die die cerebralen Blutgefäße auskleiden (Reese und Karnovsky 1967), und dass diese derart eng miteinander verbunden sind, dass keine Lücken zwischen ihnen existieren und dadurch der freie Durchtritt von Blutkomponenten durch das cerebrale Endothel verhindert wird (Brightman und Reese 1969).

Aufgrund des hohen Energie- und Sauerstoffbedarfs des Gehirns, der im Ruhezustand etwa ein Viertel des gesamten Körpers ausmacht, ist das cerebrale Blutgefäßsystem sehr ausgeprägt; es wird geschätzt, dass in einem Gramm Hirngewebe die Gesamtlänge aller Blutgefäße 425 m und die gesamte kapillare Oberfläche 240 cm^2 beträgt (Crone 1963). Die BHS verhindert einen freien Stoffaustausch zwischen dem cerebralen Blutgefäßsystem und dem Hirnparenchym und stellt diesen unter ihre Kontrolle. Dies sorgt für die Aufrechterhaltung und Regulation der definierten und empfindlichen neuronalen Mikroumgebung des Hirnparenchyms und verhindert Störungen ihrer spezifischen Ionenzusammensetzung, beispielsweise aufgrund von Veränderungen in der Zusammensetzung des Blutes oder durch Zusammenbruch des

Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Gehirn. Weiterhin schützt die BHS das Gehirn vor neurotoxischen Substanzen und Krankheitserregern. Somit stellt die BHS letztendlich sicher, dass die Nervenzellen des Gehirns und somit das Gehirn selbst ihre normalen Funktionen ausüben können.

Über den zeitlichen Verlauf und den Prozess der BHS-Ausbildung während der prä- und postnatalen Entwicklung ist bislang nur wenig bekannt. In Nagetierembryonen weisen die ersten das entwickelnde Gehirn vaskularisierenden Kapillaren noch keine speziellen Eigenschaften auf und ähneln mehr den Blutgefäßen des peripheren Gewebes (Kniesel *et al.* 1996). Der Zeitpunkt der eigentlichen Ausbildung einer Barriere ist kontrovers, es erscheint zumindest mittlerweile äußerst unwahrscheinlich, dass sämtliche Eigenschaften der BHS gleichzeitig ausgebildet werden. So werden beispielsweise bei Nagetier-Embryonen Serum-Proteine bereits zu einem relativ frühen Zeitpunkt aus dem Gehirn ausgeschlossen, was zeigt, dass eine Protein-Barriere bereits früh in der Embryonalentwicklung ausgebildet wird (Saunders *et al.* 1991). Die vollständige Ionen-Barriere entwickelt sich dagegen erst relativ spät; Widerstandsmessungen an Kapillaren der *Pia Mater* zeigten zum Beispiel, dass hohe elektrische Widerstände (vergl. 2.1.3) erst kurz nach der Geburt vorhanden waren (Butt *et al.* 1990).

2.1.2 Aufbau

Obwohl die Endothelzellen die eigentliche Barriere der BHS repräsentieren, setzt sich das cerebrale mikrovaskuläre Gefäßsystem aus mehreren unterschiedlichen Zellarten zusammen; dieses mehr-Zell-Modell ist in Abb. 1 dargestellt. Darin steht die zentrale, mit ihrem Zellkörper die Kapillare in vollem Umfang auskleidende und die Permeabilität der BHS regulierende Endothelzelle in enger Verbindung mit zwei anderen Arten von Zellen, den Pericyten und den Astrocyten. Diese Interaktionen stellen einen wichtigen Teil der Mikroumgebung des cerebralen Blutgefäßsystems dar, die eine ganz entscheidende Rolle bei der Ausbildung, Aufrechterhaltung

und Modulation der spezifischen Eigenschaften des cerebralen mikrovaskulären Endothels und somit auch der Physiologie der BHS als Ganzes spielen (vergl. 2.1.4).

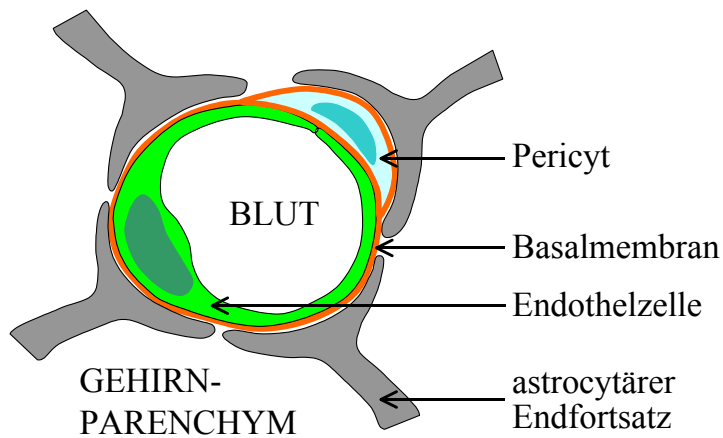


Abb. 1) Schematische Darstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke und der Interaktionen der beteiligten Zellarten

Der Pericyt ist eine phagocytische Zelle, die mit der Endothelzelle eine gemeinsame Basalmembran teilt (Cancilla *et al.* 1972). Bei isolierten cerebralen Kapillaren kommt etwa ein Pericyt auf drei Endothelzellen (Pardridge 1999). Den Pericyten wird oft eine kontraktile Funktion zugeschrieben, und sie gelten gemeinhin als das kapillare Analog der glatten Muskelzellen, die die präkapillaren Arteriolen umgeben. Bei *in vitro*-Kultivierung exprimieren Pericyten tatsächlich α -Aktin, einen Marker für kontraktile Zellen wie glatte Muskelzellen (Herman und D'Amore 1985). Eine α -Aktin-Expression bei Pericyten *in vivo* konnte jedoch bisher sowohl immunhistochemisch als auch auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen werden, so dass eine kontraktile Funktion dieser Zellen *in vivo* unter normalen physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich erscheint (Boado und Pardridge 1994). Letztendlich ist über die Funktion der Pericyten bezüglich ihrer Interaktion mit dem cerebralen Endothel und Modulation der BHS-spezifischen Eigenschaften bis dato wenig bekannt.

Die abluminale Oberfläche der intraparenchymalen Gehirnkapillaren ist zu 99 % mit astrocytären Endfortsätzen besetzt, die rosettenartige Strukturen bilden (Kacem *et al.* 1998). Der Abstand zwischen dem astrocytären Endfortsatz und dem kapillaren Endothel beträgt 20 nm; dieser Raum wird durch die dazwischenliegende Basalmembran ausgefüllt.

Die Basalmembran besteht aus speziellen extrazellulären Matrixproteinen und Proteoglycanen und grenzt direkt an epitheliale und endotheliale Zellschichten an. Der den Zellen zugewandte Teil der Basalmembran wird als *Basallamina* bezeichnet und stellt das Substrat zur Verfügung, an dem diese adhären können. Die Hauptbestandteile der Basallamina sind Typ-IV-Collagen, Laminin und Fibronectin (Timpl 1989). Das Typ-IV-Collagen bildet aufgrund seines besonderen Aufbaus keine Fibrillen aus, sondern verzweigte schichtartige Strukturen. Es liefert aber nicht nur das Gerüst der Basallamina, sondern besitzt auch spezifische Zelladhäsionsstellen (Kühn 1994). Epithel- und Endothelzellen binden an die Matrixproteine Collagen, Laminin und Fibronectin über Rezeptoren aus der Integrin-Familie (Hynes 1992), die spezifische Anheftungssequenz ist *Arg-Gly-Asp* (RGD). Diese Interaktion von Endothel- und Epithelzellen mit den extrazellulären Matrixproteinen ist notwendig, da sie die Morphologie, Polarität, Genexpression und das Überleben dieser Zellen beeinflusst (Hynes 1992, Ruoslathi und Reed 1994). Dies betrifft die cerebralen Endothelzellen in besonderem Maße, da deren Interaktion mit der extrazellulären Matrix für die Ausbildung eines dichten Zellmonolayers und somit auch für die Barrierefunktion der BHS wichtig ist (van Mourik *et al.* 1990).

2.1.3 Eigenschaften und Funktion

Cerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen (*brain capillary endothelial cells*, BCEC) unterscheiden sich grundlegend von Endothelzellen aus peripheren Geweben. Zum einen verfügen sie nur über eine geringe Anzahl von endocytotischen Vesikeln und eine geringe Pinocytoseaktivität, so dass der transzelluläre Stofffluss sehr begrenzt ist. Zum anderen sind sie über spezielle, die Interzellularspalten verschließende *tight junctions* (siehe Abb. 2) eng miteinander verbunden, was wiederum den parazellulären Stofffluss stark limitiert. Die Kombination dieser beiden unterschiedlichen Eigenschaften bildet die BHS, die dadurch eine der stärksten Barrieren im Körper von Wirbeltieren darstellt (Rubin und Staddon 1999).

Die BHS verhindert den Übertritt vom Blutkreislauf in das Gehirn für nahezu alle Moleküle, ausgenommen der kleinen und lipophilen. Eine Reihe kleiner und großer hydrophiler Moleküle können aber in das Gehirn gelangen; dies sind hauptsächlich für den Hirnstoffwechsel essentielle Nährstoffe wie Glucose und bestimmte Aminosäuren, sowie Lactat, Purinbasen, Fettsäuren, Choline, Thyroidhormone und einige wasserlösliche Vitamine (Drewes 1999). Hierfür besitzen die BCEC spezifische Carrier-Systeme, die den transendothelialen Transport dieser Substanzen vom Blutkreislauf in das Gehirn bewirken. Dabei bindet das entsprechende Molekül auf der luminalen Seite der Endothelzelle an Substrat-spezifische membranständige Proteine und dissoziiert nach dem transzellulären Transport an der gegenüberliegenden abluminalen Membran. Darüber hinaus besitzen BCEC noch Transportsysteme für makromolekulare Substanzen und Peptide wie Insulin, Transferrin, Leptin und *Insulin-like growth factor* (IGF); diese werden hauptsächlich durch Rezeptor-vermittelte Transcytose über das cerebrale Endothel transportiert (Pardridge 1999).

Ein weiteres wichtiges Transportersystem der BHS ist das *P-Glycoprotein*, das in relativ hoher Konzentration in den cerebralen Kapillaren zu finden ist. Hierbei handelt es sich um ein im Vergleich zu den oben beschriebenen Transportsystemen in Gegenrichtung wirkendes aktives Efflux-System, das eine Reihe von lipophilen Molekülen, die theoretisch die BHS überwinden könnten, zurück in den Blutstrom befördert und somit deren Eintritt in das Gehirn verhindert. Immunreaktives P-Glycoprotein wurde im Blutgefäßsystem von Hirngewebe (Cordon-Cardo *et al.* 1989) und in isolierten cerebralen Kapillaren (Jette *et al.* 1993) gefunden. Immun-elektronenmikroskopische *in vitro*-Studien zeigten die Anwesenheit von P-Glycoprotein in der luminalen Membran von kultivierten BCEC (Tsuji *et al.* 1992, Biegel *et al.* 1995). Ausgehend von diesen Beobachtungen geht man gemeinhin davon aus, dass das P-Glycoprotein *in vivo* von den Endothelzellen exprimiert wird. Neuere und weiterführende immunocytochemische Studien an isolierten humanen cerebralen Kapillaren zeigten aber, dass das P-Glycoprotein nicht in den Endothelzellen, sondern in den astrocytären Endfortsätzen der abluminalen Oberfläche der Hirnkapillaren lokalisiert war (Golden und Pardridge 1999). Sollten sich diese Ergebnisse

bestätigen, wäre P-Glycoprotein damit ein Beispiel für ein funktionelles Charakteristikum der BHS, das entgegen der bisherigen Annahme nicht den Endothelzellen, sondern dem assoziierten astrocytären Endfortsatz zugeordnet werden müsste.

Wie bereits erwähnt, sind die cerebralen Endothelzellen über epithelartige, die Interzellularspalten verschließende *tight junctions* eng miteinander verbunden, was den parazellulären Stofffluss insbesondere von Wasser, atomaren Ionen und niedermolekularen hydrophilen Molekülen stark einschränkt. Diese Eigenschaft verleiht dem cerebralen Blutgefäßsystem einen hohen transendothelialen elektrischen Widerstand (*transendothelial electrical resistance*, TEER). Direkte Widerstandsmessungen an oberflächlich liegenden mikrovaskulären Blutgefäßen innerhalb der zur Hirnhaut gehörenden *Pia Mater* ergaben einen TEER-Wert von 1000-2000 $\Omega\text{-cm}^2$ (Crone und Olsen 1982, Butt *et al.* 1990); dieser liegt damit um Größenordnungen über dem elektrischen Widerstand von peripheren Kapillaren ($\sim 10 \Omega\text{-cm}^2$). Der TEER der im Hirnparenchym liegenden Kapillaren ist direkt nicht messbar, Schätzungen gehen aber davon aus, dass dieser deutlich über dem der pialen Blutgefäße liegt und bis zu 8000 $\Omega\text{-cm}^2$ beträgt (Smith und Rapoport 1986).

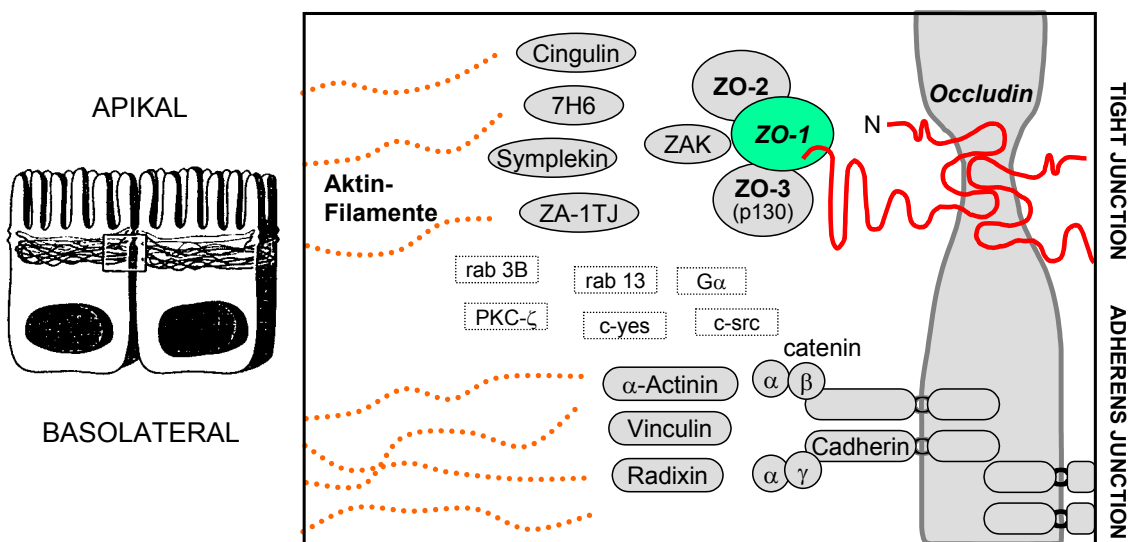


Abb. 2) Schematische Darstellung einer *tight junction* als Teil des *apical junction complex*, der zwei Epithelzellen miteinander verbindet.

Die *tight junctions* des cerebralen Endothels ähneln im molekularen Aufbau weitgehend denen der epithelialen *tight junctions* (Anderson und Van Itallie 1995, Balda und Matter 1998, Mitic

und Anderson 1998). Diese bestehen aus Multiprotein-Komplexen, die an der apikalen Oberfläche ein kontinuierliches um die Epithelzellen und BCEC verlaufendes Band bilden und zusammen mit der *adherens junction* den *apical junction complex* formen (siehe Abb. 2). Mehrere *tight junction*-assoziierte Proteine wurden bisher identifiziert und charakterisiert. Das erste identifizierte *tight junction*-assoziierte Protein war *zonula occludens-1* (ZO-1) (Stevenson *et al.* 1986), obwohl es, abhängig vom Wachstums- und Differenzierungsstadium der Zelle, nicht ausschließlich an den *tight junctions* lokalisiert ist (Gottardi *et al.* 1996, Fanning *et al.* 1998). Weitere ubiquitäre Proteine epithelialer und endothelialer *tight junctions* sind das zu ZO-1 homologe ZO-2, dessen Vorkommen ausschließlich auf die *tight junctions* beschränkt ist. (Jesaitis und Goodenough 1994), sowie ZO-3, welches ebenfalls eine enge Homologie zu ZO-1 zeigt und an dieses bindet (Haskins *et al.* 1998). ZO-1, ZO-2 und ZO-3 gehören aufgrund von Sequenzhomologien zur Proteinfamilie der *membrane-associated guanylate kinase homologues* (MAGUKs), dem beispielsweise auch das Produkt des *Disc-large*-Tumorsuppressorgens (Dlg-A) von *Drosophila* angehört (Willott *et al.* 1993, Jesaitis und Goodenough 1994, Haskins *et al.* 1998). Dies lässt eine Beteiligung dieser *tight junction*-assoziierten Proteine an der Signaltransduktion und Genregulation vermuten.

Die integrale Komponente der *tight junctions* stellt das *Occludin* dar, welches aus vier transmembranen Helices und zwei stark hydrophoben extrazellulären Schleifen besteht (Furuse *et al.* 1993, Ando-Akatsuka *et al.* 1996). Es wird vermutet, dass diese Schleifen mit den gegenüberliegenden Schleifen der Nachbarzelle in Wechselwirkung treten oder sogar in den Lipidbilayer der Nachbarzellmembran eintauchen, so dass der Interzellularspalt dadurch verschlossen würde (siehe Abb. 2). Occludin ist über seinen carboxyterminalen Teil mit ZO-1 und ZO-3 verbunden, und es wird vermutet, dass diese Interaktion für dessen Lokalisierung an der Zellmembran erforderlich ist (Furuse *et al.* 1994, Van Itallie und Anderson 1997, Haskins *et al.* 1998). Die Verbindung von Occludin mit den cytoplasmatischen *tight junction*-assoziierten Proteinen stellt eine Möglichkeit dar, mit der die Barriere-Eigenschaften von *tight junctions* moduliert werden könnten. Es ist gezeigt worden, dass Occludin über ZO-1 mit

Aktin-Filamenten des Cytoskeletts verbunden ist (Fanning *et al.* 1998), und dass das Cytoskelett eine zentrale Rolle bei der Regulation der Permeabilität endothelialer *tight junctions* spielt (Blum *et al.* 1997, Rist *et al.* 1997). Ein weiteres *tight junction*-assoziiertes Protein ist das kürzlich identifizierte *junctional adhesion molecule* (JAM), das ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie ist und entscheidend an der Regulation der transendothelialen Migration (TEM) von Leukocyten beteiligt ist (Martin-Padura *et al.* 1998). Darüber hinaus wurde in Epithelzellen eine Beteiligung von JAM beim Zusammenbau von *tight junctions* gefunden (Liu *et al.* 2000).

Über die Regulation der *tight junctions* cerebraler Endothelzellen und somit auch der Permeabilität der BHS sowie die daran beteiligten Signaltransduktionswege ist bis dato wenig bekannt; die meisten Erkenntnisse zu diesem Themenkomplex wurden in epithelialen Zellsystemen gefunden. Es zeigte sich, dass zwischen der Steuerung der Biogenese oder des Abbaus von *tight junctions* und der Regulation der Permeabilität bereits etablierter *tight junctions* erhebliche Unterschiede existieren, da der erstgenannte Prozess wesentlich komplexer ist und mehrere Signaltransduktionswege und -mediatoren beteiligt sind, so beispielsweise Ca^{2+} und Calmodulin, Protein-Kinasen, G-Proteine, cAMP und Phospholipase C (Denker und Nigam 1998). Eine bedeutende Rolle kommt insbesondere dem extra- und intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel zu: extrazelluläres Ca^{2+} ist für die Ausbildung der *adherens junction* wichtig, die wiederum eine Grundvoraussetzung für die Entstehung von *tight junctions* und Formation des *apical junction complex* darstellt (Gumbiner *et al.* 1988). Die Entfernung von Ca^{2+} aus dem externen Milieu führt sowohl bei Epithelzellen als auch bei cerebralen Endothelzellen zur Auflösung der interzellulären Verbindungen und *tight junctions* sowie zum Verlust der Zellpolarität (D'Angelo Siliciano und Goodenough 1988); dieser Prozess ist durch Rückkehr zu physiologischen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen umkehrbar (Gonzales-Mariscal *et al.* 1990) und kann daher für Studien der *tight junction*-Biogenese eingesetzt werden (Ca^{2+} -Switch-Experimente). Aber auch der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel ist für die *tight junction*-Biogenese von Bedeutung, da die hierfür notwendige Akkumulation und Organisation der

tight junction-Proteine und der Zusammenbau der *tight junctions* Ca^{2+} -Calmodulin-abhängig sind (Stuart *et al.* 1994).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Bildung und Organisation von *tight junctions* spielen Protein-Phosphorylierungsprozesse durch Protein-Kinasen. Hierbei ist insbesondere die Protein-Kinase C (PKC) beteiligt: deren Aktivität erhöht sich in Epithelzellen während der Biogenese von *tight junctions*, und es erfolgt eine Translokation dieses Enzyms zur lateralen Membran und Kollokalisierung mit ZO-1 (Stuart und Nigam 1995). PKC-Inhibitoren stören die Ausbildung niedrigpermeabler Epithelzell-Monolayer (Stuart und Nigam 1995), während PKC-Aktivatoren den gegenteiligen Effekt zeigen (Balda *et al.* 1993). Protein-Kinasen scheinen aber nicht nur beim Aufbau von *tight junctions* beteiligt zu sein, sondern auch bei deren Abbau, da dieser durch Protein-Kinase-Inhibitoren inhibiert werden kann (Citi 1992, Klingler *et al.* 2000).

2.1.4 Mikroumgebung

Wie bereits erwähnt, besitzen BCEC Eigenschaften, die sich erheblich von denen peripherer Endothelzellen unterscheiden. Frühe Gewebe-Transplantationsstudien gaben bereits Hinweise darauf, dass nicht der Ursprung, sondern die Mikroumgebung der Endothelzellen im Gehirn die entscheidende Rolle bei der Ausbildung und Modulation ihrer speziellen Charakteristiken spielt. Hierbei zeigte sich, dass in das Gehirn transplantiertes Darmgewebe von cerebralen Endothelzellen vaskularisiert wurde, die neugebildeten Blutgefäße aber in ihrer geänderten Umgebung für Farbstoffe durchlässig wurden (Stewart und Wiley 1981). Wurde dagegen Hirngewebe in den Darm transplantiert, wurde dieses durch Darm-Endothelzellen vaskularisiert, und die in dieser neuen Umgebung gebildeten Blutgefäße entwickelten die Fähigkeit, Vitalfarbstoffe auszuschließen. Noch deutlicher zeigt sich der Einfluss der Mikroumgebung auf die Eigenschaften der BCEC durch die Beobachtung, dass kapillare Blutgefäße in Hirntumoren eine erhöhte Durchlässigkeit aufweisen, obwohl diese Tumore durch Endothelzellen cerebralen Ursprungs vaskularisiert werden (Stewart 1994).

Die Zellart des Hirnparenchyms, die strukturell den engsten Kontakt mit den cerebralen Kapillaren hat, stellen die Astrocyten dar, deren Endfortsätze den Großteil der basalen Oberfläche der Kapillaren bedecken (vergl. 2.1.2). Aus diesem Grund wurden die Astrocyten bereits früh als die zelluläre Quelle der Faktoren angesehen, die die Ausbildung von BHS-spezifischen Eigenschaften bei Endothelzellen bewirken. Dies wurde zuerst mit aus neonatalem Rattenhirn isolierten und kultivierten Astrocyten gezeigt, die sogar bei Endothelzellen peripheren Ursprungs eine verringerte Permeabilität für große Moleküle zu induzieren vermochten (Jantzer und Raff 1987). Eine Reihe weiterer *in vitro*-Studien zeigten ebenfalls, dass Astrocyten in der Lage sind, verschiedene für die BHS charakteristische Eigenschaften bei cerebralen oder peripheren Endothelzellen zu induzieren, wenn beide Zellarten miteinander kultiviert werden (vergl. 2.3.3.2).

Die einfache Schlussfolgerung, dass Astrocyten *in vivo* die Ausbildung der BHS induzieren, kann allerdings nicht getroffen werden, da eine Reihe von Aspekten und Beobachtungen einem derart simplen Mechanismus widersprechen. So besitzen beispielsweise Kapillaren innerhalb der *Pia Mater* auf der Oberfläche des Gehirns einen für die BHS charakteristischen hohen elektrischen Widerstand (vergl. 2.1.3), obwohl sie nicht oder nur teilweise mit astrocytären Endfortsätzen bedeckt sind (Allt und Lawrenson 1997, Cassella *et al.* 1997). Entwicklungsstudien bei embryonalen Mäusen haben gezeigt, dass der erste Differenzierungsmarker von cerebralen Endothelzellen bereits in einem Entwicklungsstadium auftaucht, bei dem noch keine Astrocyten vorhanden sind (Qin und Sato 1995). Da die cerebralen Endothelzellen während der Entwicklung ihren vollständigen BHS-spezifischen Phänotyp über einen längeren Zeitraum von mehreren Wochen ausbilden (vergl. 2.1.3), könnten möglicherweise mehrere unterschiedliche Faktoren, die auch von nicht-astrocytären Zellen stammen könnten, die Eigenschaften der Endothelzellen im Hirngewebe beeinflussen. So wurden beispielsweise in der Nähe von cerebralen Kapillaren auch Nervenendigungen gefunden, die eine mögliche Quelle solcher Faktoren darstellen könnten (Cohen *et al.* 1997).

Unklar ist außerdem der Einfluss der mit dem cerebralen Blutgefäßsystem assoziierten perivaskulären Mikrogliazellen auf die BHS (vergl. 2.1.5.4).

2.1.5 Die Blut-Hirn-Schranke als Ziel von Cytokinen und ihre Interaktion mit Zellen des Immunsystems

2.1.5.1 Wirkung von Cytokinen auf cerebrale Endothelzellen

Cytokine sind eine heterogene Gruppe parakriner und autokriner regulatorischer Glykoproteine, die ein komplexes Signalnetzwerk bilden. Sie sind sowohl bei der Regulation physiologischer Prozesse der BHS beteiligt, wie beispielsweise ihre Entwicklung und Differenzierung, als auch bei pathophysiologischen Prozessen, wie ihre Reaktion auf traumatische Verletzungen, Infektionen und Entzündungsreaktionen des Gehirns.

Cytokine sind wie andere biologisch aktive Substanzen in der Lage, funktionelle und phänotypische Änderungen des Endothels zu induzieren (Augustin *et al.* 1994). Das ruhende Endothel ist nichtadhesiv, antithrombotisch und fibrinolytisch. Die Einwirkung bestimmter proinflammatorischer Cytokine, wie beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ), Interferon- β (IFN- β), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1), auf das Endothel bewirkt einen Übergang in einen dysfunktionellen beziehungsweise aktivierten Zustand: es wird hyperadhesiv, prothrombotisch und proinflammatorisch (Pober 1988, Pober und Cortan 1990). TNF- α wirkt auf kultivierte Hirnendothelzellen durch Inhibition ihrer DNA-Synthese und induzierten Verlust ihrer Kontaktinhibition direkt toxisch (Yoshida *et al.* 1989).

Im Gehirn erfolgt eine Aktivierung des Endothels hauptsächlich durch die lokale Freisetzung von Cytokinen, wobei verschiedene Quellen möglich sind: Zellen des vaskulären Systems selbst, benachbarte nicht-vaskuläre Zellen des Hirnparenchyms, oder Leukocyten, die an den Ort einer Infektion oder Verletzung angelockt werden (Beneviste 1992). Die lokale Freisetzung von Cytokinen durch Zellen des Immunsystems ist bei vielen pathophysiologischen Zuständen der BHS von Bedeutung.

Proinflammatorische Cytokine steuern die Expression verschiedener Gruppen von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen. Diese können in drei Superfamilien eingeteilt werden: die Selektine, die Immunglobuline und die Integrine. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung von Leukocyten an das cerebrale Endothel und deren Migration durch die BHS (vergl. 2.1.5.5).

In *in vitro*-Studien waren Cytokine wie IL-1, TNF- α und IFN- γ in der Lage, die Expression des *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) bei kultivierten murinen und humanen BCEC hochzuregulieren (Fabry *et al.* 1992, Wong und Dorovini-Zis 1992). TNF- α und IL-1 erhöhten die Expression von E-Selectin in isolierten cerebralen Kapillarfragmenten und primären BCEC-Kulturen (Dore-Duffy *et al.* 1994b). Die Expression des *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) wurde durch die Wirkung von TNF- α und IL-1, aber nicht durch IFN- γ , hochreguliert (Fabry *et al.* 1993, Dore-Duffy *et al.* 1994b).

Darüber hinaus existieren Cytokine, die einer Aktivierung des cerebralen Endothels entgegenwirken, so beispielsweise Interferon- β und *tumor growth factor- β 1* (TGF- β 1). Diese beiden Cytokine haben keine Wirkung auf ruhende Endothelzellen, aber inhibieren die Cytokin-induzierte Aktivierung von Endothelzellen beziehungsweise können diese herunterregulieren (Dore-Duffy *et al.* 1994a, Huynh *et al.* 1995). Offenbar sind beide Cytokine bei der Regulation der Aktivierung des cerebralen Endothels involviert; der Verlust ihrer regulativen Funktion könnte diese Aktivierung aufrechterhalten und/oder das cerebrale Endothel in einen chronisch-inflammatorischen Zustand überführen (Antonelli-Oldridge *et al.* 1989, Dore-Duffy *et al.* 1994a, Huynh *et al.* 1995).

2.1.5.2 Wirkung von Cytokinen auf die Blut-Hirn-Schranke

Sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Studien haben gezeigt, dass Cytokine einen tiefgreifenden Einfluss auf die strukturelle Integrität und/oder Barrierefunktion der BHS ausüben können. Dies beinhaltet das gesamte Spektrum möglicher Störungen der BHS-Funktion, die von einer leichten Änderung der Regulation bestimmter Transportmechanismen bis zu einem

Totalzusammenbruch der BHS mit daraus resultierendem massiven Einfluss von aus den Blut stammenden Elementen in das Hirnparenchym reichen können. Die meisten Erkenntnisse zu diesem Themenkomplex entstammen, neben Untersuchungen pathologischer Gewebe und toxikologischen *in vivo*-Studien, insbesondere aus *in vitro*-Studien an BHS-Zellkultur-Modellen (vergl. 2.3.2), wobei sich die Ergebnisse aus *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten gelegentlich widersprechen.

In einigen Studien verursachten die Cytokine IL-1 und TNF- α im Tierversuch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität im Zentralnervensystem (Saukkonen *et al.* 1990, Quagliarello *et al.* 1991), während eine andere Studie zeigte, dass TNF- α *in vivo* die Permeabilität der BHS verringern kann (Saija *et al.* 1995).

In *in vitro*-BHS-Modellen bewirkten die Cytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 eine deutliche, durch Bestimmung des TEER (vergl. 2.1.3) (de Vries *et al.* 1996, Blum *et al.* 1997) oder mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen (Mark und Miller 1999) nachweisbare Erhöhung der Permeabilität der damit behandelten BCEC-Monolayer. Dabei erfolgte eine 50%ige Verringerung des TEER bereits innerhalb von 60 min nach Zugabe der Cytokine. Es ist unwahrscheinlich, dass solch eine schnelle Änderung der Permeabilität durch eine Induktion der Proteinsynthese bewirkt wurde, sondern eher auf einer direkten Modulation von Zell-Zell-Verbindungen und der *tight junctions* beruhte.

In einem vergleichbaren System verursachte IFN- γ eine Erhöhung der Permeabilität von primären humanen BCEC-Monolayern (Huynh und Dorovini-Zis 1993). Eine längere Einwirkzeit des IFN- γ auf die BCEC über mehrere Tage bewirkte nachhaltige morphologische Änderungen mit einhergehendem Verlust der organisierten Struktur des Cytoskeletts und der Kontaktinhibition. Dies unterstützt die These, dass durch Cytokine verursachte ultrastrukturelle Veränderungen in den BCEC deren vaskuläre Permeabilität erhöht (Blum *et al.* 1997). In einer weiterführenden Studie konnte gezeigt werden, dass IFN- β antagonistisch auf die IFN- γ -induzierte Struktur- und Permeabilitätsänderung der BCEC wirkt (Huynh *et al.* 1995).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IFN- α 2b die Barriereeigenschaften retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen verstärken kann (Gillies und Su 1995). Es ist nach wie vor unklar, ob andere Cytokine wie z.B. TGF- β 1, die bekanntlich eine endotheliale Aktivierung herunterregulieren (vergl. 2.1.5.1), auch die vaskuläre Permeabilität wiederherstellen können. Eine direkte Korrelation zwischen der Aktivierung von BCEC und ihrer vaskulären Permeabilität konnte jedenfalls bisher nicht gezeigt werden.

2.1.5.3 Monocyten/Makrophagen als Teil des Immunsystems

Monocyten/Makrophagen (MO/MAC) gehören zu den mononukleären Phagocyten, die zusammen mit den Granulocyten die wichtigsten Effektorzellen des unspezifischen Immunsystems darstellen. Beide Zelltypen leiten sich von den gleichen Progenitorzellen aus dem Knochenmark ab, die als myeloische Stammzellen bezeichnet werden. Diese leiten sich wiederum, zusammen mit den lymphatischen Stammzellen, von pluripotenten Stammzellen ab (van Furth *et al.* 1972).

MO/MAC haben eine Lebenszeit von mehreren Monaten bis Jahren; solange sie in der Blutbahn verbleiben, werden sie als Monocyten bezeichnet (Lasser 1983). Diese zirkulieren für etwa ein bis drei Tage im Blut und migrieren dann in verschiedene Organe und Gewebesysteme, wo sie zu Makrophagen ausreifen (*terminale Differenzierung*, van Furth und Cohn 1968). Terminal differenzierte Makrophagen sind beispielsweise Alveolarmakrophagen (Lunge), Osteoclasten (Knochen), Kupffer'sche Sternzellen (Leber), Peritonealmakrophagen (Bauchhöhle) sowie die Mikrogliazellen im Gehirn (vergl. 2.1.5.4) (van Furth 1982).

MO/MAC sind in der Lage, in den Körper eingedrungene Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Protozoen) durch Phagozytose aufzunehmen, was als unspezifische Immunabwehr bezeichnet wird (Argyris 1968). Die aufgenommenen Fremdkörper werden anschließend in einem als Antigenprozessierung bezeichneten Prozess intrazellulär abgebaut und Antigenbruchstücke aus 8-24 Aminosäuren in Assoziation mit MHC-I- oder MHC-II-Molekülen an der Zelloberfläche den T-Lymphocyten „präsentiert“, wodurch diese aktiviert und die spezifische Immunantwort eingeleitet wird (Bamford 1972, Birmingham *et al.* 1982).

Makrophagen existieren in drei verschiedenen Zuständen: ruhend, aktiviert und hyperaktiviert. Der Übergang von einem Stadium zum anderen wird von einer Vielzahl verschiedener Stimuli induziert. Im nicht entzündeten Gewebe ist eine Aufgabe von ruhenden Makrophagen die Beseitigung gealterter oder geschädigter körpereigener Zellen beziehungsweise deren Bestandteile. Sie produzieren aber auch eine Vielzahl löslicher Faktoren, die für die Kommunikation und Koordination innerhalb des Immunsystems wichtig sind (Levy 1996). Ruhende Makrophagen werden von Interferon- γ (IFN- γ) und anderen Cytokinen, Hormonen, Entzündungsmediatoren und verschiedenen exogenen Substanzen aktiviert; aktivierte Makrophagen werden wiederum durch den Kontakt mit bakteriellen Zellwandbestandteilen wie beispielsweise *Lipopolysaccharid* (LPS) oder anderer Stimuli in einen hyperaktivierten Zustand überführt (Allison 1978). Hyperaktivierte Makrophagen unterscheiden sich morphologisch, biochemisch und funktionell von ruhenden und aktivierten Makrophagen; sie sind größer, haben einen erhöhten Metabolismus, zeigen eine gesteigerte cytotoxische Aktivität und weisen einen erhöhten Phagocytoseumsatz auf (Andreesen *et al.* 1983a, Murray und Nathan 1999).

2.1.5.4 Mikroglia

Mikrogliazellen stellen einen Anteil von ca. 10 % an der gesamten glialen Zellpopulation des Zentralnervensystems (Vaughan und Peters 1974) und sind im überwiegenden Maße im Hirnparenchym in der grauen und weißen Substanz lokalisiert (Lawson *et al.* 1990). Die parenchymalen Mikrogliazellen werden aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie als *verzweigte Mikroglia* bezeichnet. Ein spezialisierter Typ von Mikroglia steht dagegen in engem Kontakt mit den cerebralen Blutgefäßen, weshalb sie als *perivaskuläre Mikroglia* bezeichnet werden (Graeber *et al.* 1989).

Mikrogliazellen teilen viele phänotypische Marker und Eigenschaften mit hämatogenen Makrophagen, was eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Zelltypen schwierig macht (Stoll und Jander 1999). Dies führte bereits früh zu der Vermutung, dass Mikrogliazellen von monocytären Vorläuferzellen des Blutkreislaufs abstammen und somit hämatogenen Ursprungs sind (Ling und Wong 1993). Dies wird aber mittlerweile kontrovers diskutiert, wobei sich

herauskristallisiert, dass diesbezüglich zwischen den beiden verschiedenen Mikroglia Typen differenziert werden muss. Die parenchymalen verzweigten Mikrogliazellen des adulten Zentralnervensystems stellen eine extrem sessile Zellpopulation dar, die praktisch keinen Umsatz von zirkulierenden monocytären Vorläuferzellen aufweisen (Lawson *et al.* 1992, Lassmann *et al.* 1993). Die Hypothese, dass diese Zellpopulation von hämatogenen monocytären Zellen abstammen, die während der prä- oder postnatalen Entwicklungsphase in das Zentralnervensystem migrieren, konnte bislang ebenfalls nicht bestätigt werden (de Groot *et al.* 1992). Weitere Studien deuten darauf hin, dass die parenchymalen verzweigten Mikrogliazellen wie andere Gliazellen neuroektodermalen Ursprungs sind (Richardson *et al.* 1993, Fedoroff *et al.* 1997).

Für den zweiten Mikroglia Typ, die perivaskuläre Mikroglia, konnte hingegen gezeigt werden, dass diese Zellpopulation kontinuierlich vom Knochenmark ersetzt wird und somit hämatopoetischen Ursprungs ist (Hickey und Kimura 1988, Hickey *et al.* 1992, Lassmann *et al.* 1993, Gehrman *et al.* 1995), so dass sie häufig auch als perivaskuläre Makrophagen bezeichnet werden. Perivaskuläre Mikrogliazellen exprimieren konstitutiv immunogene Aktivierungsmarker wie CD4 und MHC-II (Stoll und Jander 1999).

Mikroglia reagieren sehr schnell auf die verschiedensten pathophysiologischen Veränderungen des Zentralnervensystems und werden dadurch in einen aktivierten Zustand überführt, der durch Änderungen ihrer Morphologie, Phagozytoseaktivität, Proliferation und der verstärkten Expression von Oberflächenmolekülen charakterisiert ist. Ein relativ frühes Zeichen einer mikroglialen Aktivierung ist die Hochregulation von MHC-I- und MHC-II-Antigen auf ihrer Oberfläche, die ihnen die direkte Interaktion mit immunkompetenten Zellen ermöglicht (Hickey und Kimura 1988). In bestimmten Fällen exprimieren aktivierte Mikroglia auch CD4-Antigen (Perry und Gordon 1987). Sämtliche für aktivierte Mikroglia charakteristischen Marker sind auch bei aktivierten Monocyten/Makrophagen vorhanden, was eine Unterscheidung zwischen residenten Mikrogliazellen und invasiven hämatogenen Makrophagen bei den krankhaften Veränderungen des Zentralnervensystems schwierig macht, bei denen beide Zelltypen involviert

sind. Ähnlich den Makrophagen produzieren aktivierte Mikrogliazellen eine Vielzahl von potentiell gefährlichen löslichen Faktoren, wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Derivate, proteolytische Enzyme, sowie eine Reihe von proinflammatorischen und potentiell cytotoxischen Cytokinen wie TNF- α und IL-1 (Banati *et al.* 1993, Renno *et al.* 1995, Chabot *et al.* 1997).

2.1.5.5 Interaktion von Immunzellen mit der Blut-Hirn-Schranke

Das Zentralnervensystem wird als immunprivilegiert angesehen, also als ein Organ, das der normalen Überwachung des Immunsystems entzogen ist. Unter physiologischen Bedingungen beschränkt die BHS den Zugang von Komponenten des Immunsystems in das Kompartiment des Zentralnervensystems in erheblichem Maße. Der Transport von Immunglobulinen wird durch sie kontrolliert, und die negative Ladung auf der Oberfläche der Hirnendothelzellen weist die in der Blutbahn zirkulierenden Leukocyten ab. Die entweder völlige Abwesenheit oder allenfalls geringfügige Expression von an der Adhäsion und Transmigration von Immunzellen beteiligten Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Hirnendothelzellen sowie die Struktur der extrazellulären Matrix reduziert erheblich den Übertritt von Leukocyten aus der Blutbahn in das Hirnparenchym (Brosnan *et al.* 1992, Carson und Sutcliffe 1999).

Die durch Einwirkung proinflammatorischer Cytokine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der luminalen Oberfläche des Endothels (vergl. 2.1.5.1) und deren Interaktion mit den entsprechenden Liganden auf der Oberfläche von Leukocyten erleichtert und verstärkt deren Anheftung an die mikrovaskuläre Blutgefäßwand und letztendlich auch deren Migration (Male *et al.* 1990, Bevilacqua 1993, McCarron *et al.* 1993, Carlos und Harlan 1994). Hierbei handelt es sich um einen mehrstufigen Vorgang, in den mehrere Adhäsionsmoleküle aus unterschiedlichen Familien involviert sind (Butcher 1991, Ley 1995). Der initiale Schritt ist die leichte Anheftung und das daran anschließende „rolling“ der Leukocyten entlang der luminalen Oberfläche der aktivierten Endothelzellen; dieser Prozess wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen der *Selectin*-Familie an der Zelloberfläche vermittelt. Die P-Selectine werden nach Kontakt der Endothelzellen mit Mediatoren einer

akuten Entzündungsreaktion (wie beispielsweise Thrombin oder Histamin) sehr schnell exprimiert, während die E-Selectine erst nach Induktion durch Cytokine wie IL-1 und TNF exprimiert werden (Springer 1994). Die anschließende feste Anheftung der Leukocyten an die Endothelzelle wird durch Aktivierung von Adhäsionsmolekülen aus der Integrin-Familie, wie beispielsweise das *lymphocyte function associated antigen* (LFA-1) und MAC-1, vermittelt, die mit Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie wie das *intercellular adhesion molecule*- (ICAM-)1 und ICAM-2 interagieren. Aktivierte Lymphocyten exprimieren auch das *very late activation antigen*-4 (VLA-4), das mit dem *vascular cell adhesion molecule*-1 (VCAM-1) auf der Endothelzelle wechselwirkt. Der letzte Schritt in diesem Prozess ist die Migration der Leukocyten durch die Blutgefäßwand, bei dem die Integrine eine zentrale Rolle spielen (Springer 1994, Weller *et al.* 1996).

2.2 Die Blut-Hirn-Schranke bei AIDS

Das humane Immundefizienzvirus (HIV), zuerst isoliert von Barré-Sinoussi *et al.* (1983), wird als ätiologisches Agens der Immunschwächekrankheit AIDS angesehen (CDC 1985). Eine der Hauptzielzellen von HIV stellen die Helfer-T-Lymphocyten dar, die auf ihrer Zelloberfläche das für das HI-Virus als primärer Rezeptor dienende CD4-Antigen tragen (Levy *et al.* 1984). Monocyten/Makrophagen exprimieren ebenfalls das CD4-Molekül auf ihrer Oberfläche und können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit HIV infiziert werden (Gartner *et al.* 1986, Nicholson *et al.* 1986, Kühnel *et al.* 1989, Perno *et al.* 1989, v. Briesen *et al.* 1990). Darüber hinaus existieren spezifische Chemokin-Rezeptoren, die bei der Bindung von HIV an die Zielzelle in Kombination mit CD4 als Korezeptoren dienen, nämlich die *CC-Chemokin-Rezeptoren* (CCR)-2b, CCR-3, CCR-5 und der *CXC-Chemokin-Rezeptor* (CXCR)-4 (Alkhatib *et al.* 1996, Deng *et al.* 1996, Doranz *et al.* 1996, Dragic *et al.* 1996, Endres *et al.* 1996).

Bei AIDS-Kranken treten häufig neurologische Störungen und Krankheiten auf, was als AIDS-Demenz bezeichnet wird (*AIDS dementia complex*, ADC). Bis zu 30 % der adulten AIDS-Patienten und die Hälfte der AIDS-kranken Kinder sind von dieser Symptomatik betroffen

(Navia *et al.* 1986, Brew *et al.* 1995). Der ADC ist durch eine direkte HIV-Infektion des Gehirns gekennzeichnet, die als HIV-Encephalitis bezeichnet wird und mit der Ausbildung von mikroglialen Knötchen im cerebralen Parenchym verbunden ist. Diese stellen somit ein charakteristisches neuropathologisches Merkmal der HIV-Encephalitis dar (Nottet und Gendelman 1995). Die HIV-Encephalitis kann als die am stärksten korrelierende pathologische Manifestation der AIDS-Demenz angesehen werden, wobei gelegentlich auch ADC-symptomatische AIDS-Patienten ohne HIV-Encephalitis beziehungsweise der umgekehrte Fall vorkommen (Koenig *et al.* 1986, Wiley und Achim 1994).

Bereits zu einem verhältnismäßig frühen Zeitpunkt einer akuten HIV-Infektion können sowohl von HIV stammendes Protein und genetisches Material als auch HIV-spezifische Antikörper im Gehirn und in der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) betroffener Individuen nachgewiesen werden. Im Hirngewebe AIDS-kranker Individuen finden sich darüber hinaus die für eine HIV-Infektion charakteristischen multinukleären Riesenzellen (Ho *et al.* 1985, Goudsmit *et al.* 1986, Petitto *et al.* 1986, Sharer 1992). Das HI-Virus kann zudem aus der CSF isoliert und in Kultur genommen werden (Chiodi *et al.* 1986, v. Briesen *et al.* 1987).

Subkortikale Regionen, und hierbei besonders die Basalganglien und die cerebrale weiße Substanz, sind die Gebiete des Gehirns, die von einer HIV-Encephalitis hauptsächlich betroffen sind (Berger und Nath 1997). Die produktive HIV-Infektion beschränkt sich dabei auf die in das Gehirn eingewanderten hämatogenen Makrophagen und hirnparenchymalen Mikrogliazellen, während diese für neuroektodermale Zellen (Neuronen, Astrocyten, Oligodendrocyten) *in vivo* bisher nicht gezeigt werden konnte (Koenig *et al.* 1986, Wiley *et al.* 1986, Vazeux *et al.* 1987). Deshalb ist eine der führenden Hypothesen, dass die Schädigung des Gehirns bei HIV-Encephalitis mit der neurotoxischen Wirkung HIV-infizierter oder aktivierter Monocyten/Makrophagen und Mikrogliazellen zusammenhängt (Price *et al.* 1988, Chiodi und Fenyo 1991, Achim und Wiley 1996, Giulian *et al.* 1996). HIV-infizierte Makrophagen und Mikrogliazellen produzieren in hohem Ausmaß Neurotoxine, wobei zusätzlich zur HIV-Infektion noch eine sekundäre Immun-Stimulation beziehungsweise Aktivierung erfolgen muss

(Genis *et al.* 1992, Nottet und Gendelman 1995); diese sekundäre Stimulation kann durch Cytokine erfolgen, die von T-Lymphocyten, aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen oder Astrocyten sezerniert werden (Yoshioka *et al.* 1995, Smits *et al.* 2000). HIV-spezifische Proteine wirken aber auch auf direktem Weg und stimulieren die Produktion neurotoxischer Substanzen: so induzieren beispielsweise *tat*, *gp41*, *gp120* und *gp160* die Produktion von Stickstoffmonoxyd in Mikrogliazellen, Makrophagen und Astrocyten (Bukrinsky *et al.* 1995, Adamson *et al.* 1996, Kong *et al.* 1996, Polazzi *et al.* 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *tat* und *gp120* eine unmittelbare neurotoxische Wirkung besitzen (Brenneman *et al.* 1988, Dreyer *et al.* 1990, Sabatier *et al.* 1991).

Trotz des frühen Eintritts von HIV in das Zentralnervensystem zeigen sich neurologische Manifestationen in Form des ADC erst relativ spät im Verlauf der Erkrankung. Dies könnte auf supprimierende endogene Faktoren hindeuten, die beispielsweise von Astrocyten produziert werden (Nottet und Gendelman 1995) und entweder die schnelle Ausbreitung von HIV im Zentralnervensystem und/oder die Neurotoxin-Produktion von HIV-infizierten Makrophagen unterdrücken (Nottet *et al.* 1997). Darüber hinaus wurde in AIDS-Patienten mit ADC eine im Vergleich zu AIDS-Patienten ohne neurologische Symptome einzigartige Monocyten/Makrophagen-Subpopulation gefunden, die für hirnparenchymale Zellen toxische Faktoren produziert (Pulliam *et al.* 1997). Diese Zellen könnten zu einem späteren Zeitpunkt der HIV-Infektion in das Gehirn migrieren, neurale Zellen toxischen Faktoren aussetzen und damit die Entwicklung des ADC begünstigen.

Es ist nach wie vor unklar, ob HIV das cerebrale Endothel *in vivo* direkt infiziert. Falls dies der Fall ist, könnte solch eine Infektion nicht nur der Weg sein, auf dem HIV in das Gehirn gelangt, sondern es könnte dadurch auch die endothelialen Eigenschaften und somit letztlich die Integrität der BHS beeinflussen. Hinweise für solch eine direkte Infektion ergeben sich daraus, dass *in vitro*-Kulturen primärer humaner Hirnendothelzellen zumindest schwach mit HIV infizierbar sind (Moses *et al.* 1993, Poland *et al.* 1995) sowie durch das Vorhandensein einer produktiven endothelialen Infektion bei tierischer retroviraler Encephalitis, einschließlich der

bei Affen durch SIV (*simian immunodeficiency virus*) verursachten Encephalitis (Pitts *et al.* 1987, Mankowski *et al.* 1994). Es sprechen allerdings auch mehrere Fakten gegen eine signifikante Infektion des cerebralen Endothels durch HIV *in vivo*. Diese konnte bisher nur in einer Studie gezeigt werden (Bagasra *et al.* 1996), während andere Studien diese nicht nachweisen konnten (Wiley *et al.* 1986, Gosztonyi *et al.* 1994, Nottet *et al.* 1996, Takahashi *et al.* 1996). Im Gehirn von asymptomatischen HIV-Infizierten konnte eine HIV-Infektion des Endothels bisher nicht nachgewiesen werden, so dass diese wohl, wenn überhaupt, erst zu einem eher späten Zeitpunkt der HIV-Infektion nach Beginn der symptomatischen Phase erfolgt. Wenn HIV-infizierte Zellen im Endothel gefunden wurden, so sprachen Anhaltspunkte dafür, dass dies eher infizierte, die Blutgefäßwand passierende Monocyten und keine HIV-infizierten Endothelzellen waren (Smith *et al.* 1990b) (Falangola *et al.* 1995).

Diese Ergebnisse sowie die Beobachtung, dass im Zentralnervensystem HIV-infizierter Individuen eine selektive Lokalisation und produktive Replikation des HI-Virus innerhalb infiltrierter hämatogener Makrophagen und residenter Mikroglia erfolgt, lassen es am wahrscheinlichsten erscheinen, dass das HI-Virus innerhalb infizierter hämatogener Monocyten/Makrophagen, die aus dem Blutstrom in das Gehirn einwandern, Zugang zu dem Zentralnervensystem findet (*trojan horse theory*) (Peluso *et al.* 1985, Kure *et al.* 1990, Nottet 1999).

Bei SIV- oder HIV-Encephalitis ist die Expression des Zelladhäsionsmoleküls VCAM (vergl. 2.1.5.5) beim cerebralen Endothel selektiv gesteigert, und bei der HIV-Encephalitis ist zusätzlich die E-Selectin-Expression erhöht (Sasseville *et al.* 1994, Nottet *et al.* 1996). HIV-infizierte Makrophagen sind darüber hinaus, im Gegensatz zu uninfizierten Makrophagen, in der Lage, *in vitro* die E-Selectin-Expression bei primären humanen BCEC zu induzieren (Nottet *et al.* 1997). Da diese beiden Liganden wichtige Modulatoren der Monocyten/Makrophagen-Endothelzell-Adhäsion und -Migration sind, könnten HIV-infizierte Makrophagen gegenüber uninfizierten Makrophagen einen selektiven Vorteil beim Eintritt in das Hirngewebe besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass der Grad der Infiltration von Makrophagen in das Gehirn mit

dem Auftreten einer HIV-Encephalitis besser korreliert als mit der Menge von HIV im Hirngewebe (Glass *et al.* 1995). In *in vitro*-Studien wurde allerdings keine verstärkte Migration von HIV-infizierten Makrophagen durch BCEC-Monolayer im Vergleich zu uninfizierten Makrophagen nachgewiesen, diese erfolgte erst nach proinflammatorischer Stimulation der Makrophagen (Persidsky und Gendelman 1997a, Persidsky *et al.* 1997b). Dies deutet darauf hin, dass nicht die HIV-Infektion *per se*, sondern erst eine immunogene Aktivierung der Makrophagen deren Migration durch das cerebrale Endothel begünstigt.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bei HIV-Encephalitis die Expression einer Reihe von Chemokinen und deren Rezeptoren im Gehirn erhöht ist. Im Hirngewebe von Patienten mit HIV-Encephalitis konnte eine erhöhte Expression von Makrophagen-inflammatorischem Protein (*macrophage inflammatory protein*, MIP)-1 α und MIP-1 β mRNA in Mikrogliazellen und Astrocyten gezeigt werden (Schmidtmayerova *et al.* 1996). Immuncytochemische *post mortem*-Studien wiesen die verstärkte Expression der β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , Monocyten-chemotaktisches Protein (*monocyte chemotactic protein*, MCP)-1 und RANTES im Hirngewebe von Patienten mit HIV-Encephalitis im Vergleich zu Patienten ohne HIV-Encephalitis nach (Sanders *et al.* 1998). Dabei konzentrierte sich deren verstärkte Expression hauptsächlich innerhalb der für die HIV-Encephalitis charakteristischen mikroglialen Knötchen. Im Gehirn AIDS-kranker Patienten mit HIV-Encephalitis konnte eine verstärkte Expression der Chemokin-Rezeptoren und HIV-Korezeptoren CXCR-4 und CCR-5 in den verschiedensten Zelltypen nachgewiesen werden (Lavi *et al.* 1997, Vallat *et al.* 1998). Eine weiterführende Studie zeigte die verstärkte Expression sämtlicher Chemokin-Rezeptoren (CCR-1, CCR-3, CCR-5 und CXCR-4) im Hirngewebe bei Vorhandensein einer HIV-Encephalitis; diese konzentrierte sich wiederum hauptsächlich auf die mikroglialen Knötchen (Sanders *et al.* 1998). Bemerkenswert war dabei das besonders ausgeprägte Vorhandensein von CXCR-4 auf hirnparenchymalen Makrophagen und Mikrogliazellen, da es sich bei CXCR-4 um einen Korezeptor lymphotropischer HIV-1-Stämme handelt und die im Gehirn von AIDS-Patienten vorherrschenden makrophagotropischen HIV-1-Stämme CCR-3 und CCR-5 als Korezeptor

benutzen (Alkhatib *et al.* 1996, He *et al.* 1997). Dies lässt vermuten, dass durch die Überexpression von Chemokinen und deren Rezeptoren im von HIV-Encephalitis betroffenen Gehirn die virale Ausbreitung nicht direkt verstärkt wird, sondern die Rekrutierung und Anlockung von Makrophagen und Mikrogliazellen zu den infizierten und entzündeten Hirnregionen bewirkt wird. Bei diesem Prozess könnte auch die BHS selbst involviert sein: *in vitro* konnte mit Hilfe eines Kokultursystems gezeigt werden, dass die Interaktion von HIV-infizierten Makrophagen mit cerebralen Hirnendothelzellen zu einer verstärkten Expression von IL-1 β in den Endothelzellen führte, und diese induzierte wiederum die Expression der Chemokine MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES in beiden Zellsystemen (Boven *et al.* 2000).

Veränderungen der mikrovaskulären Blutgefäße des Gehirns wurden im Zusammenhang mit der Neuropathologie von AIDS bereits früh beschrieben. Diese Änderungen beinhalten endotheliale Hypertrophie oder Hyperplasie (Smith *et al.* 1990b), die Ansammlung von hämatogenen Makrophagen in perivaskulären Räumen (Gelman *et al.* 1992) sowie die verstärkte Expression von Laminin in der Basalmembran und Hypertrophie der astrocytären Endfortsätze (Taruscio *et al.* 1991). Bei HIV-Infizierten zeigen sich zum Teil erhebliche Störungen der Barriere-Funktion der BHS. Untersuchungen der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) zeigten eine Erhöhung des CSF:Serum-Verhältnisses von Albumin bei HIV-infizierten Patienten (McArthur *et al.* 1992, Singer *et al.* 1994). Diese Erhöhung war bei Patienten mit ausgebildetem AIDS im Vergleich zu asymptomatischen HIV-Infizierten stärker ausgeprägt. Außerdem war das erhöhte CSF:Serum-Verhältnis von Albumin bei AIDS-Patienten mit neurologischen Symptomen größer als bei AIDS-Patienten, die keine neurologischen Symptome zeigten (Singer *et al.* 1994). Obwohl diese Studien eine gestörte Barrierefunktion der BHS bei AIDS nahe legen, sind sie letztendlich kein endgültiger Beweis dieser These, da das erhöhte Albumin-CSF:Serum-Verhältnis nicht nur durch eine erhöhte Permeabilität der intraparenchymalen Kapillaren der BHS, sondern auch durch eine Permeabilitätssteigerung von Blutgefäßen anderer Regionen (beispielsweise der Hirnhaut oder des *Choroid plexus*) herrühren kann.

Überzeugender sind *post mortem*-Studien, in denen eine erhöhte Permeabilität der BHS bei AIDS-Patienten durch den immunocytochemischen Nachweis von Serumproteinen im Hirnparenchym gezeigt wurde (Lenhardt und Wiley 1989, Petito und Cash 1992, Power *et al.* 1993). Dabei konnte bei AIDS-symptomatischen HIV-Infizierten eine signifikante Erhöhung von Serumproteinen im Hirnparenchym im Vergleich zu asymptomatischen HIV-Infizierten und uninfizierten Individuen nachgewiesen werden, es waren aber keine eindeutigen Unterschiede zwischen AIDS-Patienten ohne und AIDS-Patienten mit ausgeprägter Encephalitis vorhanden.

Mit Hilfe der MRI (*magnetic resonance imaging*) konnte in *in vivo*-Studien bei Patienten mit mittel bis schwer ausgeprägter ADC eine im Vergleich zu asymptomatischen beziehungsweise leicht ADC-symptomatischen Individuen verstärkte Ansammlung von Kontrastmittel im Gehirn nachgewiesen werden, was ebenfalls auf eine erhöhte Permeabilität der BHS hindeutet (Berger *et al.* 2000). Diese beschränkte sich allerdings auf die Basalganglien, also einer der Hirnregionen, die von einer HIV-Encephalitis hauptsächlich betroffen sind.

Immunhistochemische *post mortem*-Studien zeigten bei Individuen mit HIV-Encephalitis eine veränderte Expression und Verteilung der *tight junction*-Proteine Occludin und ZO-1 (vergl. 2.1.3), was auf eine Störung der *tight junctions* cerebraler Blutgefäße und dadurch bedingte erhöhte Permeabilität der BHS hindeutet (Dallasta *et al.* 1999). Diese Veränderungen waren mit den histopathologischen Merkmalen der HIV-Encephalitis assoziiert und konnten wiederum bei HIV-Infizierten ohne vorhandene HIV-Encephalitis nicht nachgewiesen werden.

Über den Mechanismus, der im Gehirn von AIDS-Patienten zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität führt, kann bislang nur spekuliert werden. Im Serum enthaltene Cytokine, insbesondere TNF- α und IL-1, stehen im Verdacht, die erhöhte Permeabilität der BHS bei AIDS zu verursachen oder zumindest zu begünstigen (Petito und Cash 1992, Power *et al.* 1993). Der Spiegel dieser Cytokine ist im Serum von AIDS-Patienten erhöht (Lahdevirta *et al.* 1988, Gallo *et al.* 1989, Mintz *et al.* 1989, Grunfeld *et al.* 1991), und beide Cytokine zeigen eine erhebliche Wirkung auf cerebrale Endothelzellen und die Permeabilität der BHS (vergl. 2.1.5.1 und 2.1.5.2). Zusätzlich üben Cytokine einen komplexen Einfluss auf Immunzellen, Astrocyten

und Mikroglia aus, was zu einer indirekten Beeinflussung der BHS führen könnte. Bei HIV-infizierten Individuen werden die Cytokine TNF- α , IFN- γ , IL-1 und IL-6 sowohl von cerebralen Endothelzellen als auch innerhalb des Hirnparenchyms verstärkt produziert, und dies in besonderem Maße, wenn eine Entzündung und HIV-Encephalitis vorhanden sind (Tyor *et al.* 1992, Wesselingh *et al.* 1997). Als primäre Quelle dieser Cytokine wurden dabei in das Gehirn eingewanderte hämatogene Makrophagen sowie die residenten Mikrogliazellen identifiziert. In einer *in vitro*-Studie führte der direkte Zell-Zell-Kontakt von Hirnendothelzell-Monolayern mit HIV-infizierten Makrophagen im Vergleich zu uninfizierten Makrophagen zu einer erhöhten Permeabilität (Dhawan *et al.* 1995).

Virale Proteine des HI-Virus, insbesondere *gp120* und *tat*, werden als weitere mögliche Ursache für die erhöhte vaskuläre Permeabilität im Gehirn von AIDS-Patienten diskutiert. Deren Serum-Spiegel steigt in der Frühphase der HIV-Infektion kurzzeitig an und erhöht sich wieder parallel zur Ausbildung und Schwere von AIDS (Cao *et al.* 1987). Es gibt Hinweise darauf, dass HIV und HIV-Proteine das cerebrale Endothel beeinflussen können; radioaktiv markiertes *gp120* beziehungsweise dessen Teile zeigten sich in der Lage, die BHS zu überwinden, und konnten 1 h nach deren subkutanen Injektion im Hirnparenchym von Ratten nachgewiesen werden (Hill *et al.* 1993). In einer *in vitro*-Studie führte die Inkubation von primären Ratten-BCEC-Monolayern mit rekombinantem *gp120* in einer Konzentration, die der im Serum von AIDS-Patienten entsprach, zu einer deutlichen Erhöhung deren Permeabilität (Annunziata *et al.* 1998). Das *tat*-Protein scheint nicht in der Lage zu sein, die BHS zu überwinden, wird aber vom Endothel des gesamten Körpers und somit auch von Hirnendothelzellen aufgenommen (Fawell *et al.* 1994), wo es, wie in anderen bisher untersuchten Zellsystemen auch, in der Lage ist, deren zelluläre Funktionen zu beeinflussen (Magnuson *et al.* 1995). *Tat* aktivierte Hirnendothelzellen *in vitro* und erhöhte deren Expression von E-Selektin, IL-6 und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (Hofman *et al.* 1993, Hofman *et al.* 1994).

Systemische Veränderungen des Gehirns selbst könnten ebenfalls für die erhöhte Durchlässigkeit der BHS bei AIDS verantwortlich sein, so beispielsweise Abnormalitäten bei

den hirnparenchymalen Astrocyten, die, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der BHS spielen (vergl. 2.1.4). Eine direkte HIV-Infektion von Astrocyten *in vivo* ist umstritten (Kure *et al.* 1990, Ranki *et al.* 1995, Achim und Wiley 1996), aber eine indirekte Beeinträchtigung dieser Zellpopulation könnte entweder durch von HIV-infizierten und/oder aktivierten Makrophagen oder Mikrogliazellen freigesetzten Faktoren oder viralen Proteinen erfolgen (Nottet 1999). Ein durch apoptotische Mechanismen ausgelöster Zelltod bei Astrocyten ist mit dem Auftreten und der Schwere der HIV-Encephalitis assoziiert (Petito und Roberts 1995, Shi *et al.* 1996). HIV-Proteine, besonders *gp120*, verändern den normalen Metabolismus und die funktionellen Eigenschaften von kultivierten Astrocyten, wie beispielsweise den Ionentransport (Benos *et al.* 1994), die GFAP-Expression (Pulliam *et al.* 1993) und die β -adrenerge Regulation (Levi *et al.* 1993).

2.3 Die Erforschung der Blut-Hirn-Schranke

2.3.1 Einführung

Bis Ende der 1960er erfolgte die Erforschung der BHS *in vivo* zunächst mit Hilfe von Vitalfarbstoffen wie beispielsweise Trypanblau, deren Körperverteilung nach deren Administration in die Blutbahn bestimmt wurde (Pardridge 1999). Diese Methodik wurde durch die Verwendung des Enzyms Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) verfeinert, deren Anreicherung im Hirngewebe nach ihrer Administration durch Peroxidase-Histochemie auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene visualisiert werden konnte. In den 1970ern erfolgte die zunehmende Verbreitung von Radioisotopen, die durch Bestimmung des *Brain-Uptake-Index* (BUI) oder *Brain-Efflux-Index* (BEI) auch eine quantitative Untersuchung der BHS-Permeabilität für unterschiedliche radioaktiv markierte Substanzen erlaubte. Mitte der 1970er wurden Techniken zur Isolierung von mikrovaskulären Blutgefäßen aus dem Hirngewebe entwickelt, die erstmals *in vitro*-Studien der BHS ermöglichten. Die entweder mit mechanischen oder enzymatischen Homogenisierungstechniken isolierten intakten cerebralen

KapillargefäÙe konnten für Rezeptor-Studien, immuncytochemische und *patch clamp*-Untersuchungen verwendet werden. Weiterhin dienten sie als Quelle für angereicherte Präparationen von luminalen oder abluminalen endothelialen Membranvesikeln. Es zeigte sich aber, dass diese isolierten cerebralen Kapillaren metabolisch beeinträchtigt waren, sehr niedrige ATP-Spiegel aufwiesen und Vital-Farbstoffe wie Trypanblau nicht ausschlossen (Lasbennes und Gayet 1984). Diese Beschränkung sowie der Wunsch nach weiterführenden Studien der BHS-Physiologie führte zur Entwicklung von Methoden und Techniken, primäre BCEC *in vitro* zu kultivieren und für Zellkulturmodelle der BHS zu verwenden (DeBault *et al.* 1979, Bowman *et al.* 1983), was im folgenden eingehender betrachtet wird (vergl. 2.3.2). In den 1990ern ermöglichte schließlich die Entwicklung Target-spezifischer Antikörper und cDNAs biochemische und molekularbiologische Untersuchungen der Expression BHS-spezifischer Proteine. Hierzu ist allerdings ebenfalls die Isolierung von cerebralen Kapillarfragmenten aus dem Hirngewebe erforderlich, da der Anteil der Endothelzellen an der Gesamtzellmasse des Gehirns nur 0,2 % beträgt und somit BHS-spezifische molekularbiologische Studien an aus Gesamthirn-Extrakten gewonnener mRNA nicht möglich sind.

2.3.2 *In vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Systeme

In vitro-Systeme spielen eine wichtige Rolle bei der Erforschung der biochemischen und physiologischen Eigenschaften der BHS. Insbesondere die Entwicklung von Zellkultursystemen mit isolierten primären BCEC ergab ein einfaches und flexibles experimentelles System, um die biochemischen, molekularen und physiologischen Eigenschaften der BHS unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen *in vitro* zu untersuchen (Dehouck *et al.* 1990, Lathera und Goldstein 1993, Dehouck *et al.* 1995). Hierbei werden unterschiedliche Arten von Zellkultursystemen verwendet: reine BCEC-Primärkulturen, BCEC-Gliazellen-Kokultursysteme und Zelllinien. Jedes dieser *in vitro*-Systeme besitzt prinzipielle Vor- und Nachteile, die im folgenden näher erläutert sind.

Primärkulturen von BCEC bilden konfluente Monolayer, die viele der morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften, die für die BHS *in vivo* charakteristisch sind, beibehalten (Audus und Borchardt 1986, 1987, Miller *et al.* 1992) und funktionell polarisiert sind (Raub und Audus 1990, Borges *et al.* 1994, Wang *et al.* 1996). In konventionellen Kulturgefäßen (Zellkulturplatten oder -flaschen) kultivierte BCEC sind für die Untersuchung der Rezeptor- oder Transporter-vermittelten Stoffaufnahme sowie der Genexpression der für das BHS-Endothel spezifischen Proteine brauchbar. BCEC-Monolayer, die auf permeablen Trägermaterialien (zum Beispiel mikroporöse Polycarbonat-Membranen, Transwell®-Systeme) kultiviert werden, sind besonders dann nützlich, wenn der transzelluläre Transport von Substanzen und die Permeabilitäts-Charakteristiken von BCEC-Monolayern studiert werden sollen, da dieses System den Zugang zu sowohl der luminalen als auch der abluminalen Seite der BCEC-Monolayer ermöglicht (Audus und Borchardt 1991). Dies erlaubt Untersuchungen zu polarisierten Transportsystemen, Rezeptoren und Enzymen sowie anderen asymmetrisch verteilten Eigenschaften, die die Natur der BHS ausmachen.

Die Einschränkung primärer BCEC-Kulturen besteht darin, dass ihre parazelluläre Permeabilität in der Regel höher ist als *in vivo*, da die Ausbildung der intrazellulären *tight junctions* (vergl. 2.1.3) nur unvollständig erfolgt (vergl. 2.3.3). Außerdem durchlaufen die BCEC in der Zellkultur einen gewissen Entdifferenzierungsprozess, der zu einer Herunterregulation von BHS-spezifischen Proteinen wie beispielsweise dem Glucose-Transporter führt (Boado und Pardridge 1990) und besonders nach Passage der Zellen und längerer Kultivierung auftritt. Da in dem BCEC-Primärkultursystem viele der für die *in vivo*-Situation charakteristischen Umgebungseinflüsse (wie beispielsweise astrocytäre oder neuronale Faktoren, die zylindrische Geometrie der Kapillaren, Blutdruck und -fluss, Blut-spezifische Faktoren und Blutzellen, vergl. 2.1.4) fehlen, muss man davon ausgehen, dass die Funktionen und Differenzierung der BCEC *in vitro* nicht mit denen *in vivo* identisch sind (Joo 1985, Reardon und Audus 1993).

Ein prinzipieller Nachteil bei der Verwendung von nur-BCEC-Primärkultursystemen, nämlich das Fehlen des für die Ausbildung der BHS-spezifischen Eigenschaften des cerebralen

Endothels wichtigen astrocytären Einflusses (vergl. 2.1.4), kann durch die Verwendung eines Astrocyten-BCEC-Kokultursystems reduziert werden, da dieses eher der *in vivo*-Situation entspricht. Dies kann auf unterschiedliche Weise realisiert werden, nämlich mit oder ohne direkten Kontakt der Astrocyten mit den BCEC. In einem direkt-Kontakt-Kokultursystem wachsen die BCEC entweder direkt auf dem Astrocyten-Layer, oder die BCEC werden auf der einen Seite einer porösen Kunststoff- oder dünnen Collagen-Membran und die Astrocyten auf der anderen Seite kultiviert (DeBault 1981, Tao-Cheng *et al.* 1987). In einem indirekt-Kontakt-Kokultursystem wachsen die Astrocyten auf dem Boden der Zellkulturplatte, während sich die BCEC auf einer darüber liegenden mikroporösen Membran eines Einsatzes (z.B. Transwell®-Insert) befinden. In diesem indirekt-Kontakt-Kokultursystem ist ein direkter physischer Kontakt zwischen den beiden Zelltypen nicht möglich, aber von den Astrocyten sezernierte Faktoren können durch das Kulturmedium kontinuierlich auf die BCEC einwirken (Rubin *et al.* 1991, Raub *et al.* 1992).

Der Vorteil der Astrocyten-Kokultur ist die Integration des Einflusses der Astrocyten auf die kultivierten BCEC, was die Eigenschaften des *in vitro*-BHS-Modells verbessert und dadurch die *in vivo*-BHS bezüglich ihrer strukturellen, metabolischen, physiologischen und Permeabilitäts-Charakteristiken besser simuliert wird (Jantzer und Raff 1987, Tao-Cheng *et al.* 1987, Tontsch und Bauer 1991, Joo 1992, 1993), besonders bei der Verwendung von passagierten beziehungsweise subkultivierten BCEC (Raub *et al.* 1992). Als Alternative für die Benutzung von primären Astrocyten bei den Kokultur-Systemen bietet sich aufgrund ihrer einfacheren Handhabbarkeit und besseren Verfügbarkeit der Einsatz von astrocytären beziehungsweise glialen Zelllinien an. Insbesondere die aus der Ratte stammende Glioblastom-Zelllinie C6 findet hierbei oft Verwendung, da diese Zellen *in vitro* einen mit primären Astrocyten vergleichbaren Effekt auf die BCEC ausüben (DeBault und Cancilla 1980, Rubin *et al.* 1991, Raub *et al.* 1992, Raub 1996) (vergl. 2.3.3.2).

Erfolge wurden auch bei der Etablierung von kontinuierlichen Zelllinien aus transformierten BCEC erzielt, die einige der für das BHS-Endothel spezifischen Eigenschaften beibehalten

haben und bei einem *in vitro*-BHS-Modell als Ersatz für primäre BCEC Verwendung finden können. Durch das Rous-Sarcoma-Virus (RSV) transformierte Ratten-BCEC zeigten erhöhte Spiegel der BHS-spezifischen γ -Glutamyl-Transpeptidase (Diglio *et al.* 1983, Caspers und Diglio 1984). RBE4-Zellen, kloniert von Ratten-BCEC, die mit einem das E1A-Adenovirus-Gen enthaltenden Plasmid transfiziert wurden, zeigen einen untransformierten Phänotyp, exprimieren typische endotheliale Marker und sind empfänglich für astrogliale, die Expression der BHS-spezifischen Enzyme γ -Glutamyl-Transpeptidase und alkalische Phosphatase beeinflussende Faktoren (Roux *et al.* 1994). Daneben existieren noch eine Reihe weiterer, aus bovinen, murinen oder humanen BCEC gewonnene Zelllinien-Systeme (Robinson *et al.* 1986, Durieu-Trautmann *et al.* 1991, Muruganandam *et al.* 1997).

Aufgrund ihrer einfacheren Handhabbarkeit und fast unbegrenzten Verfügbarkeit stellen immortalisierte BCEC-Zelllinien eine interessante Alternative zur Verwendung primärer BCEC dar, die nur mit Hilfe einer komplizierten und zeitaufwendigen Prozedur aus dem Hirnmaterial zu gewinnen sind und nur für eine sehr begrenzte Zeit verwendet werden können, so dass ihre Isolierung regelmäßig wiederholt werden muss. Andererseits sind die meisten immortalisierten BCEC-Zelllinien für die Verwendung in einem *in vitro*-BHS-Modell nur bedingt tauglich, da sie in der Regel jeweils nur einige bestimmte der für das cerebrale Endothel spezifischen Merkmale aufweisen, während andere oft völlig fehlen. Die betrifft insbesondere die oft fehlende oder unvollständige Kontaktinhibition sowie die unvollständige Ausbildung der intrazellulären *tight junctions*, so dass die Permeabilität von Monolayern immortalisierter BCEC-Zelllinien in der Regel deutlich über der von primären BCEC liegt und damit die Barriere-Eigenschaften der BHS *in vivo* bei Verwendung solcher Zelllinien nur unzureichend simuliert wird.

2.3.3 Einfluss externer Faktoren auf die spezifischen Eigenschaften eines *in vitro*-BHS-Systems

2.3.3.1 Problematik der *in vitro*-Kultivierung primärer BCEC

In vitro verlieren BCEC ihre BHS-spezifischen Eigenschaften, die sie *in vivo* besessen haben, im Verlauf der Kultivierung in zunehmendem Maße. Dies beinhaltet unter anderem die reduzierte Ausbildung und Komplexität der *tight junctions* (Tao-Cheng *et al.* 1987) mit daraus resultierendem niedrigem transendothelialen elektrischen Widerstand (*transendothelial electrical resistance*, TEER) und erhöhter parazellulärer Permeabilität für Makromoleküle (Rubin *et al.* 1991), den Verlust von Marker-Enzymen wie beispielsweise die alkalische Phosphatase (AP) und γ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT) (Meyer *et al.* 1990) und den Verlust spezifischer Transportersysteme wie das Glucose-Transporter-System 1 (GLUT1) (Hemmila und Drewes 1993). Offensichtlich fehlen den BCEC *in vitro* wichtige, *in vivo* aus dem Hirnparenchym stammende Signale beziehungsweise Faktoren, damit sie ihren differenzierten BHS-spezifischen Phänotyp beibehalten. Folglich ist es bei der Arbeit mit primären BCEC das vorrangige Ziel, diese Faktoren und Signale zu identifizieren, in das BCEC-Zellkultursystem zu integrieren und dadurch Kulturbedingungen zu schaffen, die die *in vivo*-Situation am besten simulieren. Da die cerebralen Kapillaren *in vivo* komplett mit astrocytären Endfortsätzen besetzt sind (vergl. 2.1.2) und die Astrocyten als wichtige Modulatoren der BHS-spezifischen Eigenschaften der BCEC gelten, konzentriert sich die Forschung auf die astrocytären Signale, die kultivierte BCEC im Hinblick auf ihren BHS-spezifischen Phänotyp beeinflussen könnten. Es ist aber nach wie vor unklar und wird sehr kontrovers diskutiert, ob diese Signale in Form löslicher Moleküle, membrangebunden oder als Teil der extrazellulären Matrix existieren. Darüber hinaus gibt es eine Reihe exogener unphysiologischer Faktoren, die durch Beeinflussung bestimmter Signaltransduktionswege der BCEC ihre BHS-spezifischen Eigenschaften beeinflussen können.

2.3.3.2 Einfluss glialer Faktoren auf die BHS-spezifischen Eigenschaften kultivierter BCEC

Im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung verlieren die BCEC in zunehmendem Maße das komplexe *tight junctions*-Netzwerk, das sie im lebenden Organismus wie ein gürtelartiges, kontinuierliches Band umgibt und zahlreiche Verzweigungspunkte aufweist. Bei subkultivierten BCEC konnten diese Strukturen in elektronenmikroskopischen Gefrierbruchstudien nicht mehr gefunden werden, sondern nur noch fragmentartige Überreste (Tao-Cheng *et al.* 1987). Säte man die subkultivierten BCEC hingegen auf einen konfluenten Rasen primärer Astrocyten aus, bildeten die BCEC wieder *tight junctions* aus, deren Länge, Weite und Komplexität deutlich erhöht war. Diese Beobachtung konnte in vergleichbaren Studien bestätigt werden. Aber auch ohne direkten Zell-Zell-Kontakt sind Astrocyten in einem indirekt-Kontakt-Kokultur-System mittels sezernierter Faktoren in der Lage, die Komplexität von *tight junctions* bei BCEC zu erhöhen (Wolburg *et al.* 1994).

Als wesentlich aussagekräftigere Alternative zu der elektronenmikroskopischen Untersuchung von *tight junctions* ist die Bestimmung des TEER und der parazellulären Permeabilität von Makromolekülen bei BCEC-Monolayern. Zum einen korrelieren diese beiden Parameter direkt mit der vollständigen Ausbildung von *tight junctions* und somit der „Dichtigkeit“ eines BCEC-Monolayers, zum anderen sind sie einfach und direkt zu bestimmen, so dass die Auswirkung von Kulturbedingungen und externen Faktoren auf die BCEC unmittelbar demonstriert werden kann.

Vielfach ist bereits eine Erhöhung des TEER boviner BCEC-Monolayer unter astrocytärem Einfluss gezeigt worden: bei subkultivierten BCEC auf Filtereinsätzen, die entweder mit primären Rattenastrocyten kokultiviert (Dehouck *et al.* 1990) oder in Astrocyten-konditioniertem Medium (ACM) kultiviert wurden (Rubin *et al.* 1991), sowie bei primären BCEC-Kulturen, die entweder mit Astrocyten oder in ACM (ko-)kultiviert wurden (Neuhaus *et al.* 1991, Wolburg *et al.* 1994). In anderen Experimenten wurden keine primären Astrocyten, sondern kontinuierliche Zelllinien glialen Ursprungs verwendet; C6-Glioma- und Astrocytoma-

konditioniertes Medium bewirkte hierbei ebenfalls eine deutliche Erhöhung des TEER der darin kultivierten primären bovinen BCEC (Raub *et al.* 1992). Auch die Kokultur von BCEC-Monolayern mit der Glioma-Zelllinie C6 führte wie die Kokultur mit primären Astrocyten zu einer deutlichen Erhöhung des TEER (DeBault und Cancilla 1980, Rubin *et al.* 1991, Raub *et al.* 1992, Raub 1996). Offensichtlich sezernieren bestimmte Zelllinien glialen Ursprungs die gleichen, die Ausbildung der *tight junctions* und die Permeabilität von BCEC beeinflussende Faktoren wie primäre Astrocyten.

Ein hoher TEER von BCEC-Monolayern ist mit einer niedrigen Permeabilität für hydrophile makromolekulare Substanzen verbunden. Die verschiedensten, sich im Molekulargewicht und somit auch ihrer Größe voneinander unterscheidenden Verbindungen wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, einen postkonfluenten BCEC-Monolayer zu überwinden. Entsprechend der mit Hilfe der TEER-Messung gefundenen Ergebnisse zeigte sich auch hierbei, dass sich die parazelluläre Permeabilität von BCEC-Monolayern für beispielsweise Inulin, Sucrose, Polyethylenglykol oder Dextran bei Kultivierung in Astrocyten- beziehungsweise C6-Glioma-konditioniertem Medium oder bei Kokultur mit primären Astrocyten beziehungsweise C6 deutlich verringerte (Neuhaus *et al.* 1991, Raub *et al.* 1992, Wolburg *et al.* 1994, Raub 1996).

Neben der Ausbildung von *tight junctions* und der parazellulären Permeabilität moduliert ein glialer Einfluss noch weitere BHS-spezifische Eigenschaften von kultivierten BCEC, so beispielsweise die Expression der Enzyme alkalische Phosphatase (AP) und γ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT). Obwohl es sich hierbei um keine exklusiven Marker für das cerebrale Endothel handelt, zeigen diese Enzyme *in vivo* in BCEC eine besonders hohe Aktivität. In Kultur verlieren BCEC ihre AP- und GGT-Aktivitäten dagegen schnell, da die *de novo*-Synthese dieser Enzyme eingestellt wird (Meyer *et al.* 1990).

Es wurden viele Versuche durchgeführt, diese Enzymaktivitäten bei BCEC *in vitro* zu reinduzieren. Der direkte Zell-Zell-Kontakt mit primären Astrocyten (Dehouck *et al.* 1990) beziehungsweise der Kontakt mit C6-Glioma-Plasmamembranen oder den C6-Zellen selbst (Bauer *et al.* 1990) bewirkte bei klonierten bovinen BCEC eine beträchtliche Erhöhung ihrer

GGT-Aktivität. Von Neuronen gewonnene Plasmamembranen stellten sich dabei als genauso effizient wie C6-Plasmamembranen heraus (Tontsch und Bauer 1991), was wiederum die Frage aufwirft, ob nicht nur Astrocyten, sondern auch Neuronen bei der Aufrechterhaltung der BHS *in vivo* eine Rolle spielen (vergl. 2.1.4). Auch bei primären BCEC porcinen Ursprungs führte ein direkter Zell-Zell-Kontakt mit primären Astrocyten oder C6-Glioma-Zellen zu einer Reinduktion deren AP- beziehungsweise GGT-Aktivitäten auf ein Niveau, das dem frisch isolierter BCEC entsprach (Meyer *et al.* 1991, Rauh *et al.* 1992).

Umstritten ist nach wie vor die Frage, ob ein direkter Kontakt der BCEC mit Plasmamembranen primärer Astrocyten oder C6-Glioma-Zellen beziehungsweise den Zellen selbst für eine Reinduktion der AP- und GGT-Aktivitäten *in vitro* notwendig ist. In den oben aufgeführten Studien konnte mit Astrocyten- beziehungsweise C6-konditioniertem Medium keine derartige Reinduktion bewirkt werden, während andere Forschergruppen dies durchaus erreichten (Raub *et al.* 1992). In weiteren Studien konnte mit Hilfe von Astrocyten- beziehungsweise Glioma-Zelllinien-konditioniertem Medium eine Reinduktion der AP- und GGT-Aktivität sogar bei immortalisierten Ratten-BCEC (Roux *et al.* 1994) sowie Endothelzellen nicht-cerebralen Ursprungs, wie beispielsweise humane venöse Nabelschnur-Endothelzellen (*human umbilical cord vein endothelial cells*, HUVEC) (Tio *et al.* 1990) und bovinen pulmonaren Arterien-Endothelzellen (Takemoto *et al.* 1994), erreicht werden.

2.3.3.3 Einfluss exogener unphysiologischer Faktoren auf die BHS-spezifischen Eigenschaften kultivierter BCEC

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Höhe des intrazellulären cAMP-Spiegels der BCEC eine zentrale Schlüsselfunktion bei der Ausbildung ihrer BHS-spezifischen Eigenschaften einnimmt. Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels in lebenden Zellen kann prinzipiell auf mehreren Wegen erreicht werden: durch Zugabe von exogenem cAMP, durch Aktivierung des Enzyms Adenylat-Cyclase mit daraus resultierender verstärkter Produktion von endogenem cAMP, und durch Inhibition der Phosphodiesterase, so dass der Abbau von endogenem cAMP reduziert wird.

Ein zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels häufig verwendetes Reagenz ist der Adenylat-Cyclase-Aktivator *Forskolin*, ein aus *Coleus forskohlii* stammendes Diterpenoid (vergl. 3.4.6.1). Zur Inhibition des Abbaus endogenen cAMPs existieren eine Reihe von spezifischen Phosphodiesterase-Inhibitoren, wie beispielsweise RO 20-1724 (vergl. 3.3.2.3) oder *3-Isobutyl-1-Methyloxanthin* (IBMX).

In elektronenmikroskopischen Studien konnte nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Zugabe von Forskolin zu kultivierten BCEC eine gesteigerte *tight junction*-Komplexität, die mit der von frisch isolierten Hirnkapillaren vergleichbar war, gezeigt werden (Wolburg *et al.* 1994). Diese Beobachtung korrespondiert mit dem bereits vielfach gefundenem Ergebnis, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Zugabe von exogenem cAMP, Aktivierung der Adenylat-Cyclase und/oder Inhibition der Phosphodiesterase eine Steigerung des TEER beziehungsweise Verringerung der parazellulären Permeabilität für Makromoleküle bei den so behandelten BCEC-Monolayern zur Folge hat (Rubin *et al.* 1991, Deli *et al.* 1995, Raub 1996, Rist *et al.* 1997). Durch Zugabe von exogenem cAMP konnte bei kultivierten primären BCEC auch die AP-Aktivität wieder auf das Niveau frisch isolierter Zellen reinduziert werden (Beuckmann *et al.* 1995), und dies ohne die Anwesenheit anderer induzierender Zellen (vergl. 2.3.3.2). Obwohl der TEER beziehungsweise die parazelluläre Permeabilität und die AP-Expression zwei unterschiedliche BHS-spezifische Eigenschaften der BCEC darstellen, liegt ihnen also offensichtlich ein gemeinsamer regulativer Mechanismus zugrunde, der den *second messenger* cAMP beinhaltet.

Da sowohl die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels wie auch der direkte oder indirekte Kontakt der BCEC mit Astrocyten beziehungsweise Zellen glialen Ursprungs (vergl. 2.3.3.2) zu einer Aufrechterhaltung oder Reinduktion ihrer BHS-spezifischen Eigenschaften führt, legt dies den Verdacht nahe, dass der gliale Einfluss auf die BCEC über einen Signaltransduktionsweg führt, bei dem die Adenylat-Cyclase und/oder der *second messenger* cAMP involviert sind. Die bisherigen Erkenntnisse sprechen allerdings gegen diese Hypothese. Zum einen wirken beide Effekte additiv: die Aktivierung der Adenylat-Cyclase durch exogene Zugabe

unphysiologischer Reagenzien wie beispielsweise Forskolin führt auch bei mit Astrocyten beziehungsweise C6-Glioma-Zellen kokultivierten BCEC zu einer zusätzlichen Steigerung des TEER (Rubin *et al.* 1991, Wolburg *et al.* 1994, Raub 1996, Hurst und Clark 1998); dies wäre nicht der Fall, wenn die Adenylat-Cyclase bereits über einen anderen Mechanismus aktiviert wäre. Außerdem konnte bisher kein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels von BCEC durch den glialen Einfluss gezeigt werden (Rubin *et al.* 1991, Raub 1996).

2.4 Methoden zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke in der pharmakologischen Forschung

Die Existenz der BHS stellt die pharmakologische Forschung vor besondere Herausforderungen bei der Entwicklung von Arzneimitteln, die ihre Wirkung im zentralen Kompartiment entfalten sollen. Zahlreiche therapeutisch wirksame Agenzien sind aufgrund ihres hydrophilen Charakters *per se* nicht in der Lage, die BHS zu überwinden, andere werden durch aktive Efflux-Mechanismen der BHS am Übertritt aus der Blutbahn in das Gehirn gehindert (Tamai und Tsuji 1996)(vergl. 2.1.3). Dies erfordert die Entwicklung von Strategien, Arzneistoffe gezielt in das Gehirn zu bringen (*brain targeting*). Hierbei führten bereits einige Ansätze zum Erfolg, wie beispielsweise die Modifizierung von Arzneistoffen, die osmotische Öffnung des cerebralen Gefäßsystems oder alternative Administrationsformen (intracerebrale Injektion) (Tamargo und Brem 1992). Zunehmend konzentriert sich die pharmakologische Forschung darauf, die spezifischen Transportsysteme der BHS (vergl. 2.1.3) für das *brain targeting* von Arzneistoffen zu nutzen, so beispielsweise den spezifischen Carrier-vermittelten Transport (Pardridge 1995, Begley 1996) oder die adsorptiv-vermittelte Endocytose von neuropharmazeutischen Peptiden (Tamai und Tsuji 1996, Tamai *et al.* 1997). Erfolgsversprechend ist auch die Nutzung der spezifischen Rezeptor-vermittelten Transcytosesysteme der BHS, wie beispielsweise die auf der luminalen Oberfläche der BCEC in hohen Konzentrationen vorhandenen Transferrin- und Insulin-Rezeptoren. Gegen den Transferrin-Rezeptor gerichtete monoklonale Antikörper werden durch Transcytose über die BHS transportiert und konnten erfolgreich als Vehikel für daran

gebundene Peptide verwendet werden (Saito *et al.* 1995). Insulin-Fragmente konnten ebenfalls erfolgreich als Träger für den Transport von Peptiden über die BHS genutzt werden (Fukuta *et al.* 1994).

Supramolekulare Träger, wie beispielsweise Liposomen oder Nanopartikel, stellen ebenfalls potentiell geeignete Systeme für den Transport von darin eingeschlossenen Arzneistoffen in das Gehirn dar, können aber aufgrund ihrer Größe die BHS nicht ohne weiteres überwinden. Die Nutzung spezifischer Transportsysteme der BHS stellt auch hierbei eine Möglichkeit für das *brain targeting* dieser Trägersysteme dar, wie die Verwendung von gegen das Transferrin-Transcytose-System gerichteten Immunliposomen zeigen konnte (Huwyler *et al.* 1996). Einfacher in der Herstellung und Handhabung sind allerdings *Polybutylcyanoacrylat*-(PBCA-)Nanopartikel, die mit dem nichtionischen Tensid Polysorbat 80 (PS 80) überzogen sind. Nanopartikel sind kolloidale Partikel, deren Größe im Bereich von 10 bis 1000 nm liegt und die in der Lage sind, Substanzen entweder an der Oberfläche adsorptiv zu binden oder in ihr Inneres zu inkorporieren (Kreuter 1983, Allemann *et al.* 1993). Darüber hinaus können ihre Eigenschaften bezüglich Körperverteilung und -zirkulation durch Modifikation ihrer Oberfläche, wie beispielsweise dem Überzug mit bestimmten Detergenzien, verändert werden (Tröster *et al.* 1990). PS 80-gecoatete PBCA-Nanopartikel konnten erfolgreich als Trägersysteme für das *brain targeting* verschiedener Arzneistoffe verwendet werden, so beispielsweise für den Transport des antinozizeptiv wirkenden Leu-Enkephalin-Analogs *Dalargin* in das Gehirn (Alyautdin *et al.* 1995, Kreuter *et al.* 1995, Kreuter *et al.* 1997).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Materialien, Reagenzien und Geräte

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Komplett-Zellkulturmedien

BCEC-Medium # 1	DMEM (BioWhittaker, 4,5 g Glucose/l) + 2 % L-Glutamin 200 mM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % NEAA (<i>non-essential amino acids</i>) + 1 % Natrium-Pyruvat 100 mM + 10 % Fötale Kälberserum (FCS) + 2 % Retinafaktor (RF)
BCEC-Medium # 2	DMEM/HAM's F-12 (Sigma D-6421) + 2 % L-Glutamin 200 mM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Natrium-Pyruvat 100 mM + 10 % Fötale Kälberserum (FCS) + 2 % Retinafaktor (RF)
BCEC-Medium # 3	M199 (Sigma M-7528) + 2 % L-Glutamin 200 mM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Natrium-Pyruvat 100 mM + 10 % humanes AB-Serum + 2 % Retinafaktor (RF)
Serum-freies BCEC-Medium (BCEC-SFM)	Basal serum-free endothel medium, Life Technologies (GibcoBRL 11111-044) + 1 % Penicillin/Streptomycin + 2 % Retinafaktor
Zelllinien-Medium	DMEM (BioWhittaker, 4,5 g Glucose/l) + 2 % L-Glutamin 200 mM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % NEAA (<i>non-essential amino acids</i>) + 10 % Fötale Kälberserum (FCS)
Makrophagen-Medium	RPMI 1640 (Seromed, Biochrom KG F-1295) + 2 % L-Glutamin 200 mM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % NEAA (<i>non-essential amino acids</i>) + 1 % Vitamin-Mix + 1 % Natrium-Pyruvat 100 mM + 4 % humanes AB-Serum

3.1.1.2 Medienzusätze

L-Glutamin 200 mM	Life Technologies (GibcoBRL 25030-024)
MEM NEAA (<i>non-essential amino acids</i>)	Life Technologies (GibcoBRL 11140-035)
Natrium-Pyruvat 100 mM	Life Technologies (GibcoBRL 11360-039)
Penicillin/Streptomycin 100×	Life Technologies (GibcoBRL 10378-016)
Vitamin-Lösung MEM 100×	Life Technologies (GibcoBRL 11120-037)
fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)	Boehringer, Hitze-inaktiviert (45 min bei 56 °)
humanes AB-Serum	Sigma H-4522, Hitze-inaktiviert (45 min bei 56 °) und steril filtriert (0,45 µm)

3.1.1.3 Enzyme, Cytokine und Mitogene

Collagenase	Collagenase II (CLS II), Biochrom KG C2-22
Collagenase/Dispase	Boehringer 269-638, 1 mg/ml (w/v) in PBS (0,1 U/ml Collagenase, 0,8 U/ml Dispase)
Dispase (neutrale Protease)	Sigma P-3417, 10 U/ml in PBS + 25 mM HEPES, steril filtriert (0,45 µm)
DNase I	Boehringer 0154-695, 0,1 U/ml in un-supplementiertem DMEM
<i>high purity</i> -Collagenase Typ VII	Sigma C-0773, 500 U/ml in PBS
GM-CSF	PromoCell C-60420
IL-4	PromoCell C-61410
LPS	Dr. Galanos, MPI Freiburg (aus <i>Salmonella abortus equi</i> , Stammlösung 1 mg/ml)
M-CSF	Cetus Corporation
TNF- α	Boehringer 1088-939

3.1.1.4 Adhäsionsfaktoren

Collagen Typ IV	Sigma C-5533, in 0,25 % (v/v) Essigsäure (0,5 mg/ml (w/v)) gelöst und steril filtriert (0,45 µm); zum Coaten von Kulturgefäßen erfolgte eine 1:5-Verdünnung (v/v) mit PBS (Endkonzentration 0,1 mg/ml)
Collagen Typ I	Collagen G, Biochrom KG L-7213
Fibronectin	Biochrom KG L-7127
Laminin-Like Engineered Protein Polymer	Sigma LLEPP
RGD-ECM	Boehringer BMS 4427

3.1.1.5 Zelllinien

C6 (Ratten-Glioblastom-Zelllinie)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ)
CACO-2 (humane intestitielle Epithelzelllinie)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ)
ECV304 (humane Nabelschnur-Endothelzelllinie)	European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)
MDCK (<i>Madin-Darby canine kidney cells</i> , canine Nieren-Epithelzelllinie)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ)
MRC-5 (humane Fibroblasten-Zelllinie)	European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)

3.1.2 Signaltransduktions-Reagenzien

Forskolin	ICN Biomedicals
H-7	Biomol EI-148
H-8	Biomol EI-158
OAG	Biomol DG-125
RO 20-1724	Biomol EI-117
U-73122	Biomol ST-391
W-7	Biomol CA-320

3.1.3 sonstige Reagenzien

¹⁴ C-Sucrose (672 mCi/mmol)	ICN 111-37-50
Bovines Serum-Albumin (BSA, Fraktion V)	Boehringer 735-108, gelöst in PBS (25 % (w/v)) und steril filtriert (0,45 µm)
Cytochalasin B	Sigma C-6767, Stammlösung 500 µg/ml (w/v) in PBS
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i> , PBS)	PAA Laboratories
Ethanol	Roth GmbH & Co. KG
Ficoll (spezifische Dichte 1,077 g/ml)	Biochrom KG L-6115
HEPES 1 M	Life Technologies (GibcoBRL 15630-056)
Methanol	Roth GmbH & Co. KG
Paraformaldehyd	Roth GmbH & Co. KG
Percoll (spezifische Dichte 1,124 g/ml)	Biochrom KG L-6145
Trypsin/EDTA 1×	Life Technologies (GibcoBRL 25300-054)

3.1.4 Kulturgefäße und Gebrauchsmaterial

50 ml-Röhrchen	Falcon [®] , BD Biosciences
Einmal-Skalpelle	Swann-Morton
Fibronectin-gecoatete Zellkulturplatten	Biocoat [®] , BD Biosciences
Steril-Filter 0,22 µm	Millicell GP, 0,22 µm
Steril-Filter 0,45 µm	Millicell Sterivex-HV, 0,45 µm
Transwell [®] -Einsätze (Inserts) für 12-well Zellkulturplatten (Ø 12 mm, Porengröße 3 µm)	Costar [®] TW-3402, Corning Life Sciences
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturplatten (verschiedene Formate)	Costar [®] (6-well: 3516, 12-well: 3513, 24-well: 3526), Corning Life Sciences
Zellsieb (<i>cell strainer</i>), 40 µm Maschenweite	Falcon [®] , BD Biosciences

3.1.5 Geräte

Brutschrank	Cytoperm, Heraeus Instruments GmbH
Flüssig-Szintillationszähler	Packard TriCarb 1500
Kammer-Ringelektrode	EndOhm [®] -12, World Precision Instruments
Rotationsschüttler mit Inkubator	Edmund Bühler KS-15
Ultrazentrifuge	Beckmann Avanti (mit Festwinkelrotor JA-12)
Widerstands-Messgerät	MilliCell [®] ERS, Millipore
Zellkultur-Zentrifuge	Minifuge RF (mit Freischwingrotor 5000), Heraeus Instruments GmbH

3.2 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung boviner und humaner mikrovaskulärer Hirnendothelzellen und Zelllinien

3.2.1 Isolierung von mikrovaskulären Kapillarfragmenten aus bovinem und humanem Hirnmaterial

3.2.1.1 Ausgangsmaterial und Vorbereitung

Frisches bovines Hirngewebe wurde von einem lokalen Schlachthaus bezogen und bis zur Aufarbeitung in kaltem, un-supplementiertem DMEM aufbewahrt.

Humanes Hirnmaterial stammte aus Proben, die während der Sektion von Verstorbenen in der benachbarten Gerichtsmedizin entnommen wurden. Die Individuen, von denen das Hirnmaterial stammte, waren in der Regel Opfer von Gewaltverbrechen, Unfallopfer oder Suizidfälle. Die jeweilige Todesursache war dementsprechend unterschiedlich: übermäßiger Blutverlust infolge innerer und/oder äußerer Blutungen (z.B. durch Schuss- und Stichverletzungen oder Quetschungen), irreparable Schäden am Zentralnervensystem aufgrund eines Schädel-Hirn-Traumas (z.B. durch Schlageinwirkung), Erstickten (z.B. durch Strangulation oder Ertrinken) und Herz-Kreislaufversagen in Folge exzessivem Rauschgift- und/oder Alkoholkonsums. Die Liegezeit der Verstorbenen bis zum Beginn der Sektion beziehungsweise der Entnahme und Aufarbeitung der Hirnprobe lag im Zeitraum von 6-24 Stunden. Auch das humane Hirnmaterial wurde nach der Entnahme bis zur Aufarbeitung in kaltem Medium aufbewahrt.

Vor Beginn der eigentlichen Aufarbeitung wurde das Hirnmaterial zunächst für einige Minuten in 70 % Ethanol eingelegt, um die Wahrscheinlichkeit einer späteren Kontamination der Kulturen durch Bakterien und Pilze, die während der unsterilen Entnahme an die Proben gelangt sein konnten, zu reduzieren. Zur Beseitigung des Ethanols wurde das Gewebe mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend die anhaftende Hirnhaut gründlich entfernt. Schließlich erfolgte die weitgehende Entfernung der weißen Hirnsubstanz, so dass die anschließende

Isolierung der Kapillarfragmente hauptsächlich aus der verbliebenen grauen Substanz erfolgte. Pro Präparation wurden zwischen 20-25 ml Hirngewebe aufgearbeitet; dieser Wert bezieht auf die Füllmenge des zerkleinerten Hirngewebes nach dem ersten Zentrifugationsschritt (siehe unten).

3.2.1.2 Originales Isolierungs-Protokoll (“MPI-Protokoll”)

Die Isolierung von mikrovaskulären Kapillarfragmenten aus bovinem und humanem Hirngewebe erfolgte zunächst über einen längeren Zeitraum mit Hilfe des nachfolgend beschriebenen Isolierungsprotokolls, das vom Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung (W.G. Kerckhoff-Institut) in Bad Nauheim übernommen wurde (abgewandelt nach Wolburg *et al.* 1994), im folgenden als „MPI-Protokoll“ bezeichnet:

- 1.) Das Hirngewebe wurde zunächst mit einem Skalpell grob in ca. 1-3 mm große Stücke zerkleinert.
- 2.) Nun wurde das Gewebe mit Hilfe einer Collagenase enzymatisch verdaut. Hierzu wurde das zerkleinerte Gewebe in der gleichen Menge einer 0,375 %igen Collagenase-II-Gebrauchslösung resuspendiert und 20-30 min bei 37° inkubiert. Der Verdau wurde durch gelegentliches leichtes Schütteln des Reaktionsgefäßes unterstützt.
- 3.) Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von kaltem PBS abgestoppt, die Suspension für 10 min bei 1100 rpm und 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- 4.) Anschließend erfolgte die Trennung der Bindegewebsbestandteile von den Kapillarfragmenten mit Hilfe eines BSA-Gradienten. Hierzu wurde das Pellet aus dem vorherigen Zentrifugationsschritt in 25 % BSA-Lösung resuspendiert und die Suspension 20 min mit 2600 rpm bei 4° C zentrifugiert. Danach befanden sich die Kapillarfragmente im Pellet. Der aus der Bindegewebsfraktion und der BSA-Fraktion bestehende Überstand wurde abgezogen und verworfen.
- 5.) Das Pellet wurde nun in 1,5 ml Collagenase/Dispase-Lösung resuspendiert und 10 min bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte ein mehrminütiger DNase-Verdau bei 37° C durch Zugabe von 5 ml DNase-Lsg (0,1 U/ml).
- 6.) Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von kaltem PBS abgestoppt, die Suspension für 10 min bei 1100 rpm und 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml DMEM resuspendiert.
- 7.) Anschließend erfolgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Hilfe eines kontinuierlichen Percoll-Gradienten. Dieser wurde wie folgt hergestellt: 24 ml Percoll wurden mit 13 ml PBS und 2 ml 10x PBS verdünnt und die Mischung für 60 min mit 11000 rpm bei RT ultrazentrifugiert, wobei sich ein kontinuierlicher Gradient einstellte. Dieser wurde nun vorsichtig mit der Suspension aus Schritt 6) überschichtet und 10 min mit 2600 rpm bei 10° C zentrifugiert. Die Kapillarfragmente befanden sich nun im oberen Teil des Gradienten in einem Dichtebereich von 1,05-1,06 g/ml, der durch in einem parallelen identischen Percoll-Dichtegradienten befindliche *Density-marker-beads* identifiziert werden konnte. Dieser Bereich wurde abgezogen und der Rest verworfen.

- 8.) Die abgenommene Interphase aus dem vorherigen Dichtegradienten wurde nun mit PBS gewaschen und die darin enthaltenen Kapillarfragmente durch Zentrifugation für 10 min mit 1100 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer geeigneten Menge Medium resuspendiert und die Kapillarfragmente in Zellkulturgefäße ausplattiert.

3.2.1.3 Etablierung und Optimierung eines alternativen Isolierungs-Protokolls (“Alternativ-Protokoll”)

Aufgrund zahlreicher Probleme und unbefriedigender Ergebnisse, die sich durch die Verwendung des oben beschriebenen MPI-Protokolls bei der Isolierung der cerebralen Kapillarfragmente ergaben (vergl. 4.1.1), bestand die Notwendigkeit, ein alternatives und geeigneteres Isolierungsprotokoll zu entwickeln, das nicht die prinzipiellen Schwächen des Original-Protokolls beinhalten sollte. Die Entwicklung und Etablierung dieses alternativen Isolierungsprotokolls erfolgte auf der Basis der vierstufigen Grundstruktur des originalen MPI-Protokolls, also primärer Enzymverdau → diskontinuierlicher Dichtegradient → sekundärer Enzymverdau → kontinuierlicher Dichtegradient, jedoch wurden die einzelnen Schritte zum Teil erheblich modifiziert und einige neue Schritte eingeführt. Hierbei wurden folgende zwei Bedingungen zur Vorgabe gemacht:

Erstens sollten nur noch möglichst reine Enzyme bei den einzelnen Verdauschritten Verwendung finden. Die im MPI-Protokoll benutzten Enzyme waren sogenannte *crude*-Collagenasen, also ein Gemisch unterschiedlicher proteolytischer Enzyme, bei dem das Verhältnis der einzelnen Enzymaktivitäten zueinander starken chargenabhängigen Schwankungen unterlag, so dass eine Standardisierung und Reproduzierbarkeit bei der Isolierung der Kapillarfragmente erheblich erschwert wurde. Außerdem konnte eine Schädigung der Hirnendothelzellen bei Verwendung dieser Enzymgemische durch das Vorhandensein unerwünschter zellschädigender enzymatischer Nebenaktivitäten nicht ausgeschlossen werden.

Zweitens sollte nur eine gemeinsame Trennlösung bei den beiden Dichtegradienten Verwendung finden. Bei dem MPI-Protokoll stellte sich die grundsätzliche Frage, ob der Einsatz einer Proteinlösung auf Basis von BSA als Trennlösung sinnvoll ist. BSA ist ein aus Blutplasma gewonnenes natives Protein, das Kontaminationen von anderen Proteinen enthält, die eine mögliche Problemquelle darstellten. Zur Verwendung als Trennlösung existieren

zahlreiche, auch preislich attraktivere Alternativen, wie beispielsweise Saccharidlösungen aus Glucose oder Saccharose, Dextran, und synthetische Trennlösungen auf Basis von Ficoll oder Percoll. Da ein Percoll-Gradient ohnehin bereits Teil des Isolierungsprotokolls war (kontinuierlicher Dichtegradient), lag der Gedanke nahe, eine geeignete Percolllösung auch als Trennlösung beim diskontinuierlichen Dichtegradienten zu verwenden.

Die einzelnen Modifikationen beziehungsweise Neuerungen bei der Entwicklung und Etablierung des alternativen Isolierungsprotokolls sind im Einzelnen:

1. Ersatz der Collagenase durch eine neutrale Protease (*Dispase*) beim primären Enzymverdau: Die Dispase ist ein sehr reines proteolytisches Enzym, das nur unbedeutende enzymatische Nebenaktivitäten enthält. Dadurch ergaben sich nur geringe Chargenschwankungen bezüglich ihrer spezifischen Aktivität, die zudem durch Ansetzen einer Gebrauchslösung definierter Aktivität (10 U/ml) ausgeglichen wurde.
2. Einsatz eines Rotationsschüttlers während des primären Enzymverdaus: Durch die mechanische Krafteinwirkung der Bewegung des Rotationsschüttlers während der Dispase-Inkubation des Hirngewebes wurde dessen enzymatischer Abbau unterstützt und beschleunigt. Dadurch konnte eine vollständige Homogenisierung des Hirngewebes und eine damit verbundene komplette Freisetzung der darin enthaltenen Kapillarfragmente sowie eine Verkürzung der Inkubationszeit erreicht werden.
3. Ersatz der BSA-Lsg. durch eine geeignete Percoll-Lsg. beim diskontinuierlichen Dichtegradienten: Durch eine 1:2-Verdünnung des beim primären enzymatischen Verdau entstandenen Gewebehomogenisats mit einer 40 %igen Percoll-Lsg. und anschließender Zentrifugation dieses Gemischs konnte eine der Verwendung einer 25 %igen BSA-Lsg. im MPI-Protokoll vergleichbare Trennung des Bindegewebes von den daraus freigesetzten Kapillarfragmenten aufgrund ihrer differierenden Dichten erreicht werden.
4. Ersatz des Collagenase/Dispase-Enzymgemischs durch eine hochreine Collagenase beim sekundären Enzymverdau: Die verwendete *high-purity*-Collagenase war chromatografisch hochaufgereinigt und besaß neben der reinen Collagenase-Aktivität keine störenden enzymatischen Nebenaktivitäten. Da eine hochreine Collagenase eine native Collagen-Struktur weniger effizient abbaut als ein Collagenase-Protease-Gemisch gleicher Aktivität, musste die Inkubationszeit bei diesem Schritt im Vergleich zum Collagenase/Dispase-Verdau des MPI-Protokolls verdoppelt werden.

5. Filtration der Kapillarfragment-Suspension durch ein 40 µm-Zellsieb nach dem letzten Enzymverdau: Durch diesen Filtrationsschritt wurde eine quantitative Entfernung von unvollständig verdauten mikrovaskulären Kapillarfragmenten sowie makrovaskulären Kapillarfragmenten, die eine erhebliche Quelle von kontaminierenden Zellen (Pericyten, Astrocyten) darstellen, erreicht.
6. Ersatz des 10x-PBS durch 1x-PBS beim Ansetzen des kontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten: Die Verwendung von 10x-PBS beim Ansetzen des kontinuierlichen Percoll-Gradienten stellte einen offensichtlichen Fehler im MPI-Protokoll dar. Das Percoll war in der vom Hersteller gelieferten Form bereits in einer physiologischen und somit isoosmolaren Salzlösung gelöst. Folglich konnte es in jedem beliebigen Verhältnis mit einer physiologischen Salzlösung wie PBS verdünnt werden, als Endergebnis ergab sich stets wieder eine physiologische isoosmolare Lösung. Eine Zugabe zusätzlicher Ionen in Form von 10fach konzentrierter Salzlösung wie 10x-PBS war daher nicht nur überflüssig, sondern sogar schädlich, da die in der dadurch entstandenen hypertonen Lösung befindlichen Hirnendothelzellen einem unnötigen osmotischen Stress ausgesetzt waren.

Zusammengefasst lautete das neuetablierte alternative Isolierungsprotokoll (künftig als „Alternativ-Protokoll“ bezeichnet) zur Isolierung von Kapillarfragmenten aus bovinen und humanen Hirnmaterial wie folgt:

- 1.) Das Hirngewebe wurde zunächst mit einem Skalpell grob in ca. 1-3 mm große Stücke zerkleinert.
- 2.) Nun erfolgte der primäre enzymatische Verdau des Hirngewebes unter Verwendung einer Dispase. Hierzu wurde das zerkleinerte Gewebe in der gleichen Menge der Dispase-Gebrauchslösung (10 U/ml) resuspendiert und 70 min bei 37° auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach 30 min erfolgte eine kurze Trituration des teilverdauten Gewebes mit Hilfe einer Pipette. Durch die synergistische Wirkung der mechanischen Krafteinwirkung und des enzymatischen Abbaus ergab sich eine vollständige Homogenisierung des Gewebes und somit eine vollständige Freisetzung der darin enthaltenen Kapillarfragmente.
- 3.) Anschließend erfolgte die Trennung der Bindegewebsbestandteile von den Kapillarfragmenten mit Hilfe eines Percoll-Gradienten. Hierzu wurde das im vorherigen Schritt entstandene Gewebehomogenisat 1:2 mit einer 40 %igen Percoll-Lösung verdünnt und die Suspension 20 min mit 4000 rpm bei 4° C ohne Bremse zentrifugiert. Die Auftrennung beruhte auf den unterschiedlichen Dichten der Kapillarfragmente beziehungsweise des homogenisierten Bindegewebes: Die Kapillarfragmente sind schwerer, das homogenisierte Bindegewebe ist leichter als die Percoll-Lsg. Nach der Zentrifugation befanden sich die Kapillarfragmente im untersten Teil des Zentrifugationsröhrchens und waren dort deutlich als Trübung erkennbar. Der aus der Bindegewebsfraktion und der Percoll-Fraktion bestehende Überstand wurde bis zu dem die Kapillarfragmente enthaltenden Bereich abgezogen und verworfen.

- 4.) Die verbliebene Suspension wurde mit kaltem PBS auf 50 ml hochverdünnt und die darin enthaltenen Kapillarfragmente durch Zentrifugation für 10 min bei 1600 rpm und 4° C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen.
- 5.) Das Pellet wurde nun in 1,0 ml *high-purity*-Collagenase-Lösung (500 U/ml) resuspendiert und 20 min bei 37° C inkubiert. Durch die Aktivität der Collagenase wurde die Basalmembran der Kapillarfragmente weiter anverdaut, damit die BCEC nach dem Ausplattieren der isolierten Kapillarfragmente leichter auswachsen konnten und kontaminierende nichtendotheliale Zellen (z.B. Pericyten und Astrocyten) sich von diesen abspalten.
- 6.) Dann erfolgte ein mehrminütiger DNase-Verdau bei 37° C durch Zugabe von 5 ml DNase-Lsg. (0,1 U/ml). Diese Inkubation sorgte für den Abbau von freigesetzter DNA, die ein Zusammenkleben der Kapillarfragmente zur Folge hatte und deren Beweglichkeit im anschließenden Dichtegradienten beeinträchtigte. Die Freisetzung von DNA kann auf zweierlei Art erfolgen: zum einen endogen durch Absterben von Zellen im sich zersetzenden Gewebe, zum anderen exogen aufgrund einer Zerstörung von Zellen durch mechanische Krafteinwirkung und Einwirken von proteolytischen Aktivitäten der verwendeten Enzymlösungen im Verlauf der Isolierung. Jedenfalls sorgte die freigesetzte DNA für eine makroskopisch sichtbare Verklumpung der Kapillarfragmente in der Suspension, so dass der Verdau so lange unter permanentem Schütteln durchgeführt wurde, bis sich die Klumpen vollständig aufgelöst hatten.
- 7.) Die Suspension wurde nun durch ein Zellsieb (*cell strainer*) mit 40 µm Porenweite filtriert. Dadurch wurden große makrovaskuläre und unvollständig verdaute mikrovaskuläre Kapillarfragmente entfernt und dadurch die Kontamination der späteren BCEC-Kulturen mit nichtendothelialen Zellen verringert.
- 8.) Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von kaltem PBS abgestoppt, die Suspension für 10 min bei 1100 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml DMEM resuspendiert.
- 9.) Anschließend erfolgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Hilfe eines kontinuierlichen Percoll-Gradienten. Dieser wurde wie folgt hergestellt: 24 ml Percoll wurden mit 15 ml PBS verdünnt und die Mischung für 60 min mit 11000 rpm bei RT ultrazentrifugiert, wobei sich ein kontinuierlicher Gradient einstellte. Dieser wurde nun vorsichtig mit der Suspension aus Schritt 8) überschichtet und 10 min mit 2600 rpm bei 10° C zentrifugiert. Hierbei erfolgte eine Trennung der Kapillarfragmente von kontaminierenden Fremdzellen (hauptsächlich Erythrocyten und Zellen des Hirnparenchyms) und diversen Bindegewebsbestandteilen aufgrund ihrer differierenden Dichten. Die Kapillarfragmente sammelten sich im oberen Teil des Gradienten an und waren dort deutlich als trübe, rötlich gefärbte Interphase zu erkennen. Diese Interphase wurde abgezogen und der Rest verworfen.
- 10.) Die abgenommene Interphase aus dem vorherigen Dichtegradienten wurde nun mit PBS gewaschen und die darin enthaltenen Kapillarfragmente durch Zentrifugation für 10 min mit 1100 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer geeigneten Menge Medium resuspendiert und die Kapillarfragmente in Zellkulturgefäße ausplattiert.

Die Verwendung des neu etablierten Alternativ-Isolierungsprotokolls zeigte durchgehend überzeugende Ergebnisse (vergl. 4.1.1), so dass sämtliche in dieser Arbeit gezeigten Experimente mit BCEC-Präparationen auf Basis des Alternativ-Protokolls durchgeführt wurden.

3.2.2 Kultivierung der Hirnendothelzellen

3.2.2.1 Beurteilung der Kulturbedingungen

Die Beurteilung von unterschiedlichen Bedingungen bei der Kultivierung dieser Zellen erfolgt häufig rein qualitativ durch mikroskopische Beurteilung der Hirnendothelzell-Kulturen bezüglich Wachstumsverhalten, Morphologie, Reinheit der Kultur etc. Hierbei muss aber einschränkend festgestellt werden, dass die rein qualitative Beurteilung anhand der oben aufgeführten Kriterien subjektiv und somit fehleranfällig ist. Wünschenswert wäre deshalb ein auf quantitativen Parametern beruhendes objektives, reproduzierbares und standardisierbares Verfahren, mit dessen Hilfe sich eine Beurteilung durchführen ließe.

Im Rahmen eines *in vitro*-Zellkulturmodells der Blut-Hirn-Schranke (vergl. 3.3) bietet sich diese Möglichkeit einer quantitativen und somit objektiven Beurteilung verschiedener Kulturbedingungen, da sich die charakteristischen Eigenschaften kultivierter Hirnendothelzellen, wie beispielsweise die vollständige Ausbildung von *tight junctions*, in den Charakteristiken des darauf aufbauenden *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells, wie beispielsweise dessen Permeabilität und transendothelialer elektrischer Widerstand (TEER, vergl. 2.1.3), widerspiegeln. Somit kann folgende Aussage gemacht werden: je besser die Kulturbedingungen der BCEC sind, desto besser sind die Charakteristiken und spezifischen Parameter des *in vitro*-BHS-Modells, wie beispielsweise die Höhe des TEER. Da die Messung des TEER einfach und wiederholt durchgeführt werden kann (vergl. 3.3.2.1), eignet sich die Verfolgung des zeitlichen Verlaufs des TEER in reproduzierbarer Weise zur objektiven und quantitativen Beurteilung der Qualität verschiedener Kulturbedingungen der BCEC. Dies wurde bei der Austestung verschiedener Parameter der Kulturbedingungen, wie beispielsweise Art des verwendeten Adhäsionsfaktors und Mediums, nach Möglichkeit als Bewertungskriterium herangezogen.

3.2.2.2 Adhäsionsfaktor

Für die Kultivierung der bovinen und humanen BCEC wurden verschiedene Adhäsionsfaktoren erprobt. Außer dem zur Kultivierung von Endothelzellen häufig eingesetzten Typ-I-Collagen

wurden Typ-IV-Collagen und Fibronectin auf ihre Tauglichkeit als Adhäsionsfaktor hin ausgetestet. Die Testung umfasste sowohl kommerzielle fertig gecoatete (z.B. BIOCOAT[®]) als auch mit geeigneten Collagen- beziehungsweise Fibronectin-Lösungen selbstgecoatete Zellkulturgefäße. Die standardmäßige Verwendung fertig gecoateter Zellkulturgefäße erschien aber von vornherein als nachteilig: zum einen sprachen wirtschaftliche Gründe dagegen, zum anderen musste für die Kultivierung der BCEC auf den Transwell[®]-Inserts ohnehin mit einem löslichen Adhäsionsfaktor gearbeitet werden, um diese zu coat.

Zusätzlich zu den nativen Proteinen Collagen und Fibronectin wurden noch zwei gentechnisch hergestellte Polypeptide zur Verwendung als Adhäsionsfaktor bei der Kultivierung der BCEC ausgetestet, nämlich RGD-ECM (Boehringer-Mannheim) und *Laminin-Like Engineered Protein Polymer* (LLEPP, Sigma). Bei RGD-ECM handelt es sich um ein rekombinantes Polypeptid aus *E. coli*, das die RGD-Zellanheftungssequenz des Fibronectins in mehrfach duplizierter Form enthält. LLEPP hingegen enthält mehrere IKVAV-Zellanheftungs-Epitope der α -Kette des Laminins. Durch die künstliche Vervielfältigung der spezifischen Zellanheftungssequenzen der entsprechenden nativen Proteine Fibronectin und Laminin innerhalb dieser beiden rekombinanten Polypeptide soll Zellen die Adhärenz daran erleichtert werden.

Das Coating der Zellkulturoberflächen erfolgte durch deren Benetzung mit der jeweils laut Herstellerangaben angesetzten Adhäsionsfaktor-Lösung und anschließender ein- bis mehrstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37° C. Bei dem letztendlich standardmäßig verwendeten Typ-IV-Collagen erfolgte das Coating der Zellkulturgefäße mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Anschließend wurden die Zellkulturoberflächen mit PBS gewaschen und die BCEC darauf ausgesät.

Die Bewertung der Adhäsionsfaktoren erfolgte, wie bereits erwähnt, häufig rein qualitativ durch vergleichende mikroskopische Beurteilung der BCEC-Kulturen bezüglich Wachstumsverhalten, Morphologie, Reinheit der Kultur etc., sofern die Unterschiede zwischen den verschiedenen auszutestenden Adhäsionsfaktoren diesbezüglich eindeutig waren und keinen

interpretatorischen Spielraum zuließen. War dies nicht gegeben, erfolgte die Austestung und Bewertung im Rahmen des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells (vergl. 3.2.2.1 und 3.3.1).

3.2.2.3 Wachstumsfaktor

Für die Kultivierung der BCEC war die Zugabe eines Wachstumsfaktors zum Kulturmedium erforderlich, da die Zellen ohne dessen Vorhandensein keine Proliferationsaktivität zeigten. Hierfür wurde ein aus bovinen Retinae extrahierter Faktor verwendet (*Retinafaktor*, RF), der eine rohe Quelle verschiedener Wachstumsfaktoren darstellt (Wolburg *et al.* 1994). Hierfür wurden aus Rinderaugen herauspräparierte Retinae für 24 h in PBS eingelegt (5 Retinae/25 ml) und dann der den herausgelösten Retinafaktor enthaltende Überstand abgenommen. Anschließend wurde dieser zur Entfernung von festen Schwebeteilchen abzentrifugiert, der Überstand steril filtriert und Aliquots dieser Retinafaktor-Lösung bis zu ihrer Verwendung bei -20° C gelagert.

3.2.2.4 Kulturmedium

Für die Kultivierung der Hirnendothelzellen wurden verschiedene Medien ausgetestet, wobei sich dabei nicht auf eine rein qualitative mikroskopische Beurteilung der Auswirkung unterschiedlicher Medien auf die Wachstumseigenschaften und Morphologie der damit kultivierten Hirnendothelzellen beschränkt wurde. Deshalb erfolgte die Beurteilung der Medien im Rahmen des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells (vergl. 3.3.1) quantitativ durch Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des TEER (vergl. 3.3.2.1) von mit unterschiedlichen Medien kultivierten Hirnendothelzell-Monolayern. Hierzu wurden primäre bovine Hirnendothelzellen direkt nach der Isolierung auf Collagen IV-gecoatete Inserts ausgesät und zunächst bis zum Erreichen der Konfluenz am Tag 2 *in vitro* unter gleichen Bedingungen mit BCEC-Medium # 1 kultiviert. Am Tag 2 wurde das Medium gewechselt und die verschiedenen Ansätze in unterschiedlichen Medien - Serum-freies BCEC-Medium (BCEC-SFM, GIBCO), supplementiertes Medium 199 (M199, SIGMA) und supplementiertes DMEM/HAM's F-12 (SIGMA) – weiterkultiviert (je drei Inserts pro Ansatz). Dem M199 und DMEM/HAM's F-12

wurden jeweils 10 % FCS zugesetzt. Sämtliche drei Medien enthielten zusätzlich noch jeweils 2 % Retinafaktor. In einem weiteren, unter identischen Bedingungen durchgeführten Experiment wurde dasselbe Medium (M199) von jeweils zwei verschiedenen Herstellern (SIGMA und PAA) gegeneinander ausgetestet.

3.2.2.5 Zusammenfassung der standardmäßig verwendeten Kulturbedingungen der BCEC

Nach Isolierung der Kapillarfragmente aus dem Hirngewebe und deren Aussaat in die Zellkulturgefäße beziehungsweise Inserts erfolgte die Kultivierung der BCEC zunächst in supplementiertem DMEM, dem 10 % FCS und 2 % Retinafaktor zugesetzt war (BCEC-Medium # 1). Am Tag 2 *in vitro* wurde das Kulturmedium der BCEC-Kulturen gewechselt, um die Überreste der zu diesem Zeitpunkt zerfallenen Kapillarfragmente sowie abgestorbene Zellen beziehungsweise Zellbestandteile zu entfernen.

Die Art des jeweils zur Weiterkultivierung verwendeten Mediums war abhängig von den Experimenten, die mit der jeweiligen BCEC-Populationen durchgeführt werden sollten. Bei den in Transwell[®]-Inserts kultivierten BCEC wurde in der Regel Medium 199 von SIGMA (BCEC-Medium # 3) verwendet, da dieses in den Austestungen die besten Resultate gezeigt hatte (vergl. 4.1.2.2). Dem M199 wurde 10 % humanes AB-Serum (SIGMA) sowie 2 % Retinafaktor zugegeben. Die Verwendung von humanem AB-Serum ergab sich aus der Notwendigkeit, in vielen der durchgeführten Experimente die BCEC-Monolayer mit humanen Makrophagen zu kokultivieren. Mehrere Austestungen ergaben keine eindeutigen Unterschiede zwischen der Verwendung von FCS im Vergleich zum humanem AB-Serum zur Kultivierung der bovinen BCEC bezüglich ihres Wachstumsverhaltens oder Höhe ihres TEER (nicht gezeigt).

Für die Durchführung einiger Experimente musste allerdings auf die Verwendung von M199 verzichtet werden. Bei den Experimenten, bei denen die BCEC mit Nanopartikeln inkubiert wurden (vergl. 3.6), hätte die Anwesenheit des im M199 enthaltenen Emulgators *Polysorbat 80* die Ergebnisse verfälschen können, so dass die für diese Versuche vorgesehenen BCEC in

supplementiertem DMEM/HAM's F-12 mit 10 % FCS und 2 % Retinafaktor (BCEC-Medium # 2) kultiviert wurden.

Für die Versuche, bei denen der Einfluss von Serum auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern untersucht wurde (vergl. 3.5.1), wurden die BCEC zum Teil in Serum-freien Endothelzellmedium (BCEC-SFM) oder Serum-haltig in BCEC-Medium # 2 kultiviert.

Als Adhäsionsfaktor wurde grundsätzlich Typ-IV-Collagen zum Coaten der Zellkulturgefäß-Oberflächen verwendet (vergl. 3.2.2.2).

Die Kultivierung der BCEC erfolgte in einem Brutschrank mit 7 %iger CO₂-Begasung, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90 % und einer Temperatur von 37° C.

3.2.3 Kultivierung der Zelllinien

In vielen Experimenten wurden als Kontrolle, Vergleich und zur Kokultur folgende Zelllinien verwendet: MRC-5 (humane Fibroblasten-Zelllinie), ECV304 (humane Nabelschnur-Endothelzelllinie), CACO-2 (humane intestitielle Epithelzelllinie), MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*, canine Nieren-Epithelzelllinie) und C6 (Ratten-Glioblastom-Zelllinie). Diese wurden durchgehend in Zelllinien-Medium gehalten. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen oder -platten in einem Brutschrank mit 7 %iger CO₂-Begasung, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90 % und einer Temperatur von 37° C.

3.2.4 Charakterisierung der Hirnendothelzellen: Immun-cytochemische Fluoreszenz-Färbung

Die Charakterisierung sowohl der bovinen als auch der humanen BCEC erfolgte mit Hilfe einer immunocytochemischen Fluoreszenzfärbung, mit der die Expression des Endothelzell-spezifischen Markers von-Willebrand-Faktor (vWF) nachgewiesen werden sollte.

Eine weitere Charakterisierung und die Demonstration der vollständigen Ausbildung von *tight junctions* bei den BCEC-Monolayern erfolgte durch die immuncytochemische Detektion des *tight junction*-assoziierten Proteins ZO-1 (vergl. 2.1.3).

Die Charakterisierung der die BCEC-Kulturen kontaminierenden Pericyten erfolgte durch die immuncytochemische Färbung von glattem Muskelzell-Aktin (MZA), da dieses Protein für diesen Zelltyp spezifisch ist und nicht von Endothelzellen exprimiert wird. Dadurch konnte eine bessere Beurteilung der Reinheit der BCEC-Kulturen erfolgen als durch rein lichtmikroskopische Begutachtung.

Die Fixierung der postkonfluenten BCEC erfolgte mit Ausnahme der für den immuncytochemischen Nachweis des ZO-1 vorgesehenen Präparate durch 15-minütige Inkubation mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei 37° C. Für die ZO-1-Färbung erwies sich diese Fixiermethode als ungeeignet, so dass die Fixierung der für diese Färbung vorgesehenen Präparate mit -20° C kaltem Methanol erfolgte. Nach der Fixierung wurden sämtliche Präparate mit PBS gewaschen und bis zur Durchführung der Färbung in 70 % Ethanol bei -20° C gelagert.

Zu Beginn der immuncytochemischen Färbung wurden die Präparate zunächst mit Normalserum (4 % in PBS) für 1 h bei 37° C inkubiert. Hierbei wurde Serum der Spezies verwendet, aus der der jeweilige später zugegebene Sekundärantikörper stammte. Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers und Inkubation über Nacht bei 4° C. Die folgende Tabelle zeigt die hierbei verwendeten Primärantikörper sowie die eingesetzten Konzentrationen:

Antikörper	Spezies/Typ	Hersteller	Konzentration
ZO-1	Ratte, monoklonal	CHEMICON	1:200
ZO-1	Kaninchen, polyklonal	ZYMED	1:200
vWF	Maus, polyklonal	DAKO	1:400
vWF	Maus, monoklonal	DAKO	1:100
MZA	Maus, monoklonal	DAKO	1:200

Nach Inkubation mit den Primärantikörpern wurden mehrere Waschschrte durchgeführt und anschließend der jeweilige FITC-gelabelte Sekundärantikörper zugegeben. Auch dieser

Inkubationsschritt erfolgte über Nacht bei 4° C. Die verwendeten Sekundärantikörper und die eingesetzten Konzentrationen zeigt folgende Tabelle:

Antikörper	Spezies	Hersteller	Konzentration
anti-Maus	Ziege	DIANOVA	1:125
anti-Ratte	Ziege	DIANOVA	1:125
anti-Kaninchen	Esel	DIANOVA	1:125

Nach Abschluss der Sekundärantikörper-Inkubation erfolgten mehrere Waschschrte und anschließend die Visualisierung der Färbung am Fluoreszenz-Mikroskops. Das verwendete Mikroskop besaß eine integrierte CCD-Kamera, die über eine Videokarte mit einem Computer verbundenen war. Dies erlaubte eine unmittelbare Sicherung der Ergebnisse der Fluoreszenz-Färbung durch Übertragung in den Computer und anschließendes Abspeichern auf Datenträgern.

Als Kontrollen bei der immuncytochemischen Fluoreszenz-Färbung wurden primäre venöse Nabelschnur-Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) und Zellen der humanen intestitiellen Epithelzelllinie CACO-2 verwendet. Die HUVEC dienten dabei als Positiv-Kontrolle für den Endothelzell-spezifischen vWF und als Negativ-Kontrolle für ZO-1 und MZA. Die CACO-2-Zellen dienten als Positiv-Kontrolle für ZO-1, da sie wie BCEC *tight junctions* ausbilden und somit ZO-1 exprimieren. CACO-2-Zellen wurden außerdem als Negativ-Kontrolle für vWF benutzt.

3.3 Etablierung und Charakterisierung des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells

3.3.1 Aufbau des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells

Eine schematische Darstellung des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells ist in Abb. 4 (vergl. 3.4.2) gezeigt. Die mikrovaskulären Kapillarfragmente wurden direkt nach ihrer Isolierung aus dem Hirngewebe (vergl. 3.2.1.3) auf Collagen-IV-gecoatete Transwell®-Inserts ausplattiert. Das Coating der Inserts erfolgte dabei mit 15 µg/cm² - im Gegensatz zu 10 µg/cm²

bei Zellkulturplatten (vergl. 3.2.2.2) -, um den BCEC die Adhäsion auf der porösen Membran des Inserts zu erleichtern. Etwa 1 h nach Isolierung und Aussaat erfolgte ein Medienwechsel, um nichtadhärierte Kapillarfragmente und Zellen zu entfernen. Wie bei der Kultivierung in konventionellen Kulturgefäßen erfolgte anschließend ein Auswachsen der BCEC aus den zerfallenden Kapillarfragmenten und das Einsetzen ihrer Proliferationsaktivität. Wie bereits erwähnt (vergl. 3.2.2.5), wurde am Tag 2 *in vitro* ein Medienwechsel durchgeführt, um abgestorbene Zellen und Überreste der zerfallenen Kapillarfragmente zu entfernen.

Um eine unspezifische Störung des Zellkultur-Systems zu verhindern (vergl. 4.4.1), wurde nach Ausbildung eines konfluenten BCEC-Monolayers auf der porösen Membran des Transwell®-Inserts kein weiterer Medienwechsel mehr durchgeführt.

3.3.2 Charakterisierung des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells

3.3.2.1 Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (*transendothelial electrical resistance*, TEER)

Der transendotheliale elektrische Widerstand (*transendothelial electrical resistance*, TEER) wurde mit einem Widerstands-Messgerät (MILLICELL ERS) in Kombination mit einer speziell auf die verwendeten Transwell®-Einsätze angepassten Kammer-Ringelektrode (ENDOHM-12) bestimmt (siehe Abb. 3), was akkurate und reproduzierbare Messungen gewährleistete. Zur Widerstandsmessung wurde die Elektrode mit TEER-Messmedium (unsupplementiertes DMEM + 25 mM HEPES) gefüllt und dann das zu messende Insert eingesetzt. Um eine Elektrolyse des Messmediums zu verhindern, arbeitet dieses System mit Wechselstrom. Von dem gemessenen Wert wurde anschließend der Widerstandswert eines Collagen-beschichteten Leerinserts (Nullwert) abgezogen, womit man den transendothelialen Widerstandswert erhält. Damit man die TEER-Werte von verschiedenen Inserts mit unterschiedlichen Membranflächen zueinander in Beziehung setzen kann, wird der transendotheliale Widerstandswert mit der inneren Fläche der Membran des Inserts (Wachstumsfläche, *growth area*) multipliziert. Dadurch

erhält man die für die Angabe von TEER-Werten gebräuchliche Einheit [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]. Bei den verwendeten Inserts (Transwell® PC, \varnothing 12 mm, 3 μm Porenweite) betrug die Wachstumsfläche 1,1 cm^2 .

Bei sämtlichen in dieser Arbeit aufgeführten TEER-Angaben wurden grundsätzlich die Widerstandswerte von drei identisch behandelten und nacheinander durchgemessenen Inserts verwendet und gemittelt.

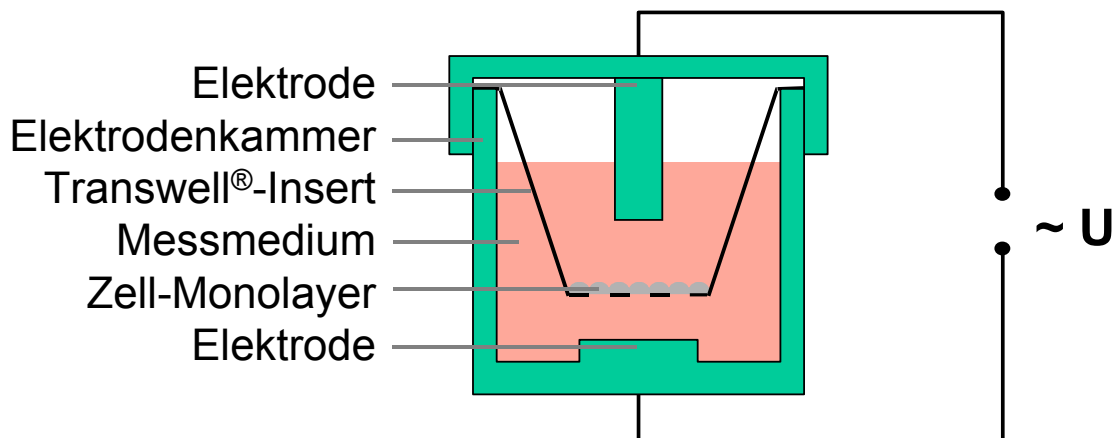


Abb. 3) Schematische Darstellung der Durchführung einer TEER-Messung mit Hilfe der hierfür verwendeten Kammer-Ringelektrode (ENDOHEM®).

3.3.2.2 Bestimmung der parazellulären Permeabilität makromolekularer Substanzen (radioaktiver Permeabilitätsassay)

Um die Permeabilität der BCEC-Monolayer für makromolekulare Verbindungen zu bestimmen, wurde der Durchtritt einer radioaktiv markierten Tracer-Substanz durch den Zellmonolayer pro Zeiteinheit quantifiziert. Hierfür wurde ^{14}C -Sucrose verwendet, da diese durch Endothelzellen nicht aufgenommen wird und somit auch kein aktiver oder erleichterter Transport dieser Substanz über den BCEC-Monolayer erfolgen kann (Bowman *et al.* 1983, Neuhaus *et al.* 1991, Raub *et al.* 1992, Grabb und Gilbert 1995, Johnson und Anderson 1999); unter nicht-pathologischen Bedingungen ist die BHS *in vivo* nahezu impermeabel für Sucrose (Ohno *et al.* 1978, Levin 1980). Zudem besitzt Sucrose ein niedriges Molekulargewicht (MW = 342 Dalton), so dass sie für Permeabilitätsstudien an Zellmonolayern mit niedriger Permeabilität besser geeignet ist als beispielsweise Albumin (MW \sim 70.000 Dalton).

Zur Durchführung des radioaktiven Permeabilitätsassays wurden Zellkulturplatten durch Füllen jedes *Wells* mit jeweils der gleichen Menge (1,5 ml) Medium (BCEC-Medium # 3 ohne Serum) vorbereitet und dann die Inserts mit den darauf wachsenden Hirnendothelzellen mit 0,5 ml Medium gefülltem oberen Kompartiment in die erste Spalte der Zellkulturplatte eingesetzt. Durch die gewählten Füllmengen (0,5 ml im oberen und 1,5 ml im unteren Kompartiment) wurde sichergestellt, dass die Flüssigkeitsniveaus in beiden Kompartimenten innerhalb und außerhalb des Inserts gleich waren und somit keine unerwünschte Beeinflussung des Assays durch hydrostatische Effekte erfolgte. Zum Start des Assays, d.h. zum Zeitpunkt $t = 0$, wurde eine definierte Menge ^{14}C -Sucrose in das obere Kompartiment des Inserts gegeben (je drei Inserts pro Ansatz) und dann die Inserts nach definierten Zeitintervallen in das jeweils benachbarte, mit frischem Medium gefüllte *Well* umgesetzt. Nach Ende des Assays konnte durch Entnahme eines Aliquots aus jedem *Well* der Zellkulturplatte und Messung der darin enthaltenen Radioaktivität mit Hilfe eines Flüssig-Szintillationszählers anhand der Herstellerangaben bezüglich der spezifischen Aktivität der ^{14}C -Sucrose (Verhältnis zwischen Radioaktivität und Sucrosemenge) die permeierte Sucrosemenge pro Zeiteinheit bestimmt werden.

Als Vergleich wurden verschiedene Zelllinien herangezogen, die jeweils zwei Tage vor Durchführung des Assays auf Collagen-gecoatete Inserts ausgesät wurden und zum Zeitpunkt des Assays konfluent waren. Dabei wurden folgende Zelllinien verwendet: MRC-5 (humane Fibroblasten), ECV304 (humane Nabelschnur-Endothelzelllinie), CACO-2 (humane intestitielle Epithelzellen) und MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*, canine Nieren-Epithelzellen). Als Kontrolle dienten weiterhin Collagen-IV-gecoatete Leerinserts ohne darauf wachsende Zellen. Um eine Korrelation zwischen dem transendothelialen beziehungsweise -membranen elektrischen Widerstand (T[E]ER) und der Permeabilität für Sucrose herstellen zu können, wurde vor Beginn des Assays bei sämtlichen Ansätzen eine T(E)ER-Messung durchgeführt.

3.3.2.3 Einfluss von den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhenden Substanzen und C6-Kokultur auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

Zur weiteren Validierung des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells wurde untersucht, ob die Kokultur von postkonfluenten BCEC-Monolayer mit der Glioma-Zelllinie C6 und die Zugabe von den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhenden Substanzen wie Forskolin und RO 20-1724 (vergl. 2.3.3.3) zu der zu erwartenden und mit Hilfe der TEER-Messung nachweisbaren Verringerung der Permeabilität der so behandelten BCEC-Monolayern führt.

Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts. Zunächst erfolgte die Messung des Ausgangs-TEER der für den Versuch verwendeten Inserts. Diese wurden dann in mehrere Ansätze aufgeteilt, wobei je drei Inserts pro Ansatz verwendet wurden.

Zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels der BCEC erfolgte zu Beginn des Experiments bei einem Teil der Ansätze die Zugabe des Adenylat-Cyclase-Aktivators Forskolin und/oder des Phosphodiesterase-Inhibitors RO 20-1724 zu je 50 µM in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts.

Forskolin ist ein aus *Coleus forskohlii* isoliertes zellpermeables Diterpenoid, das direkt mit der katalytischen Untereinheit der Adenylat-Cyclase interagiert, diese aktiviert und dadurch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels bewirkt (Seamon und Daly 1986, Laurenza *et al.* 1989).

RO 20-1724 (*4-[3-Butoxy-4-methoxybenzyl]-2-Imidazolidinon*) ist ein selektiver Inhibitor cAMP-spezifischer Typ-IV-Phosphodiesterasen ($IC_{50} = 2 \mu M$), so dass der cAMP-Abbau reduziert wird und dadurch der intrazelluläre cAMP-Spiegel steigt (Sheppard *et al.* 1972, Reeves *et al.* 1987, Katano und Endoh 1990).

Die Kokultur der BCEC mit der Glioma-Zelllinie C6 erfolgte in der gleichen Weise wie die unten ausführlich beschriebene Kokultur mit humanen Makrophagen (vergl. 3.4) im Rahmen eines indirekt-Kontakt-Kokultursystems, dessen experimentelles Design in Abbildung 4

schematisch dargestellt ist. Dabei befanden sich die C6-Zellen in den *Wells* der Zellkulturplatten und die postkonfluenten BCEC-Monolayer darüber auf der porösen Membran des Transwell[®]-Inserts. Die C6 wurden etwa 24 h vor Versuchsbeginn in einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² in die *Wells* der Zellkulturplatten ausplattiert und bildeten zu Beginn der Kokultur mit den BCEC einen konfluenten Monolayer. Der Beginn des Experiments und der Kokultur erfolgte durch Einsetzen der Inserts mit den BCEC-Monolayern in die *Wells* mit den darin wachsenden C6. Hierbei wurde nach der gleichen Methodik verfahren wie bei den Makrophagen-Kokultur-Experimenten (vergl. 3.4). Auch bei den Kokultur-Ansätzen erfolgte bei einem Teil der Ansätze die Zugabe von Forskolin oder RO 20-1724 zu je 50 µM. Als Kontrolle wurden ein Teil der Ansätze nicht mit C6 kokultiviert beziehungsweise erfolgte keine Zugabe von Forskolin oder RO 20-1724.

3.4 Einfluss von Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenten BCEC-Monolayer

3.4.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut und deren Kultivierung

Die Isolierung der mononukleären Zellen (Monocyten/Makrophagen und Lymphocyten) erfolgte mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation nach der Ficoll-Hypaque-Methode. Die dabei isolierten Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) bestehen zu ca. 90 % aus Lymphocyten und zu ca. 10 % aus Monocyten.

Aus der Leukocytenpräparation (*buffy coat*) eines Blutspenders (Blutspendedienst) wurden die PBMC nach folgendem Protokoll isoliert:

- 1.) Der *buffy coat* wurde mit PBS 1:2 verdünnt und gut vermischt.
- 2.) In 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen wurden je 25 ml Ficoll-Trennlsg. vorgelegt und mit je 25 ml der PBS-Zellsuspension überschichtet, wobei eine Durchmischung vermieden wurde.
- 3.) Die Zentrifugenröhrchen wurden anschließend 30 min bei 2000 rpm und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert; nach der Zentrifugation waren in den Röhrchen vier Phasen erkennbar.
- 4.) Die die mononukleären Zellen enthaltende weißliche Interphase von je zwei Zentrifugenröhrchen wurde vorsichtig abgesaugt, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt.
- 5.) Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 1500 rpm. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets von je zwei Zentrifugenröhrchen vereinigt und in 50 ml PBS resuspendiert.
- 6.) Anschließend erfolgte eine Zellzählung: 100 μ l Zellsuspension wurden 1:10 mit 900 μ l Trypanblau verdünnt und in die Kammer einer Zählplatte pipettiert.
- 7.) Es folgte eine weitere Zentrifugation unter den bei Schritt 5) beschriebenen Bedingungen. Die Überstände wurden wieder verworfen und die Pellets in Makrophagen-Kulturmedium in einer Dichte von $5-6 \cdot 10^6$ PBMC/ml aufgenommen und in die Zellkulturgefäße überführt.

Die aus dem peripheren Blut isolierten PBMC wurden zunächst in einem Teflon-Beutel kultiviert, so dass die darin enthaltenen Monocyten zu Makrophagen ausreifen konnten. Diese Kultivierungsmethode bot den Vorteil, dass die Makrophagen zu jedem beliebigen Zeitpunkt der *in vitro*-Kultur aus dem Teflon-Beutel in konventionelle Zellkulturgefäße ausplattiert werden konnten, da eine feste Adhäsion der Makrophagen an der Beutelinnenseite durch dessen hydrophobe Oberfläche verhindert wird (Andreesen *et al.* 1983b).

Die Kultivierung der Makrophagen erfolgte in einem Brutschrank mit 5 %iger CO₂-Begasung, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90 % und einer Temperatur von 37° C.

3.4.2 Einfluss unstimulierter und stimulierter Makrophagen verschiedener Differenzierungsgrade auf die Permeabilität boviner und humaner BCEC-Monolayer

Die Untersuchung der Interaktion zwischen Makrophagen und BCEC unter Verwendung des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells erfolgte im Rahmen eines indirekt-Kontakt-Kokultursystems, dessen experimentelles Design in Abbildung 4 schematisch dargestellt ist. In diesem System wurden in Zellkulturplatten wachsende Makrophagen mit postkonfluenten BCEC-Monolayern, die sich oberhalb der Makrophagen auf der porösen Membran des Transwell[®]-Inserts befanden, kokultiviert. Ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen den beiden Zelltypen war dabei nicht möglich, aber die Zellen waren in der Lage, mittels in das Medium sezernierter löslicher Faktoren miteinander zu interagieren. Durch wiederholte Messung des TEER konnte der Einfluss von Makrophagen auf die spezifischen Eigenschaften der mit ihnen kokultivierten BCEC untersucht und quantifiziert werden.

Die Durchführung sämtlicher Kokultur-Experimente erfolgte grundsätzlich am Tag 7 nach Isolierung der BCEC, da zu diesem Zeitpunkt ihre TEER-Werte das Maximum entweder erreicht oder angenähert hatten (vergl. 4.2.1). Parallel dazu wurden PBMC aus peripherem Blut isoliert und zunächst in einem Teflon-Beutel kultiviert, so dass die darin enthaltenen Monocyten zu Makrophagen ausreifen konnten (vergl. 3.4.1). Am Tag 7 nach Isolierung der PBMC wurden diese dem Teflonbeutel entnommen und in 12-Well-Zellkulturplatten ausplattiert ($1 \cdot 10^6$ Makrophagen/Well beziehungsweise 250.000 Makrophagen/cm²). In weiteren Experimenten erfolgte die Kultivierung der PBMC im Teflonbeutel über einen deutlich längeren Zeitraum von 14 beziehungsweise 21 Tagen, um auch den Einfluss von Makrophagen fortgeschritteneren Differenzierungsgrades auf die BCEC untersuchen zu können. Da Makrophagen im Verlauf ihrer Ausreifung beträchtlich an Größe zunehmen, erfolgte die

Aussaat der 14 d im Teflon-Beutel kultivierten Makrophagen in einer Dichte von 200.000 Zellen/cm² beziehungsweise 150.000 Zellen/cm² bei den 21 d im Teflon-Beutel kultivierten Makrophagen.

Etwa 2 h nach Ausplattierung hatten die Makrophagen fest adhärert, sich ausgebreitet und einen konfluenten Zellrasen gebildet, so dass die nichtadhärenten Lymphocyten durch wiederholte gründliche Waschschrte quantitativ entfernt werden konnten. Anschließend wurden die in den Zellkulturplatten verbliebenen Makrophagen 1 d weiterkultiviert.

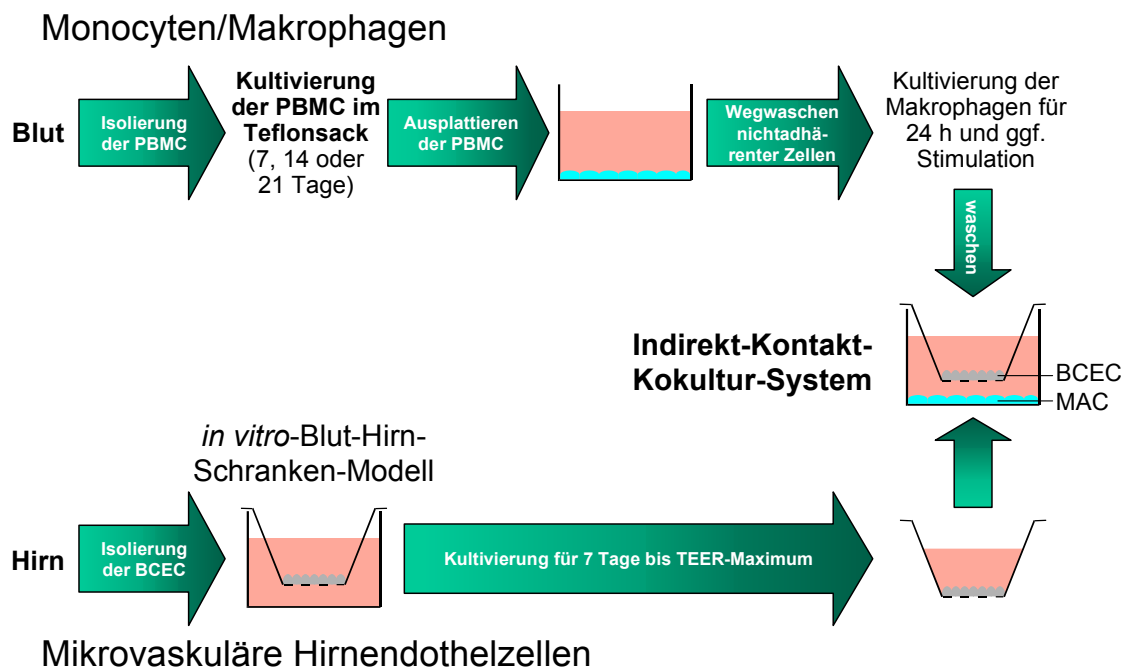


Abb. 4) Schematische Darstellung des indirekt-Kontakt-Kokultursystems von Makrophagen mit mikrovaskulären Hirndothelzellen (BCEC) unter Verwendung des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells.

Um zu untersuchen, ob eine proinflammatorische Stimulation der Makrophagen eine Auswirkung auf ihren Einfluss auf die kokultivierten BCEC hat, wurde ein Teil der Makrophagen-Populationen vor Beginn der Kokultur für 24 h mit einem Cytokin-Mix aus GM-CSF (100 ng/ml), M-CSF (100 ng/ml), IL-4 (1 U/ml) und TNF- α (50 ng/ml) oder mit LPS (100 ng/ml) für 4 h beziehungsweise 24 h stimuliert. Nach Ende der Stimulation wurden sämtliche Makrophagen-Kulturen gründlich gewaschen und anschließend die Inserts mit den darauf wachsenden bovinen BCEC in die *Wells* mit den Makrophagen eingesetzt (je drei Inserts pro Ansatz). Um eine gravierende Störung des *in vitro*-BHS-Systems auszuschließen (vergl. 4.4.1), wurde kein Medienwechsel bei den BCEC durchgeführt, d.h. die Inserts wurden

mit gefülltem oberen Kompartiment umgesetzt und das untere Kompartiment des Transwell[®]-Systems mit dem gleichen Medium aus dem *Well* gefüllt, aus dem das Insert ursprünglich entnommen wurde. Dieses Medium wurde zur Entfernung von abgestorbenen Zellen beziehungsweise Zellbestandteilen filtriert (0,22 µm), um eine Aktivierung der Makrophagen durch phagocytische Aktivitäten zu vermeiden.

Die oben beschriebenen Experimente, bei denen bovine BCEC mit humanen Makrophagen kokultiviert wurden, konnten durch die Möglichkeit der Aufarbeitung einer geeigneten humanen Hirnprobe und Isolierung und Verwendung von humanen mikrovaskulären Hirndothelzellen im homologen System wiederholt werden. Das hierfür aufgearbeitete humane Hirnmaterial entstammte einem knapp vier Jahre alten männlichen Kind, das infolge Ersticken verstorben war. Aufgrund der vergleichsweise geringen Liegezeit des Leichnams bis zur Entnahme der Hirnprobe (etwa 6,5 h) war das entnommene Material noch hinreichend frisch, so dass die Aufarbeitung ausreichend Kapillarfragmente für die Aussaat auf die zur Durchführung der Experimente erforderliche Anzahl von Inserts lieferte. Die isolierten humanen BCEC erwiesen sich zudem als vital und zeigten Proliferationsaktivität. Die Durchführung des Kokultur-Experiments erfolgte am Tag 9 nach Isolierung der humanen BCEC, da zu diesem Zeitpunkt deren TEER einen ausreichend hohen Wert von etwa 200 Ω·cm² erreicht hatte und keine weitere Steigerung mehr erfolgte. Die Kokultur der humanen BCEC erfolgte mit unterschiedlich lange differenzierten Makrophagen zweier verschiedener Spender, die vor ihrer Aussaat in die Zellkulturplatten und anschließender Stimulation für 7 d beziehungsweise 14 d im Teflon-Beutel kultiviert wurden. Die Durchführung des Kokultur-Experiments erfolgte mit der bereits beschriebenen Methodik.

Zur Kontrolle und zum Vergleich wurde in einigen Experimenten in zusätzlichen parallelen Ansätzen die BCEC-Monolayer mit der Glioma-Zelllinie C6 (vergl. 3.3.2.3) sowie mit der humanen Fibroblasten-Zelllinie MRC-5 kokultiviert. Die in Zellkulturflaschen gehaltenen Zelllinien wurden trypsinisiert, abzentrifugiert, anschließend in einer geeigneten Menge

Medium resuspendiert und in die Zellkulturplatten in einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² ausplattiert. Nach etwa 24 h hatten beide Zelllinien einen konfluenten Zellrasen ausgebildet, und das Kokultur-Experiment konnte durchgeführt werden. Hierbei wurde die gleiche Methodik verwendet wie bei den oben beschriebenen Makrophagen-Kokultur-Experimenten.

Bei sämtlichen Kokultur-Experimenten wurden kurz vor deren Beginn die Ausgangs-TEER-Werte der jeweils verwendeten Inserts bestimmt, und nach Einsetzen der Inserts in die Platten mit den Makrophagen wurde der TEER täglich erneut gemessen.

3.4.3 Einfluss Makrophagen-konditionierten Mediums auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer und Vergleich mit Zelllinien

Um zu untersuchen, welchen Einfluss Makrophagen-konditioniertes Medium - also Medium, in dem Makrophagen für einen längeren Zeitraum kultiviert wurden und in dem sich Stoffwechselprodukte der Makrophagen angesammelt haben – auf die Permeabilität von damit inkubierten BCEC-Monolayern hat, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Hierzu wurden Makrophagen nach ihrer Isolierung zunächst 7 d in Teflon-Beuteln vorkultiviert und dann mit der gleichen Methodik wie bei den oben beschriebenen Kokultur-Experimenten (vergl. 3.4.2) in 12-Well-Platten in einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² ausplattiert und nach 2 h die nichtadhärenten Lymphocyten durch gründliches Waschen entfernt. Als Kontrolle und Vergleich wurde in zusätzlichen parallelen Ansätzen Zellen der Glioma-Zelllinie C6 sowie der humanen Fibroblasten-Zelllinie MRC-5 in der gleichen Dichte wie die Makrophagen in die Zellkulturplatten ausplattiert. Die Kulturen wurden nun zunächst für drei Tage in ihrem jeweiligen Medium weiterkultiviert (Makrophagen-Medium bei den Makrophagen beziehungsweise Zelllinien-Medium bei C6 und MRC-5). Zu diesem Zeitpunkt waren sämtliche Kulturen konfluent. Zur Entfernung von abgestorbenen beziehungsweise abgelösten Zellen wurden sie nun gründlich gewaschen und das Medium auf das standardmäßig verwendete BCEC-Medium # 3 umgestellt. Nach weiteren 5 Tagen erfolgte die Abnahme des von der

jeweiligen Zellpopulation konditionierten Mediums und die Durchführung des Experiments. Hierzu wurde das konditionierte Medium zur Entfernung von abgestorbenen Zellen beziehungsweise Zellbestandteilen zunächst filtriert (0,22 μm) und dann in neue 12-Well-Zellkulturplatten pipettiert (1,5 ml pro *Well*).

Zum Versuchsbeginn wurden die Inserts mit den darauf kultivierten bovinen BCEC nach Messung ihrer Ausgangs-TEER-Werte in die Zellkulturplatten mit dem vorgelegten konditionierten Medium eingesetzt (je drei Inserts pro Ansatz). Dabei erfolgte kein Medienwechsel im oberen Kompartiment der umgesetzten Inserts. Zur Kontrolle wurden bei einem Ansatz die Inserts in leere *Wells* eingesetzt und das untere Kompartiment des Transwell[®]-Systems mit dem gleichen und filtrierten (0,22 μm) Medium aus dem *Well* gefüllt, aus dem das Insert ursprünglich entnommen wurde.

Im Rahmen der Experimente mit HIV-infizierten Makrophagen wurden weitere Versuche mit Makrophagen-konditioniertem Medium durchgeführt (vergl. 3.4.5).

3.4.4 Einfluss HIV-1-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

Für die Kokultur von BCEC mit HIV-1-infizierten Makrophagen wurden die im Teflonsack kultivierten PBMC am Tag 7 nach Isolierung diesem entnommen, die darin enthaltenen Makrophagen in einer Dichte von 250.000 Makrophagen/cm² in Zellkulturplatten ausplattiert und nach 2 h die nichtadhärenten Lymphocyten durch gründliches Waschen quantitativ entfernt (vergl. 3.4.2). Nach eintägiger Kultivierung erfolgte die Infektion der Makrophagen mit zwei unterschiedlichen HIV-1-Isolaten, entweder mit dem Isolat 117_{III} oder mit Ada-M, durch 24-stündige Inkubation mit entsprechendem virushaltigem Überstand. Hierzu wurden zu 0,7 ml Kulturmedium der zu infizierenden Makrophagen-Kulturen je 0,3 ml der HIV-117_{III}- oder HIV-Ada-M-Saatvirus-Stammcharge zugegeben. Die TCID₅₀-Werte der verwendeten Saatvirus-Stammchargen betragen 2,2·10⁴/ml (117_{III}) beziehungsweise 3,5·10⁴/ml (Ada-M), die virale *Reverse Transkriptase*(RT-)Aktivität (siehe unten) betrug bei der 117_{III}-Stammcharge 1.900.000 cpm/ml/90 min und bei der Ada-M-Stammcharge 684.000 cpm/ml/90 min. Als

resultierende RT-Aktivität im Kulturmedium der Makrophagen ergab sich somit 570.000 cpm/ml/90 min bei den mit 117_{III} zu infizierenden Kulturen und 205.200 cpm/ml/90 min bei den mit Ada-M zu infizierenden Kulturen. Zur Kontrolle blieb ein Teil der Makrophagen-Kulturen uniniziert.

Nach 24 h wurde bei sämtlichen Makrophagen-Kulturen der Überstand weggewaschen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Makrophagen wurden anschließend für weitere 6 Tage kultiviert, um eine möglichst weitgehende Durchinfektion der Kulturen zu erreichen. Diese konnte vor Beginn des eigentlichen Kokultur-Experiments durch mikroskopische Begutachtung der infizierten Kulturen anhand des Vorhandenseins der für HIV-infizierte Makrophagen charakteristischen cytopathischen Effekte und das Auftreten von mehrkernigen Synzytien festgestellt werden.

Am Tag 7 nach Infektion beziehungsweise Tag 15 nach Isolierung der Makrophagen wurde das Kokultur-Experiment mit den BCEC begonnen. Die Durchführung erfolgte nach der gleichen Methodik, die bereits bei den Kokultur-Experimenten von BCEC mit unstimulierten beziehungsweise verschieden stimulierten Makrophagen angewandt wurde (vergl. 3.4.2), am Tag 7 nach Isolierung der BCEC durch Einsetzen der Transwell[®]-Inserts mit den BCEC-Monolayern in die Zellkulturplatten mit den uninizierten beziehungsweise HIV-1-infizierten Makrophagen-Kulturen. Vor Beginn der Kokultur erfolgte die Bestimmung des Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts.

Um die produktive Infektion der Makrophagen mit HIV zu verifizieren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf des Kokultur-Experiments den Kulturmedien der HIV-infizierten Makrophagen-Kulturen Proben entnommen und die darin enthaltene Aktivität des HIV-spezifischen Enzyms *Reverse Transkriptase* (RT) bestimmt. Die Entnahme dieser Aliquots erfolgte aus dem Überstand von nicht mit BCEC kokultivierten Makrophagen-Kulturen, die parallel zu den für die Kokultur mit den BCEC verwendeten Makrophagen-Populationen

gehalten und bis zum Beginn des Kokultur-Experiments in gleicher Weise wie diese behandelt wurden.

Das in den einzelnen zellfreien Kulturüberständen enthaltene Virus wurde zunächst durch Ultrazentrifugation ($400.000 \times g$, 7 min) pelletiert, anschließend in TSAM-Puffer resuspendiert und in Reaktionsgefäße überführt. Nach Aufschluss des Virus durch Zugabe von Lysispuffer wurde die Reverse Transkriptase-Reaktion durch Zugabe der RT-Substratlösung und anschließender Inkubation bei 37°C für 90 min eingeleitet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die enzymatische Umsetzung im Reaktionsgemisch durch Zugabe einer 10 %igen N-Lauroylsarkosin-Lösung abgestoppt. Eine geeignete Menge der Proben wurde dann auf ein Stück Filterpapier verteilt, dieses anschließend getrocknet und danach mehrmals gewaschen. Die Filterpapiere mit den darauf aufgetragenen Proben wurden schließlich in Messröhrchen überführt, diese mit Szintillations-Lösung gefüllt und die darin enthaltene RT-Aktivität in einem Szintillationszähler gemessen.

3.4.5 Einfluss konditioniertem Mediums HIV-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

Die Herstellung von konditioniertem Medium HIV-infizierter Makrophagen erfolgte parallel zu den Kokultur-Experimenten von BCEC mit HIV-infizierten Makrophagen mit der dort beschriebenen Methodik. Die Makrophagen-Kulturen, die zur Herstellung des konditionierten Mediums (*conditioned medium*, CM) dienten, wurden somit in gleicher Weise behandelt wie die für die Kokultur verwendeten Makrophagen-Ansätze (vergl. 3.4.4).

Zum Zeitpunkt des Beginns der Kokultur in den parallelen Ansätzen wurde bei den für die Herstellung des CMs verwendeten Makrophagen-Kulturen ein Medienwechsel durchgeführt und frisches BCEC-Medium # 3 in die *Wells* mit den verschiedenen Makrophagen-Ansätzen (uninfiziert beziehungsweise mit dem HIV-1-Isolat 117_{III} oder Ada-M infiziert) pipettiert (1,5 ml/*Well*). Für einen Kontrollansatz mit unkonditioniertem Medium erfolgte die Zugabe von frischem Medium in leere *Wells* ohne darin wachsende Makrophagen. Aufgrund der mit diesem

Kontroll-Medium im anschließenden Inkubationsversuch gemachten Ergebnisse wurde in einem weiteren Experiment auf diesen Kontrollansatz verzichtet (vergl. 4.3.6).

Die Abnahme des Makrophagen-konditionierten Mediums erfolgte nach 2 beziehungsweise 6 Tagen. Dieses wurde zur Entfernung von abgestorbenen Zellen beziehungsweise Zellbestandteilen zunächst mit 2000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. Die Verwendung des CMs und die Inkubation der BCEC-Monolayer erfolgte unmittelbar daran anschließend. Hierzu wurde das CM in neue 12-Well-Zellkulturplatten pipettiert (1,5 ml pro *Well*) und danach die Inserts mit den darin wachsenden bovinen BCEC nach Messung ihrer Ausgangs-TEER-Werte in die *Wells* mit dem vorgelegten CM eingesetzt (je drei Inserts pro Ansatz). Auch hierbei erfolgte kein Medienwechsel im oberen Kompartiment der umgesetzten Inserts. Zur Kontrolle wurden bei einem Ansatz die Inserts in leere *Wells* eingesetzt und das untere Kompartiment des Transwell[®]-Systems mit dem gebrauchten Medium aus dem *Well* gefüllt, aus dem das Insert ursprünglich entnommen wurde.

Die Durchführung der beiden Inkubationsexperimente mit dem CM HIV-infizierter Makrophagen erfolgte am Tag 9 beziehungsweise Tag 6 nach Isolierung der bovinen BCEC. Diese zeitlichen Abweichungen zwischen den beiden Experimenten beruhten auf der unterschiedlich langen Herstellungszeit des CMs und der Vorgabe, dieses ohne weitere Lagerung unmittelbar nach dessen Abnahme zu verwenden.

3.4.6 Untersuchung der an der Makrophagen-BCEC-Interaktion beteiligten Signaltransduktionswege

In weiterführenden Experimenten sollte die Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege an dem von Makrophagen ausgeübten Effekt auf die Permeabilität der mit ihnen kokultivierten BCEC-Monolayer näher untersucht werden. Hierzu wurden zu Beginn des jeweiligen Kokultivierungsversuchs bei einem Teil der durchgeführten Ansätze die BCEC zusätzlich mit Substanzen behandelt, die Schlüsselenzyme bestimmter Signaltransduktionswege beeinflussen. Sofern eine ausreichende Anzahl von geeigneten Inserts zur Verfügung stand, wurden als Vergleich in parallelen Ansätzen entsprechende Inkubationen bei mit Zellen der Glioma-Zelllinie C6

kokultivierten BCEC-Monolayern durchgeführt. Die Durchführung der Kokultur-Experimente erfolgte dabei mit der gleichen Methodik, mit der sämtliche bisher beschriebenen Kokultur-Experimente von BCEC mit unstimulierten und verschiedenen stimulierten Makrophagen beziehungsweise C6 durchgeführt wurden, also am Tag 7 nach Isolierung der BCEC beziehungsweise Tag 8 nach Isolierung der Makrophagen (vergl. 3.4.2).

Die zu Beginn des Kokultur-Experiments durchgeführte Zugabe der jeweiligen zu untersuchenden Substanz erfolgte grundsätzlich in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts, um eine Beeinflussung der Makrophagen durch deren Wirkung nach Möglichkeit auszuschließen beziehungsweise zu reduzieren. Da die meisten der verwendeten Substanzen allerdings Zell-permeabel sind, sind sie somit in der Lage, auch einen hochimpermeablen BCEC-Monolayer zu überwinden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass im Laufe der Zeit eine zunehmende Anreicherung dieser Substanzen im unteren Kompartiment bis zum Konzentrationsausgleich zwischen oberem und unterem Kompartiment des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells erfolgte und somit eine Beeinflussung der Makrophagen möglich war. Um eine potentielle Beeinflussung der Makrophagen und deren Wirkung auf die mit ihnen kokultivierten BCEC durch die verwendeten Substanzen zeigen beziehungsweise eingrenzen zu können, wurden in zusätzlichen Ansätzen die Makrophagen bis kurz vor Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h mit der entsprechenden Substanz präinkubiert.

Als Kontrolle erfolgte in parallelen Ansätzen keine Kokultur und keine Zugabe der Substanz beziehungsweise keine Kokultur mit Zugabe der Substanz.

3.4.6.1 Adenylat-Cyclase-cAMP-Signaltransduktionsweg

Zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels erfolgte zu Beginn des Kokultur-Experiments entweder die Zugabe des Adenylat-Cyclase-Aktivators Forskolin oder des Phosphodiesterase-Inhibitors (PDEI) RO 20-1724 zu je 50 μM zu den BCEC in das obere Kompartiment des Inserts (vergl. 3.3.2.3).

Um eine eventuelle Beteiligung der Adenylat-Cyclase an dem von Makrophagen ausgeübten Einfluss auf die Permeabilität der mit ihnen kokultivierten BCEC-Monolayer zeigen zu können, wurden die BCEC in weiteren Kokultur-Experimenten mit dem Adenylat-Cyclase-Inhibitor **SQ22536** (*9-(Tetrahydro-2'-furyl)Adenine*) behandelt. Hierbei handelt es sich um eine zellpermeable Substanz, die die Prostaglandin E₁-induzierte cAMP-Produktion in Thrombocyten-Lysaten (IC₅₀ = 82 µM) und intakten Thrombocyten (IC₅₀ = 1 µM) inhibiert (Harris *et al.* 1979). SQ22536 wurde bereits in vielen Studien verwendet, um die Beteiligung der Adenylat-Cyclase in einer Vielzahl von Rezeptorsystemen einschließlich der für Prostaglandine (Harris *et al.* 1979, Tamaoki *et al.* 1993) und Neurotransmitter (Dixon und Atwood 1989, Shi und Bunney 1992) zu zeigen. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte wiederum zu Beginn des Kokultur-Experiments in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts in einer Endkonzentration von 100 µM.

3.4.6.2 Protein-Kinasen

Um eine eventuelle Beteiligung verschiedener Protein-Kinasen an dem von Makrophagen ausgeübten Einfluss auf die Permeabilität der mit ihnen kokultivierten BCEC-Monolayer zu untersuchen, erfolgte zu Beginn des jeweiligen Kokultur-Experiments die Zugabe entweder des Protein-Kinase-Aktivators *1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol* (OAG) oder der Protein-Kinase-Inhibitoren **H-7** (*1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine · 2 HCl*) beziehungsweise **H-8** (*N-2-(Methylamino)ethyl-5-isoquinoline-Sulfonamide · 2 HCl*) zu den BCEC in das obere Kompartiment des Inserts.

Bei OAG handelt es sich um ein zellpermeables unphysiologisches Diacylglycerol, das einen potenten Aktivator der Protein-Kinase C darstellt (Mori *et al.* 1982, Kaibuchi *et al.* 1983). Die OAG-Inkubation der BCEC erfolgte mit einer Konzentration von 50 µg/ml.

H-7 ist ein zellpermeabler Inhibitor mehrerer Protein-Kinasen; es inhibiert die Protein-Kinase A (K_i = 3 µM), Protein-Kinase G (K_i = 5,8 µM), Protein-Kinase C (K_i = 6 µM) und MLCK (K_i = 97 µM) (Hidaka *et al.* 1984). H-8 ist ebenfalls ein zellpermeabler Inhibitor verschiedener

Protein-Kinasen, es inhibiert die Protein-Kinase A ($IC_{50} = 1,2 \mu\text{M}$), Protein-Kinase G ($IC_{50} = 0,48 \mu\text{M}$), Protein-Kinase C ($IC_{50} = 15 \mu\text{M}$) und MLCK ($IC_{50} = 68 \mu\text{M}$) (Hidaka *et al.* 1984, Hagiwara *et al.* 1987). Die Zugabe der Protein-Kinase-Inhibitoren H-7 und H-8 in das obere Kompartiment der Inserts erfolgte jeweils in einer Endkonzentration von $50 \mu\text{M}$.

3.4.6.3 Weitere Signaltransduktions-Mediatoren: Phospholipase C und Ca^{2+} -Calmodulin

Um eine eventuelle Beteiligung der Phospholipase C-Phosphoinositid- oder der Ca^{2+} -Calmodulin-Signalübertragungs-Kaskade an dem von Makrophagen ausgeübten Einfluss auf die Permeabilität der kokultivierten BCEC-Monolayer zeigen zu können, wurden die BCEC in einem weiteren Kokultur-Experiment mit dem Phospholipase C-Inhibitor **U-73122** (*1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione*) sowie dem Calmodulin-Inhibitor **W-7** (*N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-Naphtalene-Sulfonamide-HCl*) behandelt.

Das zellpermeable U-73122 inhibiert die Agonisten-induzierte Phospholipase C-Aktivierung ($IC_{50} = 1,0-2,1 \mu\text{M}$) in humanen Thrombocyten (Smith *et al.* 1990a) und Neutrophilen (Bleasdale *et al.* 1990), wobei es nicht Isotyp-selektiv ist. In vielen Studien wurde es als ein nützliches Werkzeug verwendet, um einen Rezeptor-vermittelten Phosphoinositid-Umsatz bei der Signaltransduktion zu untersuchen (Yule und J.A. 1992). Die Zugabe dieses Inhibitors erfolgte zu Beginn des Kokultur-Experiments in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$.

Das zellpermeable W-7 bindet an Calmodulin und verhindert dadurch eine Ca^{2+} -Calmodulin-vermittelte Regulation der Enzymaktivität; es inhibiert z.B. die Ca^{2+} -Calmodulin-regulierte Aktivierung der *myosin light chain kinase* (MLCK) in einer konzentrationsabhängigen Weise (Hidaka *et al.* 1981, Tanaka 1983). Die Zugabe des W-7 in das obere Kompartiment der Inserts erfolgte in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$.

3.5 Weitere physiologische Studien

3.5.1 Einfluss von Serum auf die Permeabilität postkonfluenten BCEC-Monolayer

Bei der Arbeit mit dem *in vitro*-BHS-Zellkultur-Modell konnte wiederholt die Beobachtung gemacht werden, dass nach Ausbildung eines konfluenten BCEC-Monolayers auf den Transwell®-Inserts und Erreichen eines hohen TEER der postkonfluenten BCEC-Monolayer ein Medienwechsel innerhalb kurzer Zeit zu einem deutlichen Einbruch des TEER führte. Im Extremfall konnte sogar die komplette Auflösung des BCEC-Monolayers beziehungsweise seine Ablösung von der porösen Membran des Inserts erfolgen. Da bekannt ist, dass Serum einen starken Einfluss auf die Integrität von Epithelzell-Monolayern ausüben kann (vergl. 5.4), lag die Vermutung nahe, dass das oben beschriebene Phänomen durch das im Medium enthaltene Serum verursacht worden sein könnte.

Um dies näher zu untersuchen, wurden bei postkonfluenten bovinen BCEC-Monolayern Inkubationsversuche mit frischem Serum durchgeführt. Hierzu wurden BCEC nach der Isolierung und Aussaat auf die Inserts zunächst zwei Tage in BCEC-Medium # 1 kultiviert. Am Tag 2 *in vitro* erfolgte die Umstellung auf Serum-freie Kulturbedingungen durch Wechsel des Mediums auf BCEC-SFM, in dem die BCEC weitere 6 Tage kultiviert wurden. Am Tag 8 nach Isolierung der Zellen erfolgte die Durchführung des Experiments. Zunächst wurde der Ausgangs-TEER der für den Versuch verwendeten Inserts gemessen. Zu Beginn des Experiments erfolgte bei einem Teil der Ansätze die Zugabe von 50 µl FCS in das obere Kompartiment der Inserts. Da das Füllvolumen des oberen Kompartiments 500 µl beträgt, ergab sich somit eine FCS-Konzentration von 10 % im oberen Kompartiment, was der Konzentration im Medium bei Serum-haltiger Kultivierung der BCEC entsprach (vergl. 3.2.2.5). Eine der zugegebenen Menge FCS entsprechende Menge Medium wurde vorher dem oberen Kompartiment entnommen. Beim Kontroll-Ansatz erfolgte keine Zugabe. Anschließend erfolgte eine erneute Messung des TEER zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Experiments.

Um zu untersuchen, ob der Einfluss von Serum auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern auf einer eventuellen endocytotischen Aufnahme von Serum-Bestandteilen durch die Hirnendothelzellen und damit einhergehender Beeinflussung beziehungsweise Öffnung der *tight junctions* begründet liegt, wurden bei einem Teil der Ansätze die BCEC vor Zugabe des Serums 1 h mit 1 µg/ml *Cytochalasin B* präinkubiert. Hierbei handelt es sich um ein Pilzalkaloid, das bei eukaryotischen Zellen an die freien Enden von Aktin-Filamenten bindet, wodurch die Assoziation und Dissoziation von Untereinheiten verhindert und somit die von einer Aktin-Polymerisation abhängigen Prozesse, wie beispielsweise die Endocytose, blockiert werden (Cooper 1987). Die Zugabe des Cytochalasins B erfolgte in beide Kompartimente; ein Teil der Ansätze blieb zur Kontrolle unbehandelt.

Insgesamt wurden also vier Ansätze durchgeführt (je drei Inserts pro Ansatz): Kontrolle ohne Zugabe, Kontrolle ohne Zugabe mit Inkubation mit 1 µg/ml Cytochalasin B, Zugabe von 10 % FCS und Zugabe von 10 % FCS bei vorheriger einstündiger Inkubation mit 1 µg/ml Cytochalasin B.

Bei dem oben beschriebenen Experiment erfolgte die Kultivierung der BCEC nach dem Medienwechsel am Tag 2 *in vitro* unter Serum-freien Bedingungen. Um zu überprüfen, ob der gefundene Effekt von Serum auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer (vergl. 4.4.1) auch bei BCEC-Kulturen auftritt, die unter Serum-haltigen Bedingungen kultiviert wurden, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Hierbei wurden wieder bovine Hirnendothelzellen nach ihrer Isolierung und der Aussaat auf die Inserts zunächst zwei Tage in BCEC-Medium # 1 kultiviert. Am Tag 2 *in vitro* erfolgte bei einer Hälfte der Kulturen die Umstellung auf Serum-freie Kulturbedingungen durch Wechsel des Mediums auf BCEC-SFM, die andere Hälfte wurde unter Serum-haltigen Bedingungen in BCEC-Medium # 2 weiterkultiviert. Die Durchführung des Experiments erfolgte wieder am Tag 8 *in vitro* mit der gleichen Methodik wie im oben beschriebenen Versuch parallel in den beiden mit unterschiedlichen Medien kultivierten Populationen. Insgesamt wurden pro Population wieder vier Ansätze durchgeführt (je drei Inserts pro Ansatz): Kontrolle ohne Serum-Zugabe, Kontrolle

ohne Serum-Zugabe mit Inkubation mit 1 µg/ml Cytochalasin B, Zugabe von 10 % FCS und Zugabe von 10 % FCS bei vorheriger einstündiger Inkubation mit 1 µg/ml Cytochalasin B.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der gefundene Effekt von Serum auf die Permeabilität boviner BCEC-Monolayer Spezies-spezifisch ist, d.h. nur bei Serum bovinen Ursprungs auftritt, oder ob auch Serum einer anderen Spezies wie beispielsweise Humanserum die gleiche Wirkung auf bovine BCEC hat. Hierzu wurden wieder auf Inserts kultivierte bovine BCEC am Tag 2 *in vitro* durch Wechsel des Mediums auf BCEC-SFM bis zur Durchführung des Experiments am Tag 8 *in vitro* unter Serum-freien Bedingungen kultiviert. Die Methodik des Versuchs entsprach der der oben beschriebenen Experimente, allerdings wurde diesmal auf eine Vorinkubation der BCEC-Monolayer mit Cytochalasin B verzichtet, da dieses in den vorangegangenen Experimenten keinen Einfluss zeigte (vergl. 4.4.1). Vor Zugabe des Serums wurden wiederum die Ausgangs-TEER-Werte der verwendeten Inserts gemessen. Anschließend erfolgte bei einem Ansatz die Zugabe von 50 µl humanem Serum aus einem hausinternem Spender-Pool („GSH-Pool“) in das obere Kompartiment der Inserts, bei einem weiteren Ansatz wurde die gleiche Menge kommerzielles humanes AB-Serum zugegeben (drei Inserts pro Ansatz); beim Kontroll-Ansatz erfolgte keine Zugabe. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Experiments der TEER erneut gemessen.

3.5.2 Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) auf die durch TEER-Messung bestimmte Permeabilität von damit behandelten BCEC-Monolayern näher untersucht werden. Hierbei wurde das gleiche LPS verwendet, welches auch für die proinflammatorische Stimulation der Makrophagen (vergl. 3.4.2) benutzt wurde.

Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 8 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts. Kurz vor Zugabe des LPS wurde der Ausgangs-TEER der für den Versuch verwendeten Inserts bestimmt. Zu Beginn des Experiments erfolgte die Zugabe des LPS in

beide Kompartimente in drei verschiedenen Endkonzentrationen von 1, 10 und 100 ng/ml, beim Kontrollansatz die Zugabe des Lösungsmittels (unsupplementiertes DMEM) ohne LPS (pro Ansatz wurden drei Inserts verwendet). Anschließend wurde der TEER zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Experiments erneut gemessen.

3.6 Einfluss von Nanopartikeln auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

In den folgenden beschriebenen Experimenten wurde unter Anwendung des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells untersucht, welchen Einfluss *Polybutylcyanoacrylat*-(PBCA-)Nanopartikel auf die Permeabilität boviner BCEC-Monolayer haben, und ob dieser zu einer Beeinflussung des TEER und der parazellulären Permeabilität für Makromoleküle der mit diesen Partikeln inkubierten BCEC-Monolayer führt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Nanopartikel-Präparationen verwendet: native ungecoatete Nanopartikel und mit dem Emulgator Polysorbat 80 (PS 80) gecoatete Nanopartikel.

Die Durchführung der Experimente erfolgte durchgehend am Tag 8 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts. Die Kultivierung der BCEC erfolgte dabei nicht mit dem standardmäßig verwendeten BCEC-Medium # 3, da das hierfür als Grundmedium dienende M199 Polysorbat 80 enthält, was die Ergebnisse der Nanopartikel-Inkubationsversuche und den Vergleich zwischen ungecoateten und PS 80-gecoateten PBCA-Nanopartikeln bei der Zugabe zu den BCEC-Monolayern beeinflusst hätte. Deshalb erfolgte die Kultivierung der für diese Experimente verwendeten BCEC mit dem BCEC-Medium # 2. In einem Experiment wurden die BCEC mit Serum-freien BCEC-Medium (BCEC-SFM) kultiviert, um einen eventuellen Einfluss von Serumfaktoren auf die Wirkung der Nanopartikel herauszufinden.

3.6.1 Herstellung von Polybutylcyanoacrylat-(PBCA)-Nanopartikeln

Die Herstellung von PBCA-Nanopartikeln erfolgte nach dem Prinzip der anionisch katalysierten Emulsionspolymerisation (Couvreur *et al.* 1979) und wurde von Herrn Sebastian Steininger (Institut für Pharmazeutische Technologie, J.W.G.-Universität Frankfurt) durchgeführt. Zu einer Dextran-Lösung (1 % (w/v) Dextran 70.000 in 0,01 M HCl) wurde das Butylcyanoacrylat-Monomer bis zu einer Endkonzentration von 1 % (v/v) langsam hinzutropft. An der Grenzschicht zwischen den lipophilen Monomertropfen erfolgte nun die Polymerisationsreaktion. Diese wurde nach 4 h durch Zugabe von 1 M Natronlauge bis zur pH-Wert-Neutralisierung beendet. Die Nanopartikel-Suspension wurde dann durch einen Glasfilter (Porenweite G3) filtriert und anschließend dreimal durch Ultrazentrifugation gereinigt, um insbesondere nicht umgesetztes PBCA-Monomer abzutrennen. Hierzu wurden die Nanopartikel 1 h mit 90.000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in frischem Lösungsmittel (PBS) mit Hilfe eines Ultraschallbades resuspendiert.

Nach der Reinigung wurden die gewonnenen Partikel durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS) charakterisiert und der Polymergehalt durch Trocknung von Aliquoten bestimmt. Anschließend wurde in gleichem Mengenverhältnis zum Polymer Glucose dazugegeben und die Suspension gefriergetrocknet. Für die Inkubations-Experimente wurden entsprechende Teilmengen einer Nanopartikelcharge frisch in PBS resuspendiert und direkt verwendet.

3.6.2 Coating der PBCA-Nanopartikel mit Polysorbat 80 (PS 80)

Die Herstellung von PS 80-gecoateten PBCA-Nanopartikeln erfolgte durch Adsorption des Tensids an die Oberflächenmatrix der Partikel. Hierzu wurde PS 80 in einer Konzentration von 1 % (v/v) zu einer 1%igen PBCA-Nanopartikelsuspension gegeben und die Mischung anschließend bei 400 rpm für 30 min gerührt.

3.6.3 Einfluss verschiedener Nanopartikel-Präparationen auf den TEER postkonfluenten BCEC-Monolayer

Wie bereits erwähnt, erfolgte die Durchführung der Nanopartikel-Inkubationsversuche am Tag 8 nach Isolierung der BCEC und deren Aussaat auf die Inserts.

Im ersten hier vorgestellten Experiment wurden die BCEC unter Serum-freien Bedingungen mit BCEC-SFM kultiviert. Kurz vor dem Beginn der Nanopartikel-Inkubation wurden die TEER-Werte der für den Versuch verwendeten Inserts gemessen. Anschließend wurden zwei unterschiedliche Nanopartikel-Präparationen (ungeoated und PS 80-geoated) in jeweils drei verschiedenen Endkonzentrationen (1, 2 und 10 µg/ml) in das obere Kompartiment des jeweiligen Inserts gegeben (je drei Inserts pro Ansatz). Als Kontrolle erfolgte bei einem Ansatz die Zugabe des Lösungsmittels (PBS) ohne Nanopartikel, bei einem weiteren Kontroll-Ansatz wurde Lösungsmittel mit Polysorbat 80 in das obere Kompartiment gegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 10 µg/ml Polysorbat 80 ergab. In definierten Zeitintervallen nach der Zugabe wurden nun der TEER erneut gemessen.

In einem weiteren, analog durchgeführten Inkubations-Experiment erfolgte die Kultivierung der BCEC unter Serum-haltigen Bedingungen mit dem BCEC-Medium # 2. Diesmal erfolgte die Zugabe der beiden unterschiedlichen Nanopartikel-Präparationen (ungeoated und PS 80-geoated) in nur zwei verschiedenen Endkonzentrationen (5 und 10 µg/ml), da die niedrigeren Nanopartikel-Konzentrationen im obigen Experiment keine Wirkung zeigten (vergl. 4.5).

3.6.4 Einfluss verschiedener Nanopartikel-Präparationen auf die parazelluläre Permeabilität postkonfluenten BCEC-Monolayern für ¹⁴C-Sucrose

Um zu untersuchen, ob die mit Hilfe der TEER-Messung gefundene Wirkung der Nanopartikel auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern für Elektrolyte (vergl. 3.6.3) auch die parazelluläre Permeabilität für Makromoleküle betrifft, wurden weitere Nanopartikel-Inkubations-Experimente im Rahmen eines Permeabilitätsassays mit radioaktiv markierter Sucrose durchgeführt.

Die Methodik des Permeabilitätsassays war gleich der, mit der die Validierung des *in vitro*-BHS-Modells erfolgte (vergl. 3.3.2.2). Zu Beginn des Assays wurde eine definierte Menge ^{14}C -Sucrose zusammen mit der jeweiligen Nanopartikel-Suspension in das obere Kompartiment des Inserts gegeben (je drei Inserts pro Ansatz) und die Inserts in definierten Zeitintervallen in das jeweils nächste, mit frischem Medium gefüllte *Well* umgesetzt. Durch Messung der Radioaktivität des Mediums jedes *Wells* konnte anschließend die permeierte Sucrosemenge pro Zeiteinheit bestimmt werden. Analog zu den oben beschriebenen Inkubations-Experimenten wurden wieder zwei verschiedene Nanopartikel-Präparationen (uncoated und PS 80-gecoated) in je zwei verschiedenen Konzentrationen (5 und 10 $\mu\text{g/ml}$) in das obere Kompartiment des jeweiligen Inserts gegeben (je drei Inserts pro Ansatz). Als Kontrolle erfolgte bei einem Ansatz keine Zugabe von Nanopartikeln beziehungsweise Polysorbat 80, bei einem weiteren Kontroll-Ansatz wurde Polysorbat 80 in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ in das obere Kompartiment gegeben.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die gefundene Permeabilitätserhöhung von BCEC-Monolayern bei der Inkubation mit Nanopartikeln durch eine endocytotische Aufnahme der Nanopartikel durch die Hirnendothelzellen und damit einhergehender Beeinflussung beziehungsweise Öffnung der *tight junctions* verursacht worden sein könnte. Zur Blockierung ihrer endocytotischen Aktivität wurden die BCEC vor Beginn des radioaktiven Permeabilitätsassays und Zugabe der Nanopartikel 90 min mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B (vergl. 3.5.1) präinkubiert. Die Zugabe des Cytochalasins B erfolgte in beide Kompartimente; ein Teil der Ansätze blieb zur Kontrolle unbehandelt. Die Durchführung des Assays erfolgte mit der bereits beschriebenen Methodik nach Ablauf der 90-minütigen Inkubationszeit. Bei einem Teil der Inserts erfolgte wiederum eine Zugabe von Nanopartikeln, wobei nur gecoatete Nanopartikel in der Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ verwendet wurden, da in den bis dahin durchgeführten Experimenten mit dieser Nanopartikel-Präparation und –konzentration die stärksten Effekte beobachtet worden sind. Es wurden insgesamt vier Ansätze durchgeführt (je drei Inserts pro Ansatz): Kontrolle ohne Zugabe, Kontrolle ohne Zugabe mit vorheriger

Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B, Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ PS 80-gecoateten Nanopartikeln und Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ PS 80-gecoateten Nanopartikeln bei vorheriger Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B.

4 ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG

4.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung boviner und humaner mikrovaskulärer Hirnendothelzellen

4.1.1 Isolierung von mikrovaskulären Kapillarfragmenten aus bovinem und humanem Hirnmaterial

Der direkte Vergleich der beiden unterschiedlichen Protokolle, die für die Isolierung von Kapillarfragmenten aus bovinem Hirnmaterial verwendet wurden, zeigte eindeutige Vorteile des neuetablierten alternativen Protokolls gegenüber dem originalen MPI-Protokoll. Am deutlichsten war dabei die gegenüber dem MPI-Protokoll um Größenordnungen gesteigerte Ausbeute an Kapillarfragmenten bei Verwendung des Alternativ-Protokolls, aber auch die Unterschiede zwischen den Qualitäten der auf der Basis der beiden verschiedenen Isolierungsprotokolle gewonnenen BCEC-Kulturen (siehe unten).

Die folgenden Abbildungen zeigen gegenüberstellend die mit den zwei verschiedenen Isolierungsprotokollen in parallel durchgeführten Aufarbeitungsansätzen gewonnenen bovinen Kapillarfragmente direkt nach der Isolierung sowie die daraus resultierenden BCEC-Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der *in vitro*-Kultivierung. Die Abbildungen 5a-c zeigen dabei die mit dem originalen MPI-Protokoll (vergl. 3.2.1.2) isolierten Kapillarfragmente (Abb. 5a) beziehungsweise die entsprechenden BCEC-Kulturen am Tag 2 (Abb. 5b) und Tag 8 (Abb. 5c) *in vitro*, die Abbildungen 5d-f zeigen dagegen zum Vergleich die mit dem neuetablierten alternativen Isolierungsprotokoll (vergl. 3.2.1.3) isolierten Kapillarfragmente (Abb. 5d) und daraus resultierenden BCEC-Kulturen zu den korrespondierenden Zeitpunkten *in vitro* (Abb. 5e und f).

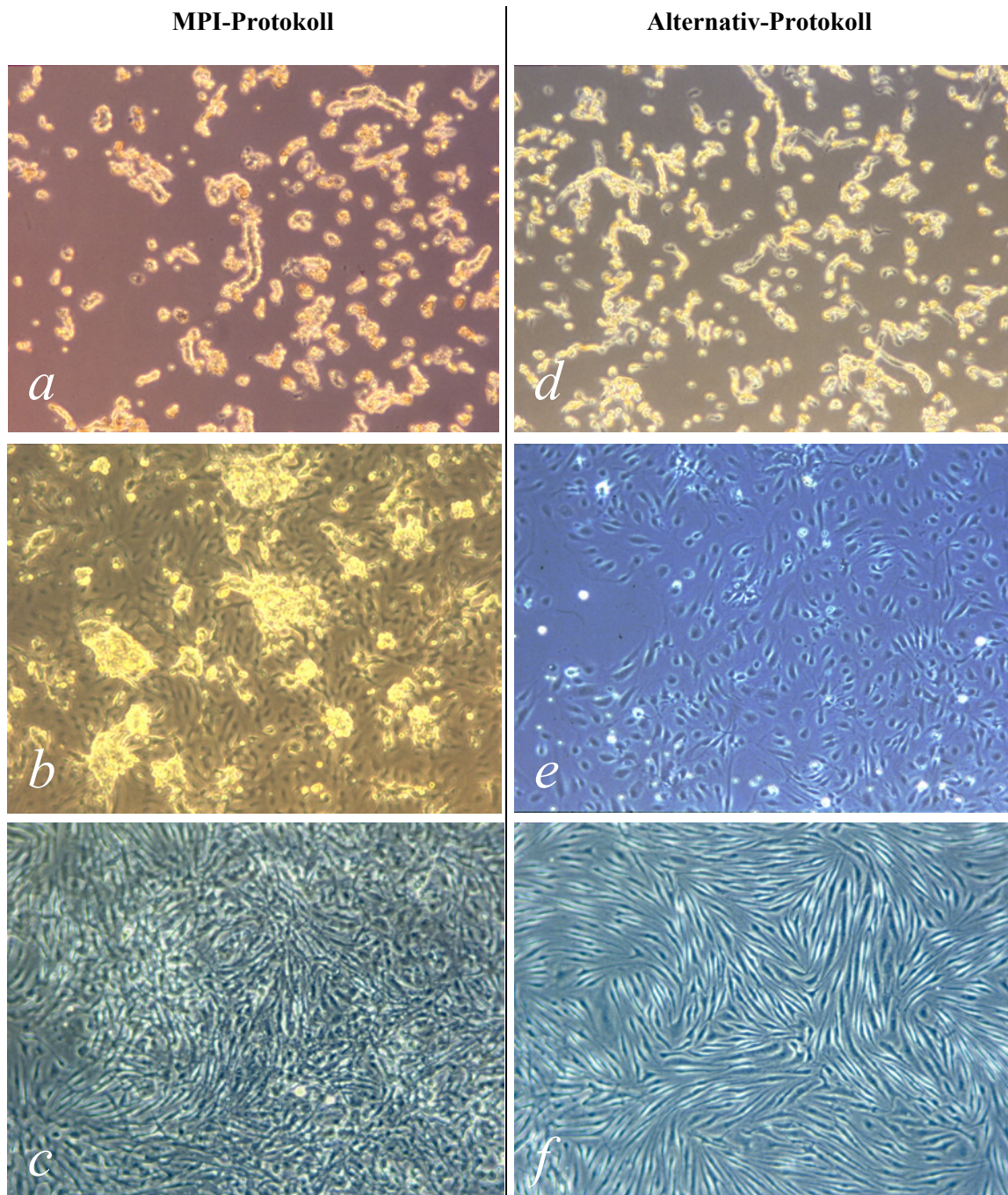


Abb. 5) Lichtmikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast der mit dem originalen MPI-Protokoll (*a-c*) und dem neuetablierten Alternativ-Protokoll (*d-f*) isolierten bovinen cerebralen Kapillarfragmente 2 h nach Isolierung und Aussaat in Collagen-coatede Zellkulturplatten (*a,d*) und die daraus resultierenden BCEC-Kulturen nach 2 d (*b,e*) beziehungsweise 8 d (*c,f*) *in vitro*.

Besonders beim Vergleich der 8 d alten *in vitro*-Kulturen fielen deutliche Unterschiede bezüglich Reinheit und Morphologie zwischen den mit unterschiedlichen Isolierungsprotokollen gewonnenen BCEC auf (vergl. Abb. 5*c* und 5*f*). Die mit dem Alternativ-Protokoll gewonnenen BCEC-Kulturen wiesen eine homogene und die für Hirnendothelzellen charakteristische spindelförmige Morphologie sowie eine nur geringfügige und lichtmikroskopisch kaum

sichtbare Kontamination durch Pericyten auf, während die korrespondierenden, mit dem MPI-Protokoll gewonnenen BCEC-Kulturen wesentlich uneinheitlicher waren und stark mit kontaminierenden und aufgrund ihrer deutlich abweichenden Morphologie identifizierbaren nichtendothelialen Zellen (Pericyten) durchsetzt waren.

Bei der Aufarbeitung von humanem Hirnmaterial zeigte die Verwendung des Alternativ-Protokolls im direkten Vergleich ebenfalls Vorteile gegenüber dem MPI-Protokoll in Bezug auf die Ausbeute der isolierten Kapillarfragmente. Trotzdem konnte kein mit der Aufarbeitung von bovinem Hirngewebe vergleichbares Ergebnis erzielt werden, da sich oftmals keine oder nur eine geringe Ausbeute an isolierten humanen cerebralen Kapillarfragmenten ergab und darüber hinaus die aus den isolierten Kapillarfragmenten auswachsenden humanen Hirnendothelzellen eine im Vergleich zu entsprechenden bovinen BCEC-Kulturen äußerst geringe oder keine Proliferationsaktivität zeigten. Aus den genannten Gründen konnte nur ein Kokultur-Experiment mit humanen BCEC durchgeführt werden (vergl. 3.4.2). Weiterhin wurden humane BCEC dieser Präparation für die immunocytochemische Fluoreszenz-Färbung verwendet (vergl. 4.1.3).

4.1.2 Optimierung der Kulturbedingungen der mikrovaskulären Hirnendothelzellen

4.1.2.1 Adhäsionsfaktor

Über einen großen Zeitraum erfolgte die Kultivierung der BCEC in mit Typ-I-Collagen gecoateten Kulturgefäßen beziehungsweise Transwell[®]-Inserts. Ein Nachteil dieses Collagen-Typs ist seine Neigung zur Entropie-getriebenen spontanen Polymerisation und damit einhergehender Fibrillenbildung bei der Neutralisierung des in Säure gelösten Collagens durch Zugabe von PBS oder Medium. Diese Eigenschaft bereitete Probleme, da hierdurch Kulturgefäße häufig unbrauchbar wurden beziehungsweise die in solche Kulturgefäße ausplattierten Hirnendothelzellen aufgrund der entstandenen Collagenfibrillen ein unbefriedigendes Wachstumsverhalten zeigten oder sich von der Unterlage ablösten.

Als Konsequenz wurde der Wechsel zu einem Typ-IV-Collagen vollzogen, welches die oben genannten störenden Eigenschaften der Typ I-Collagene nicht besitzt, da es nicht zur Fibrillenbildung neigt, sondern ein offenes Netzwerk bildet. Bereits die rein qualitative Beurteilung bei Verwendung des Typ-IV-Collagens als Adhäsionsfaktor zeigte seine Tauglichkeit bezüglich Adhäsion und Wachstumsverhalten der Hirnendothelzellen, die auf damit gecoateten Zellkulturoberflächen kultiviert wurden. Darüber hinaus konnte innerhalb des *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells durch Verfolgung des zeitlichen Verlaufs des TEER der Einfluss der beiden Collagen-Typen auf die spezifischen Permeabilitäts-Eigenschaften der darauf wachsenden Hirnendothelzellen bei ansonsten identischen Kulturbedingungen direkt quantifiziert und miteinander verglichen werden (siehe Abb. 6).

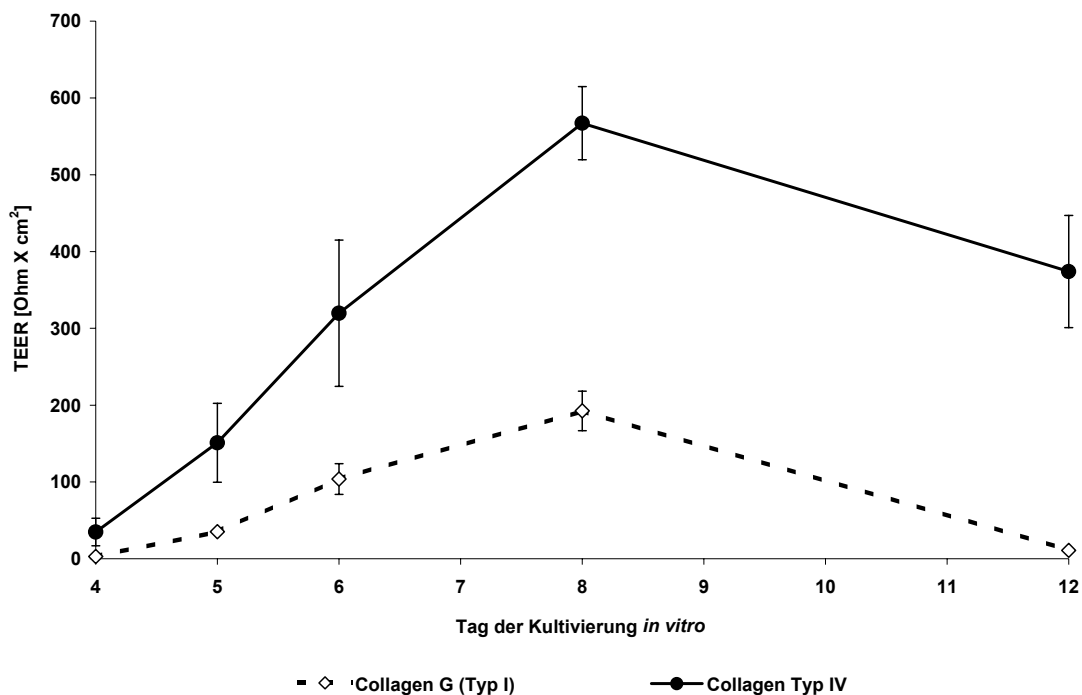


Abb. 6) Zeitlicher Verlauf des TEER von primären bovinen BCEC, die auf mit unterschiedlichen Collagen-Typen gecoateten Transwell[®]-Inserts kultiviert wurden. Die cerebralen Kapillarfragmente wurden direkt nach ihrer Isolierung in gleicher Dichte auf entweder mit Typ-I- oder Typ-IV-Collagen gecoateten (15 µg/cm²) Inserts ausgesät und anschließend unter identischen Bedingungen kultiviert.

Es zeigte sich, dass der TEER von bovinen BCEC-Monolayern auf Typ-IV-Collagen gecoateten Transwell[®]-Inserts auf ein deutlich höheres Niveau stieg, verglichen mit Hirnendothelzellen, die unter ansonsten gleichen Kulturbedingungen auf Typ-I-gecoateten Inserts wuchsen. Dieses Ergebnis ließ sich in identisch durchgeführten Experimenten durchgehend reproduzieren.

Neben Collagen wurde auch Fibronectin zur Verwendung als Adhäsionsfaktor bei der Kultivierung der BCEC ausgetestet. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen auf den damit gecoateten Zellkulturgefäßen beziehungsweise Transwell[®]-Inserts nur ein schlechtes Adhärenz- und Wachstumsverhalten zeigten. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich auch bei der Verwendung kommerzieller mit Fibronectin gecoateter Zellkulturplatten (Biocoat[®]).

Unbefriedigend fiel auch die Erprobung der beiden gentechnisch hergestellten rekombinanten Polypeptide RGD-ECM und LLEPP aus. Die Austestung bei bovinen BCEC ergab, dass die Zellen an mit diesen Substraten gecoateten Zellkulturoberflächen nicht adhärirten.

4.1.2.2 Medium

Eine rein qualitative, auf mikroskopischer Begutachtung basierende Beurteilung unterschiedlicher Medien bezüglich der Wachstumseigenschaften und Morphologie der damit kultivierten BCEC erwies sich als unzulänglich, da keine eindeutigen und reproduzierbaren Unterschiede festgestellt werden konnten. Es war hingegen sehr gut möglich, mit Hilfe des BHS-Zellkulturmodells durch Verfolgung des zeitlichen Verlaufs des TEER den Einfluss verschiedener Medien auf die spezifischen Eigenschaften der damit kultivierten Hirnendothelzellen bei ansonsten identischen Kulturbedingungen zu quantifizieren und somit zu beurteilen (siehe Abb. 7).

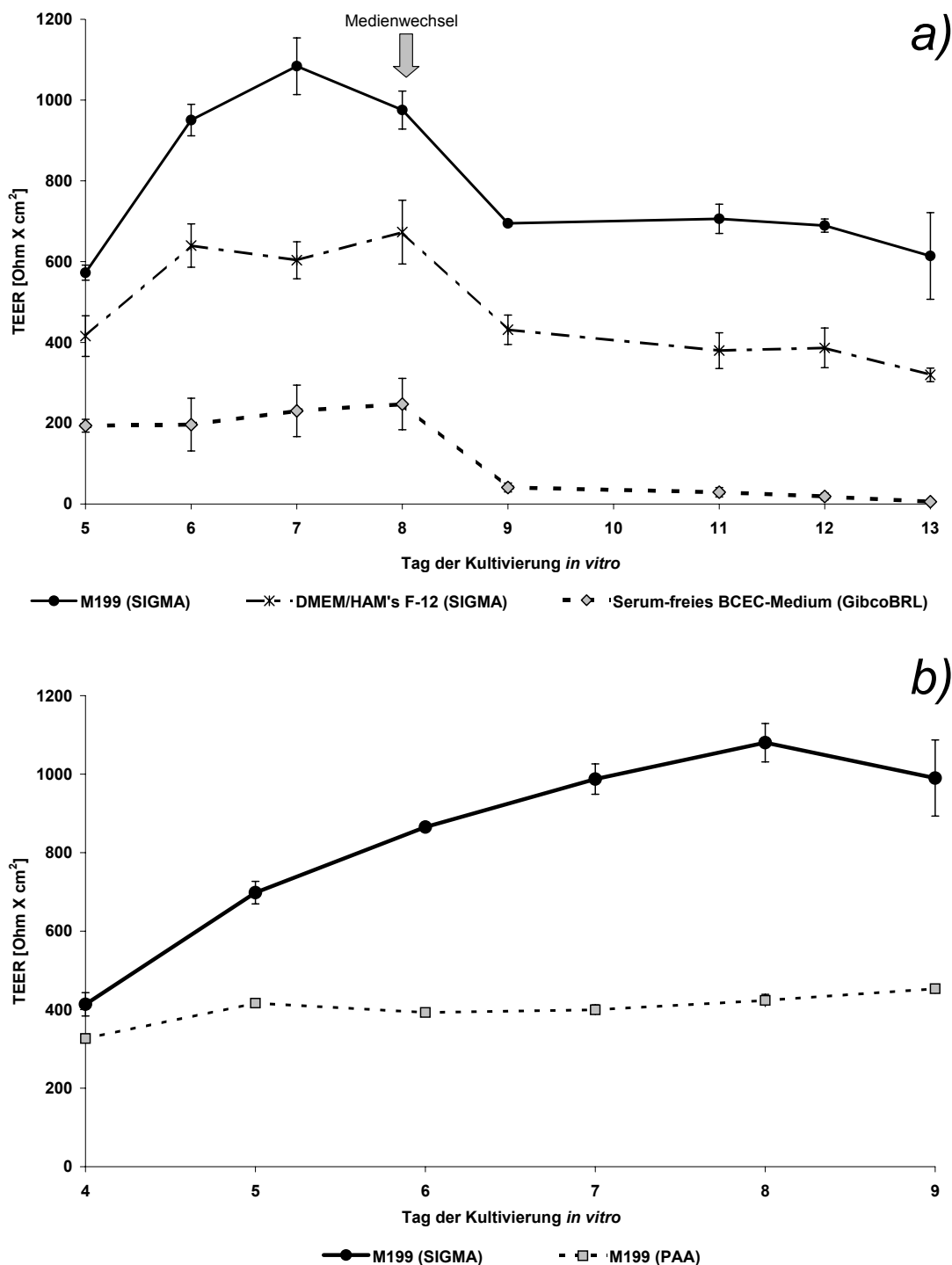


Abb. 7) Zeitlicher Verlauf des TEER von in verschiedenen Medien kultivierten primären bovinen BCEC. Die cerebralen Kapillarfragmente wurden direkt nach ihrer Isolierung in gleicher Dichte auf Typ-IV-Collagen-gecoatete Inserts ausgesät und zunächst unter identischen Bedingungen in supplementiertem DMEM + 10 % FCS + 2 % Retinafaktor kultiviert. Am Tag 2 *in vitro* erfolgte die Umstellung auf das jeweilige auszutestende Medium:

- a) Vergleich zwischen den Medien M199 (SIGMA), DMEM/HAM's F-12 (SIGMA) und Serum-freiem Endothelzell-Medium (S.F.M. von GibcoBRL). Sämtlichen Medien enthielten zu 2 % Retinafaktor und, mit Ausnahme des Serum-freien S.F.M.-Mediums, zusätzlich noch 10 % FCS.
- b) Vergleich zweier M199-Flüssigmedien verschiedener Hersteller (SIGMA und PAA). Beide Medien enthielten jeweils die gleichen Zusätze sowie 10 % FCS und 2 % Retinafaktor.

Es zeigte sich, dass die Verwendung von Medium 199 deutliche Vorteile gegenüber der Verwendung des Serum-freien Mediums (S.F.M.) oder DMEM/HAM's F-12 hatte, da hiermit

deutlich höhere TEER-Werte von über $1000 \Omega\text{-cm}^2$ erreicht wurden. Die mit DMEM/HAM's F-12 erreichten TEER-Werte lagen etwa im mittleren Bereich zwischen denen des M199 und S.F.M. Ein Medienwechsel nach der Messung am Tag 8 hatte bei allen drei Ansätzen einen Einbruch des TEER zur Folge (Pfeil), wie die nächste TEER-Messung am darauffolgenden Tag zeigte; dieser Effekt konnte auch in anderen, vergleichbar durchgeführten Experimenten beobachtet werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung blieb der TEER beim M199 weiterhin auf hohem und über einen Zeitraum von mehreren Tagen konstantem Niveau, während er beim S.F.M. im gleichen Zeitraum auf fast den Nullwert absank.

Es wurde weiterhin deutlich, dass auch Unterschiede zwischen jeweils gleichen Medien unterschiedlicher Hersteller existieren, wie der Vergleich der Kultivierung der BCEC in Medien 199 zweier verschiedener Hersteller zeigte (Abb. 7b).

4.1.3 Charakterisierung der Hirnendothelzellen: Immuncytochemische Fluoreszenz-Färbung

4.1.3.1 von-Willebrand-Faktor (vWF)

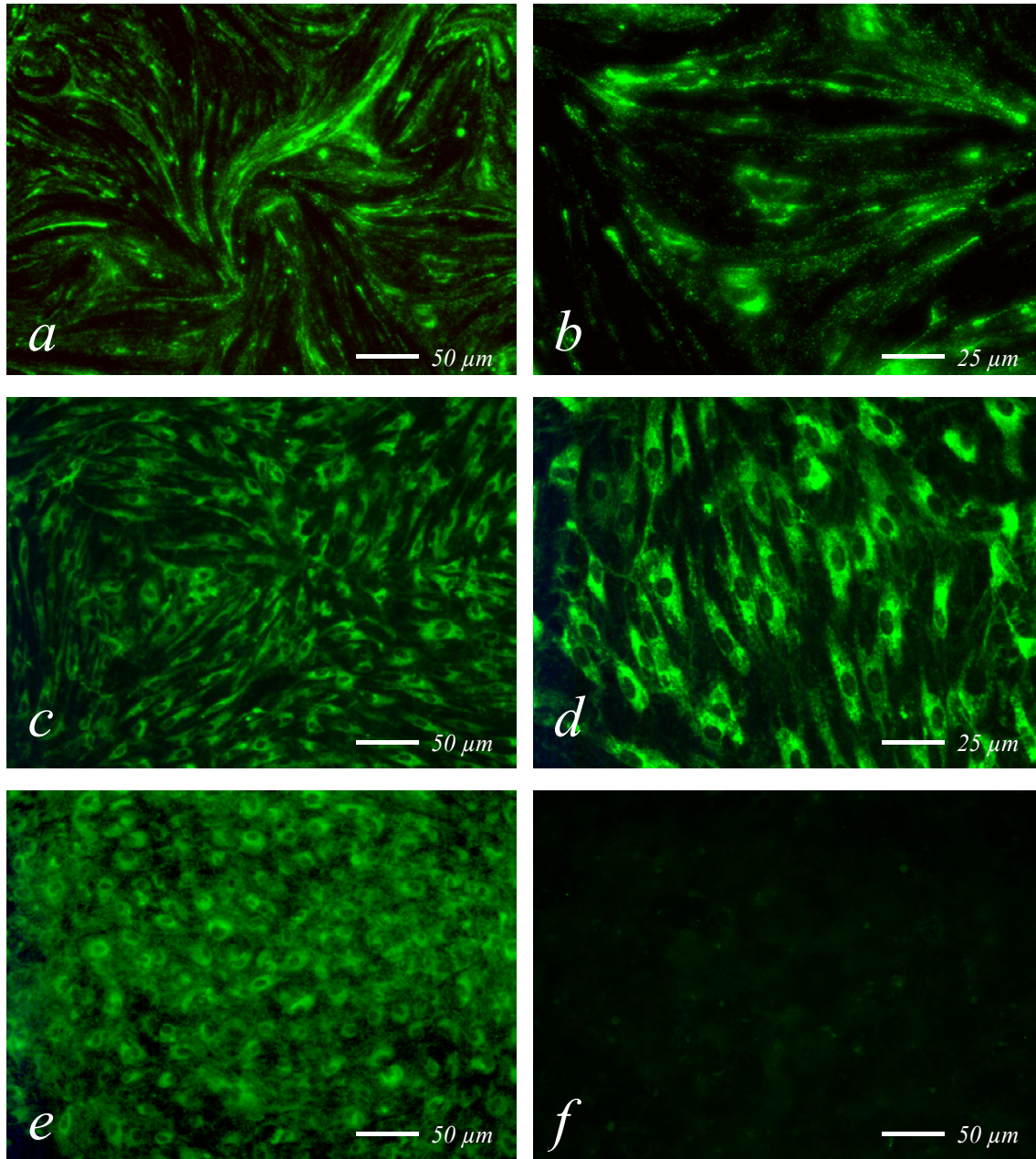


Abb. 8) Immuncytochemischer Nachweis des Endothelzell-spezifischen Markers von-Willebrand-Faktor (vWF) mit dem polyklonalen Antikörper (vergl. 3.2.4).
(*a,b*) bovine BCEC in zwei verschiedenen Vergrößerungen
(*c,d*) humane BCEC in zwei verschiedenen Vergrößerungen
(*e,f*) Kontrollen: (*e*) Positivkontrolle (HUVEC), (*f*) Negativkontrolle (CACO-2)

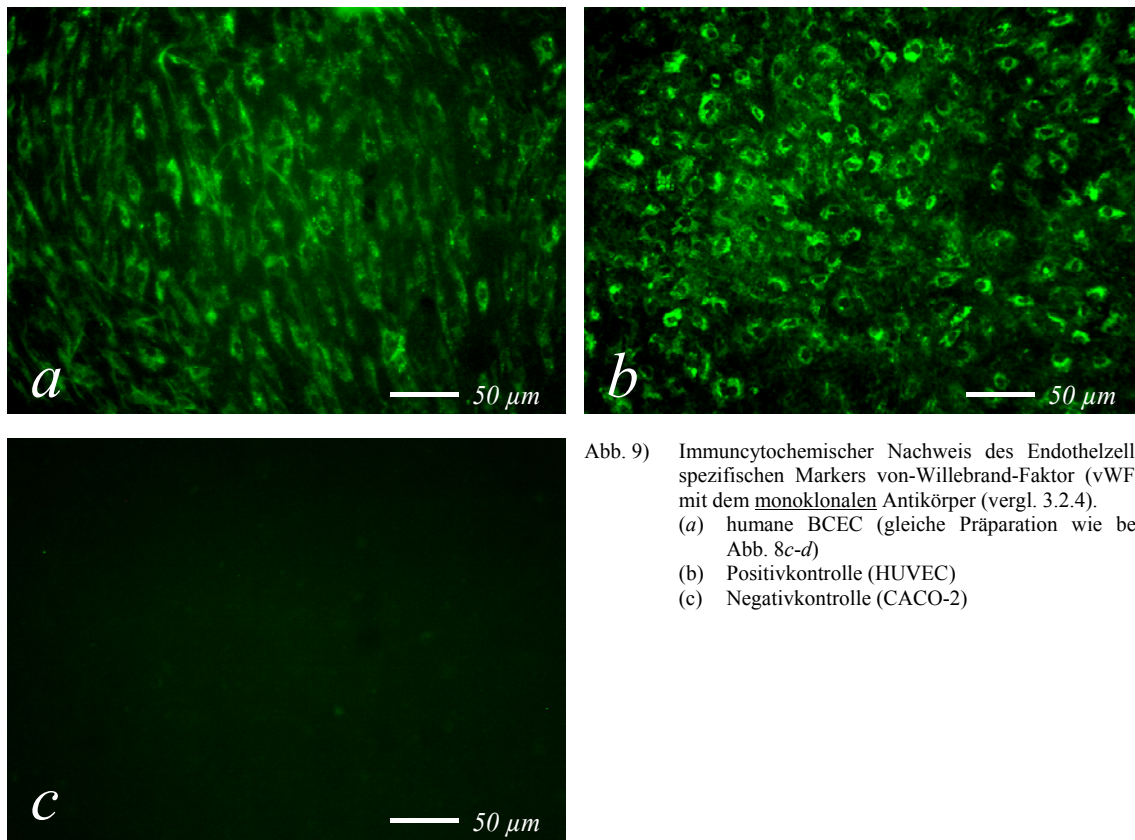


Abb. 9) Immuncytochemischer Nachweis des Endothelzell-spezifischen Markers von-Willebrand-Faktor (vWF) mit dem monoklonalen Antikörper (vergl. 3.2.4).
(a) humane BCEC (gleiche Präparation wie bei Abb. 8c-d)
(b) Positivkontrolle (HUVEC)
(c) Negativkontrolle (CACO-2)

Die immuncytochemische Färbung mit dem polyklonalen vWF-Antikörper zeigte eindeutig das Vorhandensein dieses Endothelzell-spezifischen Markers sowohl bei den bovinen als auch humanen BCEC (siehe Abb. 8a-d). Charakteristisch war dabei dessen perinukleäre und granuläre Verteilung, die vor allem bei den stärkeren Vergrößerungen deutlich wurde (siehe Abb. 8b,d). Die Spezifität der Färbung wurde durch die entsprechenden Kontrollen bestätigt: eine positive Färbung zeigte sich bei HUVEC (siehe Abb. 8e), keine Färbung hingegen bei CACO-2-Epithelzellen (siehe Abb. 8f).

Mit dem monoklonalen vWF-Antikörper ließ sich der Marker dagegen nur bei humanen BCEC nachweisen (siehe Abb. 9a), bei bovinen BCEC zeigte sich dagegen kein positives Ergebnis (nicht gezeigt). Dieses war allerdings nicht zu erwarten, da der monoklonale vWF-Antikörper laut Herstellerangabe nicht für das bovine Antigen spezifisch ist. Die Kontrollen zeigten hingegen das erwartete Ergebnis (siehe Abb. 9b,c).

4.1.3.2 Zonula occludens-1 (ZO-1)

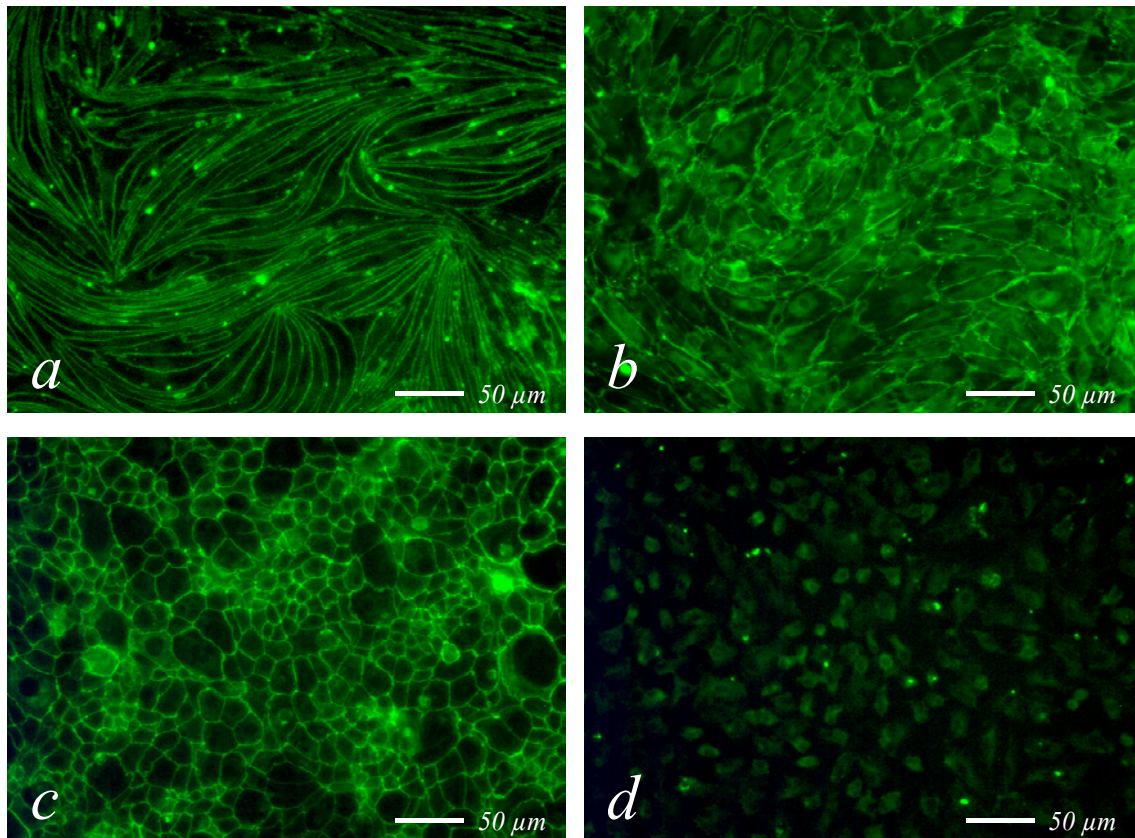


Abb. 10) Immuncytochemischer Nachweis des *tight junction*-assoziierten Proteins ZO-1 mit dem polyklonalen Antikörper (ZYMED, vergl. 3.2.4).
 (a) bovine BCEC
 (b) humane BCEC (gleiche Präparation wie bei 4.1.3.1, Abb. 8c-d und 9)
 (c,d) Kontrollen: (c) Positivkontrolle (CACO-2), (d) Negativkontrolle (HUVEC)

Der immuncytochemische Nachweis des *tight junction*-assoziierten Proteins ZO-1 mit dem polyklonalen Antikörper (ZYMED) zeigte bei bovinen BCEC das charakteristische, an den Zellrändern ein kontinuierliches Band bildende Färbungsmuster, was auf eine vollständige Ausbildung der *tight junctions* hindeutet (siehe Abb. 10a). Das gleiche Färbungsmuster zeigte sich auch bei der humanen Epithelzelllinie CACO-2 (Positivkontrolle, siehe Abb. 10c), während sich bei den als Negativkontrolle verwendeten HUVEC nur eine schwache und diffuse perinukleäre Verteilung zeigte und keine Zellränder angefärbt waren (siehe Abb.10d). Bei den humanen BCEC war die Färbung dagegen uneinheitlicher und verteilte sich sowohl auf die Zellränder als auch auf den perinukleären Bereich der Zellen (siehe Abb.10b).

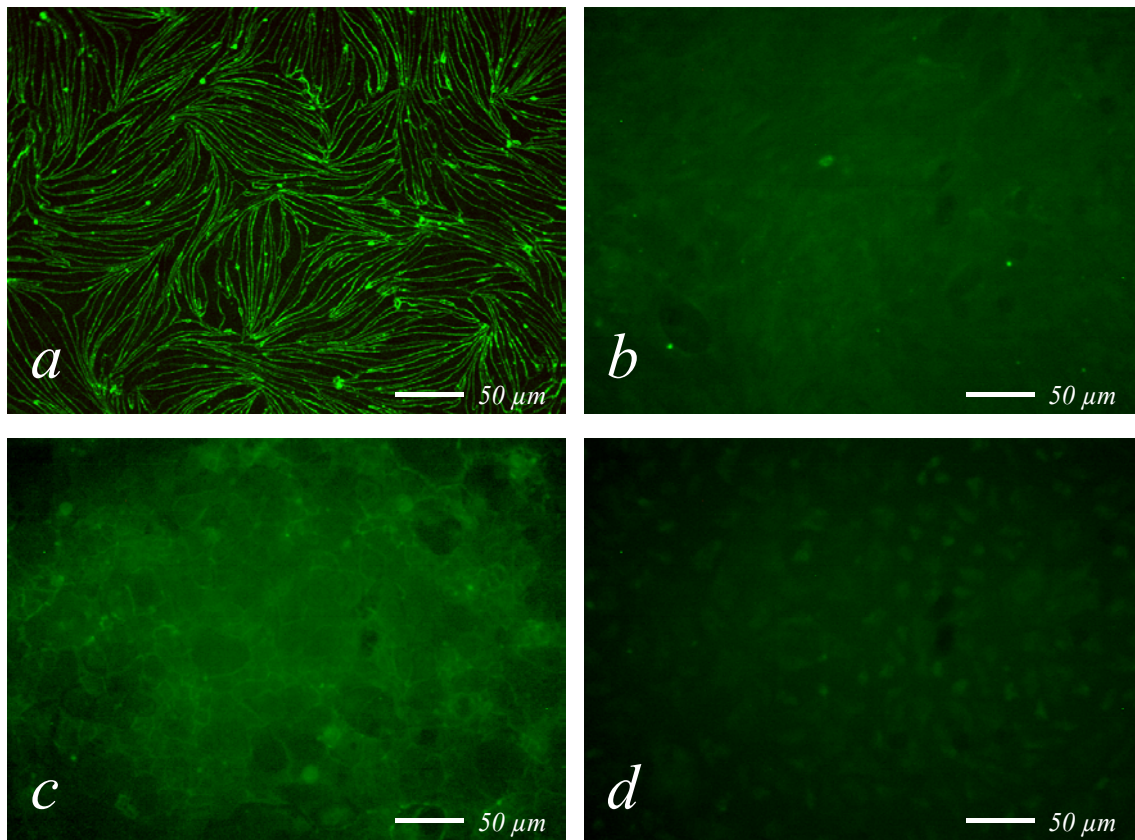


Abb. 11) Immuncytochemischer Nachweis des *tight junction*-assoziierten Proteins ZO-1 mit dem monoklonalen Antikörper (CHEMICON, vergl. 3.2.4).
(a) bovine BCEC
(b) humane BCEC (gleiche Präparation wie bei Abb. 10b)
(c,d) Kontrollen: (c) Positivkontrolle (CACO-2), (d) Negativkontrolle (HUVEC)

Der immuncytochemische Nachweis des *tight junction*-assoziierten Proteins ZO-1 mit dem monoklonalen Antikörper (CHEMICON) zeigte bei bovinen BCEC wie beim polyklonalen Antikörper das charakteristische Färbungsmuster und die ausschließliche Lokalisation dieses Proteins an den Zellrändern (siehe Abb. 11a). Dieses Ergebnis ließ sich aber weder bei den humanen BCEC noch den CACO-2-Epithelzellen reproduzieren (siehe Abb. 11b,c), da sich nur eine völlig diffuse Färbung mit starkem Hintergrund zeigte, was auf die laut Herstellerangaben fehlende Spezifität des monoklonalen Antikörpers für das humane ZO-1-Antigen zurückzuführen ist.

4.1.3.3 Glattes Muskelzell-Aktin (MZA)

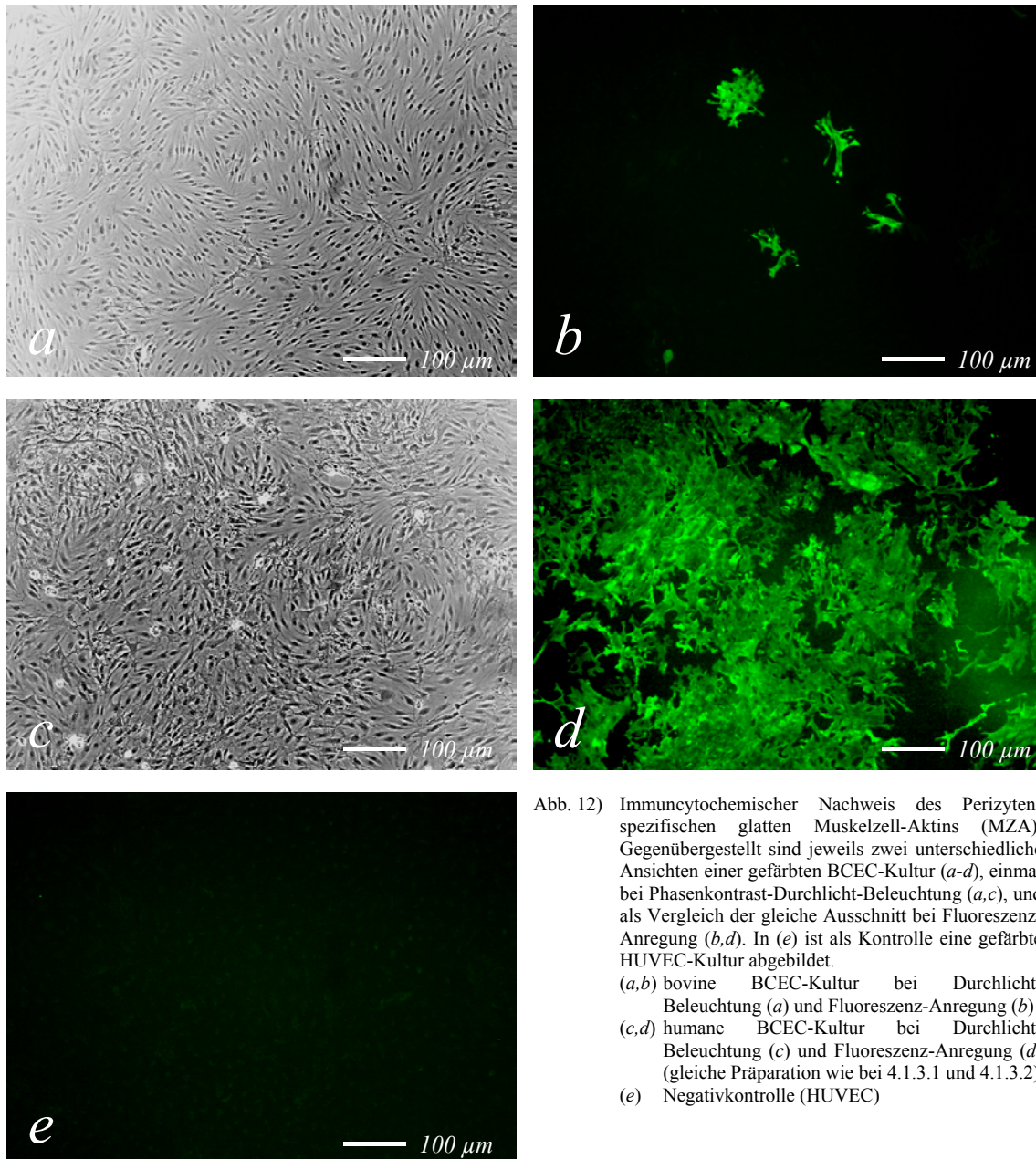


Abb. 12) Immunocytochemischer Nachweis des Perizyten-spezifischen glatten Muskelzell-Aktins (MZA). Gegenübergestellt sind jeweils zwei unterschiedliche Ansichten einer gefärbten BCEC-Kultur (*a-d*), einmal bei Phasenkontrast-Durchlicht-Beleuchtung (*a,c*), und als Vergleich der gleiche Ausschnitt bei Fluoreszenz-Anregung (*b,d*). In (*e*) ist als Kontrolle eine gefärbte HUVEC-Kultur abgebildet.
 (*a,b*) bovine BCEC-Kultur bei Durchlicht-Beleuchtung (*a*) und Fluoreszenz-Anregung (*b*)
 (*c,d*) humane BCEC-Kultur bei Durchlicht-Beleuchtung (*c*) und Fluoreszenz-Anregung (*d*) (gleiche Präparation wie bei 4.1.3.1 und 4.1.3.2)
 (*e*) Negativkontrolle (HUVEC)

Der immunocytochemische Nachweis des Pericyten-spezifischen glatten Muskelzell-Aktins (MZA) zeigte bei der bovinen BCEC-Kultur eine nur geringe Durchsetzung von kontaminierenden Pericyten (Abb. 12*b*), während die Kultur humaner BCEC fast vollständig mit Pericyten überwuchert war (Abb. 12*d*). Die als Vergleich und Negativ-Kontrolle verwendete HUVEC-Kultur zeigte dagegen keine Anfärbung (Abb. 12*e*).

4.2 Charakterisierung des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells

4.2.1 Transendothelialer elektrischer Widerstand (*trans-endothelial electrical resistance*, TEER) des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells

Auf den Transwell[®]-Inserts erfolgte das Erreichen der Konfluenz der bovinen BCEC-Kulturen in der Regel am Tag 2-3 *in vitro*, was durch mikroskopische Begutachtung sowie Messung eines über dem Nullwert liegenden transendothelialen Widerstands (TEER, vergl. 3.3.2.1) nachweisbar war. Von diesem Zeitpunkt ab erfolgte die Ausbildung eines dichten BCEC-Monolayers mit niedriger Permeabilität, was durch tägliche TEER-Messung verfolgt werden konnte. Der TEER erreichte sein Maximum gewöhnlich am Tag 6-8 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts (siehe Abb. 7). Nach Abschluss der Etablierungsphase des *in vitro*-BHS-Modells und Optimierung der Kulturbedingungen der BCEC lag das TEER-Maximum in der Regel oberhalb $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$, bei vereinzelt BCEC-Präparationen aber auch darunter.

4.2.2 Parazelluläre Permeabilität des *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells für Makromoleküle und Relation mit dem TEER

Die Durchführung der im folgenden exemplarisch gezeigten radioaktiven Permeabilitätsassays erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der Optimierungs- und Etablierungsphase des *in vitro*-BHS-Modells beziehungsweise nach deren Abschluss, so dass sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der ermittelten Permeabilität der BCEC-Monolayer für ¹⁴C-Sucrose sowie des vor Beginn des radioaktiven Permeabilitätsassays gemessenen transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) ergaben. Die bei den radioaktiven Assays angewandte Methodik war stets die gleiche (vergl. 3.3.2.2), allerdings mussten aufgrund der im Verlauf der Etablierung beziehungsweise Optimierung des *in vitro*-BHS-Modells stetig niedriger werdenden Permeabilität der BCEC-Monolayer unterschiedliche ¹⁴C-Sucrosemengen bei deren Zugabe in

das obere Kompartiment der Inserts verwendet werden, damit die Radioaktivität im unteren Kompartiment auf einem detektierbaren Niveau blieb. Die Gesamt-Radioaktivität und Sucrosekonzentration im oberen Kompartiment der Inserts zum Zeitpunkt $t = 0$ nach Zugabe der radioaktiven Sucroselösung bei Beginn des Assays betrug bei Permeabilitätsassay # 1 $0,0625 \mu\text{Ci}$ ($0,186 \mu\text{M}$), bei Permeabilitätsassay # 2 $0,1 \mu\text{Ci}$ ($0,298 \mu\text{M}$) und bei Permeabilitätsassay # 3 $0,25 \mu\text{Ci}$ ($0,744 \mu\text{M}$).

Durch Messung der pro Zeitpunkt in dem unteren Kompartiment des Transwell®-Systems vorhandenen Radioaktivität konnte die permeierte Sucrosekonzentration für den jeweiligen Ansatz in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt werden (Mittelwert von je drei Inserts). Da der Durchtritt der ^{14}C -Sucrose durch einen Zellmonolayer beziehungsweise die poröse Membran des Inserts unabhängig von der initialen Konzentration im oberen Kompartiment einer linearen Kinetik folgt (Audus und Borchardt 1986, Silfinger-Birnboim *et al.* 1987, Kazakoff *et al.* 1995, Raub 1996, Johnson und Anderson 1999), konnte somit die permeierte Sucrosekonzentration pro Zeiteinheit (= Transportrate $M_{(t)}$) berechnet werden. Unter Verwendung der so ermittelten Transportrate $M_{(t)}$ und der bekannten Parameter (Sucrose-Ausgangskonzentration im oberen (Donor-)Kompartiment C_0 , Volumen im oberen (Donor-)Kompartiment V_0 und Fläche des Zellmonolayers A) konnte nun der Permeabilitätskoeffizient des Gesamtsystems (P_G) nach folgender Formel berechnet werden (Silfinger-Birnboim *et al.* 1987, Milton und Knutson 1990, Sill *et al.* 1992, Grabb und Gilbert 1995, Johnson und Anderson 1999):

$$P_G = M_{(t)} \times \frac{V_0}{C_0 \times A} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{cm}^3 \text{ sec}} \frac{\text{cm}^3}{\text{nmol cm}^{-3} \text{ cm}^2} \right]$$

$M_{(t)}$ = Transportrate (= permeierte Sucrosekonzentration pro Zeiteinheit)
 C_0 = Ausgangskonzentration im Donor-Kompartiment
 V_0 = Volumen des Donor-Kompartiments
 A = Fläche des Zellmonolayers (*growth area*)

$$[P_G] = \left[\frac{\text{cm}}{\text{sec}} \right]$$

Der Gesamt-Permeabilitätskoeffizient P_G setzt sich aus dem Permeabilitätskoeffizienten der porösen Filter-Membran des Transwell[®]-Inserts P_F (ohne darauf wachsende Zellen) und des Permeabilitätskoeffizienten des jeweiligen Zellmonolayers P_M wie folgt zusammen:

$$\frac{1}{P_G} = \frac{1}{P_M} + \frac{1}{P_F}$$

$P_G =$ Permeabilitätskoeffizient des Gesamtsystems (Filter-Membran und Zellmonolayer)
 $P_M =$ Permeabilitätskoeffizient des Zellmonolayers
 $P_F =$ Permeabilitätskoeffizient der porösen Filter-Membran des Inserts

Mit Hilfe des ermittelten Permeabilitätskoeffizienten der porösen Filter-Membran P_F konnten die Permeabilitätskoeffizienten der jeweiligen Zellmonolayer P_M nach folgender Formel bestimmt werden:

$$P_M = \frac{P_G \times P_F}{P_F - P_G}$$

$P_G =$ Permeabilitätskoeffizient des Gesamtsystems (Filter-Membran und Zellmonolayer)
 $P_M =$ Permeabilitätskoeffizient des Zellmonolayers
 $P_F =$ Permeabilitätskoeffizient der porösen Filter-Membran des Inserts

Die folgende Tabelle 1 zeigt die bei den verschiedenen radioaktiven Permeabilitätsassays ermittelten Sucrose-Permeabilitätskoeffizienten der BCEC-Monolayer beziehungsweise Zelllinien-Monolayer (P_M) und zum Vergleich den jeweiligen vor Beginn des Assays gemessenen transendothelialen beziehungsweise -membranen elektrischen Widerstand (T[E]ER):

Zellmonolayer	Permeabilitätsassay					
	# 1		# 2		# 3	
	T(E)ER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	P_M [$\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$]	T(E)ER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	P_M [$\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$]	T(E)ER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	P_M [$\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$]
MRC-5	0 ± 1	78,1·10 ⁻⁶	—	—	0 ± 0	39,5·10 ⁻⁶
ECV-304	25 ± 0	5,97·10 ⁻⁶	14 ± 1	10,2·10 ⁻⁶	10 ± 1	13,3·10 ⁻⁶
CACO-2	135 ± 6	0,45·10 ⁻⁶	151 ± 4	0,50·10 ⁻⁶	221 ± 2	0,53·10 ⁻⁶
MDCK	—	—	1009 ± 17	0,09·10 ⁻⁶	875 ± 40	0,08·10 ⁻⁶
BCEC # 1	318 ± 36	0,64·10 ⁻⁶	337 ± 19	0,48·10 ⁻⁶	1029 ± 116	0,13·10 ⁻⁶
BCEC # 2	—	—	811 ± 95	0,23·10 ⁻⁶	1569 ± 7	0,12·10 ⁻⁶

Tabelle 1) Übersicht der in drei verschiedenen radioaktiven Permeabilitätsassays ermittelten Sucrose-Permeabilitätskoeffizienten boviner BCEC-Monolayer (grau unterlegt) und diverser Zelllinien-Monolayer (P_M) im Vergleich mit den vor Beginn des Assays gemessenen transendothelialen beziehungsweise -membranen elektrischen Widerständen (T[E]ER, Werte ± S.D.). (—) = nicht durchgeführt

Die folgende Grafik zeigt die ermittelten Sucrose-Permeabilitätskoeffizienten der BCEC-Monolayer in Abhängigkeit vom TEER. Es zeigte sich, dass hierbei eine reziproke, aber keine lineare Relation zwischen beiden Parametern bestand (vergl. 5.2).

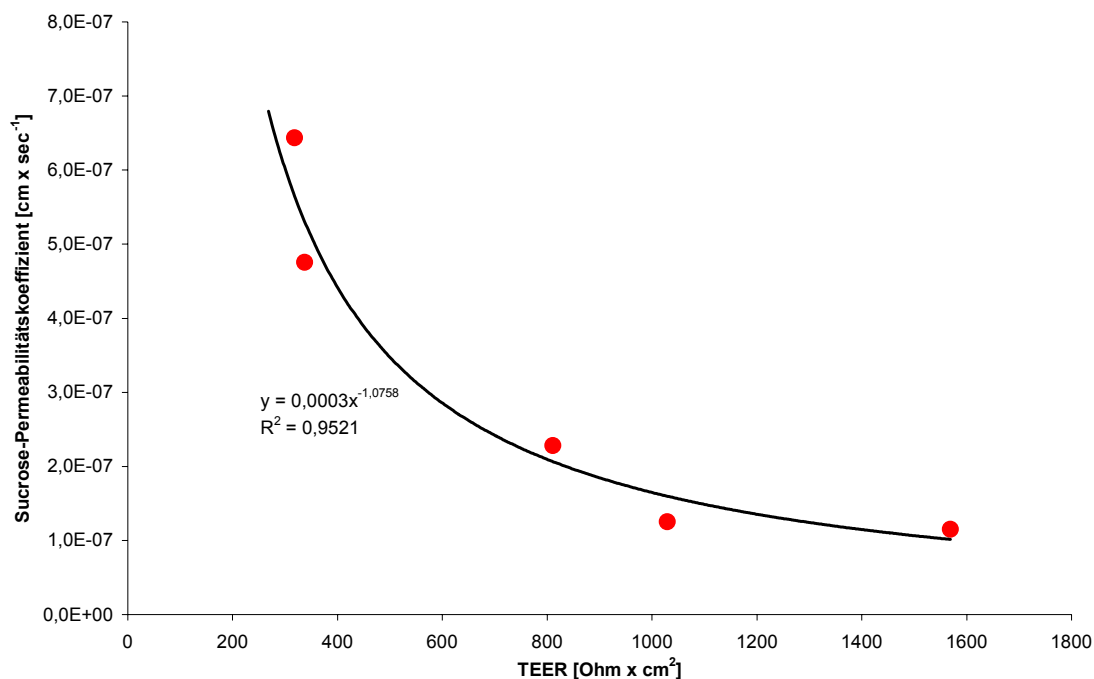


Abb. 13) Die in den Permeabilitätsassays ermittelten Sucrose-Permeabilitätskoeffizienten der BCEC-Monolayer in Relation zu den vor der Durchführung der Assays bestimmten TEER-Werte (rote Punkte, vergl. Tab. 1). Es zeigt sich eine nichtlineare Relation beider Parameter.

4.2.3 Einfluss von den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhenden Substanzen und C6-Kokultur auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

In dem Experiment, dessen Ergebnisse in der folgenden Abbildung 14 dargestellt sind, wurde der Einfluss einer Kokultur von BCEC-Monolayern mit Zellen der Glioma-Zelllinie C6 und/oder Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels der BCEC auf deren TEER untersucht.

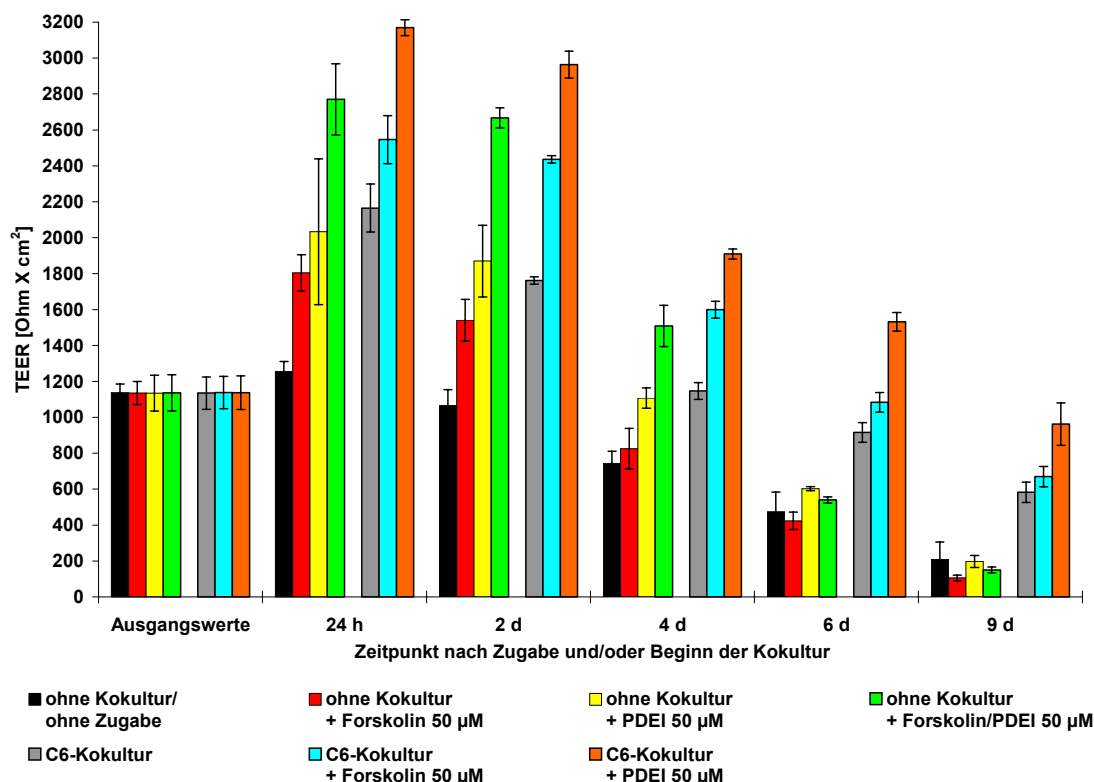


Abb. 14) Einfluss der Kokultur mit C6-Glioma-Zellen und/oder der Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Zugabe von je 50 µM Forskolin und/oder des Phosphodiesterase-Inhibitors (PDEI) RO 20-1724 auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und deren Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von Forskolin und/oder PDEI in das obere Kompartiment der Inserts beziehungsweise Einsetzen der Inserts in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten C6-Zellen.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur und/oder Zugabe / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle									
	24 h		2 d		4 d		6 d		9 d	
	absolut [Ω·cm²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm²]	relativ [%]
ohne Kokultur + Forskolin (50 µM)	550	44	474	44	82	11	-51	-11	-103	-49
ohne Kokultur + PDEI (50 µM)	778	62	803	75	364	49	128	27	-11	-5
ohne Kokultur + Forskolin (50 µM) und PDEI (50 µM)	1515	121	1601	150	765	103	65	14	-59	-28
Kokultur mit C6	910	72	695	65	403	54	441	93	373	179
C6-Kokultur + Forskolin (50 µM)	1291	103	1370	128	856	115	609	128	461	221
C6-Kokultur + PDEI (50 µM)	1914	153	1898	178	1166	157	1057	223	753	360
ohne Kokultur/ohne Zugabe (absoluter TEER [Ω·cm²])	1255		1067		744		475		209	

Tabelle 2) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 14) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments gemessene Ausgangs-TEER lag im Mittel bei 1136 Ω·cm² ± 72 S.D.

Die Behandlung postkonfluenten BCEC mit Forskolin und/oder RO 20-1724 bewirkte eine deutliche Steigerung des TEER im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Wirkung dieser beiden Substanzen auf den TEER von postkonfluenten BCEC-Monolayern war dabei additiv; eine kombinierte Zugabe von Forskolin und RO 20-1724 zu je 50 μM bewirkte eine Erhöhung des TEER, die deutlich über die TEER-steigernde Wirkung der Einzelsubstanzen hinausging und etwa der Summe der von den jeweils einzeln applizierten Substanzen bewirkten TEER-Erhöhung entsprach.

Eine Kokultur der BCEC-Monolayer mit der Glioma-Zelllinie C6 führte ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung des TEER im Vergleich zur Kontrolle ohne Kokultur. Auch bei den mit C6 kokultivierten BCEC-Monolayern führte die Zugabe von entweder Forskolin oder RO 20-1724 zu je 50 μM zu einer zusätzlichen Steigerung des TEER, so dass auch in diesem Fall die Wirkung additiv war. Die Zugabe von 50 μM RO 20-1724 ließ den TEER der mit C6 kokultivierten BCEC-Monolayer auf einen Wert von deutlich über 3000 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ ansteigen.

4.3 Einfluss von Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenten BCEC-Monolayer

4.3.1 Einfluss von Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenten BCEC-Monolayer bei Kokultur und Vergleich mit Zelllinien

In dem der folgenden Abbildung 15 zugrunde liegenden Experiment wurde der Einfluss einer Kokultur von BCEC-Monolayern mit humanen Makrophagen zweier verschiedener Spender auf deren TEER untersucht. Als Kontrolle und Vergleich wurden die BCEC-Monolayer zusätzlich noch mit Zellen der humanen Fibroblasten-Zelllinie MRC-5 und der Glioma-Zelllinie C6 kokultiviert.

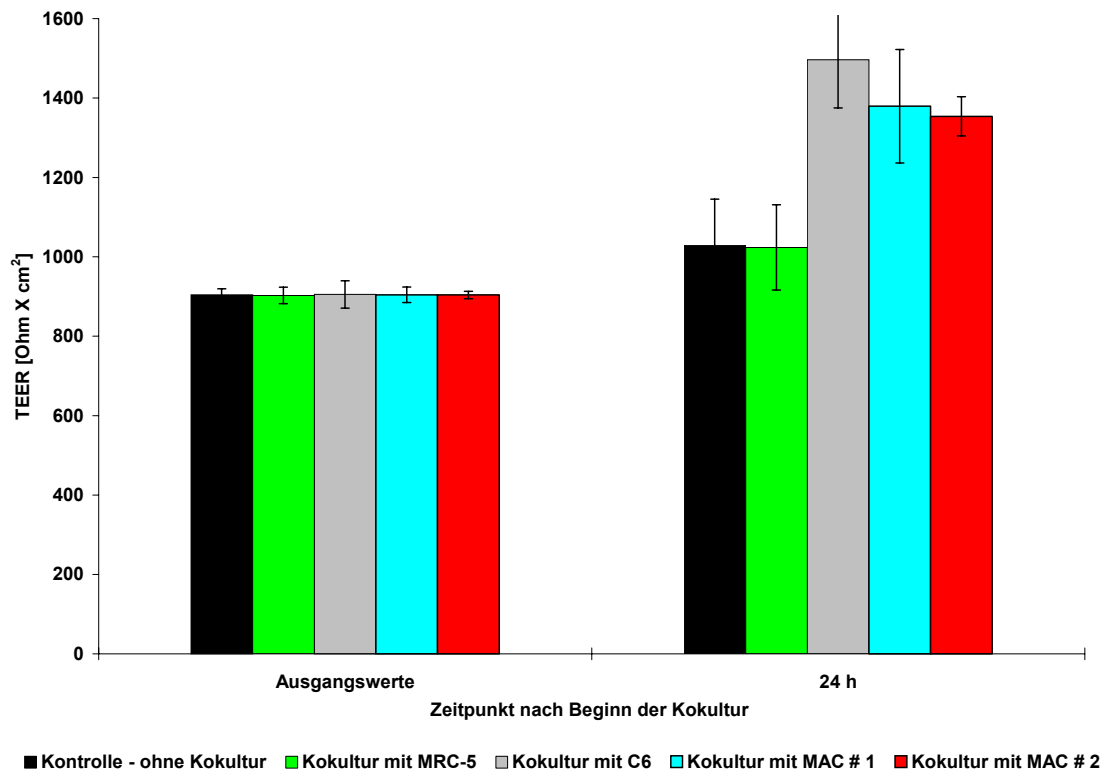


Abb. 15) Einfluss der Kokultur von postkonfluenten bovinen BCEC-Monolayern mit Zellen der Fibroblasten-Zelllinie MRC-5, C6-Glioma-Zellen und 8 d Serum-gereiften Makrophagen (MAC) zweier verschiedener Spender (MAC # 1 und MAC # 2) auf deren 24 h nach Versuchsbeginn gemessenen TEER. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch deren Einsetzen in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten MRC-5, C6 oder Makrophagen (250.000 Zellen/cm²). Der vor Beginn des Experiments gemessene Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts lag im Mittel bei 904 Ω·cm² ± 18 S.D.

Eine Kokultur von BCEC-Monolayern mit Makrophagen zweier verschiedener Spender bewirkte wie die Kokultur mit der Glioma-Zelllinie C6 (vergl. 4.2.3) im Vergleich zur Kontrolle ohne Kokultur eine deutliche Erhöhung des TEER. Innerhalb von 24 h lag der TEER der mit C6 kokultivierten BCEC-Monolayer 45 %, der TEER der mit Makrophagen kokultivierten Ansätze 34 % (Spender # 1) beziehungsweise 32 % (Spender # 2) über dem der Kontrolle ohne Kokultur. Eine Kokultur mit MRC-5 führte dagegen zu keiner TEER-Steigerung, der entsprechende Wert lag exakt auf dem Niveau der Kontrolle.

In einem weiteren Kokultur-Experiment, dessen Ergebnisse in der folgenden Abbildung 16 dargestellt sind, wurde der Einfluss der Kokultur von BCEC-Monolayern mit humanen Makrophagen mit der Kokultur mit C6-Glioma-Zellen über einen längeren Zeitraum verglichen.

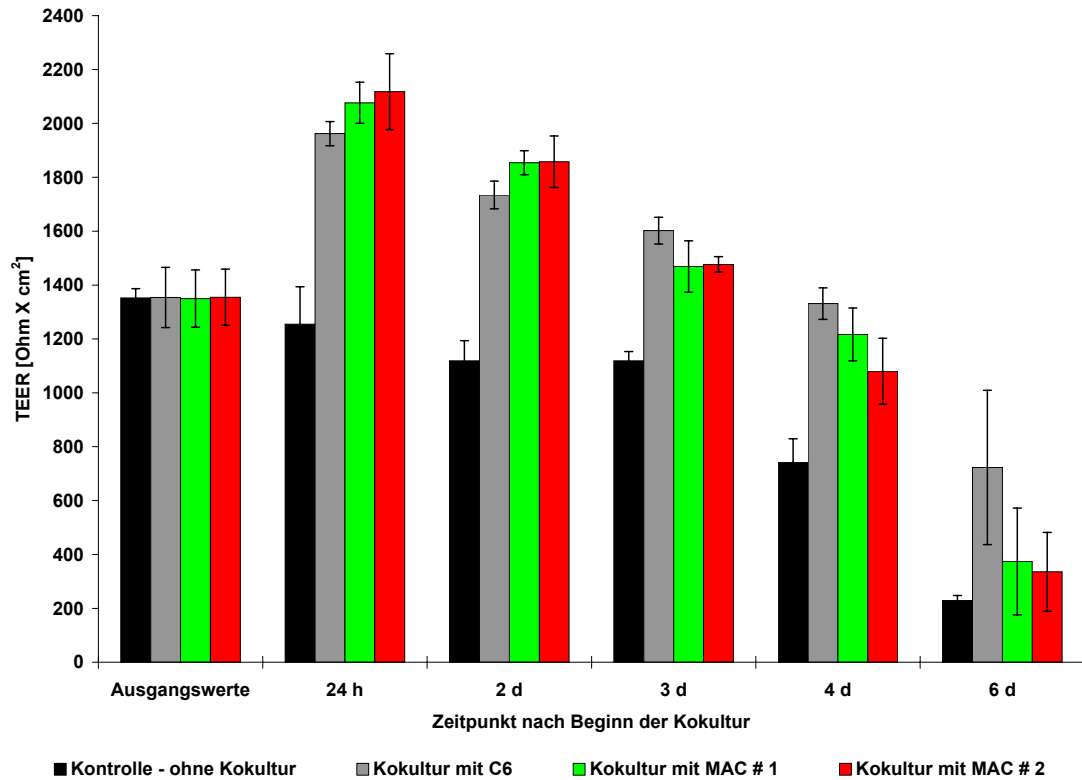


Abb. 16) Einfluss der Kokultur von postkonfluenten bovinen BCEC-Monolayern mit der Glioma-Zelllinie C6 beziehungsweise 8 d alten Serum-gereiften Makrophagen (MAC) zweier verschiedener Spender (MAC # 1 und MAC # 2) auf deren TEER. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch deren Einsetzen in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten C6 beziehungsweise Makrophagen (250.000 Zellen/cm²).

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle									
	24 h		2 d		3 d		4 d		6 d	
	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]
Kokultur mit C6	707	56	616	55	484	43	589	79	494	216
Kokultur mit MAC # 1	822	65	736	66	351	31	474	64	145	63
Kokultur mit MAC # 2	863	69	740	66	358	32	338	46	106	46
Kontrolle - ohne Kokultur (absoluter TEER [Ω·cm ²])	1255		1118		1118		742		229	

Tabelle 3) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 16) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments bestimmte Ausgangs-TEER lag im Mittel bei 1353 Ω·cm² ± 81 S.D.

Die Kokultur von BCEC-Monolayern mit Makrophagen oder der Glioma-Zelllinie C6 führte im Vergleich zur Kontrolle ohne Kokultur innerhalb von 24 h zu einer deutlichen Erhöhung des TEER. Auch im Verlauf der weiteren Kultivierung blieben die TEER-Werte der mit C6

beziehungsweise Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayer deutlich über denen der Kontrolle ohne Kokultur, obgleich sie in allen Ansätzen stetig sanken.

4.3.2 Einfluss Makrophagen-konditionierten Mediums (CM) auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer und Vergleich mit Zelllinien

In dem Experiment, dessen Ergebnisse in der folgenden Abbildung 17 dargestellt sind, wurden postkonfluente bovine BCEC-Monolayer in mit konditioniertem Medium (*conditioned medium*, CM) von Makrophagen, der Glioma-Zelllinie C6 sowie der Fibroblasten-Zelllinie MRC-5 gefüllte *Wells* eingesetzt (vergl. 3.4.3) und darin weiterkultiviert.

Sowohl 24 h als auch 2 d nach Versuchsbeginn zeigte sich im Vergleich zum Ausgangswert ein Anstieg des TEER bei der im gleichen Medium weiterkultivierten Kontrolle sowie bei dem in Makrophagen-CM kultivierten Ansatz, während er bei den mit CM der Zelllinien C6 und MRC-5 kultivierten Ansätzen zu diesem Zeitpunkt gefallen war.

Im weiteren Verlauf der Kultivierung änderte sich dieses Verhältnis deutlich. Im Zeitraum bis vier Tage nach Versuchsbeginn verblieben die TEER-Werte der mit Makrophagen-CM kultivierten BCEC-Monolayer auf annähernd der gleichen Höhe, während die entsprechenden Werte der anderen Ansätze mit zunehmender Kultivierungsdauer stetig sanken. Am Tag 6 nach Versuchsbeginn lag der TEER der mit Makrophagen-CM kultivierten BCEC deutlich über dem Vergleichswert der Kontrolle, der zu diesem Zeitpunkt auf etwa das Niveau der beiden anderen Ansätze mit den Zelllinien-CM gefallen war.

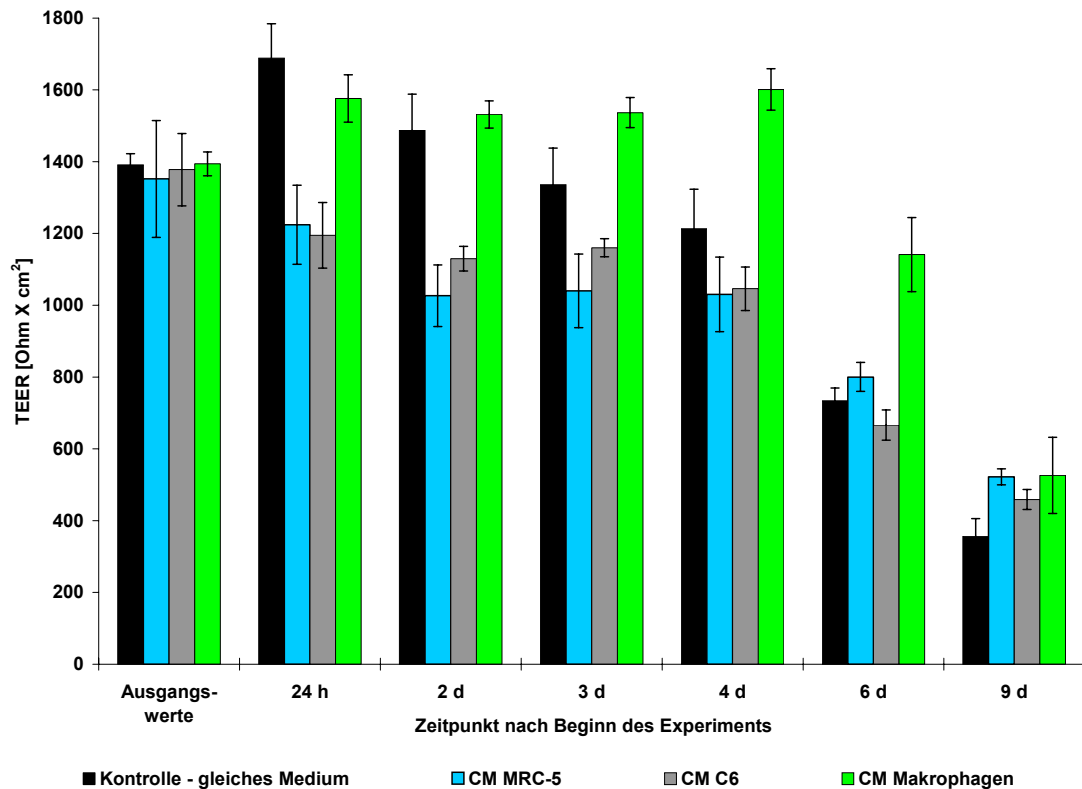


Abb. 17) Einfluss konditioniertem Mediums der Fibroblasten-Zelllinie MRC-5, Glioma-Zelllinie C6 und Serum-gereifter Makrophagen (MAC) auf den TEER von postkonfluenten bovinen BCEC-Monolayern. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch deren Einsetzen in Zellkulturplatten, die mit filtriertem konditioniertem Medium konfluenter MRC-5-, C6- oder Makrophagen-Kulturen gefüllt waren. Als Kontrolle wurden Inserts in *Wells* eingesetzt, die mit dem gleichen und filtriertem Medium aus den *Wells*, aus denen sie ursprünglich entnommen wurden, gefüllt waren.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn des Experiments / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle											
	24 h		2 d		3 d		4 d		6 d		9 d	
	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]
CM MRC-5	-464	-27	-461	-31	-296	-22	-183	-15	66	9	165	46
CM C6	-494	-29	-358	-24	-176	-13	-167	-14	-68	-9	102	29
CM Makrophagen	-113	-7	44	3	201	15	388	32	407	55	169	47
Kontrolle – gleiches Med. (absoluter TEER [$\Omega\text{-cm}^2$])	1689		1487		1336		1213		734		357	

Tabelle 4) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 17) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments gemessene Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts lag im Mittel bei $1379 \Omega\text{-cm}^2 \pm 86 \text{ S.D.}$

4.3.3 Einfluss proinflammatorisch stimulierter Makrophagen verschiedener Differenzierungsgrade auf die Permeabilität postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer bei Kokultur

In dem der folgenden Abbildung 18 zugrunde liegenden Experiment wurden die Makrophagen zweier verschiedener Spender zunächst 7 d im Teflonsack kultiviert und nach Aussaat in die Zellkulturplatten bis kurz vor Beginn des Kokultur-Experiment entweder für 24 h mit einem Cytokin-Mix aus GM-CSF, M-CSF, IL-4 und TNF- α oder 4 h mit LPS stimuliert (vergl. 3.4.2).

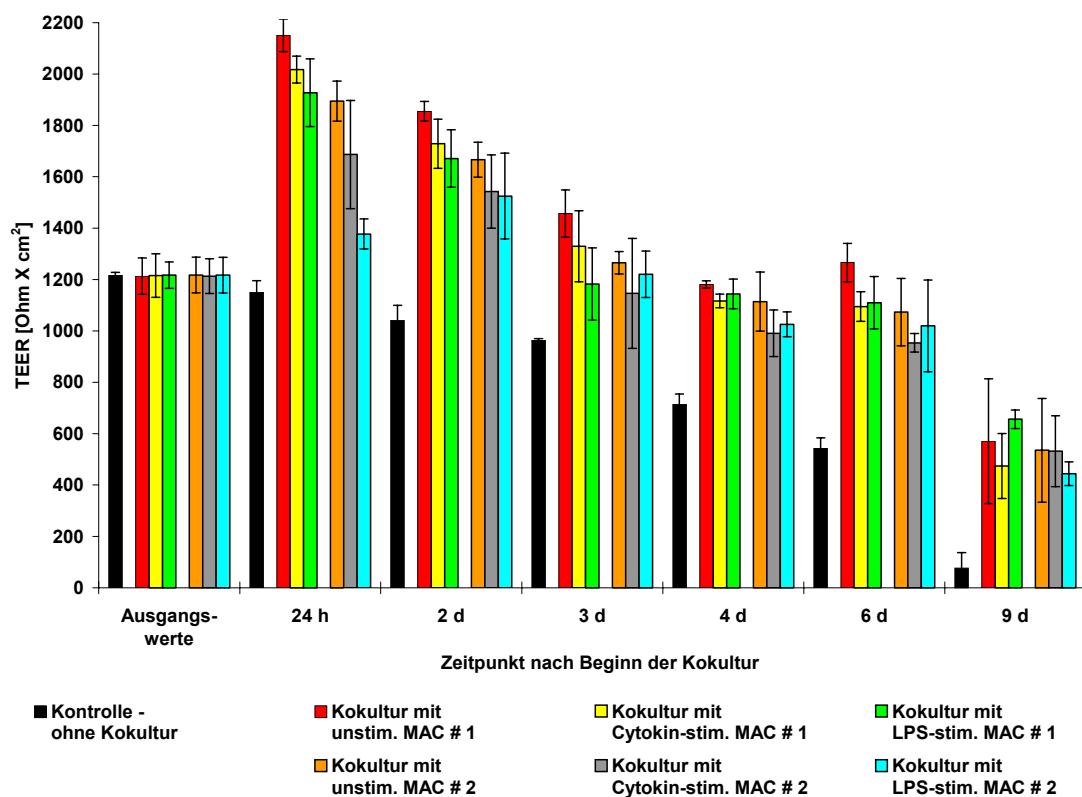


Abb. 18) Einfluss der Kokultur von unstimulierten beziehungsweise verschieden stimulierten 7 d im Teflon-Beutel gereiften Makrophagen zweier verschiedener Spender (MAC # 1 und MAC # 2) auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch deren Einsetzen in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen (250.000 Zellen/cm²). Vor Beginn der Kokultur wurde ein Teil der Makrophagen-Kulturen entweder für 24 h mit einem aus GM-CSF (100 ng/ml), M-CSF (100 ng/ml), IL-4 (1 U/ml) und TNF- α (50 ng/ml) bestehenden Cytokin-Mix oder durch Inkubation mit LPS (100 ng/ml) für 4 h stimuliert.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle											
	24 h		2 d		3 d		4 d		6 d		9 d	
	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]
Kokultur mit unstimulierten MAC # 1	1000	87	814	78	493	51	466	65	723	133	494	644
Kokultur mit Cytokin-stimulierten MAC # 1	866	75	687	66	365	38	402	56	552	102	397	519
Kokultur mit LPS-stimulierten MAC # 1	777	67	630	60	218	23	430	60	567	105	580	756
Kokultur mit unstimulierten MAC # 2	744	65	625	60	301	31	400	56	531	98	459	599
Kokultur mit Cytokin-stimulierten MAC # 2	536	47	501	48	182	19	276	39	411	76	455	594
Kokultur mit LPS-stimulierten MAC # 2	227	20	483	46	256	27	311	44	477	88	367	479
Kontrolle – ohne Kokultur (absoluter TEER [$\Omega\text{-cm}^2$])	1151		1042		964		714		543		77	

Tabelle 5) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 18) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments gemessene Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts lag im Mittel bei $1216 \Omega\text{-cm}^2 \pm 54 \text{ S.D.}$

Wie in den in Abschnitt 4.3.1 gezeigten Kokultur-Experimenten bewirkte auch in diesem Experiment die Kokultur von Makrophagen mit BCEC-Monolayern eine im Vergleich zur Kontrolle ohne Kokultur deutliche Erhöhung des TEER.

Die Behandlung der Makrophagen mit dem Cytokin-Mix zeigte keine eindeutige Auswirkung dieser Stimulation auf den von ihnen auf die kokultivierten BCEC ausgeübten Einfluss.

Bei den mit LPS-stimulierten Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayern waren die Unterschiede zu den unstimulierten Ansätzen prägnanter, zumindest bei der Makrophagen-Population des Spenders # 2. Bei den mit LPS-stimulierten Makrophagen des Spenders # 2 kokultivierten BCEC-Monolayern erhöhte sich der TEER innerhalb von 24 h nur geringfügig, und zwar um weniger als einem Drittel der entsprechenden TEER-Steigerung der mit unstimulierten Makrophagen kokultivierten BCEC (siehe Tab. 5). Es zeigten sich auch Unterschiede im weiteren zeitlichen Verlauf des TEER; bei den mit LPS-stimulierten Makrophagen des Spenders # 2 kokultivierten BCEC-Monolayern stieg der TEER weiter an und erreichte am Tag 2 nach Beginn der Kokultur fast die entsprechenden Werte der mit

unstimulierten beziehungsweise Cytokin-stimulierten Makrophagen dieses Spenders kokultivierten BCEC-Monolayer, während zu diesem Zeitpunkt bei sämtlichen anderen Ansätzen die TEER-Werte im Vergleich zu den 24 h-Werten bereits wieder gesunken waren.

Im Gegensatz zu den Makrophagen des Spenders #2 bewirkte die Stimulation der Makrophagen des Spenders #1 mit LPS nur eine geringfügige Reduktion der TEER-Steigerung bei den kokultivierten BCEC-Monolayern im Vergleich zu dem entsprechenden Ansatz mit unstimulierten Makrophagen.

Im weiteren Verlauf der Kokultur wurden die Unterschiede zwischen den verschiedenen Makrophagen-Ansätzen im Vergleich zu den Werten nach 24-stündiger Kokultur zunehmend geringer. 9 Tage nach Beginn des Experiments lag der TEER sämtlicher Kokultur-Ansätze um ein Vielfaches über dem der Kontrolle ohne Kokultur.

In einem weiteren Experiment wurden die BCEC mit Makrophagen fortgeschritteneren Differenzierungsgrades kokultiviert (siehe Abb. 19). Hierzu wurden die Makrophagen vor der Aussaat in die Zellkulturplatten zunächst 21 d im Teflon-Beutel kultiviert. Vor Beginn des Kokultur-Experiments erfolgte wiederum entweder eine Stimulation mit dem bereits beschriebenen Cytokin-Mix oder eine Stimulation der Makrophagen mit LPS für jeweils 24 h.

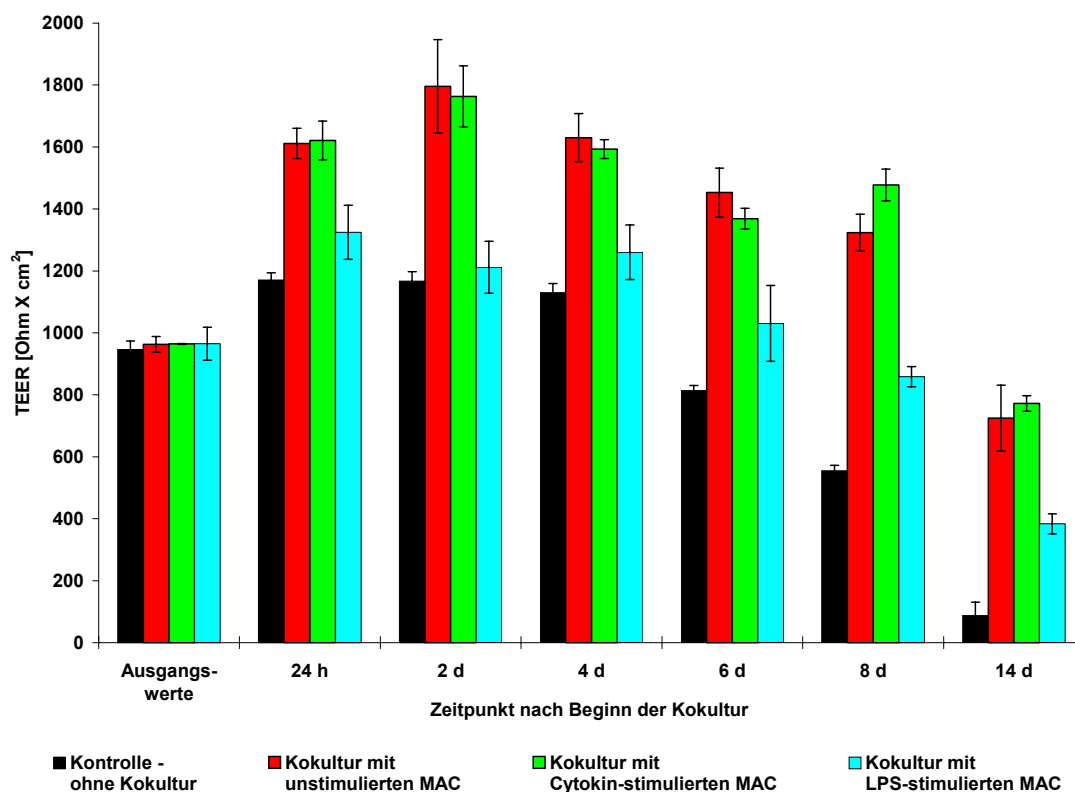


Abb. 19) Einfluss der Kokultur von unstimulierten beziehungsweise unterschiedlich stimulierten 21 d im Teflon-Beutel gereiften Makrophagen (MAC) auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayern. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch deren Einsetzen in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen (150.000 Zellen/cm²). Vor Beginn der Kokultur wurde ein Teil der Makrophagen-Kulturen entweder mit einem aus GM-CSF (100 ng/ml), M-CSF (100 ng/ml), IL-4 (1 U/ml) und TNF- α (50 ng/ml) bestehenden Cytokin-Mix oder durch Inkubation mit LPS (100 ng/ml) für 24 h stimuliert.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle											
	24 h		2 d		4 d		6 d		8 d		14 d	
	absolut [Ω -cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω -cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω -cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω -cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω -cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω -cm ²]	relativ [%]
Kokultur mit unstimulierten MAC	441	38	629	54	501	44	638	78	769	139	636	717
Kokultur mit Cytokin-stimulierten MAC	450	38	596	51	464	41	554	68	923	167	683	770
Kokultur mit LPS-stimulierten MAC	154	13	45	4	131	12	216	27	304	55	295	332
Kontrolle – ohne Kokultur (absoluter TEER [Ω -cm ²])	1171		1167		1130		815		554		89	

Tabelle 6) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 19) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments gemessene Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts lag im Mittel bei 953 Ω -cm² \pm 30 S.D.

Es zeigte sich, dass die Kokultur von BCEC-Monolayern mit Makrophagen fortgeschritteneren Differenzierungsgrades mit drei Wochen langer Vorkultur im Teflon-Beutel wie die Kokultur

mit Makrophagen geringeren Differenzierungsgrades mit nur einwöchiger Vorkultivierung zu einer deutlichen Erhöhung des TEER führte.

Eine Stimulation mit dem Cytokin-Mix zeigte bei diesem Experiment keine Beeinflussung des von den Makrophagen bewirkten Effekts auf die mit ihnen kokultivierten BCEC-Monolayer, der TEER lag bei beiden Ansätzen auf dem gleichen Niveau.

Eine Stimulation der Makrophagen mit LPS reduzierte den von ihnen bewirkten Effekt auf die BCEC im Vergleich zu den unstimulierten Makrophagen deutlich, sowohl 24 h als auch 2 d nach Versuchsbeginn lag der TEER der mit den LPS-stimulierten Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayer nur geringfügig über den entsprechenden Werten der Kontrolle ohne Kokultur. Erst bei längerer Kokultur wurden die Unterschiede zwischen den mit LPS-stimulierten Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayern und dem Ansatz ohne Kokultur deutlicher, der TEER fiel bei der Kontrolle ohne Kokultur wesentlich schneller.

Nach 14-tägiger Kokultur lag der TEER bei den mit Makrophagen kokultivierten BCEC um ein Vielfaches über dem der Kontrolle ohne Kokultur; er betrug beim Ansatz mit unstimulierten Makrophagen 75 % beziehungsweise beim Ansatz mit den Cytokin-stimulierten Makrophagen 80 % vom Ausgangswert vor Beginn der Kokultur, während der entsprechende Wert der Kontrolle bereits auf 9 % vom Ausgangswert gefallen ist.

4.3.4 Einfluss proinflammatorisch stimulierter Makrophagen verschiedener Differenzierungsgrade auf die Permeabilität postkonfluenter humaner BCEC-Monolayer bei Kokultur

Durch die erfolgreiche Aufarbeitung einer geeigneten humanen Hirnprobe ergab sich die Gelegenheit, ein Kokultur-Experiment im homologen System, also unter Verwendung von BCEC und Makrophagen humanen Ursprungs, durchzuführen. Hierbei wurden unterschiedlich differenzierte Makrophagen zweier verschiedener Spender verwendet, die vor ihrer Aussaat in die Zellkulturplatten für 7 d beziehungsweise 14 d im Teflon-Beutel kultiviert wurden. Auch in diesem Experiment erfolgte vor Beginn der Kokultur eine Stimulation der Makrophagen mit entweder dem bereits beschriebenen Cytokin-Mix oder LPS für jeweils 24 h.

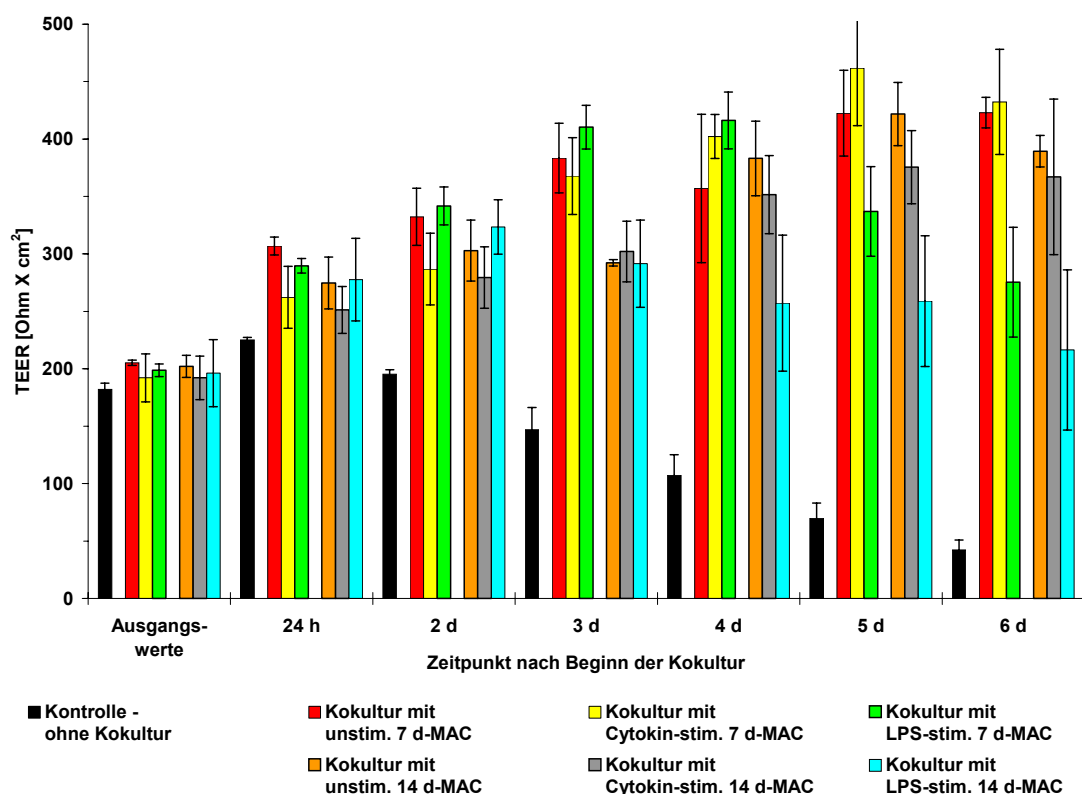


Abb. 20) Einfluss der Kokultur von unstimulierten beziehungsweise verschiedenen stimulierten 7 d und 14 d im Teflon-Beutel gereiften Makrophagen (MAC) auf den TEER postkonfluenter humaner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 9 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch deren Einsetzen in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen (250.000 Zellen/cm² bei den 7 d beziehungsweise 200.000 Zellen/cm² bei den 14 d im Teflon-Beutel kultivierten Makrophagen). Vor Beginn der Kokultur wurde ein Teil der Makrophagen-Kulturen entweder mit einem aus GM-CSF (100 ng/ml), M-CSF (100 ng/ml), IL-4 (1 U/ml) und TNF- α (50 ng/ml) bestehenden Cytokin-Mix oder durch Inkubation mit LPS (100 ng/ml) für 24 h stimuliert.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle											
	24 h		2 d		3 d		4 d		5 d		6 d	
	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]
Kokultur mit unstimulierten 7 d-MAC	82	36	137	70	237	161	250	233	353	505	381	899
Kokultur mit Cytokin- stimulierten 7 d-MAC	37	17	91	47	221	150	295	275	392	561	390	921
Kokultur mit LPS- stimulierten 7 d-MAC	65	29	146	75	263	179	309	288	267	382	233	550
Kokultur mit unstimulierten 14 d-MAC	50	22	108	55	145	99	276	257	352	504	347	819
Kokultur mit Cytokin- stimulierten 14 d-MAC	26	12	84	43	155	106	244	228	306	438	325	767
Kokultur mit LPS- stimulierten 14 d-MAC	53	23	128	66	145	99	150	140	189	271	174	411
Kontrolle – ohne Kokultur (absoluter TEER [$\Omega\text{-cm}^2$])	225		195		147		107		70		42	

Tabelle 7) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 20) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments gemessene Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts lag im Mittel bei $195 \Omega\text{-cm}^2 \pm 15 \text{ S.D.}$

Die Kokultur von humanen BCEC-Monolayern mit Makrophagen bewirkte wie bei bovinen BCEC-Monolayern im Vergleich zur Kontrolle ohne Kokultur eine prägnante Erhöhung des TEER. Diese war nach 24 h bei den meisten Kokultur-Ansätzen bereits deutlich ausgeprägt und wurde nach mehrtägiger Kokultur immer größer. Während der TEER beim Kontrollansatz, verglichen mit dem Ausgangswert vor Beginn des Kokultur-Experiments, nach 24 h zunächst noch geringfügig anstieg und anschließend im weiteren Verlauf der Kultivierung kontinuierlich absank, erfolgte dagegen bei den mit Makrophagen über mehrere Tage kokultivierten Ansätzen ein fortgesetzter Anstieg und/oder Verbleiben des TEER auf einem im Vergleich zur Kontrolle ohne Kokultur um ein Vielfaches höher liegendem Niveau.

Innerhalb der Makrophagen-Population eines Spenders beziehungsweise Reifungsgrades bestanden zwischen den Ansätzen der mit unstimulierten oder proinflammatorisch stimulierten Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayer bis einschließlich Tag 3 nach Beginn des Experiments nur geringfügige und meist im Rahmen der Standardabweichung liegende Unterschiede der TEER-Werte zueinander. Ab diesem Zeitpunkt stagnierten aber die TEER-

Werte der mit 14 d im Teflon-Beutel gereiften und mit LPS-stimulierten Makrophagen kokultivierten BCEC für drei Tage auf ihrem Niveau, während der TEER der mit unstimulierten beziehungsweise Cytokin-stimulierten Makrophagen des gleichen Spenders kokultivierten BCEC-Monolayer weiter anstieg. Ähnliches zeigte sich auch bei den Ansätzen mit 7 d im Teflon-Beutel gereiften Makrophagen: zwischen Tag 4 und Tag 5 nach Beginn des Kokultur-Experiments fiel der TEER der mit LPS-stimulierten Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayer deutlich ab, während er bei den mit unstimulierten beziehungsweise Cytokin-stimulierten Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayern noch weiter anstieg.

4.3.5 Einfluss HIV-1-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

Zusätzlich zu den Kokultur-Experimenten mit unterschiedlich stimulierten Makrophagen verschiedenen Differenzierungsgrades wurden weitere Versuche mit HIV-1-infizierten Makrophagen durchgeführt. Im folgenden werden zwei dieser Experimente exemplarisch vorgestellt, deren Ergebnisse in der folgenden Abbildung 21 dargestellt sind. Die den Abbildungen 21a und 21b zugrunde liegenden Experimente wurden mit zwei verschiedenen BCEC-Präparationen durchgeführt, die sich in der Höhe der vor Beginn des Kokultur-Experiments gemessenen Ausgangs-TEER-Werte deutlich voneinander unterschieden; dieser befand sich im Mittel bei dem der Abbildung 21b zugrunde liegenden Experiment auf fast dem doppelten Niveau. In diesem Experiment wurden außerdem Makrophagen zweier verschiedener Spender verwendet, um eventuelle spenderabhängige Unterschiede in ihrer Infizierbarkeit mit HIV und daraus resultierende Differenzen bezüglich ihres Einflusses auf die mit ihnen kokultivierten BCEC-Monolayer zu verdeutlichen. Die Durchführung der Kokultur-Experimente erfolgte ansonsten mit der bereits beschriebenen Methodik (vergl. 3.4.4).

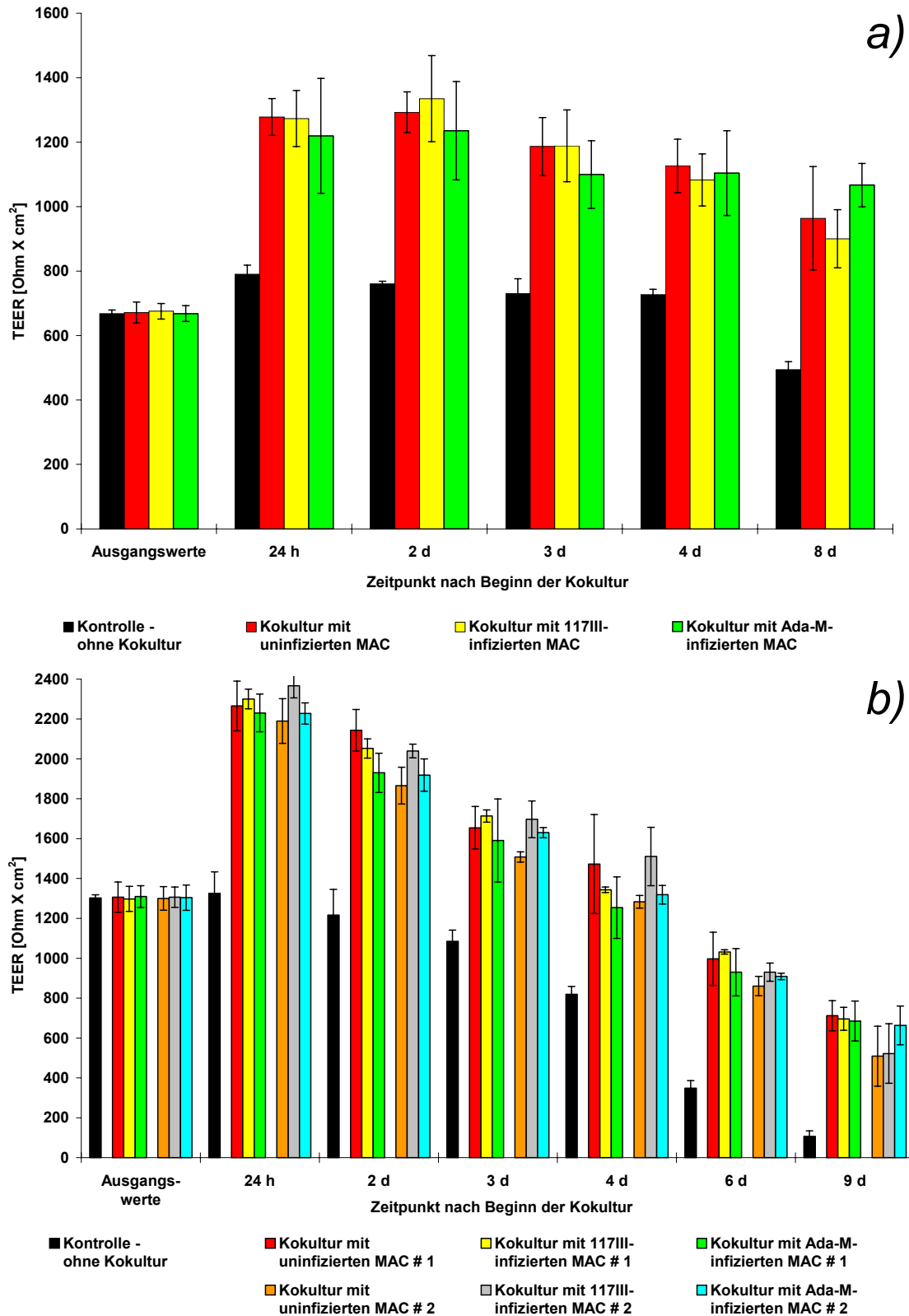


Abb. 21) Einfluss der Kokultur von Makrophagen (MAC), die mit zwei unterschiedlichen HIV-1-Isolaten (117_{III} und Ada-M) infiziert waren, auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch deren Einsetzen in Zellkulturplatten mit darin wachsenden HIV-infizierten Makrophagen (250.000 Zellen/cm²). Die Makrophagen wurden nach 7-tägiger Kultivierung im Teflon-Beutel ausplattiert, durch 24-stündige Inkubation mit virushaltigem Überstand mit HIV infiziert und nach weiteren 6 Tagen bei weitgehender Durchinfektion der Kulturen für das Kokultur-Experiment verwendet. Die den Abbildungen (a) und (b) zugrunde liegenden Experimente wurden mit verschiedenen BCEC-Präparationen durchgeführt, und bei (b) wurden Makrophagen zweier verschiedener Spender verwendet (MAC # 1 und MAC # 2).

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle									
	24 h		2 d		3 d		4 d		8 d	
	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]
Kokultur mit uninfizierten MAC	488	62	533	70	457	63	400	55	470	95
Kokultur mit HIV-117 _{III} -infizierten MAC	483	61	575	76	459	63	356	49	406	82
Kokultur mit HIV-Ada-M-infizierten MAC	429	54	475	63	370	51	377	52	573	116
Kontrolle ohne Kokultur absoluter TEER [$\Omega\text{-cm}^2$]	790		760		730		727		494	

Tabelle 8) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des in Abb. 21a gezeigten Experiments in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments gemessene Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts lag im Mittel bei $671 \Omega\text{-cm}^2 \pm 21 \text{ S.D.}$

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle											
	24 h		2 d		3 d		4 d		6 d		9 d	
	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]
Kokultur mit uninfizierten MAC # 1	940	71	927	76	570	53	654	80	649	187	606	570
Kokultur mit HIV-117 _{III} -infizierten MAC # 1	975	74	836	69	629	58	525	64	684	197	590	554
Kokultur mit HIV-Ada-M-infizierten MAC # 1	905	68	714	59	506	47	435	53	582	167	579	544
Kokultur mit uninfizierten MAC # 2	864	65	649	53	424	39	464	57	513	147	403	379
Kokultur mit HIV-117 _{III} -infizierten MAC # 2	1041	79	823	68	612	56	691	84	582	167	416	391
Kokultur mit HIV-Ada-M-infizierten MAC # 2	902	68	703	58	546	50	499	61	561	161	557	524
Kontrolle ohne Kokultur absoluter TEER [$\Omega\text{-cm}^2$]	1326		1217		1085		819		348		106	

Tabelle 9) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des in Abb. 21b gezeigten Experiments in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments gemessene Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts lag im Mittel bei $1304 \Omega\text{-cm}^2 \pm 48 \text{ S.D.}$

Das Vorhandensein einer produktiven HIV-Infektion bei den verwendeten Makrophagen-Kulturen im Verlauf der Kokultur-Experimente konnte durch Bestimmung der Aktivität des

HIV-spezifischen Enzyms *Reverse Transkriptase* (RT) in deren Kulturmedien nachgewiesen werden (siehe folgende Tabelle).

HIV-Experiment # 1 (vergl. Abb. 21a und 22a)		HIV-Experiment # 2 (vergl. Abb. 21b und 22b)	
Zeitpunkt/Ansatz	RT-Aktivität [cpm/ml/90 min]	Zeitpunkt/Ansatz	RT-Aktivität [cpm/ml/90 min]
2 d 117 _{III}	181.952	3 d 117 _{III} MAC # 1	31.568
2 d Ada-M	65.804	3 d 117 _{III} MAC # 2	133.961
4 d 117 _{III}	810.268	3 d Ada-M MAC # 1	33.628
4 d Ada-M	319.664	3 d Ada-M MAC # 2	119.468
8 d 117 _{III}	843.673	6 d 117 _{III} MAC # 1	31.254
8 d Ada-M	564.499	6 d 117 _{III} MAC # 2	88.326
8 d 117 _{III} + Kokultur	395.888	6 d Ada-M MAC # 1	43.603
8 d Ada-M + Kokultur	707.948	6 d Ada-M MAC # 2	56.620
		9 d 117 _{III} MAC # 1	51.552
		9 d 117 _{III} MAC # 2	101.926
		9 d Ada-M MAC # 1	228.656
		9 d Ada-M MAC # 2	128.729
		9 d 117 _{III} MAC # 1 + Kokultur	25.660
		9 d 117 _{III} MAC # 2 + Kokultur	79.126
		9 d Ada-M MAC # 1 + Kokultur	141.065
		9 d Ada-M MAC # 2 + Kokultur	143.078

Tabelle 10) Übersicht der RT-Aktivitäten in den Kulturmedien der HIV-infizierten Makrophagen-Kulturen zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Kokultur-Experimente von bovinen BCEC-Monolayern mit HIV-infizierten Makrophagen (vergl. Abb. 21) beziehungsweise zum Zeitpunkt der Entnahme von konditioniertem Medium HIV-infizierter Makrophagen zur Inkubation von BCEC-Monolayern (*kursive* Schrift, vergl. 4.3.6 und Abb. 22). Die linke Hälfte der Tabelle (HIV-Experiment # 1) zeigt dabei die RT-Werte der den Abb. 21a und 22a zugrunde liegenden Experimente, die rechte Hälfte die RT-Werte der Experimente, deren Ergebnisse in Abb. 21b und Abb. 22b dargestellt sind (HIV-Experiment # 2). Der Zeitpunkt bezieht sich dabei auf den Beginn des jeweiligen Kokultur-Experiments beziehungsweise Abnahme des konditionierten Mediums (*kursive*). Der Ansatz bezeichnet die Art des verwendeten HIV-1-Isolats (117_{III} oder Ada-M), und bei dem in der rechten Hälfte der Tabelle gezeigten HIV-Experiment # 2 zusätzlich noch den jeweiligen Makrophagen-Spender (MAC # 1 oder MAC # 2). Nach Ende des jeweiligen Kokultur-Experiments wurden zusätzlich noch die RT-Aktivitäten in den Überständen der mit den BCEC-Monolayern kokultivierten HIV-infizierten Makrophagen-Kulturen bestimmt, was entsprechend gekennzeichnet ist. Die Bestimmung der RT-Aktivitäten erfolgte für beide Experimente innerhalb eines RT-Assays. Sämtliche RT-Angaben sind Blankwert-korrigiert.

In beiden Experimenten zeigte sich trotz unterschiedlichen Ausgangsniveaus des TEER vor Beginn des Kokultur-Experiments ein vergleichbares Ergebnis, nämlich eine deutliche Erhöhung des TEER bei sämtlichen Ansätzen, bei denen die BCEC-Monolayer mit uninfizierten oder HIV-infizierten Makrophagen kokultiviert wurden. Unterschiede zwischen den beiden Experimenten ergaben sich nur dahingehend, dass in dem Versuch mit den niedrigeren TEER-Ausgangswerten die maximale durch den Einfluss der Makrophagen bewirkte TEER-Erhöhung erst nach zweitägiger Kokultur erreicht wurde (siehe Abb. 21a und Tab. 8), während dies in dem Abb. 21b zugrunde liegenden Experiment bereits nach 24 h der Fall war. Die im Vergleich

zur Kontrolle ohne Kokultur erfolgte Erhöhung des TEER der mit Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayer betrug in dem Abb. 21a zugrunde liegenden Experiment 2 d nach Versuchsbeginn etwa der bereits nach 24-stündiger Kokultur erzielten TEER-Erhöhung des Experiments von Abb. 21b.

Eindeutige Unterschiede zwischen uninfizierten und HIV-infizierten Makrophagen bezüglich ihres Einflusses auf die Permeabilität der kokultivierten BCEC-Monolayer waren bei diesen Experimenten nicht zu finden, sämtliche Differenzen zwischen den TEER-Werten der verschiedenen Ansätze waren nur geringfügig und bewegten sich im Rahmen der Standardabweichung.

4.3.6 Einfluss konditionierten Mediums HIV-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

In den Abbildung 22a-b zugrunde liegenden Experimenten wurden postkonfluente bovine BCEC-Monolayer in konditioniertes Medium (*conditioned medium*, CM) von mit den HIV-1-Isolaten 117_{III} oder Ada-M infizierten Makrophagen - beziehungsweise uninfizierten Makrophagen als Vergleich - eingesetzt (vergl. 3.4.5). In dem Experiment der Abb. 22a erfolgte dabei die Herstellung des CMs über einen Zeitraum von 2 Tagen, in dem Abb. 22b zugrunde liegenden Experiment 6 Tage; außerdem wurden in dem Abb. 22b zugrunde liegenden Experiment Makrophagen zweier verschiedener Spender verwendet, um eventuelle spenderabhängige Unterschiede in ihrer Infizierbarkeit mit HIV und daraus resultierende Differenzen bezüglich des von ihnen konditionierten Mediums zu verdeutlichen. Zum Zeitpunkt der Abnahme des konditionierten Mediums war eine produktive HIV-Infektion bei den hierfür verwendeten Makrophagen-Kulturen vorhanden (vergl. Tabelle 10).

Als zusätzliche Kontrolle wurde bei dem Abb. 22a zugrunde liegenden Experiment noch frisches, unkonditioniertes Medium verwendet. Aufgrund der mit diesem Kontroll-Medium gemachten Ergebnisse wurde im zweiten Experiment auf diesen Kontrollansatz verzichtet (siehe unten).

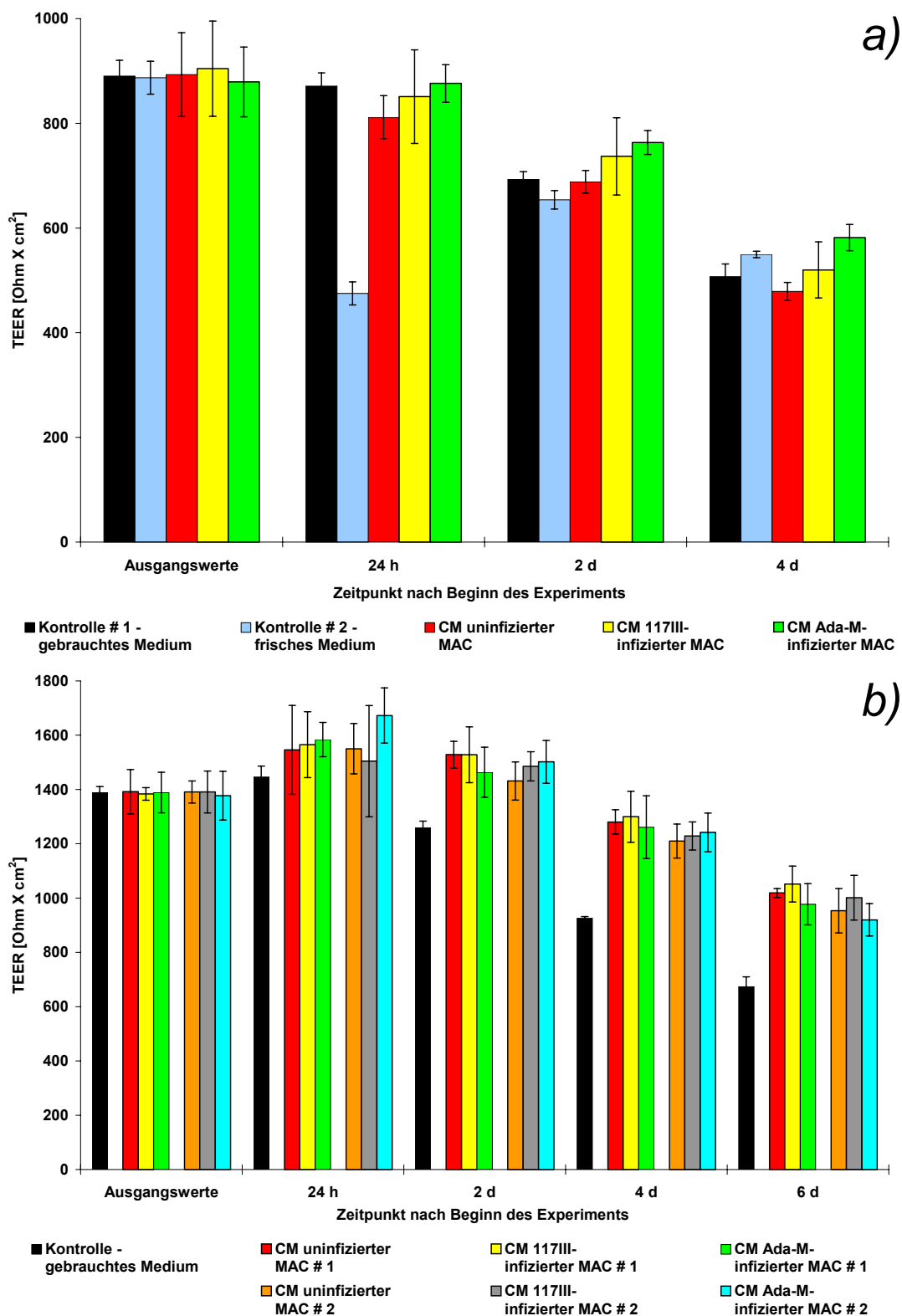


Abb. 22) Einfluss von konditioniertem Medium (CM) uninifizierter und HIV-infizierter Makrophagen (MAC) auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 9 (a) beziehungsweise Tag 6 (b) nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch deren Einsetzen in Zellkulturplatten, die entweder mit CM uninifizierter beziehungsweise HIV-infizierter Makrophagen-Kulturen oder unkonditioniertem Medium gefüllt waren. Die Makrophagen wurden nach 7-tägiger Kultivierung im Teflon-Beutel ausplattiert, durch 24-stündige Inkubation mit virushaltigem Überstand mit HIV infiziert und nach weiteren 6 Tagen bei weitgehender Durchinfektion der Kulturen für die Herstellung des CMs verwendet. Die Herstellung des CMs erfolgte über einen Zeitraum von 2 (a) beziehungsweise 6 Tagen (b). Die den Abbildungen (a) und (b) zugrunde liegenden Experimente wurden mit verschiedenen BCEC-Präparationen durchgeführt, und bei (b) wurden Makrophagen zweier verschiedener Spender verwendet (MAC # 1 und MAC # 2).

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn des Experiments / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle					
	24 h		2 d		4 d	
	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]
Kontrolle # 2 – frisches Medium	-396	-45	-40	-6	43	8
CM uninfizierter MAC	-59	-7	-6	-1	-28	-6
CM HIV-117 _{III} -infizierter MAC	-20	-2	43	6	13	3
CM HIV-Ada-M-infizierter MAC	5	1	70	10	75	15
Kontrolle # 1 – gebrauchtes Medium (absoluter TEER [$\Omega\cdot\text{cm}^2$])	871		694		507	

Tabelle 11) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des in Abb. 22a gezeigten Experiments in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn der Inkubation mit dem CM bestimmte Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts lag im Mittel bei $891 \Omega\cdot\text{cm}^2 \pm 55 \text{ S.D.}$

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn des Experiments / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle							
	24 h		2 d		4 d		6 d	
	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]
CM uninfizierter MAC # 1	100	7	269	21	355	38	345	51
CM HIV-117 _{III} -infizierter MAC # 1	120	8	268	21	374	40	378	56
CM HIV-Ada-M-infizierter MAC # 1	138	10	204	16	336	36	304	45
CM uninfizierter MAC # 2	105	7	172	14	285	31	280	42
CM HIV-117 _{III} -infizierter MAC # 2	59	4	226	18	304	33	328	49
CM HIV-Ada-M-infizierter MAC # 2	227	16	242	19	316	34	246	37
Kontrolle – gebrauchtes Medium (absoluter TEER [$\Omega\cdot\text{cm}^2$])	1446		1260		925		674	

Tabelle 12) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des in Abb. 22b gezeigten Experiments in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der Mittelwert der Ausgangs-TEER-Werte der verwendeten Inserts lag hier bei $1388 \Omega\cdot\text{cm}^2 \pm 54 \text{ S.D.}$

In dem Experiment, bei dem die Herstellung des Makrophagen-konditionierten Mediums über einen Zeitraum von nur 2 Tagen erfolgte, zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Ansätzen, bei denen die BCEC mit den verschiedenen Makrophagen-konditionierten Medien inkubiert wurden, und dem Kontrollansatz, bei dem die Weiterkultivierung im gleichen Medium aus dem unteren Kompartiment des Blut-Hirn-Schranken-Modells erfolgte (siehe Abb. 22a und Tab. 11). Es existierten auch keine eindeutigen Unterschiede zwischen den in CM uninfizierter Makrophagen und den in CM 117_{III}- oder Ada-M-infizierter Makrophagen

kultivierten BCEC-Monolayern. Beim zweiten Kontrollansatz mit frischem Medium zeigte sich aber innerhalb von 24 h ein deutlicher Einbruch des TEER im Vergleich zum Ausgangswert um fast 50 %, was auf das im Medium enthaltene frische Serum zurückzuführen ist (vergl. 4.4.1). Nach weiteren 24 h regenerierte sich das System aber wieder, und der TEER dieses Ansatzes befand sich wieder auf dem Niveau der anderen Ansätze.

In dem Experiment, bei dem die Herstellung des Makrophagen-konditionierten Mediums über einen Zeitraum von 6 Tagen erfolgte, zeigte sich hingegen ein abweichendes Ergebnis (siehe Abb. 22*b* und Tab. 12). Während 24 h nach Versuchsbeginn noch keine eindeutigen Unterschiede zwischen den TEER-Werten der in unterschiedlichen Medien kultivierten BCEC-Monolayer auszumachen waren, änderte sich dieses Verhältnis im Verlauf der weiteren Kultivierung. Nach weiteren 24 h, also 2 d nach Versuchsbeginn, lagen die TEER-Werte der in Makrophagen-CM kultivierten BCEC-Monolayer bereits deutlich über dem entsprechenden Wert der Kontrolle, und dieser Unterschied wurde mit fortgesetzter Kultivierung zunehmend größer. Auch bei diesem Experiment existierten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den TEER-Werten der in CM uninfizierter Makrophagen kultivierten BCEC-Monolayer und den in CM 117_{III}- oder Ada-M-infizierter Makrophagen kultivierten BCEC-Monolayern. Zwischen den beiden verschiedenen Makrophagen-Spendern waren ebenfalls keine eindeutigen Unterschiede auszumachen.

4.3.7 Untersuchung der an der Makrophagen-BCEC-Interaktion beteiligten Signaltransduktionswege

4.3.7.1 Adenylat-Cyclase-cAMP-Signaltransduktionsweg

4.3.7.1.1 Adenylat-Cyclase-Aktivator Forskolin und Phosphodiesterase-Inhibitor (PDEI) RO 20-1724

In dem der folgenden Abbildung 23 zugrunde liegenden Experiment wurden postkonfluente BCEC-Monolayer mit Makrophagen kokultiviert und zusätzlich entweder mit dem Adenylat-Cyclase-Aktivator Forskolin oder dem Phosphodiesterase-Inhibitor (PDEI) RO 20-1724 inkubiert. Darüber hinaus erfolgte eine Kokultur mit Makrophagen, die bis zum Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h mit entweder Forskolin oder PDEI vorinkubiert wurden. Zwecks besserer Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse der innerhalb eines Versuchs mit einer BCEC-Präparation durchgeführten Ansätze in zwei Grafiken dargestellt.

Wie bereits in vergleichbaren Experimenten (vergl. 4.2.3) führte auch bei diesem Versuch die Behandlung postkonfluenter BCEC mit Forskolin oder RO 20-1724 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer deutlichen Erhöhung ihres TEER.

Die Kokultur von BCEC-Monolayern mit der Glioma-Zelllinie C6 und Makrophagen führte ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung des TEER im Vergleich zur Kontrolle ohne Kokultur; und diese TEER-Erhöhung konnte durch die Zugabe von Forskolin oder PDEI im Vergleich zu den entsprechenden Kokultur-Ansätzen ohne Zugabe weiter gesteigert werden, so dass auch hier ein additiver Wirkmechanismus existierte.

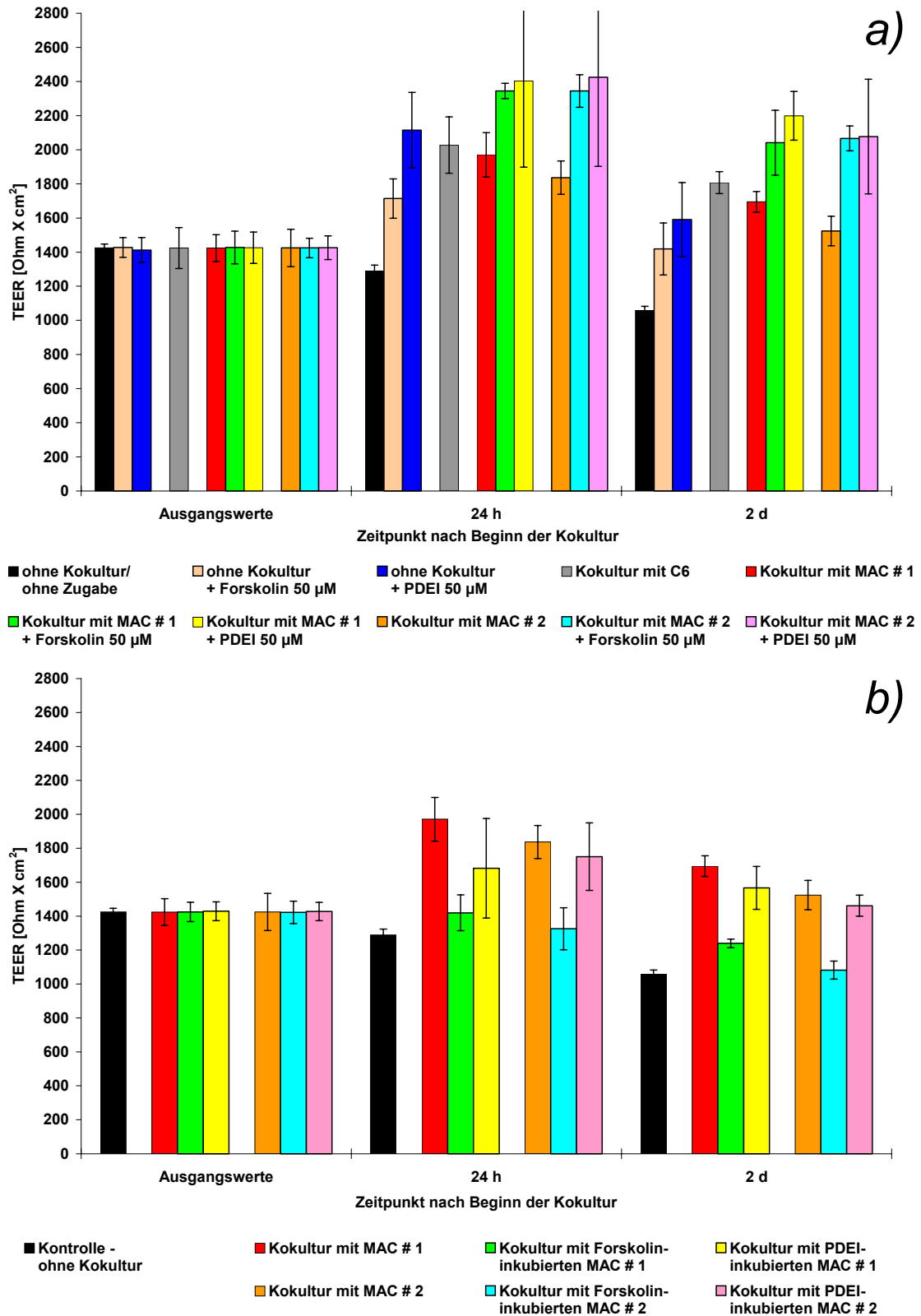


Abb. 23) Einfluss einer Kokultur von Makrophagen beziehungsweise C6-Glioma-Zellen und/oder Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Inkubation mit 50 µM Forskolin oder 50 µM Phosphodiesterase-Inhibitors (PDEI) RO 20-1724 auf den TEER postkonfluenten boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von Forskolin oder PDEI und/oder Einsetzen der Inserts in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen zweier verschiedener Spender (MAC # 1 und MAC # 2) beziehungsweise C6-Glioma-Zellen. Die Zugabe der Substanzen erfolgte direkt daran anschließend in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts (a). Zusätzlich erfolgte eine Kokultur von BCEC mit Makrophagen, die bis zum Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h mit 50 µM Forskolin oder PDEI inkubiert wurden (b).

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur und/oder Zugabe / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle			
	24 h		2 d	
	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]
ohne Kokultur + Forskolin 50 μM	425	33	361	34
ohne Kokultur + PDEI 50 μM	826	64	533	50
Kokultur mit C6	738	57	749	71
Kokultur mit MAC # 1	682	53	637	60
Kokultur mit MAC # 1 + Forskolin 50 μM	1055	82	983	93
Kokultur mit MAC # 1 + PDEI 50 μM	1114	86	1141	108
Kokultur mit MAC # 2	547	42	466	44
Kokultur mit MAC # 2 + Forskolin 50 μM	1055	82	1009	95
Kokultur mit MAC # 2 + PDEI 50 μM	1136	88	1020	96
Kokultur mit Forskolin-inkubierten MAC # 1	131	10	182	17
Kokultur mit PDEI-inkubierten MAC # 1	393	30	509	48
Kokultur mit Forskolin- inkubierten MAC # 2	37	3	24	2
Kokultur mit PDEI-inkubierten MAC # 2	461	36	404	38
Kontrolle ohne Kokultur/ohne Zugabe (absoluter TEER [$\Omega\cdot\text{cm}^2$])	1289		1058	

Tabelle 13) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 23) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments bestimmte Ausgangs-TEER lag im Mittel bei $1425 \Omega\cdot\text{cm}^2 \pm 63 \text{ S.D.}$

Eine 24-stündige Inkubation der Makrophagen mit dem Adenylat-Cyclase-Aktivator Forskolin bis kurz vor Beginn des Kokultur-Experiments zeigte bei beiden Makrophagen-Spendern eine fast völlige Blockierung des von ihnen ausgeübten Einflusses auf die kokultivierten BCEC-Monolayer (siehe Abb. 23b): 24 h nach Beginn der Experiments lagen die TEER-Werte der BCEC-Monolayer, die mit Forskolin-behandelten Makrophagen kokultiviert wurden, nur geringfügig über dem entsprechenden Wert der Kontrolle ohne Kokultur und somit deutlich unterhalb der entsprechenden Werte der mit unbehandelten Makrophagen kokultivierten BCEC. Bei den PDEI-behandelten Makrophagen war das Ergebnis dagegen nicht so eindeutig: während sich bei den Makrophagen des Spenders # 2 sowohl 24 h als auch 2 d nach Beginn der Kokultur kein eindeutiger Unterschied zwischen den PDEI-behandelten und den unbehandelten Makrophagen bezüglich ihres Einflusses auf die kokultivierten BCEC-Monolayer zeigten, lag

der TEER bei den mit PDEI-behandelten Makrophagen des Spenders # 1 kokultivierten BCEC im Vergleich zum Ansatz mit unbehandelten Makrophagen 24 h nach Versuchsbeginn deutlich niedriger, aber immer noch erheblich über dem entsprechenden Wert der Kontrolle ohne Kokultur. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichung der TEER-Werte der Inserts dieses Ansatzes ist der Unterschied zu den entsprechenden Werten des Ansatzes mit den unbehandelten Makrophagen aber nicht signifikant. Nach weiteren 24 h war auch bei den Ansätzen mit Makrophagen des Spenders # 1 der Unterschied zwischen den TEER-Werten der mit unbehandelten und PDEI-behandelten Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayer unbedeutend und bewegte sich im Rahmen der Standardabweichung.

Aufgrund der teilweise hohen Standardabweichung der TEER-Werte in dem oben gezeigten Experiment bei den Ansätzen, bei denen die BCEC mit PDEI inkubiert wurden, erfolgte mit einer anderen BCEC-Präparation eine Wiederholung der Makrophagen-Kokultur bei gleichzeitiger PDEI-Inkubation; die Ergebnisse dieses weiteren Experiments sind in der folgenden Abbildung 24 dargestellt. Die Methodik war dabei die gleiche wie bei dem oben gezeigten Experiment.

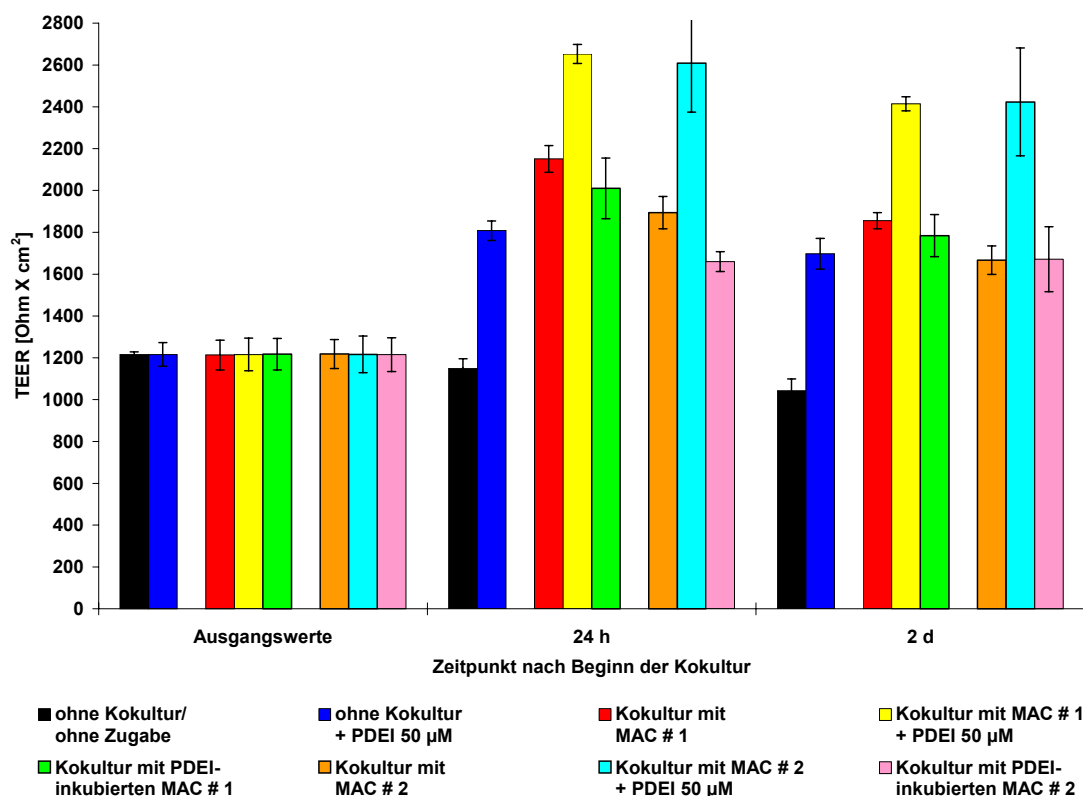


Abb. 24) Einfluss einer Kokultur von Makrophagen und/oder Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Inkubation mit 50 µM Phosphodiesterase-Inhibitor (PDEI) RO 20-1724 auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von PDEI und/oder Einsetzen der Inserts in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen zweier verschiedener Spender (MAC # 1 und MAC # 2). Die Zugabe der Substanz erfolgte direkt daran anschließend in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts. Zusätzlich erfolgte eine Kokultur von BCEC mit Makrophagen, die bis zum Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h mit 50 µM PDEI inkubiert wurden.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur und/oder Zugabe / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle			
	24 h		2 d	
	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]
ohne Kokultur + PDEI 50 µM	657	57	655	63
Kokultur mit MAC # 1	1000	87	814	78
Kokultur mit MAC # 1 + PDEI 50 µM	1502	131	1372	132
Kokultur mit PDEI-inkubierten MAC # 1	859	75	743	71
Kokultur mit MAC # 2	744	65	625	60
Kokultur mit MAC # 2 + PDEI 50 µM	1458	127	1381	133
Kokultur mit PDEI-inkubierten MAC # 2	509	44	630	60
Kontrolle ohne Kokultur/ohne Zugabe (absoluter TEER [Ω·cm ²])	1151		1042	

Tabelle 14) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 24) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn gemessene Ausgangs-TEER lag im Mittel bei 1216 Ω·cm² ± 58 S.D.

Auch bei diesem Experiment bewirkte die Zugabe des PDEI sowohl bei den mit Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayer als auch bei den Ansätzen ohne Kokultur eine deutliche Erhöhung des TEER im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Ansätzen.

Zwei Tage nach Versuchsbeginn war der TEER bei sämtlichen Ansätzen verglichen mit den 24 h-Werten leicht gesunken, im Verhältnis der Werte zueinander ergaben sich aber nur geringfügige Änderungen.

Eine 24-stündige Inkubation der Makrophagen bis kurz vor Beginn des Kokultur-Experiments mit PDEI zeigte bei den Makrophagen des Spenders # 1 sowohl 24 h als auch 2 d nach Beginn der Kokultur keinen eindeutigen Unterschied zwischen den PDEI-behandelten und den unbehandelten Makrophagen bezüglich ihres Einflusses auf die kokultivierten BCEC-Monolayer. Bei den mit PDEI-behandelten Makrophagen des Spenders # 2 kokultivierten BCEC lag der TEER im Vergleich zum Ansatz mit unbehandelten Makrophagen 24 h nach Versuchsbeginn deutlich niedriger, aber noch erheblich über dem entsprechenden Wert der Kontrolle ohne Kokultur. Nach weiteren 24 h war dieser Unterschied zwischen den TEER-Werten der mit unbehandelten und PDEI-behandelten Makrophagen des Spenders # 2 kokultivierten BCEC allerdings nicht mehr vorhanden.

4.3.7.1.2 Adenylat-Cyclase-Inhibitor (ACI) SQ22536

In einem weiteren Experiment wurden postkonfluente BCEC-Monolayer mit Makrophagen kokultiviert und zusätzlich mit dem Adenylat-Cyclase-Inhibitor (ACI) SQ22536 inkubiert. Als Vergleich wurde in parallelen Ansätzen die ACI-Inkubation bei mit C6 kokultivierten BCEC-Monolayern durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Kokultur mit Makrophagen, die bis kurz vor Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h mit dem ACI inkubiert wurden.

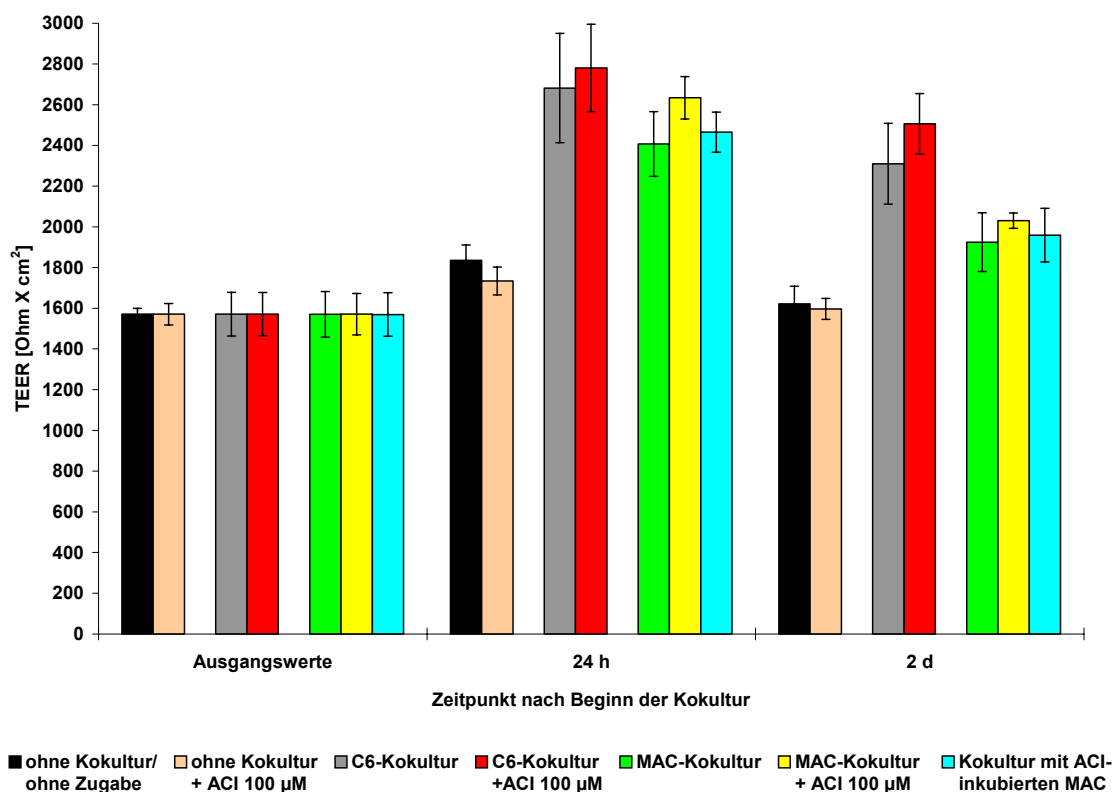


Abb. 25) Einfluss einer Kokultur von Makrophagen beziehungsweise C6-Glioma-Zellen und/oder Inkubation mit dem Adenylat-Cyclase-Inhibitor (ACI) SQ22536 (100 µM) auf den TEER postkonfluenten boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe des ACI in das obere Kompartiment der Inserts und/oder Einsetzen der Inserts in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen zweier verschiedener Spender (MAC # 1 und MAC # 2) beziehungsweise C6-Glioma-Zellen. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte direkt daran anschließend in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts. Zusätzlich erfolgte eine Kokultur von BCEC mit Makrophagen, die bis zum Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h mit 100 µM ACI inkubiert wurden.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur und/oder Zugabe / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle			
	24 h		2 d	
	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]
ohne Kokultur + ACI 100 µM	-102	-6	-25	-2
C6-Kokultur	846	46	688	42
C6-Kokultur + ACI 100 µM	945	51	884	55
MAC-Kokultur	571	31	303	19
MAC-Kokultur + ACI 100 µM	799	44	408	25
Kokultur mit ACI-inkubierten MAC	630	34	337	21
Kontrolle ohne Kokultur/ohne Zugabe (absoluter TEER [Ω·cm ²])	1836		1622	

Tabelle 15) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 25) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments bestimmte Ausgangs-TEER der verwendeten Inserts lag im Mittel bei 1571 Ω·cm² ± 80 S.D.

Es zeigte sich, dass die Inkubation der BCEC mit 100 μ M ACI keinen Einfluss auf die durch die Kokultur mit der Glioma-Zelllinie C6 beziehungsweise Makrophagen bewirkte TEER-Erhöhung hatte. Die TEER-Werte der mit ACI inkubierten BCEC befanden sich sowohl 24 h als auch 2 d nach Versuchsbeginn auf dem Niveau der korrespondierenden Ansätze ohne Inkubation, die Unterschiede bewegten sich im Rahmen der Standardabweichung. Eine bis kurz vor Beginn des Kokultur-Experiments durchgeführte 24-stündige Präinkubation der Makrophagen mit dem ACI zeigte ebenfalls keine Auswirkung auf den von ihnen bewirkten Einfluss auf den TEER der kokultivierten BCEC-Monolayer.

Da die durch C6- beziehungsweise Makrophagen-Kokultur bewirkte TEER-Erhöhung in dem oben gezeigten Experiment im Vergleich zu den Ergebnissen der meisten durchgeführten Kokultur-Experimente nur relativ gering ausfiel und sich dadurch ein möglicher Einfluss des Adenylat-Cyclase-Inhibitors SQ22536 eventuell nicht deutlich genug bemerkbar gemacht haben könnte, wurde dieses Experiment noch einmal mit einer anderen BCEC-Präparation wiederholt (siehe Abbildung 26). Die Methodik war dabei die gleiche, allerdings wurde diesmal nur ein Makrophagen-Spender verwendet und keine Präinkubation der Makrophagen mit dem ACI mehr durchgeführt.

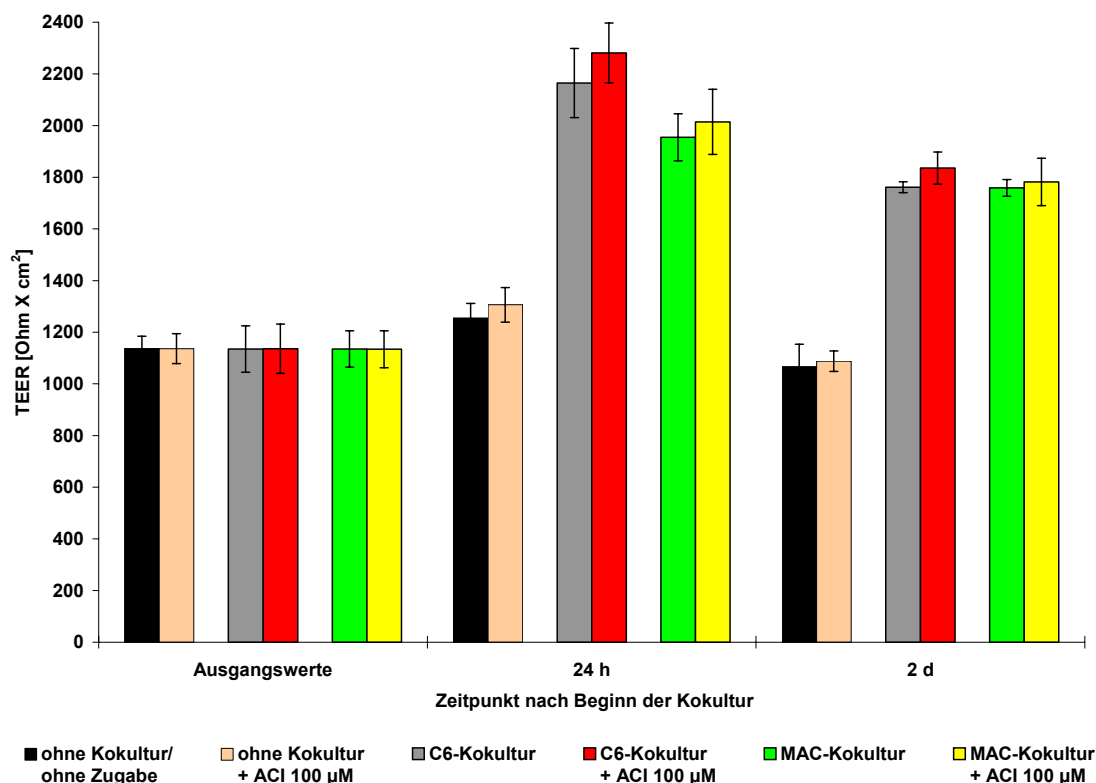


Abb. 26) Einfluss einer Kokultur von Makrophagen beziehungsweise C6-Glioma-Zellen und/oder Inkubation mit dem Adenylat-Cyclase-Inhibitor (ACI) SQ22536 (100 µM) auf den TEER postkonfluenten boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe des ACI und/oder Einsetzen der Inserts in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen (MAC) beziehungsweise C6-Glioma-Zellen. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte direkt daran anschließend in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur und/oder Zugabe / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle			
	24 h		2 d	
	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]
ohne Kokultur + ACI 100 µM	51	4	21	2
C6-Kokultur	910	72	695	65
C6-Kokultur + ACI 100 µM	1026	82	769	72
MAC-Kokultur	700	56	692	65
MAC-Kokultur + ACI 100 µM	759	61	715	67
Kontrolle ohne Kokultur/ohne Zugabe (absoluter TEER [Ω·cm ²])	1255		1067	

Tabelle 16) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 26) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn dieses Experiments gemessene Ausgangs-TEER lag im Mittel bei 1136 Ω·cm² ± 62 S.D.

Bei diesem Kokultur-Experiment ergab sich gegenüber dem vorherigen Experiment eine wesentlich ausgeprägtere TEER-Erhöhung bei den mit C6- beziehungsweise Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayern. Die ACI-Zugabe zeigte weder bei den Ansätzen mit Kokultur noch bei der Kontrolle ohne Kokultur einen Einfluss auf den TEER der so behandelten BCEC-Monolayer im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle.

4.3.7.2 Protein-Kinasen

4.3.7.2.1 Protein-Kinase-C-Aktivator *1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol* (OAG)

Bei dem im folgenden gezeigten Experiment wurden postkonfluente BCEC-Monolayer mit Makrophagen kokultiviert und mit dem Protein-Kinase-C-Aktivator *1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol* (OAG, 50 µg/ml) inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Kokultur mit Makrophagen, die bis kurz vor Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h mit OAG inkubiert wurden.

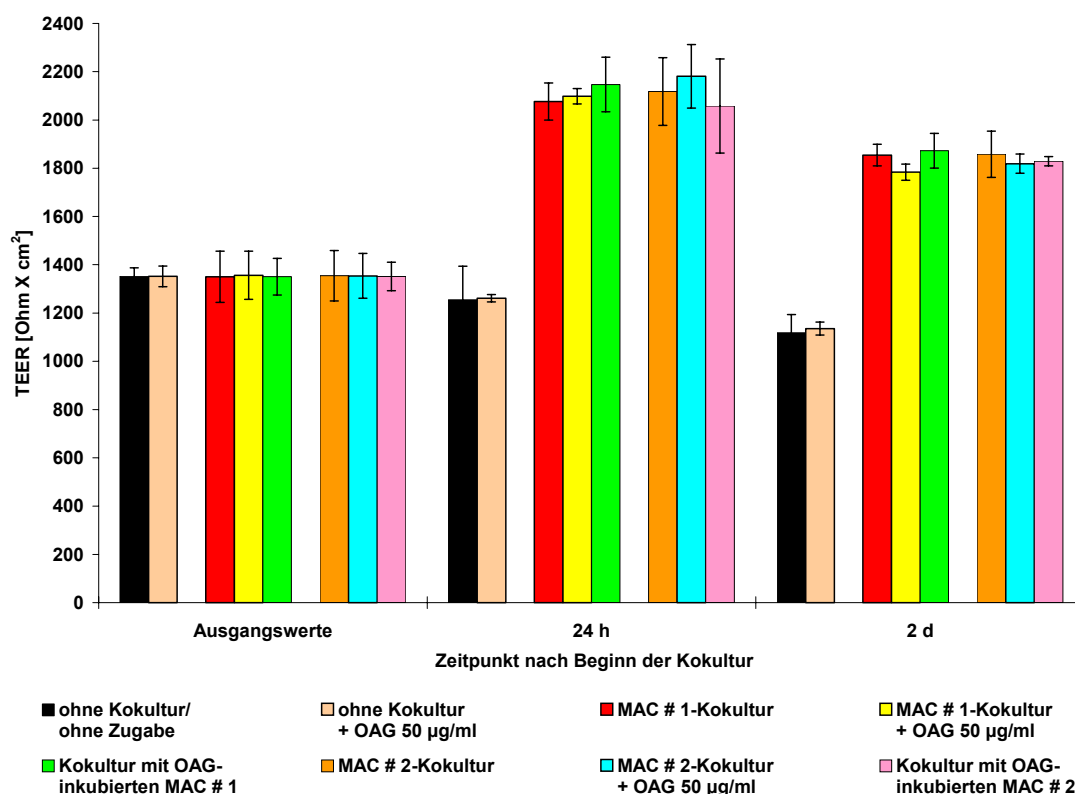


Abb. 27) Einfluss einer Kokultur von Makrophagen und/oder Inkubation mit dem Protein-Kinase C-Aktivator OAG (50 µg/ml) auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von OAG und/oder Einsetzen der Inserts in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen zweier verschiedener Spender (MAC # 1 und MAC # 2). Die Zugabe des Aktivators erfolgte direkt daran anschließend in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts. Zusätzlich erfolgte eine Kokultur von BCEC mit Makrophagen, die bis zum Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h mit 50 µg/ml OAG inkubiert wurden.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur und/oder Zugabe / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle			
	24 h		2 d	
	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]
ohne Kokultur + OAG 50 $\mu\text{g/ml}$	7	1	17	2
MAC # 1-Kokultur	822	65	736	66
MAC # 1-Kokultur + OAG 50 $\mu\text{g/ml}$	843	67	665	59
Kokultur mit OAG-inkubierten MAC # 1	892	71	754	67
MAC # 2-Kokultur	863	69	740	66
MAC # 2-Kokultur + OAG 50 $\mu\text{g/ml}$	926	74	700	63
Kokultur mit OAG-inkubierten MAC # 2	803	64	711	64
Kontrolle ohne Kokultur/ohne Zugabe (absoluter TEER [$\Omega\cdot\text{cm}^2$])	1255		1118	

Tabelle 17) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 27) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments bestimmte Ausgangs-TEER der für den Versuch verwendeten Inserts lag im Mittel bei $1353 \Omega\cdot\text{cm}^2 \pm 68 \text{ S.D.}$

Es zeigte sich, dass die Inkubation der BCEC mit OAG (50 $\mu\text{g/ml}$) zu keiner Änderung deren TEER im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Ansätzen führte, und zwar unabhängig davon, ob die BCEC mit Makrophagen kokultiviert wurden oder nicht. Eine 24-stündige Inkubation der Makrophagen mit OAG vor Beginn des Kokultur-Experiments zeigte ebenfalls keine Auswirkung auf den von ihnen ausgeübten Einfluss auf die Permeabilität der kokultivierten BCEC-Monolayer.

4.3.7.2.2 Protein-Kinase-Inhibitoren H-7 und H-8

In einem weiteren Experiment wurden postkonfluente BCEC zu Beginn der Kokultur mit Makrophagen zusätzlich mit den Protein-Kinase-Inhibitoren H-7 beziehungsweise H-8 (50 μM) behandelt. Zusätzlich wurden BCEC mit Makrophagen kokultiviert, die bis zum Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h entweder mit H-7 oder H-8 inkubiert wurden. Die Darstellung der Ergebnisse dieses mit einer BCEC-Präparation durchgeführten Experiments erfolgt zwecks besserer Übersichtlichkeit in zwei Grafiken.

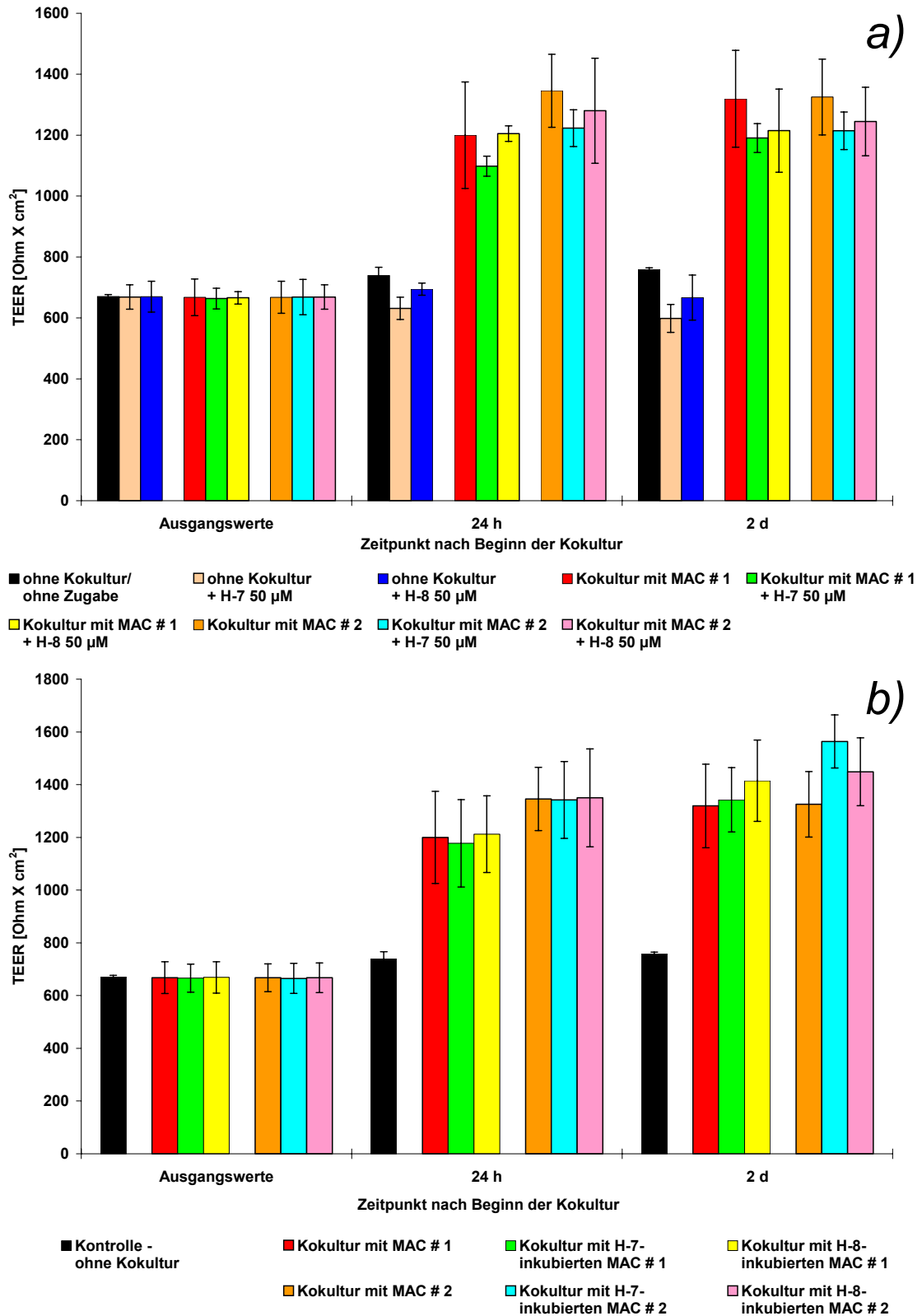


Abb. 28) Einfluss einer Kokultur von Makrophagen und/oder Inkubation mit den Protein-Kinase-Inhibitoren H-7 oder H-8 (50 µM) auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von H-7 oder H-8 und/oder Einsetzen der Inserts in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen zweier verschiedener Spender (MAC # 1 und MAC # 2). Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte direkt daran anschließend in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts (a). Zusätzlich erfolgte eine Kokultur von BCEC mit Makrophagen, die bis zum Beginn des Kokultur-Experiments für 24 h mit 50 µM H-7 oder H-8 inkubiert wurden (b).

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur und/oder Zugabe / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle			
	24 h		2 d	
	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]
ohne Kokultur + H-7 50 μM	-107	-15	-161	-21
ohne Kokultur + H-8 50 μM	-44	-6	-92	-12
Kokultur mit MAC # 1	461	62	560	74
Kokultur mit MAC # 1 + H-7 50 μM	359	49	432	57
Kokultur mit MAC # 1 + H-8 50 μM	466	63	456	60
Kokultur mit MAC # 2	607	82	566	75
Kokultur mit MAC # 2 + H-7 50 μM	484	66	455	60
Kokultur mit MAC # 2 + H-8 50 μM	541	73	486	64
Kokultur mit H-7-inkubierten MAC # 1	439	59	583	77
Kokultur mit H-8-inkubierten MAC # 1	473	64	656	86
Kokultur mit H-7-inkubierten MAC # 2	603	82	805	106
Kokultur mit H-8-inkubierten MAC # 2	611	83	690	91
Kontrolle ohne Kokultur/ohne Zugabe (absoluter TEER [$\Omega\cdot\text{cm}^2$])	739		759	

Tabelle 18) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 28) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments bestimmte Ausgangs-TEER der für den Versuch verwendeten Inserts lag im Mittel bei $668 \Omega\cdot\text{cm}^2 \pm 40 \text{ S.D.}$

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation der BCEC-Monolayer mit H-7 beziehungsweise H-8 keine Auswirkung auf die durch Kokultur mit Makrophagen bewirkte TEER-Erhöhung im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Ansätzen zur Folge hatte. Eine Inkubation der BCEC mit dem Inhibitor H-7 führte zu einer geringfügigen Erniedrigung des TEER im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle, der Unterschied bewegte sich aber bei den Ansätzen mit Makrophagen-Kokultur noch innerhalb der Standardabweichung, und bei der entsprechenden Kontrolle ohne Kokultur führte die Zugabe von H-7 im Vergleich zur Kontrolle ohne Kokultur und ohne Zugabe ebenfalls zu einer leichten Reduktion des TEER der so behandelten BCEC-Monolayer.

Eine 24-stündige Inkubation der Makrophagen mit den beiden Protein-Kinase-Inhibitoren vor Beginn des Kokultur-Experiments zeigte keine Auswirkung auf den von ihnen ausgeübten

Einfluss auf die Permeabilität der kokultivierten BCEC-Monolayer (siehe Abb. 28b); bei beiden Makrophagen-Spendern lagen die TEER-Werte der mit behandelten Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayer auf dem Niveau der jeweiligen Ansätze der mit unbehandelten Makrophagen kokultivierten BCEC.

In einem weiteren Experiment wurde die Inkubation der BCEC mit den Protein-Kinase-Inhibitoren H-7 und H-8 bei mit Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayern im Vergleich zu mit Zellen der Glioma-Zelllinie C6 kokultivierten BCEC-Monolayern durchgeführt (siehe Abb. 29). Hierbei wurde die gleiche Methodik angewandt wie in dem oben beschriebenen Experiment, allerdings wurde diesmal nur ein Makrophagen-Spender verwendet und keine Inkubation der Makrophagen mit den Inhibitoren durchgeführt. Außerdem lag der vor Beginn des Experiments bestimmte mittlere Ausgangs-TEER mehr als doppelt so hoch wie bei dem vorher gezeigten Experiment.

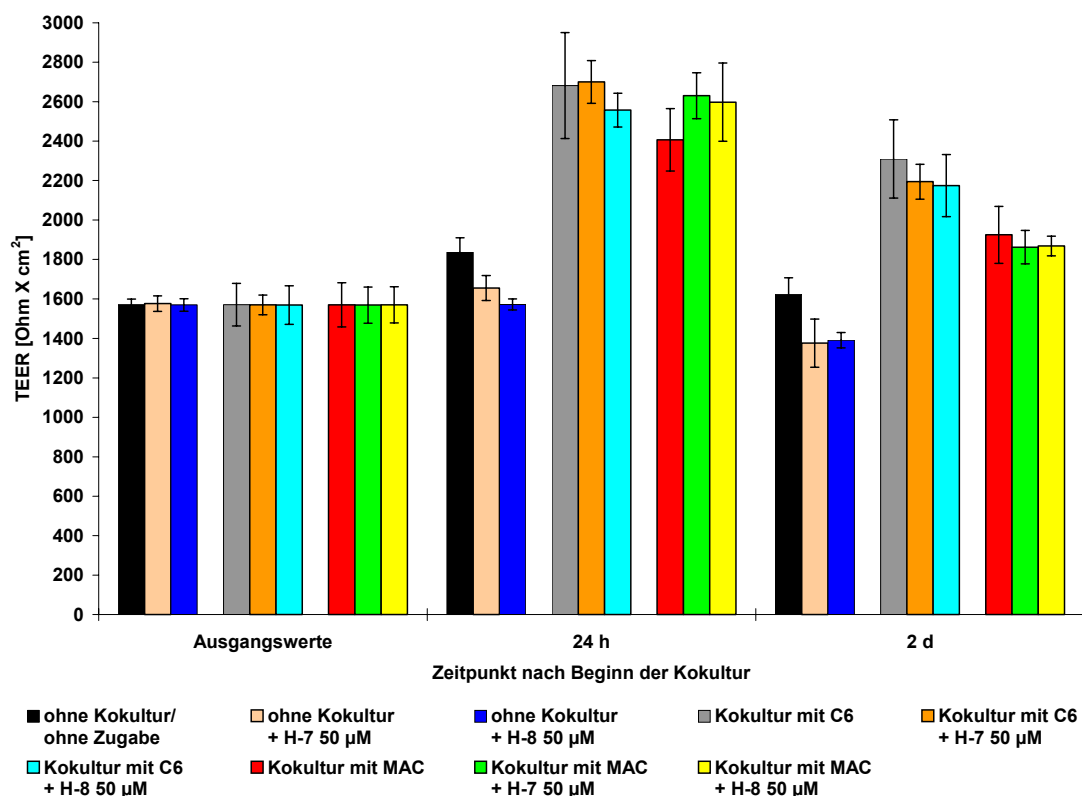


Abb. 29) Einfluss einer Kokultur von Makrophagen beziehungsweise C6-Glioma-Zellen und/oder Inkubation mit den Protein-Kinase-Inhibitoren H-7 oder H-8 (50 µM) auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von H-7 oder H-8 und/oder Einsetzen der Inserts in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen (MAC) beziehungsweise C6-Glioma-Zellen. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte direkt daran anschließend in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur und/oder Zugabe / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle			
	24 h		2 d	
	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]
ohne Kokultur + H-7 50 μM	-180	-10	-246	-15
ohne Kokultur + H-8 50 μM	-263	-14	-231	-14
Kokultur mit C6	846	46	688	42
Kokultur mit C6 + H-7 50 μM	865	47	572	35
Kokultur mit C6 + H-8 50 μM	722	39	553	34
Kokultur mit MAC	571	31	303	19
Kokultur mit MAC + H-7 50 μM	795	43	241	15
Kokultur mit MAC + H-8 50 μM	762	42	246	15
Kontrolle ohne Kokultur/ohne Zugabe (absoluter TEER [$\Omega\cdot\text{cm}^2$])	1836		1622	

Tabelle 19) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 29) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments bestimmte mittlere Ausgangs-TEER der für den Versuch verwendeten Inserts lag bei $1571 \Omega\cdot\text{cm}^2 \pm 66 \text{ S.D.}$

Auch in diesem Experiment zeigte die Inkubation mit den Substanzen H-7 beziehungsweise H-8 keine Auswirkung auf die durch Kokultur der BCEC-Monolayer mit C6 beziehungsweise Makrophagen bewirkte TEER-Erhöhung. Die Unterschiede zwischen den TEER-Werten der mit H-7 beziehungsweise H-8 behandelten und den der entsprechenden unbehandelten BCEC-Monolayer waren bei den Ansätzen mit Kokultur nur gering und lagen im Bereich der Standardabweichung. Bei den Kontrollen ohne Kokultur zeigte die Inkubation mit den Protein-Kinase-Inhibitoren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wiederum eine leichte Reduktion des TEER.

4.3.7.3 Weitere Signaltransduktionsmediatoren: Phospholipase C und Ca^{2+} -Calmodulin

In dem der folgenden Abbildung 30 zugrunde liegenden Experiment wurden die BCEC zu Beginn der Kokultur mit Makrophagen beziehungsweise C6-Gliomazellen mit dem Phospholipase C-Inhibitor U-73122 oder dem Calmodulin-Inhibitor W-7 inkubiert.

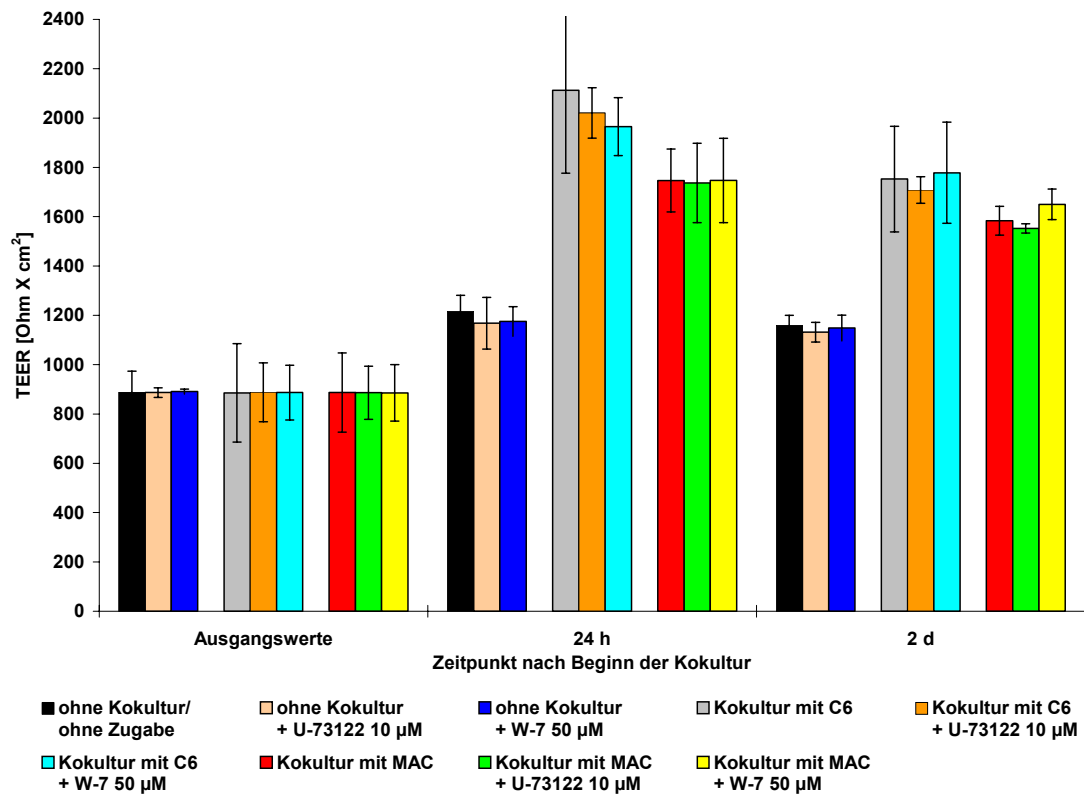


Abb. 30) Einfluss einer Kokultur von Makrophagen oder C6-Glioma-Zellen und/oder Inkubation mit dem Phospholipase C-Inhibitor U-73122 (10 µM) oder Calmodulin-Inhibitor W-7 (50 µM) auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 7 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von U-73122 oder W-7 und/oder Einsetzen der Inserts in Zellkulturplatten mit darin wachsenden konfluenten Makrophagen (MAC) beziehungsweise C6-Glioma-Zellen. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte direkt daran anschließend in das obere Kompartiment der entsprechenden Inserts.

Ansatz	Zeitpunkt nach Beginn der Kokultur und/oder Zugabe / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle			
	24 h		2 d	
	absolut [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	relativ [%]
ohne Kokultur + U-73122 10 μM	-49	-4	-27	-2
ohne Kokultur + W-7 50 μM	-42	-3	-10	-1
Kokultur mit C6	896	74	594	51
Kokultur mit C6 + U-73122 10 μM	804	66	549	47
Kokultur mit C6 + W-7 50 μM	748	61	619	53
Kokultur mit MAC	529	44	425	37
Kokultur mit MAC + U-73122 10 μM	520	43	394	34
Kokultur mit MAC + W-7 50 μM	530	44	491	42
Kontrolle ohne Kokultur/ohne Zugabe (absoluter TEER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$])	1217		1159	

Tabelle 20) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 30) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments bestimmte Ausgangs-TEER der für den Versuch verwendeten Inserts lag im Mittel bei $887 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 98 \text{ S.D.}$

Es zeigte sich, dass weder die Inkubation mit U-73122 noch die W-7-Inkubation zu einer Beeinflussung der durch die Makrophagen- beziehungsweise C6-Kokultur bewirkten TEER-Erhöhung bei den BCEC-Monolayern führte, sämtliche Abweichungen bewegten sich im Rahmen der Standardabweichung.

4.4 Weitere physiologische Studien

4.4.1 Einfluss von Serum auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

In den Experimenten, deren Ergebnisse in der folgenden Abbildung 31 dargestellt sind, wurde der Einfluss von Serum auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer durch Zugabe in das obere Kompartiment des *in vitro*-BHS-Modells untersucht. Bei einem Teil der Ansätze erfolgte zusätzlich vor der Zugabe des Serums eine Inkubation der BCEC mit Cytochalasin B.

Für diese Experimente wurden zwei unterschiedliche BCEC-Präparationen verwendet und die BCEC-Kulturen bis zur Durchführung des Experiments unter verschiedenen Bedingungen (Serum-frei beziehungsweise Serum-haltig) kultiviert. Bei dem der Abbildung 31a zugrunde liegenden Experiment erfolgte die Kultivierung der BCEC ab dem Tag 2 *in vitro* unter Serum-freien Bedingungen. Die Durchführung des der Abbildung 31b-c zugrunde liegenden Experiments erfolgte mit BCEC einer Präparation, die ab dem Tag 2 *in vitro* in zwei Populationen aufgeteilt und in verschiedenen Medien weiterkultiviert wurden.

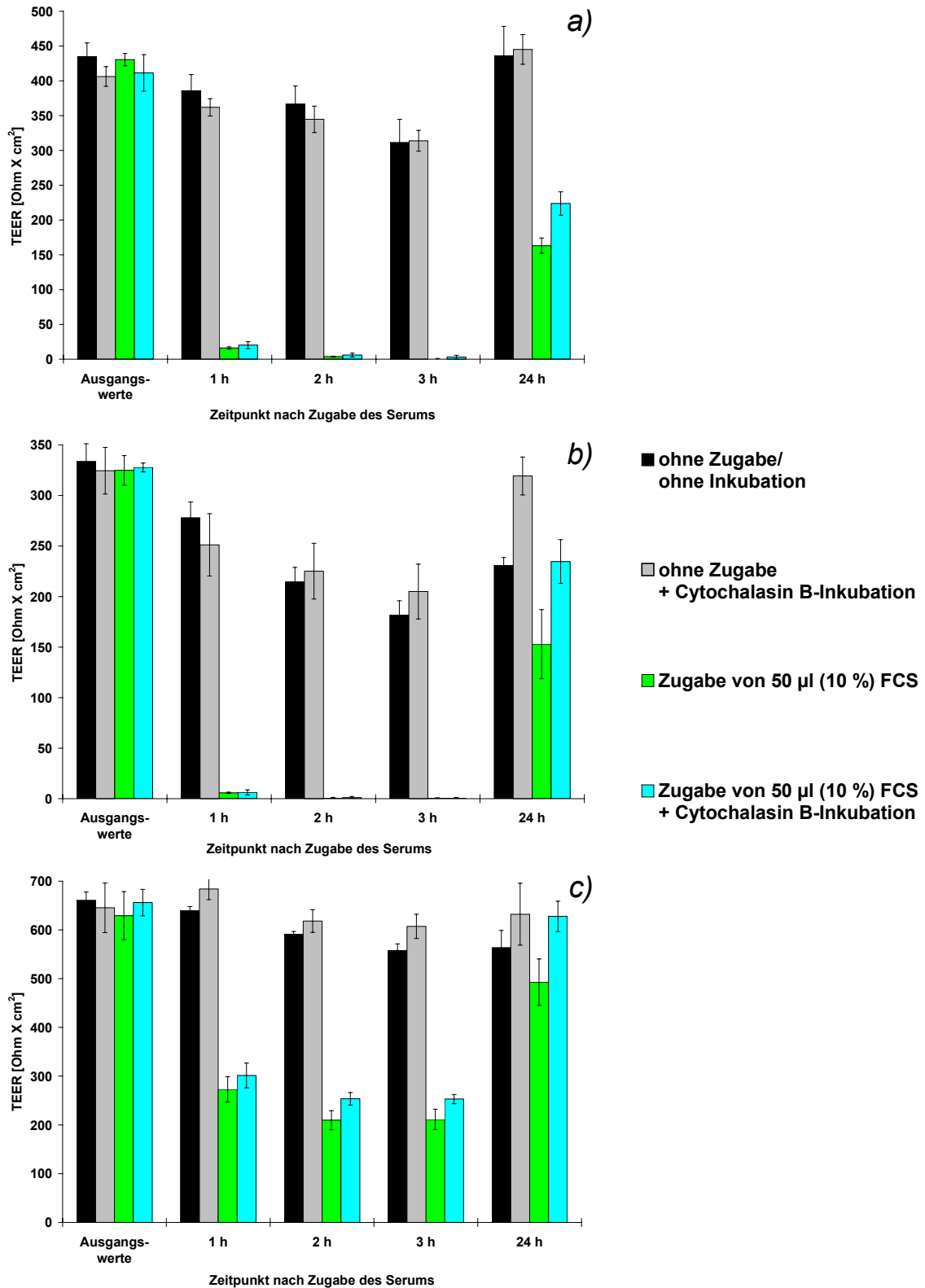


Abb. 31) Einfluss von frischem Serum auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer ohne/mit vorheriger Inkubation mit Cytochalasin B. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 8 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von 50 µl FCS (10 % Endkonzentration) in das obere Kompartiment der Inserts. In einigen Ansätzen wurden die BCEC 1 h vor der Zugabe des Serums mit Cytochalasin B (1 µg/ml) inkubiert, die Zugabe des Cytochalasin B erfolgte dabei in beide Kompartimente. Die Kultivierung der BCEC bis zur Durchführung der Experimente erfolgte unter verschiedenen Bedingungen, nämlich Serum-frei (a und b) beziehungsweise Serum-haltig (c). Die (b) und (c) zugrunde liegenden Experimente wurden mit BCEC einer Präparation durchgeführt, die am Tag 2 *in vitro* durch Umstellung auf das entsprechende Medium (Serum-frei beziehungsweise Serum-haltig) in zwei Populationen aufgeteilt wurden.

Ansatz	Zeitpunkt nach Zugabe des Serums / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle							
	1 h		2 h		3 h		24 h	
	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]
ohne Zugabe + Cytochalasin B-Inkubation	-24	-6	-22	-6	3	1	9	2
Zugabe von 50 μl (10 %) FCS	-370	-96	-363	-99	-311	-100	-273	-63
Zugabe von 50 μl (10 %) FCS + Cytochalasin B-Inkubation	-366	-95	-361	-98	-308	-99	-213	-49
Kontrolle ohne Zugabe/ohne Inkubation (absoluter TEER [$\Omega\cdot\text{cm}^2$])	386		367		311		436	

Tabelle 21) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des in Abb. 31a gezeigten Experiments in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments bestimmte Ausgangs-TEER lag bei $421 \Omega\cdot\text{cm}^2 \pm 21 \text{ S.D.}$

Ansatz	Zeitpunkt nach Zugabe des Serums / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle							
	1 h		2 h		3 h		24 h	
	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]
ohne Zugabe + Cytochalasin B-Inkubation	-27	-10	11	5	23	13	88	38
Zugabe von 50 μl (10 %) FCS	-272	-98	-214	-100	-181	-100	-78	-34
Zugabe von 50 μl (10 %) FCS + Cytochalasin B-Inkubation	-272	-98	-213	-99	-181	-100	4	2
Kontrolle ohne Zugabe/ohne Inkubation (absoluter TEER [$\Omega\cdot\text{cm}^2$])	278		215		182		231	

Tabelle 22) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des in Abb. 31b gezeigten Experiments in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Versuchsbeginn bestimmte Ausgangs-TEER lag bei $328 \Omega\cdot\text{cm}^2 \pm 14 \text{ S.D.}$

Ansatz	Zeitpunkt nach Zugabe des Serums / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle							
	1 h		2 h		3 h		24 h	
	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]	relativ [%]
ohne Zugabe + Cytochalasin B-Inkubation	44	7	27	5	49	9	69	12
Zugabe von 50 μl (10 %) FCS	-367	-57	-381	-65	-347	-62	-71	-13
Zugabe von 50 μl (10 %) FCS + Cytochalasin B-Inkubation	-338	-53	-337	-57	-305	-55	64	11
Kontrolle ohne Zugabe/ohne Inkubation (absoluter TEER [$\Omega\cdot\text{cm}^2$])	640		591		558		564	

Tabelle 23) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des in Abb. 31c gezeigten Experiments in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Versuchsbeginn bestimmte Ausgangs-TEER lag bei $648 \Omega\cdot\text{cm}^2 \pm 36 \text{ S.D.}$

Die Zugabe von 10 % FCS in das Kulturmedium postkonfluenten boviner BCEC-Monolayer bewirkte bei den unter Serum-freien Bedingungen kultivierten BCEC-Monolayern innerhalb 1 h eine starke Reduktion des TEER bis fast auf den Nullwert (siehe Abb. 31a und b), nach 3 h war der TEER auf den Nullwert gefallen beziehungsweise nicht mehr messbar. Bei den unter Serum-haltigen Bedingungen kultivierten BCEC-Monolayern war ein ähnlicher Effekt des Serums nach dessen Zugabe zu beobachten (siehe Abb. 31c), allerdings war hierbei die TEER-Reduktion nicht so ausgeprägt wie bei den in parallelen Ansätzen unter Serum-freien Bedingungen kultivierten BCEC-Monolayern (siehe Abb. 31b); 1 h nach FCS-Zugabe war der TEER im Vergleich zu dem entsprechenden Wert der Kontrollen ohne FCS-Zugabe auf etwa die Hälfte gefallen.

Eine einstündige Präinkubation der BCEC-Monolayer mit 1 µg/ml Cytochalasin B vor Zugabe des FCS führte zu keiner Inhibition des durch das Serum bewirkten Effekts auf die Permeabilität der BCEC-Monolayer, der Serum-induzierte Einbruch des TEER war bei den Cytochalasin-behandelten Ansätzen vergleichbar dem der unbehandelten Ansätze.

Um zu untersuchen, ob der gefundene Effekt von bovinem Serum auf die Permeabilität boviner BCEC-Monolayer Spezies-spezifisch oder Spezies-übergreifend ist, wurden in einem weiteren, mit der gleichen Methodik durchgeführten Experiment Serum-frei kultivierte BCEC-Monolayer mit zwei verschiedenen humanen Seren inkubiert (siehe folgende Abb. 32). Auf eine Vorinkubation der BCEC-Monolayer mit Cytochalasin B wurde dabei verzichtet, da dieses in den vorangegangenen Experimenten keinen Einfluss zeigte.

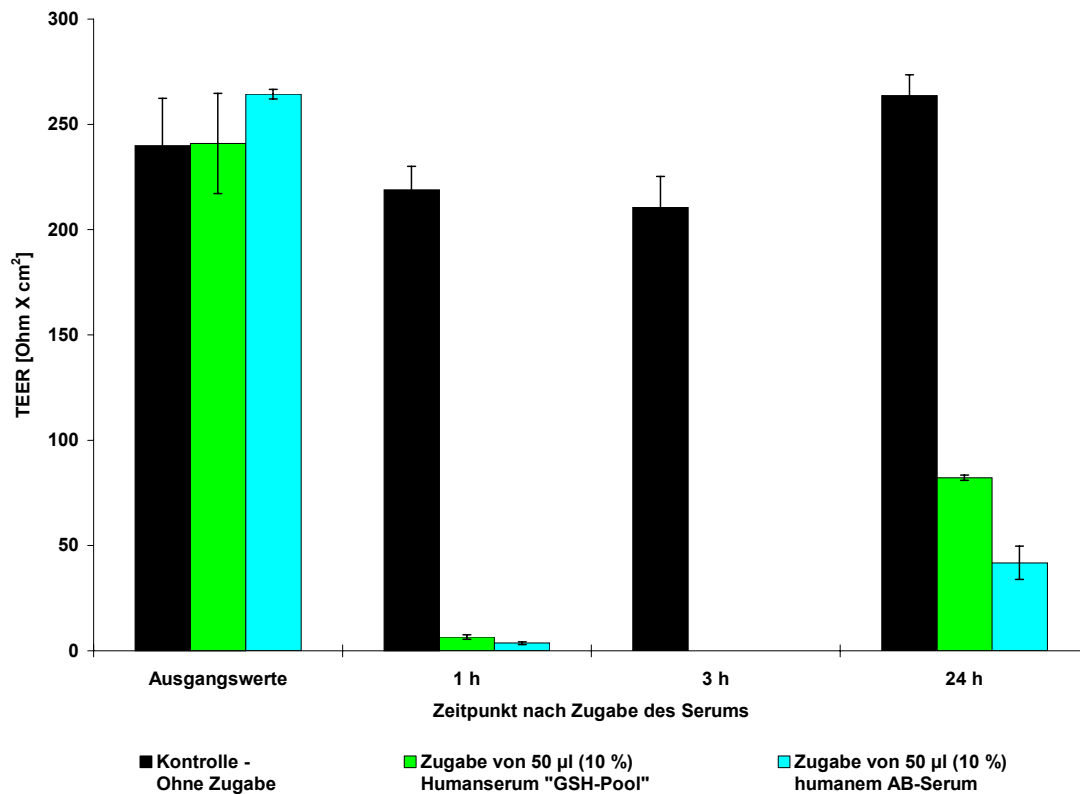


Abb. 32) Einfluss verschiedener Humansenen auf den TEER Serum-frei kultivierter postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 8 nach Isolierung der BCEC und Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von 50 µl (10 % Endkonzentration) Serum eines hausinternen Spender-Pools („GSH-Pool“) beziehungsweise kommerzielles humanes AB-Serum (SIGMA) in das obere Kompartiment der Inserts.

Ansatz	Zeitpunkt nach Zugabe des Serums / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle					
	1 h		3 h		24 h	
	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]	absolut [Ω·cm ²]	relativ [%]
Zugabe von 50 µl (10 %) Humanserum „GSH-Pool“	-212	-97	-212	-100	-182	-69
Zugabe von 50 µl (10 %) humanem AB-Serum	-215	-98	-212	-100	-222	-84
Kontrolle ohne Zugabe (absoluter TEER [Ω·cm ²])	219		212		264	

Tabelle 24) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 32) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Versuchsbeginn bestimmte Ausgangs-TEER lag im Mittel bei 248 Ω·cm² ± 20 S.D.

Nach Zugabe zweier unterschiedlicher humaner Seren („GSH-Pool“ beziehungsweise AB-Serum) zu 10 % in das Medium von unter Serum-freien Bedingungen kultivierten postkonfluenten bovinen BCEC-Monolayern zeigte sich der gleiche Effekt wie bei Zugabe von

aus der gleichen Spezies wie die BCEC stammendem FCS, nämlich ein drastischer Einbruch des TEER bereits 1 h nach deren Zugabe und anschließendem Abfall auf den Nullwert.

4.4.2 Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) auf die Permeabilität postkonfluenten BCEC-Monolayer

In dem der folgenden Abbildung 33 zugrunde liegenden Experiment wurde der Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) auf die Permeabilität postkonfluenten BCEC-Monolayer untersucht. Dies erfolgte durch Zugabe des LPS in verschiedenen Konzentrationen in beide Kompartimente des *in vitro*-BHS-Modells.

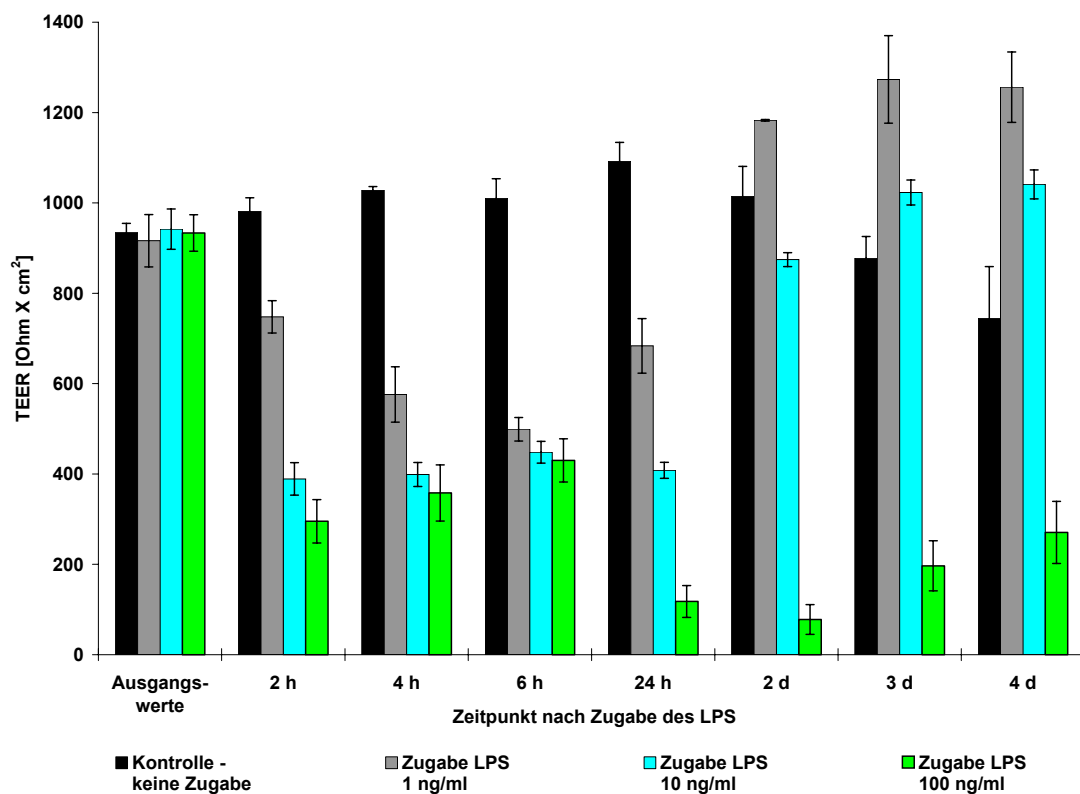


Abb. 33) Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) auf den TEER postkonfluenten boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung des Experiments erfolgte am Tag 8 nach Isolierung der BCEC und deren Aussaat auf die Inserts durch Zugabe von LPS in drei verschiedenen Endkonzentrationen (1, 10 und 100 ng/ml) in beide Kompartimente des Transwell®-Systems.

Ansatz	Zeitpunkt nach Zugabe des LPS / mittlere Änderung des TEER im Vergleich zur Kontrolle													
	2 h		4 h		6 h		24 h		2 d		3 d		4 d	
	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]	absolut [$\Omega\text{-cm}^2$]	relativ [%]
Zugabe LPS 1 ng/ml	-234	-24	-452	-44	-511	-51	-409	-37	168	17	396	45	512	69
Zugabe LPS 10 ng/ml	-592	-60	-630	-61	-562	-56	-685	-63	-140	-14	146	17	297	40
Zugabe LPS 100 ng/ml	-686	-70	-671	-65	-580	-57	-975	-89	-937	-92	-681	-78	-473	-64
Kontrolle ohne Zugabe (absoluter TEER [$\Omega\text{-cm}^2$])	981		1029		1010		1093		1015		877		744	

Tabelle 25) Mittlere Änderung des TEER (absolut und *relativ*) bei den verschiedenen Ansätzen des oben gezeigten Experiments (Abb. 33) in Bezug auf den korrespondierenden Wert der Kontrolle (grau unterlegt, Absolutwerte) zum jeweiligen Zeitpunkt nach Versuchsbeginn. Der vor Beginn des Experiments bestimmte Ausgangs-TEER lag im Mittel bei $932 \Omega\text{-cm}^2 \pm 38 \text{ S.D.}$

Es zeigte sich, dass die Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS) zu postkonfluenten BCEC-Monolayern innerhalb weniger Stunden konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Erniedrigung des TEER führte. Bei allen LPS-Konzentrationen führte die LPS-Behandlung der BCEC-Monolayer nach 6 h zu einer Reduktion des TEER auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes, hingegen er bei der Kontrolle ohne LPS-Zugabe geringfügig angestiegen war. Dieses Niveau wurde bei den höheren LPS-Konzentrationen von 10 und 100 ng/ml bereits 2 h nach Zugabe des LPS erreicht, während der TEER bei der niedrigsten Konzentration von 1 ng/ml langsamer und kontinuierlich absank. 24 h nach LPS-Zugabe war der TEER bei den mit 100 ng/ml LPS behandelten BCEC-Monolayern weiter gefallen (auf 13 % des Ausgangswertes), während er bei dem Ansatz mit 10 ng/ml auf etwa dem 6 h-Niveau verblieben und bei der niedrigsten Konzentration von 1 ng/ml wieder deutlich gestiegen war. Bei den mit der höchsten LPS-Konzentration behandelten BCEC-Monolayern verblieb der TEER auch in den darauffolgenden Tagen auf niedrigem Niveau. Bei der niedrigsten LPS-Konzentration von 1 ng/ml und teilweise auch bei der mittleren LPS-Konzentration von 10 ng/ml stieg der TEER nach 2 d (1 ng/ml) beziehungsweise 3 d (10 ng/ml) Inkubation bemerkenswerterweise sogar über den Ausgangswert beziehungsweise den entsprechenden Wert der unbehandelten Kontrolle; nach einer Inkubationszeit von 4 d lag der TEER bei den mit 1 ng/ml LPS behandelten BCEC-Monolayern 37 % über dem Ausgangswert und 69 % über dem entsprechenden Wert der Kontrolle.

4.5 Einfluss von Nanopartikeln auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

4.5.1 Einfluss verschiedener Nanopartikel-Präparationen auf den TEER postkonfluenter BCEC-Monolayer

In den Experimenten, deren Ergebnisse in der folgenden Abbildung 34 dargestellt sind, wurde der Einfluss von *Polybutylcyanoacrylat*-(PBCA-)Nanopartikeln auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer untersucht. Dies erfolgte durch Inkubation der BCEC mit verschiedenen Nanopartikel-Präparationen (ungeoated und Polysorbat 80-geoated). Hierbei wurden zwei unterschiedliche BCEC-Präparationen verwendet und die BCEC-Kulturen bis zur Durchführung des Experiments unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Bei dem der Abbildung 34a zugrunde liegenden Experiment erfolgte die Kultivierung der BCEC ab dem Tag 2 *in vitro* unter Serum-freien Bedingungen, und bei dem in Abb. 34b gezeigten Experiment unter Serum-haltigen Bedingungen.

Es zeigte sich in beiden Experimenten, dass die Zugabe von PS 80-geoateten Nanopartikeln in einer Konzentration von 10 µg/ml innerhalb einer kurzen Zeit von 30 min zu einem deutlichen Einbruch des TEER führte. Die Inkubation mit reiner Polysorbat 80-Lösung in vergleichbarer Konzentration führte dagegen zu keiner signifikanten Änderung des TEER, verglichen mit der Kontrolle ohne Zugabe. Aber auch ungeoatete Nanopartikel in der Konzentration von 10 µg/ml bewirkten eine deutliche Verringerung des TEER. Diese Wirkung setzte aber, verglichen mit den PS 80-geoateten Nanopartikel, wesentlich langsamer und zeitversetzt ein.

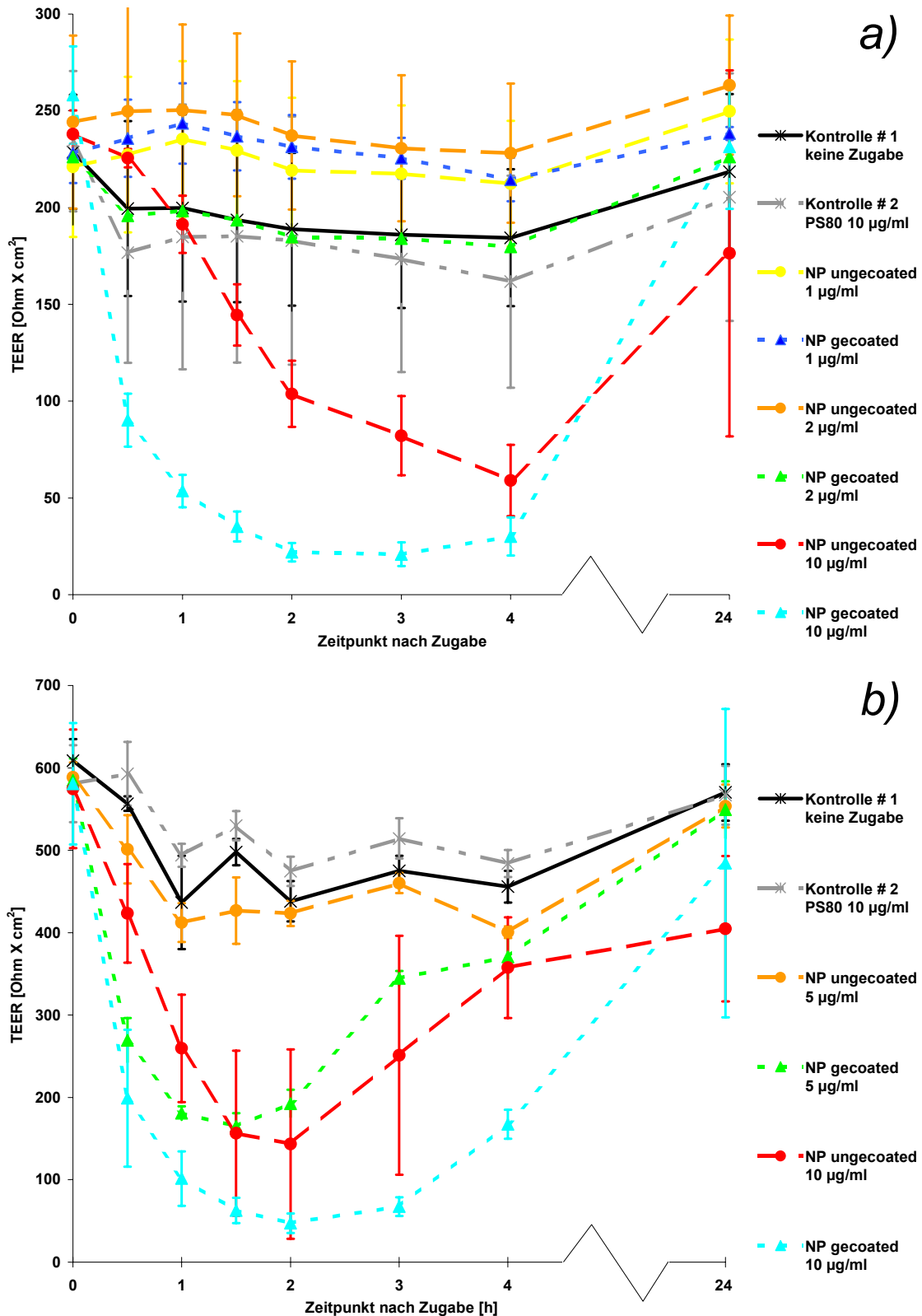


Abb. 34) Einfluss von *Polybutylcyanoacrylat*-(PBCA)-Nanopartikeln (NP, uncoated beziehungsweise Polysorbat 80-gecoatet) auf den TEER postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer. Die Durchführung der Experimente erfolgte am Tag 8 nach Isolierung der BCEC und deren Aussaat auf die Inserts durch Zugabe der unterschiedlichen Nanopartikel-Präparationen in verschiedenen Konzentrationen beziehungsweise Polysorbat 80 (PS 80) in das obere Kompartiment der Inserts. Die beiden Experimente wurden mit verschiedenen BCEC-Präparationen durchgeführt. Die Kultivierung der BCEC erfolgte bis zur Durchführung der Versuche unter unterschiedlichen Bedingungen, nämlich Serum-frei (a) beziehungsweise Serum-haltig (b). Der kurz vor Inkubationsbeginn bestimmte mittlere Ausgangs-TEER betrug bei (a) $235 \Omega\text{-cm}^2 \pm 28 \text{ S.D.}$ und bei (b) $591 \Omega\text{-cm}^2 \pm 41 \text{ S.D.}$

In der niedrigeren Konzentration von 5 µg/ml bewirkten die gecoateten Nanopartikel ebenfalls eine starke Reduktion des TEER, die allerdings nicht so ausgeprägt war wie bei der höheren Konzentration. Die Inkubation mit ungecoateten Nanopartikeln gleicher Konzentration führte hingegen zu keiner eindeutigen Erniedrigung des TEER im Vergleich zu den Kontrollen.

In niedrigeren Konzentrationen von 2 µg/ml und 1 µg/ml zeigten weder PS 80-gecoatete noch ungecoatete Nanopartikel einen eindeutigen Einfluss auf den TEER der damit inkubierten BCEC-Monolayer, die Werte blieben auf dem Niveau der Kontrollen.

Nach 24 h hatte sich das System bei fast sämtlichen Ansätzen regeneriert, die TEER-Werte entsprachen wieder den Ausgangswerten vor Beginn der Inkubation. Nur bei den mit ungecoateten Nanopartikeln in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubierten BCEC-Monolayern lagen die TEER-Werte auch nach 24 h sowohl deutlich unter den Ausgangswerten als auch unter den Werten der Kontrollen.

4.5.2 Einfluss verschiedener Nanopartikel-Präparationen auf die parazelluläre Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer für ¹⁴C-Sucrose

In den der folgenden Abbildung 35 zugrunde liegenden Experimenten wurde untersucht, ob die mit Hilfe der TEER-Messung gefundene Wirkung von Nanopartikeln auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern für Elektrolyte (vergl. 4.5.1) auch die Permeabilität für Makromoleküle wie Sucrose betrifft. Hierzu erfolgte die Inkubation der BCEC mit verschiedenen Nanopartikel-Präparationen (ungeoatet und Polysorbat 80-gecoatet) im Rahmen von radioaktiven Permeabilitätsassays, bei denen die Zugabe der Nanopartikel zusammen mit der ¹⁴C-Sucrose in das obere Kompartiment der Transwell[®]-Inserts mit den darin kultivierten postkonfluente BCEC-Monolayern erfolgte.

Bei dem in Abb. 35b gezeigten Experiment erfolgte zusätzlich eine bereits 90 min vor Beginn der Nanopartikel-Inkubation einsetzende Inkubation mit Cytochalasin B. Bei diesem Experiment wurde außerdem nur eine Nanopartikel-Präparation (PS 80-gecoatet) verwendet.

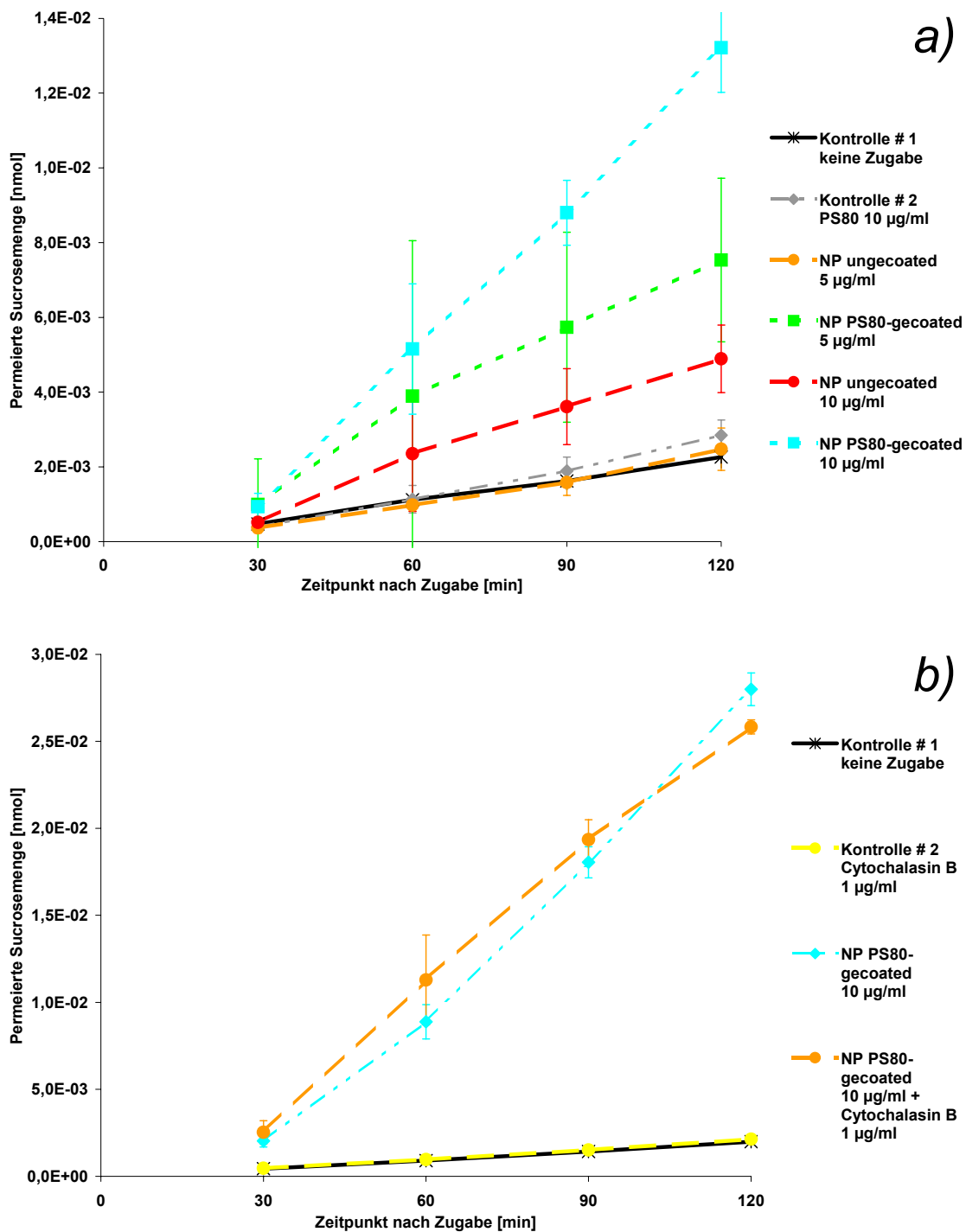


Abb. 35) Einfluss von *Polybutylcyanoacrylat*-(PBCA)-Nanopartikeln (NP) auf die Permeabilität postkonfluenter boviner BCEC-Monolayer für ^{14}C -Sucrose. Die Durchführung der Experimente erfolgte am Tag 8 nach Isolierung der BCEC und deren Aussaat auf die Inserts. Die beiden Experimente wurden mit unterschiedlichen BCEC-Präparationen durchgeführt.

a) Zugabe unterschiedlicher Nanopartikel-Präparationen (uncoated beziehungsweise Polysorbat 80-gecoated) in verschiedenen Konzentrationen beziehungsweise reiner Polysorbat 80-(PS 80)-Lösung in das obere Kompartiment der Inserts.

b) Zugabe von Polysorbat 80-gecoateten Nanopartikeln (10 µg/ml) in das obere Kompartiment der Inserts ohne/mit vorheriger 90-minütiger Inkubation mit Cytochalasin B (1 µg/ml).

Die Ergebnisse der radioaktiven Permeabilitätsassays bestätigten die bereits mit Hilfe der TEER-Messung gemachten Ergebnisse. Ungecoatete Nanopartikel bewirkten in einer Konzentration von 5 µg/ml keine Erhöhung der Permeabilität der damit inkubierten BCEC-Monolayer, erst bei einer Konzentration von 10 µg/ml wurde diese deutlich erhöht. PS 80-gecoatete Nanopartikel führten dagegen im Vergleich zu ungecoateten Nanopartikeln konzentrationsabhängig zu einer noch wesentlich stärkeren Permeabilitätssteigerung: bei der niedrigeren Konzentration von 5 µg/ml wurde die Permeabilität der BCEC-Monolayer durch PS 80-gecoatete Nanopartikel in weit stärkerem Ausmaß erhöht als durch ungecoatete Nanopartikel der doppelten Konzentration. Reines Polysorbat 80 bewirkte hingegen keine Erhöhung der Permeabilität, verglichen mit der Kontrolle ohne Zugabe.

Die durch Inkubation mit 10 µg/ml Polysorbat 80-gecoateten Nanopartikeln bewirkte Permeabilitätssteigerung der BCEC-Monolayer ließ sich auch durch 90-minütige Präinkubation der Hirnendothelzellen mit 1 µg/ml Cytochalasin B nicht inhibieren (siehe Abb. 35b), die Permeabilität der Cytochalasin B-präinkubierten BCEC-Monolayer für Sucrose erhöhte sich nach Zugabe der Nanopartikel in vergleichbarem Ausmaß wie die der nicht mit Cytochalasin B behandelten BCEC-Monolayer. Cytochalasin B selbst hatte keine Auswirkung auf die Permeabilität der BCEC-Monolayer, die Menge der permeierten Sucrose und somit die Permeabilität der BCEC-Monolayer lag bei diesem Ansatz exakt auf dem gleichen Niveau wie bei der gänzlich unbehandelten Kontrollen.

5 DISKUSSION

5.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung boviner und humaner mikrovaskulärer Hirnendothelzellen

Die für die Gewinnung von cerebralen Endothelzellen notwendige Isolierung von Kapillarfragmenten aus Hirngewebe erwies sich als besonders kritisch, da die hierbei verwendete Methodik in erheblichem Maße die Ausbeute, Vitalität und Eigenschaften der damit gewonnenen BCEC bestimmt und somit einen direkten Einfluss auf die Qualität eines darauf aufbauenden *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells besitzt. Dies zeigte sich auch im Rahmen dieser Arbeit, da in deren Verlauf zwei verschiedene Isolierungsprotokolle verwendet wurden, die sich zwar von ihrer Grundstruktur ähnelten, aber bezüglich der damit erzielten Resultate bei der Gewinnung der BCEC sowie der Qualitäten der daraus resultierenden Kulturen und des *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells erheblich voneinander unterschieden.

Im direkten Vergleich besaß das neuetablierte alternative Isolierungsprotokoll gegenüber dem originalen MPI-Protokoll eindeutige Vorteile, da hiermit reproduzierbar wesentlich bessere Resultate bei der Isolierung von Kapillarfragmenten aus bovinem und humanem Hirnmaterial erzielt werden konnten. Am deutlichsten war dabei die gegenüber dem MPI-Protokoll um Größenordnungen gesteigerte Ausbeute an Kapillarfragmenten, was durch die, auf der synergistischen Wirkung der mechanischen Krafteinwirkung des Rotationsschüttlers und des enzymatischen Abbaus durch die Dispase beruhende, vollständige Homogenisierung des Hirngewebes während des primären Enzymverdau und der damit verbundenen kompletten Freisetzung der darin enthaltenen Kapillarfragmente erreicht wurde (vergl. 3.2.1). Dagegen erfolgte beim primären Enzymverdau des MPI-Protokolls aufgrund der unzureichenden Bewegung des Inkubations-Gemischs durch lediglich gelegentliches Schütteln nur ein

unvollständiger Anverdau der Hirngewebsstücke und dadurch nur eine Herauslösung oberflächlicher Kapillarfragmente.

Ebenfalls deutlich waren die Unterschiede zwischen den Qualitäten der auf der Basis der beiden verschiedenen Isolierungsprotokolle gewonnenen BCEC-Kulturen, da die mit dem Alternativ-Protokoll isolierten BCEC und somit auch die späteren Kulturen eine erheblich geringere Kontamination von nichtendothelialen Zellen (Pericyten) aufwiesen (vergl. 4.1.1). Erreicht wurde diese Optimierung sowohl durch den intensiven primären Enzymverdau als auch durch den sekundären Enzymverdau, wodurch das die Kapillarfragmente umgebende Bindegewebe und ein Großteil der Basalmembran enzymatisch abgebaut oder durch die mechanische Krafteinwirkung des Rotationsschüttlers abgespalten wurde, so dass die im Bindegewebe enthaltenen hirnparenchymalen Zellen und die in der Basalmembran lokalisierten Pericyten von den Kapillarfragmenten weitestgehend abgetrennt wurden. Darüber hinaus führte die Filtration der Kapillarfragment-Suspension durch ein 40 µm-Zellsieb nach dem letzten Enzymverdau zur Entfernung unvollständig verdauter mikrovaskulärer und makrovaskulärer Kapillarfragmente. Da nur kleine und vollständig verdaute mikrovaskuläre Kapillarfragmente das Zellsieb passieren konnten, sorgte dieser Filtrationsschritt für eine erhebliche Steigerung der Reinheit der späteren BCEC-Kulturen und somit auch für eine Erhöhung der Qualität des darauf aufbauenden *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modells.

Neben der Isolierung der cerebralen Kapillaren aus dem Hirngewebe stellte die *in vitro*-Kultivierung der BCEC eine weitere Herausforderung dar. Hierbei mussten Kulturbedingungen gefunden werden, unter denen diese Zellen ihre charakteristischen Eigenschaften, die *in vivo* die Biologie und Physiologie der BHS prägen, *in vitro* so weitestgehend wie möglich beibehalten, da nur unter diesen Umständen die Übertragbarkeit der *in vitro* gefundenen Erkenntnisse auf die *in vivo*-Situation gewährleistet ist. Dieser Punkt ist von entscheidender Bedeutung, wird aber bei der Arbeit mit cerebralen Hirnendothelzellen oft vernachlässigt.

Eine rein qualitative Beurteilung der Kulturbedingungen anhand von Kriterien wie beispielsweise Wachstum, Morphologie und Reinheit der Kultur, erwies sich dabei oftmals als

ungenügend, da diese subjektiv und durch interpretatorische Spielräume und Fehleinschätzungen von Ergebnissen und Beobachtungen sehr fehleranfällig ist.

Unter Verwendung des *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells bot sich dagegen die Möglichkeit, die Qualität verschiedener Kulturbedingungen der BCEC nach quantitativen und somit objektiven Kriterien reproduzierbar zu beurteilen, indem der zeitliche Verlauf des TEER von unter verschiedenen Bedingungen kultivierten BCEC-Populationen verfolgt wurde. Dies erwies sich als eine äußerst zuverlässige und sensitive Methodik, unterschiedliche Kulturbedingungen gegeneinander auszutesten und ihre Auswirkungen auf die spezifischen Eigenschaften der BCEC herauszufinden und zu dokumentieren. Insbesondere zwei Parameter der Kulturbedingungen erwiesen sich in Bezug auf die Permeabilitäts-Charakteristiken der BCEC-Monolayer als kritisch, nämlich das Kulturmedium und der zum Coaten der Zellkulturgefäße verwendete Adhäsionsfaktor (vergl. 4.1.2.1 und 4.1.2.2), was sich mit den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen deckt (Hoheisel *et al.* 1998, Tilling *et al.* 1998).

Mit Hilfe des *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells konnten auch Auswirkungen unterschiedlicher Kulturbedingungen gefunden werden, die sich bei einer rein qualitativen Beurteilung anhand der oben beschriebenen Kriterien nicht dargestellt hatten. So zeigte beispielsweise der Vergleich zweier M199-Medien unterschiedlicher Hersteller, dass der TEER der im Medium des einen Herstellers kultivierten BCEC-Monolayer deutlich höher stieg als der der parallel in dem Medium des anderen Herstellers gehaltenen BCEC-Kulturen (siehe Abb. 7). Die vergleichende mikroskopische Begutachtung ergab hingegen keine sichtbaren Unterschiede bezüglich Morphologie und Wachstumsverhalten zwischen den in verschiedenen Medien kultivierten BCEC-Populationen.

Die positiven Resultate, die bei der Isolierung und Kultivierung boviner BCEC und dem darauf aufbauenden *in vitro*-BHS-Zellkulturmodell erzielt wurden, konnten allerdings bei der Isolierung von Kapillarfragmenten aus humanen Hirnmaterial und der Kultivierung humaner BCEC nicht reproduziert werden. Zwar zeigte auch bei der Aufarbeitung von humanem Hirnmaterial die Verwendung des Alternativ-Protokolls Vorteile gegenüber dem MPI-Protokoll

bezüglich der Ausbeute der damit isolierten Kapillarfragmente. Allerdings konnte selbst durch den Einsatz des Alternativ-Protokolls kein mit der Aufarbeitung von bovinem Hirngewebe vergleichbares Ergebnis erzielt werden. Zum einen ergab sich häufig eine entweder zu geringe oder sogar in einigen Fällen nicht vorhandene Ausbeute an isolierten Kapillarfragmenten, so dass eine Aussaat auf eine für die Durchführung von Experimenten notwendige Anzahl von Inserts nicht möglich war. Zudem zeigten die aus den isolierten Kapillarfragmenten auswachsenden humanen Hirnendothelzellen eine im Vergleich zu entsprechenden bovinen BCEC-Kulturen äußerst geringe Proliferationsaktivität, die darüber hinaus im weiteren Verlauf der Kultivierung häufig zum Stillstand kam, so dass auf Inserts kultivierte humane BCEC keinen konfluenten Monolayer ausbildeten. Die geringe Proliferation der humanen BCEC hatte weiterhin zur Folge, dass diese im Verlauf der Kultivierung zunehmend von kontaminierenden Pericyten überwuchert wurden und die entsprechenden Kulturen wertlos wurden (vergl. 4.1.3.3). Aus den genannten Gründen konnte nur ein Kokultur-Experiment mit humanen BCEC durchgeführt werden.

Über die Ursachen für die im Vergleich zum bovinen System unzureichenden Resultate bei der Aufarbeitung humanen Hirnmaterials und der Kultivierung humaner BCEC kann nur spekuliert werden. Als wahrscheinlichster und plausibelster Grund erscheint die Art des Ausgangsmaterials, also die in der Gerichtsmedizin während der Sektion den Verstorbenen entnommenen Hirnproben. Diese waren bezüglich ihrer Frische und Vorgeschichte äußerst uneinheitlich, da die Individuen, denen sie entnommen wurden, sich in Alter, Gesundheitszustand, Todesursache, Liegezeit und Lagertemperatur erheblich voneinander unterschieden (vergl. 3.2.1.1). Alle diese Faktoren, und hierbei insbesondere die Liegezeit und die Lagertemperatur der Verstorbenen bis zur Probenentnahme, sind entscheidend für die Frische des entnommenen Hirnmaterials und die Vitalität der darin enthaltenen Hirnendothelzellen. Da die Liegezeit generell länger als 6 h war und die Verstorbenen bis zum Sektionsbeginn oftmals nicht gekühlt, sondern bei Raumtemperatur gelagert wurden, erscheint eine Vorschädigung der Hirnendothelzellen durch Sauerstoffmangel, Zersetzungsprozesse des Gewebes und Ansammlung von schädlichen

Stoffwechselprodukten in den Zellen äußerst wahrscheinlich. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass eine durch Herzstillstand hervorgerufene globale cerebrale Ischämie bereits nach 2 min zu einer deutlichen Permeabilitäts-Erhöhung der BHS führte (Pluta *et al.* 1994). *In vitro*-Studien zeigten, dass cerebrale Endothelzellen auf einen experimentell herbeigeführten Sauerstoffmangel (*Hypoxie*) wesentlich empfindlicher reagieren als periphere Endothelzellen: während 2 h nach Einsetzen der Hypoxie die Lebensfähigkeit cerebraler Endothelzellen bereits um 25 % reduziert war, waren nicht-cerebrale Endothelzellen zu diesem Zeitpunkt noch zu 98 % lebensfähig. Diese Ergebnisse zeigen, dass cerebrale Endothelzellen auf eine durch Herzstillstand und Aussetzen des Blutstroms bedingte Mangelversorgung von Sauerstoff in besonderem Maße empfindlich reagieren. Die langwierige und die Zellen zweifelsohne belastende Isolierungsprozedur verschärfte diese Problematik zusätzlich. Im Gegensatz dazu existierten bei dem vom Schlachthaus bezogenen bovinen Hirnmaterial wesentlich einheitlichere und vor allem günstigere Ausgangsbedingungen. Die geschlachteten Rinder, denen das Hirnmaterial entnommen wurde, unterschieden sich im Alter und Gesundheitszustand nur geringfügig voneinander und gehörten der gleichen Rasse an und entstammten wahrscheinlich sogar dem gleichen Zuchtstamm, so dass auch die genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen nur gering waren. Die Entnahme des Hirngewebes erfolgte unmittelbar nach der Schlachtung und Zerlegung des Kadavers, und dieses wurde direkt in kaltes Medium überführt und sofort bei niedrigen Umgebungstemperaturen gelagert. Dadurch wurde die Stoffwechselaktivität der darin enthaltenen Zellen innerhalb eines kurzen Zeitraums stark reduziert, so dass diese bis zur Aufarbeitung des Hirngewebes nicht oder allenfalls geringfügig geschädigt wurden und noch ausreichend frisch waren.

Das Fazit des oben beschriebenen Sachverhalts lautet nicht, dass es *per se* unmöglich ist, humane Hirnendothelzellen erfolgreich zu isolieren und auf deren Basis ein hochwertiges *in vitro*-BHS-Zellkulturmodell zu etablieren, das qualitativ mit einem bovinen oder porcinen System vergleichbar ist. Hierzu müssten jedoch günstigere und einheitlichere Ausgangsbedingungen existieren; dies betrifft nicht nur, wie oben dargelegt, die Qualität des

humanen Hirnmaterials in Bezug auf die Vorgeschichte der Individuen, denen dieses entnommen wird, sondern auch seine möglichst regelmäßige und gesicherte Verfügbarkeit. Gerade letzter Punkt stellte im Rahmen dieser Arbeit eine zusätzliche Hürde dar, da humanes Hirnmaterial nur selten und unregelmäßig vorhanden war und die begrenzte Verfügbarkeit durch logistische Probleme noch verstärkt wurde. Eine im Vergleich zur Gerichtsmedizin geeignetere Quelle für humanes Hirnmaterial würde beispielsweise die Epilepsie-Chirurgie darstellen.

5.2 Das *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Zellkulturmodell

Durch Optimierung sowohl der Methodik zur Isolierung von Kapillarfragmenten aus Hirnmaterial als auch der Kulturbedingungen der bovinen BCEC konnte auf deren Basis ein hochqualitatives und gut reproduzierbares *in vitro*-BHS-Zellkulturmodell etabliert werden, das bezüglich seiner Permeabilitäts-Charakteristiken herausragende Eigenschaften aufwies. Die Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) ergab, dass die Permeabilität der BCEC-Monolayer für Elektrolyte äußerst niedrig war. Nach Abschluss der Etablierungs- und Optimierungsphase konnten regelmäßig und reproduzierbar TEER-Werte oberhalb $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ erzielt werden, bei vereinzelt BCEC-Präparationen blieb der TEER allerdings auch unter diesem Wert. Entscheidend war hierbei insbesondere, dass diese positiven Resultate nicht nur mit einzelnen, sondern mit der Mehrzahl oder sogar allen der in den Transwell[®]-Inserts kultivierten BCEC-Monolayer einer Präparation erreicht wurden, so dass in der Regel eine ausreichende Anzahl Inserts für die Durchführung von Experimenten zur Verfügung standen.

Bei Verwendung von humanen BCEC als Basis des *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells konnten die mit dem bovinen System gemachten positiven Resultate wiederum nicht erzielt werden, da aufgrund der oben bereits beschriebenen Problematik die humanen BCEC-Kulturen oftmals nicht konfluent wurden oder der TEER der humanen BCEC-Monolayer nur niedrige, auf dem

Niveau peripherer Endothelzellen ($\sim 10 \Omega \cdot \text{cm}^2$) liegende Werte erreichte und somit keine Inserts für die Durchführung von Experimenten zur Verfügung standen. Bei einer Präparation humaner BCEC konnten aber TEER-Werte von etwa $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ erzielt werden, was um mehr als eine Größenordnung über dem entsprechenden Wert peripherer Endothelzellen lag und dem Niveau humaner BHS-Zellkulturmodelle anderer Arbeitsgruppen entsprach (Biegel *et al.* 1995).

Die durchgeführte und häufig zur Validierung der Qualität von BHS-Modellsystemen eingesetzte Bestimmung der parazellulären Permeabilität der bovinen BCEC-Monolayer für Sucrose und der Vergleich mit diversen Zelllinien zeigte, dass diese ebenfalls auf einem sehr niedrigem Niveau lag (vergl. 4.2.2, Tabelle 1). Der Sucrose-Permeabilitätskoeffizient ($P_{(\text{Sucrose})}$) der BCEC-Monolayer lag nach Abschluss der Etablierungs- und Optimierungsphase um zwei Zehnerpotenzen unter dem der HUVEC-Zelllinie ECV304 und deutlich unter dem der ebenfalls *tight junctions* und dichte Monolayer ausbildenden CACO-2-Epithelzellen. Der $P_{(\text{Sucrose})}$ der MDCK-Epithelzellen konnte zwar nur annähernd erreicht werden, allerdings bildet diese Zelllinie *in vitro* einer der dichtesten und höchst-impermeablen Zellmonolayer aus, weshalb sie auch häufig für Permeabilitätsstudien und Untersuchungen der *tight junctions* verwendet wird. Ein Vergleich der ermittelten $P_{(\text{Sucrose})}$ -Werte des etablierten BHS-Zellkulturmodells mit den entsprechenden *in vivo*-Parametern ist schwierig, da abhängig von der verwendeten experimentellen Methodik unterschiedliche Werte für die Sucrose-Permeabilität der BHS *in vivo* angegeben werden, so beispielsweise $3,03 \cdot 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ (Ohno *et al.* 1978) oder $1,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ (Levin 1980). Zumindest der letztere Wert konnte bei dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten BHS-Zellkulturmodell erreicht werden.

Der Vergleich der in den radioaktiven Permeabilitätsassays ermittelten Sucrose-Permeabilitätskoeffizienten mit den jeweiligen vor Durchführung der Assays bestimmten TEER-Werten zeigte eine gute reziproke Relation dieser beiden die Permeabilität der BCEC-Monolayer beschreibenden Parameter (siehe Tabelle 1 und Abb. 13): je höher der TEER der untersuchten BCEC-Monolayer lag, desto niedriger waren deren mit Hilfe der radioaktiven

Permeabilitätsassays ermittelten $P_{(\text{Sucrose})}$ -Werte. Wie bereits in epithelialen Zellsystemen gezeigt worden ist (Madara 1998), existiert aber keine lineare Abhängigkeit zwischen beiden Parametern (siehe Abb. 13). Der elektrische Widerstand eines endothelialen oder epithelialen Zellmonolayers setzt sich aus einzelnen, durch die *tight junctions* jeder Zelle des Monolayers verkörperten individuellen elektrischen Widerständen zusammen und kann somit modellhaft als ein Schaltkreis zahlloser parallel geschalteter Einzelwiderstände angesehen werden. In einem derartigen parallelen Widerstandsnetzwerk dominieren Komponenten mit niedrigem Widerstand den Gesamtwiderstand des Netzwerkes, auch wenn diese in nur geringer Frequenz vorhanden sind. Folglich führt das Vorhandensein weniger undichter *tight junctions* in einem endothelialen oder epithelialen Zellmonolayer zu einer deutlichen Verringerung des elektrischen Gesamtwiderstandes des Zellmonolayers. Die mit Hilfe markierter Tracermoleküle (also nicht-elektrisch) bestimmte Permeabilität eines Zellmonolayers stellt dagegen die Summe der einzelnen parazellulären Stoffflüsse zwischen den Einzelzellen dar, die durch das Vorhandensein weniger undichter *tight junctions* in nur geringem Maße beeinflusst wird. Aus diesem Grund existiert kein linearer Zusammenhang zwischen dem elektrischen Widerstand eines Zellmonolayers und dessen parazelluläre Permeabilität für Makromoleküle.

Der beschriebene Sachverhalt hat zur Folge, dass bei insgesamt niedrigem TEER starke Änderungen der Permeabilität von Zellmonolayern für Makromoleküle mit nur geringen TEER-Änderungen assoziiert sind, während umgekehrt bei insgesamt hohem TEER-Niveau große TEER-Änderungen durch nur geringfügige Änderungen des parazellulären Flusses von Makromolekülen gekennzeichnet sind.

Dies ist einer der Gründe, warum in dieser Arbeit in fast allen Experimenten die Bestimmung der Permeabilität von BCEC-Monolayern mittels TEER-Messung erfolgte, da das verwendete *in vitro*-BHS-Zellkulturmodell durch ein hohes TEER-Niveau und eine niedrige parazelluläre Permeabilität für Makromoleküle gekennzeichnet war. Die Messung des TEER stellte somit die wesentlich empfindlichere und darüber hinaus einfachere und weniger fehleranfällige Messmethode dar.

Die *per se* niedrige Permeabilität des *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells konnte sowohl durch Inkubation der BCEC mit dem Adenylat-Cyclase-Aktivator Forskolin und/oder dem Phosphodiesterase-Inhibitor RO 20-1724 als auch durch Kokultur der BCEC-Monolayer mit C6-Glioma-Zellen zusätzlich deutlich verringert werden, was durch Erhöhung des TEER der so behandelten BCEC-Monolayer gezeigt werden konnte (vergl. 4.2.3).

Die Aktivierung der Adenylat-Cyclase durch Forskolin und/oder Inhibition der Phosphodiesterase durch RO 20-1724 bewirkt eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels der BCEC, der eine Schlüsselfunktion bei der Modulation ihrer BHS-spezifischen Eigenschaften einnimmt, wie in zahlreichen Studien gezeigt worden ist (vergl. 2.3.3.3). Der Einfluss der C6-Glioma-Zellen auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern bei Kokultur ist mit der von primären Astrocyten vergleichbar, was ebenfalls bereits in vielen Studien dargestellt wurde und häufig zur Verbesserung von *in vitro*-BHS-Zellkulturmodellen verwendet wird (vergl. 2.3.3.2). Beide Sachverhalte konnten mit dem in dieser Arbeit etablierten BHS-Zellkulturmodell zweifelsfrei bestätigt werden, was zeigt, dass es diesbezüglich die zu erwartenden Eigenschaften aufwies und ein wichtiges Qualitätsmerkmal darstellt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Einfluss der Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels der BCEC und der Einfluss der C6-Kokultur auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern additiv wirken (vergl. 4.2.3), was wiederum entsprechende Studien bestätigt (vergl. 2.3.3.3). In Kombination, bei Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels der BCEC durch Inkubation mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor RO 20-1724 und gleichzeitiger Kokultur mit C6-Zellen, konnte sogar ein TEER von über $3000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ erzielt werden. Dies ist ein Wert, der deutlich über dem TEER mikrovaskulärer Blutgefäße der *Pia Mater* ($1000\text{-}2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$, vergl. 2.1.3) liegt und in BCEC-Zellkultursystemen bisher nicht einmal annähernd erreicht wurde. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels der BCEC eine gravierende Manipulation sämtlicher Signaltransduktionswege darstellt, in denen cAMP involviert ist, und dass dadurch bedingte Folgeeffekte die Physiologie der BCEC verändern könnten und somit die Übertragbarkeit und Relevanz von *in vitro*-Studien auf die *in vivo*-

Situation in Frage gestellt wird (de Boer *et al.* 1999). Aus diesem Grund wurde diese Methodik im Rahmen dieser Arbeit nicht zur weiteren Verbesserung des BHS-Zellkulturmodells eingesetzt.

Durch die Kokultur der BCEC-Monolayer mit C6-Glioma-Zellen konnte wiederholt und reproduzierbar ein TEER von $2000 \Omega\cdot\text{cm}^2$ und darüber erreicht werden, also einem Wert, dem der pialen mikrovaskulären Blutgefäße *in vivo* entspricht und ebenfalls für *in vitro*-BHS-Modelle bisher nicht publiziert wurde. Die Integration des glialen Einflusses auf die BCEC stellt im Gegensatz zur Manipulation des cAMP-Spiegels eine wesentlich attraktivere Methodik zur Verbesserung des BHS-Zellkultursystems dar, da hierdurch die *in vivo*-Situation besser simuliert wird (vergl. 2.3.3.2).

Ein Vergleich des in dieser Arbeit vorgestellten *in vitro*-BHS-Modells mit den BHS-Zellkulturmodellen anderer Arbeitsgruppen ist schwierig, da zwar eine Reihe von BHS-Zellkulturmodellen existieren, bemerkenswerterweise aber viele Modelle nicht eingehender validiert und charakterisiert werden. Oftmals werden auf permeablen Membranen kultivierte Monolayer primärer BCEC oder davon abgeleiteter Zelllinien ohne Bestimmung und Angabe BHS-spezifischer Parameter, wie beispielsweise dem mittleren TEER oder der parazellulären Permeabilität für Makromoleküle, pauschal als „BHS-Modell“ definiert. Da häufig mit mehrfach subkultivierten BCEC-Kulturen gearbeitet wird, ist es nach den im Rahmen dieser Arbeit mit primären BCEC gemachten Erfahrungen fraglich, ob diese Zellkulturmodelle eine BHS-spezifische niedrige Permeabilität aufweisen. Dies ist im übrigen auch eine der Hauptkritikpunkte an *in vitro*-Modellen der BHS, da die nicht-BHS-spezifische hohe Permeabilität der meisten BHS-Modelle zu einer Überschätzung der Hirngängigkeit darin getesteter Substanzen führen kann und die Übertragbarkeit von *in vitro* gefundenen Erkenntnissen auf die Situation *in vivo* nicht gegeben ist (Pardridge 1995, Franke *et al.* 1999, Pardridge 1999).

Zwei sehr ausgereifte und gut charakterisierte Zellkulturmodelle stellen das sogenannte „Cecchelli-Modell“ und das von der Arbeitsgruppe Galla (Wilhems-Universität Münster)

etablierte BHS-Modell dar. Das „Cecchelli-Modell“ besteht aus primären und subkultivierten bovinen BCEC in direkt-Kontakt-Kokultur mit Astrocyten, für den in diesem Modell erzielten TEER werden Werte zwischen $600-1200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben (Dehouck *et al.* 1990, Cecchelli *et al.* 1999). Das BHS-Modell der Galla-Gruppe besteht hingegen aus primären porcinen BCEC-Monolayern ohne Astrocyten-Kokultur, die unter Serum-freien Kulturbedingungen bei Hormonsupplementation hohe TEER-Werte von $800-1200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ erreichen, und unter Verwendung besonderer Matrixfaktoren vereinzelt sogar $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$; für den Sucrose-Permeabilitätskoeffizient dieses Modells wird ein Wert von $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ angegeben (Hoheisel *et al.* 1998, Tilling *et al.* 1998, Franke *et al.* 1999). Der Vergleich dieser BHS-Modelle mit dem in dieser Arbeit vorgestellten *in vitro*-BHS-Modell bestätigt somit eindeutig dessen hohe Qualität und herausragenden Eigenschaften

5.3 Einfluss von Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

5.3.1 Einfluss von Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter boviner und humaner BCEC-Monolayer

Im Rahmen eines indirekt-Kontakt-Kokultursystems (vergl. 3.4 und Abb. 4) konnte in zahlreichen Experimenten eindeutig und reproduzierbar gezeigt werden, dass eine Kokultur von humanen Makrophagen unterschiedlicher Differenzierungsgrade mit postkonfluenten bovinen BCEC-Monolayern zu einer deutlichen Erhöhung des TEER führte, verglichen mit BCEC-Kulturen ohne Kokultur (vergl. 4.3). Die bei den BCEC durch kokultivierte Makrophagen induzierte TEER-Erhöhung war mit der durch die Kokultur mit C6-Glioma-Zellen bewirkten vergleichbar, obwohl sie in einigen Fällen nicht ganz so hoch ausfiel. Die als Kontrolle durchgeführte Kokultur von BCEC mit Zellen der humanen Fibroblasten-Zelllinie MRC-5 führte hingegen erwartungsgemäß zu keiner Steigerung des TEER (siehe Abb. 15).

Die durch die Makrophagen-Kokultur bewirkte TEER-Erhöpfung bei den BCEC-Monolayern zeigte sich bereits innerhalb von 24 h, und der TEER der mit Makrophagen kokultivierten BCEC erreichte im Vergleich zu den entsprechenden BCEC-Populationen ohne Kokultur zu diesem Zeitpunkt in der Regel sein Maximum. Im weiteren Verlauf der Kultivierung fiel zwar der TEER der mit Makrophagen kokultivierten BCEC wie bei den BCEC-Populationen ohne Kokultur stetig ab, jedoch erfolgte dieser Abfall unter dem Einfluss der Makrophagen oftmals deutlich langsamer (siehe Abb. 16 und 18).

Eine weitergehende quantitative Auswertung der absoluten und relativen Makrophagen-induzierten TEER-Erhöpfung bei den kokultivierten BCEC-Monolayern ist insofern schwierig, da bei jedem Kokultur-Experiment mit zwei verschiedenen und damit bei jedem Experiment variierenden Primärzell-Systemen (BCEC und Makrophagen) gearbeitet wurde und somit trotz einheitlicher experimenteller Methodik unterschiedliche Ausgangsbedingungen existierten. Einerseits unterschieden sich die einzelnen BCEC-Präparationen bezüglich der Höhe ihres TEER-Ausgangswertes vor Beginn des Kokultur-Experiments, und dieser hatte in einigen Fällen zu diesem Zeitpunkt noch nicht sein Maximum erreicht; andererseits wurden bei jedem Kokultur-Experiment Makrophagen verschiedener Spender verwendet. In den Experimenten, in denen BCEC einer Präparation mit Makrophagen verschiedener Spender kokultiviert wurden, zeigten sich zum Teil deutliche spenderabhängige Unterschiede zwischen den verschiedenen Makrophagen-Populationen bezüglich ihres TEER-erhöhenden Einflusses auf die BCEC, so beispielsweise bei dem Abbildung 18 zugrunde liegenden Experiment (vergl. 4.3.3), bei dem die unstimulierten Makrophagen des einen Spenders eine 87 %ige TEER-Erhöpfung, die des anderen Spenders aber nur eine 65 %ige TEER-Erhöpfung bei den kokultivierten BCEC-Monolayern bewirkten.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Problematik ließen sich dennoch einige Tendenzen bei dem Einfluss der Makrophagen auf die Permeabilität der mit ihnen kokultivierten BCEC erkennen, wobei im Folgenden nur die Kokultur-Ansätze berücksichtigt wurden, bei denen keine weitere Manipulation (Stimulation, Inkubation, HIV-Infektion) der Makrophagen oder

BCEC erfolgte. Bei BCEC-Monolayern, deren Ausgangs-TEER-Werte vor Beginn des Kokultur-Experiments bei etwa $1200 \Omega\cdot\text{cm}^2$ oder höher lagen, führte die Kokultur mit Makrophagen (spenderabhängig) innerhalb von 24 h zu einer mittleren Erhöhung des TEER auf etwa $2000 \Omega\cdot\text{cm}^2$ oder teilweise deutlich darüber (siehe Abb. 16, 18, 21b, 23 und 25). Die *relative* Steigerung des TEER lag bei sämtlichen durchgeführten Kokultur-Experimenten nach 24 h im Bereich von 31-87 %, und deren Höhe schien vom Niveau des Ausgangs-TEER unabhängig zu sein: so betrug die *relative* TEER-Erhöhung bei dem Abb. 21a (vergl. 4.3.5) zugrunde liegenden Experiment 62 % und entsprach damit etwa der (spenderabhängigen) TEER-Erhöhung des Abb. 21b zugrunde liegenden Experiments von 65 % bzw. 71 %, obwohl im letztgenannten Experiment der Ausgangs-TEER vor Beginn der Kokultur etwa doppelt so hoch lag. Die am häufigsten eintretende *relative* TEER-Steigerung innerhalb von 24 h lag im Bereich von 60-70 % (siehe Abb. 16, 18, 21 und 28). Die *absolute* TEER-Erhöhung in diesem Zeitraum betrug $325\text{-}1000 \Omega\cdot\text{cm}^2$ und verteilte sich, bezogen auf sämtliche durchgeführten Kokultur-Experimente, recht gleichmäßig über diesen Bereich. Da, wie bereits erwähnt, die Höhe der *relativen* TEER-Steigerung unabhängig vom TEER-Ausgangswert vor Beginn der Kokultur war, lag die durchschnittliche *absolute* TEER-Erhöhung bei den Kokultur-Experimenten mit hohem TEER-Ausgangswert ($>1000 \Omega\cdot\text{cm}^2$) zwangsläufig auf höherem Niveau als bei denen mit eher niedrigem TEER-Ausgangswert ($<1000 \Omega\cdot\text{cm}^2$).

Die im heterologen Makrophagen-BCEC-Kokultursystem gefundenen Ergebnisse konnten im homologen System eindeutig bestätigt werden. Die Kokultur von humanen Makrophagen mit humanen BCEC-Monolayern führte wie bei Hirnendothelzellen bovinen Ursprungs zu einer deutlichen Erhöhung des TEER (vergl. 4.3.4). Unterschiede zwischen dem heterologen und dem homologen Kokultur-System zeigten sich nur in der zeitlichen Entwicklung des TEER im Verlauf des Kokultur-Experiments. Während im heterologen Kokultur-System der TEER bei den mit Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayern in der Regel bereits 24 h nach Beginn der Kokultur sein Maximum erreichte und anschließend wieder abfiel, zeigte sich im homologen System bei den Kokultur-Ansätzen ein kontinuierlicher Anstieg des TEER bis etwa

Tag 5 nach Versuchsbeginn. Dagegen war die maximale *relative* TEER-Steigerung im homologen System um ein Vielfaches höher als in jedem der durchgeführten Kokultur-Experimente mit bovinen BCEC, sie betrug 5 d nach Versuchsbeginn bei beiden Makrophagen-Populationen über 500 %. Die *absolute* TEER-Erhöhung zu diesem Zeitpunkt entsprach mit etwa $350 \Omega\text{-cm}^2$ annähernd der einiger im heterologen System durchgeführten Kokultur-Experimente nach 24 h (siehe Abb. 15 und 19), obwohl bei diesen der Ausgangs-TEER vor Versuchsbeginn um ein Vielfaches höher lag.

Die gefundenen Abweichungen zwischen heterologem und homologem System können durch die unterschiedlichen Qualitäten der jeweiligen *in vitro*-BHS-Zellkulturmodelle erklärt werden. Im Vergleich zum bovinen System existierten im humanen *in vitro*-BHS-Zellkultursystem andere Ausgangsbedingungen, bedingt durch die Höhe des TEER vor Beginn der Kokultur (etwa $200 \Omega\text{-cm}^2$), der deutlich unter dem entsprechenden, in der Regel über $1000 \Omega\text{-cm}^2$ liegenden Wert des bovinen Systems lag. Weiterhin ergab die tägliche Messung des TEER der humanen BCEC-Monolayer bis zum Beginn des Kokultur-Experiments, dass dieser im Vergleich zum bovinen System nur langsam anstieg (nicht gezeigt), so dass die durch die Makrophagen-Kokultur bewirkte, aber über mehrere Tage verzögerte und nachhaltigere TEER-Erhöhung durchaus erklärbar ist.

5.3.2 Einfluss proinflammatorisch stimulierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

Eine Stimulation der Makrophagen mit einem Cytokin-Mix vor Beginn der Kokultur zeigte keine eindeutige Beeinflussung ihrer Wirkung auf die mit ihnen kokultivierten BCEC-Monolayer (vergl. 4.3.3). Dagegen führte eine Stimulation der Makrophagen mit Lipopolysaccharid (LPS) zumindest teilweise zu einer Reduktion des von ihnen ausgeübten Effekts auf die BCEC. Dieses Ergebnis war allerdings nicht immer reproduzierbar, da hierbei offenbar spenderabhängige Unterschiede zwischen verschiedenen Makrophagen-Populationen existierten. So zeigte sich beispielsweise bei dem der Abbildung 18 zugrunde liegenden

Experiment (vergl. 4.3.3), dass die LPS-Stimulation bei den Makrophagen des einen Spenders keine Auswirkung hatte, während bei den Makrophagen des anderen Spenders der von ihnen bewirkte Einfluss auf die BCEC zumindest über einen Zeitraum von 24 h deutlich reduziert wurde. Da in einigen Experimenten die LPS-Stimulation über einen verhältnismäßig langen Zeitraum von 24 h erfolgte, kann auch ein pathogener Effekt des LPS auf die Makrophagen nicht ausgeschlossen werden, der eine Reduktion ihrer Wirkung auf die BCEC zur Folge haben könnte. Möglich wäre weiterhin, dass sich nach dem Einsetzen der Inserts in die Zellkulturplatten mit den Makrophagen trotz gründlichen Waschens der Makrophagen-Kulturen nach Beendigung der Stimulation (vergl. 3.4.2) noch Reste von LPS, welches beispielsweise an die Makrophagen gebunden oder in Blasen zwischen diesen und der Zellkulturoberfläche lokalisiert war, im Medium des Kokultursystems befanden und die TEER-Reduktion bei den entsprechenden BCEC-Populationen nicht durch eine potentielle Beeinflussung der Makrophagen, sondern durch das LPS selbst verursacht wurde. LPS zeigte selbst in niedriger Konzentration einen negativen Einfluss auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern, der sich in einer deutlichen Reduktion des TEER bemerkbar machte (vergl. 4.4.2).

5.3.3 Einfluss Makrophagen-konditioniertem Mediums (MAC-CM) auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer und Vergleich mit Zelllinien

Schwierig zu interpretieren sind die Ergebnisse der Experimente, in denen der Einfluss von Makrophagen-konditioniertem Medium (MAC-CM) auf die BCEC untersucht wurden (vergl. 4.3.2 und 4.3.6). Im Gegensatz zur Kokultur bewirkte dieses in einem Zeitraum von 24 h keine eindeutige Erhöhung des TEER der darin kultivierten BCEC. Erst bei längerer Einwirkung zeigten sich Unterschiede im TEER zwischen den in MAC-CM kultivierten und den in unkonditioniertem Medium kultivierten BCEC-Monolayern, da der stetige Abfall des TEER im Verlauf der Kultivierung bei den in MAC-CM kultivierten BCEC langsamer erfolgte als bei den in unkonditioniertem Medium kultivierten Kontrollen. Diese Unterschiede ergaben sich allerdings nur bei den Experimenten, in denen die Herstellung des MAC-CMs über einen

längeren Zeitraum von 5 Tagen (siehe Abb. 17) oder 6 Tagen (siehe Abb. 22b) erfolgte, während das nach 2 Tagen abgenommene CM keinen Einfluss auf die BCEC zeigte (siehe Abb. 22a). Dies deutet darauf hin, dass der oder die von den Makrophagen in das Kulturmedium sezernierte(n) Faktor(en), der (die) eine Verstärkung oder Aufrechterhaltung der BHS-spezifischen Barriere-Eigenschaften bei BCEC-Monolayern bewirkte(n), erst bei einer längeren Herstellungszeit des CMs in diesem ausreichend konzentriert vorlag(en), um eine durch die TEER-Messung erkennbare Wirkung zu zeigen. Die Beobachtung, dass durch das CM im Gegensatz zur direkten Kokultur von Makrophagen keine merkliche TEER-Erhöhung nach 24 h bei den BCEC bewirkt wurde, könnte einen Hinweis darauf geben, dass bei dem gefundenen Einfluss der Makrophagen auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern nicht nur ein, sondern mehrere unterschiedlich wirkende Faktoren involviert sein könnten. Dabei würde ein Teil dieser Faktoren die nach 24 h bestimmbare Erniedrigung der Permeabilität der BCEC-Monolayer bewirken, während der andere Teil die Barriere-Eigenschaften der BCEC bei längerer Kultivierung aufrechterhielte, und dass der oder die den erstgenannten Effekt bewirkende(n) Faktor(en) im MAC-CM, möglicherweise aufgrund kurzer Lebensdauer, in einer für eine merkliche Wirkung nicht ausreichenden Konzentration vorgelegen haben könnte(n).

Der Vergleich des Makrophagen-CM mit dem der Glioma-Zelllinie C6 und der Fibroblasten-Zelllinie MRC-5 zeigte, dass die Kultivierung der BCEC in den beiden Zelllinien-CM zu einer Erniedrigung des TEER im Vergleich zu den in unkonditioniertem Medium kultivierten Populationen führte (siehe Abb. 17). Obwohl dieses Ergebnis mit dem MRC-5-CM zu erwarten war, sollte dagegen die Kultivierung der BCEC im C6-CM wie die direkte Kokultur mit C6-Zellen eher zu einer TEER-Erhöhung führen. Dies stellt allerdings keinen Widerspruch dar, da davon ausgegangen werden muss, dass das CM durch die intensive Stoffwechselaktivität der C6-Zellen, die eine im Vergleich zu den MRC-5-Zellen hohe Proliferationsrate besitzen und nicht kontaktinhibiert sind, bei dessen Abnahme bereits stark verbraucht war, was sich wiederum negativ auf die darin kultivierten BCEC ausgewirkt und eine potentiell TEER-erhöhende Wirkung darin enthaltener Faktoren überlagert haben könnte.

Generell ist, im Gegensatz zu den Kokultur-Experimenten, die Aussagekraft der mit konditionierten Medien durchgeführten Versuche begrenzt. Ein Vergleich des von Makrophagen konditionierten Mediums mit dem anderer Zellen oder Zelllinien ist problematisch, da, wie bereits dargelegt, sich die verschiedenen Zelltypen bezüglich ihrer Stoffwechselaktivität, die wiederum entscheidend von ihrer Proliferationsrate abhängt, zu stark voneinander unterscheiden. Dadurch ergeben sich große Unterschiede in der „Frische“ der verschiedenen konditionierten Medien zum Zeitpunkt ihrer Abnahme, was zu unvorhersehbaren Folgeeffekten bei den darin kultivierten BCEC führen kann. Auch die Wahl der Kontrollen gestaltete sich als schwierig, da frisches unkonditioniertes Medium durch das darin enthaltene Serum einen starken negativen Effekt auf die Permeabilität der darin kultivierten BCEC ausübte (vergl. 4.4.1, siehe Abb. 22a als Beispiel). Folglich blieb als einzige Kontrolle die Weiterkultivierung der BCEC in dem bereits gebrauchten Medium aus dem jeweiligen unteren Kompartiment des Transwell®-Systems.

5.3.4 Einfluss HIV-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer

Eine Infektion der Makrophagen mit zwei verschiedenen HIV-1-Isolaten (117_{III} und Ada-M) zeigte keinen Einfluss auf die von ihnen bewirkte Erhöhung des TEER der mit ihnen kokultivierten BCEC-Monolayer. Trotz Vorhandenseins einer produktiven HIV-1-Infektion der entsprechenden Makrophagen-Populationen konnten keine Unterschiede zwischen dem Einfluss uninfizierter und infizierter Makrophagen auf die kokultivierten BCEC festgestellt werden (vergl. 4.3.5). Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zeigen, zumindest für das verwendete Kokultur-System, dass die HIV-1-infizierten Makrophagen entweder keine löslichen Faktoren sezernierten, die eine erhöhte Permeabilität bei den kokultivierten BCEC-Monolayern bewirkt hätten, oder dass die Wirkung dieser potentiell vorhandenen Faktoren im Vergleich zu dem die Permeabilität von BCEC-Monolayern erniedrigenden Einfluss der Makrophagen zu gering war und/oder neutralisiert wurde.

Die Inkubation der BCEC-Monolayer mit Makrophagen-konditioniertem Medium (CM) zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Permeabilitäten der in CM uninfizierter Makrophagen im Vergleich zu den in CM HIV-1-infizierter Makrophagen kultivierten BCEC-Monolayer (vergl. 4.3.6), was wiederum die mit den Kokultur-Experimenten gewonnenen Ergebnisse bestätigt.

Die bisher durchgeführten *in vivo*- und *post mortem*-Studien bei HIV-Infizierten zeigten, dass eine erhöhte Permeabilität der BHS in der Regel nur bei AIDS-symptomatischen Individuen beziehungsweise AIDS-Kranken mit HIV-Encephalitis und ADC vorhanden war, nicht jedoch bei asymptomatischen HIV-Infizierten (vergl. 2.2). Obwohl bei einer akuten HIV-Infektion bereits zu einem verhältnismäßig frühen Zeitpunkt das HI-Virus oder HIV-spezifisches Material im Gehirn identifiziert werden kann, erfolgt eine nachweisbare Störung der BHS-Barrierefunktion offensichtlich erst wesentlich später mit zunehmender Progression der Erkrankung und Eintritt in die symptomatische Phase. Dies führt zu dem Schluss, dass durch den Eintritt des HI-Virus in das Gehirn und seine dortige Verbreitung die Integrität der BHS zunächst nicht beeinflusst wird. Der Weg, durch den HIV in das Hirngewebe gelangt, erfolgt dabei höchstwahrscheinlich innerhalb infizierter Monocyten/Makrophagen, die aus dem Blutstrom in das Gehirn einwandern (*trojan horse theory*, vergl. 2.2). Der Eintritt hämatogener Monocyten/Makrophagen in das Gehirn ist ohnehin ein physiologischer Vorgang, da hierdurch die Population perivaskulärer Mikrogliazellen kontinuierlich ersetzt wird (vergl. 2.1.5.4). Diese stellen wiederum bei der weiteren Verbreitung des HI-Virus im Gehirn nach dessen Eintritt die primären Zielzellen dar, da die in das Gehirn infiltrierenden HIV-infizierten Makrophagen zunächst in der Nähe der Blutgefäße verbleiben und die perivaskulären Mikrogliazellen ebenfalls dort lokalisiert sind (Smith *et al.* 1990b, Peudenier *et al.* 1991, Power *et al.* 1993, Jones *et al.* 2000). Folglich steht das cerebrale Endothel bereits frühzeitig nach dem Eintritt des HI-Virus in das Gehirn unter dem permanenten Einfluss HIV-infizierter Makrophagen und Mikrogliazellen, ohne dass dies zu einer Beeinträchtigung der BHS-spezifischen Barrierefunktion zu führen scheint. Dieser Sachverhalt wird durch die in dieser Arbeit gezeigten

Ergebnisse eindeutig bestätigt, da in den durchgeführten Kokultur-Experimenten ebenfalls kein negativer Einfluss HIV-infizierter Makrophagen auf die Permeabilität postkonfluenter BCEC-Monolayer gefunden werden konnte.

5.3.5 Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege an der Makrophagen-BCEC-Interaktion

Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels der BCEC, entweder durch die Aktivierung der Adenylat-Cyclase mit Forskolin oder durch Inhibition der Phosphodiesterase mit RO 20-1724, führte bei den mit Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayern wie bei den mit C6-Glioma-Zellen kokultivierten BCEC-Monolayern zu einer zusätzlichen Steigerung des TEER, verglichen mit den korrespondierenden Kulturen ohne Zugabe (vergl. 4.3.7.1.1). Folglich lag hierbei ebenfalls ein additiv wirkender Mechanismus vor. Es zeigte sich weiterhin, dass die Inhibition der Adenylat-Cyclase durch Inkubation der BCEC-Monolayer mit SQ22536 keine Blockierung der durch die Kokultur mit Makrophagen oder C6-Zellen bewirkten TEER-Erhöhung zur Folge hatte (vergl. 4.3.7.1.2). Dieses Ergebnis führt zu dem Schluss, dass die durch Makrophagen bewirkte Verringerung der Permeabilität der kokultivierten BCEC nicht über einen Signaltransduktionsweg vermittelt wird, der die Adenylat-Cyclase und/oder den *second messenger* cAMP beinhaltet. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen aus entsprechend mit primären Astrocyten oder C6-Glioma-Zellen durchgeführten Kokultur-Studien, in denen ebenfalls keine Aktivierung der Adenylat-Cyclase und Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels bei den BCEC durch die Astrocyten- oder C6-Kokultur nachgewiesen werden konnte (Rubin *et al.* 1991, Raub 1996).

Die Beeinflussung diverser Protein-Kinasen (Protein-Kinasen A, C, G und MLCK) zeigte ebenfalls keine Auswirkung auf die von Makrophagen bewirkte TEER-Erhöhung bei den kokultivierten BCEC-Monolayern. Die Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) durch Inkubation der BCEC mit dem Diacylglycerol-Analogen OAG führte zu keiner Änderung des TEER der so behandelten BCEC-Monolayer im Vergleich zum entsprechenden unbehandelten

Ansatz, und zwar unabhängig davon, ob die BCEC mit Makrophagen kokultiviert wurden oder nicht (vergl. 4.3.7.2.1). Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei Inhibition der PKC sowie der weiteren oben genannten Protein-Kinasen durch Inkubation mit den Substanzen H-7 und H-8. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss der Makrophagen auf die BCEC nicht über die PKC oder die anderen genannten Protein-Kinasen vermittelt wird. Entsprechende als Vergleich durchgeführte Inkubationen bei mit C6-Zellen kokultivierten BCEC zeigten dieses Ergebnis auch für den Einfluss der glialen Zellen. Dies steht allerdings in einem gewissen Widerspruch zu den Ergebnissen einer Studie, in denen eine leichte Erhöhung des TEER boviner BCEC durch Aktivierung der PKC bei gleichzeitiger C6-Kokultur im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen gezeigt wurde, und darüber hinaus führte die Inkubation der BCEC mit dem Inhibitor H-7 zu einem deutlichen Einbruch des TEER (Raub 1996). Allerdings existierten dabei gänzlich andere Bedingungen, da einerseits der Ausgangs-TEER vor Beginn der Kokultur und Inkubation auf einem wesentlich niedrigerem Niveau lag ($< 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$), und andererseits die BCEC zusätzlich noch mit einem Phosphodiesterase-Inhibitor behandelt wurden, so dass die bereits erwähnten Einschränkungen bezüglich der Qualität des in dieser Studie verwendeten BHS-Zellkulturmodells sowie die Aussagekraft der damit durchgeführten Experimente gelten (vergl. 5.2). Wahrscheinlich ist, dass in der oben erwähnten Studie aufgrund des sehr niedrigen Ausgangs-TEER der BCEC-Monolayer eine Induktion der *de novo*-Synthese und/oder fundamentale Reorganisation von *tight junctions* durch die C6-Kokultur erfolgte; dieser Prozess kann durch Aktivierung der daran beteiligten PKC unterstützt oder durch deren Inhibition verhindert werden (vergl. 2.1.3), was wiederum die in dieser Studie gefundenen Ergebnisse erklären würde. Im Gegensatz dazu lag bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten der Ausgangs-TEER der BCEC-Monolayer vor Beginn der Kokultur auf einem sehr hohen Niveau, was nahe legt, dass die *tight junctions* bereits vollständig ausgebildet waren und zur weiteren Verringerung der Permeabilität keine Neusynthese oder Reorganisation von *tight junctions* mehr erforderlich war, so dass eine Beeinflussung der Protein-Kinase-Aktivität keine Auswirkung zeigte. Dieses Resultat bestätigt wiederum die Ergebnisse einer Studie, in der

die Auswirkung von PKC-Inhibitoren, darunter auch H-7, auf den TEER von Epithelzell-Monolayern untersucht wurde (Stuart und Nigam 1995); hierbei zeigte sich ebenfalls, dass die Inhibition der PKC zwar die *de novo*-Synthese der *tight junctions* und Ausbildung eines niedrigpermeablen Zellmonolayers unterbindet, aber bereits vollständig etablierte *tight junctions* und ein auf hohem Niveau liegender TEER der Epithelzell-Monolayer dadurch nicht beeinflusst werden.

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass weder die Inhibition der Rezeptor-vermittelten Aktivierung der Phospholipase C durch Inkubation mit U-73122 noch die Inhibition der Ca^{2+} -vermittelten Aktivierung des Calmodulins durch die W-7-Inkubation eine Auswirkung auf die durch die Makrophagen- oder C6-Kokultur bewirkte TEER-Erhöhung bei den BCEC-Monolayern hatte (vergl. 4.3.7.3), so dass eine Beteiligung beider Signaltransduktions-Mediatoren an dem von Makrophagen oder C6 ausgeübten Einfluss auf die BCEC ebenfalls unwahrscheinlich erscheint. Dieses Resultat stimmt wiederum mit den Ergebnissen der oben bereits erwähnten Studie überein, in der ebenfalls bovine, mit C6-Glioma-Zellen kokultivierte BCEC-Monolayer mit dem Phospholipase C-Inhibitor U-73122 behandelt wurden und dies zu keiner Reduktion des von den C6 ausgeübten Permeabilitäts-erniedrigenden Einflusses auf die BCEC führte (Raub 1996). Dass der Phospholipase C-Inhibitor keine Auswirkung auf den TEER der so behandelten BCEC-Monolayer zeigte, bestätigt weiterhin die mit den Inhibitoren H-7, H-8 und W-7 gefundenen Ergebnisse: eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C würde einerseits über den *second messenger* Diacylglycerol zu einer Aktivierung der Protein-Kinase C führen, und andererseits einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels mit nachfolgender Ca^{2+} -Calmodulin-vermittelter Aktivierung der *myosin light chain kinase* (MLCK) bewirken. Die Inhibition beider Kinasen mit H-7 oder H-8 sowie die Inhibition der Ca^{2+} -vermittelten Aktivierung des Calmodulins mit W-7 zeigte aber keinen Einfluss auf den TEER der mit Makrophagen oder C6-Zellen kokultivierten BCEC-Monolayer (vergl. 4.3.7.2.2), so dass eine Aktivierung dieser Enzyme nicht erfolgt sein kann.

Die gezeigten Experimente haben ergeben, dass offensichtlich keine der untersuchten Signaltransduktionswege an der Makrophagen-BCEC-Interaktion beteiligt sind und die Makrophagen-induzierte TEER-Erhöhung bei den BCEC nicht oder zumindest nicht ausschließlich über diese vermittelt werden. Die parallel durchgeführten Kokultur-Experimente mit C6-Glioma-Zellen führten zu dem gleichen Ergebnis, was darauf hindeutet, dass der Einfluss sowohl der Makrophagen als auch der C6-Glioma-Zellen auf die kokultivierten BCEC über die gleichen oder zumindest ähnliche Mechanismen und Signalwege vermittelt werden. Eine gründliche Charakterisierung der Interaktions-Mechanismen zwischen primären Astrocyten beziehungsweise C6-Zellen und cerebralen Endothelzellen sowie der daran beteiligten Signaltransduktionswege ist trotz intensiver Forschung bis dato nicht gelungen, und es ist sogar nach wie vor umstritten, ob diese Interaktion über lösliche Faktoren oder direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt wird (vergl. 2.3.3.2). Zumindest die letztgenannte Fragestellung konnte in der vorliegenden Arbeit zweifelsfrei beantwortet werden, da in dem verwendeten Kokultur-System ohne direkten Zell-Zell-Kontakt der Einfluss der Makrophagen und C6-Zellen auf die BCEC nur über lösliche Faktoren vermittelt werden konnte. Es erscheint denkbar, dass mehrere unterschiedliche Faktoren bei dieser Interaktion involviert sein könnten und diese über verschiedene und vielleicht teilweise unbekannte Signaltransduktions-Mechanismen in synergistischer Weise wirken, so dass die Konzentration auf nur einzelne Signalwege bei den bisher zu diesem Themenkomplex durchgeführten Studien zu keinem eindeutigen Ergebnis führen konnte.

5.3.6 Schlussfolgerungen und Bewertung

Der gezeigte Einfluss von Makrophagen auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern, der mit dem primärer Astrocyten oder Zellen glialen Ursprungs vergleichbar ist, ist überaus bemerkenswert und bislang nicht beschrieben worden. Bisher sind nur vergleichsweise wenige Studien durchgeführt worden, in denen Monocyten oder Makrophagen mit cerebralen Endothelzellen kokultiviert wurden, und diese beschränkten sich in der Regel auf

Untersuchungen der Adhäsion und/oder Migration von uninfizierten, stimulierten oder HIV-infizierten Monocyten/Makrophagen durch BCEC-Monolayer oder deren Einfluss auf die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (Dhawan *et al.* 1995, Nottet *et al.* 1996, Persidsky und Gendelman 1997a, Persidsky *et al.* 1997b).

Nur in einer Studie wurde bisher der Einfluss von Makrophagen auf die Permeabilität von BCEC-Monolayern untersucht (Dhawan *et al.* 1995); hierbei zeigte sich, dass die Permeabilität von BCEC-Monolayern für Albumin durch die Kokultur mit HIV-infizierten Makrophagen um ein Vielfaches erhöht wurde, verglichen mit BCEC-Kulturen, die mit uninfizierten Makrophagen kokultiviert wurden. Allerdings fehlte hierbei der Vergleich zu entsprechenden Kontrollen ohne Kokultur, und es wurde dabei, wie auch in den anderen oben erwähnten Studien, eine im Vergleich zu den in dieser Arbeit gezeigten Kokultur-Experimenten gänzlich abweichende experimentelle Methodik verwendet. Zum einen wurden die Makrophagen den kultivierten BCEC-Monolayern zugegeben, so dass die Makrophagen durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit der luminalen Oberfläche der BCEC interagierten, und zum anderen wurde ein homologes System unter Verwendung von BCEC und Makrophagen humanen Ursprungs verwendet. Darüber hinaus erfolgte wiederum keine nähere Charakterisierung oder Validierung des verwendeten BHS-Zellkulturmodells, so dass die Aussagekraft dieses Ergebnisses sehr beschränkt ist (vergl. 5.2). Der Vergleich mit Endothelzell-Monolayern peripheren Ursprungs zeigte jedenfalls nur eine geringfügig niedrigere Permeabilität der BCEC-Monolayer für Albumin. Daher können aufgrund der völlig unterschiedlichen Ausgangsbedingungen bezüglich der Art und Qualität der verwendeten BHS-Zellkulturmodelle sowie der experimentellen Methodik bei der Durchführung der Kokultur-Experimente die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse nicht mit den Ergebnissen der oben angeführten Studie in Beziehung gesetzt werden.

Der in dieser Arbeit gezeigte Befund, dass hämatogene Makrophagen in der Lage sind, bei kultivierten BCEC BHS-spezifische Eigenschaften zu induzieren und/oder aufrechtzuerhalten, ist insofern bemerkenswert, da diese Wirkung bislang ausnahmslos Zellen neuroektodermalen Ursprungs (insbesondere Astrocyten), sowie glialen Zelllinien wie beispielsweise C6-Glioma-

Zellen, zugeschrieben wurde (vergl. 2.1.4 und 2.3.3.2). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass außer glialen Zellen auch hämatogene Makrophagen oder davon abgeleitete Zellen des Hirnparenchyms ebenfalls ein Teil der Mikroumgebung sind, die *in vivo* die charakteristischen Eigenschaften von Hirnendothelzellen modulieren. Diese Funktion könnten sie in Form der perivaskulären Mikrogliazellen ausüben, die in engem Kontakt mit den cerebralen Blutgefäßen stehen (vergl. 2.1.5.4) und höchstwahrscheinlich durch aus dem Blutstrom in das Gehirn einwandernde Monocyten/Makrophagen kontinuierlich ersetzt werden (Hickey und Kimura 1988, Hickey *et al.* 1992, Lassmann *et al.* 1993, Gehrman *et al.* 1995).

5.4 Einfluss von Serum auf die Permeabilität post-konfluenter BCEC-Monolayer

Die Zugabe von frischem Serum zum Kulturmedium postkonfluenter BCEC-Monolayer führte innerhalb eines kurzen Zeitraums von nur 1 h zu einem starken Einbruch des TEER (vergl. 4.4.1). Dieser Effekt (im folgenden als „Serum-Effekt“ bezeichnet) trat sowohl bei in Serum-haltigem als auch bei in Serum-freiem Medium kultivierten BCEC auf (siehe Abb. 31). Allerdings war er bei den Serum-frei kultivierten BCEC-Populationen wesentlich stärker ausgeprägt, hier führte die Serum-Zugabe innerhalb von 2-3 h zu einem völligen Zusammenbruch des TEER bis auf den Nullwert (siehe Abb. 31a-b und 32), während der TEER bei den Serum-haltig kultivierten BCEC nur um etwa die Hälfte einbrach (siehe Abb. 31c). Darüber hinaus zeigte die lichtmikroskopische Kontrolle bei den Serum-frei kultivierten BCEC, dass diese etwa 2 h nach Zugabe des Serums begannen, sich zusammenzuziehen, und 3 h nach Serum-Zugabe konnte das Vorhandensein von Lücken zwischen den Zellen und die völlige Auflösung des BCEC-Monolayers beobachtet werden (nicht gezeigt), was den zu diesem Zeitpunkt nicht mehr messbaren TEER erklärt (Kurzschlussituation). Offensichtlich waren die Hirnendothelzellen, die unter Serum-freien Kulturbedingungen gehalten wurden, für den „Serum-Effekt“ besonders empfänglich und reagierten darauf mit dem Abbau ihrer Zell-Zell- und/oder Zell-Substrat-Verbindungen, was schließlich zur Auflösung des Zellmonolayers

fürte. Aber auch unter Serum-haltigen Bedingungen kultivierte BCEC reagierten auf die Zufuhr von frischem Serum, was sich durch den starken Einbruch ihres TEER bemerkbar machte (siehe Abb. 31c); allerdings waren hierbei die Folgeeffekte viel weniger ausgeprägt als bei den Serum-frei kultivierten Populationen, da mikroskopisch keine Änderung der Morphologie bei diesen Kulturen festgestellt werden konnte. Offensichtlich erfolgte bei den bereits an Serum adaptierten BCEC infolge des Serum-Effekts zwar keine Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen, aber zumindest eine Beeinträchtigung der *tight junctions* mit daraus resultierender Erhöhung der Permeabilität des Zellmonolayers.

Bei bovinen BCEC-Monolayern trat der „Serum-Effekt“ nicht nur bei Serum bovinen Ursprungs auf, auch humanes Serum zeigte die gleiche Wirkung, was darauf hinweist, dass der „Serum-Effekt“ Spezies-übergreifend und nicht Spezies-spezifisch ist.

Eine Inkubation der BCEC mit dem Pilzalkaloid Cytochalasin B zeigte keinen inhibierenden Einfluss auf den „Serum-Effekt“, der Serum-induzierte Zusammenbruch der Barrierefunktion und die Auflösung der BCEC-Monolayer konnte dadurch weder verhindert noch reduziert werden (siehe Abb. 31). Dies zeigt, dass eine eventuell erfolgte endocytotische Aufnahme von Serum-Bestandteilen durch die BCEC mit einer potentiellen Beeinflussung der an das Cytoskelett angeschlossenen *tight junctions* nicht die Ursache für die beobachtete Permeabilitätserhöhung sein konnte, da das Cytochalasin B die Endocytose blockiert.

Im weiteren Verlauf der Kultivierung regenerierten sich die vom Serum-Effekt betroffenen BCEC-Monolayer durchgehend wieder, teilweise kehrte der TEER bereits 24 h nach der Serum-Zugabe wieder auf den Ausgangswert zurück (siehe Abb. 31).

Der gezeigte negative Effekt von frischem Serum auf die Permeabilität und Integrität von BCEC-Monolayern ist bisher bei cerebralen Endothelzellen nicht beschrieben worden und insofern bemerkenswert, da dieser Zelltyp *in vivo* auf der luminalen Seite unter der permanenten Einwirkung von Serum steht. In den durchgeführten Experimenten erfolgte die Zugabe des

Serums ausschließlich in das obere Kompartiment des BHS-Modellsystems, so dass das Serum ebenfalls nur auf die luminalen Oberfläche der BCEC einwirken konnte.

Ein vergleichbarer „Serum-Effekt“ konnte jedoch auch bei Epithelzell-Monolayern gezeigt werden, und dies sowohl bei primären Epithelzellen der Retina (Chang *et al.* 1997) und des Choroid Plexus (Hakvoort *et al.* 1998) als auch bei der epithelialen Zelllinie MDCK (Conyers *et al.* 1990, Marmorstein *et al.* 1992, Mortell *et al.* 1993). In diesen Studien führte die Zugabe von Serum verschiedener Spezies ebenfalls innerhalb eines kurzen Zeitraums von 60 min zu einem deutlichen, konzentrationsabhängigen und reversiblen Einbruch des transepithelialen elektrischen Widerstandes; dieses Resultat stimmt folglich mit den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen völlig überein.

Unbekannt sind bislang die Serumfaktoren, die für den gefundenen Effekt auf die Permeabilität von cerebralen Endothel- und epithelialen Zellmonolayern verantwortlich sein könnten. Diskutiert werden im Serum enthaltene proinflammatorische Cytokine oder Blutgerinnungsfaktoren, die bei dessen Gewinnung und/oder Aufarbeitung darin freigesetzt werden (Conyers *et al.* 1990, Hoheisel *et al.* 1998, Galla, H.-J., persönliche Kommunikation), sowie im Serum befindliche Wachstumsfaktoren, die nicht die Differenzierung der Zellen, sondern ihre Proliferation begünstigen (Hoheisel *et al.* 1998, Franke *et al.* 1999). Da sowohl in den genannten Studien als auch in den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten Hitze-inaktiviertes Serum (45 min bei 56° C) verwendet wurde, müsste(n) der/die den „Serum-Effekt“ verursachenden Faktor(en) weitgehend hitzestabil sein.

Obwohl weder der Wirkmechanismus noch die Art beziehungsweise Natur der die Permeabilität cerebral-endothelialer und epithelialer Zellmonolayer negativ beeinflussenden Serumfaktoren bekannt sind und auch in den hier gezeigten Experimenten nicht weiter aufgeklärt werden konnten, hatte dieser „Serum-Effekt“ doch erhebliche Konsequenzen zur Folge, da er bei der Arbeit mit den BCEC und dem *in vitro*-BHS-Zellkulturmodell permanent berücksichtigt werden musste und diese dadurch erschwerte. Dies betraf beispielsweise den Zeitpunkt eines

Medienwechsels bei den in Transwell[®]-Inserts kultivierten BCEC-Monolayern, da dieser nach Erreichen eines hohen TEER aufgrund des dadurch bewirkten TEER-Einbruchs nicht mehr durchgeführt werden durfte (vergl. 4.1.2.2). In besonderem Maße stellte der „Serum-Effekt“ eine Problematik bei den mit BCEC-Monolayern durchgeführten Kokultur-Experimenten und Inkubationsversuchen mit konditioniertem Medium dar, da hierbei ebenfalls auf die Verwendung von frischem Medium, beispielsweise als Kontrolle, verzichtet werden musste, da der durch das darin enthaltene Serum bewirkte TEER-Einbruch sämtliche Ergebnisse beeinflusst und verfälscht hätte (siehe Abb. 22a als Beispiel).

5.5 Einfluss von Nanopartikeln auf die Permeabilität postkonfluenten BCEC-Monolayer

Die Zugabe von Polysorbat 80-(PS 80-)gecoateten *Polybutylcyanoacrylat*-(PBCA)-Nanopartikeln zu postkonfluenten BCEC-Monolayern in einer Konzentration von 5 und 10 µg/ml führte zu einer deutlichen und konzentrationsabhängigen Erhöhung deren Permeabilität sowohl für Elektrolyte als auch für makromolekulare Substanzen, was durch Messung des TEER und durch Permeabilitätsassays mit radioaktiv markierter Sucrose gezeigt werden konnte (vergl. 4.5). Dieser Effekt der PS 80-gecoateten Nanopartikel zeigte sich sehr schnell bereits innerhalb von 30 min nach deren Zugabe. Eine Permeabilitäts-erhöhung zeigte sich auch bei der Inkubation der BCEC mit ungecoateten Nanopartikeln, deutlich allerdings nur bei der höchsten Konzentration von 10 µg/ml sowie abgeschwächt und zeitverzögert, was auf eine verlangsamte Wirkung oder einen anderen Wirkmechanismus der ungecoateten Nanopartikel hindeutet. In niedrigeren Konzentrationen von 1 oder 2 µg/ml zeigten weder die PS 80-gecoateten noch die ungecoateten Nanopartikel einen Einfluss auf die Permeabilität der damit inkubierten BCEC-Monolayer (siehe Abb. 34a). Der Schwellenwert, ab dem die Nanopartikel einen die Permeabilität erhöhenden Einfluss auf die BCEC ausübten, lag also für die PS 80-gecoateten Nanopartikel in dem Konzentrationsbereich von 2-5 µg/ml und für die ungecoateten Nanopartikel oberhalb von 5 µg/ml.

Die Inkubation der BCEC-Monolayer mit PS 80 alleine zeigte keinen Einfluss auf deren Permeabilität. Dies war ohnehin nicht zu erwarten, da PS 80 Bestandteil einiger Zellkulturmedien ist und auch im als Basis des BCEC-Mediums # 3 verwendeten M199 (vergl. 3.2.2) mit 20 µg/ml, also dem Doppelten der bei den Inkubationen eingesetzten Konzentration, vorhanden war. Die Zugabe von 20 µg/ml PS 80 zu in BCEC-Medium # 2 kultivierten BCEC zeigte auch bei einwöchiger Kultivierung keinen Einfluss auf deren TEER im Vergleich zu parallelen BCEC-Kulturen, deren Kulturmedium kein PS 80 zugesetzt war (nicht gezeigt).

Die Resultate der durchgeführten Inkubationsexperimente von BCEC mit PBCA-Nanopartikeln sind völlig kompatibel mit den Ergebnissen einer Studie, in der vergleichbare Inkubationsversuche von primären BCEC mit PS 80-gecoateten Nanopartikeln innerhalb eines *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells - bestehend aus bovinen BCEC in Kokultur mit Astrocyten (Dehouck *et al.* 1990) - durchgeführt wurden (Olivier *et al.* 1999). Dabei zeigte sich ebenfalls eine starke Erhöhung der Permeabilität der BCEC-Monolayer für Sucrose, wenn diese mit Nanopartikel inkubiert wurden, und dies bereits innerhalb eines Zeitraums von 20 min nach deren Zugabe. Die Permeabilitäts-erhöhung erfolgte erst bei einer Nanopartikel-Konzentration von 10 µg/ml und darüber, eine Nanopartikel-Konzentration ≤ 1 µg/ml zeigte dagegen keine Auswirkung. Folglich lag auch bei diesen Inkubationen der Schwellenwert der Nanopartikel-Konzentration, ab dem diese einen Permeabilität-erhöhenden Effekt zeigten, im Bereich von 1-10 µg/ml.

Unklar ist der Mechanismus, durch den die Nanopartikel die Permeabilitäts-erhöhung bei den damit inkubierten BCEC bewirken. Ein letal wirkender cytotoxischer Effekt auf die Zellen erscheint unwahrscheinlich, da sich das System wieder regenerierte und der TEER nach 24 h wieder auf seinen Ausgangswert vor Beginn der Nanopartikel-Inkubation zurückkehrte (siehe Abb. 34). In vergleichbaren Inkubations-Experimenten ist gezeigt worden, dass PBCA-Nanopartikel durch endocytotische Mechanismen von primären BCEC *in vitro* aufgenommen

wurden, und dass das Coating der Nanopartikel mit PS 80 diese Aufnahme verstärkte und beschleunigte (Ramge *et al.* 2000). Man könnte postulieren, dass durch die Endocytose von Nanopartikeln eine partielle Öffnung der die Interzellularspalten der Hirndothelzellen verschließenden *tight junctions* erfolgt, da diese mit dem Cytoskelett in Verbindung stehen und somit dessen Einfluss unterliegen (vergl. 2.1.3). Darüber hinaus wäre eine Transcytose der Nanopartikel durch den BCEC-Monolayer denkbar, was zumindest deren erhöhte Permeabilität für Sucrose bei Inkubation mit Nanopartikeln erklären könnte (vergl. 4.5.2), da möglicherweise die Sucrose zusammen mit den Nanopartikeln durch den BCEC-Monolayer transportiert würde. Eine Inkubation der BCEC mit dem die Endocytose blockierenden Pilzalkaloid Cytochalasin B zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Permeabilität-erhöhende Wirkung der PS 80-gecoateten PBCA-Nanopartikel (vergl. 4.5.2). Da gezeigt worden ist, dass die Aufnahme dieser Nanopartikel durch die BCEC mit Cytochalasin B blockiert werden kann (Ramge *et al.* 2000), führt dies zu dem Schluss, dass die durch die Nanopartikel bewirkte Permeabilitätserhöhung bei BCEC-Monolayern nicht durch einen Endocytose- beziehungsweise Transcytose-Mechanismus vermittelt wird. Darüber hinaus spricht die überaus schnell einsetzende, im Minutenbereich liegende Wirkung der Nanopartikel nach deren Zugabe gegen einen Endo- oder Transcytose-Mechanismus (Friden 1996). Die gleiche Aussage trifft auch für die *in vivo*-Situation zu, da die an Mäusen gezeigte antinozizeptive Wirkung von an PS 80-gecoatete Nanopartikel gebundenen Arzneistoffen ebenfalls bereits einige Minuten nach deren intravenösen Applikation einsetzte (Alyautdin *et al.* 1995, Kreuter *et al.* 1995, Kreuter *et al.* 1997).

Wahrscheinlicher ist deshalb, dass die Nanopartikel oder deren Abbauprodukte ab einem bestimmten Konzentrations-Schwellenwert über direkte Mechanismen eine Öffnung der *tight junctions* bewirken, möglicherweise durch direkte Interaktion mit dem *tight junction*-Multiproteinkomplex (Olivier *et al.* 1999). Ein derartiger Mechanismus könnte auch die Ergebnisse der oben genannten *in vivo*-Studien erklären. Der Eintritt der an die Nanopartikel gebundenen antinozizeptiv wirkenden Substanzen in das Gehirn, der in ungebundenem Zustand durch die Barrierefunktion der BHS verhindert wird, könnte durch die die *tight junctions*

beeinflussende Wirkung der Nanopartikel und daraus resultierende Öffnung der BHS erleichtert werden. In den oben genannten Studien erreichten die Nanopartikel direkt nach deren intravenösen Injektion im Blut eine Konzentration von etwa 1,5 mg/ml; dieser Wert liegt um mehrere Größenordnungen über dem in *in vitro*-Studien gefundenen Schwellenwert, ab dem die Nanopartikel ihren die Permeabilität erhöhenden Effekt zeigten (vergl. 4.5)(Olivier *et al.* 1999). Bei dieser hohen Nanopartikel-Konzentration erscheint eine unspezifische Öffnung der BHS äußerst wahrscheinlich.

5.6 Abschließende Bewertung und Perspektiven

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte und hochqualitative *in vitro*-Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke konnte für die Untersuchung einer Reihe unterschiedlicher Fragestellungen eingesetzt werden. Als einfaches und flexibel handhabbares experimentelles System ermöglichte es Studien unter kontrollierbaren und reproduzierbaren Bedingungen, die in dieser Form *in vivo* nicht durchführbar gewesen wären. Dabei konnten eine Reihe neuer und bemerkenswerter Ergebnisse gefunden werden. Dies bestätigt, dass *in vitro*-Zellkultursysteme der BHS bei der Untersuchung ihrer Eigenschaften, Regulation und Physiologie eine wichtige Rolle einnehmen. Darüber hinaus sind sie in der pharmakologischen Forschung als Alternative zum Tierversuch bei der Entwicklung von im Zentralnervensystem wirkenden Arzneistoffen und die BHS überwindenden Trägersystemen bedeutend. Dies trifft in besonderem Maße auf ausgereifte BHS-Modelle zu, die wie das in dieser Arbeit präsentierte Modellsystem durch eine BHS-spezifische niedrige Permeabilität verfügen und damit die Übertragbarkeit von *in vitro* gewonnenen Erkenntnissen auf die *in vivo*-Situation gewährleisten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Optimierung der Isolierung und Kultivierung von cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (BCEC) ein *in vitro*-Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke (BHS) etabliert, das bezüglich seiner Permeabilitäts-Charakteristiken spezifische und herausragende Eigenschaften aufwies. Nach Abschluss der Etablierungs- und Optimierungsphase konnten im bovinen System wiederholt und reproduzierbar transendotheliale elektrische Widerstände (*transendothelial electrical resistance*, TEER) von zum Teil deutlich oberhalb $1000 \Omega\text{-cm}^2$ erzielt werden, und die parazelluläre Permeabilität der bovinen BCEC-Monolayer für Sucrose lag annähernd auf dem niedrigen Niveau hochimpermeabler MDCK-Epithelzell-Monolayer und der entsprechenden *in vivo*-Parameter.

Die *per se* niedrige Permeabilität des *in vitro*-BHS-Zellkulturmodells konnte sowohl durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels der BCEC als auch durch Kokultur der BCEC-Monolayer mit C6-Glioma-Zellen zusätzlich deutlich verringert werden. In Kombination konnte dabei ein TEER von über $3000 \Omega\text{-cm}^2$ erzielt werden, einem Wert, der deutlich über dem TEER cerebraler pialer Kapillaren *in vivo* ($1000\text{-}2000 \Omega\text{-cm}^2$) liegt und in BHS-Zellkultursystemen bisher nicht einmal annähernd erreicht wurde. Der Vergleich des im Rahmen dieser Arbeit etablierten *in vitro*-BHS-Modells mit gut etablierten und charakterisierten BHS-Modellen bestätigten eindeutig dessen hohe Qualität und herausragende Eigenschaften.

Im Rahmen eines indirekt-Kontakt-Kokultursystems konnte in zahlreichen Experimenten eindeutig und reproduzierbar gezeigt werden, dass eine Kokultur von postkonfluenten bovinen oder humanen BCEC-Monolayern mit humanen Makrophagen zu einer durch deutliche Erhöhung des TEER nachweisbaren Verringerung ihrer Permeabilität führte. Die bei den BCEC durch die Makrophagen induzierte TEER-Erhöhung war mit der durch die Kokultur mit C6-Glioma-Zellen bewirkten vergleichbar.

Eine proinflammatorische Stimulation der Makrophagen vor Beginn der Kokultur zeigte keine eindeutige Beeinflussung ihrer Wirkung auf die mit ihnen kokultivierten BCEC-Monolayer.

Eine Infektion der Makrophagen mit zwei verschiedenen HIV-1-Isolaten zeigte trotz Vorhandenseins einer produktiven HIV-1-Infektion keine Auswirkung auf die von ihnen bewirkte TEER-Erhöhung bei den kokultivierten BCEC-Monolayer, es konnten diesbezüglich keine Unterschiede zwischen uninfizierten und infizierten Makrophagen festgestellt werden.

Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führte bei den mit Makrophagen kokultivierten BCEC-Monolayern wie bei den mit C6-Glioma-Zellen kokultivierten BCEC-Monolayern zu einer zusätzlichen Steigerung des TEER. Die Inhibition der Adenylat-Cyclase und verschiedener Protein-Kinasen (Protein-Kinasen A, C, G und MLCK) zeigte keine Auswirkung auf die von Makrophagen bewirkte TEER-Erhöhung bei den kokultivierten BCEC-Monolayern; die Aktivierung der Protein-Kinase C führte zu dem gleichen Ergebnis. Die Inhibition der Phospholipase C und der Ca²⁺-vermittelten Aktivierung des Calmodulins zeigte ebenfalls keine Auswirkung auf die durch die Makrophagen- beziehungsweise C6-Kokultur bewirkte TEER-Erhöhung bei den BCEC-Monolayern. Eine Beteiligung der untersuchten Signaltransduktionswege an dem von Makrophagen oder C6 ausgeübten Einfluss auf die BCEC erscheint somit unwahrscheinlich.

Der Befund, dass hämatogene Makrophagen in der Lage sind, bei kultivierten BCEC BHS-spezifische Eigenschaften zu induzieren und/oder aufrechtzuerhalten, ist überaus bemerkenswert, da diese Wirkung bislang ausnahmslos Zellen neuroektodermalen Ursprungs (beispielsweise Astrocyten) sowie glialen Zelllinien zugeschrieben wurde. Hämatogene Makrophagen oder davon abgeleitete Zellen des Hirnparenchyms könnten damit ein Teil der Mikroumgebung sein, die *in vivo* die charakteristischen Eigenschaften von Hirnendothelzellen modulieren, beispielsweise in Form der perivaskulären Mikrogliazellen, die in engem Kontakt mit den cerebralen Blutgefäßen stehen und höchstwahrscheinlich durch aus dem Blutstrom in das Gehirn einwandernde Monocyten/Makrophagen kontinuierlich ersetzt werden.

Das *in vitro*-BHS-Zellkulturmodell wurde weiterhin für pharmakologische Studien eingesetzt, um den Einfluss von Nanopartikeln, die als potentielle *brain targeting*-Trägersysteme für

Arzneistoffe diskutiert werden, auf die Barriere-Eigenschaften postkonfluenter cerebraler Endothelzellen zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe verschiedener Nanopartikel-Präparationen zu postkonfluenten BCEC-Monolayern zu einer deutlichen und konzentrationsabhängigen Erhöhung deren Permeabilität für Elektrolyte und makromolekulare Substanzen führte.

7 BIBLIOGRAFIE

- Achim, C.L. und Wiley, C.A. (1996): "Inflammation in AIDS and the role of the macrophage in brain pathology". *Curr. Opin. Neurol.* **9**, 221-225.
- Adamson, D.C., Wildemann, B., Sasaki, M., Glass, J.D., McArthur, J.C., Christov, V.I., Dawson, T.M. und Dawson, V.L. (1996): "Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41". *Science*. **274**, 1917-1921.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M. und Berger, E.A. (1996): "CC-CKR-5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1". *Science*. **272**, 1955-1958.
- Allemann, E., Gurny, R. und Doelker, E. (1993): "Drug-loaded nanoparticles - preparation methods and drug targeting issues". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **39**, 173-191.
- Allison, A.C. (1978): "Macrophage activation and nonspecific immunity". *Int. Rev. Exp. Pathol.* **18**, 303-346.
- Allt, G. und Lawrenson, J.G. (1997): "Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies?" *Brain Res. Rev.* **24**, 67-76.
- Alyautdin, R., Gothier, D., Petrov, V., Kharkevitch, D. und Kreuter, J. (1995): "Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **41**, 44-48.
- Anderson, J.M. und Van Itallie, C.M. (1995): "Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability". *Am. J. Physiol.* **269**, G467-G475.
- Ando-Akatsuka, Y., Hirase, T., Kishi, M., Sakakibara, A., Itoh, M., Yonemura, S., Furuse, M. und Tsukita, S. (1996): "Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues". *J. Cell Biol.* **133**, 43-47.
- Andreesen, R., Osterholz, J., Bross, K.J., Schulz, A., Luckenbach, G.A. und Lohr, G.W. (1983a): "Cytotoxic effector cell function at different stages of human monocyte-macrophage maturation". *Cancer Res.* **43**, 5931-5936.
- Andreesen, R., Picht, J. und Löhner, G.W. (1983b): "Primary cultures of human blood-born macrophages grown on hydrophobic Teflon membranes". *J. Immunol. Methods.* **56**, 295-304.
- Annunziata, P., Cioni, C., Toneatto, S. und Paccagnini, E. (1998): "HIV-1 gp120 increases the permeability of rat brain endothelium cultures by a mechanism involving substance P". *AIDS*. **12**, 2377-2385.
- Antonelli-Oldridge, A., Saunders, K., Smith, S. und D'Amore, P. (1989): "An activated form of transforming growth factor is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes". *PNAS*. **86**, 4544-4588.
- Argyris, B.F. (1968): "Role of macrophages in immunological maturation". *J. Exp. Med.* **128**, 459-467.
- Audus, K.L. und Borchardt, R.T. (1986): "Characterization of an *in vitro* blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism". *Pharm. Res.* **3**, 81-87.
- Audus, K.L. und Borchardt, R.T. (1987): "Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for the blood-brain barrier". *Ann. NY Acad. Sci.* **507**, 9-18.
- Audus, K.L. und Borchardt, R.T. (1991): "Transport of macromolecules across the capillary endothelium". *Handbook of Experimental Pharmacology*. **100**, 43-70.
- Augustin, H., Koziar, D. und Johnson, R. (1994): "Differentiation of endothelial cell: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes". *Bio-Essays*. **16**, 901-906.
- Bagasra, O., Lavi, E., Bobroski, L., Khalili, K., Pestaner, J.P., Tawadros, R. und Pomerantz, R.J. (1996): "Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of *in situ* polymerase chain reaction and immunohistochemistry". *AIDS*. **10**, 573-585.

- Balda, M.S., Gonzales-Mariscal, L., Matter, K., Cereijido, M. und Anderson, J.M. (1993): "Assembly of tight junctions: the role of diacylglycerol". *J. Cell Biol.* **123**, 293-302.
- Balda, M.S. und Matter, K. (1998): "Tight junctions". *J. Cell Sci.* **111**, 541-547.
- Bamford, D.R. (1972): "A theoretical model for antigen processing by macrophage cells". *Cell. Immunol.* **4**, 175-178.
- Banati, R.B., Gehrmann, J., Schubert, P. und Kreutzberg, G.W. (1993): "Cytotoxicity of microglia". *Glia.* **7**, 111-118.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nueyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. und Montagnier, L. (1983): "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)". *Science.* **220**, 868-871.
- Bauer, H.C., Tontsch, U., Amberger, A. und Bauer, H. (1990): "Gamma-glutamyl-transpeptidase (GGTP) and Na⁺K⁺-ATPase activities in different subpopulations of cloned cerebral endothelial cells: responses to glial stimulation". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 358-363.
- Begley, D.J. (1996): "The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system". *J. Pharm. Pharmacol.* **48**, 136-146.
- Beneviste, E. (1992): "Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function and mechanism of action". *Am. J. Physiol.* **263**, C1-16.
- Benos, D.J., Hahn, B.H., Bubien, J.K., Ghosh, S.K., Mashburn, N.A., Chaikin, M.A., Shaw, G.M. und Benveniste, E.N. (1994): "Envelope glycoprotein gp120 of human immunodeficiency virus type 1 alters ion transport in astrocytes: implications for AIDS dementia complex". *PNAS.* **94**, 494-498.
- Berger, J.R. und Nath, A. (1997): "HIV dementia and the basal ganglia". *Intervirolgy.* **40**, 122-131.
- Berger, J.R., Nath, A., Greenberg, R.N., Andersen, A.H., Greene, R.A., Bogner, A. und Avison, M.J. (2000): "Cerebrovascular changes in the basal ganglia with HIV dementia". *Neurology.* **54**, 921-926.
- Beuckmann, C., Hellwig, S. und Galla, H.-J. (1995): "Induction of the blood-brain barrier associated enzyme alkaline phosphatase in endothelial cells from cerebral capillaries is mediated via cAMP". *Eur. J. Biochem.* **229**, 641-644.
- Bevilacqua, M.P. (1993): "Endothelial-leukocyte adhesion molecules". *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 767-804.
- Biegel, D., Spencer, D.D. und Pachter, J.S. (1995): "Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties *in vitro*". *Brain Res.* **692**, 183-189.
- Birmingham, J.R., Chesnut, R.W., Kappler, J.W., Marrack, P., Kubo, R. und Grey, H.M. (1982): "Antigen presentation to T cell hybridomas by a macrophage cell line: an inducible function". *J. Immunol.* **128**, 1491-1492.
- Bleasdale, J.E., Thakur, N.R., Gremban, R.S., Bundy, G.L., Fitzpatrick, F.A., Smith, R.J. und Bunting, S. (1990): "Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 756-768.
- Blum, M.S., Toninelli, E., Anderson, J.M., Balda, M.S., Zhou, J., O'Donnell, L., Pardi, R. und Bender, J.R. (1997): "Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines". *Am. J. Physiol.* **273**, H286-H294.
- Boado, R.J. und Pardridge, W.M. (1990): "Molecular cloning of the bovine blood-brain barrier glucose transporter cDNA and demonstration of phylogenetic conservation of the 5'-untranslated region". *Mol. Cell. Neurosci.* **1**, 224-232.
- Boado, R.J. und Pardridge, W.M. (1994): "Differential expression of α -actin mRNA and immunoreactive protein in brain microvascular pericytes and smooth muscle cells". *J. Neurosci. Res.* **39**, 430-435.
- Borges, N., Shi, F., Azevedo, I. und Audus, K.L. (1994): "Changes in brain microvessel endothelial cell monolayer permeability induced by adrenergic drugs". *Eur. J. Pharmacol.* **269**, 243-248.

- Boven, L.A., Middel, J., Breij, E.C., Schotte, D., Verhoef, J., Soderland, C. und Nottet, H.S. (2000): "Interactions between HIV-infected monocyte-derived macrophages and human brain microvascular endothelial cells result in increased expression of CC chemokines". *J. Neurovir.* **6**, 382-389.
- Bowman, P.D., Ennis, S.R., Rarey, K.E., Betz, A.L. und Goldstein, G.W. (1983): "Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability". *Annal. Neurol.* **14**, 296-402.
- Brenneman, D.E., Westbrook, G.L., Fitzgerald, S.P., Ennist, D.L., Elkins, K.L., Ruff, M.R. und Pert, C.B. (1988): "Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide". *Nature.* **335**, 639-642.
- Brew, B.B., Rosenblum, M., Cronin, K. und Price, R.W. (1995): "AIDS dementia complex and HIV-1 brain infection: Clinical-virological correlations". *Annal. Neurol.* **38**, 563-570.
- Brightman, M.W. und Reese, T.J. (1969): "Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain". *J. Cell Biol.* **40**, 648-677.
- Brosnan, C.F., Claudio, L. und Martiney, J.A. (1992): "The blood-brain barrier during immune responses". *Semin. Neurosci.* **4**, 193-200.
- Bukrinsky, M.I., Nottet, H.S., Schmidtmayerova, H., Dubrovsky, L., Flanagan, C.R., Mullins, M.E., Lipton, S.A. und Gendelmann, H.E. (1995): "Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease". *J. Exp. Med.* **181**, 735-745.
- Butcher, E. (1991): "Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity". *Cell.* **67**, 1033-1036.
- Butt, A.M., Jones, H.C. und Abbott, N.J. (1990): "Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study". *J. Physiol.* **429**, 47-62.
- Cancilla, P.A., Baker, R.N., Pollack, P.S. und Frommes, S.P. (1972): "The reaction of pericytes of the central nervous system to exogenous protein". *Lab. Invest.* **26**, 376-383.
- Cao, Y.Z., Valentine, F., Hojvat, S., Allain, J.P., Rubinstein, P., Mirabile, M., Czelusniak, S., Leuther, M., Baker, L. und Friedman-Kien, A.E. (1987): "Detection of HIV antigen and specific antibodies to HIV core and envelope proteins in sera of patients with HIV infection". *Blood.* **70**, 575-578.
- Carlos, R.M. und Harlan, J.M. (1994): "Leukocyte-endothelial adhesion molecules". *Blood.* **84**, 2068-2101.
- Carson, M. und Sutcliffe, J. (1999): "Balancing function vs. self defensive: the CNS as an active regulator of immune responses". *J. Neurosci. Res.* **55**, 1-8.
- Caspers, M.L. und Diglio, A. (1984): "Expression of gamma-glutamyl transpeptidase in a transformed rat cerebral endothelial cell line". *Biochim. Biophys. Acta.* **803**, 1-6.
- Cassella, J.P., Lawrenson, J.G. und Firth, J.A. (1997): "Development of endothelial paracellular clefts and their tight junctions in the pial microvessels of the rat". *J. Neurocytol.* **26**, 567-575.
- CDC (1985): "(Centers for Disease Control) Revision of the case definition of acquired immunodeficiency syndrome for national reporting". *M.M.W.R.* **34**, 373-375.
- Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buee-Scherrer, V., Duhem, C., Lundquist, S., Rentfel, M., Torpier, G. und Dehouck, M.-P. (1999): "*In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier". *Adv. Drug Delivery Rev.* **36**, 165-178.
- Chabot, S., Williams, G. und Yong, V.W. (1997): "Microglial production of TNF-alpha is induced by activated lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferon-beta1b". *J. Clin. Invest.* **100**, 604-612.
- Chang, C., Wang, X. und Caldwell, R.B. (1997): "Serum opens tight junctions and reduces ZO-1 protein in retinal epithelial cells". *J. Neurochem.* **69**, 859-867.
- Chiodi, F., Asjo, B., Fenyo, E.M., Norkrans, G., Hagberg, L. und Albert, J. (1986): "Isolation of human immunodeficiency virus from cerebrospinal fluid of antibody-positive virus carrier without neurological symptoms". *Lancet.* **2**, 1276-1277.

- Chiodi, F. und Fenyo, E.M. (1991): "Neurotropism of human immunodeficiency virus". *Brain Pathol.* **1**, 185-191.
- Citi, S. (1992): "Protein kinase inhibitors prevent dissociation induced by low extracellular calcium in MDCK epithelial cells". *J. Cell Biol.* **117**, 169-178.
- Cohen, Z., Molinatti, G. und Hamel, E. (1997): "Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex". *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **17**, 894-904.
- Conyers, G., Milks, L., Conklyn, M., Showell, H. und Cramer, E. (1990): "A factor in serum lowers resistance and opens tight junctions of MDCK cells". *Am. J. Physiol.* **259**, C577-585.
- Cooper, J.A. (1987): "Effects of cytochalasin and phalloidin on actin". *J. Cell Biol.* **105**, 1473-1478.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. und Bertino, J.R. (1989): "Multi-drug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites". *PNAS.* **86**, 695-698.
- Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P. und Speiser, P. (1979): "Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties". *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 331-332.
- Crone, C. (1963): "The permeability of capillaries in various organs as determined by use of the "indicator diffusion" method". *Acta Physiol. Scand.* **58**, 292-305.
- Crone, C. und Olsen, S.-P. (1982): "Electrical resistance of brain microvascular endothelium". *Brain Res.* **241**, 49-55.
- Dallasta, L.M., Pizarov, L.A., Esplen, J.E., Werley, J.V., Moses, A.V., Nelson, J.A. und Achim, C.L. (1999): "Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis". *Am. J. Pathol.* **155**, 1915-1927.
- D'Angelo Siliciano, J. und Goodenough, D.A. (1988): "Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium ion". *J. Cell Biol.* **107**, 2389-2399.
- de Boer, A.G., Gaillard, P.J. und Breimer, D.D. (1999): "The transference of results between blood-brain barrier cell culture systems". *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* **8**, 1-4.
- de Groot, C.J., Huppes, W., Sminia, T., Kraal, G. und Dijkstra, C.D. (1992): "Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive *in situ* hybridization and immunoperoxidase techniques". *Glia.* **6**, 301-309.
- de Vries, H.E., Brom-Roosemalen, M.C.M., de Boer, A.G., van Berkel, T.J.C., Breimer, D.D. und Kuiper, J. (1996): "The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier *in vitro*". *J. Neuroimmunol.* **64**, 37-43.
- DeBault, L.E. (1981): " γ -glutamyl transpeptidase induction mediated by glial foot process-to-endothelium contact in co-culture". *Brain Res.* **220**, 432-435.
- DeBault, L.E. und Cancilla, P.A. (1980): "gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells *in vitro*". *Science.* **207**, 653-655.
- DeBault, L.E., Kahn, L.E., Frommes, S.P. und Cancilla, P.A. (1979): "Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: isolation and preliminary characterization". *In Vitro.* **7**, 473-487.
- Dehouck, M.P., Dehouck, B., Schluep, C. und al., e. (1995): "Drug transport to the brain: Comparison between *in vitro* and *in vivo* models of the blood-brain barrier". *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* **3**, 357-365.
- Dehouck, M.P., Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C. und Cecchelli, R. (1990): "An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*". *J. Neurochem.* **54**, 1798-1801.
- Deli, M.A., Dehouck, M.P., Abraham, C.S., Cecchelli, R. und Joó, F. (1995): "Penetration of small molecular weight substances through cultured bovine brain capillary endothelial cell monolayers: the early effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate". *Exp. Physiol.* **80**, 675-678.

- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. und Landau, N.R. (1996): "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1". *Nature*. **381**, 661-666.
- Denker, B.M. und Nigam, S.K. (1998): "Molecular structure and assembly of the tight junction". *Am. J. Physiol.* **274**, F1-F9.
- Dhawan, S., Weeks, B.S., Soderland, C., Schnaper, H.W., Toro, L.A., Asthana, S.P., Hewlett, I.K., Stetler-Stevenson, W.G., Yamada, S.S., Yamada, K.M. und al., e. (1995): "HIV-1 infection alters monocyte interactions within human microvascular endothelial cells". *J. Immunol.* **154**, 422-432.
- Diglio, C.A., Wolfe, D.E. und Meyers, P. (1983): "Transformation of rat cerebral endothelial cells by Rous sarcoma virus". *J. Cell Biol.* **97**, 15-21.
- Dixon, D. und Atwood, H.L. (1989): "Adenylate cyclase system is essential for long-term facilitation at the crayfish neuromuscular junction". *J. Neurosci.* **9**, 4246-4252.
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G. und Doms, R.W. (1996): "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors". *Cell*. **85**, 1149-1158.
- Dore-Duffy, P., Balabanov, R., Washington, R. und Swanborg, R. (1994a): "Transforming growth factor- β 1 inhibits cytokine-induced CNS endothelial cell activation". *Molecular and Chemical Neuropathology*. **22**, 161-167.
- Dore-Duffy, P., Washington, R. und Balabanov, R. (1994b): "Cytokine-mediated activation of CNS microvessels: A system for examining antigenic modulation of CNS endothelial cells, and evidence for long-term expression of the adhesion protein E-selectin". *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**, 837-844.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P. und Paxton, W.A. (1996): "HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5". *Nature*. **381**, 667-673.
- Dreyer, E.B., Kaiser, P.K., Offermann, J.T. und Lipton, S.A. (1990): "HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists". *Science*. **248**, 364-367.
- Durieu-Trautmann, O., Foignant-Chaverot, N., Perdomo, J., Gounon, P., Strosberg, A.D. und Couraud, O. (1991): "Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium". *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **27A**, 771-778.
- Endres, M.J., Clapham, P.R., Marsh, M., Ahuja, M., Turner, J.D., McKnight, A., Thomas, J.F., Stobenau-Haggarty, B., Choe, S., Vance, P.J., Wells, T.N., Power, C.A., Sutterwala, S.S., Doms, R.W., Landau, N.R. und Hoxie, J.A. (1996): "CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4". *Cell*. **87**, 745-756.
- Fabry, Z., Fitzsimmons, K.M., Herlein, J.A., Moninger, T.O., Dobbs, M.B. und Hart, M.N. (1993): "Production of the cytokines interleukin-1 and -6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes". *J. Neuroimmunol.* **47**, 23-34.
- Fabry, Z., Waldschmidt, M.M., Hendrickson, D., Keiner, J., Love-Homan, L., Takei, F. und M.N., H. (1992): "Adhesion molecules on murine brain microvascular endothelial cells: expression and regulation of ICAM-1 and Lgp 55". *J. Neuroimmunol.* **36**, 1-11.
- Falangola, M.F., Hanly, A., Galvao-Castro, B. und Petito, C.K. (1995): "HIV infection of human choroid plexus: a possible mechanism of viral entry into the CNS". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**, 499-503.
- Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A. und Anderson, M. (1998): "The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton". *J. Biol. Chem.* **273**, 29745-29753.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B. und Barsoum, J. (1994): "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells". *PNAS*. **91**, 664-668.
- Fedoroff, S., Zhai, R. und Novak, J.P. (1997): "Microglia and astroglia have a common progenitor cell". *J. Neurosci. Res.* **50**, 477-486.

- Franke, H., Galla, H.-J. und Beuckmann, C.T. (1999): "An improved low-permeability *in vitro*-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol". *Brain Res.* **818**, 65-71.
- Friden, P.M. (1996): "Utilization of an endogenous cellular transport system for the delivery of therapeutics across the blood-brain barrier". *Journal of Controlled Release.* **46**, 117-128.
- Fukuta, M., Okada, H., Iinuma, S., Yanai, S. und Toguchi, H. (1994): "Insulin fragments as a carrier for peptide delivery across the blood-brain barrier". *Pharm. Res.* **11**, 1681-1688.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. und Tsukita, S. (1993): "Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions". *J. Cell Biol.* **123**, 1777-1788.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S. und Tsukita, S. (1994): "Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions". *J. Cell Biol.* **127**, 1617-1626.
- Gallo, P., Frei, K., Rordorf, C., Lazdins, J., Tavolato, B. und Fontana, A. (1989): "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of the central nervous system: an elevation of cytokines in cerebrospinal fluid". *J. Neuroimmunol.* **23**, 109-116.
- Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D.M., Kaplan, M.H., Gallo, R.C. und Popovic, M. (1986): "The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection". *Science.* **233**, 215-219.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y. und Kreutzberg, G.W. (1995): "Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain". *Brain Res. Brain Res. Rev.* **20**, 269-287.
- Gelman, B.B., Rodriguez-Wolf, M.G., Wen, J., Kumar, S., Campbell, G.R. und Herzog, N. (1992): "Siderotic cerebral macrophages in the acquired immunodeficiency syndrome". *Arch. Pathol. Lab. Med.* **116**, 509-516.
- Genis, P., Jett, M., Berton, E.W., Gelbard, H.A., Dzenko, K., Keane, R., Resnick, L., Volsky, D.J., Epstein, L.G. und Gendelman, H.E. (1992): "Cytokines and arachidonic acid metabolites produced during HIV-1 infected macrophage-astroglial interactions: implications for the neuropathogenesis of HIV disease". *J. Exp. Med.* **176**, 1703-1718.
- Gillies, M. und Su, T. (1995): "Interferon- α 2b enhances barrier function of bovine retinal microvascular endothelium *in vitro*". *Microvasc. Res.* **49**, 277-288.
- Giulian, D., Yu, J., Li, X., Tom, D., Li, J., Wendt, E., Lin, S.N., Schwarcz, R. und Noonan, C. (1996): "Study of receptor-mediated neurotoxins released by HIV-1-infected mononuclear phagocytes found in human brain". *J. Neurosci.* **16**, 3139-3153.
- Glass, J.D., Fedor, H., Wesselingh, S.L. und McArthur, J.C. (1995): "Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia". *Annal. Neurol.* **38**, 755-762.
- Golden, P.L. und Pardridge, W.M. (1999): "P-glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries". *Brain Res.* **819**, 143-146.
- Gonzales-Mariscal, L., Contreras, R.G., Bolivar, J.J., Ponce, A., Chavez de Ramirez, B. und Cerijido, M. (1990): "The role of calcium in tight junction formation between epithelial cells". *Am. J. Physiol.* **259**, C978-C986.
- Gosztonyi, G., Artigas, J., Lamperth, L. und Webster, H.F. (1994): "Human immunodeficiency virus (HIV) distribution in HIV encephalitis: study of 19 cases with combined use of *in situ* hybridization and immunocytochemistry". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **53**, 521-534.
- Gottardi, C.J., M., A., Fanning, A.S. und D., L. (1996): "The junction-associated protein ZO-1 localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts". *PNAS.* **93**, 10779-10784.
- Goudsmit, J., DeWolf, F., Paul, D.A., Epstein, L.G., Lange, J.M.A., Krone, W.J.A., Speelman, H., Wolters, E.C., van der Noordaa, J., Oleske, J.M., van der Helm, H.J. und Coutinho, R.A. (1986): "Expression of human immunodeficiency virus antigen (HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection". *Lancet.* **2**, 177-180.

- Grabb, P.A. und Gilbert, M.R. (1995): "Neoplastic and pharmacological influence on the permeability of an *in vitro* blood-brain barrier". *J. Neurosurg.* **82**, 1053-1058.
- Graeber, M.B., Streit, W.J. und Kreutzberg, G.W. (1989): "Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain". *J. Neurosci. Res.* **22**, 103-106.
- Grunfeld, C., Kotler, D.P., Shigenaga, J.K., Doerrler, W., Tierney, A., Wang, J., Pierson, R.N.J. und Feingold, K.R. (1991): "Circulating interferon-alpha levels and hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome". *American Journal of Medicine.* **90**, 154-162.
- Gumbiner, B., Stevenson, B. und Grimaldi, A. (1988): "The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex". *J. Cell Biol.* **107**, 1575-1587.
- Hagiwara, M., Inagaki, M. und Hidaka, H. (1987): "Specific binding of a novel compound, N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-8) to the active site of cAMP-dependent protein kinase". *Mol. Pharmacol.* **31**, 523-528.
- Hakvoort, A., Haselbach, M., Wegener, J., Hoheisel, D. und Galla, H.-J. (1998): "The polarity of choroid plexus epithelial cells *in vitro* is improved in serum-free medium". *J. Neurochem.* **71**, 1141-1150.
- Harris, D.N., Asaad, M.M., Phillips, M.B., Goldenberg, J. und Antonaccio, M.J. (1979): "Inhibition of adenylate cyclase in human blood platelets by 9-substituted adenine derivatives". *J. Cyclic Nucleotide Res.* **5**, 125-134.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J. und Stevenson, B.R. (1998): "ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin". *J. Cell Biol.* **141**, 199-208.
- He, J., Chen, Y., Farzan, M., Choe, H., Ohagen, A., Gartner, S., Busciglio, J., Yang, X., Hofmann, W., Newman, W., Mackay, C.R., Sodroski, J. und Gabuzda, D. (1997): "CCR-3 and CCR-5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia". *Nature.* **385**, 645-649.
- Hemmila, J.M. und Drewes, L.R. (1993): "Glucose transporter (GLUT1) expression by canine brain microvessel endothelial cells in culture: an immunocytochemical study". *Adv. Exp. Med. Biol.* **331**, 13-18.
- Herman, I.M. und D'Amore, P.A. (1985): "Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins". *J. Cell Biol.* **101**, 43-52.
- Hickey, W.F. und Kimura, H. (1988): "Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*". *Science.* **239**, 290-292.
- Hickey, W.F., Vass, K. und Lassmann, H. (1992): "Bone-marrow derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **51**, 246-256.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. und Sasaki, Y. (1984): "Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C". *Biochemistry.* **23**, 5036-5041.
- Hidaka, T., Sasaki, Y., Tanaka, T., Endo, T., Ohno, S., Fujii, Y. und Nagata, T. (1981): "N-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation". *PNAS.* **78**, 4354-4357.
- Hill, J.M., Mervis, R.F., Avidor, R., Moody, T.W. und Brenneman, D.E. (1993): "HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development in rat neonates". *Brain Res.* **603**, 222-233.
- Ho, D.D., Rota, T.R., Schooly, R.T., Kaplan, J.C., Allan, J.D., Groopman, J.E., Resnick, L., Felsenstein, D., Andrews, C.A. und Hirsch, M.S. (1985): "Isolation of HTLV-III from cerebrospinal fluid and neural tissue of patients with neurological syndromes related to the acquired immunodeficiency syndrome". *N. Engl. J. Med.* **313**, 1493-1497.
- Hofman, F.M., Dohadwala, M.M., Wright, A.D. und al., e. (1994): "Exogenous *tat* protein activates cerebral nervous system-derived endothelial cells". *J. Neuroimmunol.* **54**, 19-29.
- Hofman, F.M., Wright, A.D., Dohadwala, M.M., Wong-Staal, F. und Walker, S.M. (1993): "Exogenous *tat* protein activates human endothelial cells". *Blood.* **92**, 2774-2780.

- Hoheisel, D., Nitz, T., Franke, H., Wegener, J., Hakvoort, A., Tilling, T. und Galla, H.-J. (1998): "Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum-free cell culture system". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 312-316.
- Hurst, R.D. und Clark, J.B. (1998): "Alterations in transendothelial electrical resistance by vasoactive agonists and cyclic AMP in a blood-brain barrier model system". *Neurochem. Res.* **23**, 149-154.
- Huwylar, J., Wu, D. und Pardridge, W.M. (1996): "Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes". *PNAS.* **93**, 14164-14169.
- Huynh, H. und Dorovini-Zis, K. (1993): "Effects of interferon-gamma on primary cultures of human brain microvessel endothelial cells". *Am. J. Pathol.* **142**, 1265-1278.
- Huynh, H., Oger, J. und Dorovini-Zis, K. (1995): "Interferon- β downregulates interferon- γ -induced class II MHC molecule expression and morphological changes in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells". *J. Neuroimmunol.* **60**, 63-73.
- Hynes, R.O. (1992): "Integrins versatility, modulation and signaling in cell adhesion". *Cell.* **69**, 11-15.
- Jantzer, R.C. und Raff, M.C. (1987): "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells". *Nature.* **325**, 253-257.
- Jesaitis, L. und Goodenough, D.A. (1994): "Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologues to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein". *J. Cell Biol.* **124**, 949-962.
- Jette, L., Tetu, B. und Beliveau, R. (1993): "High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries". *Biochim. Biophys. Acta.* **1150**, 147-154.
- Johnson, M.D. und Anderson, B.D. (1999): "*In vitro* models of the blood-brain barrier to polar permeants: comparison of transmonolayer flux measurements and cell uptake kinetics using cultured cerebral capillary endothelial cells". *J. Pharm. Sci.* **88**, 620-625.
- Jones, M.V., Bell, J.E. und Nath, A. (2000): "Immunolocalization of HIV envelope gp120 in HIV encephalitis with dementia". *AIDS.* **14**, 2709-2713.
- Joo, F. (1985): "The blood-brain barrier *in vitro*: ten years of research on microvessels isolated from the brain". *Neurochem. Int.* **7**, 1-25.
- Joo, F. (1992): "The cerebral microvessels in culture, an update". *J. Neurochem.* **58**, 1-17.
- Joo, F. (1993): "The blood-brain barrier *in vitro*: The second decade". *Neurochem. Int.* **23**, 499-521.
- Kacem, K., LaCombe, P., Seylaz, J. und Bonvento, G. (1998): "Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study". *Glia.* **23**, 1-10.
- Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T. und Nishizuka, Y. (1983): "Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation". *J. Biol. Chem.* **258**, 6701-6704.
- Katano, Y. und Endoh, M. (1990): "Differential effects of RO 20-1724 and isobutylmethylxanthine on the basal force of contraction and beta-adrenoceptor-mediated response in the rat ventricular myocardium". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**, 123-129.
- Kazakoff, P.W., McGuire, T.R., Hoie, E.B., Cano, M. und Iversen, P.L. (1995): "An *in vitro* model for endothelial permeability: assessment of monolayer integrity". *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **31**, 846-852.
- Klingler, C., Kniesel, U., Bamforth, S.D., Wolburg, H., Engelhardt, B. und Risau, W. (2000): "Disruption of epithelial tight junctions is prevented by cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors". *Histochem. Cell. Biol.* **113**, 349-361.
- Kniesel, U., Risau, W. und Wolburg, H. (1996): "Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex". *Dev. Brain Res.* **96**, 229-240.
- Koenig, S., Gendelmann, H.E. und Orenstein, J.F. (1986): "Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy". *Science.* **233**, 1089-93.

- Kong, L.Y., Wilson, B.C., McMillan, M.K., Bing, G., Hudson, P.M. und Hong, J.S. (1996): "The effects of the HIV-1 envelope protein *gp120* on the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in mixed glial cell cultures". *Cell. Immunol.* **172**, 77-83.
- Kreuter, J. (1983): "Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. I. Preparation methods". *Pharm. Acta Helv.* **58**, 196.
- Kreuter, J., Alyautdin, R., Kharkevitch, D. und Ivanov, A.A. (1995): "Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles)". *Brain Res.* **674**, 171-174.
- Kreuter, J., Petrov, V.E., Kharkevitch, D. und Alyautdin, R. (1997): "Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles". *Journal of Controlled Release.* **40**, 81-87.
- Kühn, K. (1994): "Basement membrane (type IV) collagen". *Matrix Biology.* **14**, 439-445.
- Kühnel, H., v. Briesen, H., Dietrich, U., Adamski, M., Mix, D., Biesert, L., Kreutz, R., Immelmann, A., Henco, K., Meichsner, C., Andreesen, R., Gelderblom, H. und Rübsamen-Waigmann, H. (1989): "Molecular cloning of two West African HIV type 2 isolates that replicate well in macrophages: a Gambian isolate from a patient with neurologic AIDS, and a highly divergent Ghanian isolate". *PNAS.* **86**, 2383-2387.
- Kure, K., Lyman, W.D., Weidenheim, K.M. und Dickson, D.W. (1990): "Cellular localization of an HIV-1 antigen in subacute AIDS encephalitis using an improved double-labeling immunohistochemical method". *Am. J. Pathol.* **136**, 1085-1092.
- Lahdevirta, J., Maury, C.P.J., Teppo, A.M. und Repo, H. (1988): "Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome". *American Journal of Medicine.* **85**, 289-291.
- Lasbennes, R. und Gayet, J. (1984): "Capacity for energy metabolism in microvessels isolated from rat brain". *Neurochem. Res.* **9**, 1-10.
- Lasser, A. (1983): "The mononuclear phagocytic system: a review". *Hum. Pathol.* **14**, 108-126.
- Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K. und Hickey, W.F. (1993): "Bone-marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation". *Glia.* **7**, 19-24.
- Laurenza, A., Sutkowski, E.M. und Seamon, K.B. (1989): "Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action?" *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 442-447.
- Lavi, E., Stritzki, J.M., Ulrich, A.M., Zhang, W., Fu, L., Wang, O., O'Connor, M., Hoxie, J.A. und Gonzales-Scarano (1997): "CXCR-4 (Fusin), a co-receptor for the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), is expressed in the human brain in a variety of cell types including microglia and neurons". *Am. J. Pathol.* **151**, 1035-1042.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P. und Gordon, S. (1990): "Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain". *Neurosci.* **39**, 151-170.
- Lawson, L.J., Perry, V.H. und Gordon, S. (1992): "Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain". *Neurosci.* **48**, 405-415.
- Lenhardt, T.M. und Wiley, C.A. (1989): "Absence of humorally mediated damage within the central nervous system of AIDS patients". *Neurology.* **39**, 278-280.
- Levi, G., Patrizio, M., Bernardo, A., Petrucci, T.C. und Agresti, C. (1993): "Human immunodeficiency virus coat protein gp120 inhibits the β -adrenergic regulation of astroglial and microglial functions". *PNAS.* **90**, 1541-1545.
- Levin, V.A. (1980): "Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability". *J. Med. Chem.* **23**, 682-684.
- Levy, J.A., Hoffmann, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M. und Oshiro, L.S. (1984): "Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS". *Science.* **225**, 840-842.
- Levy, J.H. (1996): "The human inflammatory response". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **27 Suppl. 1**, S31-37.
- Ley, K. (1995): "Gene-targeted mice in leukocyte adhesion research". *Microcirculation.* **2**, 141-150.

- Ling, E.A. und Wong, W.C. (1993): "The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts". *Glia*. **7**, 9-18.
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F.J., Reaves, T.A., Walsh, S., Pochet, M. und Parkos, C.A. (2000): "Human junctional adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia". *J. Cell Sci.* **113**, 2363-2374.
- Madara, J.L. (1998): "Regulation of the movement of solutes across tight junctions". *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 143-159.
- Magnuson, D.S.K., Knudsen, B.E., Geiger, J.D., Brownstone, R.M. und Nath, A. (1995): "Human immunodeficiency virus type 1 *tat* activates non-N-methyl-D-aspartate excitatory amino acid receptors and causes neurotoxicity". *Annal. Neurol.* **37**, 373-380.
- Male, D., Pryce, G., Hughes, C. und Lantos, P. (1990): "Lymphocyte migration into brain *in vitro*: control by lymphocyte activation, cytokines and antigen". *Cell. Immunol.* **127**, 1-11.
- Mankowski, J.L., Spelman, J.P., Ressetar, H.G., Strandberg, J.D., Larterra, J., Carter, D.L., Clements, J.E. und Zink, M.C. (1994): "Neurovirulent simian immunodeficiency virus replicates productively in endothelial cells of the central nervous system *in vivo* and *in vitro*". *J. Virol.* **68**, 8202-8208.
- Mark, K.S. und Miller, D.W. (1999): "Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure". *Life Sci.* **64**, 1941-1953.
- Marmorstein, A.D., Mortell, K.H., Ratcliffe, D.R. und Cramer, E.B. (1992): "Epithelial permeability factor: a serum protein that condenses actin and opens tight junctions". *Am. J. Physiol.* **262**, C1403-1410.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. und Dejana, E. (1998): "Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration". *J. Cell Biol.* **142**, 117-127.
- McArthur, J.C., Nance-Sproson, T.E., Griffin, D.E., Hoover, D., Selnes, O.A., Miller, E.N., Margolick, J.B., Cohen, B.A., Farzadegan, H. und Saah, A. (1992): "The diagnostic utility of elevation in cerebrospinal fluid beta 2-microglobulin in HIV-1 dementia. Multicenter AIDS Cohort Study". *Neurology.* **42**, 1707-1712.
- McCarron, R., Wang, L., Racke, M.K., McFarlin, D.E. und Spatz, M. (1993): "Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T-lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells". *J. Neuroimmunol.* **434**, 23-30.
- Meyer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K. und Galla, H.J. (1990): "Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells". *Brain Res.* **514**, 305-309.
- Meyer, J., Rauh, J. und Galla, H.-J. (1991): "The susceptibility of cerebral endothelial cells to astroglial induction of blood-brain barrier enzymes depends on their proliferative state". *J. Neurochem.* **57**, 1971-1977.
- Miller, D.W., Audus, K.L. und Borchardt, R.T. (1992): "Application of cultured endothelial cells of the brain microvasculature in the study of the blood-brain barrier". *J. Tiss. Cult. Meth.* **14**, 217-224.
- Milton, S.G. und Knutson, V.P. (1990): "Comparison of the function of the tight junctions of endothelial cells and epithelial cells in regulating the movement of electrolytes and macromolecules across the cell monolayer". *J. Cell. Physiol.* **144**, 498-504.
- Mintz, M., Rapaport, R., Oleske, J.M., Connor, E.M., Koenigsberger, M.R., Denny, T. und Epstein, L.G. (1989): "Elevated serum levels of tumor necrosis factor are associated with progressive encephalopathy in children with acquired immunodeficiency syndrome". *American Journal of Diseases of Children.* **143**, 771-774.
- Mitic, L.L. und Anderson, J.M. (1998): "Molecular architecture of tight junctions". *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 121-142.
- Mori, T., Takai, Y., Yu, B., Takahashi, J., Nishizuka, Y. und Fujikura, T. (1982): "Specificity of the fatty acyl moieties of diacylglycerol for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase". *J. Biochem.* **91**, 427-431.

- Mortell, K.H., Marmorstein, A.D. und Cramer, E.B. (1993): "Fetal bovine serum and other sera used in tissue culture increase epithelial permeability". *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29A**, 235-238.
- Moses, A.V., Bloom, F.E., Pauza, C.D. und Nelson, J.A. (1993): "Human immunodeficiency virus infection of human brain capillary endothelial cells occurs via a CD4/galactosylceramide-independent mechanism". *PNAS.* **90**, 10474-10478.
- Murray, H.W. und Nathan, C.F. (1999): "Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*". *J. Exp. Med.* **189**, 741-746.
- Muruganandam, A., Herx, L.M., Monette, R., Durkin, J.P. und Stanimirovic, D.B. (1997): "Development of immortalized human cerebrovascular endothelial cell line as an *in vitro* model of the human blood-brain barrier". *FASEB J.* **11**, 1187-1197.
- Navia, B.A., Cho, E.-S., Petito, C.K. und Price, R.W. (1986): "The AIDS dementia complex: II. Neuropathology". *Annal. Neurol.* **19**, 525-535.
- Neuhaus, J., Risau, W. und Wolburg, H. (1991): "Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture". *Ann. NY Acad. Sci.* **633**, 578-580.
- Nicholson, J.K.A., Cross, G.D., Callaway, C.S. und McDougal, J.S. (1986): "*In vitro* infection of human monocytes with HTLV-III/LAV". *J. Immunol.* **137**, 323-329.
- Nottet, H.S.L.M. (1999): "Interactions between macrophages and brain microvascular endothelial cells: role in pathogenesis of HIV-1 infection and blood-brain barrier function". *J. Neurovir.* **5**, 659-669.
- Nottet, H.S.L.M., Bär, D.R., van Hassel, H., Verhoef, J. und Boven, L.A. (1997): "Cellular aspects of HIV-1 infection of macrophages leading to neuronal dysfunction in *in vitro* models for HIV-1 encephalitis". *J. Leukoc. Biol.* **62**, 107-116.
- Nottet, H.S.L.M. und Gendelman, H.E. (1995): "Unraveling the neuroimmune mechanisms for the HIV-1-associated cognitive/motor complex". *Immunol. Today.* **16**, 441-448.
- Nottet, H.S.L.M., Persidsky, Y., Sasseville, V.G., Nukuna, A.N., Bock, P., Zhai, Q.-H., Sharer, L.R., McComb, R.D., Swindells, S., Soderland, C. und Gendelman, H.E. (1996): "Mechanisms for the transendothelial migration of HIV-1-infected monocytes into brain". *J. Immunol.* **156**, 1284-1295.
- Ohno, K., Pettigrew, K.D. und Rapoport, S.I. (1978): "Lower limits of cerebrovascular permeability to non-electrolytes in the conscious rat". *Am. J. Physiol.* **235**, H299-H307.
- Olivier, J.-C., Fenart, L., Chauvet, R., Pariat, C., Cecchelli, R. und Couet, W. (1999): "Indirect evidence that drug brain targeting using Polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity". *Pharm. Res.* **16**, 1836-1842.
- Pardridge, W.M. (1995): "Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology". *Adv. Drug Delivery Rev.* **15**, 5-36.
- Pardridge, W.M. (1999): "Blood-brain barrier biology and methodology". *J. Neurovir.* **5**, 556-569.
- Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M. und Ventura, P. (1985): "A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes". *Virology.* **147**, 231-236.
- Perno, C.F., Yarchoan, R., Coonay, D.A., Hartman, N.R., Webbs, D.S., Hao, Z., Mitsuya, H., Johns, D.G. und Broder, S. (1989): "Replication of HIV in monocytes". *J. Exp. Med.* **169**, 933-939.
- Perry, V.H. und Gordon, S. (1987): "Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain". *J. Exp. Med.* **166**, 1138-1143.
- Persidsky, Y. und Gendelman, H.E. (1997a): "Development of laboratory and animal model systems for HIV-1 encephalitis and its associated dementia". *J. Leukoc. Biol.* **62**, 100-106.
- Persidsky, Y., Stins, M., Way, D., Witte, M.H., Weinand, M., Kim, K.S., Bock, P., Gendelman, H.E. und Fiala, M. (1997b): "A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis". *J. Immunol.* **158**, 3499-3510.

- Petito, C.K. und Cash, K.S. (1992): "Blood-brain barrier abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome: immunohistochemical localization of serum proteins in post mortem brains". *Annal. Neurol.* **32**, 658-666.
- Petito, C.K., Cho, E.-S., Lemann, W., Navia, B.A. und Price, R.W. (1986): "Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): an autopsy review". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **45**, 635-646.
- Petito, C.K. und Roberts, B.K. (1995): "Evidence for apoptotic cell death in HIV encephalitis". *Am. J. Pathol.* **146**, 1-10.
- Peudener, S., Hery, C., Montagnier, L. und Tardieu, M. (1991): "Human microglial cells: characterization in cerebral tissue and in primary culture, and study of their susceptibility to HIV-1 infection". *Annal. Neurol.* **29**, 152-161.
- Pitts, O.M., Powers, J.M., Bilello, J.A. und Hoffmann, P.M. (1987): "Ultrastructural changes associated with retroviral replication in central nervous system capillary endothelial cells". *Lab. Invest.* **56**, 401-409.
- Pluta, R., Lossinsky, A.S., Wisniewskie, H.M. und Mossakowski, M.J. (1994): "Early blood-brain barrier changes in the rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest". *Brain Res.* **663**, 41-52.
- Pober, J. und Cortan, R. (1990): "Cytokines and endothelial cell biology". *Physiol. Rev.* **70**, 427-451.
- Pober, R. (1988): "Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Physiology and pathology". *Am. J. Pathol.* **133**, 426-432.
- Poland, S.D., Rice, G.P.A. und Dekaban, G.A. (1995): "HIV-1 infection of human brain-derived microvascular endothelial cells *in vitro*". *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **8**, 437-445.
- Polazzi, E., Levi, G. und Minghetti, L. (1999): "Human immunodeficiency virus type 1 *tat* protein stimulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in microglial cultures". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 825-831.
- Power, C., Kong, P.A., Crawford, T.O., Wesselingh, S., Glass, J.D., McArthur, J.C. und Trapp, B.D. (1993): "Cerebral white matter changes in acquired immunodeficiency syndrome dementia: Alterations of the blood-brain barrier". *Annal. Neurol.* **34**, 339-350.
- Price, R.W., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A.C. und Cleary, P. (1988): "The brain in AIDS: Central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex". *Science.* **239**, 586-592.
- Pulliam, L., Gascon, R., Stubblebine, M., McGuire, D. und McGrath, M.S. (1997): "Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia". *Lancet.* **349**, 692-695.
- Pulliam, L., West, D., Haigwood, N. und Swanson, R.A. (1993): "HIV-1 envelope *gp120* alters astrocytes in human brain cultures". *AIDS Res. Human Retroviruses.* **9**, 439-444.
- Qin, Y. und Sato, T.N. (1995): "Mouse multidrug resistance 1a/3 gene is the earliest known endothelial cell differentiation marker during blood-brain barrier development". *Developmental Dynamics.* **202**, 172-180.
- Quagliarello, V.J., Wispelwey, B., Long, W.J. und Scheid, W.M. (1991): "Recombinant human interleukin-1 induced meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor". *J. Clin. Invest.* **87**, 1360-1366.
- Ramge, P., Unger, R.E., Oltrogge, J.B., Zenker, D., Begley, D., Kreuter, J. und v. Briesen, H. (2000): "Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells". *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1931-1940.
- Ranki, A., Nyberg, M., Ovod, V., Haltia, M., Elovaara, I., Raininko, R., Haapasalo, H. und Krohn, K. (1995): "Abundant expression of HIV *nef* and *rev* proteins in brain astrocytes *in vivo* is associated with dementia". *AIDS.* **9**, 1001-1008.
- Raub, T.J. (1996): "Signal transduction and glial cell modulation of cultured brain microvessel endothelial cell tight junctions". *Am. J. Physiol.* **271**, C495-C503.

- Raub, T.J. und Audus, K.L. (1990): "Adsorptive endocytosis and membrane recycling by cultured primary bovine brain microvessel endothelial cells". *J. Cell Sci.* **97**, 127-138.
- Raub, T.J., Kuentzel, S.L. und Sawada, G.A. (1992): "Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells *in vitro*: barrier tightening by a factor released from astroglia cells". *Exp. Cell Res.* **199**, 330-340.
- Rauh, J., Meyer, J., Beuckmann, C. und Galla, H.-J. (1992): "Development of an *in vitro* cell culture system to mimic the blood-brain barrier". *Prog. Brain Res.* **91**, 117-121.
- Reardon, P.M. und Audus, K.L. (1993): "Applications of primary cultures of brain microvessel endothelial cell monolayers in the study of vasoactive peptide interaction with the blood-brain barrier". *S.t.p. Pharma Sciences.* **3**, 63-68.
- Reese, T.J. und Karnovsky, M.J. (1967): "Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase". *J. Cell Biol.* **34**, 207-217.
- Reeves, M.L., Leigh, B.K. und England, P.J. (1987): "The identification of a new cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in human and guinea-pig cardiac ventricle. Implications for the mechanism of action of selective phosphodiesterase inhibitors". *Biochem J.* **241**, 535-541.
- Renno, T., Krakowski, M., Piccirillo, C., Lin, J.Y. und Owens, T. (1995): "TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines". *J. Immunol.* **154**, 944-953.
- Richardson, A., Hao, C. und Fedoroff, S. (1993): "Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia". *Glia.* **7**, 25-33.
- Rist, R.J., Romero, I.A. und Chan, M.W.K. (1997): "F-actin cytoskeleton and sucrose permeability of immortalised rat brain microvascular endothelial cell monolayers: effects of cyclic AMP and astrocytic factors". *Brain Res.* **768**, 10-18.
- Robinson, R.A., TenEyck, C.J. und Hart, M.N. (1986): "Establishment and preliminary growth characteristics of a transformed mouse cerebral microvessel endothelial cell line". *Lab. Invest.* **54**, 579-588.
- Roux, F., Durieu-Trautmann, O., Chaverot, N., Claire, M., Mailly, P., Bourre, J.M., Strosberg, A.D. und Couraud, P.O. (1994): "Regulation of gamma-glutamyl-transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells". *Journal of Cell Physiology.* **159**, 101-113.
- Rubin, L.L., Hall, D.E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H.C., Janatpour, M., Liaw, C.W., Manning, K., Morales, J., Tanner, L.I., Tomaselli, K.J. und Bard, F. (1991): "A cell culture model of the blood-brain barrier". *J. Cell Biol.* **115**, 1725-1735.
- Rubin, L.L. und Staddon, J.M. (1999): "The cell biology of the blood-brain barrier". *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 11-28.
- Ruoslathi, E. und Reed, J.C. (1994): "Anchorage dependence, integrins, and apoptosis". *Cell.* **77**, 477-478.
- Sabatier, J.M., Vives, E., Mabrouk, K., Benjouad, A., Rochat, H., Duval, A., Hue, B. und Bahraoui, E. (1991): "Evidence for neurotoxic activity of *tat* from human immunodeficiency virus type 1". *J. Virol.* **65**, 961-967.
- Saija, A., Princi, P., Lanza, M., Scalese, M., Aramnejad, E. und De Sarro, A. (1995): "Systemic cytokine administration can affect blood-brain barrier permeability in the rat". *Life Sci.* **56**, 775-784.
- Saito, Y., Buciak, J., Yang, J. und Pardridge, W.M. (1995): "Vector-mediated delivery of ¹²⁵I-labeled beta-amyloid peptide A-beta-40 through the blood-brain barrier and binding to Alzheimer disease amyloid of the A-beta-40/vector complex". *PNAS.* **92**, 10227-10231.
- Sanders, V.J., Pittman, C.A., White, M.G., Wang, G., Wiley, C.A. und Achim, C.L. (1998): "Chemokines and receptors in HIV encephalitis". *AIDS.* **12**, 1021-1026.

- Sasseville, V.G., Newman, W., Brodie, S.J., Hesterberg, P., Pauley, D. und Ringler, D.J. (1994): "Monocyte adhesion to endothelium in simian immunodeficiency virus-induced AIDS encephalitis is mediated by vascular cell adhesion molecule-1/ α 4 β 1 integrin interactions". *Am. J. Pathol.* **144**, 27-40.
- Saukkonen, K., Sande, S., Wolpe, S., Sherry, B., Cerami, A. und Tuomanen, E. (1990): "The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis". *J. Exp. Med.* **171**, 439-448.
- Saunders, N.R., Dziegielewska, K.M. und Mollgard, K. (1991): "The importance of the blood-brain barrier in fetuses and embryos". *Trends Neurosci.* **14**, 14-15.
- Schmidtmayerova, H., Nottet, H.S., Nuovo, G., Raabe, T., Flanagan, C.R., Dubrovsky, L., Gendelman, H.E., Cerami, A., Bukrinsky, M. und Sherry, B. (1996): "Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta peptide expression in human monocytes: implications for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes". *PNAS.* **93**, 700-704.
- Seamon, K.B. und Daly, J.W. (1986): "Forskolin: its biological and chemical properties". *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **20**, 1-150.
- Sharer, L.R. (1992): "Pathology of HIV-1 infection of the central nervous system". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **51**, 3-11.
- Sheppard, H., Wiggan, G. und Tsien, W.H. (1972): "Structure-activity relationships for inhibitors of phosphodiesterase from erythrocytes and other tissues". *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **1**, 103-112.
- Shi, B., De Girolami, U., He, J., Wang, S., Lorenzo, A., Busciglio, J. und Gabuzda, D. (1996): "Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system". *J. Clin. Invest.* **98**, 1979-1990.
- Shi, W.X. und Bunney, B.S. (1992): "Roles of intracellular cAMP and protein kinase A in the actions of dopamine and neurotensin on midbrain dopamine neurons". *J. Neurosci.* **12**, 2433-2438.
- Silfinger-Birnboim, A., DelVecchio, P.J., Cooper, J.A., Blumenstock, F.A., Shepard, J.M. und Malik, A.B. (1987): "Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer". *J. Cell. Physiol.* **132**, 111-117.
- Sill, H.W., Butler, C., Hollis, T.M. und al., e. (1992): "Albumin permeability and electrical resistance as means of assessing endothelial monolayer integrity *in vitro*". *J. Tiss. Cult. Meth.* **14**, 253-258.
- Singer, E.J., Syndulko, K., Fahy-Chandon, B., Schmid, P., Conrad, A. und Tourtellotte, W.W. (1994): "Intrathecal IgG synthesis and albumin leakage are increased in subjects with HIV-1 neurologic disease". *J. Acquir. Imm. Defic. Synd.* **7**, 265-271.
- Smith, Q.R. und Rapoport, S.I. (1986): "Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium and chloride". *J. Neurochem.* **46**, 1732-1742.
- Smith, R.J., Sam, L.M., Justen, J.M., Bundy, G.L., Bala, G.A. und Bleasdale, J.E. (1990a): "Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 688-697.
- Smith, T.W., DeGirolami, U., Hénin, D., Bolgert, F. und Hauw, J.J. (1990b): "Human immunodeficiency virus (HIV) leukoencephalopathy and the microcirculation". *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **49**, 357-370.
- Smits, H.A., Boven, L.A., Pereira, C.F., Verhoef, J. und Nottet, H.S. (2000): "Role of macrophage activation in the pathogenesis of Alzheimer's disease and human immunodeficiency virus type 1-associated dementia". *Eur. J. Clin. Invest.* **30**, 526-535.
- Springer, T.A. (1994): "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm". *Cell.* **76**, 301-314.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S. und Goodenough, D.A. (1986): "Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia". *J. Cell Biol.* **103**, 755-766.

- Stewart, D.J. (1994): "A critique of the role of the blood-brain barrier in the chemotherapy of human brain tumors". *J. Neurooncol.* **20**, 121-139.
- Stewart, P.A. und Wiley, M.J. (1981): "Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras". *Dev. Biol.* **84**, 183-192.
- Stoll, G. und Jander, S. (1999): "The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS". *Prog. Neurobiol.* **58**, 233-247.
- Stuart, R.O. und Nigam, S.K. (1995): "Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C". *PNAS.* **92**, 6072-6076.
- Stuart, R.O., Sun, A., Panichas, M., Hebert, S.C., Brenner, B.M. und Nigam, S.K. (1994): "Critical role for intracellular calcium in tight junction biogenesis". *J. Cell. Physiol.* **159**, 423-433.
- Takahashi, K., Wesselingh, S.L., Griffin, D.E., McArthur, J.C., Johnson, R.T. und Glass, J.D. (1996): "Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/*in situ* hybridization and immunohistochemistry". *Annal. Neurol.* **39**, 705-711.
- Takemoto, H., Kaneda, K., Hosokawa, M., Ide, M. und Fukushima, H. (1994): "Conditioned media of glial cell lines induce alkaline phosphatase activity in cultured artery endothelial cells. Identification of interleukin-6 as an induction factor". *FEBS Letters.* **350**, 99-103.
- Tamai, I., Sai, Y., Kobayashi, H., Kamata, M., Wakamiya, T. und Tsuji, A. (1997): "Structure-internalization relationship for adsorptive-mediated endocytosis of basic peptides at the blood-brain barrier". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 410-415.
- Tamai, I. und Tsuji, A. (1996): "Drug delivery through the blood-brain barrier". *Adv. Drug Delivery Rev.* **19**, 401-424.
- Tamaoki, J., Chiyotani, A., Takeyama, K., Yamauchi, F., Tagaya, E. und Konno, K. (1993): "Relaxation and inhibition of contractile response to electrical field stimulation by Beraprost sodium in canine airway smooth muscle". *Prostaglandins.* **45**, 363-373.
- Tamargo, R.J. und Brem, H. (1992): "Drug delivery to the central nervous system: a review". *Neurosurg. Quarterly.* **2**, 259-279.
- Tanaka, T. (1983): "Calmodulin antagonists' binding sites on calmodulin". *Pharmacology.* **26**, 249-257.
- Tao-Cheng, Nagy, Z. und Brightman, M.W. (1987): "Tight junctions of brain endothelium *in vitro* are enhanced by astroglia". *J. Neurosci.* **7**, 3293-3299.
- Taruscio, D., Malchiodi-Albedi, F., Bagnato, R., Pauluzzi, S., Francisci, D., Cavaliere, A. und Donelli, G. (1991): "Increased reactivity of laminin in the basement membranes of capillary walls in AIDS brain cortex". *Acta Neuropathol. (Berl.).* **81**, 552-556.
- Tilling, T., Korte, D., Hoheisel, D. und Galla, H.-J. (1998): "Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function *in vitro*". *J. Neurochem.* **71**, 1151-1157.
- Timpl, R. (1989): "Structure and biological activity of basement membrane proteins". *Eur. J. Biochem.* **180**, 487-502.
- Tio, S., Deenen, M. und Marani, E. (1990): "Astrocyte-mediated induction of alkaline phosphatase activity in human umbilical cord vein endothelium: an *in vitro* model". *Eur. J. Morphol.* **28**, 289-300.
- Tontsch, U. und Bauer, H.C. (1991): "Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells". *Brain Res.* **539**, 247-253.
- Tröster, S.D., Müller, U. und Kreuter, J. (1990): "Modification of the body distribution of poly(methylmethacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants". *Int. J. Pharm.* **61**, 85-.
- Tsuji, A., Terasaki, T., Takabatake, Y., Tenda, Y., Tamai, I., Yamashima, T., Moritani, S., Tsuruo, T. und Yamashita, J. (1992): "P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells". *Life Sci.* **51**, 1427-1437.

- Tyor, W.R., Glass, J.D., Griffin, J.W., Becker, P.S., McArthur, J.C., Bezman, L. und Griffin, D.E. (1992): "Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome". *Annal. Neurol.* **31**, 349-360.
- v. Briesen, H., Andreesen, R., Esser, R., Brugger, W., Meichsner, C., Becker, K. und Rübsamen-Waigmann, H. (1990): "Infection of monocytes/macrophages by HIV *in vitro*". *Res. Virol.* **141**, 225-231.
- v. Briesen, H., Becker, W.B., Henco, K., Helm, E.B., Gelderblom, H.R., Brede, H.D. und Rübsamen-Waigmann, H. (1987): "Isolation frequency and growth properties of HIV-variants: multiple simultaneous variants in a patient demonstrated by molecular cloning". *J. Med. Virol.* **23**, 51-66.
- Vallat, A., De Girolami, U., He, J., Mhashikar, A., Marasco, W., Shi, B., Gray, F., Bell, J., Keohane, C., Smith, T.W. und Gabuzda, D. (1998): "Localization of HIV-1 co-receptors CCR-5 and CXCR-4 in the brain of children with AIDS". *Am. J. Pathol.* **152**, 167-178.
- van Furth, R. (1982): "Current view on the mononuclear phagocyte system". *Immunobiology.* **161**, 178-185.
- van Furth, R. und Cohn, Z.A. (1968): "The origin and kinetics of mononuclear phagocytes". *J. Exp. Med.* **128**, 415-435.
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G. und Langevoort, H.L. (1972): "The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells". *Bull. World Health Organ.* **46**, 845-852.
- Van Itallie, C.M. und Anderson, J.M. (1997): "Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts". *J. Cell Sci.* **110**, 1113-1121.
- van Mourik, J.A., von dem Borne, A.E. und Giltay, J.G. (1990): "Pathophysiological significance of integrin expression by vascular endothelial cells". *Biochem. Pharmacol.* **39**, 233-239.
- Vaughan, D.W. und Peters, A. (1974): "Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscopic study". *J. Neurocytol.* **3**, 405-429.
- Vazeux, R., Brousse, N., Jarry, A., Henin, D., Marche, C., Vedrenne, C., Mikol, J., Wolff, M., Michon, C., Rozenbaum, W., Bureau, J.F., Montagnier, L. und Brahic, M. (1987): "AIDS subacute encephalitis. Identification of HIV-infected cells". *Am. J. Pathol.* **126**, 403-410.
- Wang, W., Merrill, M.J. und Borchardt, R.T. (1996): "Vascular endothelial growth factor affects the permeability of brain microvessel endothelial cells *in vitro*". *Am. J. Physiol.* **271**, C1973-1980.
- Weller, R.O., Engelhardt, B. und Phillips, M.J. (1996): "Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways". *Brain Pathol.* **6**, 275-288.
- Wesselingh, S.L., Takahashi, K., Glass, J.D., McArthur, J.C., Griffin, J.W. und Griffin, D.E. (1997): "Cellular localization of tumor necrosis factor mRNA in neurological tissue from HIV-infected patients by combined reverse transcriptase polymerase chain reaction, *in situ* hybridization and immunohistochemistry". *J. Neuroimmunol.* **74**, 1-8.
- Wiley, C.A. und Achim, C. (1994): "Human immunodeficiency virus encephalitis is the pathological correlate of dementia in acquired immunodeficiency syndrome". *Annal. Neurol.* **36**, 673-676.
- Wiley, C.A., Schrier, R.D., Nelson, J.A., Lampert, P.W. und Oldstone, M.B. (1986): "Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients". *PNAS.* **93**, 7089-7093.
- Willott, E., Balda, M.S., Fanning, A.S., Jameson, B., Van Itallie, C. und Anderson, J.M. (1993): "The tight junction protein ZO-1 is homologue to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions". *PNAS.* **90**, 7834-7838.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauß, B., Schmid, E.-M., Öcalan, M., Farrell, C. und Risau, W. (1994): "Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells". *J. Cell Sci.* **107**, 1347-1357.
- Wong, D. und Dorovini-Zis, K. (1992): "Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide". *J. Neuroimmunol.* **39**, 11-22.

- Yoshida, S., Minakawa, T., Takai, N. und Tanaka, R. (1989): "Effects of cytokines on cultured microvascular endothelial cells derived from gerbil brain". *Neurosurgery*. **25**, 373-377.
- Yoshioka, M., Bradley, W.G., Shapshak, P., Nagano, I., Stewart, R.V., Xin, K.-Q., Srivastava, A.K. und Nakamura, S. (1995): "Role of immune activation and cytokine expression in HIV-1-associated neurologic diseases". *Adv. Neuroimmunol.* **5**, 335-358.
- Yule, D.I. und J.A., W. (1992): "U73122 inhibits Ca²⁺ oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells". *J. Biol. Chem.* **267**, 13830-13835.

8 PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

- Blaheta, R.A., Leckel, K., Wittig, B., Zenker, D., Oppermann, E., Harder, S., Scholz, M., Weber, S., Encke, A. und Markus, B.H. (1999): "Mycophenolate mofetil impairs transendothelial migration of allogeneic CD4 and CD8 T-cells". *Transplantation Proceedings*. **31**, 1250-1252.
- Blaheta, R.A., Leckel, K., Wittig, B., Zenker, D., Oppermann, E., Harder, S., Scholz, M., Weber, S., Schuldes, H., Encke, A. und Markus, B.H. (1998): "Inhibition of endothelial receptor expression and of T-cell ligand activity by mycophenolate mofetil". *Transplant Immunology*. **6**, 251-259.
- Ramge, P., Unger, R.E., Oltrogge, J.B., Zenker, D., Begley, D., Kreuter, J. und v. Briesen, H. (2000): "Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells". *European Journal of Neuroscience*. **12**, 1931-1940.
- Steininger, S., Zenker, D., v. Briesen, H., Begley, D. und Kreuter, J. (1999): "The influence of polysorbate 80-coated nanoparticles on bovine brain capillary endothelial cells". *International Symposium on Controlled Release and Bioactive Material*, Boston, USA.
- v. Briesen, H., Kreutz, M. und Zenker, D. (1997): "Makrophagen: HIV-induzierte Synzytienbildung bei humanen Monocyten/Makrophagen". *Publikation für den Wissenschaftlichen Film*, Göttingen. **Med. 8**, 133-148.
- Zenker, D., Begley, D., Rübsamen-Waigmann, H. und v. Briesen, H. (2000): "Effect of macrophages on the blood-brain barrier properties of cultured brain capillary endothelial cells". *Proceedings of The Physiological Society*, King's College London, Great Britain.

9 CURRICULUM VITAE

persönliche Daten

Name	Dietmar Zenker
geboren am	6. Februar 1967 in Frankfurt/Main
Anschrift	Tornowstr. 66, 60486 Frankfurt
Telefon und Email	(069) 78 69 47 DietmarZenker@Compuserve.de

schulische und Hochschul-Ausbildung

1973 – 1977	Ebelfeld-Grundschule in Frankfurt/Main
1977 – 1986	Liebig-Gymnasium in Frankfurt/Main Juni 1986 Abschluss mit Abitur
Oktober 1988 bis Februar 1995	Studium der Biologie an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main mit Hauptfach Biochemie Februar 1995 Abschluss mit Diplom, Note "sehr gut"
Februar 1994 – Februar 1995	Durchführung einer experimentellen Diplomarbeit am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/Main unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. H. Rübsamen-Waigmann in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. v. Briesen (Bereich Virologie und Zellbiologie) Thema der Arbeit: „Untersuchung von Fusionsprozessen bei humanen Monocyten/Makrophagen“
seit September 1995	Promotion am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/Main unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. H. Rübsamen-Waigmann und Prof. H. Fasold in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. v. Briesen (Bereich Virologie und Zellbiologie) Thema der Arbeit: „Etablierung, Charakterisierung und Anwendung eines <i>in vitro</i> -Zellkulturmodells der Blut-Hirn- Schranke“

sonstiges

Oktober 1986 – Dezember 1987	Grundwehrdienst beim Panzeraufklärungsbataillon der Bundeswehr in Braunschweig
---------------------------------	---
