

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
M. Sc. Lea Denzer
geboren in Landstuhl, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2022

Transkriptomvergleich primärer und immortalisierter Endothelzellen des
humanen *Plexus choroideus* unter Betrachtung des WNT/ β -Catenin
Signalweges

Gutachter: Professor Dr. Michael Lanzer
Professor Dr. Horst Schrotten

Meiner Familie

**Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung für die
Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Universität Heidelberg.**

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema:

Transkriptomvergleich primärer und immortalisierter Endothelzellen des humanen *Plexus choroideus* unter Betrachtung des WNT/ β -Catenin Signalweges

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich ~~wie folgt/~~bislang nicht¹ an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

.....
Ort und Datum

.....
Unterschrift

¹ Nicht Zutreffendes streichen. Bei Bejahung sind anzugeben: der Titel der andernorts vorgelegten Arbeit, die Hochschule, das Jahr der Vorlage und die Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung

I. Inhaltsverzeichnis

II. Zusammenfassung.....	1
III. Summary.....	2
IV. Abkürzungen.....	3
1. Einleitung.....	6
1.1. Bedeutung von Endothelzellen	6
1.2. Morphologische Unterschiede von Endothelien.....	6
1.2.1. Kontinuierliches Endothel	8
1.2.2. Fenestriertes Endothel	8
1.2.3. Diskontinuierliches Endothel.....	9
1.3. Diaphragmen	9
1.3.1. PLVAP-der Bestandteil der Diaphragmen.....	11
1.3.2. Molekulare Charakteristiken von PLVAP.....	11
1.3.3. Funktionen von PLVAP in nicht-Barriere-formenden & Barriere-formenden EZ.....	12
1.3.4. Regulation von PLVAP	13
1.4. Das zentrale Nervensystem.....	13
1.4.1. Blut-Hirn-Schranke	14
1.4.2. Blut-Liquor Schranke	16
1.4.3. Bedeutung der Barrieren für das ZNS	17
1.5. WNT/ β -Catenin-Signalweg	17
1.5.1. Bestandteile des WNT-Signalweg.....	18
1.5.2. Funktionsweise des kanonischen WNT-Signalweges	20
1.5.3. Regulation des ZNS Endothels durch WNT-Signalübermittlung.....	22
1.6. Ziel dieser Arbeit	23
2. Material und Methoden	25
2.1. Material	25
2.1.1. Zellen	25
2.1.2. Medien und Zusätze für die Zellkultur	25
2.1.3. Antikörper.....	25
2.1.4. Größenstandards und Ladepuffer	26
2.1.5. Oligonukleotidprimer	26
2.1.6. Chemikalien und Lösungen	28
2.1.7. Puffer und Lösungen	28

2.1.8.	Kits	29
2.1.9.	Laborgeräte	29
2.1.10.	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.11.	Software	31
2.2.	Methoden.....	32
2.2.1.	Zellbiologische Methoden	32
2.2.2.	Molekularbiologische Methoden	32
3.	Ergebnisse.....	37
3.1.	Prinzip der RNA-Sequenzierung und statistische Analyse.....	37
3.2.	Vergleich der Transkriptome von HCPEnC und iHCPEnC	41
3.2.1.	Numerischer Vergleich signifikant exprimierter Gene bei HCPEnC und iHCPEnC	41
3.2.2.	Identifikation der Gene mit den höchsten Signifikanzen	48
3.2.2.	Auswirkungen der signifikant exprimierten Gene auf biologische Prozesse	51
3.3.	Vergleichende Expression endothel-relevanter Gene	56
3.3.1.	Numerischer Vergleich signifikant exprimierter, endothel-relevanter Gene	57
3.3.2.	Identifikation signifikant exprimierter, endothel-relevanter Gene.....	58
3.4.	Expression von WNT-Rezeptoren, Ko-Rezeptoren und Signalmodulatoren in HCPEnC	60
3.5.	Expression von WNT-Rezeptoren, Ko-Rezeptoren und Signalmodulatoren in iHCPEnC	62
3.6.	Vergleichende Expression WNT-Signalweg Moleküle primärer und immortalisierter Endothelzellen.....	63
3.7.	Extrinsische Aktivierung des WNT-Signalweges in iHCPEnC und Einfluss auf PLVAP	69
3.7.1.	Stimulation des WNT-Signalweges mit LiCl und WNT-Agonisten	69
3.7.2.	Stimulation des WNT-Signalweges durch Inhibition von GSK3 β mit SB 216763	73
3.7.3.	Ko-Lokalisation von CTNNB mit unterschiedlichen Zellorganellen	76
4.	Diskussion	79
4.1.	Eignung von iHCPEnC als Modell zur Erforschung des PC und der BLS.....	79
4.1.1.	Die Bedeutung von EZ in der Erforschung des PC	79
4.1.2.	Grundlage einer neuartigen PC-Endothelzelllinie (iHCPEnC)	80
4.1.3.	Hohe Übereinstimmung von HCPEnC und iHCPEnC.....	81
4.1.4.	Auswirkungen der Immortalisierung auf biologische Prozesse	83
4.2.	WNT-Signalübertragung als Regulator vaskularer Permeabilität in iHCPEnC.....	84
4.2.1.	Ausprägung des kanonischen WNT-Signalweges in HCPEnC und iHCPEnC	84
4.2.2.	Aussagekraft der Transkriptomuntersuchungen von HCPEnC und iHCPEnC	86
4.2.3.	Nukleare Translokation von CTNNB	88
4.2.4.	Einfluss des kanonischen WNT-Signalweges auf die Expression von PLVAP	91

V. Ausblick.....	94
VI. Referenzen.....	95
VII. Abbildungsverzeichnis	116
VIII. Tabellenverzeichnis	117
IX. Anhang.....	117
X. Publikationen.....	118
XI. Danksagung	119

II. Zusammenfassung

Endothelzellen (EZ) fungieren als wichtiger Regulator der Gefäßpermeabilität und -angiogenese und müssen die umliegenden Gewebe mit den jeweils benötigten Nährstoffen versorgen. Sie existieren in einer stark ausgeprägten Heterogenität, sodass eine optimale Anpassung an die unterschiedlichen Bedürfnisse dieser Gewebe gewährleistet wird. Es haben sich drei Subtypen entwickelt, die sich durch ihr Vorhandensein an spezifischen Endothel-Mikrodomänen, den *Caveolae*, den *Fenestrae* und den Transendothel-Kanälen, auszeichnen. Diese Mikrodomänen können Diaphragmen ausbilden, deren einzige bekannte Komponente das EZ spezifische *plasmalemma vesicle-associated protein* (PLVAP) ist. Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist die Expression von PLVAP von dem jeweiligen Gefäßbett abhängig. Z.B. wird dessen Expression in der Blut-Hirn-Schranke (BHS) durch den kanonischen WNT-Signalweg unterdrückt. Die Gefäße des humanen *Plexus choroideus* (PC), dessen Epithelzellen zur Bildung der Blut-Liquor-Schranke (BLS) beitragen, weisen dagegen fenestrierte EZ auf, welche PLVAP exprimieren. Ektopische Expression der humanen TERT ermöglichte erstmals die Herstellung einer immortalisierten EZ-Zelllinie des PC (iHCPEnC), die *Fenestrae* mit PLVAP enthaltenden Diaphragmen ausbildet. Mithilfe einer Transkriptomanalyse via *Massive Analysis of cDNA Ends* (MACE) wurden die iHCPEnC zunächst näher charakterisiert. Dazu wurden primäre Zellen der sechsten Passage (HCPEnC p6) mit einer jüngeren (p20) und einer älteren Passage (p50) von iHCPEnC verglichen. So konnte eine sehr hohe Übereinstimmung von HCPEnC und iHCPEnC beobachtet werden, da die verglichenen Transkriptome sehr hohe Bestimmtheitsmaße erzielten und von den 26586 untersuchten Transkripten nur geringe Anteile signifikant verändert waren. Mithilfe einer GSEA-Analyse wurden die identifizierten *differentially expressed genes* (DEG) biologischen Prozessen zugeordnet, die durch die veränderte Expression der DEG potenziell beeinflusst werden. Verschiedene der identifizierten DEG konnten als endothel-relevant identifiziert werden, u.a. auch Vertreter des WNT-Signalweges. Die Expression der Komponenten des Signalweges wurde mittels PCR überprüft. Dabei wurden verschiedene Vertreter der WNT-Liganden, WNT-Rezeptoren und Ko-Rezeptoren, WNT-Modulatoren sowie der Signaltransmitter β -Catenin (CTNNB) in HCPEnC und iHCPEnC nachgewiesen. Im Weiteren wurden die Funktionsfähigkeit des WNT-Signalweges und sein Einfluss auf die Expression von Zielgenen wie *plvap* durch Stimulation mit LiCl und den WNT-Agonisten WNT3a und WNT9a überprüft. Es konnte jedoch weder eine nukleare Translokation von CTNNB noch eine signifikante Änderung der Expressionslevel der untersuchten Zielgene nachgewiesen werden. Die Verwendung des GSK3 β -Inhibitors SB 216763 bewirkte eine leicht verbesserte nukleare Translokation von CTNNB, allerdings wurde CTNNB weiterhin auch an der Zellmembran detektiert. Außerdem konnten nur geringe Änderungen der Zielgenexpression nach Behandlung der iHCPEnC mit SB 216763 festgestellt werden. Mögliche weitere Ko-Lokalisationen von CTNNB mit zellulären Komponenten außerhalb des Zellkerns wurden überprüft, wobei eine Ko-Lokalisation von CTNNB mit dem ER erfasst wurde. Zuvor in der Literatur beschriebene Lokalisationen im Golgi oder frühen und späten Endosomen konnten jedoch nicht eindeutig detektiert werden.

Diese Arbeit konnte eine große Übereinstimmung der iHCPEnC mit den primären HCPEnC belegen und dadurch die Eignung der iHCPEnC als Modell der BLS stützen. Außerdem wurden Hinweise auf einen funktionierenden WNT-Signalweg in den PC-Endothelzellen gefunden, der zur Regulation der Permeabilität der EZ des PC und damit der BLS beitragen könnte. Um die Funktion des WNT-Signalwegs im PC-Endothel im Detail zu bestimmen, wären eine weitere Optimierung und Vertiefung der durchgeführten Versuche notwendig.

III. Summary

Endothelial cells (ECs) act as an important regulator of vascular permeability and angiogenesis and must supply the surrounding tissues with the respective nutrients they require. They exist in a highly distinct heterogeneity, ensuring optimal adaptation to the different needs of these tissues. Three subtypes have evolved, characterized by their presence of specific endothelial microdomains, the caveolae, the fenestrae, and the transendothelial channels. These microdomains can form diaphragms whose only known component is the EC specific plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP). In the central nervous system (CNS), PLVAP expression is dependent on the particular vascular bed. For example, its expression in the blood-brain barrier (BBB) is repressed by the canonical WNT pathway. In contrast, the vessels of the human choroid plexus (CP), whose epithelial cells contribute to the formation of the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCSFB), have fenestrated EC that express PLVAP. Ectopic expression of human TERT allowed for the first time the generation of an immortalized EZ cell line of CP (iHCPEnC) that forms fenestrae with PLVAP-containing diaphragms. Using transcriptome analysis via Massive Analysis of cDNA Ends (MACE), iHCPEnC were first characterized in more detail. For this purpose, primary cells of the sixth passage (HCPEnC p6) were compared with a younger (p20) and an older passage (p50) of iHCPEnC. Thus, a very high concordance of HCPEnC and iHCPEnC was observed, as the compared transcriptomes achieved very high coefficients of determination and only small proportions of the 26586 transcripts examined were significantly altered. Using GSEA analysis, the identified differentially expressed genes (DEG) were assigned to biological processes potentially affected by the altered expression of DEG. Several of the identified DEG could be identified as endothelium-relevant, including representatives of the WNT signaling pathway. The expression of the components of the signaling pathway was verified by PCR. Various representatives of WNT ligands, WNT receptors and co-receptors, WNT modulators, and the signal transmitter β -catenin (CTNNB) were detected in HCPEnC and iHCPEnC. Furthermore, the functionality of the WNT signaling pathway and its influence on the expression of target genes such as *plvap* were verified by stimulation with LiCl and the WNT agonists WNT3a and WNT9a. However, neither nuclear translocation of CTNNB nor a significant change in the expression levels of the target genes examined was detected. The use of the GSK3 inhibitor SB 216763 caused a slightly improved nuclear translocation of CTNNB; however, CTNNB was still also detected at the cell membrane. In addition, only minor changes in target gene expression were detected after treatment of iHCPEnC with SB 216763. Possible further co-localization of CTNNB with cellular components outside the nucleus was verified, and co-localization of CTNNB with the ER was detected. However, previously reported localizations in the Golgi or early and late endosomes in the literature could not be clearly detected.

This work was able to demonstrate a high concordance of iHCPEnC with primary HCPEnC, thereby supporting the suitability of iHCPEnC as a model of BCSFB. In addition, evidence was found for a functional WNT signaling pathway in the CP endothelial cells, which may contribute to the regulation of the permeability of the EZ of the CP and thus BCSFB. To determine in detail the function of the WNT signaling pathway in the Cp endothelium, further optimization and deepening of the experiments performed would be necessary.

IV. Abkürzungen

A	ABC	ATP-bindende Kasette (<i>ATP binding cassette</i>)	
	AJ	<i>Adherens junctions</i>	
	APC	<i>adenomatous polyposis coli</i> Genprodukt	
	ATP	Adenosine triphosphate	
	ANOVA	analysis of variance	
	AS	Aminosäure	
	AS RNA	anti-sense RNA	
B	BHS	Blut-Hirn-Schranke (<i>blood-brain-barrier, BBB</i>)	
	BLS	Blut-Liquor-Schranke (<i>blood-cerebrospinal fluid barrier, BCSFB</i>)	
	BCRP	Brustkrebs-Resistenzprotein (<i>breast cancer resistance protein</i>)	
	bp	Basenpaare	
	BP	Biologische Prozesse	
	BRB	Blut-Retina-Schranke	
	C	°C	grad Celsius
Ca ²⁺		Calcium	
cDNA		copy Deoxyribonucleinsäure	
CDLN		Claudin	
CK1		Casein Kinase 1	
CO ₂		Kohlenstoffdioxid	
CRD		Cystein reiche Domäne	
CSF		<i>Liquor cerebrospinalis (cerebrospinal fluid)</i>	
CT		threshold cycle	
CTNNB		β-Catenin	
CVDs		Kardiovaskuläre Krankheiten (<i>cardiovascular diseases</i>)	
CXCL		(CXC-motif) ligand	
D		DEG	differentially expressed gene(s)
		DKK	Dickkopf
		DME	diabetische Makularödeme (<i>diabetic macular edema</i>)
	DMSO	dimethylsulfoxide	
	DNA	Deoxyribonucleinsäure	
	DNase	Deoxyribonuclease	
	DPBS	Dulbecco's phosphate buffered solution	
	DVL	Dishevelled	
	DUSP2	Dual specificity phosphatase 2	
	E	EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
		EF	extracellular factor
EMT		epithelial-mesenchymal transition	
EPZ		Epithelzellen	
ER		Endoplasmatisches Retikulum	
ES		<i>Enrichment Score</i>	
EZ		Endothelzellen	
F	FCS	fetal calf serum	
	FC	fold change	
	FD	<i>fenestral diaphragms</i>	
	FDR	false discovery rate	
	FZD	Frizzled Rezeptoren	
G	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
	Glut1	Glukosetransporter 1	
	GO	Gene Ontology	
	GOBP	<i>Gene Ontology Biological Processes</i>	

	Golgi	Golgi-Apparat
	GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (<i>G-protein-coupled receptors</i>)
	GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
	GSK3	Glycogen-Synthase-Kinase 3
	GS	Gen-Sets
H	h	Stunde (<i>hora</i>)
	HCO ³⁻	Bicarbonat
	HCPEnC	humane PC Endothelzellen (<i>human choroid plexus endothelial cells</i>)
	H ₂ O	Wasser
	HIBPCP	human choroid plexus epithelial papilloma cells
	HIF	hypoxia-inducible factor
	hTERT	Humane Telomerase
I	IF	Immunfluoreszenz
	iHCPEnC	immortalisierte humane PC Endothelzellen (<i>immortalized human choroid plexus endothelial cells</i>)
K	kDA	Kilo Dalton
	KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
	KRM	Kremen
L	LiCl	Lithiumchlorid
	LINC	long intergenic non-coding RNA
	log ₂ PCM	<i>log₂ counts per million</i>
	LRP	<i>low-density lipoprotein receptor related protein</i>
M	MACE	massive analysis of cDNA ends
	MECA-32	Maus Endothel-Zell Antigen 32 (<i>mouse endothelial cell antigen</i>)
	Mg ²⁺	Magnesium
	μl	Mikroliter
	min	Minuten
	MIR	mikroRNA
	ml	Milliliter
	MOI	multiplicity of infection
	mRNA	messenger RNA
	MRP	muramidase-released protein
	MSigDB	Molecular Signature Database
	MXI1	MAX interactor 1
	MYC	myelocytomatosis
N	Na ⁺	Natrium
	NCD	nicht übertragbare Krankheiten (<i>non-communicable diseases</i>)
	NGS	Next-Generation Sequencing
	NES	normalisierter Anreicherungs Wert (<i>normalized enrichment score</i>)
	NET	neutrophil extracellular trap
	NFκBIA	NFκB inhibitor alpha
	nm	nano meter
O	Ω	Ohm
	OCLN	Occludin
	OD ₆₀₀	optical density at 600 nm
	ORF	open reading frame
P	PAL-E	Pathologische Anatomie Leiden-Endothel
	PC	<i>Plexus choroideus (choroid plexus, CP)</i>
	PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
	P-GP	Permeabilitäts-Glykoprotein (<i>permeability glycoprotein</i>)
	PKC	Protein-Kinase C

	PLVAP	Plasmalemma Vesikel-assoziiertes Protein (<i>plasmalemma vesicle-associated protein</i>)
	PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
	poly(A)	polyadenyliert
	p6, p20, p50	Passage 6, Passage 20, Passage 50
Q	qRT-PCR	quantitative Polymerase chain reaction
R	RIN	RNA Integrity Number
	RNA	Ribonucleinsäure
	RNase	Ribonuclease
	RNA-seq	RNA-Sequencierung
	RND1	Rho family GTPase 1
	RPKM	reads per kilobase of exon model per million reads
	RSPO	R-spondin
	rRNA	ribosomale RNA
	RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
	R ²	Bestimmtheitsmaß
S	SD	<i>stomatal diaphragms</i>
	SAS	subarachnoid space
	sec	Sekunden
	SFM	Serum-freies Medium
	sFRP	sekretierten Frizzled-verwandten Proteine (<i>secreted Frizzled related proteins</i>)
	SLY	Suilysin
	SNP	single nucleotide polymorphismen
	SOST	Sclerostin
	SRA	sequence read archive
	ST	Serotyp
	STABW	Standardabweichung
T	7-TM	sieben-Transmembran
	TAE	tris-acetic acid-EDTA buffer
	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
	TCF/LEF	<i>T cell factor/lymphoid enhancer factor</i>
	TEC	transendothelialer-Kanal (<i>transendothelial channel</i>)
	TEER	transepithelial electrical resistance
	TGF- β	transformierende Wachstumsfaktor- β (<i>transforming growth factor β</i>)
	TJ	<i>Tight junctions</i>
	TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
U	U	Units
V	V	Volt
	v/v	volume per volume
	VE	<i>vascular endothelial</i>
	VEGF	vascular endothelial growth factor
	VEGFA	vascular endothelial growth factor a
W	WT	Wildtyp
	WIF	WNT inhibitorische Protein (<i>WNT inhibitory protein</i>)
	w/v	<i>wight per volume</i>
Z	ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Bedeutung von Endothelzellen

In der heutigen Zeit gelten nicht übertragbare Krankheiten als häufigste Todesursache. Diese machten im Jahr 2017 weltweit 73,4 % der Todesfälle aus, was einem Anstieg von 22,5 % seit dem Jahr 2007 entspricht [1,2]. Innerhalb dieser Gruppe verursachten nach Angaben der WHO im Jahr 2015 neben kardiovaskulären Krankheiten (*cardiovascular diseases; CVD*), die mit 6,2 Millionen Toten an der Spitze lagen, Krebs, chronische Atemwegserkrankungen und Diabetes zusammen insgesamt 12,4 Millionen Tote (82.7 %). Dabei werden in Ländern mit hohem Einkommen (ca. 48 Länder) CVD auf Grund von Erfolgen in Prävention und Behandlung mittlerweile durch Krebs abgelöst, während in den 65 verbleibenden Ländern mit mittlerem und niedrigem Einkommen durch Krebs verursachte Todesfälle weiterhin auf Rang zwei bis vier verbleiben [1,3].

Sowohl bei CVD als auch bei Krebserkrankungen spielen Endothelzellen (EZ), welche die innerste Schicht von Blutgefäßen auskleiden, eine bedeutende Rolle [4]. EZ nehmen nicht nur Scherstress wahr und passen Durchmesser und Dicke der Gefäßwand durch molekulare Signalwege entsprechend an, sondern kontrollieren auch die Migration von Immunzellen und den Transport von Molekülen in und aus dem Blutstrom [5,6]. Zusätzlich halten sie die Versorgung des unterliegenden Gewebes und die Homöostase des Mikroklimas der unterschiedlichen Gewebe aufrecht. Außerdem unterstützen sie das Immunsystem bei der Abwehr von Pathogenen, Tumoren und körperfremden Material [7,8].

Damit EZ den unterschiedlichen Ansprüchen der verschiedenen umgebenden Gewebe und Mikroumfelder gerecht werden können, haben sich unterschiedliche Typen von EZ entwickelt. Diese Heterogenität ist nicht nur zwischen verschiedenen Spezies und Organismen zu finden, sondern auch innerhalb eines Organismus und selbst innerhalb eines Organs [9]. Dementsprechend können EZ entsprechend ihres Vorkommens in Organismus-übergreifende EZ oder Organ-spezifische EZ eingeteilt werden. Die Gruppe der Organismus-übergreifenden EZ umfasst Arterielle EZ, Venöse EZ, Kapillare EZ und Lymphatische EZ, während Organ-spezifische EZ in die EZ der Blut-Hirnschranke (BHS), des Herzens, der Leber, der Lunge und der Niere unterteilt werden [9]. Eine weitere Klasse bilden Tumor EZ, da sie sich deutlich von gesunden EZ unterscheiden. Neben diesen Möglichkeiten ist eine Einteilung entsprechend ihrer morphologischen Struktur und Funktion geläufig.

1.2. Morphologische Unterschiede von Endothelien

Um den unterschiedlichen Ansprüchen verschiedener Abschnitte des Kardiovaskulären-Systems und mitunter auch solchen innerhalb des identischen Gefäßbettes gerecht zu werden, besteht das Endothel aus einer heterogenen Population von EZ mit diversen Funktionen. Die Eigenschaften eines Blutgefäßes, wie z.B. dessen Permeabilität, hängen daher von den EZ ab. Dies schließt sowohl ihre Anordnung in einer lockeren oder dichten Schicht kombiniert mit dem Vorkommen einer Basalmembran als auch die Ausprägung von EZ-spezifischen Mikrodomänen ein [10-14]. Entsprechend werden verschiedene Endotheltypen anhand ihrer charakteristischen Struktur und Funktion unterschieden (*SIEHE ABBILDUNG 1*), die den diversen Anforderungen der umgebenden Gewebe angepasst und daher spezifisch für jedes Organ sind [10,15-20]. Dementsprechend erfolgt eine Einteilung in kontinuierliches, fenestriertes oder diskontinuierliches (auch sinusförmiges) Endothel, welche zur Regulation der Permeabilität von Blutgefäßen für Wasser und gelöste Nährstoffe unterschiedlich stark beitragen [12-14].

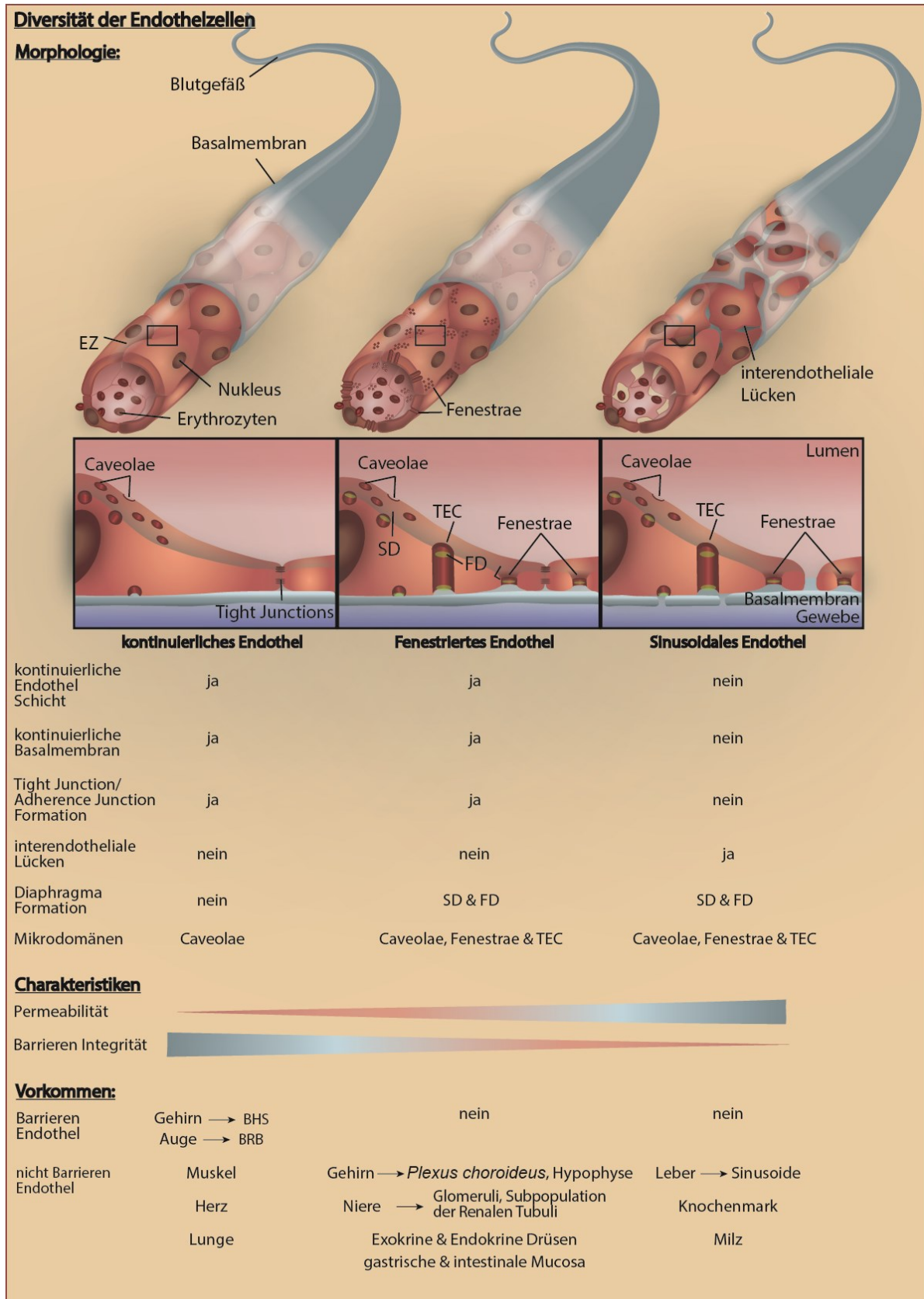


Abbildung 1 Schematische Gegenüberstellung der drei Endothelgrundtypen. Die Abbildung stellt die Gegensätze und Gemeinsamkeiten von kontinuierlichen, fenestrierten und sinusoidalen Endothelien hinsichtlich ihrer Morphologie (oben), ihrer Charakteristiken und ihrem Vorkommen (unten) dar.

1.2.1. Kontinuierliches Endothel

Das kontinuierliche Endothel weist die geringste Permeabilität aller Endothelien auf (*SIEHE ABBILDUNG 1*) und wird durch ein ununterbrochenes Endothel mit kontinuierlicher Basalmembran und dichten Zell-Zell Kontakten, die auch als *tight junctions* (TJ) bekannt sind, charakterisiert. Dieser Typ EZ ist unter anderem in Muskelgewebe, dem Herz, der Lunge und dem Gehirn zu finden [17,20]. Diese dicht angeordneten Endothelien formen eine hoch selektive Diffusions-Barriere für Nährstoffe, Proteine und Immunzellen, die nur die Passage von Wasser und kleinen Molekülen erlaubt und so den Verlust von Plasmaproteinen und Blutzellen verhindert [12-14].

Charakteristisch für diese EZ sind 50-100 nm große, kolbenförmige Einbuchtungen der Plasmamembran, sogenannte *Caveolae* (*SIEHE ABBILDUNG 1*). Sie sind im Elektronenmikroskop abhängig von dem jeweiligen Zelltyp in unterschiedlichen Organisationsgraden zu erkennen, nämlich als Traubenähnliche Cluster, Rosetten, Membran-gebundene oder -ungebundene Vesikel oder als Tubulusähnliche Strukturen [21-23]. Diesen Strukturen wurde eine Rolle in einer Form des transzellulären Molekültransports über die Schicht aus EZ zugeschrieben, eine Funktion der *Caveolae*, die später durch Cholesterol-Transport, Potozytose und Endozytose ergänzt wurde [24-32]. Außerdem wurde bei Membranen mit hoher Anzahl an *Caveolae* zunächst dem Protein Caveolin1 eine relevante Rolle als strukturelle Komponente und beim Vesikeltransport zugewiesen. Caveolin1 war das erste identifizierte Protein der Familie gefolgt von den später beschriebenen verwandten Proteinen Caveolin2 und Caveolin3. Diese Proteine der Caveolin-Familie dienen seither als Marker-Proteinen für *Caveolae*-haltige Membranen [33-39].

1.2.2. Fenestriertes Endothel

Auch bei dem fenestrierten Endothel handelt es sich um ein kontinuierliches Endothel, das sich zusätzlich noch durch eine weitere Mikrodomäne auszeichnet, die sogenannten *Fenestrae* (*SIEHE ABBILDUNG 1*). Dabei handelt es sich um kreisförmige Membranöffnungen mit einem Durchmesser von 70 nm, die sich durch die gesamte Dicke der Zelle ziehen und oftmals mit einem 5 bis 6 nm dünnen, nicht membranösen Diaphragma verschlossen sind, das als *fenestral diaphragm* (FD) bezeichnet wird [10,17,18,22]. Im fenestrierten Endothel weisen nicht nur *Fenestrae* solche Diaphragmen auf, sie sind auch bei *Caveolae* zu finden und werden dort als *stomatal diaphragms* (SD) bezeichnet (*SIEHE ABBILDUNG 1*). Die Fusion von *Caveolae* soll zu der Entstehung sogenannter transendothelialer Kanäle (*transendothelial channels*; TEC) führen, welche ebenfalls die gesamte Zelle durchziehen und im Gegensatz zu *Fenestrae* zwei Diaphragmen aufweisen, je eines an jeder Öffnung [31,40-43].

Die Poren-ähnliche Struktur von *Fenestrae* und TEC soll einen schnellen Austausch von Molekülen zwischen dem Blutkreislauf und dem zu versorgenden Gewebe ermöglichen [13,14]. Das fenestrierte Endothel weist daher eine erhöhte Permeabilität für kleine und mittelgroße Moleküle auf, weshalb es eine wichtige Rolle in der Regulation endokriner Homöostase spielt [22]. Dementsprechend kommt dieses Endothel in Gefäßbetten von Organen mit erhöhter Filtration, Sekretion oder transendotheliale Transport vor. Das trifft unter anderem auf exokrine und endokrine Drüsen, die Magen- und Darmschleimhaut, den *Plexus choroideus* (PC), die Nierenglomeruli und einen Teil der renalen Tubuli zu [10,17,19,44].

1.2.3. Diskontinuierliches Endothel

Das diskontinuierliche Endothel weist ebenso wie das fenestrierte Endothel *Caveolae*, *Fenestrae* und TEC mit entsprechenden Diaphragmen auf, allerdings handelt es sich hierbei um kein kontinuierliches Endothel (SIEHE ABBILDUNG 1). Stattdessen besitzt das diskontinuierliche Endothel größere Öffnungen von 30 bis 40 µm, sogenannte *interendothelial gaps*, die auf Lücken zwischen den EZ und eine poröse Basalmembran zurückzuführen sind [17,19,44]. Folglich handelt es sich beim diskontinuierlichen Endothel um den Typ EZ mit der höchsten Permeabilität des Gefäßbettes. Es ist in Organen wie der Leber oder hämatopoetischen Organen wie der Milz und dem Knochenmark vorhanden [10-14,17].

1.3. Diaphragmen

Obwohl Struktur und Komposition von SD and FD als gleich angesehen werden, scheinen beide Diaphragmen unterschiedliche biochemische Eigenschaften zu haben. So ist eine hohe Anzahl anionischer Modifikationen charakteristisch für FD, während diese in SD fehlen [45]. Diese anionischen Modifikationen verursachen einen Ladungsunterschied in FD, der scheinbar höher ist als die negative Ladung der Plasmamembran [45,46]. Dadurch werden FD impermeabel für anionische Proteine, sodass die Permeabilität durch einen zusätzlichen Selektivitätsfaktor eingeschränkt wird. Dieser zusätzliche Selektivitätsfaktor fehlt bei SD, sodass diese die Passage von anionischen Proteinen weiterhin erlauben sollten [45]. Da Proteasen und Heparinasen die anionischen Modifikationen der FD entfernen können, wird angenommen, dass die luminalen Seiten dieser Diaphragmen von einer Glykokalyx überzogen sind [47].

Bisher ist die einzige bekannte molekulare Komponente von SD und FD das Endothel-spezifische, nur in Diaphragmen präsente Plasmalemma Vesikel-assoziierte Protein (*plasmalemma vesicle-associated protein*; PLVAP) (SIEHE ABBILDUNG 2) [12,42,48,49]. Allerdings ist die Expression dieses Proteins auf einen Teil der EZ in der Vaskulatur beschränkt. So ist es bis auf die endokardiale Auskleidung der Herzkammern nicht in den großen Gefäßen vorhanden [14,31,40,50-53]. Die höchsten PLVAP Expressionslevel sind in Organen mit fenestrierten Endothelien, wie in den endokrinen Drüsen, der Lunge, der Milz, den Nieren und dem Verdauungstrakt zu finden [50,51]. Es wurde gezeigt, dass PLVAP nicht nur für die Entstehung des Herz-Kreislauf-Systems, sondern auch für postnatale Prozesse wie die Aufrechterhaltung der Blutkomposition und Organ-Homöostase wichtig ist. Daher wird angenommen, dass PLVAP eine außerordentliche Rolle in der Regulation der Gefäßpermeabilität einnimmt [13,41,42,49]. Außerdem soll es als Leukozyt-Transfer Molekül eine essenzielle Rolle in der Überwachung von Immun- und Entzündungsprozessen spielen, da es nach einem inflammatorischen Stimulus in der Zelle neu verteilt wird [54].

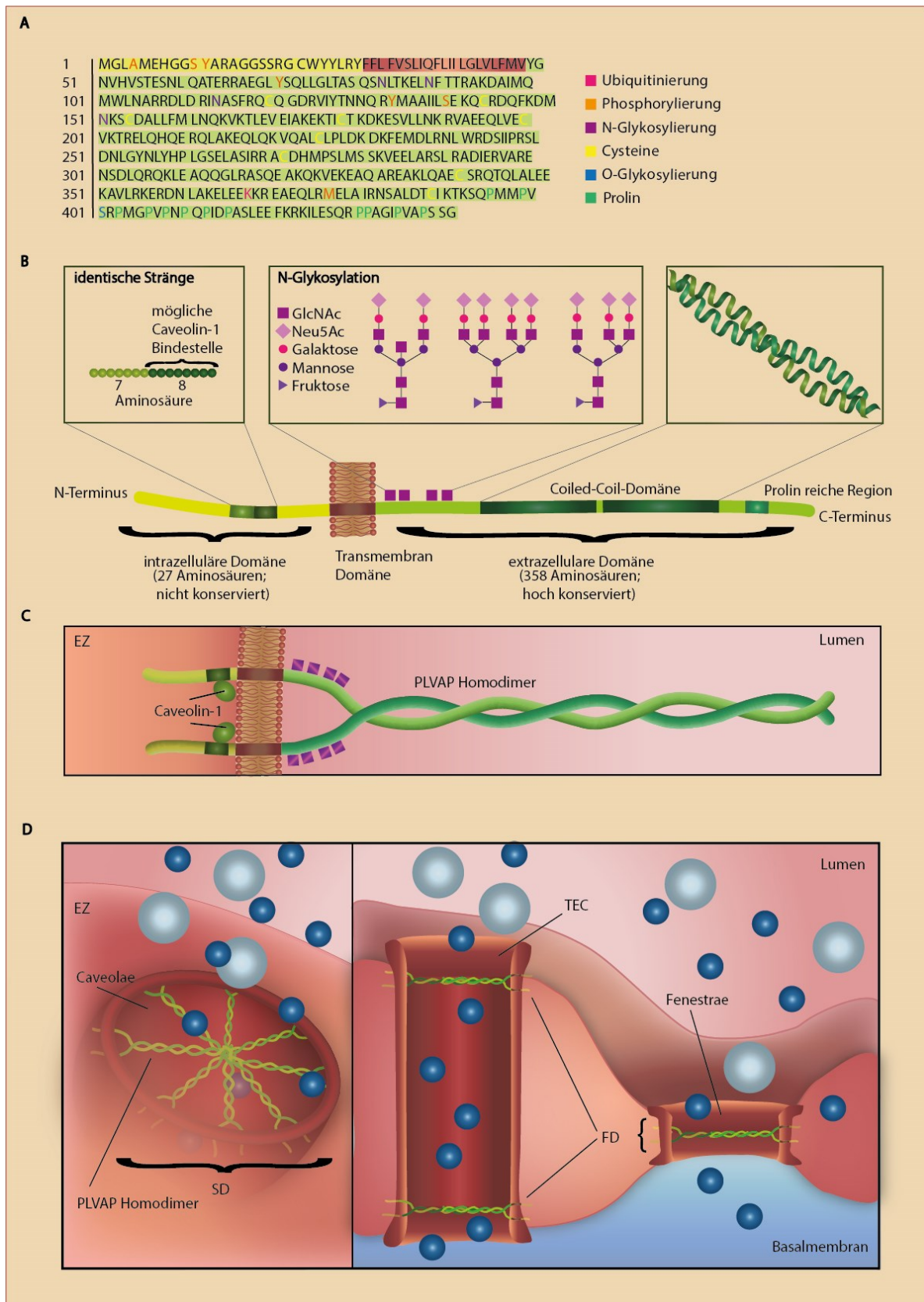


Abbildung 2 Schematische Darstellung von PLVAP. **A** zeigt die Primärsequenz von PLVAP. Bereiche, die zu der extrazellulären Domäne (grün), der Transmembrandomäne (rot) oder der intrazellulären Domäne (gelbgrün) gezählt werden, wurden farblich unterlegt. Aminosäuren mit möglicher regulatorischer Funktion wurden farblich entsprechend hervorgehoben. **B** stellt die Tertiärstruktur von PLVAP dar und hebt die Besonderheiten wie z.B. prominente Sekundärstrukturen der einzelnen Domänen hervor. **C** Bildung der Quartärstruktur in Form von Homodimeren. **D** veranschaulicht die Zusammenlagerung mehrerer dieser Homodimere bei der Ausbildung der Diaphragmen in *Caveolae* (links), *TEC* (mittig) und *Fenestrae* (rechts).

1.3.1. PLVAP-der Bestandteil der Diaphragmen

PLVAP wurde zuerst als Antigen für die beiden klassischen Endothel-Antikörper, Maus Endothel-Zell Antigen 32 (*mouse endothelial cell antigen*; MECA-32) und Pathologische Anatomie Leiden-Endothel (PAL-E), entdeckt [49,55-57]. Dabei repräsentiert MECA-32 die murine Variante von PAL-E, welches die Endothelzellen von Kapillaren, mittelgroßen Venen, Venolen und Milzsinusoiden färbt, Arteriolen und große Venen allerdings nicht erkennt, während MECA-32 diese färbt [55,58,59].

Aufgrund der Fähigkeit zwischen verschiedenen EZ zu unterscheiden, wurde PAL-E verbreitet als vaskulärer Marker verwendet, der in Kombination mit einem allgemeinen vaskulären Marker wie CD31 zur Unterscheidung von lymphatischen und vaskulären Endothelien beitrug. [13]. So wurde festgestellt, dass PLVAP im Endothel der BHS, in der Blut-Retina-Schranke (BRS) oder anderen EZ mit Eigenschaften einer Blut-Gewebe-Barriere nicht exprimiert wird, jedoch in dem fenestrierten Endothel des PC, welches keine direkten Barriere-Eigenschaften besitzt [13,59-63]. Darüber hinaus ist PLVAP die erste und bisher einzige entdeckte molekulare Komponente in FD und SD und wurde als essenziell für ihre Ausbildung festgestellt [64,65]. In Übereinstimmung wurden weder PLVAP Homologe in Vertebraten ohne SD und FD gefunden, noch wird PLVAP in Endothelien ohne Diaphragmen exprimiert [31].

Außerdem wurde demonstriert, dass PLVAP an der Regulation der basalen Permeabilität, des Leukozyten-Transfers und der Angiogenese beteiligt ist [54,66-69]. Dies wird besonders unter pathogenen Bedingungen deutlich, wenn PLVAP in der BHS oder der BRB exprimiert wird und die schützende Barriere unterbrochen wird. Auf den Verlust der Barriere folgen unter anderem Ischämie, traumatische Rückenmarksverletzungen, Transplantant-Glomerulopathie, Krebs und diabetische Retinopathie, weswegen PLVAP in den Fokus für neue Therapieansätze rückt [66,70-80].

1.3.2. Molekulare Charakteristiken von PLVAP

Bei PLVAP handelt es sich um ein 55-65 kDa großes N-glykosyliertes Glykoprotein des Typs II, das in die Membran integriert ist, *in situ* Homodimere formt und bei physiologischem pH-Wert Heparin binden kann (*SIEHE ABBILDUNG 2*) [14,48,52,53,81,82]. Auf molekularer Ebene lässt sich das Protein in eine kurze 27 Aminosäuren (AS) umfassende intrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine große, 380 AS beinhaltende extrazelluläre Domäne unterteilen (*SIEHE ABBILDUNG 2A, B*) [31,52,53]. Innerhalb der nicht konservierten intrazellulären Domäne befinden sich zwei kurze fast identische Abschnitte aus 7 bzw. 8 AS, wovon der 7 AS zählende dem N-Terminus zugewandt ist und der 8 AS umfassende näher an der Transmembrandomäne liegt und eine mögliche Caveolin-1 Bindestelle repräsentiert [31,83]. Dagegen ist die extrazelluläre Domäne hoch konserviert und weist vier N-Glykosilierungsstellen, zwei Coiled-Coil-Domänen und eine Prolin-reiche Region in der Nähe des C-Terminus auf (*SIEHE ABBILDUNG 2A, B*) [52,82]. Die gesamte extrazelluläre Domäne wird von α -Helices dominiert, deren Anordnung dem Protein eine stabähnliche Struktur verleihen. Indem zwischen jeder siebten hydrophoben AS benachbarter PLVAP-Proteine eine Bindung geformt wird, entsteht eine intermolekulare Superhelix, die zur Ausbildung der Homodimere führt (*SIEHE ABBILDUNG 2C*) [52,57]. Diese Homodimere lagern sich zu radialen Fibrillen zusammen, die letztendlich FD und SD ausbilden. Untersuchungen von FD mit Hilfe von Schockfrosten- und Tiefätzen-Elektronenmikroskopie zeigten, dass PLVAP-Homodimere in einer oktogonalen radförmigen Symmetrie angeordnet sind (*SIEHE ABBILDUNG 2D*) [27,31,84]. Die extrazellulären Enden der Fibrillen verflochten sich dabei zu einem zentralen Netz, während die intrazellulären Enden das Protein in der Zellmembran verankern, indem sie entweder direkt an das Cytoskelett oder indirekt an dieses über Adaptermoleküle binden (*SIEHE ABBILDUNG 2D*) [31,54]. Um das Konstrukt auf der extrazellulären Seite zu stabilisieren, ist das Protein in der Nähe der

Transmembrandomäne in solch einem Ausmaß glykolisiert, dass die Masse der Glykolisation bis zu 15 % des Gesamtgewichts des Proteins ausmacht (*SIEHE ABBILDUNG 2C*). Es wird angenommen, dass die maximale Distanz zwischen den benachbarten, radial angeordneten Fibrillen ungefähr 6 nm beträgt. Dieser Wert beruht auf ultrastrukturellen Bildern, die mithilfe von Elektronenmikroskopie aufgenommen wurden [84,85].

1.3.3. Funktionen von PLVAP in nicht-Barriere-formenden & Barriere-formenden EZ

PLVAP gilt als essenzieller Regulator vaskulärer Permeabilität während der Embryogenese und in postnatalen physiologischen Prozessen, zu denen unter anderem die Aufrechterhaltung der Blutkomposition und die Organhomöostase zählen [13,41,42,49,53,55,61,86,87]. Die exakten Funktionen von PLVAP sind jedoch stark davon abhängig, ob es in fenestrierten oder nicht fenestrierten EZ exprimiert wird. Zu den EZ, die keine Barrieren formen, zählen fenestrierte EZ, die von FD abgedeckt werden (ausgenommen sind EZ der Glomeruli der Niere und der Leber-Sinusoid-Kapillaren, welche beide keine FD ausprägen), und die kontinuierlichen Endothelien der Haut, der Muskulatur und der Lunge [48,49,56,62].

Fenestrierte EZ exprimieren PLVAP auch über die Embryogenese hinaus im adulten Gewebe, wo es dazu beiträgt, einem exzessiven Proteinverlust des Blutstroms in das umliegende Gewebe vorzubeugen [88-90]. Aufgrund seiner Lokalisation in den Diaphragmen, wird PLVAP als Filter für FD und SD angesehen, der die Passage von Wasser und gelösten Stoffen ermöglicht, aber eine Größenlimitation für Makromoleküle darstellt, und gilt somit als Feinregulator der vaskulären Permeabilität [91]. Fehlt PLVAP, führt dies folglich zum Fehlen von FD und SD und zu einer Leckage von Proteinen aus dem betroffenen Gefäß. Dabei scheint der Verlust der FD schwerwiegender als der der SD, da *Fenestrae* ohne Diaphragmen Poren formen, welche die Kapillarlumen mit dem darunter liegenden Gewebe direkt verbinden und so eine unkontrollierte Diffusion von Makromolekülen ermöglichen. Fehlende SD erlauben zwar den Eintritt der Makromoleküle in Vesikel, der Vesikuläre Transport wird jedoch nicht betroffen. Dieser benötigt weitere Proteine, wie Caveolin-1, Dyneine und SNARE-Proteine. Diese regulieren auch die Formation, Abschnürung und Fusion von *Caveolae* [88-90].

In EZ, die eine Barriere ausformen, wie z.B. in der BHS (*SIEHE ABBILDUNG 1 & ABBILDUNG 3*) oder der BRS, wird PLVAP im ausdifferenzierten Gewebe nicht mehr exprimiert, sodass eine erneute Expression von PLVAP zum Verlust der Barriereintegrität führt [55,61,91-94]. Dies verursacht Gefäßdurchbrüche und schließlich den Zusammenbruch der Barriere [95]. Daher tritt eine Expression von PLVAP in diesen EZ nur unter pathogenen Konditionen auf [91]. Dazu zählen z.B. diabetische Makulaödeme (*diabetic macular edema* (DME)), welche Blindheit oder Gehirntumore verursachen [71,96], diabetische Retinopathie [70,72,97], Gehirnschämie [66,73] und Gehirntumore [59,73].

Menschen mit einer *nonsense* Mutation im *plvap*-Gen entwickeln, aufgrund des Verlusts der Barrierefunktion und dem Austreten der Plasmakomponenten in das Interstitium von Organen mit fenestrierten Kapillaren, Protein-Verlust Enteropathie, Hypoproteinämie, Hypoalbuminämie und Hypertriglyzeridämie [49,98]. Diese können zu einem Kwashiorkor-ähnlichem Auszehrungssyndrom und letztendlich zum Tod führen [49,98]. Als besonders wichtige Regulatoren der Barriereintegrität gelten dabei Claudin-5 (CLDN5) und Occludin (OCLN) in ihrer Funktion als Regulatoren des parazellulären Transports, und Caveolin-1 und PLVAP als Regulatoren des vesikulären und transzellulären Transports [74].

1.3.4. Regulation von PLVAP

Betrachtet man die zahlreichen Krankheiten, die durch eine fehlerhafte Permeabilität der Gefäße durch veränderte PLVAP Expression in den betroffenen Geweben hervorgerufen werden, wird ersichtlich, dass die Expression vom PLVAP genauestens an die Bedürfnisse der jeweiligen Gefäße und der darunter liegenden Gewebe angepasst und reguliert werden muss. Als Hauptregulator der PLVAP-Expression wurde der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) identifiziert [70,74,79,99,100]. Weitere identifizierte Regulatoren von PLVAP in unterschiedlichen EZ sind Angiotensin-2 [99], Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) [65], durch Norrin/WNT vermittelte β -Catenin Signaltransduktion [76,93,101,102], Notch-abhängige Signalübermittlung, der transformierende Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* (TGF- β)) [103,104], inflammatorische Mediatoren, wie der Tumornekrosefaktor- α (*tumor necrosis factor- α* (TNF- α), und Scherstress [105].

Über die Regulation von PLVAP im zentralen Nervensystem (ZNS) ist bisher noch nicht sehr viel bekannt, da sich die meisten Studien mit dem Barriere-formenden Endothel der BHS oder der BRB beschäftigen, in denen *plvap* nur nach pathologischen Veränderungen exprimiert wird und so zur Ausprägung zahlreicher Erkrankungen führt [55,61,91-94]. Allerdings besitzt das ZNS noch weitere Grenzflächen zwischen Blutkreislauf und dem Parenchym, die nicht zur BHS oder der BRS zählen (*SIEHE ABBILDUNG 3*). Der PC gilt zum Beispiel als ein Grundorgan der Blut-Liquor-Schranke (*blood-cerebrospinal fluid barrier*; BLS) und besteht aus Epithelzellen (EPZ) und EZ. Im Gegensatz zur BHS und der BRS ist das Endothel des PC fenestriert und exprimiert *plvap*, sodass es eine größere Permeabilität als die Endothelien der BHS und der BRS aufweist. Es ist denkbar, dass sich die Regulation von PLVAP in diesen verschiedenen Endothelien unterscheidet, sodass es zur Ausprägung der unterschiedlichen Funktionen und Phänotypen kommt.

1.4. Das zentrale Nervensystem

Das ZNS benötigt ein strikt homöostatisches und steriles Umfeld, um seine Funktionalität aufrecht zu erhalten. Durch die Abschirmung des ZNS vom Rest des Körpers können sowohl der Metabolit-Influx als auch der Efflux von Stoffwechselendprodukten kontrolliert werden. Zwei der Barrieren, die diese Funktionen ermöglichen, sind die BHS und die BLS. Hinweise auf die Existenz dieser Barrieren ergaben sich bereits im 16. Jahrhundert, als Leonardo da Vinci das Ventrikelsystem im Gehirn illustrierte, welches später als Ort der Lokalisation des PC und damit der BLS identifiziert wurde [106]. Darüber hinaus konnten Ehrlich und Goldmann zur Wende des 20ten Jahrhunderts die Abgrenzung des ZNS vom Blutkreislauf beweisen [107,108]. Bei den von Ihnen durchgeführten Studien färbte ein in den Blutkreislauf injizierter Farbstoff alle Organe bis auf das Gehirn an, während umgekehrt nach Injektion des Farbstoffes in den *Liquor cerebrospinalis* (*cerebrospinal fluid*; CSF) nur das Gehirn gefärbt wurde [107,108]. Dies weist auf das Vorhandensein von Barrieren zwischen dem Blut und dem ZNS hin.

1.4.1. Blut-Hirn-Schranke

Die Barriere mit der größten Oberfläche zwischen dem Blut-Kreislauf und dem ZNS stellt die BHS dar (SIEHE ABBILDUNG 3B) [109-112]. Sie wird aus den die Kapillaren formenden EZ gebildet, die durch die TJ Proteine *Zonula occludens*1-3 (ZO1-3) und *adherens junctions* (AJ) Proteine wie Cadherine dicht miteinander verbundenen sind [109-113]. Die dabei gebildeten Zell-Zell-Verbindungen sind oftmals mehrreihig ausgeprägt, sodass eine physische Barriere entsteht, die für viele Moleküle unpassierbar ist. Verstärkt wird dieser Effekt noch durch das Fehlen von Fenestrierungen, wie sie in anderen Endothelien auftreten, und einer sehr geringen Anzahl pinozytischer Vesikel [112,114]. Zur Aufrechterhaltung der BHS und ihrer Funktionalität befinden sich zusätzlich Astrozyten und Perizyten im Verband mit den EZ, wobei Perizyten und EZs eine besonders enge Verbindung miteinander eingehen (SIEHE ABBILDUNG 3B). Dadurch entsteht die sogenannte Basallamina, die im Raum der extrazellulären Matrix von den Endfüßen der Astrozyten umgeben wird. Andere Zelltypen der extrazellulären Matrix wie Mikroglia und die Enden von Nervenzellen, tragen zusätzlich zur Unterstützung der BHS bei [115].

Die Endothelzellschicht der BHS stellt allerdings auch eine Verbindung zwischen dem ZNS und dem peripheren Kreislauf dar, und muss, trotz des im Vergleich zu anderen Kapillarendothelien stark reduzierten parazellulären und transzellulären Transports, das unterliegende Gewebe mit genügend Nährstoffen versorgen [112]. Zu den wichtigsten Transportsystemen zählen dabei Rezeptor-vermittelte Endozytose, aktiver Effluxtransport durch *Solute carrier* Transporter sowie Ionentransport [116]. Daher besitzt die BHS eine Reihe an spezialisierten Adenosintriphosphat (ATP)-bindende Kassetten (ABC) Transportern und weitere Transzytose-Mechanismen, die den Zufluss von Makromolekülen und somit den Stoffaustausch zwischen Blut und ZNS regulieren. Zusammen repräsentieren sie die chemische Komponente der Barriere, die einen selektiven Austausch ermöglicht. Für den selektiven Austausch durch unterschiedliche selektive Transporter sprechen die ausgeprägte Anzahl an Mitochondrien in den EZ der BHS, die deren Energiebedarf und metabolische Aktivität decken müssen [109,117].

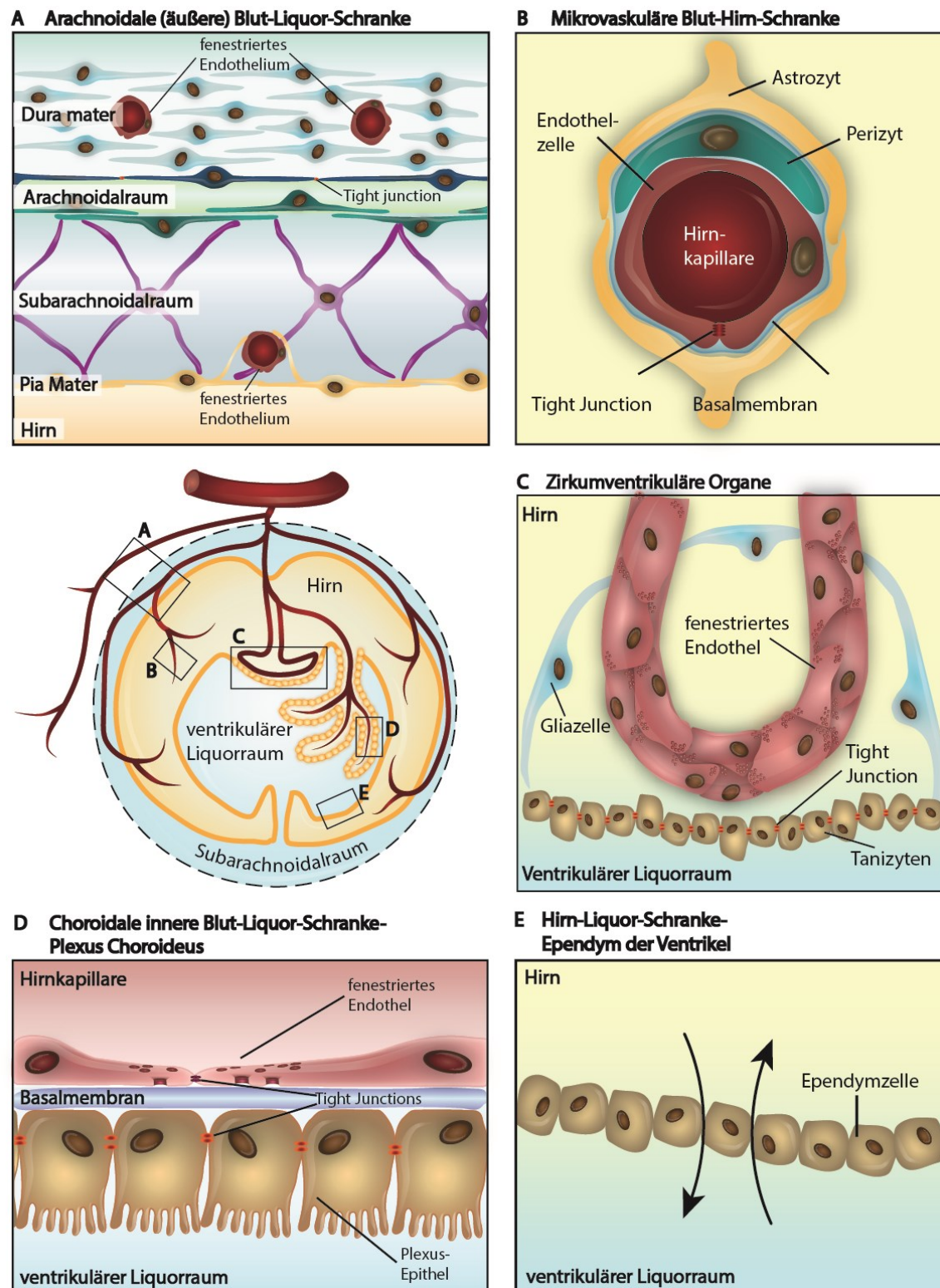


Abbildung 3 Ausprägungen der Barrieren zwischen peripherem Blutkreislauf oder Gewebe und dem ZNS. A Nach außen hin wird das Gehirn durch die arachnoide Blut-Liquor-Schranke, welche zwischen dem Subarachnoidalraum (äußerer Liquorraum) und der Dura mater durch arachnoide Grenzstellen ausgebildet wird, abgeschirmt. B Das Gehirnparenchym wird vom Blutkreislauf durch die BHS isoliert. Das Grundelement der Barriere bilden die durch TJ versiegelten mikrovaskulären EZ der Gehirnkapillaren, welche zusätzlich durch Perizyten und Astrozyten eingefasst werden. C Die Blutgefäße der Zirkumventrikulären Organe weisen große Ähnlichkeiten zu peripheren Gefäßen auf. Dabei wird der innere Liquorraum durch Tanizyten abgegrenzt. D Die choroidale innere Blut-Liquor Schranke trennt den Blutkreislauf des im Ventrikelsystem lokalisierten Plexus choroideus von dem ventrikulären Liquor ab. Das Endothel des PC ist im Gegensatz zur BHS fenestriert, sodass die eigentliche Barrierenfunktion von den dicht mit TJ verbundenen Epithelzellen übernommen wird. (Modifiziert nach Borkowski et al. 2020 [118])

Neben der BHS, existiert noch eine weitere Grenzfläche zwischen ZNS und Blutkreislauf, die BLS. Diese ist in zwei Strukturen, dem PC (*ABBILDUNG 3D*) und der *Arachnoidea* (*ABBILDUNG 3A*), lokalisiert. Im weiteren Verlauf wird näher auf die choroidale innere BLS als Grenzfläche des PC zum inneren Liquorraum fokussiert.

1.4.2. Blut-Liquor Schranke

Die innere BLS wird zwischen dem Blut-Kreislauf und der CSF ausgebildet und erstreckt sich über alle vier Ventrikel des PC [119]. Damit repräsentiert die BLS eine weitere hoch vaskularisierte Barriere des ZNS mit der zweitgrößten Oberfläche nach der BHS. Die Zellen des PC, die auch den Großteil der CSF im ZNS produziert, welche eine wichtige stoßdämpfende Eigenschaften für das Gehirn ausübt [120], bilden die Grundstruktur dieser Barriere. Zu dieser Grundstruktur (*SIEHE ABBILDUNG 3D*) zählen ein durch TJ und TJ-assoziierte Proteine (wie ZO1 und OCLN) dicht verbundenes Epithel und ein fenestriertes Endothel entlang der Blutgefäße [119-121]. Dementsprechend übernimmt das spezialisierte neuroektodermale Epithel die Ausbildung der Schrankenfunktion dieser stark vaskulierten Barriere [120,122]. Neuere Studien deuten allerdings darauf hin, dass das Endothel des PC die Barrierefunktion der BLS beeinflussen kann [122,123].

Die stark polarisierten Epithelzellen sitzen, mit der apikalen Seite dem CSF zugewandt, auf einer Basalmembran mit darunter liegendem Stroma [120]. Es handelt sich zudem um hochkuboidale Zellen, die von Ependymzellen (*SIEHE ABBILDUNG 3E*) abstammen, und im Bereich der Ventrikelaufhängung in diese übergehen [124]. Zur Optimierung der Sekretion des CSF ist die Oberfläche der apikalen Seite durch einen Bürstensaum aus Mikrovilli stark vergrößert [125]. Die polare Expression von Transportern und Ionenkanälen in den Epithelzellen des PC ermöglicht die Produktion des CSF [125].

Die Produktion des CSF wird durch den Fluss von Natrium (Na^+), Chlorid (Cl^-) und Bicarbonat (HCO_3^-) über die Zellmembran ermöglicht. Dieser Fluss wird durch einen osmotischen Gradienten mit Hilfe der Aktivität der basolateralen Natrium/Kalium-ATPasen infolge des Zerfalls von Kohlensäure, welcher durch carbonische Anhydrasen katalysiert wird, erzeugt [119,125]. Folglich werden die entstandenen HCO_3^- und H^+ Ionen gegen Cl^- und Na^+ ausgetauscht und reichern sich in den Epithelzellen des PC an. So wird stetig Wasser aus dem Blutkreislauf über Aquaporin 1 Kanäle in das ZNS aufgenommen und schätzungsweise 500 ml CSF am Tag produziert, wodurch die CSF drei bis fünfmal täglich ausgetauscht wird [126]. Die Zusammensetzung der sekretierten CSF bleibt dabei stets konstant.

Darüber hinaus repräsentiert die BLS nicht nur eine physikalische Barriere, die potenzielle Pathogene und andere über das Blut übertragbare Bedrohungen für das ZNS abwehrt [119,125]. Die Epithelzellen sind mit einer großen Anzahl von transmembranalen Efflux-Transportern, wie ABC-Transporter, und anderen Enzymen ausgestattet, um neurotoxische Substanzen zu entfernen oder abzubauen [125]. Weitere passive und aktive Transporter sorgen für den Austausch von Substraten, während gleichzeitig die freie Diffusion über die Barriere verhindert wird. Unter diese weiteren Transporter fallen z.B. Mitglieder der *Solute-Carrier* Familie [119]. Da das Endothel des PC im Gegensatz zu dem der BHS stark fenestriert ist, werden Wasser, Nährstoffe und Immunzellen nicht durch das Endothel abgehalten und deren selektiver Transport wird vom Blut ins ZNS über das Epithel reguliert [120]. Das Zusammenspiel von Epithel und Endothel des PC dient somit der Aufrechterhaltung der BLS, der Produktion der CSF und der Homöostase des ZNS.

1.4.3. Bedeutung der Barrieren für das ZNS

Die Barrieren des ZNS, wie die BHS oder die BLS, tragen deutlich zum Schutz und der Homöostase des ZNS bei. Daran beteiligt sind auch unterschiedliche Immunzellen, die, im Vergleich zum Blutkreislauf, in sehr geringer Anzahl im ZNS vorkommen [127,128]. So wurden im Hirnparenchym vorwiegend Mikroglia, die zu Phagozyten gezählt werden, im Stroma der BLS Makrophagen und dendritische Zellen und an den Mikrovilli des PC ebenfalls Phagozyten, die sogenannten Epilexuszellen oder Kolmer-Zellen, als vorherrschende Immunzellen beschrieben [126]. Darüber hinaus konnten Immunzellen im ZNS detektiert werden, die unter nicht-entzündlichen Bedingungen im Blutkreislauf vorkommen [127]. Generell konnte im gesunden Zustand ein sehr niedriges Verhältnis von Immunzellen im ZNS zum Blut von 1 zu 2500 für T- und B-Zellen und 1 zu 2000 für Monozyten festgestellt werden, was ungefähr einem Leukozyten pro μl CSF entspricht [128]. Aus diesen Gründen wird das ZNS-Parenchym als immunprivilegiertes Ort bezeichnet, der eine ordnungsgemäße Funktion von Neuronen gegenüber einer Immunantwort priorisieren kann, während die Barrieren dieses Privileg nicht besitzen, da sie die ZNS-Immunität vermitteln [127-129].

Die physikalischen und biochemischen Barrieren der BHS und BLS verhindern demnach nicht nur den Eintritt von Mikroorganismen oder neurotoxischen Substanzen über das Blut ins ZNS, sondern regulieren auch die Immunzellaktivität streng. Eine Störung der daran beteiligten komplexen Interaktionen, z.B. durch Entzündungen, und der folgende Zusammenbruch der Barrieren des ZNS werden als Teil der Pathogenese vieler schwerwiegender Krankheiten, wie z.B. der Multiplen Sklerose, angesehen [130,131]. Für viele pathogene Erreger ist bekannt, dass sie diese Barrieren überwinden und in das ZNS vordringen können, auch wenn sie zuvor eine Immunreaktion der Zellen der BHS oder BLS ausgelöst haben [132]. Die anschließende Infektion des ZNS kann einen Zusammenbruch der Barrieren bewirken. Ebenso werden Metastasenbildung und Schizophrenie als Ursache diskutiert [131,133-137].

1.5. WNT/ β -Catenin-Signalweg

Einen fundamentalen Mechanismus innerhalb der Embryogenese und der Homöostase im Gewebe stellt die sogenannte WNT-Signaltransduktion dar, welche durch die Sekretion von Glykoproteinen aus der Familie der WNT-Proteine initiiert wird [138,139]. Während der Embryogenese spielt der WNT-Signalweg in vielen unterschiedlichen Gefäßsystemen, u.a. der Mikrovaskulatur des ZNS, eine zentrale Rolle in der Vaskulo- und Angiogenese. Gerät die WNT-vermittelte Signalübertragung durch Über- oder Unterexpression dieses Signalweges aus dem Gleichgewicht, kann dies zu deutlichen Veränderungen der vaskulären Entwicklung und der Spezifikation von EZ führen [140,141].

Da dieser Mechanismus unter anderem die Zellproliferation, Zellpolarität und die Bestimmung des Zellschicksals steuert, ist eine Störung dieses Signaltransduktions-Prozesses beim Menschen oftmals assoziiert mit Geburtsdefekten, Krebs und anderen Krankheiten [142].

Die WNT-Signaltransduktion kann in drei unterschiedliche Prozesse aufgeteilt werden. Zunächst wird zwischen dem kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg unterschieden [139]. Der nicht-kanonische WNT-Signalweg wird nochmals unterschieden in den planaren Zellpolaritätsweg und den WNT/ Ca^{2+} -Weg [143].

In den Kapillaren des sich entwickelnden Gehirns fördert die Aktivierung des kanonischen Signalweges die Formation von TJ und Transportern [102,144-148]. Auf eine Dysregulation dieses Signalweges wurde bei vielen ZNS-Krankheiten verwiesen, die einen Zusammenbruch der BHS beinhalten, wie z.B. Multiple Sklerose [130], Schlaganfall [149], Alzheimer [150], Huntington [151] und Gehirntumore [152]. Daher ist in diesen Fällen eine therapeutische Modulation des WNT-Signalweges eine interessante Option, die

allerdings durch die große Vielfalt und Komplexität des Signalweges erschwert wird. Diese Vielfalt und Komplexität ergibt sich auch daher, dass von jedem Protein, welches in dem Signalweg eine wesentliche Rolle spielt, zahlreiche Isoformen existieren [143,144]. Hinzu kommt, dass bisher sehr wenige Kenntnisse über die Verteilung, Funktion und Aktion der einzelnen Komponenten und deren Isoformen in der Mikrovaskulatur des Gehirns existieren [144]. Von den wenigen bisher bekannten Informationen beziehen sich die meisten Daten auf die Rolle des WNT-Signalweges in der Embryogenese, jedoch nicht im adulten Gehirn. Darüber hinaus beschäftigen sich die meisten Forschungen mit der BHS, jedoch nicht mit den anderen Schnittstellen zwischen ZNS und Blutkreislauf.

1.5.1. Bestandteile des WNT-Signalweg

Der WNT-Signalweg zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Komplexität aus, die auf der Kombination seiner Bestandteile beruhen, welche über den gesamten Zweig der vielzelligen Tiere (*Metazoa*) hinweg konserviert sind [139,153]. So existieren in Säugetieren 19 WNT-Liganden, 10 Frizelled Rezeptoren (FZD), 4 Ko-Rezeptoren und 10 WNT-Modulatoren [154].

1.5.1.1. WNT-Liganden

Bei den WNT-Liganden handelt es sich um ca. 350-400 Aminosäuren umfassende, sekretierte Wachstumsfaktoren, deren Aminosäuresequenzen untereinander einen Identitätsgrad von 27 % bis 83 % aufweisen und ein konserviertes Muster aus 23 oder 24 Cysteinen teilen [139,153]. Alle WNT-Liganden sind von ähnlicher Größe und erreichen ein Molekulargewicht von 39 kDa (WNT7a) bis zu 46 kDa (WNT10a) [153]. Über ihre Struktur ist allerdings wenig bekannt, da sie nicht löslich sind. Aufgrund des hochkonservierten Musters aus Cysteinen wird jedoch angenommen, dass die Ausbildung mehrerer intramolekularer Disulfidbrücken wesentlich zur Faltung der Proteine beiträgt. Aus Experimenten mit chimären WNT-Proteinen und Deletionsmutanten wird abgeleitet, dass der N-Terminus der Proteine für die Bindung an Rezeptoren benötigt wird, während C-terminale Bereiche Zielrezeptoren aktivieren und die Spezifität der Reaktion auf die unterschiedlichen WNT-Proteine festlegen [155-157]. Außerdem wird ein Lipid mit einer Acyl-Gruppe, eine sog. Palmitoleinsäure, während der Synthese an das Protein durch eine Palmitoyl-Transferase namens Porcupin angehängt, eine Modifikation, die vermutlich übergreifend bei allen WNT-Proteinen stattfindet [153,158-160]. Es wird angenommen, dass dieses Lipid als Bindemotiv für die FZD fungiert [161]. Darüber hinaus verleiht das Lipid dem Protein hydrophobe Eigenschaften, die es an die Zellmembran binden, und trägt somit womöglich zur Begrenzung des WNT-Aktionsradius bei. Das Transmembranprotein Wntless/Evi bindet die lipid-modifizierte Form im Verlauf dieser Maturation und überführt diese an die Plasmamembran, sodass das WNT-Protein sekretiert werden kann [155,162-166]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Proteine keineswegs frei im extrazellulären Raum vorliegen, sondern mit Glykosaminoglykanen assoziieren und daher eng an die Zelloberfläche gebunden bleiben oder in Vesikel und Exosomen integriert und auf deren Oberfläche präsentiert werden [167-172]. Ein anderes Modell besagt, dass der Transfer von WNT-Proteinen zwischen direkt benachbarten Zellen stattfindet und zusätzlich zu den FZD noch die transmembranen E3 Ligasen RNF43/ZNRF3 benötigt werden [173]. Obwohl in einigen Fällen angenommen wird, dass sekretierte WNT-Proteine als weit reichende Morphogene fungieren, geschieht die Signalübertragung mittels WNT in den meisten Geweben über den direkten Kontakt benachbarter Zellen [174].

1.5.1.2. WNT-Rezeptoren und Ko-Rezeptoren

Im kanonischen WNT-Signalweg spielen zwei Rezeptorfamilien, die Transmembranrezeptoren aus der Familie der FZD und deren Ko-Rezeptoren, *low-density lipoprotein receptor related protein 6* (LRP6) und LRP5, eine wichtige Rolle [138,175]. Bei den FZD handelt es sich um sogenannte sieben-Transmembran (7-TM) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein-coupled receptors*; GPCR), wodurch die Vermutung nahe gelegt wird, dass WNT-Signale durch heterotrimere G-Proteine weitergeleitet werden [155]. Tatsächlich wurde gezeigt, dass eine Untergruppe der FZD mithilfe der Pertussis Toxin-sensitiven Unterklasse der heterotrimeren G-Proteine intrazelluläres Ca²⁺ anreichern und so die Protein-Kinase C (PKC) aktivieren kann [176-180]. Neben der 7-TM GPCR enthält die Struktur der FZD eine N-terminale Cystein reiche Domäne (CRD) zur Bindung der WNT-Proteine und einen kurzen zytoplasmatischen Teil, der ein PDZ bindendes Motiv aus den Aminosäuren S/T-X-V am C-terminalen Ende enthält. Die CRD formt eine neue Proteineinbuchtung mit einer konservierten Dimer-Verbindung, welche als wichtige Bindestelle für WNT-Proteine betrachtet wird [181].

Die FZD weisen unterschiedliche Kapazitäten zur Aktivierung von β -Catenin (CTNNB) auf, sobald sie mit WNT und LRP5/6 ko-überexprimiert werden [138,182]. Dabei ist eine partielle funktionelle Redundanz zwischen den einzelnen FZD wahrscheinlich. Da FZD sowohl Bestandteil des kanonischen als auch des nicht-kanonischen WNT-Signalweges sind, scheint die Aktivierung des betreffenden Signalweges durch ein bestimmtes WNT-Protein von der Zusammensetzung des involvierten Rezeptor-Komplexes abzuhängen [183]. Der CTNNB abhängige kanonische WNT-Signalweg wird nur aktiviert sobald ein WNT-FZD-Komplex LRP5/6 rekrutieren kann, und wird folglich das FZD-LRP5/6 Ko-Rezeptor Modell genannt [175]. Die beiden Ko-Rezeptoren LRP5 und LRP6 sind partiell redundant, allerdings ist LRP6 meist dominant vertreten. Darüber hinaus ist LRP6 essenziell für die Embryogenese, während LRP5 eine kritische Rolle in der adulten Knochen-Homöostase spielt [175]. Es wird angenommen, dass LRP6 den nicht-kanonischen Signalweg *in vivo* antagonisiert, was durch konkurrierende WNT-Liganden erklärt werden könnte oder aber durch einen bisher unbekanntem Mechanismus [184,185]. Im Gegenzug wurden weitere WNT-Rezeptoren wie RYK und ROR2 nachgewiesen, die in manchen Fällen den kanonischen Signalweg unterdrücken [183].

1.5.1.3. WNT-Modulatoren

Zu den zahlreichen von der Zelle abgegebenen Proteinen, die den WNT-Signalweg antagonisieren oder modellieren, gehören die sekretierten Frizzled-verwandten Proteine (*secreted Frizzled related proteins*; sFRP) und das WNT-inhibitorische Protein (*Wnt inhibitory protein*; WIF). Diese sind in der Lage WNT zu binden und können dadurch sowohl den kanonischen als auch den nicht-kanonischen WNT-Signalweg inhibieren, jedoch sind nur sFRP dazu fähig auch an FZD zu binden [186]. Bei der Bindung an FZD wurde eine hohe Redundanz unter den sFRP nachgewiesen und einige sFRP scheinen auch Funktionen unabhängig der WNT-Signaltransduktion aufzuweisen, zum Beispiel als Regulatoren extrazellulärer Proteinasen [186,187].

Zusätzlich zu den bereits genannten WNT-Antagonisten, existieren zwei Familien an WNT-Inhibitoren, diejenigen der Dickkopf (DKK) und der Wise/SOST Familien. Ausgenommen von DKK1 handelt es sich bei den Proteinen der DKK-Familie um LRP5/6 Liganden bzw. Antagonisten, welche daher als spezifische Inhibitoren des kanonischen WNT-Signalweges betrachtet werden [188,189]. Dagegen scheint der Mechanismus, mit Hilfe dessen DKK1 den WNT-Signalweg inhibiert, nicht vollständig geklärt zu sein. Die vorherrschende Theorie besagt, dass DKK1 die Ausbildung des WNT-induzierten FZD-LRP6 Komplexes unterbricht, wobei in manchen Geweben die transmembranen Kremen (KRM)

Proteine eine geringe modulatorische Funktion übernehmen [108,189,190]. Ebenso wie DKK1 soll Sclerostin (SOST) die Formation des durch WNT-Liganden induzierten FZD-LRP6 Komplex *in vitro* unterbrechen können. Daher wird SOST als LRP5/6 Ligand bzw. Antagonist angesehen. Bei WISE handelt es sich ebenfalls um einen LRP5/6 Antagonisten [189,191,192].

Mit den Norrin und R-spondin (RSPO) Proteinen existieren zwei Protein-Familien, die als Agonisten des kanonischen WNT-Signalweges gelten [193]. Als ein spezifischer Ligand für FZD4 interagiert Norrin während der retinalen Vaskularisation mit FZD4 und LRP5/6 [193]. RSPO scheint währenddessen eine Synergie mit WNT, FZD und LRP6 einzugehen und während der Embryogenese auch eine allgemeine Interaktion mit LRP6 zu zeigen, wobei der Interaktionsmechanismus kontrovers diskutiert wird [194-197]. Es wurde in unterschiedlichen Quellen berichtet, dass RSPO an FZD und LRP6 [195], in erster Linie an LRP6 [196] oder an keines der beiden bindet [198]. Ein anderes Modell besagt, dass RSPO ein Ligand von KRM ist und die DKK/KRM vermittelte Internalisation von LRP6 unterbindet [182]. Gegen letzteres Modell spricht jedoch, dass KRM2 Doppel-KO Mutanten lebensfähig sind, keine Phänotypen von RSPO-Mutanten ausbildeten und RSPO die Signalübermittlung via CTNNB aktivieren kann, obwohl beide KRM-Gene fehlen [108,197]. Interessanterweise werden RSPO-Gene oft zusammen mit WNT-Genen ko-exprimiert und ihre Expression scheint sogar von derjenigen der WNT-Gene abzuhängen, was für ein positives Feedback zur Verstärkung der WNT-Signalvermittlung spricht [198].

1.5.2. Funktionsweise des kanonischen WNT-Signalweges

Der kanonische Signalweg zeichnet sich durch die Aktivierung des zytosolischen Signalmoleküls CTNNB aus, während die nicht-kanonischen Signalwege unabhängig von diesem Signalmolekül funktionieren. Es handelt sich bei CTNNB um einen transkriptionalen Ko-Aktivator, welcher, insofern kein Stimulus durch ein WNT-Protein eingeht, konstant durch den AXIN-Komplex degradiert wird (*ABBILDUNG 4*) [139]. Dieser Komplex besteht aus dem Scaffold-Protein AXIN, dem Tumor Suppressor *adenomatous polyposis coli* Genprodukt (APC), der Casein Kinase 1 (CK1) und der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) [139]. Die N-terminale-Region von CTNNB wird sequenziell durch CK1 und GSK1 phosphoryliert, was durch eine E3 Ubiquitin-Ligase Untereinheit, β -TrPC, erkannt wird [138,175]. Dies führt wiederum zur Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation von CTNNB, sodass es an der Translokation in den Nukleus gehindert und der Expression von WNT-Zielgenen vorgebeugt wird [175].

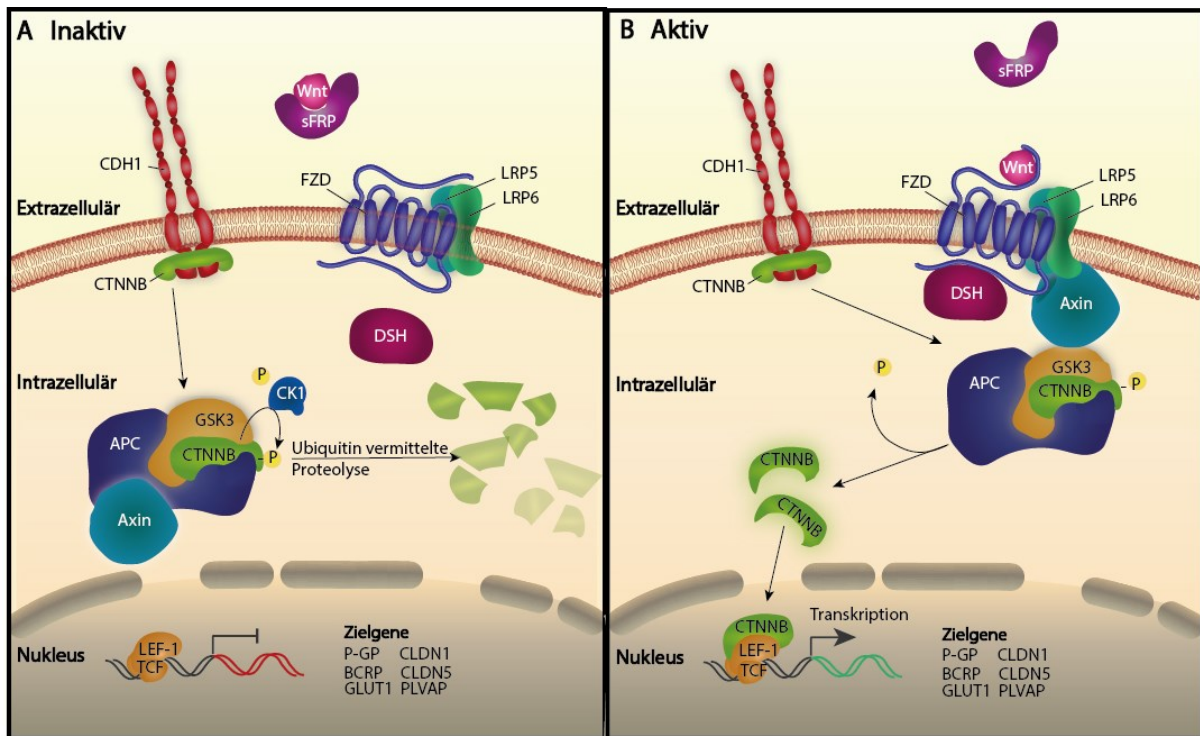


Abbildung 4 Schematische Darstellung des WNT-Signalweges. In **A** sind die Mechanismen bei einem inaktiven kanonischen WNT-Signalweges zusammengefasst, während in **B** die Abläufe nach einer Aktivierung veranschaulicht werden.

Bindet ein WNT-Ligand an einen FZD und LRP5/6, dimerisieren die beiden Rezeptoren nach einer Konformationsänderung des FZD und es kommt zur Ausbildung eines Proteinkomplexes unter Einbezug des Gerüstproteins *Dishevelled* (DVL) [174,199,200]. Infolgedessen wird LRP6 durch Phosphorylierung aktiviert, indem GSK3 oder CK1y den Ko-Rezeptor an einem Serin innerhalb der fünf wiederholenden PPPSP Motive phosphoryliert [201]. Eine Beteiligung weiterer Proteinkinasen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ein solches PPPSP Motiv kommt bei mehreren Komponenten des WNT-Signalweges vor, unter anderem bei CTNNB, AXIN, and APC [202].

Diese zweifach phosphorylierten Motive innerhalb der cytoplasmischen Teile des LRP-Komplexes gelten wiederum als Bindestelle für AXIN, sodass der AXIN-Komplex anschließend durch Bindung an die phosphorylierten Motive an den Rezeptor-Komplex rekrutiert wird [201,203-205]. Die Interaktion zwischen LRP und AXIN wird wiederum durch die Bindung von FZD und DVL ermöglicht, da deren Interaktion die Phosphorylierung von LRP6 durch GSK3 induzieren soll [206-209]. Infolgedessen wird die AXIN-vermittelte Phosphorylierung von CTNNB verhindert [139,210,211].

Die Stabilisation von CTNNB begünstigt seine Akkumulation im Zytosol und schließlich seine Translokation in den Nucleus, wo CTNNB mit Mitgliedern der *DNA-bound T cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) Proteinfamilie interagiert. Dadurch wird die Repression von WNT-Zielgenen aufgehoben und stattdessen ihre Expression ermöglicht [138,139,210,211].

1.5.3. Regulation des ZNS Endothels durch WNT-Signalübermittlung

Es wurde bereits gezeigt, dass einige der Zielgene, die mit Hilfe von WNT und CTNNB im ZNS reguliert werden, neben der Angiogenese und Differentiation auch wichtig für die Aufrechterhaltung der BHS sind [102,145-147]. Darunter fallen unter anderem PLVAP, CyclinD (CCND1), Glukosetransporter 1 (GLUT1), Permeabilitäts-Glykoprotein (*permeability glycoprotein*; P-GP), Brustkrebs-Resistenzprotein (*breast cancer resistance protein*; BCRP), AXIN2, CLAUDIN 1 (CLDN1), CLAUDIN 3 (CLDN3) und CLAUDIN 5 (CLDN5) [144]. Außerdem wurde beschrieben, dass die Gefäße unterschiedlich sensitiv auf Störungen oder Abweichungen des kanonischen WNT-Signalweges reagieren, je nachdem, welche Region des ZNS untersucht wurde. Folglich wird der WNT-Signalweg benötigt, um die Plastizität der Barriere-Eigenschaften im ausgereiften ZNS Gefäßsystem zu bewahren [20].

Weiterhin konnte auch für die BRB eine Regulation diverser zellulärer Prozesse durch den WNT-Signalweg festgestellt werden. Beispielsweise kann der WNT-Agonist Norrin zusammen mit FZD4, LRP5 und Tetraspanin-12 die retinale Angiogenese während der Embryonalentwicklung beeinflussen [212]. Weitere Studien offenbarten, dass auch in der adulten Retina Norrin und FZD exprimiert werden. Die von den beiden Faktoren vermittelte Signalübertragung bewirkt sowohl in der sich entwickelnden Retina als auch in dem tiefen Kapillarbett der neuralen Retina, dass die Expression von PLVAP herunterreguliert bzw. blockiert und so die Permeabilität der BRB verringert wird [213]. Wurde dagegen die Interaktion von Norrin oder WNT3a und FZD4 unterbrochen, konnte eine Induktion der PLVAP Expression in tiefen Gefäßbetten und damit eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität innerhalb der adulten neuronalen Retina beobachtet werden [213]. Durch Inhibition der CTNNB-vermittelten Transkription konnten diese Phänotypen, welche auch bei Gefäßentwicklungsstörungen und Barriere-defekten aufgrund fehlender Rezeptoren, Ko-Rezeptoren oder Liganden festgestellt werden konnten, reproduziert werden [20]. Eine erneute Stabilisation von CTNNB konnte diese vaskulären Defekte in Gehirn und Retina wieder verbessern [20]. Diese Beispiele verdeutlichen, dass der kanonische WNT-Signalweg ein unverzichtbarer Regulator während der Angiogenese des Gehirns, der postnatalen Reifung der Gefäße im ZNS und letztendlich auch der Etablierung der BHS ist [76,102,213,214].

Darüber hinaus spielt der kanonische WNT-Signalweg eine Rolle in der Aufrechterhaltung der BHS im adulten Gehirn, da WNT und Notch an der Signalübermittlung zur Kontrolle der Herabregulation von PLVAP in spezialisierten Gefäßbetten der BHS beteiligt zu sein scheinen [20,76,102-104,211,213,215-218]. Betrachtet man allerdings den Einfluss unterschiedlicher Gefäßbetten und Anforderungen bestimmter Mikroumgebungen auf die Entwicklung der EZ, dann wird deutlich, dass noch viel Forschung notwendig ist, um die Regulation von PLVAP in diesem Kontext zu verstehen. Ebenso interessant ist der Einfluss von PLVAP auf die Ausbildung von *Fenestrae*, FD und SD innerhalb der EZ dieser unterschiedlichen Gefäßbetten und Gewebe. So gibt es Hinweise darauf, dass eine differenzielle Regulierung des WNT-Signalweges dazu beiträgt in unterschiedlichen ZNS-Regionen die vorhandenen EZ so anzupassen, dass ihre Eigenschaften den jeweiligen Anforderungen entsprechen [214]. Ein besseres Verständnis der gegenseitigen Beeinflussung und Regulierung der unterschiedlichen ZNS-Regionen untereinander, sowie der daraus entstehenden Anforderungen an EZ, könnte zukünftig die Anwendung neuer therapeutischer Strategien zur gezielten Bekämpfung der zahlreichen Facetten kardiovaskulärer Krankheiten ermöglichen.

1.6. Ziel dieser Arbeit

Ein Grundbaustein moderner Forschung ist die Verwendung von Zellen, welche aus einem tierischen oder humanen Gewebe entnommen wurden [219]. Das Problem dieser primären Zellen ist ihre natürliche Seneszenz, d.h., dass sie eine beschränkte Lebensdauer haben und nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen (das sog. Heyflick-Limit) absterben. Daher wurden viele der in der Literatur beschriebenen Zelllinien ursprünglich aus Tumorgeweben entnommen, deren Zellen tendenziell immortalisiert sind, sich aber häufig auch drastisch von den Zellen des entsprechenden gesunden Gewebes unterscheiden [219]. Durch experimentelle Immortalisierung von Zellen aus Normalgewebe kann man diese Probleme umgehen, indem p53/p16/pRb inhibiert wird und sich die Zellen dadurch unbegrenzt teilen können [219,220]. Neben Mutation der *p53* und *pRb* Gene und der Einführung von Onkogenen kann auch die ektopische Expression der Telomerase oder der TERT zur Immortalisierung einer Zelle verwendet werden [219]. Allerdings können auch bei immortalisierten Zelllinien mit der Zeit deutliche Unterschiede zu den primären Zellen auftreten [221].

Der humane PC ist ein hoch vaskularisiertes Organ in den Ventrikeln des Gehirns, das unter anderem bei der CSF Produktion, der Gehirnentwicklung, dem Alterungsprozess des ZNS, Neuro-Immun-Interaktionen, der Pathogenese von ZNS Infektionen, neurodegenerativen Krankheiten und der Bildung der BLS eine bedeutende Rolle spielt [120,222]. Die Überwindung dieser Barriere durch Pathogene und ihr Zusammenbruch wurde im Zusammenhang mit ZNS-Infektionen und zahlreichen neurodegenerativen Krankheiten beschrieben [120,222-225]. Im Gegensatz zu dem dichten Epithel, das die Barrierefunktion der BLS übernimmt, ist das Endothel des PC, welches das Lumen der Blutgefäße vom Gewebe abtrennt, fenestriert [120,222]. Neue Beobachtungen verweisen allerdings auf einen wichtigen Beitrag des Endothels bei der Regulierung der BLS [11,122]. Diverse Erkenntnisse über die Funktionen des PC konnten durch die Anwendung von *in vitro* Modellen gewonnen werden, unter anderem mit Hilfe einer humanen PC-Epithelzelllinie (HIBCPP Zellen), aber eine Zelllinie des PC Endothels stand bis vor kurzem nicht zur Verfügung [76,93,101,102,226,227]. Durch ektopische Expression der TERT wurde in unserem Labor vor kurzem aus primären PC Endothelzellen eine immortalisierte Zelllinie (iHCPEnC) generiert, welche typische Eigenschaften des primären PC Endothels, wie die Ausbildung von *Fenestrae*, aufweist [123]. Im nächsten Schritt war es nötig, diese Zelllinie molekularbiologisch zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit die Zelllinie noch alle wesentlichen Charakteristiken der primären Zellen aufweist, und in welchem Maße sie sich von diesen unterscheidet. Dazu wurden primäre Zellen der Passage 6 (p6) mit den iHCPEnC verglichen. Für die Analyse wurde sowohl eine frühere Passage (p20) als auch eine spätere Passage (p50) der immortalisierten Zelllinie herangezogen, um zusätzlich die Stabilität der Zelllinie zu untersuchen. Mithilfe einer RNA-Sequenzierung wurde ein Überblick über den Ähnlichkeitsgrad der beiden Zelllinien und der beiden Altersstufen gewonnen.

Im Gegensatz zum Endothel der BHS exprimieren die Endothelzellen des PC PLVAP, die einzige bekannte Komponente von FD und SD [52,57]. Es wurde bereits gezeigt, dass neben VEGF als Hauptregulator auch die Norrin/WNT-vermittelte CTNNB Signaltransduktion PLVAP reguliert [70,74,76,79,93,99-102]. In EZ ist der WNT-Signalweg besonders aktiv während der Embryonalentwicklung und ist involviert in der Vaskulo- und Angiogenese der Mikrovaskulatur. Bei Veränderungen des WNT-Signalweges durch *loss-* oder *gain-of-function* werden sowohl die vaskuläre Entwicklung der EZ als auch deren Spezifikation deutlich verändert [140,141].

Im ZNS konnte dem WNT-Signalweg eine wichtige Rolle sowohl während der Entwicklung als auch bei der Instandhaltung der Barriere-Eigenschaften der adulten Gehirnkapillaren der BHS und der BRB zugewiesen werden [76,102,213,214]. In beiden Fällen bewirkt die Aktivierung des WNT-Signalweges

eine Unterdrückung der PLVAP Expression. Wie bereits bei der pathologischen Überexpression von VEGF beobachtet, führen durch Mutationen oder pathogene Konditionen ausgelösten Störungen des WNT-Signalweges zur Hochregulierung der PLVAP Expression, einer vergrößerten vaskulären Permeabilität und damit zum Verlust der Barriere. [13]. Die Sensitivität der EZ auf das WNT/CTNNB übermittelte Signal ist dabei abhängig von der Region des ZNS, in der das betroffene Gefäß lokalisiert ist [214]. Außerdem unterscheiden sich EZ auch innerhalb desselben Gefäßbettes, z.B. weisen die EZ des PC auch in Bezug auf Endothel-Marker signifikante Unterschiede zum Endothel der BHS auf [11]. Daher könnte der WNT-Signalweg in fenestrierten EZ des PC dazu beitragen, dass PLVAP exprimiert wird, um so die Permeabilität der EZ zu regulieren. Um diese Fragestellung zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der Aktivierung des WNT-Signalweges auf die Expression von PLVAP und weitere Zielgene dieses Signalweges untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellen

Es wurden sowohl primäre Endothelzellen (HCPEnC) des humanen *Plexus choroideus* verwendet, als auch die daraus abgeleitete immortalisierte Zelllinie (iHCPEnC). Letztere wurde in unserem Labor generiert, indem die katalytische Einheit der humanen Telomerase (*human telomerase*; hTERT) exprimiert wurde.

2.1.2. Medien und Zusätze für die Zellkultur

Beschreibung	Hersteller
Attachment Factor (4ZO-201)	Cell Systems (USA)
Komplettes, Klassisches Medium mit Serum und CultureBoost™ (4ZO-500)	Cell Systems über PELOTech
Fötale Kälberserum Gold (FCS)	PAA, Pasching, A
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypsin 0,25 % (1 x), mit EDTA Na flüssig	Gibco/Life Technologies, Paisley, UK
Trypanblau	Fluka/Sigma, Steinheim, D

2.1.3. Antikörper

2.1.3.1. Primärantikörper

Beschreibung	Hersteller-bezeichnung	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
Anti-β-catenin	GTX101435	Kaninchen, polyclonal	1:200 (IF); 1:1000 (WB)	GeneTex
Anti actives β-catenin	05-665	Maus, monoclonal, Klonnr.: 8.00E+07	1:200 (IF); 1:1000 (WB)	MerckMillipore
Anti -PLVAP	abx129030	Kaninchen	1:1000 (WB)	Abxexa
Anti -PLVAP/PV-1	ab81719	Maus, monoclonal	1:200 (IF)	Abcam
Anti -β-actin	MA1-140	Maus, monoclonal, Klonnr.: 15G5A/E2	1:1000 (WB)	Thermo Fischer
Anti -GAPDH	2118	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell signalling
Anti-Rab5	3547	Kaninchen, monoclonal, Klonnr.: C8B1	1:200 (IF)	Cell signalling
Anti-Rab7a	55469-1-AP	Kaninchen, polyclonal	1:200 (IF)	Proteintech

2.1.3.2. Sekundärantikörper

Beschreibung	Hersteller-bezeichnung	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
Esel Anti-Kaninchen	AP182	HRP-gekoppelt	1:5000 (WB)	Millipore
Esel Anti-Maus	AP192	HRP-gekoppelt	1:5000 (WB)	Millipore
Esel Anti Kaninchen	A21206	Alexa-Fluor 488	1: 500 (IF)	Invitrogen
Esel Anti Maus	A21125	Alexa-Fluor 594	1: 500 (IF)	Invitrogen

2.1.4. Größenstandards und Ladepuffer

Beschreibung	Hersteller
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
4 x LDS Proben-Puffer	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Novex Sharp Protein-Standard	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
100 x reduzierendes Reagenz	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

2.1.5. Oligonukleotidprimer

Gensymbol	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragment-größe	Referenz
GAPDH	TGTTGCCATCAATGACCCCTT	CTCCACGACGTACTIONCAGCG	202	
ACTB	ATTGGCAATGAGCGGTTC	TGAAGGTAGTTTCGTGGATGC	91	Kang <i>et al.</i> , 2019
YWHAZ	CCGTTACTTGGCTGAGGTTG	TTGCATTTCTTTTTGCTGA	106	Kang <i>et al.</i> , 2019
RLP19	CTGATCAAGGATGGGCTGAT	GCCGCTATGTACAGACACGA		Rodriguez <i>et al.</i> , 2012
B2M	AGCGTACTCAAAGATTCAGGTT	ATGATGCTGCTTACATGTCTCGAT	306/ 933	Radonic <i>et al.</i> , 2004
RLP13a	GGATGAACACCAACCTTCC	AACACCTTGAGACGGTCCAG	133	Kang <i>et al.</i> , 2019
SDHA	CATCCACTACATGACGGAGCA	ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA	90	Modesto <i>et al.</i> , 2013
WNT1	CAAGATCGTCAACCGAGGCT	TCACACGTGCAGGATTCGAT	120	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT2	CGTGTGTGCAACCTGACTTC	TGTGTGCACATCCAGAGCTT	168	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT2B	GATCCGAGAGTGTGACGACC	CCTCTCGGCTACTTCTGAGC	107	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT3	TGACTCGCATCATAAGGGGC	GTGGTCCAGGATAGTCGTGC	181	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT3A	AGCAGGACTCCACCTAAAC	AGAGGAGACACTAGCTCCAGG	132	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT4	TCTTCGCCGTCTTCTCAGCC	GCACCGAGTCCATGACTTCC	162	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT5A	TGTTGCTCGGCCAGAAGTC	GCTTCAATTACAACCTGGGCG	137	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT5B	GCGAGAAGACTGGAATCAGGG	TAATGACCACCAGGAGTTGGC	163	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT6	CGGGGAGCGTTAAAGGACA	TTATTGATACTAACCTCACCCACC	159	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT7A	AGTACAACGAGGCCGTTAC	GCACGTGTTGCACTTGACAT	326	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT7B	TACGTGAAGCTCGGAGCACT	CGGAAGTGGTACTGGCACTC	176	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019

WNT8A	CTGGTCAGTGAACAATTTCC	GTAGCACTTCTCAGCCTGTT	180	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT8B	TATCAGTTTGCCTGGGACCG	CTGTCTCCCGATTGGCACTG	91	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT10A	CTGTTCTTCTACTGCTGCT	ACACACACCTCCATCTGC	152	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT10B	GTCTCCCCACGGTTTAAGCA	TCAGGACCTCCAGTGGTTTG	91	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT11	TCTTTGGGGTGGCACTTCTC	TCTGCCGAGTTCACCTGACG	177	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT9A	GACGGTCAAGCAAGGATCTG	TGCTCTCGAGTTCTTCTCA	411	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT9B	GTGTCTTGCCATAGCAGGCTT	AATAAGGAGGCCGTGTGTGAG	70	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WNT16	TCAGGGAGACCCTCTTCACAG	AGCAGGTACGGTTTCTCTTG	151	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
LRP5	ATGGGCGCCAGAACATCAA	AGATGTCGATGCTGAGGTCGTG	117	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
LRP6	TTGTTGCTTTATGCAAACAGACG	CGTTAATGGCTTCTCGCTGAC	167	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD1	GTGAGCCGACCAAGGTGTAT	CAGCCGGACAAGAAGATGAT	184	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD2	GCGAAGCCCTCATGAACAAG	TCCGTCTCGGAGTGGTTCT	116	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD3	TGAGTGTTCGAAGCTCTATGG	ATCACGCACATGCAGAAAAG		Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD4	CAGTGAGGCATGGAGGTGTT	AAAGAGCTCAAGGGGCCATC	95	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD5	TACCCAGCCTGTCGCTAAAC	AAAACCGTCCAAAGATAAACTGC	247	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD6	TGGCCTGAGGAGCTTGAATGTGAC	TATCGCCCAGCAAAAATCCAATGA	421	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD7	GTTTGGATGAAAAGATTTAGGC	GACCACTGCTTGACAAGCACAC	295	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD8	ACAGTGTGATTGCTATTAGCATG	GTGAAATCTGTGTATCTGACTGC	269	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD9	CCCTAGAGACAGCTGACTAGCAG	CGGGGGTTTATTCCAGTCACAGC	264	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
FZD10	ACACGTCCAACGCCAGCATG	ACGAGTCATGTTGTAGCCGATG	170	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
sFRP1	TGGCCCAGATGCTTAAGTG	CCTCAGTGCAAACCTCGCTGG	180	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
sFRP2	CTCGCTGCTGCTGCTCTTC	GGCTTCACATACCTTTGGAG	505	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
sFRP3	ATGGTCTGCGGCAGCCCGG	CTGTCGTACACTGGCAGCTC	431	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
sFRP4	GTTCTCTCCATCCTAGTGG	GCTGAGATACGTTGCCAAAG	574	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
sFRP5	CTACTGGAGGGTGTTCAC	CTTTCCTTACCCTCTCCT	201	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
WIF1	CACCTGGATTCTATGGAGTG	ACAGAGGTCTCCCTGGTAAC	218	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
DKK1	CAGGATTGTGTTGTGCTAGA	TGACAAGTGTGAAGCCTAGA	202	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
DKK2	CTCAACTCCATCAAGTCCTC	TACCTCCAACTTCACACTC	164	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
DKK3	GAGGTTGAGGAACTGATGG	CCAGTCTGGTTGTTGGTTAT	215	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
DKK4	GTCCTGGACTTCAACAACAT	GTTGCATCTTCCATCGTAGT	233	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
PVLAP	CTGCGATGCCTTCTTTCAT	AGTCCCTCCACAGGTTACGA	272	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
OCLN	AAGCAAGTGAAGGGATCTGC	GGGGTTATGGTCCAAAGTCA	204	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019

GLUT1	AATACACCACCTCACTCCTG	GAGGTACGTGTAAGGGACTG	188	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
BCRP	CAGTCTTCAAGGAGATCAGC	CCAGTACGACTGTGACAATG	132	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
P-GP	ATATCAGCAGCCCACATCAT	GAAGCACTGGGATGTCCGGT	154	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
CDH5	GTTCCGGCTGACAGGTCCACA	CGATGTGGCGAGGAGCATCA		Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
ZO-1	ATCTCGGAAAAGTGCCAGGA	TTTCAGCGCACCATACCAAC	124	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
CLDN5	AGGCGTGCTCTACCTGTTTTG	AACTCGCGGACGACAATGTT	78	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
CLDN3	GCCACCAAGGTCGTCTACTC	CGTAGTCCTTGCGGTCTAG	82	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
CLDN1	TTTACTCCTATGCCGGCGAC	GAGGATGCCAACCCATCA	173	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
CCND1	GTCCCACTCCTACGATACGC	CAGGGCCGTTGGGTAGAAAA	129	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
APCDD1	AAGGAGTCACAGTGCCATCA	TTGTGATGAACTCTGGGCCT	136	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
AXIN-2	GACAGGAATCATTGCGCCAC	CCTTCAGCATCCTCCGGTAT	181	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
CTNNB	TCTGAGGACAAGCCACAAGATTACA	TGGGCACCAATATCAAGTCAA	122	Laksitorini <i>et al.</i> , 2019
VWF	CGGCTTGCAACCATTAGCTA	TGCAGAAGTGAGTATCACAGCCATC	90	Xu <i>et al.</i> , 2017
PLAT	GGTCTGGAGAAGTCTGTAGAG	CCTAGACTGGATTCTGTGACAA	134	Yan <i>et al.</i> , 2020
THBS	AGTGGAAGAGCATCACGCTG	CACCACGTTGTTGTCAAGGG	287	Bray <i>et al.</i> , 2019
SERPINE1	GCAAGGCACCTCTGAGAACT	GGGTGAGAAAACCACGTTGC	202	Zhang <i>et al.</i> , 2020
EDN1	CAGAAGAAGTTCAGAGGAACACC	GGAAGCCAGTGAAGATGGTT	334	Lee <i>et al.</i> , 2018

2.1.6. Chemikalien und Lösungen

Beschreibung	Hersteller
Agarose NEEO Ultra Quality	Carl Roth, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Desoxynukleotid Triphosphat Set PCR Grade	Roche applied Science, Mannheim, D
Ethanol absolut	Mallinckrodt Baker, Devender, NL
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt, D
Fsl-1	Invivogen, Toulouse, F
LPS <i>E. coli</i> O111:B4 ultrapure	Invivogen, Toulouse, F
Milchpulver	Roth, D
ProLong Gold Antifade Reagenz	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

2.1.7. Puffer und Lösungen

Beschreibung	Zusammensetzung	Hersteller	Verwendung
	Verwendete Menge/ finale Konzentration	Stock	
Blockierlösung	1x 5 %	TBST Milchpulver (w/v)	siehe TBST 20x Supermarkt
Inkubationslösung	2 %	DPBS 1x liquid +/- Mg/Ca Bovine Serum Albumine (BSA) (w/v)	Gibco/Life Technologies, Paisley, UK PAA Laboratories, Pasching, Österreich

DPBS 1 x liquid -/- Mg/Ca			Gibco/ Life Technologies, Paisley, UK	divers
modifizierter RIPA-Puffer	1x 1x	10x RIPA-Puffer 10x Protease Inhibitor Cocktail	Millipore, Billerica, MA, USA Sigma Aldrich, Steinheim, D	Proteinlyse/ Protein- bestimmung
	1 mM	Na ₃ VO ₄ H ₂ O dest	Sigma Aldrich, Steinheim, D	
modifizierter RLT-Puffer	1x 10 mM	RLT Lyse Puffer β-Mercaptoethanol	Qiagen, Hilden, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	RNA-Isolation
MOPS- Laufpuffer	20 ml 380 ml	20x NuPAGE SD MOPS Laufpuffer H ₂ O dest	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	SD-Gelelektro- phorese
TAE-Puffer	20 ml 980 ml	50x TAE-Puffer H ₂ O dest	Biorad, München, D	Agarosegel- elektrophorese
TBST-Puffer	50 ml 10 ml 960 ml	20x TBS-Puffer (200 mM Tris, 3 M NaCl, pH7,6 (HCl)) 10% Tween 20 H ₂ O dest	Carl Roth, Karlsruhe, D Applichem, Darmstadt, D Applichem, Darmstadt, D	Immuno- detektion
Transferpuffer	50 ml 200 ml 750 ml	20x NuPAGE Transferpuffer Methanol H ₂ O dest	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA Merck KGaA, Darmstadt, D	Westernblot

2.1.8. Kits

Beschreibung	Hersteller
AffinityScript QRT-PCR cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, D
Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix	Agilent Technologies, Waldbronn, D
RNA easy Micro Kit	QIAGEN, Hilden, D
RNAse free DNase Set	QIAGEN, Hilden, D
QIASHredder	QIAGEN, Hilden, D
Taq DNA Polymerase Kit(1000 U)	QIAGEN, Hilden, D
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate WBKL S05 00	Millipore, Billerica, USA

2.1.9. Laborgeräte

Beschreibung	Modell	Hersteller
Autoklav	5075 ELV	Systemec
Bioanalyzer	Bioanalyzer 2100/2100 expert software	Agilent Technologies
Blotting Apparatur	TE22 Mighty Small Transfer	Hoefer
Brutschrank	Hera Cell 240	Thermo Fischer
Chemilumineszenzdetektor	Chemi Smart 5100 (150W TypeT ø 5x20-2A)	VILBER LOURMAT
Fluoreszenzmikroskop	ApoTome/Linse 636/1.4/Axiovision 4.6 software	Carl Zeiss, Jena, D
Geldokumentation	TV Zoom Linse 2/3"C 11.5- 6.9 mm F1.4	VILBER LOURMAT

Gelkammer	SUB-CELL® GT Mini SUB-CELL® GT	BioRad
Heizblock	Thermomixer compact Thermomixer comfort	Eppendorf Eppendorf
Heiz-/Magnetrührer	VMS-C4-2	VWR
Kühlaggregat	F12/ED	Julabo
Lichtmikroskop	Axiovert 40C	Zeiss
Mikrowelle	MWG758	Ciatronic
PCR	2720 Thermocycler MX3005P™	Applied Biosystems Agilent Technologies
pH Meter	pH Meter 766 Calimetric	Knick
Pipetboy	Pipetboy Comfort	IBS integra Biosciences
Pipetten	Research 100-1000 µl; 20-200 µl; 10-100 µl Reference 0,5-10 µl; 0,1-2,5 µl	Eppendorf BioRad
Powersupply	Power Pac™ Basic	BioRad
Rollmischer	Assistant 348 Typ RM5.40	Karl Hecht KG
SD Gelelektrophoreseapparatur	XCell SureLock electrophoresis Novex Mini Cell	Invitrogen
Spectrophotometer	Co 8000 Cell Density Meter Nanodrop-1000 Spectrophotometer Infinite M200	WPA biowave Peqlab Tecan
Sterilbank	Hera Save	Thermo Fischer
Volt-/Ohmmessgerät mit Elektrode	Millicell®-ERS MERSSTX 01	Millipore Millipore
Vortex	Analog Vortex Mixer	VWR
Waagen	PCA 623s Extend ED2245	Satorius Satorius
Wasserbad	SW22	Julabo
Zählkammer	Improved 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Neubauer
Zentrifuge	Micro 200R Rotor 2424A Rotana 460R Rotor 5624 PicoFuge® II Microfuge	Hettich Hettich Stratagene

2.1.10. Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Eigenschaften	Hersteller
Chromatographie Papier	Whatman 3mm Chr	Maidstone, Kent, UK
Deckgläschen	24*50 mm	VWR, D
Impfschlinge	hart, 1 µl steril	VWR, D
Nitrozellulose Trans-Blot Transfermembran	0,45 µm	Biorad, München, D
NuPAGE NOVEX	4-12 % Bis-Tris Gele 1,5 mm, 15 Well	Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Objektträger	Mattrand 76*26 mm	Langenbrinck, Emmendingen, D
Safe-Lock Reaktionsgefäß	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Mx3000P Optical Strip Caps	(120 count)	Agilent Technologies, Waldbronn, D
Mx3000P Strip Tubes		Agilent Technologies, Waldbronn, D
QRT-PCR 96-Well Plates	non-skirted	Agilent Technologies, Waldbronn, D
TipOne® Filter Tip	1000 µl XL Graduated Filter Tip (Sterile) 200 µl Graduated Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, D Starlab, Hamburg, D

TipOne® Tip	100 µl Bevelled Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, D
	10 µl XL Graduated Filter Tip, Max. Volume 20 µl (Sterile)	Starlab, Hamburg, D
	1250 µl XL Graduated Tip	Starlab, Hamburg, D
	200 µl Bevelled Graduated Tip	Starlab, Hamburg, D
TipOne® RTP Filter Tip	10 µl XL Graduated Tip (Max. Vol. 20µl)	Starlab, Hamburg, D
	RPT 1000 µl XL Graduated Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, D
	200 µl Graduated Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, D
	100 µl Bevelled Filter Tip (Sterile)	Starlab, Hamburg, D
Thincert Zellkultur Einsätze	10 µl XL Graduated Filter Tip, Max. Vol. 20 µl (Sterile)	Starlab, Hamburg, D
	für 24-Well Zellkultur Platten 3 µm 2*10E6 Poren	Greiner, Frickenhausen, D
	für 12-Well Zellkultur Platten 3 µm	Greiner, Frickenhausen, D
	75 cm ² 250 ml PS red filter cap sterile	Greiner, Frickenhausen, D
Zellkulturplatten	12-Well	Starlab, Hamburg, D
	24-Well	Starlab, Hamburg, D
	48-Well	Starlab, Hamburg, D

2.1.11. Software

Software	Developer
Adobe Illustrator CC	Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA
Bioconductor	Bioconductor Core Team
Vision-Capt	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Chemi-Capt	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
clusterProfiler package	Guangchuang Yu, Bioconductor
complexHeatmap (Version 2.0.0)	Zuguang Gu, Bioconductor
FastQC	Babraham Bioinformatics
ggplot2 package (Version 3.3.6)	Thomas Lin Pedersen
i-control™	Tecan, Männedorf, Schweiz
kallisto (Version 0.46.1)	
limma package	Gordon Smyth, Bioconductor
MXPro	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
NGS Analyse package systemPipeR	Thomas Girke, Bioconductor
Prism 9.0.0	GraphPad Software, Inc.
R	R Core Team
SAS system, release 9.4	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
trim_galore (Version 0.6.4)	Babraham Bioinformatics
Zeiss ZEN Imaging Software	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Zellkultur

Sowohl primäre als auch immortalisierte HCPEnC wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ bis zum konfluenten Wachstum kultiviert. Nach dem Waschen mit vorgewärmten Zellkulturmedium wurden die Zellen durch Zugabe warmen Trypsins und einer kurzen Inkubationszeit von der Zellkulturflasche abgelöst. Um die Ablösungsreaktion zu beenden, wurden 1 ml Zellkulturmedium hinzugefügt, die Zellen wurden gründlich suspendiert, und das Trypsin wurde mittels Zentrifugation bei 1400 rpm für max. 5 min entfernt. Das während der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 1 ml neuen Medium resuspendiert, und eine neue Kultur wurde im Verhältnis 1:4 angelegt. Für Experimente mit anschließender Extraktion von RNA oder Protein-Lysaten wurden die Zellen in 24 Well Platten ausgesät, zur Durchführung von Immunfluoreszenz-Experimenten wurden zusätzlich in 100 % EtOH sterilisierte Coverslips verwendet. Sowohl die verwendeten Zellkulturflaschen als auch die Wells und die Coverslips wurden unmittelbar vor dem Zellkontakt mit Attachment-Faktor beschichtet.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. RNA-Isolation

Um eine veränderte Expression bestimmter Gene nachzuweisen, wurde die RNA der Zellen extrahiert und anschließend isoliert. Zunächst werden die Zellen einmal mit DPBS gewaschen, bevor sie durch Zugabe von modifiziertem RLT Puffer (nach Vorgabe des RNeasy Micro Kits, Quiagen) lysiert wurden. Die Lyse wurde dabei durch zu Hilfenahme eines Zellschaber (bei größeren Kulturen) oder mittels mehrmaligen Auf- und Abpipettierens unterstützt. Nachdem das Lysat in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde, konnte es anschließend bei -80°C gelagert werden. Zur weiteren Isolation und Aufreinigung der RNA wurde das RNeasy Micro Kit von Quiagen verwendet. Die Quantität und Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde anschließend mit dem UV-Spektrophotometer Nanodrop® ND1000 bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm und 260/280 nm bestimmt. Anschließend wurde eine Reverse Transkription PCR (RT-PCR) zur Herstellung von cDNA durchgeführt.

2.2.2.2. Reverse Transkription PCR (RT-PCR) zur cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA aus der isolierten RNA behandelte und unbehandelte Zellen, wurde das AffinityScript QRT-PCR cDNA Synthesis Kit von Agilent Technologies den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die entstandene cDNA konnte anschließend bei -20°C gelagert werden, oder weiter mittels (quantitativer) PCR untersucht werden.

2.2.2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Expression der Zielgene wurde anhand von PCR analysiert. Dazu wurde das Qiagen Taq DNA-Polymerase Kit von Quiagen gemäß den Anweisungen der Produzenten verwendet. Der Ansatz für eine PCR Reaktion wurde dementsprechend zusammengestellt und ist in *TABELLE 1* aufgeführt

Tabelle 1 Reaktionsansatz einer konventionellen PCR

Reagenz	Ansatz für 1x PCR Reaktion [μ l]
Buffer	2,5
dNTP	0,5
For/Rev Primer	1
Taq pol	0,125
H ₂ O	20,375
cDNA	0,5
total:	25

Die verwendeten Primer und die Reaktionsbedingungen sind in 2.1.5 bzw. in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2 Reaktionsbedingungen der konventionellen PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Initiation	94°C	2 min
Denaturation	94°C	30 s
Annealing	60°C	45 s
Elongation	72°C	45 s
Finale Elongation	72°C	5 min
Hold	4°C	∞

35 Zyklen

Anschließend wurde das entstandene Produkt mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.2.4. Agarosegelelektrophorese

Die zu untersuchenden Proben wurden mittels Agarosegelelektrophorese (2 % Agarose in TAE-Puffer versetzt mit Ethidiumbromid) bei 100-120 V für 40-50 min aufgetrennt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mithilfe des zugesetzten Ethidiumbromids anhand ihrer Fluoreszenz durch die Geldokumentationsanlage BioVision-3026 und der dazu gehörenden Software VisionCapt nachgewiesen.

2.2.2.5. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Mittels quantitativer PCR konnte die Genexpression durch absolute oder relative Quantifizierung numerisch dargestellt werden. Dazu wurde das Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit verwendet, welches den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green II Farbstoff enthält. Im Komplex mit DNA kann er bei maximaler Absorption $\lambda=494$ nm und maximaler Emission $\lambda=521$ nm detektiert werden, wodurch der Fortschritt der Amplifikation dargestellt werden kann. Um nicht-PCR basierte Schwankungen der Fluoreszenz zu normalisieren, wird ein Referenz-Farbstoff verwendet, dessen Fluoreszenz bei einer maximalen Absorption von $\lambda=584$ nm und maximale Emission von $\lambda=612$ nm konstant bleibt. Der Ansatz für eine qRT-PCR Reaktion gemäß den Angaben des Herstellers ist in *TABELLE 3* zusammengefasst.

Tabelle 3 Reaktionsansatz einer qRT-PCR

Reagenz	Ansatz für 1x PCR Reaktion [µl]
2x Brilliant II SYBR Green Master Mix	12,5
Diluted reference dye, 30 nm (ROX)	0,375
cDNA	0,2
H ₂ O	6,925
For/Rev Primer Mix, 250 nM	5
total:	25

Die Reaktion wurde mit dem Stratagene Mx3005P System und der dazugehörenden MX Software durchgeführt. Dabei wurden die Parameter 1 „plateau premelt/RT segment“ und „normal 2-step amplification setting“ ausgewählt, welchen eine Dissoziationskurve angeschlossen wurde. Dieses Setting wurde entsprechend den Angaben in TABELLE 4 modifiziert.

Tabelle 4 Reaktionsbedingungen der qRT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturation	95°C	15 min
Denaturation	94°C	15 s
Annealing	60°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Dissoziationskurve	95°C	30 s
	60°C	20 s
	95°C	20 min
Hold	4°C	∞

Der langsame Temperaturanstieg ermöglicht das Sammeln der Fluoreszenzdaten, die sich in einem Peak abzeichnen, welcher abfällt, sobald der Farbstoff durch das Schmelzen der DNA freigesetzt wird. Mithilfe der Dissoziations- und Schmelzkurve konnte das Amplifikat so hinsichtlich seiner Qualität und Quantität interpretiert werden. Außerdem wurde der Schwellenzyklus (*threshold cycle*, CT) jedes Amplifikats bestimmt, jene Anzahl von Amplifikationszyklen, ab der sich die Fluoreszenz vom Hintergrundrauschen abgrenzt. Der CT Wert ist demnach repräsentativ für den initial vorliegenden Expressionsstatus eines Gens und ist invers korreliert mit der Anzahl der Amplifikate einer Probe. Dementsprechend gibt er Auskunft darüber, ob das Zielgen auch die exponentielle Phase während der PCR Amplifikation erreicht hat. Um die relative Expression eines Gens zu bestimmen, wurde die Effizienz-korrigierte Δ CT-Methode verwendet:

$$\text{relative Expression} = E_{\text{Zielgen}}^{-CT_{\text{Zielgen}}} \div E_{\text{Referenzgen}}^{-CT_{\text{Referenzgen}}}$$

Durch Auftragung des Logarithmus der Fluoreszenz gegen die durchlaufenen Zyklen konnte die Effizienz (E) eines Gens ermittelt werden, indem die Steigung der linearen Regression (R^2) im exponentiellen Bereich bestimmt wurde. Die *Fold change* der einzelnen Gene wurde mittels der Effizienz-korrigierten $2^{\Delta\Delta CT}$ Methode ermittelt:

$$Fold\ change = E_{Zielgen}^{-\Delta CT_{Zielgen}} \div E_{Referenzgen}^{-\Delta CT_{Referenzgen}}$$

mit

$$\Delta CT_{Zielgen} = CT_{Zielgen} - CT_{Kontrolle\ Zielgen}$$

$$\Delta CT_{Referenzgen} = CT_{1\ Haushaltsgen} - CT_{1\ Kontrolle\ Haushaltsgen}$$

Um Variationen durch Referenzgene zu vermeiden, wurden jeweils die CT-Werte und die Effizienzen der drei Referenzgene RPL13a (Ribosomal Protein L19, YWHAZ (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta) und SDHA (Succinat Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A) gemittelt und als Referenz-CT bzw. Referenzeffizienz verwendet.

Ein Gen wurde als höher bzw. geringer exprimiert als in der Kontrollkondition eingestuft, sobald die *Fold change* größer als 2 bzw. geringer als 0,5 betrug.

2.2.2.6. *Doppelimmunfluoreszenzfärbung*

Die Doppelimmunfluoreszenz ermöglicht das Anfärben unterschiedlicher Strukturen durch Verwendung von Antikörpern-Fluoreszenz Konjugat mit unterschiedlichem Absorptions- und Emissionspektrum. Die auf Deckgläser herangezogenen Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, um Reste des Zellmediums und verwendeter Zell-Stimulantien wie z.B. LiCl abzuwaschen. Je nach Kompatibilität der verwendeten Antikörper wurden die Zellen anschließend durch eine 30-minütige Behandlung in 4 % PFA bei RT fixiert, zweimal in PBS gewaschen und anschließend 5 min in 0,1 % Triton X100/PBS aufgeschlossen oder Fixierung und Aufschluss erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation mit 100 % eiskaltem Methanol. Es folgten ein Waschschriff mit PBS und eine Inkubation in 1 % BSA/PBS Lösung von 15 min, um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu blockieren. Danach wurden die Zellen in frischer 1 % BSA/PBS Inkubationslösung mit Erstantikörper (*SIEHE 2.1.3.1*) für 1 h inkubiert. Bei Verwendung mehrerer Erstantikörper konnten diese gleichzeitig inkubieren, insofern sie einen unterschiedlichen Hintergrund hatten (*SIEHE 2.1.3.1*), andernfalls musste noch einmal gewaschen, blockiert und neu inkubiert werden. Nachdem die Deckgläser viermal in PBS gewaschen worden waren, wurde ein erneuter 15-minütiger Blockierschritt angehängt. Dem folgte die Inkubation in frisch angesetztem Zweitantikörper in Inkubationslösung für eine weitere Stunde im Dunkeln (*SIEHE 2.1.3.2*). Analog zur Erstantikörperinkubation konnten auch hier mehrere Zweitantikörper gleichzeitig verwendet werden, (*SIEHE 2.1.3.2*). Im Anschluss wurden die Deckgläser viermal in PBS und einmal in ddH₂O gewaschen und getrocknet. Die Deckgläser wurden in Einbettungsmedium (*SIEHE 2.1.6*) eingebettet.

2.2.2.7. *RNA Sequenzierung via Massive Analysis of cDNA Ends (MACE)*

Zur Analyse des Transkriptoms wurde eine Form der RNA-Sequenzierung, die sogenannte Massive Analysis of cDNA Ends (MACE) durch die Firma GenXPro durchgeführt [228]. Während konventionelle RNA-Seq Methoden Transkripte zufällig fragmentieren und sequenzieren, werden durch MACE die Transkriptfragmente von dem 3'Ende spezifisch sequenziert. So wird verhindert, dass mehrere Fragmente eines Transkripts in die finale Datenquantifikation aufgenommen werden und so eine Überrepräsentation von langen Fragmenten verursacht wird [228]. Außerdem wird jedes Transkript mit einer einmaligen Sequenz als Barcode ("TrueQuant" -*unique molecular identifiers*) markiert, sodass eine Verzerrung durch PCR verhindert wird. Stattdessen wird jedem Read einer Sequenz nur ein Transkript in der Probe zugeordnet, sodass auch seltene Transkripte schon bei einer 10 bis 20 fach geringeren Sequenziertiefe als bei der herkömmlichen RNA-Seq festgestellt werden, wo diese zumeist erst nach 100 oder mehr Reads auftauchen [228]. Dadurch wird deutlich weniger Ausgangsmaterial

benötigt. Dementsprechend wurde isolierte Gesamt-RNA von HCPEnCs der Passage 6 (p6) und iHCPEnC aus den Passagen 20 und 50 (p20 bzw. p50) aus je 3 biologischen Replikaten isoliert und deren Konzentration bestimmt, eine Mindestkonzentration von 10 ng/ μ L zur Bearbeitung ist notwendig.

2.2.2.8. Statistische Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten: Differentially Expressed Genes und Gene Ontology

Nach der Bearbeitung und Analyse der Proben durch GenXPro wurden die erhaltenen Daten bioinformatisch weiter in Zusammenarbeit mit Herrn Sticht der Arbeitsgruppe Bioinformatics der UMM Mannheim analysiert. Dabei wurden hauptsächlich die Programme R und Bioconductor verwendet, wobei das NGS Analyse package systemPipeR verwendet wurde [229]. Die Qualitätskontrolle der sequenzierten *Raw Reads* wurde mithilfe von FastQC (Babraham Bioinformatics) durchgeführt, wobei *Reads* mit geringer Qualität mit Hilfe von trim_galore (Version 0.6.4) entfernt wurden. Die resultierenden Reads wurden mit dem humanen Genom (Version GRCh38.p13 von GeneCode) abgeglichen und mittels kallisto (Version 0.46.1) gezählt [230]. Anschließend wurden die gezählten Daten in log₂ counts per million (log₂PCM) unter der Verwendung der voom-Funktion des limma package transformiert [231]. Die Unterschiede (log₂ *Fold changes*) der log₂PCM zwischen den Proben einschließlich der zugehörigen p-Werte und FDR Werte wurden kalkuliert. Als signifikant wurden Gene erachtet, deren log₂ *Fold change* > 1 betrug und deren p-Wert und FDR < 0,05 war. Die ermittelten Werte wurden daraufhin sortiert und als *ranked list* für eine *gene set enrichment analysis* (GSEA) verwendet. Die folgende Gene Ontology Analyse wurde mithilfe des clusterProfiler package in R durchgeführt [232]. Vulcanoplots und Dotplots wurden mithilfe des ggplot2 package (Version 3.3.6) [233] und Heatmaps wurden durch Anwendung von complexHeatmap (Version 2.0.0) erstellt [234].

Die Daten sind derzeit unter „results_MACE.zip; Aktueller Pfad: Denzer / results_MACE.zip“ bei der Arbeitsgruppe der Kinder- und Jugendklinik, Infektiologisches Labor der Universitätsklinik Mannheim hinterlegt und können auf Wunsch eingesehen werden. Ein öffentlicher Pfad wird bei Publikation der Daten eingerichtet werden.

3. Ergebnisse

3.1. Prinzip der RNA-Sequenzierung und statistische Analyse

Immortalisierte Zelllinien unterliegen im Gegensatz zu Kulturen aus primären Zellen nicht der natürlichen Seneszenz und können so für vielfältige Zwecke in der Forschung genutzt werden. Sie können aus den ursprünglich gewonnenen primären Zellen durch Mutation der *p53* und *pRb* Gene, der Einführung von Onkogenen und die ektopische Expression der Telomerase oder hTERT hergestellt werden [219,220]. Eine immortalisierte Zelllinie ist dabei umso wertvoller, je mehr sie den Zellen des natürlichen Herkunftsgewebes entspricht. Daher ist es wichtig, eine Transkriptomanalyse der primären Zellen und der immortalisierten Zelllinie durchzuführen, um den Grad ihrer Übereinstimmung zu überprüfen und aufgrund dessen zu entscheiden, ob die immortalisierte Zelllinie als Modell genutzt werden kann.

Das Transkriptom von Zellen kann mit Hilfe von *next generation sequencing* ermittelt werden. Neben der traditionellen RNA-Sequenzierung basiert eine neuere Methode, die sog. *Massive Analysis of cDNA Ends* (MACE) darauf, nur das 3'-Endes der Transkripte zu sequenzieren [228]. Dadurch wird jeder Lesevorgang eines Transkripts der Probe für dieses repräsentativ, anstatt der möglichen mehreren *Reads* desselben, zufällig fragmentierten Transkripts bei der konventionellen RNA-Seq. Somit ermöglicht die MACE eine tiefere Sequenzierung der Proben, sodass auch selten exprimierte Gene schon bei geringerer Tiefe erfasst werden und nicht zugunsten längerer, häufiger detektierter Transkripte unterrepräsentiert werden [228].

Um die Ähnlichkeit der in unserem Labor generierten Zelllinie iHCPEnC zu der primären Zelllinie HCPEnC zu untersuchen, der sie entstammt, sollten beide zunächst einer vergleichenden Gesamttranskriptom-Analyse unterzogen werden. Um herauszufinden, ob die immortalisierte Zelllinie auch über späte Passagen hinweg eine stabile Genexpression aufweist, wurden unterschiedlich weit fortgeschrittene Passagen der iHCPEnC analysiert. Untersucht wurden eine jüngere Passage der primären HCPEnC (p6; „HCPEnC p6“) sowie eine junge Passage der immortalisierten iHCPEnC (p20; „iHCPEnC p20“) und eine ältere Passage der iHCPEnC (p50; „iHCPEnC p50“).

Die Analyse erfolgte durch eine RNA-Sequenzierung mittels einer MACE aus je drei biologischen Replikaten der primären Zellen und zwei unterschiedlichen Passagen der immortalisierten Zelllinie. Dazu wurden je 10ng/µl isolierte RNA aus Zellen der Kulturen p6, p20 und p50 der Firma GenXPro zur Verfügung gestellt, die sowohl die Durchführung der MACE als auch der bioinformatischen Auswertungen übernahm (*siehe 2.2.2.7 und 2.2.2.8*).

Um die ermittelten Transkriptomdaten der drei Zelltypen miteinander zu vergleichen, wurde zunächst die Heatmap der *Raw Reads* der einzelnen biologischen Replikate betrachtet (*ABBILDUNG 5*). Dabei wurden die drei Zelllinien in einer Matrix gegenübergestellt, ihre Ähnlichkeit mit Hilfe von hierarchischem Clustering bestimmt und in Form von Dendrogrammen dargestellt. Zusätzlich wurden die errechneten Cluster entsprechend ihrer Pearson Koeffizienten koloriert, wobei rot einem Wert von 1 und damit der höchstmöglichen Übereinstimmung entspricht, während blau dem niedrigsten identifizierten Wert von 0,94 zugeordnet wurde. Aus der generierten Heatmap wird zunächst deutlich, dass die jeweiligen Transkriptome der biologischen Replikate eine hohe Übereinstimmung ihrer *Raw Reads* zueinander aufweisen. Der Pearson Koeffizient belegt, dass eine starke positive Korrelation zwischen den einzelnen Proben besteht, da der niedrigste Wert für den Koeffizienten bei 0,94 liegt. Drei hell hervorgehobene Cluster und drei Gruppen im Dendrogramm verweisen darauf, dass sich jeweils die drei biologischen Replikate innerhalb einer Gruppe am ähnlichsten sind. Die größte Übereinstimmung untereinander haben dabei die drei Proben der immortalisierten Zelllinie p20, was

deutlich an dem sehr hellen Cluster in der linken oberen Ecke der Abbildung zu erkennen ist. Bei genauerer Betrachtung offenbart sich eine leichte Rotfärbung der Cluster aus dem Vergleich von raw_iHCPEnC_p20_2 mit raw_iHCPEnC_p20_3. Somit liegt in diesen Clustern der höchste Pearson Koeffizient und damit die höchste identifizierte Ähnlichkeit zwischen zwei unterschiedlichen Proben vor. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in den Dendrogrammen wider. Der Unterschied dieser beiden Proben zu raw_iHCPEnC_p20_1 ist jedoch so gering, dass er sich nur in einer sehr feinen Farbnuance im Pearson Koeffizient und einem sehr geringen Abstand in den Dendrogrammen widerspiegelt (*ABBILDUNG 5*).

Die drei Proben der primären HCPEnC weisen untereinander größere Abweichungen auf als die der immortalisierten iHCPEnC p20. Dadurch erscheinen sie in der Heatmap in leicht bläulichen Clustern (entsprechend einem Pearson Koeffizient zwischen 0,97 und 0,96) und das Dendrogramm zeigt einen größeren Abstand der einzelnen Äste. Die Proben 2 und 3 stimmen daher öfter miteinander überein, als je eine der beiden Proben mit Probe 1.

Bei den immortalisierten iHCPEnC p50 können die größten Abweichungen innerhalb der biologischen Replikate einer Gruppe beobachtet werden. Dementsprechend ist ihre Färbung etwas weiter ins Bläuliche verschoben, als bei HCPEnC p6 zu beobachten war und auch der Abstand der Verbindungen im Dendrogramm ist größer. Entsprechend ihrer Ähnlichkeit lassen sich zuerst Probe 1 und Probe 3 gruppieren, und anschließend kann Probe 2 hinzugruppiert werden.

Wenn die verschiedenen Gruppen von Replikaten miteinander verglichen werden, dann besteht die größte Ähnlichkeit beim Vergleich der Replikate von HCPEnC p6 und iHCPEnC p20, während die aus den Replikaten von HCPEnC p50 bestehende Gruppe insgesamt die deutlichsten Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen von Replikaten aufzeigt. Ein Unterschied zwischen den Replikat-Gruppen ist beim Vergleich der aus den Gegenüberstellungen von HCPEnC p6 und iHCPEnC p20 bzw. iHCPEnC p50 und iHCPEnC p20 entstandenen Pearson Koeffizienten bereits sichtbar, ist aber deutlicher ausgeprägt bei der Betrachtung des Vergleichs von HCPEnC p6 und iHCPEnC p50. Dies zeigt sich dadurch, dass diese Cluster unter anderem die tiefsten Blaufärbungen aufweisen, einschließlich dem geringsten Pearson Koeffizienten von 0,94 zwischen den Proben der primären raw_HCPEnC_p6_1 und der immortalisierten raw_iHCPEnC_p50_3. Zusammenfassend scheint die Heatmap darauf hinzudeuten, dass die Transkriptome der primären Zelllinie p6 und der jüngeren Passage der immortalisierten Zelllinie p20 zu einem höheren Anteil einander entsprechen, während die ältere Passage p50 der immortalisierten Zelllinie auf den ersten Blick eine höhere Heterogenität aufweist. Insgesamt kann jedoch ein hoher Grad der Übereinstimmung zwischen den primären Zellen und den immortalisierten Zellen der beiden Passagen nachgewiesen werden.

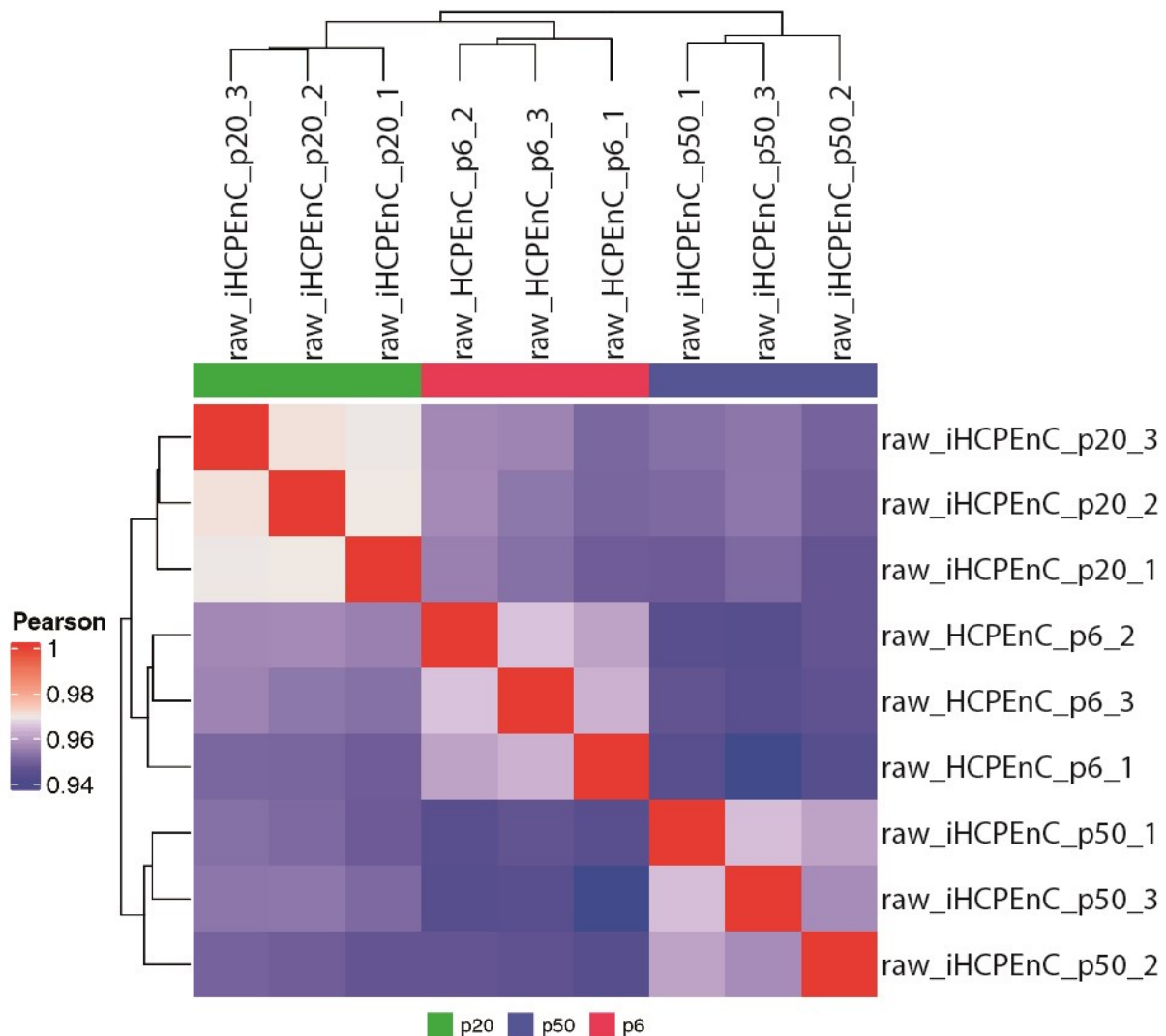


Abbildung 5 Graphischer Vergleich der Transkriptome von HCPEnC und iHCPEnC. Die Heatmap veranschaulicht die *Raw Reads* der drei biologischen Replikate von HCPEnC p6, iHCPEnC p20 und iHCPEnC p50 und stellt die jeweiligen Beziehungsgrade untereinander dar.

Da für den ersten Vergleich der Transkriptome jedoch die Rohdaten der Expressionslevel der einzelnen Gene verwendet wurden, ist noch keine Aussage möglich, in welchem Umfang die beobachteten Differenzen tatsächlich signifikant sind. Daher wurden die *Fold changes* der normalisierten Rohdaten und deren *p*- und *false discovery rate* (FDR)-Werte genauer betrachtet. Aus diesen Daten wurden zunächst Listen mit differentiell exprimierten Genen (DEG) erstellt, um die Unterschiede der Transkriptome zwischen den primären und den immortalisierten Zellen, als auch zwischen junger und alter Passage statistisch zu erfassen.

Zur Verifizierung der durch die MACE-Analyse ermittelten Listen der DEG, wurde eine qRT-PCR-Analyse ausgewählter Gene durchgeführt, sodass deren Expressionslevel mit den in der qRT-PCR ermittelten relativen Expressionslevel verglichen werden konnten. Es wurden die Gene von Willebrandt Faktor (VWF), Plasminogen Aktivator, Gewebetyp (*plasminogen activator, tissue type*; PLAT), Thrombospondin1 (THBS1), Serpin E1 (*serpin family E member*; SERPINE1) und Endothelin 1 (EDN1) ausgewählt, da es sich um Endothel relevante Gene handelt, deren Expression im Vergleich nach der Immortalisierung im Vergleich zu den primären Zellen signifikant verändert erschien.

Die aus der qRT-PCR ermittelten relativen differentiellen Expressionen und die aus der MACE-Analyse stammenden *Fold changes* und FDR-Werte wurden in *TABELLE 5* gegenübergestellt.

Tabelle 5 Quantitative PCR zur Validierung der Transkriptomdaten der MACE-Analyse. Verglichen werden die relativen *Fold changes*, die mithilfe der in 2.2.2.5 beschriebene Effizienz-korrigierte $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode ermittelt, mit den DEG und den FDR-Werten der MACE-Analyse. In beiden Fällen lagen zu jeder Probe drei Stichproben zu Grunde, aus denen ein Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung (STABW) bzw. ein normalisierter Wert bestimmt wurde. Die *Fold change* bzw. die differenzielle Expression wurde in Bezug zu den primären Zellen HCPEnC ermittelt.

iHCPENC		VWF		
	qRT-PCR	STABW	MACE	FDR
P20	5,30	0,11	2,49	0,0
P50	0,56	0,12	-0,54	2,68E-12
		PLAT		
	qRT-PCR	STABW	MACE	FDR
P20	0,07	0,01	-3,07	0,0
P50	1,32	0,20	0,3	6,22E-76
		THBS1		
	qRT-PCR	STABW	MACE	FDR
P20	1,06	0,02	-0,18	6,47E-24
P50	0,17	0,03	-2,62	0,0
		SERPINE1		
	qRT-PCR	STABW	MACE	FDR
P20	0,47	0,03	-0,94	0,0
P50	0,30	0,02	-1,59	0,0
		EDN1		
	qRT-PCR	STABW	MACE	FDR
P20	1,57	0,08	0,22	1,57E-09
P50	0,15	0,02	-2,66	0,0

Bei der qRT-PCR werden Gene, deren *Fold change* größer 2 ist, als überexprimiert definiert, und jene, deren *Fold change* unter 0,5 ist, als unterexprimiert, während bei der MACE *Fold changes* zwischen -1,5 und 1,5 als nicht verändert eingestuft wurden. Aus *TABELLE 5* wird ersichtlich, dass die angewandten Kriterien in MACE und qRT-PCR zu übereinstimmenden Einstufungen der Gene in hoch- oder herunterregulierte Gene führen.

3.2. Vergleich der Transkriptome von HCPEnC und iHCPEnC

3.2.1. Numerischer Vergleich signifikant exprimierter Gene bei HCPEnC und iHCPEnC

Die differenzielle Expression in den analysierten Zellen wurde durch die Firma GenXPro bestimmt. Dabei wurden die Expressionslevel der insgesamt 26586 untersuchten Transkripte in den primären Zellen 6 (p6), den immortalisierten Zellen der Passage 20 (p20), und den immortalisierten Zellen der Passage 50 (p50) untereinander verglichen. Für diese Vergleiche werden die Bezeichnungen p20_vs_p6, p50_vs_p6, sowie p50_vs_p20 verwendet.

Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, wie ähnlich die Expressionsdaten der drei Zelllinien zueinander sind, wurden Scatterplots angefertigt, indem die gemittelten Expressionsdaten von p6, p20 und p50 einander gegenübergestellt wurden (*ABBILDUNG 6*). Anhand einer Trendlinie wurde anschließend das Bestimmtheitsmaß (R^2) jedes Vergleichs bestimmt. Dieser Wert beschreibt, wieviel Prozent der Varianz durch das vorliegende lineare Regressionsmodell erklärt werden kann. Für den Vergleich der älteren und jüngeren Passagen p50_vs_p20 wurde ein Wert von 0,9463 für R^2 bestimmt, woraus geschlossen werden kann, dass ca. 95 % der Varianz innerhalb der Genexpression von p50 durch das Niveau der Genexpression in p20 ausgeglichen wird. Dies legt eine hohe Übereinstimmung der Expressionsniveaus der beiden Passagen der immortalisierten Zellen nahe. Auch für die Vergleiche von p50_vs_p6 und p20_vs_p6 konnten mit 0,9379 und 0,9506 hohe Werte für R^2 ermittelt werden.

In diesen ersten Vergleichen der Zellen wurden alle erhaltenen Expressionsdaten verglichen. Daher fand die statistische Signifikanz der unterschiedlichen Genexpressionen zwischen den verglichenen Zellen hier noch keine Beachtung. Bei diesen Analysen wurden demnach noch keine signifikant exprimierten Gene ermittelt, und die Gene wurden noch nicht in hoch- oder herunterregulierte Gene eingeteilt.

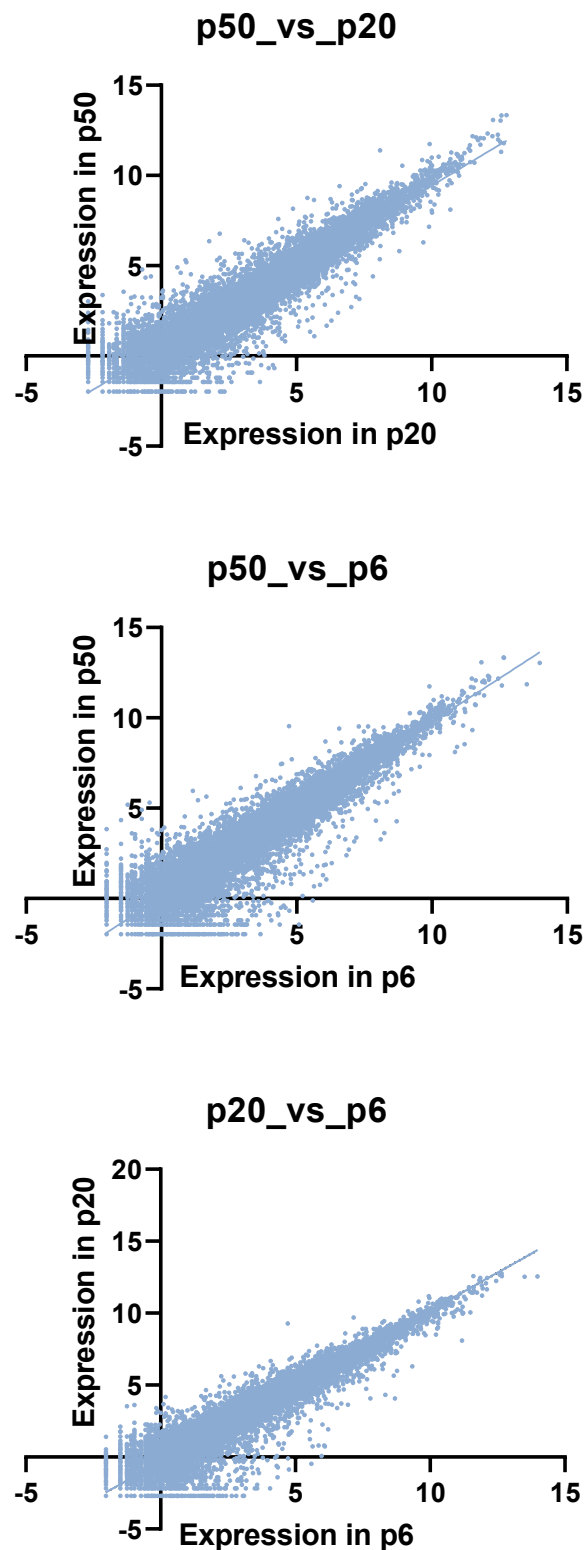


Abbildung 6 Bestimmung der Ähnlichkeit der drei Zelllinien durch Gegenüberstellung der Genexpressionsdaten in Form von Scatterplots. Als Grundlage dienten die gemittelten Expressionslevel der primären HCPEnC p6, sowie der jüngeren und älteren Passage der immortalisierten iHCPEnC p20 und p50. Es wurde eine lineare Trendlinie in die Graphiken der Gegenüberstellungen von p50_vs_p20 (oben), p50_vs_p6 (mittig) und p20_vs_p6 (unten) eingefügt, die als Grundlage zur Ermittlung des jeweiligen Bestimmtheitsmaßes (R^2) diente.

Um diese Daten weiter entsprechend ihrer statistischen Signifikanz aufzuteilen, wurden diese nach einem $\log_2\text{FoldChange} > 1,0$ und einem p-Wert und FDR $< 0,05$ gefiltert. Gene dieser Kategorie wurden als signifikant eingestuft. Durch diese Analyse konnten für p20_vs_p6 insgesamt 2899 Gene identifiziert werden, deren Expressionen sich signifikant voneinander unterschieden (SIEHE ABBILDUNG 7). Bei p50_vs_p6 wurden 3038 Gene mit signifikanten Differenzen festgestellt. Die größte Anzahl DEG (4791) konnte beim Vergleich p50_vs_p20 festgestellt werden. Die ermittelten DEG wurden weiter in herunter- (Runter) und hochregulierte (Hoch) Gene unterteilt (ABBILDUNG 7).

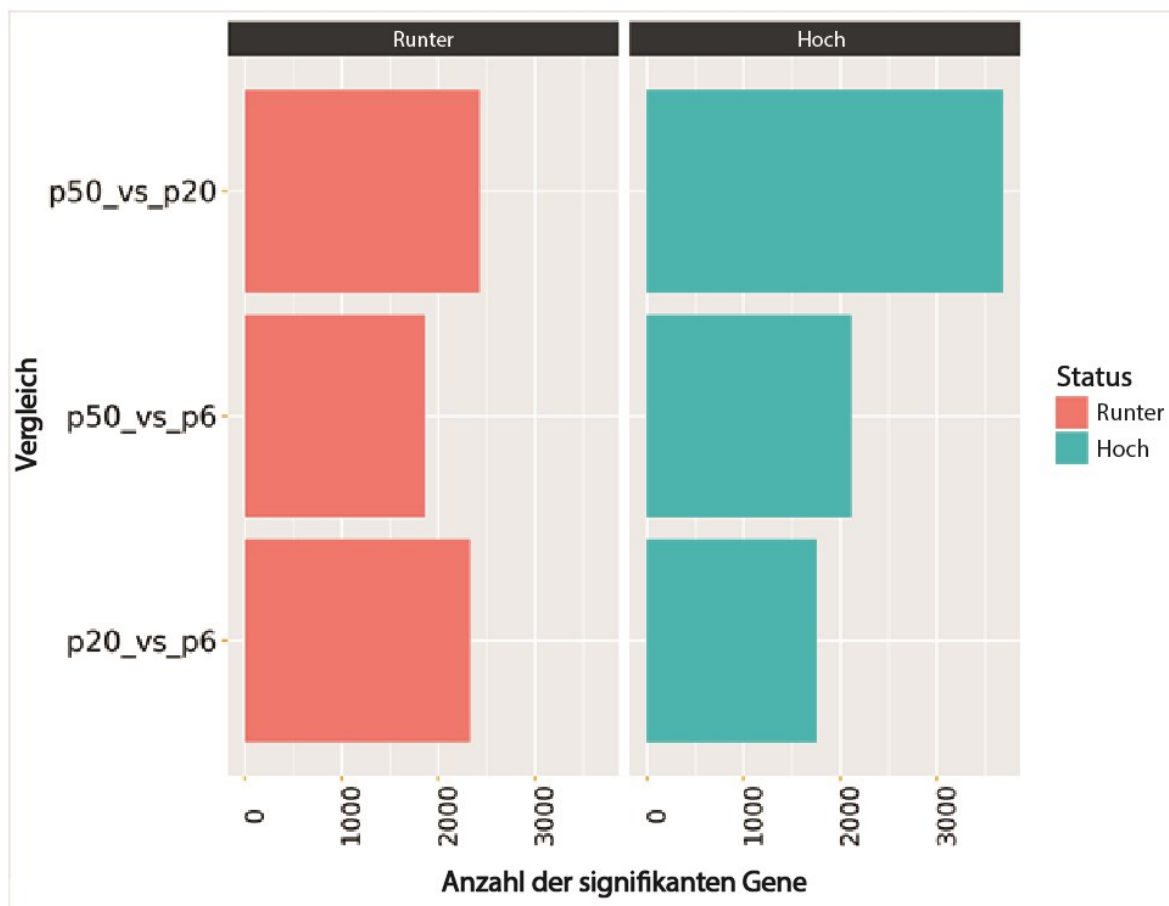


Abbildung 7 Übersicht der signifikanten Gene. Zur Ermittlung signifikanter Gene wurden die Transkriptome von p50 mit denen von p20, p50 mit p6 und p20 mit p6 verglichen. Diese wurden darüber hinaus in runter- bzw. hochregulierte Gene unterteilt und entsprechend graphisch erfasst.

In die Kategorie „Runter“ fielen beim Vergleich p20_vs_p6 1723 DEG, 1465 bei p50_vs_p6 und 1882 bei p50_vs_p20. Gleichzeitig wurden 1176 Gene bei p20_vs_p6, 1573 bei p50_vs_p6 und 2909 bei p50_vs_p20 der Kategorie „Hoch“ zugeordnet (ABBILDUNG 8A). Aus dieser Unterteilung ist jedoch nicht zu entnehmen, inwiefern sich diese Gruppen voneinander unterscheiden oder zu welchem Grad sie miteinander übereinstimmen. Um dies zu klären, wurden verschiedene Vergleiche der signifikanten DEG von p20_vs_p6, p50_vs_p6 und p50_vs_p20 durchgeführt (ABBILDUNG 8B). Zunächst wurden die Listen der signifikanten DEG von p20_vs_p6 und p50_vs_p6 gegenübergestellt, da beide auf dem Vergleich der immortalisierten iHCPEnC zu den primären HCPEnC basierten. So wurden 1806 Gene bestimmt, die nur dem Vergleich p20_vs_p6 zugeordnet wurden und 1945 Gene, die nur in p50_vs_p6 auftraten. Die restlichen 1093 Gene konnten in beiden Gruppen nachgewiesen werden und unterscheiden sich demnach signifikant voneinander beim Vergleich der primären Zellen p6 mit beiden Passagen der immortalisierten Zellen (p20 und p50). Diese Gruppe wurde anschließend mit den

signifikanten DEG aus p50_vs_p20 verglichen. So wurden 769 Gene bestimmt, die nur im Bezug zu p6 signifikant verändert waren, aber beim Vergleich von p50 zu p20 nicht auftreten. Gleichzeitig wurden 4467 Gene identifiziert, die sich zwar zwischen den beiden immortalisierten Zelllinien unterscheiden, aber im Vergleich zur Primärkultur keine Signifikanz aufweisen. Außerdem ließen sich 324 Gene ermitteln, die in beiden Gruppen vorkamen (ABBILDUNG 8B).

A Anzahl der signifikanten Gene

	Runter	Hoch	Gesamt
p50_vs_p20	1882	2909	4791
p50_vs_p6	1465	1573	3038
p20_vs_p6	1723	1176	2899

B Aufteilung der signifikanten Gene

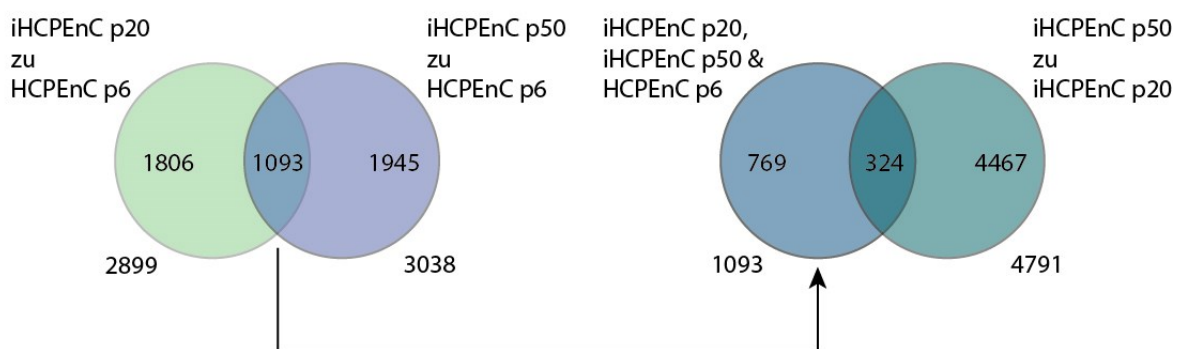


Abbildung 8 Vergleich der Transkriptome zwischen HCPEnC p6, iHCPEnC p20 und iHCPEnC p50. Zunächst wurde die jeweilige Anzahl der signifikanten Gene aus **ABBILDUNG 7** unterteilt in Runter, Hoch und Gesamt in **A.** aufgelistet und diese Werte genutzt, um sie in **B.** schematisch gegenüber und in Beziehung zueinander zu setzen. Dabei wurden die signifikanten Gene aus p20_vs_p6 und p50_vs_p6 miteinander verglichen und anschließend in gemeinsam bzw. einzeln auftretende Gene aufgespalten. Die so ermittelte Gruppe der geteilten signifikanten Gene wurde daraufhin mit p50_vs_p20 verglichen.

Im vorherigen Abschnitt wurde die Gesamtanzahl der DEG für jede Gegenüberstellung der primären und immortalisierten Zellen und deren Passagen bestimmt und diese anschließend nebeneinander betrachtet, um DEG zu identifizieren, die in nur einer, zwei oder sogar drei der verglichenen Listen hervortraten.

Als Basis für den nächsten Vergleich dienten die Listen der hoch- und herunterregulierten DEG mit dem Ziel gemeinsame DEG zu identifizieren, die sowohl in den beiden Vergleichen der primären HPCEnC und den immortalisierten iHPCEnC (p20_vs_p6 bzw. p50_vs_p6) vorkamen, als auch im Vergleich der jungen und alten Passage (p50_vs_p20). Dadurch sollten DEG identifiziert werden, die gemeinsam oder einzeln innerhalb der beschriebenen Vergleiche auftraten. In mehreren Gruppen auftretende DEG können einen Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung der betreffenden Abweichung liefern, welche mit dem fortschreitenden Alter der Zelllinie weiter besteht. Treten DEG nur in einer Gruppe auf, deutet dies auf potenziell unterschiedliche Auslöser der beobachteten Differenzen hin und könnte darüber hinaus ein Indiz dafür sein, dass sich Differenzen über mehrere Passagen weiter verändern.

Aus diesem Grund wurde nun für die hoch- bzw. herunterregulierten DEG jeder Gruppe ebenso verfahren, wie es im vorigen Abschnitt beschrieben wurde. Dabei wurden hoch- und herunterregulierte DEG getrennt voneinander betrachtet (*ABBILDUNG 9*). In beiden Fällen wurden wieder zuerst p20_vs_p6 und p50_vs_p6 verglichen, um Auskunft über gemeinsam hoch- und herunterregulierte DEG der immortalisierten Zellen im Vergleich zu den primären Zellen zu erhalten. Die einzeln und gemeinsam vorkommenden Gene wurden bestimmt und letztere wiederum dem Vergleich der späten mit der frühen Passage der immortalisierten Zellen (p50_vs_p20) gegenübergestellt. Dadurch sollten zum einen DEG identifiziert werden, die nur beim direkten Vergleich der älteren und jüngeren Passage als signifikant differentiell exprimiert klassifiziert werden konnten, und zum anderen DEG, die auch im Vergleich der beiden immortalisierten Linien mit den primären Zellen signifikant differentiell reguliert sind. Letztere weisen demnach sowohl signifikante Unterschiede zwischen der primären Zelllinie und der immortalisierten Zelllinie als auch zwischen der jüngeren und der älteren Passage der immortalisierten Zellen auf.

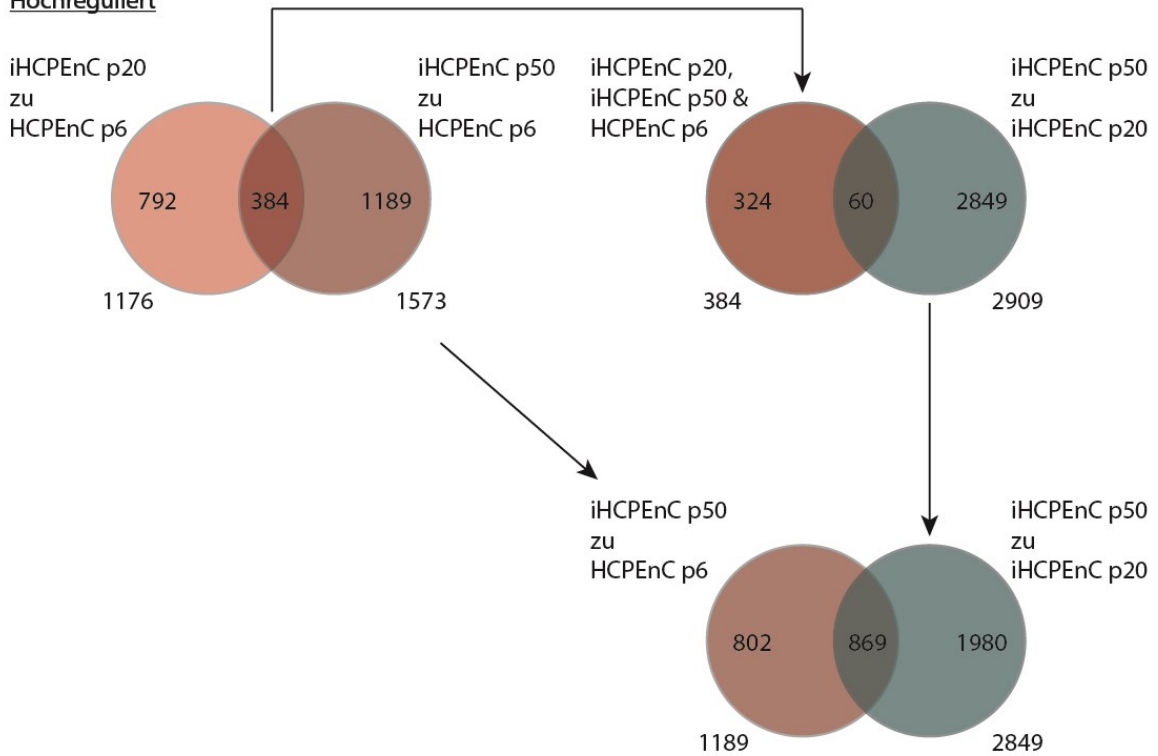
In einem weiteren Schritt wurden die DEG, die nur im Vergleich der späten Passage zur frühen Passage (p50_vs_p20) auftraten, noch einmal mit den ermittelten DEG verglichen, die nur in der Gegenüberstellung von p50_vs_p6 auftraten (*ABBILDUNG 9A*). Auf diese Weise wurden jene DEG herausgefiltert, die tatsächlich nur in einer dieser beiden Listen vorkamen, und jene DEG, die in beiden Listen vorkamen. Die parallele Betrachtung der dem Vergleich aus p50_vs_p20 zu p20_vs_p6 entstammenden Liste an DEG mit den DEG, die zuvor nur in p20_vs_p6 vorkommend identifiziert werden konnten, wies wiederum keine weitere Übereinstimmung auf und wurden aus diesem Grund nicht dargestellt.

Nach dieser Vorgehensweise konnten für die Kategorie der hochregulierten Gene 792 bzw. 1189 einzelne Gene für p20_vs_p6 bzw. p50_vs_p6 identifiziert werden, während 384 Gene beiden Gegenüberstellungen zugeordnet werden konnten. Von diesen kamen 324 nur im Bezug zu p6 vor und 60 konnten nach Vergleich mit p50_vs_p20 auch bei diesen gefunden werden. Somit verblieben 2849 Gene, die nur in den immortalisierten Zellen zwischen der jungen und der alten Passage unterschiedlich waren. Diese teilten sich nochmals in 1980 einzeln vorkommende Gene und 869 Gene auf, die mit den einzelnen Genen aus p50_vs_p6 übereinstimmten. Daher verblieben 802 Gene, die nur in p50_vs_p6 signifikant hochreguliert worden waren (*ABBILDUNG 9A*).

Bei den herunterregulierten Genen wurden zunächst 1119 bzw. 861 Gene identifiziert, die nur zu p20_vs_p6 bzw. p50_vs_p6 gehörten, und 604 Gene, die in beiden existierten. Wurden diese mit p50_vs_p20 verglichen, ergab sich eine Übereinstimmung von 89 Genen. Gleichzeitig wurden 515 bzw. 1793 Gene identifiziert, die nur einer der Gruppen auftraten. Von den 1793 nur in p50_vs_p20 vorkommenden Genen waren 685 ebenfalls unter jenen Genen zu finden, die nur bei p50_vs_p6 signifikant auftraten. Somit wurden 1135 bzw. 203 Gene bestimmt, die ausschließlich beim Vergleich von p50_vs_p20 bzw. von p50_vs_p6 eine Signifikanz aufwiesen (*ABBILDUNG 9B*).

Aufteilung der signifikanten Gene

A Hochreguliert



B Runterreguliert

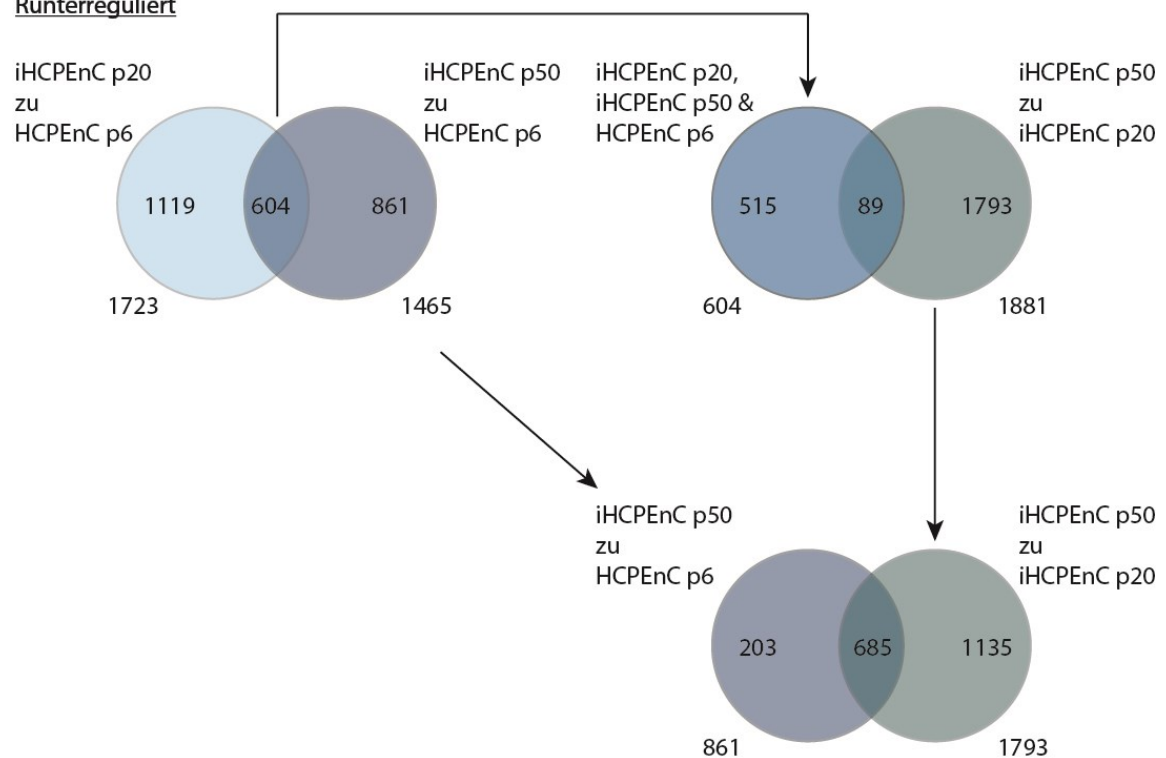


Abbildung 9 Aufteilung der signifikanten Gene nach hoch- und herunterregulierten Genen. Ähnlich wie in *ABBILDUNG 8*, wurde für die hochregulierten Gene (**A**) und für die herunterregulierten Gene (**B**) nach Übereinstimmungen und Unterschieden zwischen den untersuchten Zellgruppen gesucht. Dazu wurden die signifikanten Gene aus p20_vs_p6 und p50_vs_p6 miteinander verglichen und anschließend in gemeinsam bzw. einzeln auftretende Gene unterteilt. Die so ermittelte Gruppe der geteilten signifikanten Gene wurde daraufhin mit p50_vs_p20 verglichen und ebenfalls zwischen gemeinsamen und einzeln vorkommenden Genen unterschieden. Anschließend wurden die nur in p50_vs_p20 ermittelten Gene nochmals mit denen nur in p50_vs_p6 auftretenden Genen verglichen.

Die beobachteten Unterschiede in den DEG geben bisher noch wenig Auskunft darüber, ob diese Expressionsunterschiede zeitlich stabil bestehen bleiben oder sich verändern. So könnte z.B. ein signifikanter Unterschied der Expression verschiedener Gene in der frühen Passage der immortalisierten Zellen im Vergleich zu den primären Zellen (p20_vs_p6) auch im Vergleich der späten Passage der iHCPEnC mit den primären Zellen (p50_vs_p6) bestehen bleiben, oder der Expressionsunterschied könnte sich so weit reduzieren, dass keine Signifikanz mehr besteht.

Um zu untersuchen, wie sich die beobachteten Veränderungen in der Genexpression über die Zeit verhalten, wurden die Gruppen der hoch- und herunterregulierten Gene der frühen Passage vs. der primären Zellen (p20_vs_p6) und der späten Passage vs. der primären Zellen (p50_vs_p6) gegenübergestellt (*ABBILDUNG 10*). Dabei wurde während dieser Analyse auf eine explizite Trennung der hoch- und herunterregulierten DEG verzichtet und vier getrennte Vergleiche durchgeführt. Zuerst wurden die hochregulierten DEG aus p20_vs_p6 mit den hochregulierten DEG aus p50_vs_p6 und anschließend die hochregulierten DEG aus p20_vs_p6 mit den herunterregulierten DEG aus p50_vs_p6 verglichen. Das gleiche Verfahren wurde mit den herunterregulierten DEG aus p20_vs_p6 wiederholt. Wie bereits in *ABBILDUNG 9* gezeigt, wurden 384 Gene identifiziert, deren Expressionslevel sowohl in p20_vs_p6, als auch in p50_vs_p6 signifikant verändert waren (*SIEHE ABBILDUNG 9A & ABBILDUNG 10A*), und es wurden 604 Gene bestimmt, die in diesen Gruppen herunterreguliert waren (*SIEHE ABBILDUNG 9B & ABBILDUNG 10D*). Bei diesen Genen blieb somit die Tendenz der veränderten Genexpression nach der Immortalisierung auch nach längerer Zeit bestehen.

Im Gegensatz dazu wurden 57 bzw. 48 Gene identifiziert, die in p20_vs_p6 hochreguliert waren und in p50_vs_p6 wieder herunterreguliert wurden, bzw. die in p20_vs_p6 herunter- und in p50_vs_p6 hochreguliert waren (*ABBILDUNG 10B, C*). Die in der jüngeren Passage der immortalisierten iHCPEnC detektierten Veränderungen der Genexpression gegenüber der primären HCPEnC blieben in diesen Fällen nicht stabil bestehen, sondern haben sich ins Gegenteil verändert.

Weiterhin wurden 735 bzw. 1021 Gene gefunden, die im Vergleich p20_vs_p6 hoch- bzw. herunterreguliert waren, aber beim Vergleich p50_vs_p6 keinen signifikanten Unterschied aufwiesen. Ebenso existieren 1141 Gene, die in der Gegenüberstellung p50_vs_p6 hochreguliert waren, aber bei der Gegenüberstellung p20_vs_p6 als nicht signifikant differentiell exprimiert klassifiziert wurden. Darüber hinaus wurden 804 in der Gegenüberstellung p50_vs_p6 herunterregulierte Gene identifiziert, für die ebenfalls keine signifikanten Abweichungen bei Betrachtung von p20_vs_p6 beobachtet werden konnten.

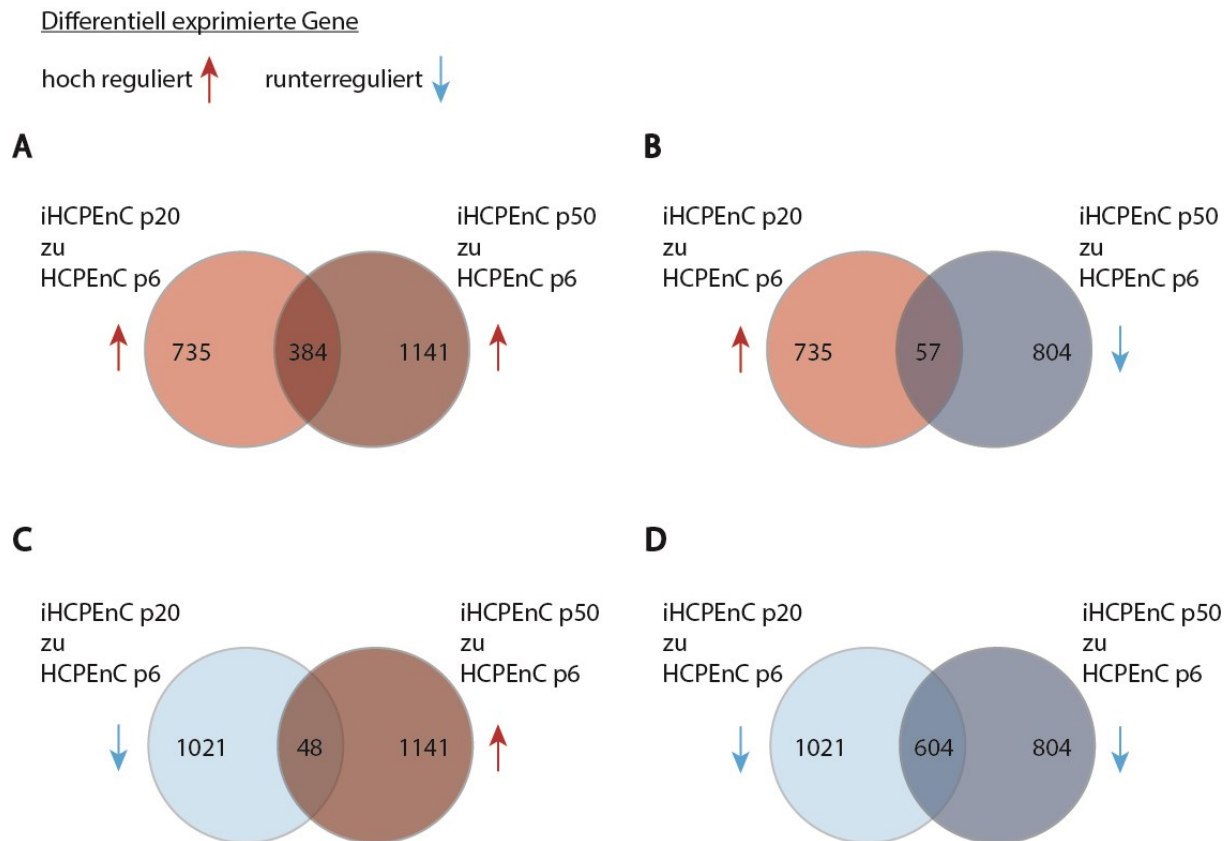


Abbildung 10 Entwicklung der Genexpression von der jüngeren zur älteren Passage. Hochregulierte Gene aus p20_vs_p6 wurden sowohl mit hochregulierten (**A**) als auch mit herunterregulierten Genen (**B**) aus p50_vs_p6 verglichen und gemeinsam und einzeln auftretende Gene aufgelistet. Dasselbe wurde für die herunterregulierten Gene aus p20_vs_p6 wiederholt (**C**, **D**). Zur Verdeutlichung der Entwicklung wurden hochregulierte Gene rot unterlegt und mit einem roten, hochweisenden Pfeil versehen, während herunterregulierte Gene blau unterlegt und mit einem blauen, herabweisenden Pfeil versehen wurden.

Nach dieser rein numerischen Analyse sollten die signifikanten DEG im nächsten Schritt näher betrachtet und verglichen werden. Dazu sollten diese Gene und ihre jeweilige Rolle identifiziert und damit ein erster Einblick in die Auswirkungen der beobachteten Veränderungen ermöglicht werden.

3.2.2. Identifikation der Gene mit den höchsten Signifikanzen

Um einen besseren Überblick über die Gene mit den höchsten Änderungen der Expressionslevel zu bekommen, wurde eine Heatmap mit den 50 DEG erstellt, welche die höchsten Signifikanzen aufwiesen (*SIEHE ABBILDUNG 11*). Dazu wurden die Daten der Genexpression standardisiert, d.h. für jedes Gen wurden die *Raw Reads* jeder Probe in die entsprechenden Z-Scores umgewandelt. Dadurch werden starke Abweichungen der Genexpression vom Erwartungswert (dem Mittel der detektierten Expressionslevel eines Gens) nun entsprechend einer Skala von 1 bis -1 zugeordnet, mit dem Wert 1 als starke positive Genexpression (rot) und -1 als starke negative Genexpression (grün). Dementsprechend können positive Werte als hochreguliert und negative Werte als herunterreguliert angesehen werden, während der Wert 0 keiner Abweichung entspricht und damit kein Unterschied in den Expressionslevel darstellt. Die so entstandenen Reihenminima und Reihenmaxima wurden anschließend anhand ihrer Ähnlichkeit hierarchisch geclustert, wodurch eine einfache Identifizierung der größten Unterschiede zwischen den primären Zellen p6 und den immortalisierten Zellen p20 und p50 ermöglicht wird.

Für die primäre Zelllinie sind drei unterschiedliche Cluster zu erkennen, in die sich die DEG einteilen lassen. Im oberen linken Eck der Heatmap (*ABBILDUNG 11A*) ist ein Cluster zu erkennen, das die Gene *fam102a*, *nfe4*, *pim3* und *col4a1* umfasst. Entsprechend seiner grünen Färbung wird diesen Genen in den primären HCPEnC ein Reihenminimum zwischen -0,5 und -1 zugewiesen und sie sind demnach nur schwach exprimiert. Die gleichen Gene sind in den immortalisierten Zellen vorwiegend rötlich gefärbt, was einem Maximum von 0,5 bis 1 entspricht. Sie sind dort demnach stark exprimiert. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Proben der älteren Passage p50 weniger stark exprimiert sind als die der jüngeren Passage p20, sodass sie je ein eigenes Cluster ausbilden.

Ein weiteres Cluster besteht aus den Genen *cd44*, *melanoma cell adhesion molecule (mcam)* und *cdpc1*. Während die geringste Expression dieser Gene in den Proben von iHCPEnC p20 vorliegt, ist die höchste Expression in den Proben von iHCPEnC p50 vorzufinden. Dies deutet auf eine Reduktion des Expressionslevels in der jüngeren Passage im Vergleich zu den primären Zellen und der p50 hin.

Das letzte deutlich zu erkennende Cluster in den Proben der primären Zellen umfasst die restlichen Gene. Dieses im Vergleich zu den beiden anderen umfangreiche Cluster verdeutlicht durch seine hellrote Färbung, dass diese Gene in HCPEnC die höchsten Expressionslevel von 0,5 bis 1 aufweisen.

Bei Betrachtung der Proben von iHCPEnC p20 und p50 kann das zuletzt erwähnte umfangreiche Cluster in drei verschiedene Cluster weiter unterteilt werden. Von diesen drei Clustern sind zwei sehr gut innerhalb der Proben der jüngeren Passage p20 zu erkennen. Das erste Cluster umfasst die Gene *col8a1*, *ccn2*, *mt2a*, *ptx3*, *ankrd1*, *tstd1*, *serpine1*, *tpm1*, *ccnd2*, *inhba*, *map1a* und *myl9* und ist durch seine dunkle Färbung im unteren Bereich der Heatmap gut zu erkennen. Interessanterweise sind diese Gene bei der jüngeren Passage p20 nicht klar in Maxima bzw. Minima eingeteilt, stattdessen bewegen sich deren Expressionslevel zwischen -0,5 und 0,5 und verweisen damit auf sehr geringe Unterschiede in den jeweiligen Expressionslevel. In der älteren Passage p50 sind diese Gene überwiegend durch hellgrüne Kolorierung charakterisiert, was nahelegt, dass diese Gene in der älteren Passage sehr schwach exprimiert werden. Beim Vergleich von HCPEnC p6 mit iHCPEnC p20 und p50 deutet dies darauf hin, dass diese Gene in p20 und p50 fortschreitend herunterreguliert werden, wobei die Wahrscheinlichkeit für eine signifikante Abweichung beim Vergleich mit p50 größer ist.

Das zweite Cluster umfasst die übrigen Gene und ist in iHCPEnC p20 hellgrün dargestellt, was Minima von -0,5 bis -1 verdeutlicht. Betrachtet man nun Werte dieser Gene in p50 unter Zuhilfenahme des Dendrogramms auf der linken Seite, lässt sich das Cluster in zwei weitere unterteilen, sodass die letzten beiden größeren Cluster ersichtlich werden. Das erste Cluster umfasst die Gene *zscan18*, *cxcl2*, *cobll1*, *uchl1*, *actn1*, *cxcl6*, *pcdhga8*, *plau*, *coro1c*, *nrg1*, *podxl*, *cxcl1*, *serpineb2* und *c6orf132*, dessen Werte sich in p50 überwiegend zwischen 0 und 0,5 bewegen. Diese Gene könnten sich dementsprechend mit Hilfe weiterer Analysen in *p50_vs_p6* als nicht signifikant verändert und in *p20_vs_p6* als herunterreguliert herausstellen.

Das dritte Cluster beinhaltet die Gene *lox*, *bcl2a1*, *csrp1*, *soat1*, *adamstl1*, *cntn1*, *heg1*, *pcxm2*, *mpzl2*, *celf2*, *mmp1*, *pdcd1lg2*, *ccnnd1*, *kcnj12*, *nfh* und *nnat*. Diese Gene sind überwiegend grün markiert, wobei sowohl Werte zwischen -0,5 und -1 (p20 und p50) als auch zwischen -0 und -0,5 (p50) erreicht werden. Die Mehrheit dieser Gene weist jedoch niedrige negative Werte auf. Dementsprechend könnte für diese Gene im Vergleich von p50 zu p6 mit keinen signifikanten Abweichungen zu rechnen sein. Die wenigen, die in p50 ebenfalls hellgrün markiert wurden, könnten dagegen ähnlich wie p20 im Vergleich zu p6 signifikant herunterreguliert sein.

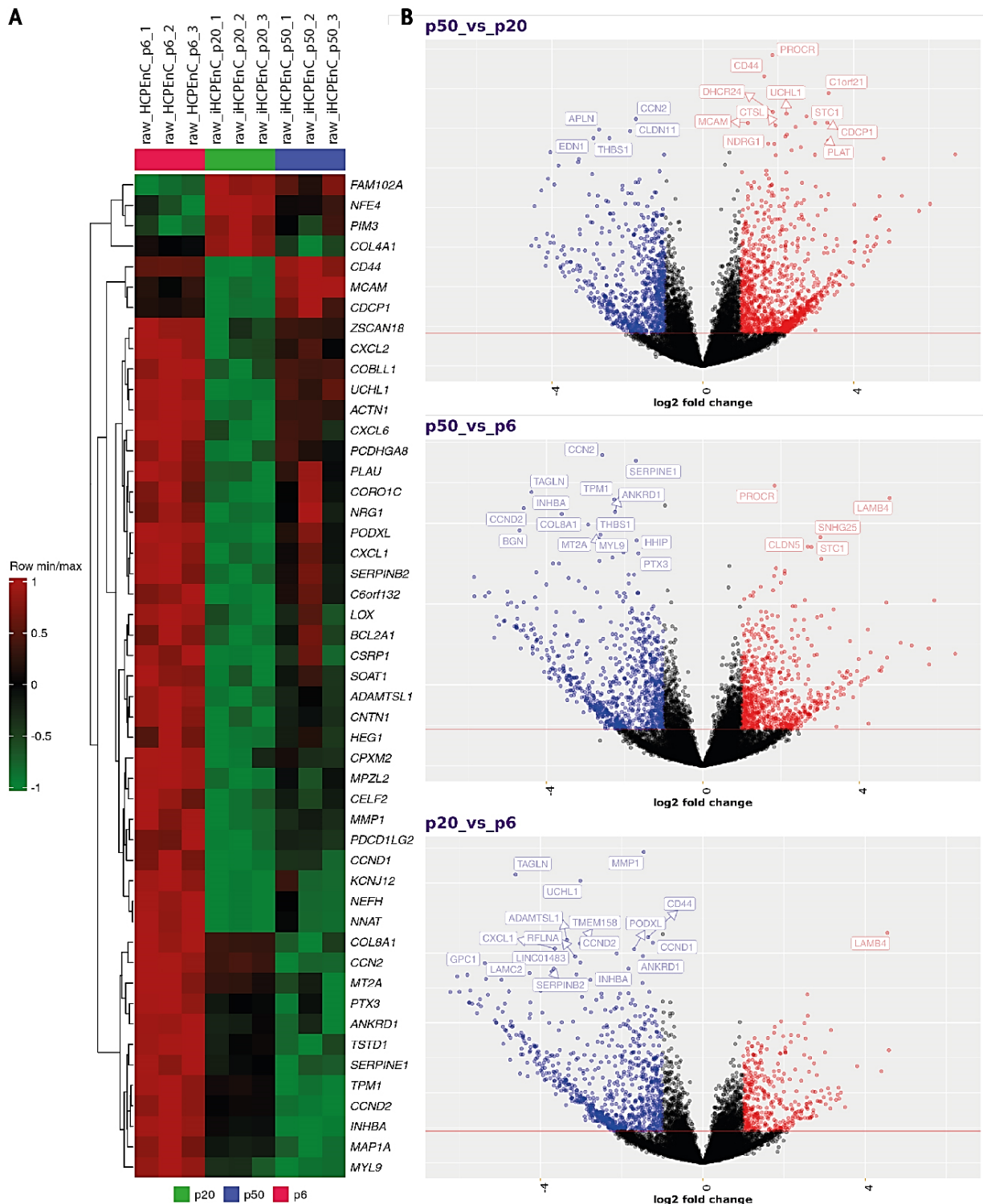


Abbildung 11 Vergleich der signifikanten Gene. A. veranschaulicht die Top 50 signifikant veränderten Gene anhand ihrer *Raw Reads* in einer Heatmap dar. B. stellt die einzelnen Volcano Plots von p20_vs_p6, p50_vs_p6 und p20_vs_p20 gegenüber. Die \log_2 *Fold changes* der einzelnen Transkripte wurde gegen den negativen \log_{10} ihrer p-Werte für p50_vs_p20, p50_vs_p6 und p20_vs_p6 aufgetragen. Dabei wurden Gene mit \log_2 *Fold changes* unter -1 als signifikant unter- und über 1 als signifikant überexprimiert. Darüber hinaus wurde ein p-Wert von 2,5 als *Signifikanz-Threshold* gewählt. Die resultierenden signifikant unter- bzw. überexprimierten Gene wurden blau bzw. rot markiert, während die nicht signifikanten schwarz gekennzeichnet wurden.

Da als Grundlage zur Generierung der Heatmap die *Raw Reads* der einzelnen Proben dienen, ist es möglich, dass nach Einbeziehung einer definierten Signifikanzschwelle bestimmte Gene in Bezug auf ihre differenzielle Expression anders bewertet werden. Aus diesem Grund wurden Volcano Plots für alle Gene aus den Vergleichen p20_vs_p6, p50_vs_p6 und p50_vs_p20 angefertigt, um eine bessere Aussage über die Verteilung aller DEG zu ermöglichen (ABBILDUNG 11B).

Im Gegensatz zur Heatmap bildet beim Volcano Plot der \log_2 *Fold change*, der gegen den \log_{10} der p-Werte aufgetragen wird, die Grundlage zur Darstellung der signifikanten DEG. Als Signifikanz-Grenzwerte wurden \log_2 *Fold changes* von +1 bzw. -1 und \log_{10} p-Werte von +0,05 bzw. -0,05 ausgewählt. Entsprechend dieser Kriterien werden die meisten Gene im nicht signifikanten Bereich eingestuft. Zusätzlich wurden für jede Gruppe einige der Gene mit den höchsten Signifikanzen ermittelt. Wie bereits in ABBILDUNG 5 angedeutet, sind bei Vergleich der jungen Passage der immortalisierten Zellen zu den primären Zellen (p20_vs_p6) die Mehrheit der signifikanten Gene herunterreguliert, einschließlich aller Gene mit den höchsten Signifikanzen, mit der Ausnahme von *lamb4*. Auch bei Vergleich der späten Passage der immortalisierten Zellen zu den primären Zellen (p50_vs_p6) sind die meisten signifikanten Gene herunterreguliert, jedoch sind neben *lamb4* auch *procr*, *snhg25*, *cldn5* und *stc1* hochreguliert. Mit einer erhöhten Lebensdauer der Zelllinie findet daher eine Verschiebung der differentiellen Expression hin zu einer Hochregulierung statt. Betrachtet man die Unterschiede zwischen den immortalisierten Zellen der Passagen p50 und p20, ohne die primäre Zelllinie miteinzubeziehen, wird dieser Effekt besonders deutlich. Dementsprechend finden sich hier nicht nur die Mehrzahl der signifikant regulierten Gene auf der Seite der hochregulierten Gene, auch *uchl1* und *cd44*, die bei p20_vs_p6 unter den stark herunterregulierten Genen zu finden waren, werden nun den stark hochregulierten Genen zugeordnet. Vergleicht man p20_vs_p6 und p50_vs_p6 fallen auch einige Gene auf, deren Einordnung unverändert bleibt. Dazu zählen neben *lamb4* auf der hochregulierten Seite auch *tagln*, *ccdn2*, *inhba* und *ankrd1* auf der herunterregulierten Seite (ABBILDUNG 11). Ebenso ist sowohl bei p50_vs_p6 als auch bei p50_vs_p20 *thbs1* herunterreguliert und *stc1* hochreguliert. Durch die Betrachtung einzelner signifikanter Gene ist jedoch weder eine Schlussfolgerung noch eine Voraussage möglich, ob bzw. wie sich diese Veränderungen auf die Zelle auswirken und welchen Phänotyp sie dadurch potenziell ausbildet. Daher sollen im nächsten Schritt alle Gene gemeinsam betrachtet werden, die in einem logischen Zusammenhang zueinanderstehen. Dadurch soll geklärt werden, ob die signifikant veränderten Gene nur einzelne Abweichungen darstellen, oder ob sie in der Summe zu biologischen Veränderungen führen könnten.

3.2.2. Auswirkungen der signifikant exprimierten Gene auf biologische Prozesse

Sowohl in der Heatmap als auch in den Volcano Plots tauchen differentiell regulierte Gene auf, die eine ähnliche biologische Funktion haben bzw. denselben biologischen Prozessen zugeordnet werden. Dazu zählen z.B. *ccnd1* und *ccnd2*, welche beide an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, oder *cldn5* und *cldn11*, die beide zum Aufbau von TJ beitragen. Dementsprechend stellt sich die Frage, ob neben diesen DEG noch weitere DEG identifiziert werden können, die derselben biologischen Funktion zugeordnet werden können. Weiterhin ist von Interesse, ob die beobachteten signifikanten Veränderungen potenziell in der Lage sind Veränderungen der biologischen Abläufe innerhalb der Zelle zu verursachen. Daher wurden Gene Set Enrichment Analysen (GSEA) durchgeführt, um festzustellen, ob innerhalb einer Gruppe von Genen bestimmte Genklassen signifikant über- oder unterexprimiert werden und somit zu einem veränderten Phänotyp beitragen könnten.

Als Grundlage für die GSEA wurden Gen-Sets (GS) auf Basis der Gene Ontology (GO) Datenbank ausgewählt und nach den biologischen Prozessen (BP) als Parameter geordnet (Gene Ontology Biological Processes; GOBP). Dies wurde für p20_vs_p6, p50_vs_p6 und p50_vs_p20 durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden anschließend in *ABBILDUNG 12* in Form von Dot Blots wiedergegeben. Dabei wurden die GS zunächst vom niedrigstem zum höchsten p-Wert sortiert und anschließend die zehn GS mit den niedrigsten p-Werten zur Erstellung der Dot Blots verwendet. Nach der Adjustierung der p-Werte wiesen diese Sets die gleichen p-Werte auf und wurden demnach nach den *GeneRatios* aufgetragen.

Die GSEA ergab, dass das Gen-Set mit der höchsten *GeneRatio* bei Vergleich der jungen immortalisierten Passage zu den primären Zellen (p20_vs_p6) „*neuron projection development*“ war, während es bei Vergleich der späten immortalisierten Passage zu den primären Zellen (p50_vs_p6) „*RNA processing*“ und bei Vergleich der beiden Passagen (p50_vs_p20) „*cell division*“ war. Des Weiteren fällt auf, dass p20_vs_p6 und p50_vs_p6 vier der zehn ermittelten GS teilen, diese allerdings andere Counts und *GeneRatios* aufweisen, sodass sie aufgrund ihrer Signifikanz in einer anderen Rangfolge erscheinen. Es handelt sich dabei um „*regulation of cellular component movement*“, „*regulation of protein phosphorylation*“, „*epithelium development* und „*circulatory system development*“. Darüber hinaus ist auffällig, dass bei p20_vs_p6 die meisten Gen-Sets in den Bereichen „*development*“ und „*morphogenesis*“ mit jeweils zwei bzw. drei Sets zu finden sind. Dagegen ist nur ein Set zum Bereich „*movement*“ vorhanden. Interessanterweise hatten diese GS alle einen negativen *Enrichment Score* (ES) und auch ihr normalisierter ES (NES) war negativ, weswegen diese GO-Termini als herunterreguliert oder unterdrückt betrachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu sind bei p50_vs_p6 nur zwei GS der Entwicklung und ein Set der Morphogenese unter den 10 betrachteten GS zu finden, während vier Sets Signalwegen zugeordnet werden können. Darüber hinaus wurden die beiden GS „*RNA processing*“ und „*positive regulation of cellular component organisation*“ ermittelt. Auch bei der älteren Passage waren alle ES und NES der im Dot Blot dargestellten GO-Termini negativ und gelten daher als herunterreguliert oder unterdrückt. Auffällig ist jedoch, dass beim direkten Vergleich von p50 und p20, ohne dass vorher auf eine Schnittmenge mit p6 selektiert wurde, andere GS in den Vordergrund treten. So können drei Sets dem Bereich Immunität zugeordnet werden, drei umfassen unterschiedliche biosynthetische Prozesse und drei umfassen die Organisation der Zelle, sowie die Zellteilung. Somit sind Unterschiede zwischen den drei Zelltypen festzustellen. Darüber hinaus sind alle GS, die im Dot Blot von p50_vs_p20 vermerkt wurden, hochreguliert und haben demnach positive ES und NES in Gegensatz zu p20_vs_p6 und p50_vs_p6.

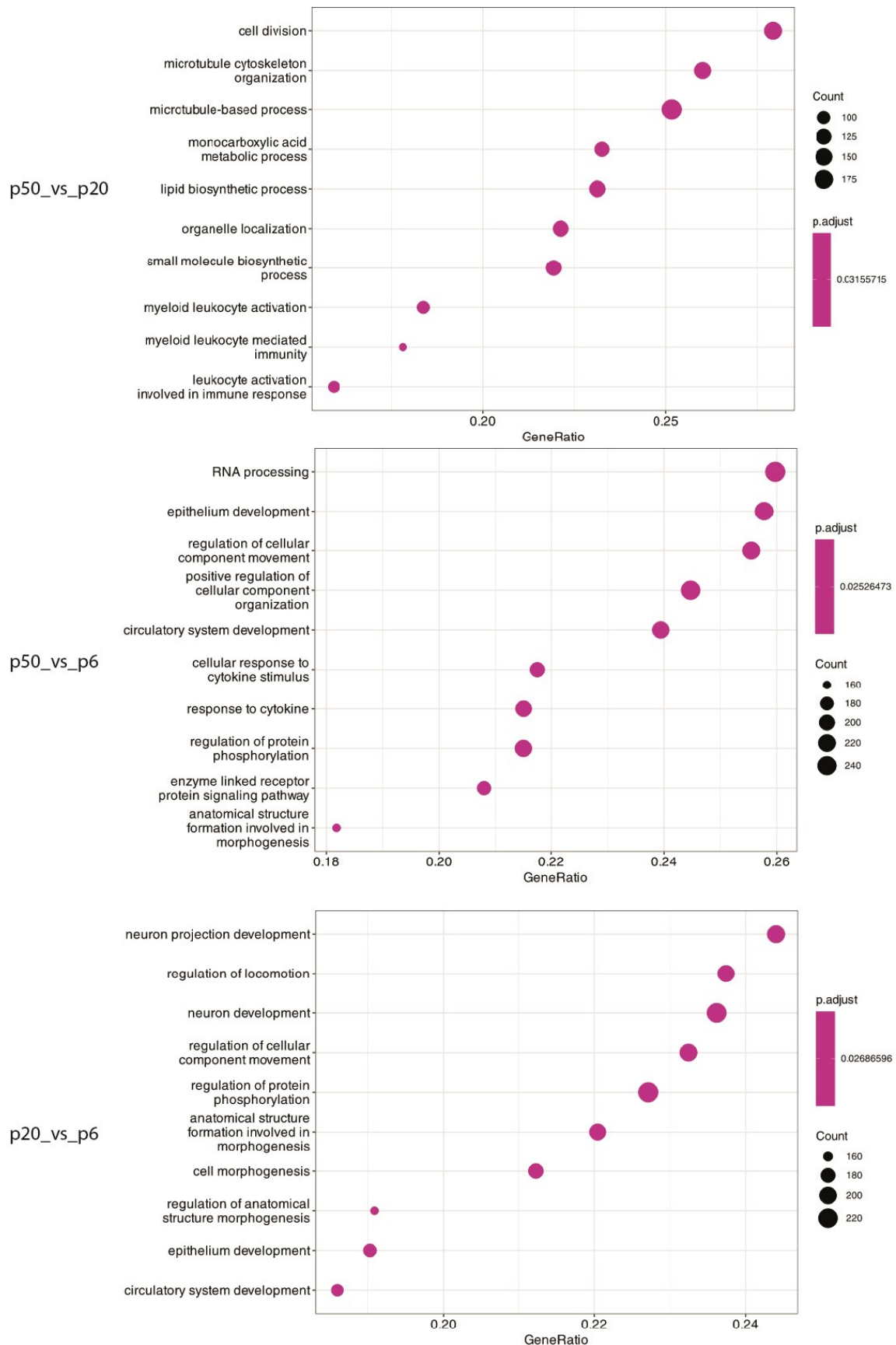


Abbildung 12 Dot Blots der GSEA ermittelten GOBP. Als Grundlage der GSEA wurde die Datenbank der GO unter der Rubrik BP verwendet. Dargestellt wurden die 10 GS mit den höchsten *GeneRatios* und niedrigsten adjustierten p-Wert. Die jeweilige Anzahl (Count) signifikant veränderter Kern-Gene des GS wird dabei durch Kreise (Dots) mit unterschiedlichen Durchmessern versinnbildlicht. Die *GeneRatio* stellt das Verhältnis zwischen Counts pro Setgröße dar.

Mit Hilfe der beschriebenen GSEA Analysen auf Basis der GOBP wurde ein Überblick über diejenigen biologischen Prozesse erstellt, welche in Folge der Immortalisierung der Zelllinie potenziell verändert wurden. Zur Überprüfung dieser Daten wurde eine weitere GSEA auf Basis der *Reactome* Datenbank durchgeführt. Gleichzeitig ist es damit möglich, die identifizierten BP genauer zu untersuchen und so potenzielle Auswirkungen besser abzuschätzen. Analog zur vorherigen Untersuchung, wurden auch hier die Ergebnisse in einem Dot Blot veranschaulicht (*ABBILDUNG 13*). Dabei wurden für p20_vs_p6, p50_vs_p6 und p50_vs_p20 die zehn GS mit den niedrigsten p-Werten ausgewählt und im Dot Blot entsprechend der Größe ihrer *GeneRatios* aufgetragen, da auch hier die adjustierten p-Werte identisch waren.

Die Analyse von p20_vs_p6 ergab, dass sechs der identifizierten GS dem Überbegriff „*cell cycle*“ zugeordnet werden können. Die anderen vier Sets umfassen „*sensory perception*“, „*RHO GTPase effectors*“, „*extracellular matrix organization*“ und „*intra-Golgi and retrograde Golgi to ER traffic*“. Bis auf die „*sensory perception*“, welche zu den GO-Termini unter dem Überbegriff „*neurons*“ passen, sind diese Ergebnisse zunächst überraschend, da aus der vorherigen GOBP Analyse der Schwerpunkt auf den „*cell cycle*“ nicht ersichtlich war. In der GOBP Analyse waren die meisten GO-Termini den Bereichen „*development*“ und „*morphogenesis*“ zugeordnet (*ABBILDUNG 12*). Ein Bezug zu Entwicklung und Morphogenese kann in Kombination mit den „*RHO GTPase effectors*“ und der „*extracellular matrix organization*“ erstellt werden, da sowohl während der Zellteilung als auch während der Entwicklung, die stark von der Zellteilung abhängt, die Zellkomponenten (wie z.B. die extrazelluläre Matrix, der Nukleus, Aktinskelett, Mikrotubuli, uvm.) organisiert und neu aufgebaut werden müssen. Analog zur GOBP Analyse, wiesen auch bei Analyse der *Reactome* Datenbank alle GS, die zur Erstellung der Dot Blot verwendet wurden, einen negativen ES und NES auf und waren demnach herunterreguliert.

Bei p50_vs_p6 konnten drei Sets bestimmt werden, die mit RNA-Prozession und Translation zusammengefasst werden können. Drei weitere sind dem Bereich der Biosynthese zuzuordnen, wobei sich zwei mit der Synthese von Cholesterol und ein Set mit der Synthese von Triglyceriden beschäftigt. Zwei Gene-Sets befassen sich mit der Regulation der Genexpression über SREBF/SREBP und ein Set mit Signalübertragung über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Die verbliebenen beiden Sets umfassen die Organisation der extrazellulären Matrix und Axon Führung. Während bei p20_vs_p6 sowohl die GO-Termini der BP und der *Reactome* Datenbank herunterreguliert waren, sind bei p50_vs_p6 sowohl hoch als auch herunterregulierte GS nach der *Reactome* Datenbank Analyse zu beobachten. Zu den hochregulierten GO-Termini gehören „*cholesterol biosynthesis*“, „*triglyceride synthesis*“, „*activation of gene expression by SREBF (SREBP)*“ und „*regulation of cholesterol biosynthesis by SREBP (SREBF)*“. Herunterreguliert waren dagegen „*rRNA processing*“, „*rRNA processing in the nucleus and the cytosol*“, „*extracellular matrix organization*“, „*axon guidance*“, „*translation und signaling by receptor tyrosine kinases*“. Die gefundenen GO-Termini stimmen nach Analyse der *Reactome* Datenbank bzw. der BP gut miteinander überein.

Der Vergleich p50_vs_p20 weist insgesamt fünf GS auf, die den Bereichen „*cell cycle*“ und „*cell division*“ zugeordnet werden können. Zwei weitere Sets umfassen den „*metabolism of steroids*“ und „*fatty acid metabolism*“, eines den „*cilium assembly*“ und zwei weitere „*RHO GTPase effectors*“ und „*RHO GTPase activate formins*“. Daher weist auch der Vergleich p50_vs_p20 eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der GOBP und *Reactome* Datenbank Analyse auf. Unter anderem sind die GO-Termini von p50_vs_p20 ebenfalls bei Analyse mit Hilfe der *Reactome* Datenbank hochreguliert gefunden.

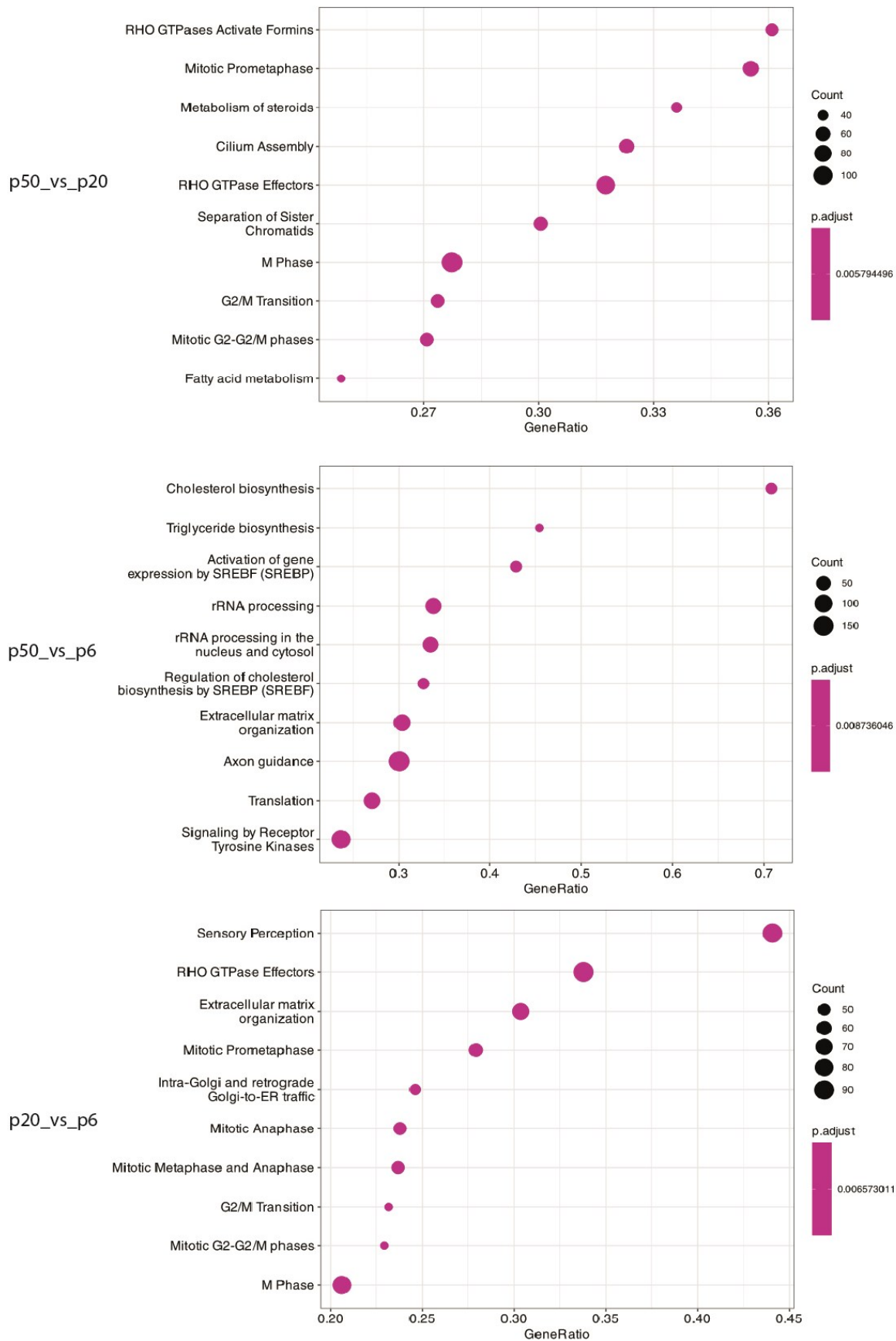


Abbildung 13 Dot Blots der mit Hilfe der GSEA ermittelten Reaktome. Als Grundlage der GSEA wurde die Datenbank der Reaktome verwendet. Dargestellt wurden die 10 GS mit den höchsten *GeneRatios* und niedrigsten adjustierten p-Wert. Die jeweilige Anzahl (Count) signifikant veränderter Kern-Gene des GS wird dabei durch Kreise (Dots) mit unterschiedlichen Durchmessern versinnbildlicht. Die *GeneRatio* stellt das Verhältnis zwischen Counts pro Setgröße dar.

Bei der gemeinsamen Betrachtung aller Daten, die mit Hilfe der Analyse der *Reactome* Datenbank gewonnen wurden, fällt auf, dass p20_vs_p6 und p50_vs_p6 nur 1 gemeinsames Gen-Set unter den betrachteten 10 relevantesten GS teilen, während p20_vs_p6 und p50_vs_p20 vier gemeinsam auftretende GS aufweisen. Während fast alle GS nicht explizit nur auf einen Zelltyp beschränkt sind, stechen die RHO-GTPase Effektoren, die bei p20_vs_p6 und p50_vs_p20 aufgelistet werden, aus dieser Liste heraus. Neben ihrer Hauptaufgabe der Aktin-Reorganisation, sind sie auch in der Zell Migration, dem Membrantransport und der Wundheilung tätig [235]. Besonders letzteres ist ein charakteristischer Funktionsbereich von Endothelien. Deswegen sollen endothel-relevanten Gene im nächsten Abschnitt nochmals genauer betrachtet werden.

3.3. Vergleichende Expression endothel-relevanter Gene

Bei den iHCPEnC handelt es sich um eine immortalisierte Endothelzelllinie des Plexus choroideus, welche möglichst genau die speziellen Eigenschaften dieses spezifischen Endothels widerspiegeln sollen. Daher wurden die Ergebnisse der RNA-Seq nochmals auf Unterschiede der Transkriptome der primären Zellen und den beiden Passagen iHCPEnC in Bezug auf charakteristische Endothel-Faktoren untersucht. Es wurden insgesamt 84 endothel-relevante Gene betrachtet. Unter diesen Genen befanden sich sowohl sogenannte pan-Endothelmarker, welche unabhängig von dem Gefäßbett und dessen Lage exprimiert werden und solche, die spezifisch für das Endothel der Gehirn-Mikrovaskulatur bzw. des PC sind. Zu den Pan-Endothelmarkern zählen unter anderem Gene, die bei der Blutgerinnung und Wundheilung eine Rolle spielen. Es wird zwischen den prokoagulierenden Faktoren, welche die Bildung von Blutpfropfen bzw. Thromben zur Gefäßverschlussung nach Verletzungen befördern und den antikoagulierenden Faktoren, welche sie verhindern, unterschieden [10]. Zu ersteren zählen unter anderem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI)-1 kodiert von *serpine1* und von Willebrand Faktor (*vWF*), welcher Träger des Blutgerinnungsfaktors VIII ist. Die antikoagulierenden Faktoren umfassen unter anderem den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (*plac1*), Thrombomodulin (*thbd*) und Endothelial Protein-C-Rezeptor (*procr*) [9,10,236,237]. Eine weitere Besonderheit beider Faktoren besteht darin, dass sie in Arterien, Venen und Kapillaren unterschiedlich exprimiert werden. Antikoagulierende Faktoren werden vermehrt in Arterien und Venen exprimiert, während Kapillaren beide Faktorarten exprimieren [9,10,236,237].

Weitere Endothelmarker können der Immunabwehr zugeordnet werden z.B. zur Rekrutierung von Leukozyten und deren Passage über die EZ. Dazu zählen P-Selektin und E-Selektin, ICAM1 und ICAM2, welche die Stadien *rolling* und *adhesion* der transendothelialen Zell-Migration vermitteln [238-240]. Für den eigentlichen Prozess der Zell-Migration ist *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (*pecam1*/ CD31) verantwortlich [238-240].

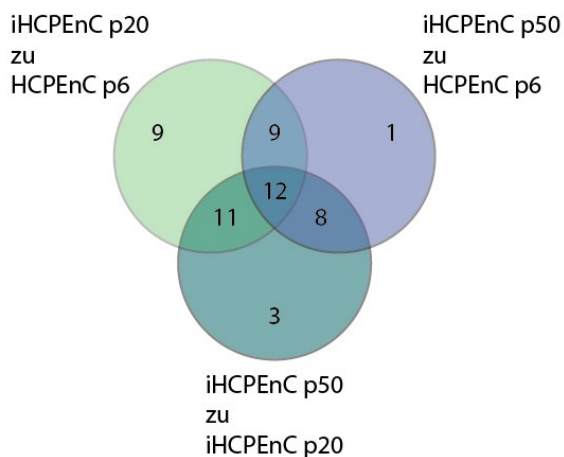
Im Gegensatz zu den pan-Endothelmarkern unterscheidet sich die Expression von Genen für TJ oder AJ oder die von Genen, welche in die Regulation der Gefäßpermeabilität involviert sind, zwischen unterschiedlichen Organen und Gefäßbetten entsprechend den vorliegenden Endotheltypen. Daher können diese Gene als Marker für spezifische Endotheltypen verwendet werden. So ist VE-cadherin (CDH5) in AJ reichen EZ zu finden, PLVAP in fenestrierten Gefäßen, und Mitglieder der Claudin Familie sind Bestandteile von TJ in besonders dichten Endothelien, wobei Claudin 5 (CLDN5) besonders hoch in der BHS exprimiert wird [10]. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei VEGF um einen Marker für induzierte Permeabilität [241-243].

3.3.1. Numerischer Vergleich signifikant exprimierter, endothel-relevanter Gene

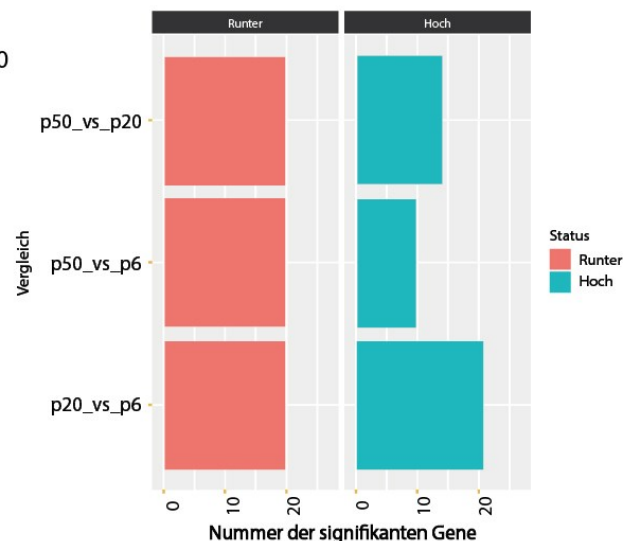
Im ersten Schritt wurde untersucht, inwiefern die 84 selektierten endothel-relevanten Gene in den Gruppen der DEG vorgefunden wurden. Von den ausgewählten Genen wurden 41 bei Vergleich der jungen immortalisierten Zellen im Vergleich zu den primären Zellen (p20_vs_p6) ermittelt, 30 bei Vergleich der älteren Passage der immortalisierten Zellen im Vergleich zu den primären Zellen (p50_vs_p6), und 34 Gene werden bei Vergleich beider Passagen der immortalisierten Zellen (p50_vs_p20) als signifikant eingestuft (ABBILDUNG 14A & B). Einige der Gene traten dabei in zwei oder sogar in allen drei Gruppen als signifikant hervor. Zwölf Gene wurden in allen drei Gruppen als signifikant identifiziert. Abzüglich der 12 Gene, die in allen drei Gruppen vertreten waren, wiesen die Vergleiche p20_vs_p6 und p50_vs_p6 eine Überlappung von 9 Genen auf, die Vergleiche p50_vs_p6 und p50_vs_p20, 8 und die Vergleiche p20_vs_p6 und p50_vs_p20 11. Außerdem offenbarten sich mehrere Gene, die nur in einer der drei Gruppen den Status eines signifikant exprimierten Genes erhielten. Das galt für 9 Gene bei p20_vs_p6, einem Gen bei p50_vs_p6 und drei Genen bei p50_vs_p20 (SIEHE ABBILDUNG 14A).

Werden die signifikanten Gene weiter nach hoch- und herunterregulierten Genen charakterisiert, ergeben sich für p20_vs_p6 20 herunterregulierte und 21 hochregulierte Gene. Auch der Vergleich p50_vs_p6 zählte 20 herunterregulierte Gene, jedoch nur 10 hochregulierte Gene. Von den 34 signifikanten Genen bei p50_vs_p20 wurden ebenfalls 20 Gene zu den herunterregulierten Genen gezählt, während 14 Gene den hochregulierten zugerechnet wurden (ABBILDUNG 14B).

A Aufteilung der signifikanten Gene



B



	Runter	Hoch	Gesamt
p50_vs_p20	20	14	34
p50_vs_p6	20	10	30
p20_vs_p6	20	20	41

Abbildung 14 Vergleich der Expression endothel-relevanter Gene zwischen HCPEnC p6, iHCPEnC p20 und iHCPEnC p50. A. stellt die jeweiligen Anzahlen der signifikant exprimierten Gene zwischen p20_vs_p6, p50_vs_p6 und p50_v_p20 und deren jeweiligen Überschneidungen in einem Venndiagramm dar. **B.** stellt die jeweiligen Anzahlen der signifikanten Gene der drei Gruppen einander gegenüber und teilt sie weiter in herunterregulierte und hochregulierte Gene auf, die sowohl in graphischer als auch in tabellarer Form zusammengefasst werden.

3.3.2. Identifikation signifikant exprimierter, endothel-relevanter Gene

Von den signifikant differentiell exprimierten, endothel-relevanten Genen wurden bei den drei Vergleichen primäre HCPEnC p6 zu immortalisierte iHCPEnC p20 (p20_vs_p6), primäre HCPEnC p6 zu immortalisierte iHCPEnC p50 (p50_vs_p6) und ältere Passage zu jüngerer Passage der immortalisierten iHCPEnC (p50_vs_p20) 12 Gene gefunden, die bei allen drei Vergleichen vorkamen. Darunter waren auch Gene, die bereits in *ABBILDUNG 11* unter den Genen mit den höchsten signifikanten differentiellen Expressionen eingestuft worden waren, nämlich die Gene für MCAM (oder CD146), Matrix metalloproteinase-1 (MMP1), Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (PLAU), Pentraxin-related protein 3 (PTX3 oder TSG-14) und SERPINE1 (*ABBILDUNG 11*). Bei MCAM handelt es sich um ein Zelladhäsionsmolekül, das als Rezeptor für ein breit exprimiertes Matrixprotein namens Laminin alpha-4 fungiert. MMP1 ist involviert im Abbau der extrazellulären Matrix, PLAU in der Auflösung von Blutgerinnseln (Fibrinolyse), PTX3 in der Aktivierung des Komplementsystems und SERPINE1 in der Hemmung der Fibrinolyse. Weitere DEG, die in allen drei Gruppen signifikant exprimiert waren, sind *cdh5*, *cldn11*, *dkk3*, *eng*, ein Teil des TGF- β Rezeptorkomplexes, *nrp1*, ein membrangebundener Tyrosinkinase Rezeptor für vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (*vegf*) und *rcn1*, ein Calcium bindendes Protein innerhalb des ER Lumens.

Tabelle 6 Vergleich der Fold changes der endothel relevanten Gene. Die zusammengestellten log₂ Fold changes von iHCPEnC p20 bzw. iHCPEnC p50 zur primären Zelllinie HCPEnC p6 wurden aufgrund der Daten der MACE-Analyse zusammengestellt. Fold changes der signifikanten Gene wurden hervorgehoben.

SYMBOL	GENNAME	P20_VS_P6	P50_VS_P6	P50_VS_P20
ANXA2	annexin A2	-0,70	-0,73	-0,03
ATP1B1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 1	-0,45	-1,20	-0,75
CAV1	caveolin 1	-0,06	-0,14	-0,08
CAV2	caveolin 2	0,16	0,09	-0,07
CAVIN1	caveolae associated protein 1	-0,56	-0,35	0,21
CD109	CD109 molecule	0,09	0,16	0,06
CD59	CD59 molecule (CD59 blood group)	0,00	0,27	0,27
CD99	CD99 molecule (Xg blood group)	0,36	0,73	0,37
CDH5	cadherin 5	0,74	-0,47	-1,21
CLDN11	claudin 11	0,69	-1,24	-1,92
CTNNB1	catenin beta 1	0,20	-0,44	-0,64
DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	-1,66	-1,64	0,02
DKK3	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3	0,32	-0,73	-1,05
DVL1	dishevelled segment polarity protein 1	0,10	0,19	0,10
DVL2	dishevelled segment polarity protein 2	0,12	0,27	0,15
DVL3	dishevelled segment polarity protein 3	0,55	0,26	-0,29
EZCR	endothelial cell surface expressed chemotaxis and apoptosis regulator	-0,22	0,07	0,29
EDF1	endothelial differentiation related factor 1	0,16	0,00	-0,16
EDN1	endothelin 1	0,25	-2,64	-2,90
EGFL7	EGF like domain multiple 7	0,62	0,34	-0,29
ENG	endoglin	0,32	-0,70	-1,03
EPHB4	EPH receptor B4	0,81	0,25	-0,56
ESAM	endothelial cell adhesion molecule	0,09	0,61	0,52
ESM1	endothelial cell specific molecule 1	-1,34	-0,56	0,79
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	-0,22	0,00	0,22
FKBP2	FKBP prolyl isomerase 2	0,04	0,04	0,01

FZD1	frizzled class receptor 1	1,00	-0,38	-1,38
FZD2	frizzled class receptor 2	-0,51	0,59	1,10
FZD3	frizzled class receptor 3	-1,90	-2,58	-0,68
FZD4	frizzled class receptor 4	0,37	0,26	-0,12
FZD5	frizzled class receptor 5	0,92	0,88	-0,03
FZD6	frizzled class receptor 6	0,75	0,37	-0,39
FZD7	frizzled class receptor 7	-0,39	0,13	0,52
FZD8	frizzled class receptor 8	1,28	-0,19	-1,47
FZD9	frizzled class receptor 9	-0,74	-0,45	0,30
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0,19	0,00	0,19
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	-0,41	-0,51	-0,10
ICAM2	intercellular adhesion molecule 2	0,06	0,05	-0,02
ICAM3	intercellular adhesion molecule 3	0,15	0,02	-0,13
IFI16	interferon gamma inducible protein 16	0,84	0,99	0,15
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	0,37	0,13	-0,24
ITGA5	integrin subunit alpha 5	-0,30	-0,53	-0,23
LGALS3	galectin 3	0,08	0,05	-0,03
LRP5	LDL receptor related protein 5	1,61	0,49	-1,12
LRP6	LDL receptor related protein 6	0,27	-0,56	-0,82
LYVE1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	3,32	2,45	-0,87
MCAM	melanoma cell adhesion molecule	-0,71	0,49	1,20
MMP1	matrix metalloproteinase 1	-1,45	-0,97	0,49
NECTIN2	nectin cell adhesion molecule 2	-0,42	-0,54	-0,13
NRP1	neuropilin 1	1,13	0,48	-0,65
OCLN	occludin	-2,51	-0,51	2,00
PECAM1	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1	0,53	-0,23	-0,77
PLAT	plasminogen activator, tissue type	-3,11	0,22	3,33
PLAU	plasminogen activator, urokinase	-1,77	-0,57	1,20
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	-0,66	-0,33	0,33
PLVAP	plasmalemma vesicle associated protein	1,23	-0,50	-1,73
PLXND1	plexin D1	0,79	0,62	-0,17
PTMA	prothymosin alpha	0,32	0,21	-0,11
PTX3	pentraxin 3	-0,96	-1,65	-0,69
RCN1	reticulocalbin 1	1,21	0,82	-0,39
ROBO4	roundabout guidance receptor 4	-0,37	-0,10	0,27
RYK	receptor like tyrosine kinase	0,44	0,59	0,15
S100A11	S100 calcium binding protein A11	-0,10	-0,03	0,07
S100A16	S100 calcium binding protein A16	-0,38	0,00	0,39
SERPINE1	serpin family E member 1	-0,98	-1,71	-0,73
SFRP4	secreted frizzled related protein 4	-1,42	0,33	1,75
TFRC	transferrin receptor	0,31	-1,83	-2,14
THBD	thrombomodulin	-1,69	-0,39	1,30
THBS1	thrombospondin 1	-0,14	-2,61	-2,48
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	-0,46	0,01	0,47
VEGFB	vascular endothelial growth factor B	0,44	0,20	-0,24
VEGFC	vascular endothelial growth factor C	-1,04	-1,64	-0,59
VIM	vimentin	-0,06	0,66	0,71
VWF	von Willebrand factor	2,58	-0,71	-3,29
WNT2B	Wnt family member 2B	-0,02	-0,41	-0,39

WNT3	Wnt family member 3	-0,79	-0,79	0,00
WNT3A	Wnt family member 3A	-0,77	0,42	1,20
WNT4	Wnt family member 4	0,04	0,23	0,18
WNT5A	Wnt family member 5A	1,11	-1,85	-2,96
WNT7B	Wnt family member 7B	0,32	0,15	-0,18
WNT9A	Wnt family member 9A	1,15	0,80	-0,34
WNT9B	Wnt family member 9B	-1,10	0,15	1,25
WNT10B	Wnt family member 10B	1,47	2,02	0,55
WNT11	Wnt family member 11	-0,77	1,50	2,27

Gene, die nur bei p20_vs_p6 und p50_vs_p6 als signifikant identifiziert werden konnten, waren *anxa2*, *cavin1*, *dkk1*, *fzd3*, *ifi16*, *itga5*, *lyve1*, *nectin2*, und *vegfc*. Diese Gene zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich der beiden Passagen der immortalisierten Zelllinie. Dementsprechend könnte eine stabile Veränderung der immortalisierten Zelllinie vorliegen.

Einige Gene wiesen sowohl in p20_vs_p6, als auch in p50_vs_p20, aber nicht in p50_vs_p6, signifikante Unterschiede auf. Unter diesen Genen waren *ephb4*, *esm1*, *fzd8*, *lrp5*, *ocln*, *pecam1*, *plat*, *robo4*, *s100a16*, *thbd* und *vwf*. Obwohl diese Gene in p20 im Vergleich zu den primären Zellen einen deutlichen Unterschied in der Expression aufwiesen, ist diese Expressionsdifferenz offensichtlich nicht über weitere Passagen stabil.

Im Gegensatz dazu konnten durch den Vergleich der späten Passage p50 zu der jungen Passage p20 Gene identifiziert werden, die erst im Verlauf einer zunehmenden Passagierung der Zelllinie den Status einer signifikanten Divergenz erreichen konnten. Diese Gene umfassten *cd59*, *cd99*, *ctnnb1*, *edn1*, *tfric*, *thbs1* und *vim*.

Die endothel-relevanten Gene *egfl7*, *fzd4*, *fzd6*, *plaur*, *plxnd1*, *ptma*, *vegfb* und *wnt9a* sind nur beim Vergleich p20_vs_p6 signifikant reguliert. Im Gegenzug dazu wurde *wnt10b* nur beim Vergleich p50_vs_p6 als signifikant verändert eingestuft. Interessanterweise scheinen sich diese Veränderungen der jungen und der älteren Passage nur in Bezug auf die Primärzelllinie zu offenbaren, da im direkten Vergleich der beiden Passagen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Werden jene Gene betrachten, die nur im direkten Vergleich der beiden Passagen der iHCPEnC als signifikant eingestuft werden, treten *plvap*, *wnt5a* und *wnt11* hervor.

3.4. Expression von WNT-Rezeptoren, Ko-Rezeptoren und Signalmodulatoren in HCPEnC

Bei der Untersuchung der endothelrelevanten Gene konnten ebenfalls einige Komponenten des WNT-Signalweges als signifikant verändert in den immortalisierten Zellen festgestellt werden. Im ZNS trägt der WNT-Signalweg zur Regulierung der Angiogenese und Differentiation der EZ bei und spielt eine ebenso wichtige Rolle beim Aufbau und der Aufrechterhaltung der BHS und der BRB in den ausdifferenzierten Kapillaren [76,102,213,214]. Eine fehlerhafte Aktivierung des WNT-Signalweges in diesen EZ führt zu der Expression von *plvap*, dessen Proteinprodukt dort unter normalen Bedingungen nicht gebildet wird, und verursacht dadurch einen Anstieg der Permeabilität dieser Kapillaren und den Verlust der Barriere [13]. Im Gegensatz zu den EZ der BHS exprimieren die fenestrierten EZ des PC PLVAP in den FD und SD der *Fenestrae* und *Stomata* [52,57]. Da EZ in verschiedenen Regionen des ZNS

unterschiedlich sensitiv für WNT-Signalübertragung sind [11], kann der WNT-Signalweg eine Rolle bei der Regulierung der *plvap* Expression in den EZ des PC spielen.

Zur Überprüfung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung sollte mittels PCR bestätigt werden werden, dass die primären PC-Endothelzellen alle nötigen Komponenten exprimieren, um einen funktionierenden kanonischen WNT-Signalweg aufzubauen. Dazu wurden die Zellen lysiert und anschließend RNA aus dem Lysat entnommen und aufgereinigt (2.2.2.1). Nach der Umwandlung in cDNA (2.2.2.2) wurde mittels PCR und den unter 2.1.5 aufgeführten Oligonukleotidprimern die Genexpression der Komponenten des kanonischen Signalweges verifiziert (2.2.2.3 & 2.2.2.4). Zur Kontrolle wurden *human fetal brain total* RNA und eine humane BHS-Endothel Zelllinie (hCMEC/D3) eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in **ABBILDUNG 15** zusammengefasst, welche repräsentativ für vier unabhängige Untersuchungen ist.

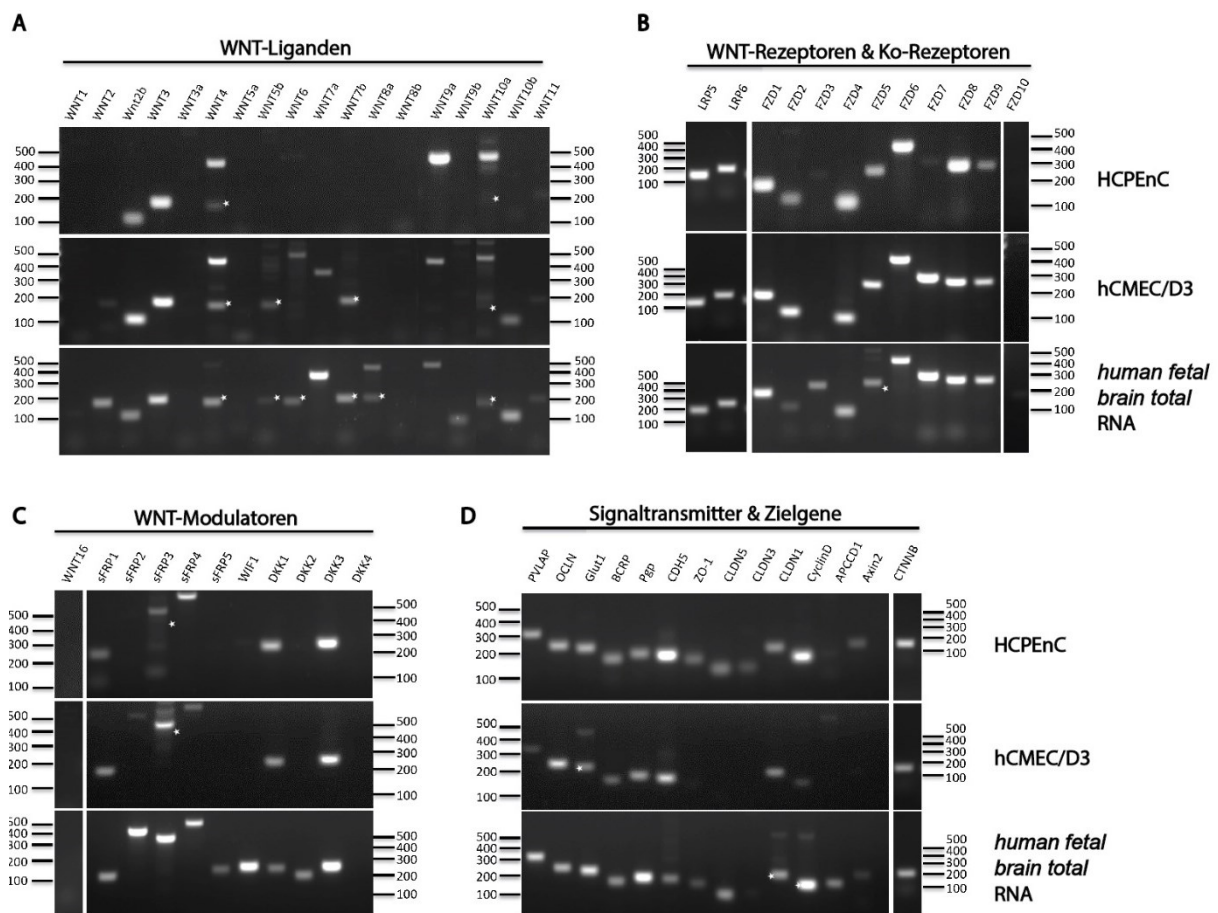


Abbildung 15 Expression des kanonischen WNT-Signalweges in HCPEnC. Die Expression von **A.** WNT-Liganden, **B.** WNT-Rezeptoren & Ko-Rezeptoren, **C.** WNT-Modulatoren und **D.** Signaltransmittern und Zielgenen in HCPEnC wurde mit Hilfe von PCR bestimmt. Als Kontrollen wurden HCPEnC/D3 und *human fetal brain total* RNA verwendet. Die Sterne zeigen die gesuchten Banden bei Mehrfachsignalen an.

Es konnte gezeigt werden, dass die primären Zellen die WNT-Liganden *wnt2b*, *wnt3*, *wnt4* und *wnt9a* exprimierten (siehe **ABBILDUNG 15**). Mithilfe der PCR konnte *Wnt5a* nicht als Bande in den Agarosegelen nachgewiesen werden. Von den untersuchten Rezeptoren konnten *fzd1*, *fzd 2*, *fzd 4*, *fzd5*, *fzd6*, *fzd7*, *fzd 8* und *fzd 9* nachgewiesen werden, sowie die beiden Ko-Rezeptoren *Lrp5*, und *Lrp6*. Somit waren bis auf *fzd3* und *fzd10* alle wesentlichen Rezeptoren des kanonischen Signalweges vorhanden. Als für die Signalkaskade benötigter Übermittler wurde auch die Expression von *ctnnb* festgestellt, ebenso wie

einige der betrachteten Zielgene des WNT-Signalweges. Unter diesen befanden sich *plvap*, *ocln*, *glut1*, *bcrp*, *p-gp*, *ve-cadherin (cdh5)*, *zo1*, *cldn5*, *cldn3*, *cldn1*, *ccnd1*, *apcdd1* und *axin2*. Zusammen mit dem Nachweis verschiedener WNT-Modulatoren wie *sfrp1*, *sfrp3*, *sfrp4*, *dkk1* und *dkk3* konnte somit gezeigt werden, dass alle für einen funktionalen Signalweg benötigten Bestandteile des kanonischen WNT-Signalweges in den primären Zellen vorhanden sind.

3.5. Expression von WNT-Rezeptoren, Ko-Rezeptoren und Signalmodulatoren in iHCPEnC

Im folgenden Schritt sollte auch für die immortalisierte Zelllinie überprüft werden, ob alle nötigen Komponenten vorhanden sind, um einen potenziell funktionsfähigen kanonischen WNT-Signalweg auszubilden. Äquivalent zu den primären Zellen wurde die RNA der immortalisierten Zellen isoliert und in cDNA umgewandelt, um sie mittels PCR und den unter 2.1.5 beschriebenen Oligonukleotidprimern auf die Expression der entsprechenden Liganden, (Ko-) Rezeptoren und Signalmodulatoren zu untersuchen (2.2.2.3 - 2.2.2.4). In **ABBILDUNG 16** wurden die Ergebnisse, welche repräsentativ für vier selbstständige Experimente sind, den Kontrollen *human fetal brain total RNA* und *hCMEC/D3* gegenübergestellt.

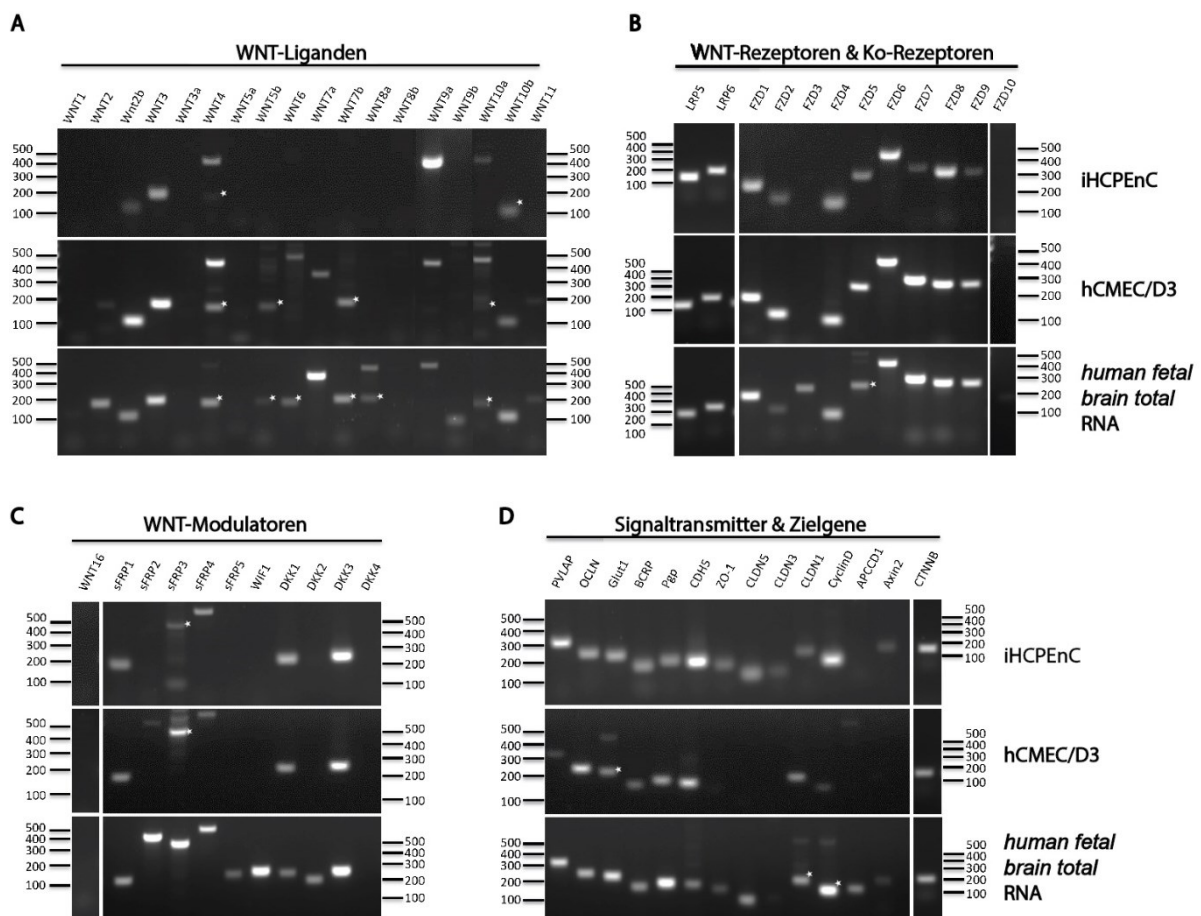


Abbildung 16 Expression des kanonischen WNT-Signalweges in iHCPEnC. Die Expression von **A.** WNT-Liganden, **B.** WNT-Rezeptoren & Ko-Rezeptoren, **C.** WNT-Modulatoren und **D.** Signaltransmittern und Zielgenen in iHCPEnC wurde mit Hilfe von PCR bestimmt. Als Kontrollen wurden HCPEnC/D3 und *human fetal brain total RNA* verwendet. Die Sterne zeigen die gesuchten Banden bei Mehrfachsignalen an.

So konnten *wnt2b*, *wnt3*, *wnt4*, *wnt9a* und *wnt10b* als vorherrschend exprimierte WNT-Liganden identifiziert werden (SIEHE ABBILDUNG 16). Daher unterscheiden sich die primären Zellen von der immortalisierten Zelllinie in der Expression von *wnt10b*.

Ähnlich den primären Zellen, konnten *fzd1*, *fzd2*, *fzd4*, *fzd5*, *fzd 6*, *fzd 7*, *fzd 8* und *fzd9* als Rezeptoren und *lrp5* und *lrp6* als Ko-Rezeptoren bestätigt werden. Ebenso wurde auch die Expression des Signalübermittlers *ctnnb*, sowie einige der Zielgene wie *plvap*, *ocln*, *glut1*, *bcrp*, *p-gp*, *cdh5*, *zo1*, *cldn5*, *cldn3*, *cldn1*, *ccnd1*, *apcdd1* und *axin2* nachgewiesen. Auch exprimiert die immortalisierte Zelllinie mit *sfrp1*, *sfrp3*, *sfrp4*, *dkk1* und *dkk3* alle WNT-Modulatoren, die bereits bei den primären Zellen bestätigt werden konnten.

3.6. Vergleichende Expression WNT-Signalweg Moleküle primärer und immortalisierter Endothelzellen

Um die Expression der wesentlichen Komponenten des kanonischen WNT-Signalweges nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ zu bestimmen, wurden die in 3.4 und 3.5 generierten cDNAs verwendet, um mithilfe der in 2.1.5 aufgelisteten Oligonukleotidprimer eine qRT-PCR durchzuführen (2.2.2.5). Die Rohdaten dieser Analyse sind in ABBILDUNG 17 dargestellt.

Entsprechend allgemein gebräuchlichem Standard gelten Transkripte mit einem CT-Wert ab 35 als nicht exprimiert. Bei Anwendung dieser Obergrenze konnten bei der Betrachtung der CT-Werte ähnliche Ergebnisse beobachtet werden, wie sie in 3.4 und 3.5 beschrieben wurden, indem Expression der WNT-Liganden *wnt2b*, *wnt3*, *wnt4* und *wnt9a* in den primären und immortalisierten Zellen bestätigt wurde.

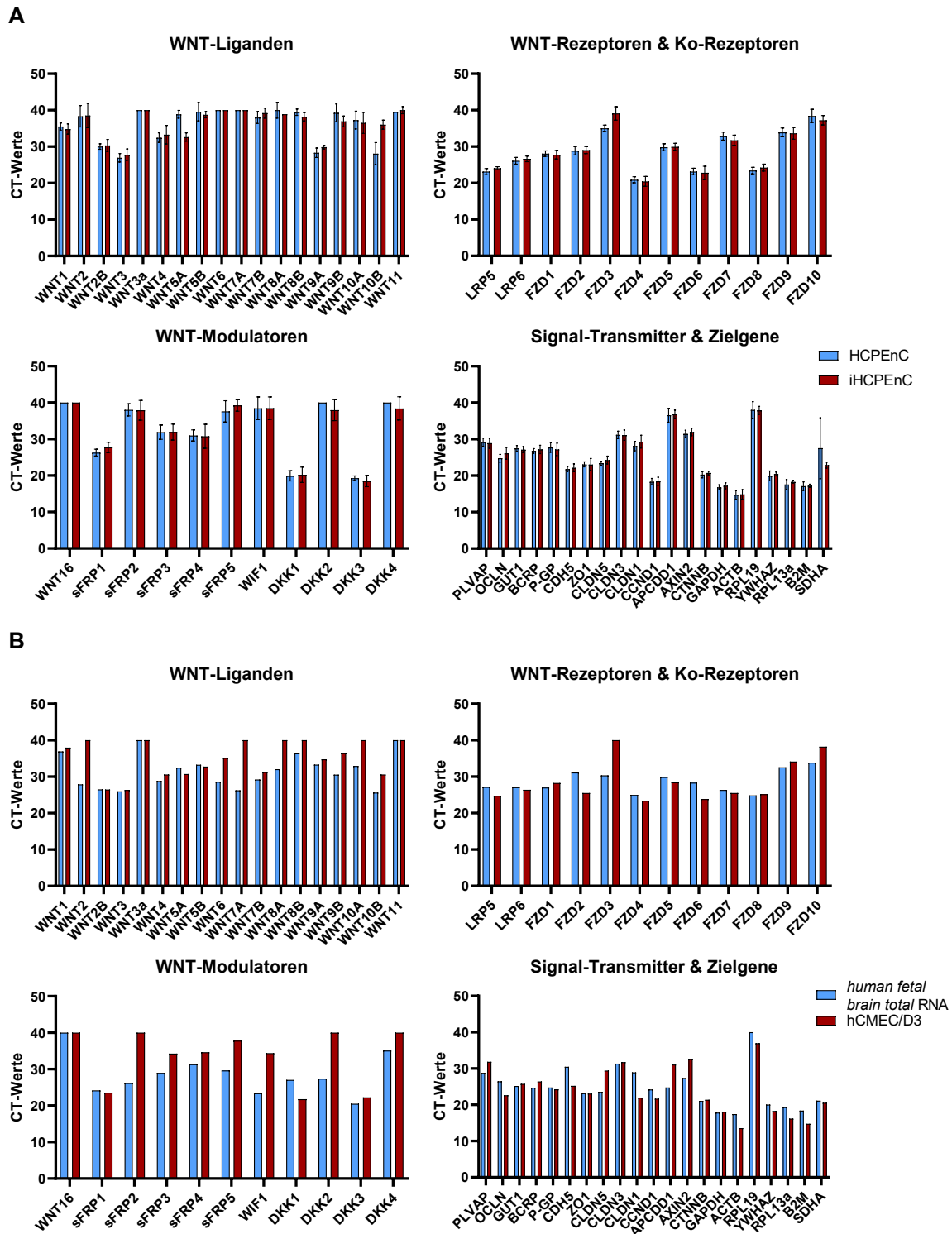


Abbildung 17 Graphische Darstellung der in der qRT-PCR ermittelten CT-Werte zur Überprüfung der Expression von Wnt-Liganden, Rezeptoren & Ko-Rezeptoren, Modulatoren, Signalübermittlern und Zielgenen. In **A** sind die CT-Werte der überprüften Transkripte von HCPEnC und iHCPEnC aus vier unterschiedlichen Experimenten als Mittelwert mit dazugehöriger Standardabweichung zusammengefasst. In **B** wurden die CT-Werte der beiden Kontrollen, *human fetal brain total RNA* und einer anderen Endothel-Zelllinie der BHS (hCMEC/D3) dargestellt.

Zur weiteren Analyse der Daten wurde die relative Expression jedes Transkriptes bezogen auf mehrere Referenzgene, deren Daten zu einem gemittelten Referenzwert zusammengefasst wurden, bestimmt (BESCHRIEBEN IN 2.2.2.5). Es wurden nur die Daten jener Transkripte zur Berechnung verwendet, die unter der in 2.2.2.5 und 3.6 genannten Definition auch exprimiert waren. Da vier unabhängige Experimente die Grundlage dieser Daten waren, wurde der Mittelwert ihrer CT-Werte in der Effizienz-korrigierten Δ CT-Methode zur Analyse verwendet. Die ermittelte relative Expression dieser Gene in HCPEnC und iHCPEnC ist in TABELLE 7 zusammengefasst und in ABBILDUNG 18 dargestellt.

Tabelle 7 Gegenüberstellung jeweiligen relativen Expression von HCPEnC und iHCPEnC sowie der *Fold change*.

Gensymbol	Genname	relative Expression		<i>Fold change</i>
		HCPEnC	iHCPEnC	iHCPEnC zu HCPEnC
Wnt2b		2 %	3%	1,13
Wnt3		10 %	12 %	1,26
Wnt4		3 %	4 %	1,24
Wnt5a		4 %	1 %	0,29
Wnt9a		5 %	7 %	1,48
Wnt10b		1 %	4 %	6,87
LRP5	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5</i>	25 %	22 %	0,86
LRP6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 6</i>	14 %	14 %	0,95
FZD1	Frizzled 1	3 %	3 %	1,07
FZD2	Frizzled 2	13 %	13 %	1,02
FZD4	Frizzled 4	27 %	32 %	1,17
FZD5	Frizzled 5	4 %	4 %	1,03
FZD6	Frizzled 6	24 %	28 %	1,14
FZD7	Frizzled 7	4 %	5 %	1,33
FZD8	Frizzled 8	20 %	18 %	0,88
FZD9	Frizzled 9	4 %	4 %	1,11
sFRP1	<i>secreted frizzled-related protein 1</i>	17 %	13 %	0,79
sFRP3	<i>secreted frizzled-related protein 3</i>	2 %	2 %	1,05
sFRP4	<i>secreted frizzled-related protein 4</i>	2 %	3 %	1,11
DKK1	Dickkopf 1	42 %	42 %	0,99
DKK3	Dickkopf 3	39 %	50 %	1,26
PLVAP	<i>plasmalemma vesicle-associated protein</i>	3 %	3 %	1,09
OCLN	Occludin	6 %	4 %	0,74
GLUT1	Glukose Transporter 1	5 %	5 %	1,14
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>	6 %	6 %	0,96
P-GP	P-glycoprotein 1	2 %	3 %	1,16
CDH5	VE-cadherin	12 %	12 %	0,95
ZO1	<i>Zona occludens 1</i>	25 %	28 %	1,07
CLDN5	Claudin5	11 %	10 %	0,85
CLDN3	Claudin3	1 %	1 %	1,08

CLDN1	Claudin1	9 %	8 %	0,82
CCDN1	CyclinD	31 %	32 %	1,03
Axin2		2 %	2 %	0,92
CTNNB	b-catenin	39 %	37 %	0,95

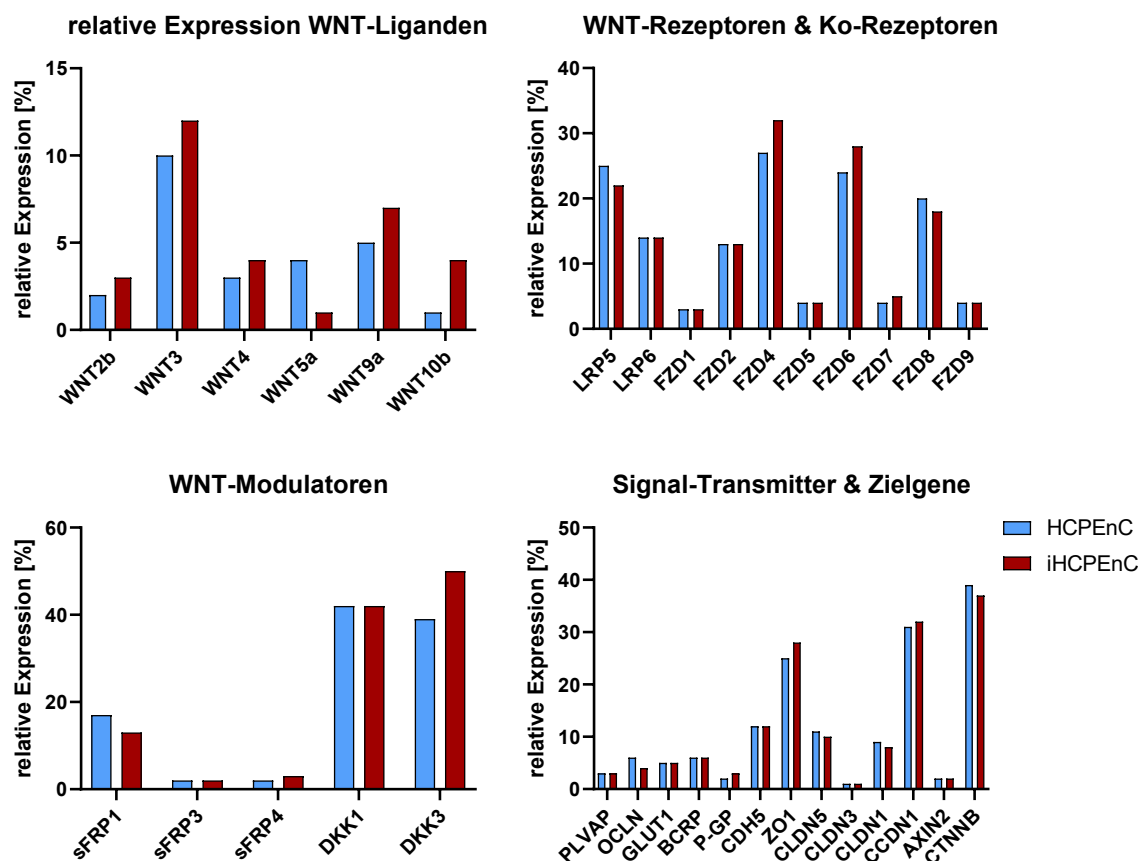


Abbildung 18 Graphische Darstellung der relativen Expression von WNT-Liganden, Rezeptoren & Ko-Rezeptoren, Modulatoren und Signalübermittlern & Zielgenen in HCPEnC und iHCPEnC. Nur für Transkripte, deren CT-Wert sich unter der Obergrenze von 35 befand, wurde die relative Expression dargestellt.

Anschließend wurde der *Fold change* der einzelnen Gene im Vergleich von iHCPEnC zu HCPEnC bestimmt, durch Anwendung der in 2.2.2.5 beschriebenen Effizienz-korrigierten $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode. Die resultierenden Werte wurden in TABELLE 7 zusammengetragen. Mithilfe der qRT-PCR gelang es auch *wnt5a* nachzuweisen, welches zuvor in der MACE-Analyse, aber nicht in den Agarosegelen der zuvor durchgeführten PCR, detektiert werden konnte. Es zeigt sich, dass die meisten der in TABELLE 7 zusammengefassten Gene einen *Fold change* um 1 aufweisen und damit als nicht signifikant über- oder unterexprimiert gelten. Dies gilt jedoch nicht für *wnt5a* und *wnt10b*, deren *Fold change* sich deutlich von dem Wert 1 absetzt (TABELLE 7). Während *wnt5a* in iHCPEnC im Vergleich zu den primären Zellen unterexprimiert ist (*Fold change* 0,29), ist *wnt10b* in iHCPEnC überexprimiert (*Fold change* 6,87).

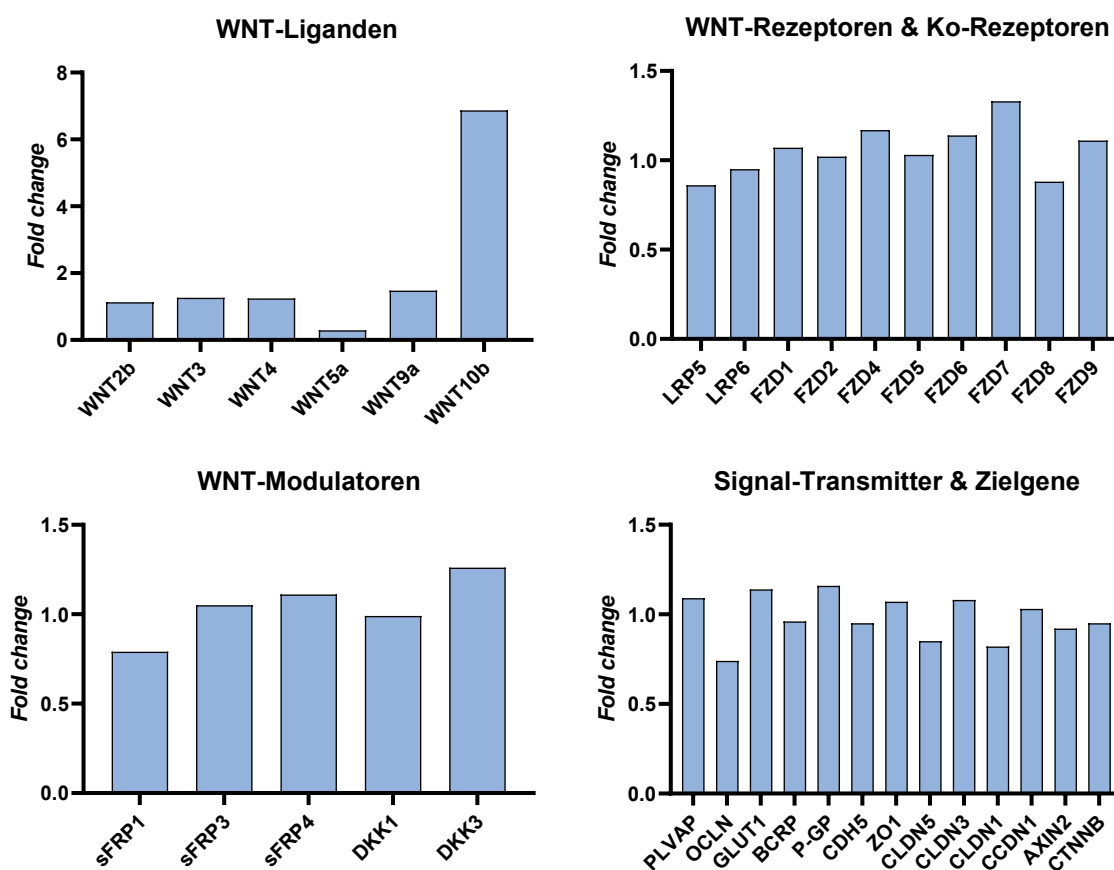


Abbildung 19 Graphische Darstellung der *Fold change* der WNT-Liganden, Rezeptoren & Ko-Rezeptoren, Modulatoren und Signalübermittlern & Zielgenen. In den Graphen wurden die in *TABELLE 5* beschriebenen *Fold change* der Gene zusammengefasst, die im Vergleich von iHCPeNC und HCPeNC generiert wurden. Zur Berechnung wurde die in 2.2.2.5 beschriebene Effizienz-korrigierte $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode verwendet. Gene wurden als über- bzw. unterexprimiert betrachtet, sobald die *Fold change* den Wert von 2 über- bzw. von 0,5 unterschritt.

Um abzugleichen, in welchem Maße die qRT-PCR Analysen der WNT-Signalwegkomponenten die MACE Daten reproduzieren, wurden die *Fold changes* der relevanten Gene in *TABELLE 8* gegenübergestellt. Dadurch wurde zum einen überprüft, ob beide Analysen gleiche oder ähnliche Interpretationen bzw. Einstufungen der ermittelten Werte in hoch-, herunter- oder nicht veränderte Gene ermöglichen. Zum anderen wurde überprüft, ob die ermittelten signifikanten DEG in beiden Analysen übereinstimmen. Dabei ist zu beachten, dass bei der qRT-PCR ein standardmäßiger Signifikanz-*Threshold* von 2 bzw. 0,5 für die signifikant hoch- bzw. herunterregulierten Gene angewendet wurde, während bei der MACE ein niedrigerer *Threshold* von 1 gewählt wurde, und p-WERT und FDR bei der Ermittlung der Signifikanz mit einbezogen wurden.

Tabelle 8 Gegenüberstellung der Expressionsdaten der MACE-Analyse und der qRT-PCR des WNT-Signalweges. Die Tabelle stellt die ermittelten *Fold changes* der Komponenten des WNT-Signalweges aus der qRT-PCR und der MACE-Analyse gegenüber. Die \log_2 *Fold changes* der MACE-Analyse wurden für diesen Vergleich zurück in die *Fold change* überführt. *Fold changes*, die als signifikant eingestuft wurden, wurden durch Fettdruck hervorgehoben.

	qRT-PCR		MACE	
	iHCPEnC vs HCPEnC	p20_vs_p6	p50_vs_p6	p50_vs_p20
WNT2B	1,13	0,99	0,75	0,76
WNT3	1,26	0,58	0,58	1,00
WNT3A		0,58	1,34	2,29
WNT4	1,24	1,03	1,17	1,13
WNT5A	0,29	2,16	0,28	0,13
WNT7B		1,25	1,11	0,89
WNT9A	1,48	2,21	1,74	0,79
WNT9B		0,47	1,11	2,38
WNT10B	6,87	2,76	4,04	1,47
WNT11		0,58	2,83	4,83
LRP5	0,86	3,05	1,40	0,46
LRP6	0,95	1,20	0,68	0,57
FZD1	1,07	2,00	0,77	0,38
FZD2	1,02	0,70	1,50	2,14
FZD3		0,27	0,17	0,62
FZD4	1,17	1,30	1,19	0,92
FZD5	1,03	1,89	1,85	0,98
FZD6	1,14	1,69	1,29	0,76
FZD7	1,33	0,76	1,09	1,43
FZD8	0,88	2,42	0,88	0,36
FZD9	1,11	0,60	0,73	1,23
SFRP1	0,79	0,30	1,07	3,55
sFRP3	1,05			
SFRP4	1,11	0,37	1,25	3,36
DKK1	0,99	0,32	0,32	1,02
DKK3	1,26	1,25	0,60	0,48
CTNNB1	0,95	1,15	0,74	0,64

Bei Betrachtung von *TABELLE 8* wird deutlich, dass die aus der MACE-Analyse und der qRT-PCR ermittelten *Fold changes* des WNT-Signalweges bis auf wenige Ausnahmen übereinstimmen und damit auch eine gleiche Einstufung der DEG in hoch- und herunterregulierte Gene ermöglicht. Die auffälligsten Unterschiede zwischen den beiden Analysen beziehen sich auf *wnt3a*, *wnt7b*, *wnt9b*, *wnt11* und *fzd3*, welche in der MACE-Analyse detektiert werden konnten, während sie in der qRT-PCR nicht detektiert werden konnten, und auf *sfrp3*, welches nur in der qRT-PCR-Analyse identifiziert wurde.

Die anderen Unterschiede wurden bei der Einstufung der Signifikanz der DEG beobachtet. Dies betraf *wnt5a*, *wnt9a*, *wnt10b*, *wnt11*, *lrp5*, *fzd3*, *fzd4*, *fzd6*, *fzd8*, *dkk1*, *dkk3* und *ctnnb*. Im Fall von *wnt5a* und *wnt10b* wurden beide Gene sowohl in der MACE-Analyse als auch in der qRT-PCR als signifikant verändert eingestuft, allerdings erfolgte diese Einstufung in der MACE in beiden Fällen nur bei einem

Vergleich (*wnt5a* in p50_vs_p20 und *wnt10b* in p50_vs_p6). Die übrigen DEG *wnt9a*, *wnt11*, *lrp5*, *fzd3*, *fzd4*, *fzd6*, *fzd8*, *dkk1*, *dkk3* und *ctnnb* wurden dagegen nur in der MACE-Analyse als signifikant differentiell exprimiert detektiert. Dabei gelten *wnt9a*, *wnt11*, *fzd4*, *fzd6* und *fzd8* als signifikant hochreguliert und *lrp5*, *dkk1*, und *ctnnb* als signifikant herunterreguliert.

3.7. Extrinsische Aktivierung des WNT-Signalweges in iHCPEnC und Einfluss auf PLVAP

3.7.1. Stimulation des WNT-Signalweges mit LiCl und WNT-Agonisten

Um zu untersuchen, ob der kanonische WNT-Signalweg auch in den ausdifferenzierten Zellen aktiv ist, wurde zunächst eine Behandlung mit 10 mM LiCl durchgeführt. Bereits Laksitorini *et al.* haben die Behandlung mit LiCl als Positiv-Kontrolle für einen funktionierenden kanonischen WNT-Signalweg in ihren Experimenten verwendet [144]. Als Inhibitor des GSK3 β -Komplexes verhindert LiCl die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung von CTNNB, und imitiert somit einen funktionsfähigen WNT-Signalweg [244]. Die Translokation des normalerweise membrangebundenen CTNNB in das Zytosol und daraufhin in den Nukleus kann mit Hilfe von Immunfluoreszenz verfolgt werden. Nach Lustig *et al.* konnte bereits ein bedeutender Anstieg zytosolischen CTNNB in MDA MB 231 Brustkarzinomzellen während der Behandlung mit WNT1 nach 2 h festgestellt werden [245]. Andere Publikationen konnten jedoch darlegen, dass die Dauer und Ausprägung der Translokation von CTNNB in den Nukleus stark vom jeweiligen Zelltyp abhängt [246-248]. Da für die Beobachtung einer nuklearen Translokation von CTNNB nach Induktion des WNT-Signalweges mit unterschiedlichen Stimuli, wie LiCl und WNT-Agonisten, nach Inkubationszeiten von 2 h bis zu 48 h berichtet wurden und um eine mögliche frühe Translokation nicht auszuschließen, wurde zunächst eine Behandlung mit LiCl für 1 h ausgewählt. Weiterhin sollte eine Schädigung der iHCPEnC durch eine zu lange Behandlung mit LiCl vermieden werden, wie z.B. die bereits beobachteten Stillstände des Zellzyklus und Auslösung der Apoptose in diversen anderen Zellen [249-251]. Die Behandlung der Zellen mit LiCl wurde mit der in 2.2.2.6 beschriebenen PFA-Fixierung abgebrochen und die Immunfluoreszenzfärbung (IF) mit dem in 2.1.3.1 & 2.1.3.2 beschriebenen CTNNB Primärantikörper und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 vorgenommen. Die Ergebnisse der Mikroskopie sind in *ABBILDUNG 20* zusammengestellt.

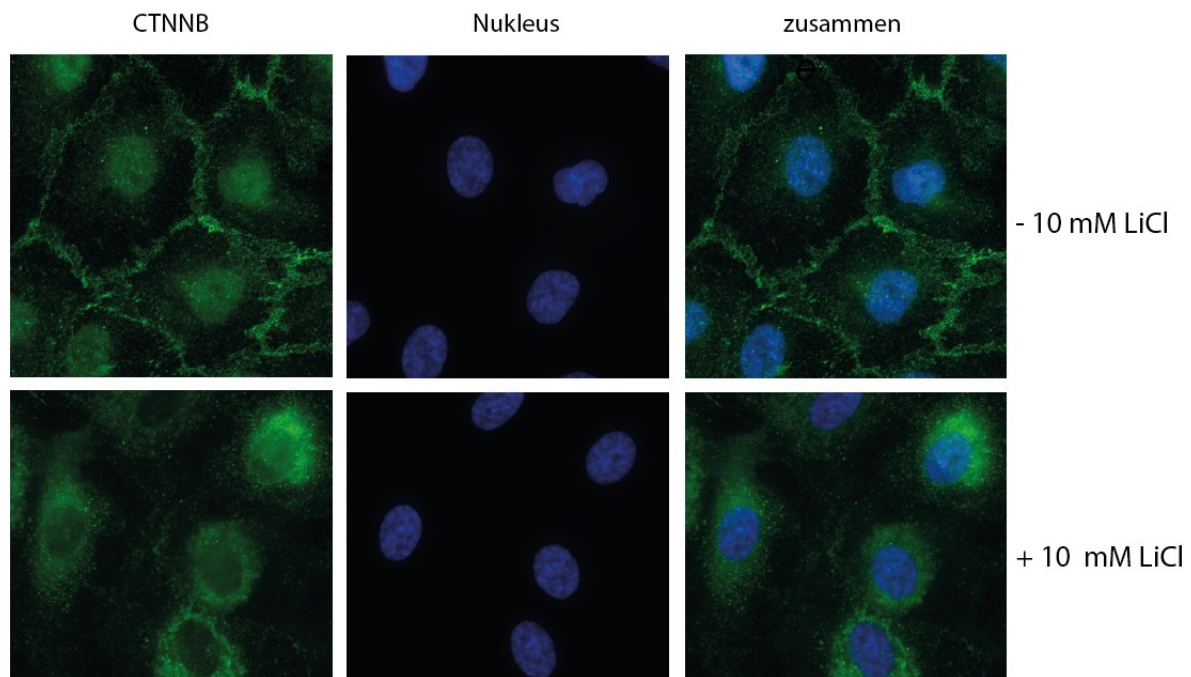


Abbildung 20 CTNNB Translokation nach 1h Behandlung mit 10 mM LiCl. iHCPEnC wurden für eine Stunde mit 10 mM LiCl behandelt und anschließend eine IF zum Nachweis von CTNNB (grün: Alexa Fluor 488) und den Nuklei (blau: DAPI) durchgeführt. In der oberen Reihe sind die unbehandelten Zellen abgebildet, in der unteren Reihe die mit 10 mM LiCl behandelten Zellen.

Vor Behandlung der iHCPEnC mit LiCl wurde CTNNB hauptsächlich an der Zellmembran detektiert. Nach der Behandlung konnte das Signal hingegen hauptsächlich im Zytoplasma der Zellen beobachtet werden, wobei es sich wahrscheinlich um die freie und damit aktive Form von CTNNB handelt. Dies spricht für den Beginn der Translokation von CTNNB von der Zellmembran über das Zytoplasma in den Nukleus. Um zu untersuchen, ob eine nukleare Translokation des aktiven CTNNB nach längeren Inkubationszeiten der iHCPEnC mit LiCl stattfindet, wurden die Zellen für 6 h und 24 h mit LiCl behandelt. Allerdings konnte weder die zytoplasmatische noch die nukleare Translokation von CTNNB mittels IF eindeutig festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Da die Translokation von CTNNB in den Nukleus die Transkription diverser Zielgene induziert [144,252-254], wurde eine mögliche Reaktion der Zellen nach Zugabe von WNT-Aktivatoren auf mRNA Ebene mit Hilfe von qRT-PCR untersucht. Als Grundlage für diese Analyse wurden die immortalisierten Zellen zunächst für 6 h mit 10 mM LiCl behandelt. In einem zweiten Versuchsaufbau wurde eine Inkubationszeit von 24 h gewählt. Außerdem wurde eine Aktivierung des WNT-Signalwegs mit den WNT-Liganden WNT9a (200 ng/ μ l) bzw. WNT3a (200 ng/ μ l) durchgeführt. Von den 19 in Vertebraten bekannten WNT-Liganden fiel die Wahl auf WNT9a, da *wnt9a* in den primären und immortalisierten Zellen in höheren Mengen exprimiert vorlag. Wnt3a wiederum wurde aufgrund seiner häufigen Verwendung in der Literatur ausgewählt [255]. Nach Behandlung der Zellen wurde die Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben, um sie anschließend mittels qRT-PCR zu analysieren (SIEHE 2.2.2.1, 2.2.2.2 & 2.2.2.5) Dabei waren zunächst die Auswirkungen der Behandlungen auf die Expression von *plvap*, *ccnd1*, *axin2*, *zo1* und *cldn5* als Zielgene des aktiven WNT-Signalweges und wichtige Regulatoren der vaskulären Permeabilität von Interesse.

Aus den erhaltenen Daten wurde der *Fold change* der analysierten Gene in iHCPEnC nach 6 h und 24 h LiCl Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (ABBILDUNG 21A). Es konnte ein schwacher Einfluss auf die Expressionen von *plvap* und *ccnd1* beobachtet werden, die beide hochreguliert wurden. Im Gegensatz dazu scheint die Expression von *axin2*, *zo1* und *cldn5* geringfügig herunterreguliert zu sein. Allerdings bewegen sich fast alle Veränderungen der Genexpression der behandelten Zellen innerhalb des nicht signifikanten Bereiches, dessen unterster bzw. oberster Grenzwert bei der *Fold change* von 0,5 bzw. 2 liegt (siehe 2.2.2.5). Nur die Expression von *plvap* weist nach einer 24 h Behandlung mit LiCl eine *Fold change* von größer als 2 auf. Auf Grund der erhöhten Standardabweichung im Vergleich zur vorliegenden *Fold change* konnte jedoch keine eindeutige Aussage über einen Einfluss auf die Genexpression von *plvap* gemacht werden. Dementsprechend wird unter den analysierten Bedingungen auch für die Expression von *plvap* von einem nicht signifikanten Einfluss durch die Behandlung mit LiCl in iHCPEnC ausgegangen.

Auch nach der Behandlung von iHCPEnC mit den WNT-Agonisten WNT9a und WNT3a lagen alle errechneten *Fold changes* in dem zuvor definierten nicht signifikanten Bereich zwischen 0,5 und 2. Demzufolge konnte kein eindeutiger Einfluss auf die Regulation der Genexpression der untersuchten WNT-Zielgene in iHCPEnC nach Stimulation mit WNT9a und WNT3a beobachtet werden (ABBILDUNG 21B). Diese Ergebnisse verifizieren wiederum die Beobachtungen der Immunfluoreszenz-Färbung nach Behandlung mit LiCl, die eine Akkumulation von CTNNB im Zytoplasma, nicht jedoch eine vollständige Translokation in den Nukleus zeigten.

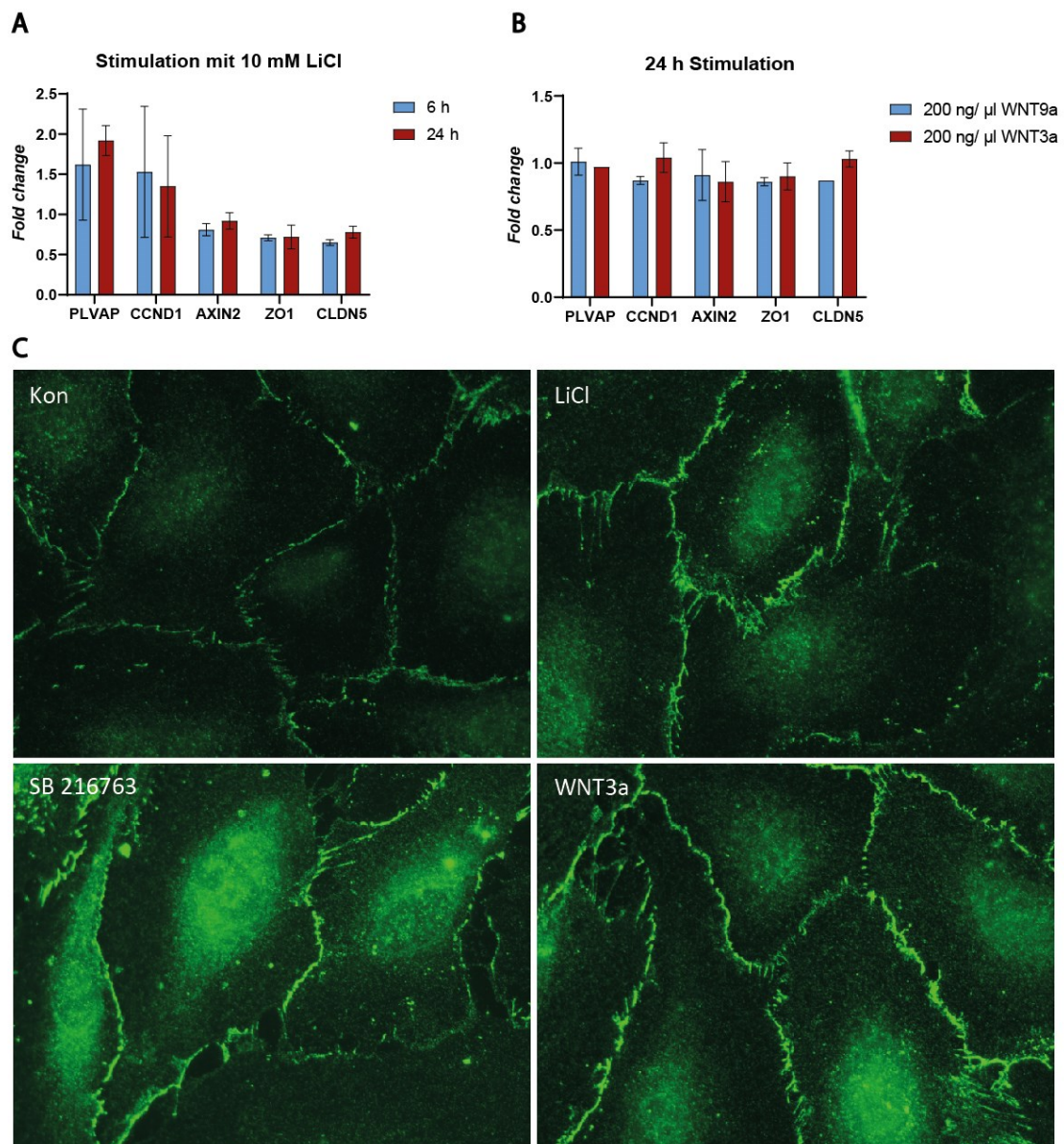


Abbildung 21 Stimulation des WNT-Signalweges. A. Stimulation von iHCPEnC mit 10 mM LiCl für 6 h und 24 h. Aufgetragen wurde der Mittelwert der erhaltenen *Fold change* der untersuchten Zielgene mit den dazugehörigen Standardabweichungen. B. Stimulation von iHCPEnC mit 200 ng/μl WNT9a und 200 ng/μl WNT3a. Aufgetragen wurde der Mittelwert der erhaltenen *Fold change* der untersuchten Zielgene mit den dazugehörigen Standardabweichungen C. IF der immortalisierten Zellen nach Stimulation mit 10 mM LiCl, 10 μM SB 216763 und 200 ng/μl WNT3a. CTNNB (grün) wurde mithilfe von Immunfluoreszenz visualisiert.

Aufgrund der geringen Stimulation des WNT-Signalweges durch LiCl und prominente Agonisten des Signalweges (WNT9a, WNT3a) wurde parallel zu LiCl ein GSK3β-Inhibitor (SB 216763) getestet, der bereits in Cai *et al.* Anwendung fand [255]. Dieser Inhibitor inhibiert spezifisch GSK3β, was die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von CTNNB und dessen Degradation im Proteasom unterbindet, und somit auch zu einer Aktivierung des WNT Signalweges führt. Bei der Behandlung von iHCPEnC mit SB 216763 über einen Zeitraum von 24 h konnte festgestellt werden, dass Konzentrationen des Inhibitors von 10 μM und 20 μM zu einer nuklearen Translokation von CTNNB führen (SIEHE IX, ABBILDUNG 26 & ABBILDUNG 27). Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Studien wurde die Wirksamkeit von SB 216763 mit der Wirksamkeit von LiCl und WNT3a verglichen (SIEHE ABBILDUNG 21C).

Dabei zeigt sich ein deutlich stärkeres Signal für CTNNB nach der Behandlung mit 10 μ M SB 216763 im Zytosol der Zellen als es bei LiCl oder WNT3a der Fall war, welches scheinbar um den Nukleus der Zelle konzentriert ist.

3.7.2. Stimulation des WNT-Signalweges durch Inhibition von GSK3 β mit SB 216763

Aufbauend auf der Beobachtung, dass Behandlung mit dem GSK3 β -Inhibitor SB 216763 in einem stärkeren Signal für CTNNB im Zytosol resultierte, sollte nun kontrolliert werden, ob nur die Menge an zytosolischem CTNNB zunahm, oder ob auch ein nukleares Signal detektiert werden kann. Dazu wurde zunächst eine IF der immortalisierten Zellen durchgeführt, die für 24 h mit 10 μ M des Inhibitors behandelt worden waren. Neben CTNNB wurde auch CDH5 überprüft, da es als AJ-Protein mitverantwortlich für die Permeabilität des Endothels ist [256,257]. Die Permeabilität des Endothels kann durch das dynamische Öffnen und Schließen der AJ zum Teil reguliert werden [258]. Studien haben unter anderem gezeigt, dass die Blockade von CDH5 die Neoangiogenese unterdrückt und die Permeabilität des Endothels erhöht [259,260].

Neben seiner Rolle als WNT-Signalübermittler und Transkriptionsfaktor besitzt CTNNB eine weitere Funktion in der Ausbildung der AJ, indem es durch Bindung an deren cytosolischen Teil Cadherine und somit AJ im Zytoskelett der Zelle verankert [261]. Zusätzlich interagiert CTNNB nicht nur mit CDH5, sondern auch mit alpha-Catenin (CTNNA) und ist somit mit dem kortikalen Aktin verbunden. Daneben ist CDH5 auch mit dem intermediärfilament Vimentin (VIM) über gamma-Catenin (CTNNG) verbunden [256,257]. Dementsprechend existieren zwei Pools an CTNNB, wobei allerdings nicht geklärt ist, ob diese beiden Pools im Austausch miteinander stehen und wie die Zelle die Verteilung von CTNNB zwischen den Pools balanciert [261,262]. Die Permeabilität der EZ könnte demnach durch eine Verringerung von CDH5 und CTNNB an der Zellmembran und einer Schwächung der AJ hervorgerufen werden, oder durch die CTNNB vermittelte Expression von PLVAP in Reaktion auf einen WNT-Stimulus. Im Folgenden wurde CTNNB wie in 2.1.3.1 & 2.1.3.2 beschrieben mit Alexa Fluor 488 und CDH5 mit Alexa Fluor 594 gefärbt. Nach einer Inkubation von 24 h mit SB 216763 konnte eine Translokation von CTNNB von der Zellmembran in das Zytosol der iHCPEnC beobachtet werden (*ABBILDUNG 22*). Dabei konnte eine besonders starke Akkumulation um den Nukleus detektiert werden, jedoch konnte auch ein stärkeres Signal von CTNNB im Nukleus erfasst werden. Interessanterweise scheint erst nach der Aktivierung von CTNNB durch den GSK3 β -Inhibitor eine Ko-Lokation von CTNNB und CDH5, vor allem an der Zellmembran stattzufinden.

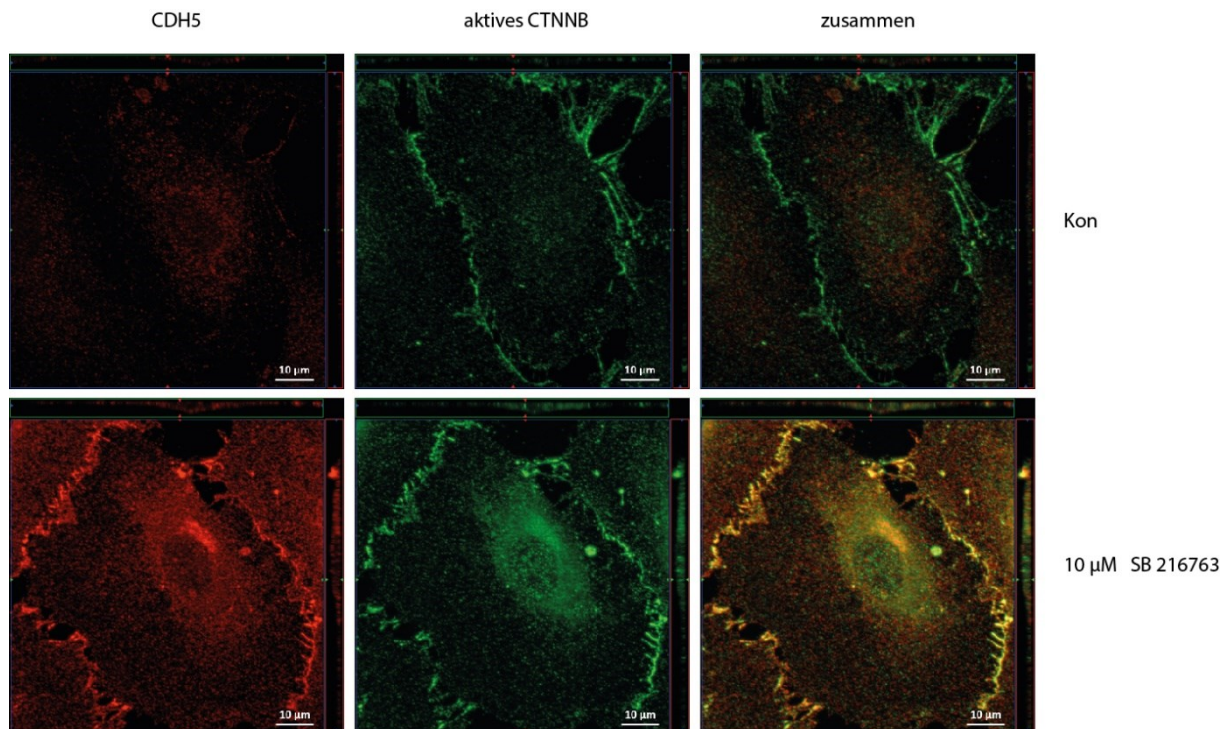


Abbildung 22 Nukleare Translokation von CTNNB. Es wurde eine IF gegen CDH5 (rot: Alexa Fluor 594) und CTNNB (grün: Alexa Fluor 488) durchgeführt. Dazu wurden iHCPEnC für 24 h mit 10 µM SB 216763 inkubiert. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für drei Experimente.

Um zu überprüfen, ob eine verlängerte Inkubationszeit, eine höhere Dosierung oder eine Kombination von beiden eine verstärkte nukleare Translokation von CTNNB herbeiführen kann, wurden die Inhibitionsstudien um eine Behandlung mit 20 µM SB 216763 und eine Inkubationszeit von 48 h ergänzt. Allerdings konnte auch nach einer verlängerten Inkubation oder einer erhöhten Dosierung keine deutlichere nukleare Translokation von CTNNB beobachtet werden *ABBILDUNG 23*. Zusätzlich scheint CDH5 bei einer längeren Inkubationszeit unabhängig von der Dosierung ebenfalls vermehrt im Zytosol und um den Nukleus lokalisiert vorzuliegen.

Da Veränderungen der Expressions- und Transkriptionslevel von Zielgenen in einer Zelle in der Regel deutlich sensitiver durch PCR-Analysen nachzuweisen sind als Veränderungen in den Proteinlevel mittels Western Blot [263], wurde eine Expressionsanalyse von Zielgenen des WNT-Signalweges nach der Stimulation mit SB 216763 durchgeführt. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob der GSK3β-Inhibitor einen Einfluss auf die Regulation der Zielgene hat, was wiederum auf einen funktionsfähigen WNT-Signalweg hindeuten würde. Dazu wurden die immortalisierten Zellen mit 10 µM SB 216763 über eine Dauer von 24 h behandelt. Nach der Isolation der RNA und der Generierung von cDNA wurden ausgewählte Zielgene mit Hilfe von qRT-PCR wie in *2.2.2.1, 2.2.2.2 & 2.2.2.5* beschrieben analysiert.

Neben den zuvor bereits betrachteten Zielgenen *plvap* und *ccnd1* wurde auch die Expression von *ctnnb* analysiert, da *ctnnb* an der Regulation einiger Gene beteiligt ist, die wiederum CTNNB regulieren [264-266] und in den durchgeführten IF-Färbungen (*SIEHE ABBILDUNG 21 & ABBILDUNG 22*) ein stärkeres Signal nach Behandlung mit dem Inhibitor detektiert wurde. Zusätzlich wurde die Expression von DKK1 in die Analyse eingeschlossen, da es einen prominenten Antagonisten des Signalweges darstellt [255]. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob eine veränderte Expression von Antagonisten ein möglicher Grund für die geringen Expressionslevel der WNT-Zielgene nach Behandlung mit SB 216763 oder

WNT-Agonisten und damit für die Inaktivität des WNT-Signalweges in den iHCPEnC ist. Die aus den qRT-PCR Analysen resultierenden *Fold changes* sind in **ABBILDUNG 24** dargestellt.

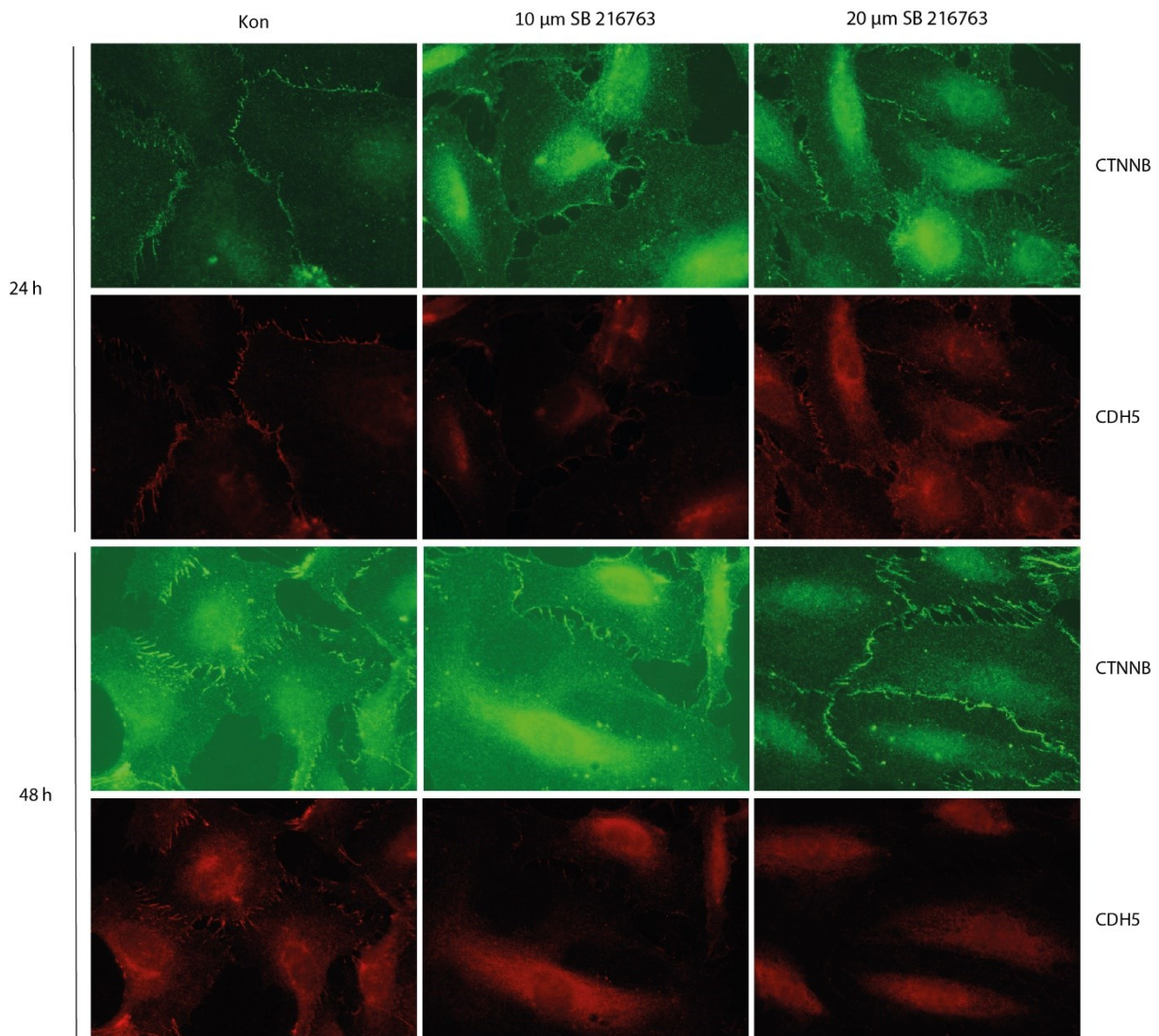


Abbildung 23 CTNNB Translokation nach Behandlung mit GSK3 β -Inhibitor SB 216763. iHCPEnC wurden für 24 h bzw. 48 h mit 10 µm und 20 µm des GSK3 β -Inhibitors SB 216763 inkubiert und anschließend mittels Immunfluoreszenz nach CTNNB (grün: Alexa Fluor 488) und CDH5 (rot: Alexa Fluor 594) gefärbt. Die dargestellten IF-Aufnahmen sind repräsentativ für drei Experimente.

Ähnlich der Stimulation der Zellen mit LiCl oder den WNT-Agonisten WNT9a und WNT3a, bewegten sich die *Fold changes* von *plvap* und *ccnd1* nahe dem Wert 1 und befanden sich demnach im nicht signifikanten Bereich, da ein *Fold change* von 1 keiner Veränderung zur Kontrolle entspricht. Im Gegensatz dazu sind sowohl *cldn5*, *cdh5* und *ctnnb* deutlich hochreguliert. Zwar treten bei *cldn5* und *cdh5* hohe Standardabweichungen auf, jedoch wiesen die jeweiligen der Standardabweichung zu Grunde liegenden *Fold changes* beider Gene Werte deutlich über dem oberen Grenzwert des nicht signifikanten Bereiches auf. Die Gene gelten somit unabhängig von der Varianz zwischen den einzeln detektierten *Fold changes* als hochreguliert. Das Gen für das TJ-Protein ZO1 ist zwar hochreguliert, jedoch nicht genug, um einen Effekt von SB 216763 verifizieren zu können. Die Expression von *dkk1* wurde durch das Wirken des Inhibitors herunterreguliert und bewegt sich am unteren Grenzwert des

nicht signifikanten Bereiches. Ob die niedrigen Expressionslevel von *dkk1* auf eine Inaktivierung seitens DKK1 zurückzuführen sind, kann daher nicht unmittelbar ausgeschlossen werden.

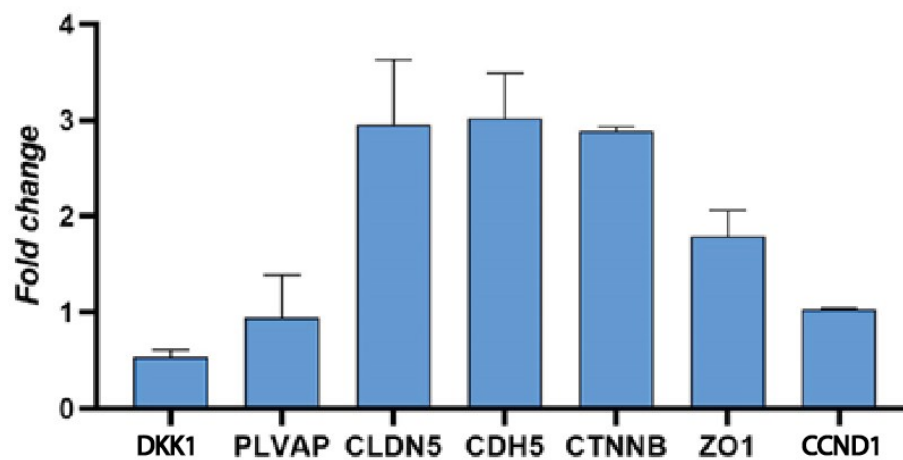


Abbildung 24 Expressionslevel ausgesuchter Zielgene nach Behandlung mit GSK3 β -Inhibitor. Stimulation von iHCPEnC mit 10 μ M LiCl für 6 h und 24 h. Aufgetragen wurde der Mittelwert der erhaltenen *Fold changes* der untersuchten Zielgene mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Da DKK1 als Ursache für die niedrigen Expressionslevel der CTNNB Zielgene nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnten und die Gene *cldn5*, *cdh5* und *ctnnb* nach dem Einsatz des Inhibitors SB 216763 tatsächlich differenziell exprimiert wurden, sollte im nächsten Schritt geklärt werden, warum nur geringe Mengen an CTNNB im Nukleus detektiert werden konnte.

3.7.3. Ko-Lokalisation von CTNNB mit unterschiedlichen Zellorganellen

Sowohl nach der Inhibition von GSK3 β durch LiCl als auch durch den Inhibitor SB 216763 wurden in der Immunfluoreszenz erhöhte Signale von CTNNB und CDH5 in iHCPEnC im Bereich um den Nukleus festgestellt, jedoch konnten nur eine minimale Zunahme von aktivem CTNNB im Nukleus und nur geringe Effekte auf die Expression von Zielgenen des WNT-Signalweges beobachtet werden. Somit stellt sich die Frage, warum in iHCPEnC trotz verlängerter Expositionen mit dem Inhibitor keine zunehmende nukleare Translokation von CTNNB stattfindet. Studien haben gezeigt, dass CTNNB nach der Aktivierung durch einen WNT-Stimulus nicht nur im Nukleus, sondern auch in Recycling-Endosomen, dem Golgi-Apparat und dem ER lokalisiert werden konnte [252,253,267]. Außerdem existiert ein zweiter Pool an aktiven CTNNB, welches in seiner Funktion als Bestandteil der AJ an Cadherine wie CDH5 bindet und diese so in der Membran verankert [261,262]. Dementsprechend ist dieser Pool an der Zellmembran lokalisiert, wobei jedoch unklar ist, ob die beiden CTNNB-Pools miteinander im Austausch stehen [261,262].

Eine vermehrte Lokalisation an der Zellmembran oder den genannten Organellen könnte demzufolge die geringe nukleare Translokation von CTNNB und geringe Einflussnahme auf die Expression von Zielgenen wie *plvap* erklären. Dementsprechend sollte im nächsten Schritt überprüft werden, inwiefern CTNNB und CDH5 mit Organellen der Zellen ko-lokalisieren.

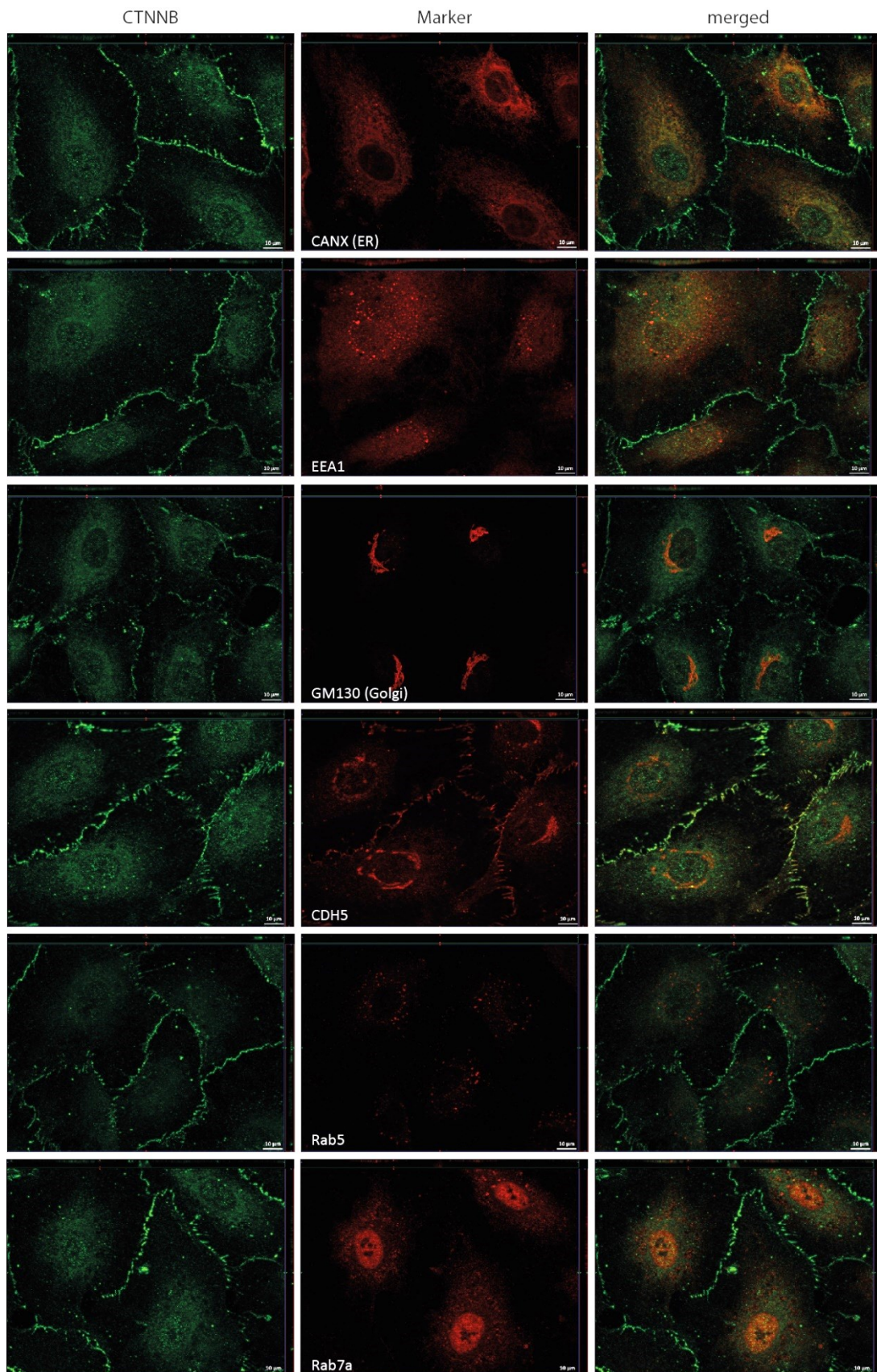


Abbildung 25 Ko-Lokalisation von CTNNB mit unterschiedlichen Zellorganellen. Die immortalisierten EZ wurden zunächst für 24 h mit 10 μ M SB 216763 inkubiert und anschließend eine IF gegen CTNNB und verschiedene Marker durchgeführt, um die Lokalisation von CTNNB im Zytosol zu bestimmen. Von oben nach unten wurden folgende Marker verwendet: CANX, EEA1, GM130, CDH5, Rab5 und Rab7a.

Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit 10 μ M SB 216763 behandelt und anschließend mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurde eine IF gegen CTNNB und verschiedene Marker durchgeführt, die spezifisch für bestimmte Zellorganellen sind. In früheren Studien wurde bereits berichtet, dass aktives CTNNB nach Behandlung der immortalisierten Zellen mit WNT-Aktivatoren unter anderem auch mit Recycling-Endosomen, dem Golgi-Apparat und in geringem Umfang dem ER assoziiert [252,253,267]. Als im Folgenden verwendete Marker wurden daher Calnexin (Canx) zur Färbung des Endoplasmatischen Retikulums (ER), EEA1 zur Färbung früher Endosomen, GM130 als Marker des Golgi-Apparats (Golgi) und Rab5 und Rab7a zur Färbung von Recycling-Endosomen ausgewählt (*ABBILDUNG 25*). Im Verlauf dieser Experimente konnte ein gemeinsames Signal für CTNNB und dem membrangebundenen CANX detektiert werden (*SIEHE ABBILDUNG 25*). Daraus lässt sich ableiten, dass CTNNB Moleküle am ER lokalisiert vorliegen. Es kann jedoch nicht differenziert werden, ob Anteile von CTNNB an das ER gebunden sind oder sich im ER Lumen befinden.

Eine Klärung dieser Fragen erfordert zusätzliche Experimente. Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Lokalisation von CTNNB in Endosomen, konnte in iHCPEnC nach Stimulation des WNT-Signalweges durch SB 216763 keine Ko-Lokalisation von CTNNB und EEA1 oder CTNNB und Rab7a detektiert werden. Ob eine Assoziation von CTNNB mit den frühen Endosomen oder den Rab7a positiven Recycling-Endosomen vorliegt, ist daher nicht festzustellen und bedarf weiterer Überprüfung.

4. Diskussion

4.1. Eignung von iHCPEnC als Modell zur Erforschung des PC und der BLS

4.1.1. Die Bedeutung von EZ in der Erforschung des PC

Der PC ist eine komplexe, hoch vaskularisierte Struktur in den Ventrikeln des Gehirns, die auf verschiedenen Zelltypen einschließlich Endothel-, Epithel-, Immun-, Mesenchym-, Glia- und Nervenzellen aufgebaut ist. Er ist nicht nur während der Entwicklung des Gehirns von Bedeutung, sondern ist auch essenziell an der Produktion des Liquors beteiligt. Außerdem bildet er die innere BLS, die eine zentrale Rolle während der Pathogenese von ZNS-Infektionen und neurodegenerativen Krankheiten spielt [120,222-225]. Dabei wird die eigentliche Schrankenfunktion von dem dichten Epithel des PC ausgeübt. Die Kapillaren des PC kleidet ein fenestriertes Endothel aus, welches die Lumen vom Stroma trennt und eine regulierte Versorgung des unterliegenden Gewebes ermöglicht [136,268,269]. Viele Funktionen des PC ergeben sich aufgrund seiner Fähigkeit, Blut und Liquor durch eine stabile Barriere voneinander zu trennen. Um die Funktionen des PC neben Tiermodellen auch mit Hilfe von *in vitro* Modellsystemen erforschen zu können, muss gewährleistet sein, dass die Barrierefunktionen und die eingeschränkte parazelluläre Permeabilität des PC in den *in vitro* Modellen rekapituliert werden. In der Literatur sind *in vitro*-Modelle basierend auf primären, aus verschiedenen Spezies isolierten Zellen oder auf Tumorzelllinien tierischer Abstammung beschrieben [118,135,136,226,227]. Eines dieser Modelle besteht aus humanen epithelialen PC-Papillomzellen (HIBPCP), die auf mikroporösen Einsätzen kultiviert werden und bei Konfluenz sowohl eine Polarität als auch einen hohen (500 bis 800 Ω cm²) TEER ausbilden sowie eine geringe Permeabilität für Makromoleküle aufweisen [268-270]. Aktuelle Beobachtungen haben gezeigt, dass sich EZ auch innerhalb des gleichen Gefäßbettes unterscheiden können, und dass sich z.B. die EZ des PC in Bezug auf Endothel-Marker signifikant von den EZ der BHS unterscheiden [11]. Diese Erkenntnisse haben dazu geführt, dass EZ in den Fokus neuer Forschungsansätze gerückt wurden [122]. In Bezug auf den PC wird angenommen, dass neben den EPZ auch die organspezifischen Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Funktion des PC spielen und damit bedeutend zur Generierung der BLS beitragen [11]. Allerdings ist im Gegensatz zu PC EPZ bisher keine humane Zelllinie bekannt, die auf PC-Endothelzellen (HCPEnC) basiert [271,272]. Daher ist, trotz des aktuellen Fokus auf EZ, Forschung zu den EZ des PC gegenwärtig stark unterrepräsentiert. Zusätzlich wird meist nur im Zusammenhang mit vaskulären Erkrankungen auf die EZ verwiesen und selbst wenn deren Auswirkungen im ZNS betrachtet werden, dann liegt der Fokus meist auf den EZ der BHS [13,40,236]. Eine Einbindung des physiologisch relevanten PC-Endothels beim Studium des PC und der BLS würde sicherlich wertvolle Erkenntnisse in Bezug auf deren Funktion liefern. Eine Substitution des PC-spezifischen Endothels durch Endothelzellen aus anderen Organen wäre aus Gründen mangelnder Spezifität keine optimale Lösung.

Bei der Generierung von *in vitro* Modellen ist weiterhin zu beachten, dass sich Transkriptom und Proteom auch innerhalb eines Zellverbandes zwischen einzelnen Zellen unterscheiden können. So wurde durch Studien am PC festgestellt, dass sich dessen EPZ untereinander in ihrem Transkriptom und Proteom unterschiedlich verhielten, was auf parakrine Signalübertragung benachbarter Zellen, unter anderem von EPZ zu EPZ, zurückgeführt wurde [237-239]. Aufgrund der Interaktion der Zellen und der gegenseitigen Einflussnahme aufeinander ist es nicht unwahrscheinlich, dass sich die Transkriptome und Proteome der einzelnen Zellen im Gewebe von denen isolierter Zellen in *in vitro* Modellen unterscheiden. Daher empfehlen Marques und Sousa bei der Analyse der BLS nicht nur das

isolierte Epithel des PC zu betrachten, sondern auch das darunter liegende Stroma mit Immunzellen und Fibroblasten einzubeziehen [237,273]. Allerdings wurden auch in dieser Arbeit EPZ und EZ getrennt voneinander betrachtet und mögliche Interaktionen nicht behandelt. Es ist davon auszugehen, dass im PC auch zwischen dem Epithel und dem darunter liegenden Endothel eine Interaktion stattfindet. Z.B. befinden sich an der basolateralen Seite der EPZ viele ABC-Transporter und Solute-Carrier, die ebenfalls in den EZ des PC exprimiert werden [240-242]. Diese Expressionsmuster unterstützen eine Interaktion zwischen Epithel und Endothel im PC. Aus Ermangelung eines PC *in vitro* Modelles, das sowohl Epithel als auch Endothel einbezieht, musste zur Erforschung dieser Interaktionen, auch hinsichtlich der Rolle des PC in der Ausbildung der BLS, auf Tiermodelle zurückgegriffen werden [118,136,227,269-272]. Durch Generierung eines Zwei-Zelltyp Modells, welches aus PC-Epithel- und Endothelzellen besteht, könnte auch *in vitro* das Zusammenspiel von Epithel und Endothel betrachtet und der Einsatz von Tiermodellen reduziert werden. Zu beachten ist allerdings, dass bei Einsatz von Primärzellen die geringe Anzahl an möglichen Zellpassagen und die Variabilität zwischen verschiedenen Primärzellkulturen die Anwendung eines solchen Modells erschwert. Daher besteht die Notwendigkeit eine Zelllinie zu erzeugen, die charakteristische Endothelmarker sowie eine reproduzierbare Morphologie und Genexpression der primären Zellen aufweist. Um diese Grundvoraussetzung an die neuartige Zelllinie zu erfüllen, wurde bei der Generierung einer PC-Endothelzelllinie eine Methode zur Immortalisierung von primären Zellen ausgewählt, welche zu möglichst geringen Unterschieden im Vergleich zu den primären Zellen führt.

4.1.2. Grundlage einer neuartigen PC-Endothelzelllinie (iHCPEnC)

Seit der ersten dauerhaften Kultur von HeLa-Zellen 1951/1952, sind Zellkulturen ein fester Bestandteil der Forschung [205]. Primäre Zellen, die direkt aus einer Probe entnommen werden, besitzen alle Eigenschaften der Ursprungsprobe und repräsentieren diese im Vergleich zu transformierten Zelllinien daher am besten, jedoch ist ihre Überlebensdauer auf einige wenige Passagen beschränkt [208]. Die Primärzellkultur unterliegt demnach ihrer natürlichen Seneszenz und stirbt nach dem sogenannten jeweiligen Heyflick-Limit ab [219,220,274,275]. Eine permanente Zellkultur aus Tumorzellen oder transformierten Zellen ist dagegen deutlich stabiler, weniger empfindlich und besitzt eine in der Theorie unendlicher Lebensdauer. Zur Herstellung einer solchen Zelllinie können p53/p16/pRb durch Mutation der p53 und pRb Gene und der Einführung von Onkogenen inhibiert werden, sodass sich die Zellen unbegrenzt teilen können [208,209]. Allerdings verändert dieser Prozess der Transformation die Zellen oftmals dramatisch, sodass sie sich deutlich von den Ursprungszellen unterscheiden [208]. Bei aus Tumorgewebe generierten Zelllinien ist zu beachten, dass sich die Tumorzellen ebenfalls deutlich vom gesunden Gewebe unterscheiden können [219,220,274,275]. Um eine permanente Zelllinie zu generieren, die den primären Zellen möglichst ähnlich ist, kann auf Transformation mit Hilfe von hTERT zurückgegriffen werden [205,206]. Auf diese Weise hergestellte Zelllinien exprimierten den katalytisch aktiven Teil der Telomerase, wodurch eine Verkürzung der Telomere unterbunden wird [208].

Auf die Immortalisierung mit Hilfe von hTERT wurde bei der Generierung der Zelllinie iHCPEnC zurückgegriffen [123]. Die gewonnenen Zellen wuchsen in Kultur nur in einer Schicht und auch das Wachstum in soft-Agar war für diese Zellen nicht möglich, was bereits darauf hindeutete, dass die Zellen durch die Immortalisierung keine onkologische Transformation erfahren hatten. Ebenso konnten auch nach fortschreitender Passagierung keine Beobachtungen bezüglich einer Veränderung der Zellmorphologie aufgrund einer fortgeschrittenen Seneszenz festgestellt werden, während sich diese bei den primären Endothelzellen bereits nach 14 Passagen durch eine abgeflachte Morphologie, eine vergrößerte Zelloberfläche mit Ausstülpungen und eine unterdrückte Proliferation äußerte. [123].

Im Gegensatz dazu wurden bei iHCPEnC keine dieser Veränderungen selbst bei Überschreitung der Passage 30 beobachtet, was 60 Verdopplungen der Ursprungspopulation entspricht [123].

Zur Ergänzung dieser rein morphologischen Beschreibung wurde in der vorliegenden Arbeit ein umfassender Transkriptom-Vergleich der primären Zellen und verschiedener Passagen der immortalisierten EZ des PC durchgeführt. Dadurch sollten die Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Zellen, aber auch mögliche Unterschiede, aufgedeckt und analysiert werden, um zu ermitteln, in welchem Maße die iHCPEnC Eigenschaften des primären PC-Endothels rekapitulieren. Durch eine vergleichende Analyse früher und später Passagen sollten weiterhin mögliche Änderungen in den immortalisierten Zellen in Abhängigkeit fortschreitender Passagierung detektiert werden.

Bei der Gegenüberstellung der gemittelten, der MACE-Analyse entstammenden Expressionswerte der primären Zellen HCPEnC und der jüngeren (p20) und älteren (p50) Passage der immortalisierten iHCPEnC konnten hohe Bestimmtheitsmaße (R^2) ermittelt werden. Mit einem Wert von 0,9463 implizierte das lineare Regressionsmodell, dass die in p50 beobachtete Genexpression zu 95 % durch die Genexpression in p20 erklärt werden könnte. Dies bedeutet, dass die beobachteten Veränderungen der Genexpression in p50_vs_p20 ihren Ursprung in der ermittelten Genexpression der jüngeren Passage p20 haben. Anders ausgedrückt, die Veränderungen, die in der Genexpression von p20 auftraten, führten zu den Expressionsveränderungen, die anschließend in p50 beobachtet werden konnten. Eine solche Beziehung verdeutlicht eine hohe Übereinstimmung der beiden Passagen. Ebenso scheint die Expression der Gene in den immortalisierten Zellen auf den Expressionsniveaus der primären Zellen zu basieren, da hohe R^2 von 0,9379 beim Vergleich p50_vs_p6 und von 0,9506 beim Vergleich p20_vs_p6 ebenfalls festgestellt werden konnten. Ausgehend von diesen Werten kann eine hohe Ähnlichkeit der ursprünglichen primären Zellen und den aus ihnen hervorgegangenen immortalisierten Zellen angenommen werden. Ähnliche Werte wurden auch beim Vergleich der Expressionsprofile von zwei BLS-Endothelzelllinien, den immortalisierten humanen Kapillarendothelzellen (hCMEC/D3) und den primären humanen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (hpBECs), beobachtet, wobei ein Bestimmtheitsmaß von 0,91 ($p < 1.68 \cdot 10^{-6}$) erreicht wurde [276]. Ein Vergleich einer häufig genutzten, auf immortalisierten Herzzellen basierenden Mauszelllinie (MCEC) mit ihren primären Zellen (pEC) konnte dagegen nur eine Übereinstimmung von 0,75-0,77 erreichen [221].

4.1.3. Hohe Übereinstimmung von HCPEnC und iHCPEnC

Mithilfe der MACE-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Expressionslevel der primären Zellen zu einem hohen Anteil mit den Expressionslevel der immortalisierten Zellen übereinstimmen, was sich nach Vergleich der *Raw Reads* in einem Pearson-Koeffizient zwischen 0,94 und 0,98 widerspiegelt. Dabei lagen die größten Übereinstimmungen in den Niveaus der untersuchten Genexpressionen beim Vergleich der *Raw Reads* der jüngeren Passage p20 mit denen der primären Zellen vor, während in dieser Analyse die ältere Passage p50 die größten Unterschiede zu der jüngeren Passage p20 aufweist. Diese Beobachtung spiegelt die bereits in der Regressionsanalyse ermittelten Ergebnisse wider.

Betrachtet man nun die Anteile der signifikanten DEG und die Gesamtanzahl der untersuchten Transkripte, sind in der Gegenüberstellung der älteren Passage zur jungen Passage der immortalisierten Zellen nur 18 % der analysierten Gene signifikant differentiell exprimiert, was eine hohe Ähnlichkeit der beiden Passagen der iHCPEnC impliziert. Besonders relevant für die Eignung der iHCPEnC als *in vitro* Modell des PC-Endothels ist die Ähnlichkeit zu der primären Zelllinie. Bei der Untersuchung dieses Aspektes konnte festgestellt werden, dass die primären Zellen und die iHCPEnC

sogar eine noch höhere Ähnlichkeit aufwiesen als die jüngere und ältere Passage der immortalisierten Zelllinie untereinander. Sowohl beim Vergleich der primären Zellen (p6) mit der frühen (p20) als auch der späten (p50) Passage der iHCPEnC waren nur ca. 11 % der insgesamt 26.586 untersuchten Transkripte differentiell exprimiert. Weiterhin sind viele der DEG nicht nur in einem der Vergleiche vorzufinden, sondern auch in einem oder zwei weiteren der Vergleiche. So wurden bei den Vergleichen der beiden Passagen der iHCPEnC mit den primären Zellen (p20_vs_p6 und p50_vs_p6) mehr als ein Drittel der insgesamt identifizierten differentiell exprimierten Gene identisch. Aus dieser Schnittmenge war wiederum eine hohe Zahl an Genen (29 %) identisch zu denen, die zwischen den beiden Passagen der iHCPEnC (p20_vs_p50) differentiell exprimiert waren. Allerdings traten beim Vergleich p20_vs_p50 noch eine große Anzahl weiterer differentiell exprimierter Gene auf, die aber beim Vergleich der immortalisierten Zellen mit den primären zunächst nicht ins Gewicht fallen. Allerdings könnte bei einer fortschreitenden Passagierung diese Differenz weiter vergrößert werden und dann auch im Vergleich zu den primären Zellen eine Rolle spielen.

Wie sich die Veränderungen der Genexpression während voranschreitender Passagierung der Zellen verhalten, lässt sich zunächst oberflächlich durch die Unterteilung in hoch- und herunterregulierte DEG ermitteln. Dabei fiel besonders auf, dass der Anteil an herunterregulierten DEG im Verlauf der Passagierung der Zelllinie abnimmt und der Anteil der hochregulierten DEG zunahm (SIEHE *ABBILDUNG 7 & ABBILDUNG 8*). Diese Beobachtung legt nahe, dass sich einige DEG über den Verlauf der voranschreitenden Passagierung in ihrer Expression verstärken oder auch verringern. Teilweise könnte es sich dabei um zelluläre Korrekturen handeln, die zuvor aufgetretene Abweichungen ausgleichen, die z.B. in Folge der Immortalisierung der Zellen entstanden sind. Dafür spricht, dass einige DEG, die im Vergleich der jüngeren immortalisierten Zellen zu den primären Zellen (p20_vs_p6) signifikant differentiell exprimiert waren, im Vergleich der älteren immortalisierten Zellen mit den primären Zellen (p50_vs_p6) nicht mehr identifiziert wurden. Auch DEG, die in p20_vs_p6 hochreguliert waren und in p50_vs_p6 runterreguliert (57 DEG), oder umgekehrt (48 DEG), unterstützen diese Hypothese. Möglich ist, dass nach der ersten Differenz der Genexpression eine Überkorrektur stattgefunden hat. Im Verlauf weiterer Passagierung könnte sich eine erneute Korrektur ereignen.

Alternativ könnte sich der in p50_vs_p6 festgestellte Expressionslevel dieser DEG stabilisieren und dieses Level in folgenden Passagen beibehalten. Da bei den Vergleichen von p20_vs_p6 und p50_vs_p6 DEG identifiziert wurden, die in beiden Gegenüberstellungen hochreguliert (384 DEG) bzw. herunterreguliert (604 DEG) vorlagen, spricht dies für ein stabiles Expressionsniveau dieser DEG, das nicht mit dem der primären Zellen übereinstimmt. Es ist allerdings möglich, dass bei weiterer Passagierung über p50 hinaus Gene, die vorher im Vergleich mit den primären Zellen differentiell exprimiert waren, entweder wieder auf das Niveau der primären Zellen „eingestellt“ werden oder sich weiter „auseinanderbewegen“.

Insgesamt zeigt sich eine hohe Übereinstimmung beider Passagen der immortalisierten iHCPEnC zu den primären Zellen, welche die Eignung der iHCPEnC als *in vitro* Modell des PC-Endothels unterstreicht. Zusätzlich wurde durch die Analyse der späten Passage der iHCPEnC die Stabilität der Immortalisierung belegt.

4.1.4. Auswirkungen der Immortalisierung auf biologische Prozesse

Durch die GSEA Analyse der ermittelten signifikant regulierten DEG konnten biologische Prozesse identifiziert werden, in denen sich die immortalisierten Zelllinien von den primären Zellen unterscheiden. Zum Beispiel wurde den signifikanten Genen der Vergleiche der jungen und der älteren Passage der iHCPEnC mit den primären HCPEnC (p20_vs_p6 und p50_vs_p6) der GO Terminus „*circulatory system development*“ zugeordnet. Die Differenzierung der Endothelzellen zählt zu den frühen Stadien der Gefäßentwicklung. Im Verlauf der Gefäßentwicklung erwerben die Endothelzellen spezialisierte Eigenschaften, zu denen die Kontrolle der Zellpermeabilität, Expression spezifischer transzellulärer Transportsysteme, sowie Membranadhäsionsmoleküle gehören, um den spezifischen Bedürfnissen verschiedener Organe gerecht zu werden [277]. Ebenso müssen die benötigten Eigenschaften zur Regulation des Blutflusses, der Produktion und Bindung von Chemokinen und zur Kontrolle des Leukozyten-Transports ausgebildet werden. Dabei werden neben der Zelldifferenzierung auch andere zelluläre Mechanismen, wie der Zellzyklus, Apoptose und zelluläre Kommunikation über den WNT-Signalweg kontrolliert [278].

Zwei weitere interessante GO-Termini, die beim Vergleich p20_vs_p6 detektiert wurden, sind „*neuron development*“ und „*epithelium development*“. Bereits in Parichha *et al.* wurde beschrieben, dass die feinregulierte Aktivität des WNT-Signalweges nicht nur in der Embryonalentwicklung des PC benötigt wird, sondern auch für die korrekte Produktion der CSF verantwortlich ist [279]. Die Überexpression als auch die Unterexpression dieses Signalweges führte sowohl in einem Maus-Modell, in dem der WNT-Signalweg-Regulator CTNNB konstant aktiviert vorlag, als auch in stammzellbasierten humanen Organoiden zu einem Verlust der PC EPZ im Telencephalon. Stattdessen bildeten diese Zellen Eigenschaften von Neuralzellen aus [279]. Die Transformation des wachsenden PC-Epithels in seine adulte, in die Ventrikel hineinragende, Form aus Vorläuferzellen wird durch die Interaktion der EPZ mit dem umgebenden zellulären Netzwerk aus mesenchymalen und vaskulären Zellen ermöglicht [280-284]. Auch in p50_vs_p20 wurde eine Anreicherung von DEG festgestellt, die dem GO-Terminus „*epithelium development*“ zugeordnet werden können.

Aufgrund der negativen ES und NES kann davon ausgegangen werden, dass Gene, die den genannten GO-Termini zugeordnet werden, herunterreguliert sind. Allerdings kann dadurch noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Prozess herunterreguliert ist, da keine explizite Unterscheidung zwischen Aktivatoren und Inhibitoren getroffen wurde. Eine tiefergehende Betrachtung der beteiligten Gene wäre demnach zusätzlich von Nöten, um das Ergebnis der GSEA weiter zu spezifizieren. Es ist bekannt, dass die weitere Entwicklung der EZ einschließlich der Ausbildung ihrer charakteristischen Eigenschaften durch Austausch mit den umliegenden Geweben induziert wird [140]. Diese produzieren Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und aktivieren damit die Expression spezifischer Gene in EZ. Während die primären Zellen möglicherweise auch in Kultur noch einige wenige Zellzyklen den Einfluss des Gewebes, z.B. durch epigenetische Modifikationen, aufrechterhalten, können die niedrigeren Expressionslevel der beschriebenen GO-Termini zugehörigen Gene in den immortalisierten Zellen potenziell dem fehlenden Einfluss der umliegenden Gewebe zugeschrieben werden. Allerdings könnten diese signifikant veränderten GO-Termini auch einen Hinweis auf eine Regulation in der älteren Passage der iHCPEnC (p50) geben, die sich von den Prozessen in jungen Zelllinien unterscheidet. Während die Entwicklung von Blutgefäßen ein lebenswichtiger Prozess während der embryonalen Entwicklung und des Gewebewachstums ist, wird in ausdifferenzierten Zellen diesem Prozess jedoch auch eine Rolle während der Regeneration und bei Krankheitsprozessen zugeschrieben [285].

Es bleibt zu klären, wie stark die jeweiligen Ausprägungen der veränderten GO-Termini sind und inwieweit sie den Phänotyp der Zellen beeinflussen. Es ist zu bedenken, dass die ermittelten GO-Termini, wenn auch indirekt mit den EZ assoziiert, lediglich einen Hinweis auf eine Veränderung biologischer Prozesse geben. Daher sollten die gewonnenen Daten stets im Bezug zum Phänotyp der Zellen betrachtet werden. Dadurch kann überprüft werden, ob der beobachtete Effekt stark genug ausgeprägt ist, um auch einen detektierbaren Unterschied zwischen den Phänotypen und dem Verhalten von primären und immortalisierten Zellen hervorzurufen. Außerdem kann der Vergleich mit anderen Zelllinien und *in vitro* Modellsystemen, z.B. den PC EPZ oder anderen EZ, dabei helfen, eine Einstufung der Unterschiede vorzunehmen. Die Unterschiede könnten unterteilt werden, z.B. in 1. verändert, aber immer noch den EZ des PC entsprechend, 2. verändert, aber immer noch im Rahmen von EZ, oder 3. generell deutlich von EZ unterschieden.

Weiterhin muss in Betracht gezogen werden, dass die gewonnenen Expressionsdaten der isolierten primären HCPEnC von den Expressionsleveln der Zellen in ihrem natürlichen Umfeld abweichen können. Es wurde bereits gezeigt, dass Zellkulturmodelle basierend auf EZ der BHS im Vergleich zu ihren primären Zellen geringe Expressionslevel wichtiger Transporter-Familien, wie ABC- oder SLC-Transporter, aufweisen, die normalerweise stark ausgeprägt sind [276]. Bei diesem Beispiel haben die kultivierten EZ der BHS außerhalb ihres nativen Umfeldes ihr charakteristisches Proteom einschließlich der Expression von charakteristischen Markergenen verloren und stattdessen eher allgemeine Phänotypen einer „durchschnittlichen“ EZ angenommen. Die These, dass die umliegenden Zellen einen großen Einfluss auf die Ausbildung der BHS typischen Geno- und Phänotypen haben, wird durch zahlreiche Studien gestützt, bei denen die EZ in Ko-Kulturen mit Astrozyten und Perizyten untersucht wurden [92,286-294]. BHS charakteristische Expressionsmuster konnten sogar in EZ, die nicht der BHS entstammen, erzeugt werden [292].

4.2. WNT-Signalübertragung als Regulator vaskularer Permeabilität in IHCPEnC

4.2.1. Ausprägung des kanonischen WNT-Signalweges in HCPEnC und iHCPEnC

Die WNT-Signalübertragung reguliert grundlegende Aspekte der Zellentwicklung, Differenzierung, Proliferation und des Überlebens, und kann dabei diverse Signalwege und Rezeptoren nutzen. Infolgedessen kam man zu der Annahme, dass EZ besonders sensitiv gegenüber der WNT-Signalübertragung sind und sich möglicherweise auch selbst über diesen Weg stimulieren [140]. Es wurde bereits beschrieben, dass *loss-* und *gain-of-function* Experimente mit Teilen des WNT-Signalweges zu deutlichen Veränderungen der vaskulären Entwicklung und der Spezifikation von Endothelzellen führen [140]. In vielen unterschiedlichen Gefäßtypen, einschließlich der Mikrovaskulatur des Gehirns, kann daher eine Aktivierung des WNT-Signalweges bei der Vaskulo- und Angiogenese im Rahmen der embryonalen Entwicklung beobachtet werden [140,141]. Auch bei der Entstehung des PC aus dem kortikalen Saum spielt der WNT-Signalweg eine große Rolle, und seine Aktivität konnte in murinen und humanen embryonalen PCs nachgewiesen werden [279,280]. Interessanterweise scheinen sich die PCs der vier Ventrikel in Mäusen morphologisch zu unterscheiden, und die molekularen Ursachen dieser Unterschiede sind bisher unbekannt [281].

In einer systematischen qRT-PCR Analyse konnte bereits in mehreren EZ unterschiedlichen Ursprungs eine breitflächige Expression der unterschiedlichen Komponenten des WNT-Signalweges festgestellt werden [295]. Sowohl in der MACE-Analyse der immortalisierten Zellen als auch in den nachfolgenden PCR Experimenten konnten alle wesentlichen Komponenten des kanonischen WNT-Signalweges nachgewiesen werden. Dabei wurde festgestellt, dass bis auf FZD 10 alle Rezeptoren und Ko-Rezeptoren, sowie CTNNB in den primären, als auch den immortalisierten EZ des PC exprimiert wurden. Jedoch konnten nicht alle Komponenten innerhalb der Gruppen der WNT-Liganden und der WNT-Modulatoren detektiert werden. So wurden nur die WNT-Liganden *wnt2b*, *wnt3*, *wnt4* und *wnt9a* sowie die WNT-Modulatoren *sfrp1*, *sfrp3*, *sfrp4*, *dkk1* und *dkk3* in den beiden Passagen der immortalisierten Zelllinie nach PCR und qPCR nachgewiesen. [295].

In der MACE-Analyse konnten für die primären und immortalisierten EZ des PC im Vergleich zur qRT-PCR zusätzlich *wnt3a*, *wnt7b*, *wnt9b* und *wnt11* aufgezeigt werden. Diese Gene wurden in der qRT-PCR und in der konventionellen PCR als nicht exprimiert definiert, da ihre CT-Werte den Threshold von 35 überschritten. Dass diese Transkripte in der MACE stärker hervortraten, könnte darauf zurückzuführen sein, dass dort auch alternativ gespleißte Isoformen erkannt werden, während eine PCR nur bekannte Sequenzen detektieren kann [296,297]. Auch wurden einige der Komponenten des WNT-Signalweges durch die MACE-Analyse und die qRT-PCR als unterschiedlich signifikant eingestuft. Dies ist hauptsächlich auf die unterschiedliche Methodik bei der Auswertung der beiden Analysen zurückzuführen. Während für die qRT-PCR der allgemein genutzte Threshold eines *Fold change* von 2 (hochreguliert) bzw. 0,5 (herunterreguliert) verwendet wurde, wurde bei der MACE-Analyse ein Threshold von 1 bzw. -1 gewählt und zusätzlich wurden p-Wert und FDR-Wert zur Bestimmung der Signifikanz berücksichtigt. Der Vergleich der mit Hilfe der beiden Methoden ermittelten Expressionsdaten ergab dennoch, dass die *Fold changes* und die Bewertung der Signifikanz der Komponenten des WNT-Signalweges sowohl in den iHCPEnC als auch den primären Zellen bei beiden Methoden in großem Maße übereinstimmten.

Einige der Komponenten des WNT-Signalweges wurden beim Vergleich der immortalisierten zu den primären Zellen sowohl in der MACE-Analyse als auch in der qRT-PCR als signifikant differentiell exprimiert identifiziert. U.a. war *wnt5a* sowohl in der MACE als auch in der qRT-PCR herunterreguliert. Allerdings war dieser Effekt in der MACE nur im Vergleich der älteren zur jüngeren Passage (p50_vs_p20) signifikant, während der Effekt in der qRT-PCR im Vergleich der immortalisierten zu den primären Zellen hervorstach. Im Gegensatz dazu wurde die Expression von *wnt10b* in den immortalisierten Zellen als hochreguliert identifiziert. Dieser Effekt konnte in der MACE-Analyse jedoch nur im Vergleich der älteren Passage von iHCPEnC gegenüber den primären HCPEnC als signifikant eingestuft werden.

Interessanterweise wird die Aktivität von WNT5a besonders im Rahmen des nicht kanonischen Signalweges bei der Differenzierung von EZ beschrieben [298]. Dabei wird über diesen Weg die Zytoarchitektur, die apikobasale Polarität und die allgemeine Größe und Komplexität des PC reguliert [299,300]. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass eine gegenseitige Beeinflussung zwischen den unterschiedlichen WNT-Signalkaskaden stattfindet. So wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass der CTNNB unabhängige Signalweg den CTNNB abhängigen Signalweg unterdrücken kann [139]. Somit könnte auch hier eine Einflussnahme mittels WNT5a vorliegen, die in den immortalisierten Zellen weniger stark ausgeprägt ist.

Die Expression der Komponenten des WNT-Signalweges in den EZ des PC impliziert, dass der Signalweg aktiv genutzt wird, da seine Transkription andernfalls zugunsten von Energieersparnis epigenetisch inaktiviert würde [301]. Unklar ist allerdings, ob diese Komponenten konstitutiv, fakultativ oder induziert exprimiert werden. Gegen eine konstitutive Expression und damit potenzielle konstante

Aktivierung des WNT-Signalweges sprechen frühere Experimente, in deren Folge die ständige Aktivität von CTNNB zur Transformation von Zellen in andere Zelltypen führte [302-304]. Außerdem reduzierte sowohl der systemische knockout als auch die Überexpression von *wnt5a* die PC-Größe und Entwicklung in Embryonen [280,305].

Inwiefern die Herunterregulierung von *wnt5a* in den iHCPEnC einen Einfluss auf den kanonischen und nicht kanonischen WNT-Signalweg und die Expression dessen Zielgene hat, muss weiter untersucht werden. Nach der GSEA Analyse der MACE Daten konnten zunächst keine signifikanten Auswirkungen auf den WNT-Signalweg an sich festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da nur wenige Komponenten als signifikant exprimiert bezeichnet werden konnten, ist in weiteren Experimenten zu untersuchen, ob diese Abweichungen ausreichen, um signifikante Veränderungen in der Genexpression von iHCPEnC im Vergleich zu HCPEnC zu gewährleisten. Trotz dieser eher geringfügigen Abweichungen bieten sich die iHCPEnC für weitere Studien zur Aktivität und Regulierung des WNT-Signalweges in den EZ des PC sowie resultierende Auswirkungen an.

4.2.2. Aussagekraft der Transkriptomuntersuchungen von HCPEnC und iHCPEnC

Für die Generierung sowie Aufrechterhaltung des zellulären Transkriptoms und Proteoms sind eine Reihe miteinander verbundener Prozesse erforderlich, die von der Menge der mRNA-Transkripte, deren Verarbeitung und Degradation bis hin zur Proteinsynthese, -modifikation und regulierten Degradation reichen [277,306]. Das dynamische Gleichgewicht zwischen diesen Prozessen bestimmt die mRNA- und Proteinmenge für ein bestimmtes Gen [277]. Allerdings sind der Einfluss der mRNA- und Proteinstabilität auf ihre spätere Korrelation auf globaler Ebene noch nicht im Detail geklärt.

Für die WNT-Liganden wurden in der vorliegenden Arbeit geringe Transkriptmengen in der qPCR und der MACE detektiert. Dies konnte in den *Raw Reads* und den normalisierten Werten beobachtet werden. Solch geringe Expressionsmengen müssen jedoch nicht gleichbedeutend damit sein, dass auch das Genprodukt in geringen Mengen vorliegt. So könnte von den in dieser Arbeit untersuchten Genen bereits ein hohes Basislevel an exprimiertem Protein vorliegen. Die in MACE und qRT-PCR gemessenen geringen Expressionsraten der WNT-Liganden auf Transkript-Ebene könnten in diesem Fall dazu dienen, den aktuellen Expressionslevel wieder an einen benötigten Basiswert anzupassen und diesen so konstant zu halten. Darüber hinaus spielt auch die Stabilität des Transkriptes eine große Rolle für die tatsächlich gebildete Menge an Protein in der Zelle [277]. Im Durchschnitt produziert eine tierische Zelle in einer Stunde 2 Kopien einer gegebenen mRNA, während in der selben Zeit mehrere Dutzend der korrespondierenden Proteine pro mRNA hergestellt werden können [306]. Dabei beträgt die durchschnittliche Halbwertszeit einer mRNA 2,6 bis 7 Stunden. Im Vergleich dazu besitzen Proteine mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 46 Stunden eine wesentlich größere Beständigkeit [307,308]. Transkripte und Proteine einer bestimmten Gruppe weisen dabei häufig ähnliche Halbwertszeiten auf. So sind mRNAs und Proteine, die dem tierischen Metabolismus zugeordnet werden, meist sehr stabil und weisen hohe Protein/mRNA Verhältnisse auf [307,308]. Im Gegensatz dazu sind mRNAs und Proteine, die in Chromatin Organisation und Regulation der Transkription involviert sind, häufig sehr kurzlebig, da so eine schnelle Reaktion auf interne und externe zelluläre Stimuli erfolgen kann [307-309].

Somit kann ein Transkript, das stabiler ist, auch öfter translatiert werden, bevor es abgebaut wird. Es werden demnach nicht so viele Transkripte benötigt, um eine vergleichbare Menge an Protein zu produzieren, wie bei einer instabilen mRNA [310,311]. Da die Sekundärstruktur eines Transkriptes

besonders zur Stabilität und damit Langlebigkeit des Transkripts beiträgt, könnten Analysen der detektierten signifikanten DEG eine Auskunft über ihre Stabilität und damit über ihren Einfluss auf die Proteinexpression gewähren. Außerdem könnte eine Ribosom-Footprint Analyse helfen, die Produktions- und Elongationsraten dieser Proteine festzustellen [306,312].

Darüber hinaus ist es nicht möglich nur mit Hilfe von Transkriptom-Daten eine Aussage über die Menge an exprimiertem Protein zu treffen, da die Stabilität des betreffenden Proteins ein nicht zu unterschätzender Faktor ist [277]. Außerdem ist zu klären, ob das Protein konstant in der Zelle vorliegt und somit einen gewissen Basiswert in der Zelle einnimmt, oder ob es nur in Reaktion auf bestimmte Stimuli gebildet oder (deutlich) vermehrt wird. Um diese Punkte zu klären, müsste zusätzlich zur Transkriptom- eine Proteomics-Analyse durchgeführt werden.

Groß angelegte Studien über Transkriptome und Proteome in zahlreichen murinen und humanen Zellen und Geweben zeigten, dass die Level exprimierter mRNAs und deren zugehöriger Proteine nur eine moderate Übereinstimmung aufweisen [307,313,314]. Die jeweiligen beobachteten Bestimmtheitsmaße dieser Vergleiche konnten mit $R \leq 0.4$ zusammengefasst werden. Dementsprechend konnten weniger als 40 % der Varianzen der detektierten Proteinlevel durch die Expressionslevel der zugehörigen Transkripte erklärt werden. Über 60 % der Varianzen manifestieren sich daher durch andere Unterschiede, z.B. Unterschiede in der Proteinproduktion und den Raten des Proteinabbaus. Entsprechend konnten variierende Beiträge von Transkription, Translation und des Proteinabbaus zu den beobachteten Varianzen in proliferierenden, differenzierenden und stimulierten murinen Immunzellen festgestellt werden [307,313,315].

Die geringe Korrelation zwischen mRNA und Proteinen scheint dabei im Gleichgewichtszustand durch intrinsische biochemische Prozesse und deren stochastische Natur und durch externes Rauschen, zum Beispiel aufgrund fluktuierender externer Konditionen, in der Genexpression hervorgerufen zu werden [316]. Im Gegensatz dazu wird bei einer zellulären Antwort auf einen Umweltstimulus das Proteom durch Transkription und Translation angepasst, wobei auch das externe Rauschen in der Genexpression reduziert wird. So wurde beispielsweise in dendritischen Zellen von Mäusen eine Verschiebung der Anteile der mRNAs von Genen, die mit Immunreaktionen assoziiert werden können, von bis zu 63 % der Gesamtexpression im Gleichgewichtszustand auf bis zu 92 % nach einer Stimulation beobachtet [315]. Außerdem wurde festgestellt, dass differentiell exprimierte Gene oftmals höhere Korrelationen von mRNA und Protein aufweisen, als es in den unstimulierten Zellen der Fall war [317]. Eine Anpassung der Genexpression an bestimmte Stimuli scheint daher durch die Reduktion des Rauschens in der Genexpression mittels höherer mRNA/Protein Korrelationen ermöglicht zu werden. Ebenso wurde beobachtet, dass die mRNA Level konservierter Gene im Laufe der Zeit divergieren, diesem Effekt jedoch durch posttranskriptionale, translationale und proteindegradierende Regulationen entgegengewirkt wird, um den Proteinreichtum zurück auf das evolutionär favorisierte Niveau zu bringen [306].

Auch wenn alle diese Faktoren bekannt sind, wäre noch zu klären, wie aktiv das fragliche Protein ist. Dies könnte mithilfe einer Phospho-Proteomics-Analyse untersucht werden, da viele Proteine erst durch das Anhängen einer Phosphatgruppe aktiviert werden.

Zieht man all diese Faktoren in Betracht, ist es durchaus möglich, dass die in dieser Arbeit beschriebenen signifikanten Differenzen zwischen der primären und der immortalisierten Zelllinie auf der Ebene der Proteinexpression keine weiteren Auswirkungen haben. Da die primären und immortalisierten Zellen bereits auf der Transkriptebene eine hohe Korrelation aufweisen, ist weiterhin davon auszugehen, dass die iHCPeNC ein sehr gutes *in vitro* Modell des PC-Endothels darstellen.

4.2.3. Nukleare Translokation von CTNNB

Der kanonische WNT-Signalweg und dessen Aktivierung spielt in vielen Forschungsansätzen, besonders in Bezug auf die Entwicklung oder die Entstehung von Krebserkrankungen eine zentrale Rolle. Die Bestätigung eines aktiven Signalweges wurde dabei in vielen Studien allerdings nur basierend auf der Lokalisation von CTNNB oder der Detektion weiterer Komponenten des WNT-Signalweges getroffen [318-324]. Um die Funktionalität des WNT-Signalweges nachzuweisen, bedarf es jedoch weiterer Analysen. Eine in der Literatur ausführlich beschriebene Methode besteht darin, mithilfe von LiCl den GSK-Komplex zu inhibieren, sodass CTNNB nicht mehr phosphoryliert und abgebaut wird. Dies führt zur Aktivierung des WNT-Signalweges [144,244,255]. Durch die Behandlung der iHCPEnC mit LiCl konnte in dieser Arbeit eine Zunahme des cytosolischen CTNNB detektiert werden, jedoch lag ein großer Anteil weiterhin an der Membran gebunden vor. Begründen lässt sich dies mit der dualen Funktion von CTNNB. In seiner cytosolischen Form ist es als Co-Transkriptionsfaktor von LEF/TCF tätig und aktiviert so Zielgene des WNT-Signalweges, während es in seiner membrangebundenen Form mit Cadherinen wie CDH5 den Zellkontakt aufrechterhält und festigt [256,257,325]. Außerdem wurde berichtet, dass CTNNB in seiner dephosphorylierten Form zunächst an der Plasmamembran in der Nähe von aktiviertem LRP6 und AXIN zu finden ist [326].

Im Unterschied zu anderen Zelllinien (e.g. HeLA, NIH3T3, U2OS, SW480, MCF10A und T47D [252]) konnte in iHCPEnC nach Behandlung mit LiCl jedoch höchstens ein sehr geringer Anteil des CTNNB Pools im Nukleus detektiert werden. Aus diesem Grund wurde zusätzlich der GSK3 β -Inhibitor SB 216763 eingesetzt, der eine spezifischere Bindung zu GSK3 β aufweisen soll als LiCl [255]. Tatsächlich konnte nach Behandlung der iHCPEnC mit diesem Inhibitor eine stärkere Translokation von CTNNB von der Zellwand ins Zytosol festgestellt werden. Dabei akkumulierte CTNNB vor allem um den Nukleus, allerdings wurde nur ein geringes Signal im Nukleus detektiert. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits bei Jamieson *et al.* beobachtet [252]. In ihrer Studie mit MCF-7 Brustkrebszellen konnte ebenfalls weder nach Stimulation mit WNT-Proteinen noch nach Stimulation mit dem WNT-Agonisten LiCl eine nukleare Translokation von CTNNB festgestellt werden. Die Autoren führten dies auf die ungewöhnlich niedrige Expression von TCF/LEF zurück, was die Zurückhaltung von CTNNB im Nukleus negativ beeinflussen und zu einem verstärkten Ausstrom von CTNNB führen würde [252]. Es wird vermutet, dass TCF/LEF unter anderen auch den nuklearen Transport von CTNNB vermitteln. Allerdings wurde auch berichtet, dass CTNNB unabhängig von anderen Faktoren oder einer nuklearen Lokalisationssequenz in den Nukleus translozieren kann, indem eine passive Interaktion mit Kernproteinen stattfindet [327]. Neben einer verringerten nuklearen Translokation und Retention von CTNNB tragen noch weitere Faktoren zu den niedrigen Leveln an CTNNB im Nukleus bei, indem sie dessen Export vermitteln. Dazu zählen unter anderem APC, AXIN und RANBP3 [327-329]. Darüber hinaus scheint APC auch als Chromatin-assoziiertes Suppressor von CTNNB Zielgenen aktiv zu sein, der den schrittweisen bzw. oszillierenden Austausch von Ko-Aktivatoren mit Ko-Repressoren vorantreibt [243,330,331]. Ob womöglich diese Faktoren die Aktivität von CTNNB im Nukleus der EZ des PC verhindern, muss weiter erforscht werden.

In den in dieser Arbeit charakterisierten, immortalisierten Endothelzellen wurde eine besonders niedrige Expression von *tcf/lef* festgestellt. Interessanterweise sind diese Faktoren nicht nur in den Endothelzellen des PC, sondern auch in der PC-Epithelzelllinie HIBPCP schwach exprimiert (Daten nicht gezeigt) [227,277,332]. Da diese Faktoren vermehrt im WNT-Signalweg eine Rolle spielen, und dieser in vielen Geweben, vor allem während der Embryogenese, aktiv ist, könnten die beobachteten niedrigen Expressionslevel auf eine Stilllegung der Gene durch epigenetische Mechanismen hindeuten. Viele Studien weisen jedoch auf eine Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs in diversen Erkrankungen

(allen voran Krebs) hin, die oftmals durch eine epigenetische Inaktivierung der Inhibitoren des WNT/ β -Catenin-Signalwegs entsteht [333]. Der Funktionsverlust negativer WNT-Regulatoren durch epigenetisches Gen-*Silencing*, sowohl durch DNA-Methylierung als auch durch Histonmodifikation der mit Tumorsuppressorgenen assoziierten Promotoren, trägt häufig zur Aktivierung der abnormen WNT/ β -Catenin-Signalübertragung in Tumoren bei [334].

Auch auf der Transkriptionsebene tragen viele epigenetische Aktivatoren und Regulatoren zu der Regulation von CTNNB bei. U.a. wurde berichtet, dass die lokale Rekrutierung von TCF/CTNNB zu weitreichenden Modifikationen des Chromatins führen kann [335]. Dabei ist allerdings nicht geklärt, ob die aktivierten Ko-Regulatoren simultan oder nacheinander agieren. In der Summe scheinen jedoch sowohl Ko-Aktivatoren als auch Ko-Repressoren während der CTNNB abhängigen Transkription aktiv zu sein und erschaffen so womöglich ein dynamisches Chromatimumfeld, um eine präzise Antwort auf den WNT-Stimulus zu generieren [139]. Eine epigenetische Analyse, wie zum Beispiel die Analyse der DNA-Methylierung oder eine Chromatin-Immünpräzipitation, könnte hier aufschlussreiche Ergebnisse liefern, ob auch in den EZ des PC die Aktivität ähnlicher Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren bei der Regulation von CTNNB involviert sind. In *Drosophila* wurden durch epigenetische Analysen die beiden Ko-Aktoren BCL9 und Pygo identifiziert, die für die CTNNB abhängige Transkription benötigt werden. Dabei ermöglicht das nuklear vorkommende Pygo die Rekrutierung und Zurückhaltung des CTNNB/BCL9 Komplexes im Nukleus und die Interaktion mit dem Mediator-Komplex, und scheint durch seine gemeinsame Bindung mit TCF an Chromatin-Loki bei der Rekrutierung vom CTNNB/BCL9 Komplex zu Beginn der Wg-Signalübermittlung zu helfen [336-340]. Außerdem bindet Pygo mit Hilfe seiner *plant homology domain* bei Interaktion mit BCL9 an dimethyliertes H3K4, weswegen spekuliert wird, dass Pygo/BCL9 an der Transition von Gen-*Silencing* zu WNT-induzierter Transkription beteiligt ist, indem entsprechende Histoncodes erkannt und so der Methylierungsstatus der WNT-Zielgene geändert werden [341]. Alternativ soll die Bindung an dimethyliertes H3K4 einen weiteren Ankermechanismus für CTNNB darstellen, sodass TCF aus dem Komplex dissoziieren und mit dem Inhibitor Groucho interagieren kann, um die Transkription von Zielgenen zu pausieren oder zu beenden [339,342,343]. Ebenso können Zielgene auch durch kompetitive Repression mittels Verdrängung von Transkriptionsaktivatoren durch CTNNB/TCF oder durch Bindung von CTNNB/TCF und weiterer Ko-Repressoren direkt unterdrückt werden [344-348].

Neben der geringen Expression von *lef1* wurden auch niedrige Level von *myc* in iHCPEnC detektiert (Daten nicht gezeigt). Kürzlich wurde publiziert, dass MYC für die Regulation der *lef1* Expression verantwortlich ist [254]. Dabei wurde beobachtet, dass MYC die Transkription von *lef1* aktiviert und dadurch wiederum die Zurückhaltung von CTNNB im Nukleus ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurden in den primären und den immortalisierten EZ niedrige Level an *lef1* beobachtet, was demnach in direktem Zusammenhang mit den geringen Expressionslevel von *myc* stehen könnte. Interessanterweise stellt *myc* ebenfalls ein Zielgen von LEF1 dar, das nach erfolgter Signaltransduktion via CTNNB aktiviert wird, sodass von einem komplexen Feedback-Loop ausgegangen werden kann [254]. Dementsprechend bieten sich weitere Untersuchungen zu den Auswirkungen von erhöhten MYC oder LEF1 Leveln auf die nukleare Translokation bzw. Retention von CTNNB an. Ebenfalls kann untersucht werden, ob durch Stimulation oder Transfektion der Zellen mit diesen Faktoren ein ausreichend großer Effekt erzielt werden kann, um die Transkription von Zielgenen anzuregen.

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass MYC neben LEF1 auch die Expression anderer Komponenten des WNT-Signalweges aktivieren kann, u.a. von *wnt2b*, *fzd6* und *lrp6* [254]. Daraus schlossen die Autoren, dass MYC nicht nur in der Lage ist, den Signalweg zu aktivieren, sondern dass es sich dabei um einen generellen Mechanismus in Zellen handelt, um den WNT-Signalweg zu regulieren. Dabei

würde MYC den größten Einfluss aller untersuchten Regulatoren auf LEF1 ausüben. Weiterhin wurde beobachtet, dass MYC in der Lage ist, die WNT-Inhibitoren DKK1 und sFRP1 in unterschiedlichen Brustkrebszelllinien zu unterdrücken und auf diese Weise den WNT-Signalweg zu aktivieren [349]. Dies belegt, dass MYC durch mehrere Mechanismen in die Regulation des WNT-Signalweges eingreift. Dazu zählt auch eine Studie, welche einen globalen Anstieg der mRNA cap-Methylierung nach Rekrutierung von *cyclin-dependent kinase 7* und *RNA (guanine-7-)-methyltransferase* an Promotoren durch Induktion des konditionalen Tet-MYC Vectors in P493-6 Zellen aufdeckte [266]. Darunter befanden sich unter anderem auch mRNAs von Proteinen innerhalb des WNT-Signalweges, wie *gsk3β*, *apc*, *lrp5*, *ctnnb1*, and *tcf7*, was zu ihrer erhöhten Transkription führte [266].

Von den möglichen Effekten von MYC und LEF1 auf die Aktivität des WNT-Signalweges abgesehen, wurde bereits vor einigen Jahren beschrieben, dass die alleinige Aktivität des WNT-Signalweges in Krebszellen womöglich nicht ausreicht, um eine optimale nukleare Translokation von CTNNB zu gewährleisten [254,350]. So wird beispielsweise die Phosphorylierung von LRP6 durch KRAS induziert, was letztendendes die Aktivierung des WNT-Signalweges einschließlich der nuklearen Translokation von CTNNB vorantreibt und so zur Zellmigration und zum Tumorwachstum beiträgt [350]. Außerdem wurde berichtet, dass zusätzlich zur Aktivierung des WNT-Signalweges auch die parallele Aktivierung der RAC1 GTPase benötigt wird, um eine nukleare Translokation von CTNNB zu induzieren [351]. Dabei bilden RAC1, JNK2 (*Jun N-terminal kinase 2*) und CTNNB einen cytoplasmischen Komplex, bei dem CTNNB von JNK2 an Serin 191 und 605 phosphoryliert wird und so die nukleare Translokation vorangetrieben wird. Anderen Studien zufolge soll RAC1 zusammen mit seinen *guanine nucleotide exchange factors* eine Rolle als Komponente des TCF/CTNNB Transkriptionskomplexes oder als antagonistischer Partner des AXIN-APC Komplexes spielen [352,353]. Auch Stimuli unabhängig von der WNT-Familie können Signale über CTNNB vermitteln und so die vaskuläre Permeabilität verändern. Dazu zählt Thrombin, das eine Neuverteilung von cadherin-gebundenen CTNNB ins Cytoplasma und den Nukleus bewirken kann [354,355]. *Lipid phosphate phosphatase 3* kann wiederum CTNNB Signale verstärken, sodass die Fibronektinsynthese, die Zellmigration von Endothelzellen und vaskuläre Vernetzungen verstärkt werden [356]. Diese Erkenntnisse implizieren, dass auch bei der Stimulation des WNT-Signalweges in den EZ des PC weitere regulatorische Elemente nötig sind, um eine optimale nukleare Translokation von CTNNB zu ermöglichen.

Eine weitere Ursache für die niedrige nukleare Translokation von CTNNB in iHCPEnC könnte die Lokalisation von CTNNB zu verschiedenen perinuklearen Strukturen sein. So wurde in MCF-7 Zellen eine Ko-Lokalisation von aktivem CTNNB mit Recyclingendosomen und dem Golgi demonstriert [252,357]. In dieser Dissertation konnte allerdings keine Ko-Lokalisation von CTNNB mit dem Golgi-Apparat oder endozytotischen Vesikeln in den EZ des PC nach Behandlung mit dem Inhibitor SB 216763 nachgewiesen werden. Es ist bereits bekannt, dass CTNNB durch den endozytotischen und makropinosomen Weg recycelt werden kann. In diesem Zusammenhang wurde in einer Studie mit A431 Plattenepithelkarzinomzellen gezeigt, dass CTNNB nach der Behandlung mit LiCl von dem „endozytotischen Recycling-Pool“ in der Nähe des Nukleus freigegeben wurde und so für eine direkte nukleare Translokation verfügbar war [358]. Bei dieser Freisetzung von CTNNB aus den Endosomen und anderen zytoplasmischen Strukturen in MCF-7 Zellen könnte WNT eine Rolle spielen [252]. Die Entschlüsselung der genaueren Mechanismen bedarf allerdings noch weiteren Untersuchungen, da beispielsweise die Endosomfaktoren Rab5 und Rab7a in Immunpräzipitationsexperimenten nicht als Bindepartner von CTNNB identifiziert wurden [252].

Neben der Ko-Lokalisation mit den Endosomen konnte in *Drosophila* und einigen Krebs Zelllinien auch eine Assoziation von CTNNB mit dem Golgi nachgewiesen werden [252,253,267,359]. Dementsprechend wurde eine Verbindung von CTNNB mit β -COP-positiven Transportvesikeln demonstriert [252]. Die Autoren vermuteten daher, dass CTNNB eine regulatorische Rolle in der Formation der COP I Vesikelhülle oder im Transport der kleinen COP I ausgekleideten Vesikel innerhalb des retrograden Transports zwischen Golgi und ER oder innerhalb des Golgis spielt [252]. Auch in *Drosophila* konnte eine Assoziation zwischen CTNNB und den Vesikeln des Golgi-Apparats beobachtet werden [253]. Daher könnte der Golgi einen Teil des zytoplasmischen CTNNB während des Vesikeltransports binden [252]. Dies könnte erklären, warum in iHCPEnC auch für CDH5 eine Lokalisation am Golgi detektiert wurde. Da für CDH5 neben CTNNA und CTNNC auch eine Interaktion mit CTNNB nachgewiesen wurde [256,257,261,262], könnte es über diese Bindung in die Vesikel des Golgi transportiert worden sein.

In der vorliegenden Studie wurde in SB 216763 stimulierten iHCPEnC CDH5 am Golgi lokalisiert detektiert. Eine weitere Arbeit hat gezeigt, dass die Golgi assoziierte Phospholipase A2 α (cPLA2 α) dazu beiträgt, neu synthetisiertes CDH5 zur Zelloberfläche zu transportieren [360,361]. Inhibition von cPLA2 α führte zur Disorganisation von CDH5 an der Plasmamembran und dessen Akkumulation in intrazellulären Vesikeln und dem Golgi. Diese Unterbrechung der Regulation von CDH5 führte wiederum zur Dissoziation von cPLA2 α vom Golgi. Ob die beobachtete Lokalisation von CDH5 im Golgi in SB 216763 stimulierten iHCPEnC durch Manipulation dieses Mechanismus einhergehend mit einem Verlust der Integrität der AJ verursacht wurde, oder ob es sich neu synthetisiertes CDH5 auf dem Weg zur Plasmamembran handelt, müsste mit Hilfe weiterer Studien geklärt werden.

4.2.4. Einfluss des kanonischen WNT-Signalweges auf die Expression von PLVAP

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass der WNT-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Vaskularisierung des Gehirns und der Ausbildung der BHS spielt [93,102,146,147,362,363]. Störungen dieses Signalweges durch Inhibition oder vermehrte Stimulation werden daher als signifikante Modulatoren der Gehirndurchblutung, der Gefäßpermeabilität von Gehirngefäßen und der Ausbildung der BHS sowohl in unterstützender als auch in schwächender Funktion betrachtet [93,102,146,147,362,363].

In vielen Fällen wird davon ausgegangen, dass die Signalübertragung über WNT-Proteine zwischen benachbarten Zellen im direkten Zell-Zellkontakt übermittelt wird [167-174]. Z.B. wurde nachgewiesen, dass Astrozyten WNT produzieren und dadurch die Architektur und Funktion der sogenannten Neurovaskulären Einheit regulieren [140]. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob eine solche Signalübertragung zwischen dem Endothel des PC und dem Epithel stattfindet. Ein vom Epithel ausgehendes Signal könnte über Vermittlung durch WNT-Proteine die Fenestrierung der Endothelzellen steuern. Für die Untersuchung solcher Interaktionen wäre ein Ko-Kulturmodell bestehend aus PC-Endothel (iHCPEnC) und -Epithel (HIBPCP Zellen) gut geeignet. In diesem Zusammenhang sind die in dieser Studie generierten Transkriptom-Daten von besonderem Interesse, da mit ihrer Hilfe Abweichungen der Genexpression in den iHCPEnC detektiert werden können, die durch Interaktion mit dem Epithel hervorgerufen werden. Andererseits können auch potenzielle Änderungen im Expressionsprofil der HIBPCP Zellen analysiert werden, welche durch Interaktion mit dem Endothel hervorgerufen werden.

Wie bereits angedeutet, scheint die Signalübertragung der WNT-Proteine in der Nähe des Ortes stattfinden, an dem sie produziert werden [174]. Die sowohl in den primären als auch den immortalisierten Zellen detektierten Expressionslevel einiger WNT-Liganden legen demnach nahe, dass WNT-Signale auch von den adulten EZ des PC übertragen werden. Allerdings ist das Ziel der Übertragung, bzw. deren Wirkung im PC, bisher nicht eindeutig bestimmt worden.

Sowohl für die BHS als auch die BRB wurde berichtet, dass die Angiogenese, die postnatale vaskuläre Maturation, sowie die Aufrechterhaltung der Barriereeigenschaften auch in adulten Zellen durch Mitwirken des WNT-Signalweges gewährleistet wird [76,102,213,218]. Dabei wird die Expression von PLVAP in den spezialisierten Gefäßbetten der BHS scheinbar über WNT und Notch Signalwege herunterreguliert [20,76,102-104,213,215-217]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Inhibition des WNT-Agonisten Norrin oder seines Interaktionspartners FZD4 die Barriereintegritäten der Retina und des Cerebellums durch reduzierte Expression von *cldn5* und erhöhte Expression von *plvap* stört [20]. Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass, abhängig von der betroffenen Region im ZNS, durch spezifische Regulierung des WNT-Signalweges unterschiedliche Endothel-Eigenschaften ausgeprägt werden [214]. Ähnlich wie PLVAP zur Erhaltung der Permeabilitätsbarriere zwischen der Hypophyse und den Gefäßen der BHS und einer damit verbundenen Regulation des Proteintransfers beiträgt, könnte der WNT-Signalweg im PC für eine beabsichtigte Steuerung der Permeabilität verantwortlich sein, anstatt die Barriere, wie bei einer Fehlfunktion in der BHS, zu beschädigen [22]. Dafür spricht, dass die Expression der unterschiedlichen Komponenten des WNT-Signalweges von der ZNS-Region abhängen und zur Ausbildung der für die entsprechende Region charakteristischen EZ-Eigenschaften beitragen soll [214]. Dies wird auch durch die Forschungen von Junge *et al.* und Hemler *et al.* unterstützt, die sich mit TSPAN12, einem Mitglied der Tetraspanin Proteinfamilie, befassen [140,364,365]. Die Autoren haben gezeigt, dass Norrin-Multimere zusammen mit TSPAN12 die Bildung von FZD4-Multimeren und die Aktivierung der nachfolgenden Signalübertragung fördern. Interessanterweise ist TSPAN12 besonders in EZ der Retina angereichert, jedoch in keinen anderen Gefäßtypen oder Zellen zu finden. Außerdem konnte TSPAN12 den WNT-Signalweg erst dann beeinflussen, nachdem dieser bereits durch den Agonisten Norrin initialisiert worden war [140]. Dadurch wird deutlich, dass WNT- bzw. CTNNB-abhängige Signalwege in Organ- und Zell-spezifischer Weise durch zusätzliche Faktoren reguliert werden können. Diese Daten legen nahe, dass auch im PC für eine spezifische Regulation des WNT-Signalweges weitere, bisher unidentifizierte, Faktoren eine Rolle spielen könnten, um die charakteristischen EZ der BLS auszubilden.

In diesem Zusammenhang stellt VEGF einen vielversprechenden Faktor dar, da Rezeptoren für VEGF in den adulten ruhenden EZ der BHS herunterreguliert sind [366]. Es wurde bereits nachgewiesen, dass VEGF unter pathogenen Konditionen die Ausbildung von fenestrierten EZ in der BHS oder der BBB durch erhöhte PLVAP Expression verursachen kann [66,70,73]. Dabei gab es wiederum Hinweise auf das Mitwirken anderer Proteine wie Caveolin-1 [217]. Auch die durch VEGF beeinflusste PLVAP-Expression ist möglicherweise abhängig von den umgebenden Geweben und damit Organen, und spezifisch für verschiedene Spezies [100,217]. Zum Beispiel ist eine spezifische Kombination unterschiedlicher VEGF nötig, um eine selektive Gefäßformation im myelenzephalen PC von Zebrafischen hervorzurufen [367]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine Behandlung von EZ mit VEGF die, durch HDAC7 unterbundene, nukleäre Translokation von CTNNB durch Induktion von HDAC7-Abbau wiederherstellen kann, sodass eine Aktivierung von Zielgenen stattfindet [140,368]. Eine bis zu 3 fache Erhöhung der Transkriptlevel von PLVAP und eine deutliche Zunahme an dessen Proteinmengen nach VEGF-Stimulation wurde in den iHCPEnC nachgewiesen [123]. Weiterhin wurden in iHCPEnC nach VEGF-Behandlung erhöhte Mengen an PLVAP in Immunfluoreszenzanalysen detektiert, und vergleichbare bis stärker ausgeprägte Effekte wurden durch Behandlung mit PMA erreicht [123]. Diese

Beobachtungen legen nahe, dass VEGF die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hemmung der nukleären Translokation von CTNNB bei Induktion des WNT-Signalweges wiederherstellen, und so als weiteres Bindeglied in der Regulation der EZ des PC fungieren kann. Dabei ist in Betracht zu ziehen, dass VEGF von den umgebenden Zellen bzw. Gewebe produziert und sekretiert wird, ähnlich der Produktion und Sekretion von WNT durch Astrozyten an der BHS [140].

V. Ausblick

Die Grundstruktur der inneren BLS bildet der in den Ventrikeln des Gehirns lokalisierte PC, eine hoch vaskularisierte Struktur aus unterschiedlichen Zelltypen, die für die Produktion des Liquors verantwortlich ist und entscheidend zu der Entwicklung des Gehirns beiträgt. Im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten des ZNS wurde ein Zusammenbruch der BLS sowie, bei Infektionserkrankungen, eine Invasion über den PC beschrieben. [120,222-225]. Zur Erforschung dieser Krankheiten wurden bisher Tiermodelle und *in vitro* Modellsysteme, welche, wie z.B. die Zelllinie HIBPCP, auf epithelialen Zellen des PC basieren, eingesetzt [118,136,226,227,269,271,272]. Allerdings konnte mit Hilfe aktueller Forschungen, neben dem Epithel des PC, auch den im PC lokalisierten EZ ein Beitrag zur BLS nachgewiesen werden [11]. Eine in unserem Labor neu generierte Zelllinie (iHCPeNC) basiert auf immortalisierten PC-Endothelzellen, ist die einzige beschriebene Endothelzelllinie des PC, und kann daher einen wertvollen Beitrag zur Erforschung der BLS liefern. Mithilfe von Transkriptomanalysen konnte eine große Ähnlichkeit zwischen den primären EZ des PC und den auf ihnen basierenden iHCPeNC nachgewiesen und somit die Eignung der iHCPeNC als Modell für die EZ des PC unterstützt werden. Die mit Hilfe der iHCPeNC gewonnenen Transkriptomdaten bilden eine Grundlage für weitere Forschungsansätze. So können die Auswirkungen verschiedener Interaktionen und Stimuli untersucht werden. Dazu zählen beispielsweise Interaktionen der iHCPeNC mit Epithelzellen des PC. Hierfür würde sich ein Zwei-Zelltyp-Modell aus iHCPeNC und HIBPCP anbieten, welches in unserer Arbeitsgruppe bereits entwickelt wurde [123]. Mit Hilfe dieses Modelles kann ein mehr der *in vivo* Situation entsprechendes Modell des PC *in vitro* dargestellt werden, wodurch auch der Anteil an benötigten Tierversuchen zur Erforschung von komplexen Interaktionen zwischen den Zellen des PC reduziert werden könnte. Ebenfalls können in diesem Modell Auswirkungen von Infektionen, die durch Pathogene wie Bakterien oder Viren ausgelöst werden, untersucht werden. In den EZ des PC werden viele ABC-Transporter und *Solute-Carrier* exprimiert, die ebenfalls an der basolateralen Seite der EPZ lokalisiert sind [240-242]. Substanzen oder Medikamente, die über die BLS in das CSF gelangen, können schnell im ZNS verteilt werden. Die in dieser Arbeit ermittelten Transkriptomdaten sowie bereits publizierte Transkriptomdaten aus Epithelzellen des PC [226,270,272,332,369,370] können helfen Studien zu generieren, welche die Interaktion und den Transport von Substanzen und Medikamenten am PC untersuchen. Eine weitere Anwendung der iHCPeNC ist die Erforschung der Regulation der Permeabilität von PC-Kapillaren durch WNT/ β -Catenin-Signalübertragung. In dieser Arbeit wurde bereits nachgewiesen, dass die Komponenten dieses Signalweges auch in ausdifferenzierten EZ des PC (primäre Zellen und iHCPeNC) exprimiert werden. Nach Stimulation des WNT-Signalweges konnte allerdings nur eine geringfügige nukleare Translokation von CTNNB festgestellt werden. Es ist zu klären, ob durch zusätzliche Stimulation mit LEF1 und/ oder VEGF die Rate der nuklearen Translokation von CTNNB erhöht werden kann. In der Folge könnten PCR-Analysen die Regulierung der Expression von WNT-Zielgenen überwachen, um festzustellen, ob die Stimulation des WNT-Signalweges einen Einfluss auf die Expression von PLVAP in den EZ und damit auf die Permeabilität der Gefäße und die Funktion der BLS hat.

VI. Referenzen

1. Cao, B.; Bray, F.; Ilbawi, A.; Soerjomataram, I. Effect on longevity of one-third reduction in premature mortality from non-communicable diseases by 2030: a global analysis of the Sustainable Development Goal health target. *Lancet Glob Health* **2018**, *6*, e1288-e1296, doi:10.1016/S2214-109X(18)30411-X.
2. Collaborators, G.B.D.C.o.D. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1736-1788, doi:10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
3. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **2018**, *68*, 394-424, doi:10.3322/caac.21492.
4. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249-257, doi:10.1038/35025220.
5. Yu, J.; Bergaya, S.; Murata, T.; Alp, I.F.; Bauer, M.P.; Lin, M.I.; Drab, M.; Kurzchalia, T.V.; Stan, R.V.; Sessa, W.C. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest* **2006**, *116*, 1284-1291, doi:10.1172/JCI27100.
6. Schimmel, L.; Heemskerk, N.; van Buul, J.D. Leukocyte transendothelial migration: A local affair. *Small GTPases* **2017**, *8*, 1-15, doi:10.1080/21541248.2016.1197872.
7. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883-899, doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
8. Nourshargh, S.; Hordijk, P.L.; Sixt, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11*, 366-378, doi:10.1038/nrm2889.
9. Przysinda, A.; Feng, W.; Li, G. Diversity of Organism-Wide and Organ-Specific Endothelial Cells. *Curr Cardiol Rep* **2020**, *22*, 19, doi:10.1007/s11886-020-1275-9.
10. Aird, W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* **2007**, *100*, 158-173, doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a.
11. Augustin, H.G.; Koh, G.Y. Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. *Science* **2017**, *357*, doi:10.1126/science.aal2379.
12. Auvinen, K.; Lokka, E.; Mokka, E.; Jappinen, N.; Tyystjarvi, S.; Saine, H.; Peurla, M.; Shetty, S.; Elima, K.; Rantakari, P., et al. Fenestral diaphragms and PLVAP associations in liver sinusoidal endothelial cells are developmentally regulated. *Sci Rep* **2019**, *9*, 15698, doi:10.1038/s41598-019-52068-x.
13. Bosma, E.K.; van Noorden, C.J.F.; Schlingemann, R.O.; Klaassen, I. The role of plasmalemma vesicle-associated protein in pathological breakdown of blood-brain and blood-retinal barriers: potential novel therapeutic target for cerebral edema and diabetic macular edema. *Fluids Barriers CNS* **2018**, *15*, 24, doi:10.1186/s12987-018-0109-2.
14. Tse, D.; Stan, R.V. Morphological heterogeneity of endothelium. *Semin Thromb Hemost* **2010**, *36*, 236-245, doi:10.1055/s-0030-1253447.
15. Aird, W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* **2007**, *100*, 174-190, doi:10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae.
16. Kisch, B. Electron microscopy of the capillary wall. *Exp Med Surg* **1956**, *14*, 113-121.
17. Okada, H.; Takemura, G.; Suzuki, K.; Oda, K.; Takada, C.; Hotta, Y.; Miyazaki, N.; Tsujimoto, A.; Muraki, I.; Ando, Y., et al. Three-dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and experimental endotoxemic conditions. *Crit Care* **2017**, *21*, 261, doi:10.1186/s13054-017-1841-8.
18. Rhodin, J. Electron microscopy of the glomerular capillary wall. *Exp Cell Res* **1955**, *8*, 572-574, doi:10.1016/0014-4827(55)90136-1.
19. Wisse, E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res* **1970**, *31*, 125-150, doi:10.1016/s0022-5320(70)90150-4.

20. Zhou, Y.; Wang, Y.; Tischfield, M.; Williams, J.; Smallwood, P.M.; Rattner, A.; Taketo, M.M.; Nathans, J. Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *J Clin Invest* **2014**, *124*, 3825-3846, doi:10.1172/JCI76431.
21. Filippini, A.; Sica, G.; D'Alessio, A. The caveolar membrane system in endothelium: From cell signaling to vascular pathology. *J Cell Biochem* **2018**, *119*, 5060-5071, doi:10.1002/jcb.26793.
22. Gordon, L.; Blechman, J.; Shimoni, E.; Gur, D.; Anand-Apte, B.; Levkowitz, G. The fenestrae-associated protein Plvap regulates the rate of blood-borne protein passage into the hypophysis. *Development* **2019**, *146*, doi:10.1242/dev.177790.
23. Razani, B.; Woodman, S.E.; Lisanti, M.P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* **2002**, *54*, 431-467, doi:10.1124/pr.54.3.431.
24. Anderson, R.G.; Kamen, B.A.; Rothberg, K.G.; Lacey, S.W. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **1992**, *255*, 410-411, doi:10.1126/science.1310359.
25. Fielding, P.E.; Fielding, C.J. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* **1995**, *34*, 14288-14292, doi:10.1021/bi00044a004.
26. Palade, G.E. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* **1953**, *1*, 188-211, doi:10.1177/1.4.188.
27. Rothberg, K.G.; Heuser, J.E.; Donzell, W.C.; Ying, Y.S.; Glenney, J.R.; Anderson, R.G. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **1992**, *68*, 673-682, doi:10.1016/0092-8674(92)90143-z.
28. Schnitzer, J.E.; Oh, P.; McIntosh, D.P. Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. *Science* **1996**, *274*, 239-242, doi:10.1126/science.274.5285.239.
29. Simionescu, N. Cellular aspects of transcapillary exchange. *Physiol Rev* **1983**, *63*, 1536-1579, doi:10.1152/physrev.1983.63.4.1536.
30. Smart, E.J.; Ying, Y.; Donzell, W.C.; Anderson, R.G. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 29427-29435, doi:10.1074/jbc.271.46.29427.
31. Stan, R.V. Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1746*, 334-348, doi:10.1016/j.bbamcr.2005.08.008.
32. Yamada, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* **1955**, *1*, 445-458, doi:10.1083/jcb.1.5.445.
33. Chang, W.J.; Ying, Y.S.; Rothberg, K.G.; Hooper, N.M.; Turner, A.J.; Gambliel, H.A.; De Gunzburg, J.; Mumby, S.M.; Gilman, A.G.; Anderson, R.G. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J Cell Biol* **1994**, *126*, 127-138, doi:10.1083/jcb.126.1.127.
34. Lisanti, M.P.; Scherer, P.E.; Tang, Z.; Sargiacomo, M. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* **1994**, *4*, 231-235, doi:10.1016/0962-8924(94)90114-7.
35. Lisanti, M.P.; Scherer, P.E.; Vidugiriene, J.; Tang, Z.; Hermanowski-Vosatka, A.; Tu, Y.H.; Cook, R.F.; Sargiacomo, M. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* **1994**, *126*, 111-126, doi:10.1083/jcb.126.1.111.
36. Lisanti, M.P.; Tang, Z.; Scherer, P.E.; Kubler, E.; Koleske, A.J.; Sargiacomo, M. Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. *Mol Membr Biol* **1995**, *12*, 121-124, doi:10.3109/09687689509038506.
37. Sargiacomo, M.; Sudol, M.; Tang, Z.; Lisanti, M.P. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* **1993**, *122*, 789-807, doi:10.1083/jcb.122.4.789.
38. Scherer, P.E.; Lewis, R.Y.; Volonte, D.; Engelman, J.A.; Galbiati, F.; Couet, J.; Kohtz, D.S.; van Donselaar, E.; Peters, P.; Lisanti, M.P. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 29337-29346, doi:10.1074/jbc.272.46.29337.

39. Tang, Z.; Scherer, P.E.; Okamoto, T.; Song, K.; Chu, C.; Kohtz, D.S.; Nishimoto, I.; Lodish, H.F.; Lisanti, M.P. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 2255-2261, doi:10.1074/jbc.271.4.2255.
40. Hamilton, B.J.; Tse, D.; Stan, R.V. Phorbol esters induce PLVAP expression via VEGF and additional secreted molecules in MEK1-dependent and p38, JNK and PI3K/Akt-independent manner. *J Cell Mol Med* **2019**, *23*, 920-933, doi:10.1111/jcmm.13993.
41. Herrnberger, L.; Hennig, R.; Kremer, W.; Hellerbrand, C.; Goepferich, A.; Kalbitzer, H.R.; Tamm, E.R. Formation of fenestrae in murine liver sinusoids depends on plasmalemma vesicle-associated protein and is required for lipoprotein passage. *PLoS One* **2014**, *9*, e115005, doi:10.1371/journal.pone.0115005.
42. Herrnberger, L.; Seitz, R.; Kuespert, S.; Bosl, M.R.; Fuchshofer, R.; Tamm, E.R. Lack of endothelial diaphragms in fenestrae and caveolae of mutant Plvap-deficient mice. *Histochem Cell Biol* **2012**, *138*, 709-724, doi:10.1007/s00418-012-0987-3.
43. Rippe, B.; Rosengren, B.I.; Carlsson, O.; Venturoli, D. Transendothelial transport: the vesicle controversy. *J Vasc Res* **2002**, *39*, 375-390, doi:10.1159/000064521.
44. Aird, W.C. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2*, a006429, doi:10.1101/cshperspect.a006429.
45. Simionescu, N.; Simionescu, M.; Palade, G.E. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites. *J Cell Biol* **1981**, *90*, 605-613, doi:10.1083/jcb.90.3.605.
46. Sarin, H. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J Angiogenesis Res* **2010**, *2*, 14, doi:10.1186/2040-2384-2-14.
47. Simionescu, M.; Simionescu, N.; Silbert, J.E.; Palade, G.E. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. II. Partial characterization of their anionic sites. *J Cell Biol* **1981**, *90*, 614-621, doi:10.1083/jcb.90.3.614.
48. Stan, R.V.; Kubitza, M.; Palade, G.E. PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 13203-13207, doi:10.1073/pnas.96.23.13203.
49. Stan, R.V.; Tse, D.; Deharvengt, S.J.; Smits, N.C.; Xu, Y.; Luciano, M.R.; McGarry, C.L.; Buitendijk, M.; Nemani, K.V.; Elgueta, R., et al. The diaphragms of fenestrated endothelia: gatekeepers of vascular permeability and blood composition. *Dev Cell* **2012**, *23*, 1203-1218, doi:10.1016/j.devcel.2012.11.003.
50. Deharvengt, S.J.; Tse, D.; Sideleva, O.; McGarry, C.; Gunn, J.R.; Longnecker, D.S.; Carriere, C.; Stan, R.V. PV1 down-regulation via shRNA inhibits the growth of pancreatic adenocarcinoma xenografts. *J Cell Mol Med* **2012**, *16*, 2690-2700, doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01587.x.
51. Guo, L.; Zhang, H.; Hou, Y.; Wei, T.; Liu, J. Plasmalemma vesicle-associated protein: A crucial component of vascular homeostasis. *Exp Ther Med* **2016**, *12*, 1639-1644, doi:10.3892/etm.2016.3557.
52. Stan, R.V.; Arden, K.C.; Palade, G.E. cDNA and protein sequence, genomic organization, and analysis of cis regulatory elements of mouse and human PLVAP genes. *Genomics* **2001**, *72*, 304-313, doi:10.1006/geno.2000.6489.
53. Stan, R.V.; Ghitescu, L.; Jacobson, B.S.; Palade, G.E. Isolation, cloning, and localization of rat PV-1, a novel endothelial caveolar protein. *J Cell Biol* **1999**, *145*, 1189-1198, doi:10.1083/jcb.145.6.1189.
54. Keuschnigg, J.; Henttinen, T.; Auvinen, K.; Karikoski, M.; Salmi, M.; Jalkanen, S. The prototype endothelial marker PAL-E is a leukocyte trafficking molecule. *Blood* **2009**, *114*, 478-484, doi:10.1182/blood-2008-11-188763.
55. Hallmann, R.; Mayer, D.N.; Berg, E.L.; Broermann, R.; Butcher, E.C. Novel mouse endothelial cell surface marker is suppressed during differentiation of the blood brain barrier. *Dev Dyn* **1995**, *202*, 325-332, doi:10.1002/aja.1002020402.

56. Niemela, H.; Elima, K.; Henttinen, T.; Irjala, H.; Salmi, M.; Jalkanen, S. Molecular identification of PAL-E, a widely used endothelial-cell marker. *Blood* **2005**, *106*, 3405-3409, doi:10.1182/blood-2005-01-0254.
57. Stan, R.V. Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis. *J Cell Mol Med* **2007**, *11*, 621-643, doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00075.x.
58. Leppink, D.M.; Bishop, D.K.; Sedmak, D.D.; Henry, M.L.; Ferguson, R.M.; Streeter, P.R.; Butcher, E.C.; Orosz, C.G. Inducible expression of an endothelial cell antigen on murine myocardial vasculature in association with interstitial cellular infiltration. *Transplantation* **1989**, *48*, 874-877, doi:10.1097/00007890-198911000-00032.
59. Schlingemann, R.O.; Dingjan, G.M.; Emeis, J.J.; Blok, J.; Warnaar, S.O.; Ruiter, D.J. Monoclonal antibody PAL-E specific for endothelium. *Lab Invest* **1985**, *52*, 71-76.
60. Hofman, P.; Hoyng, P.; vanderWerf, F.; Vrensen, G.F.; Schlingemann, R.O. Lack of blood-brain barrier properties in microvessels of the prelaminar optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2001**, *42*, 895-901.
61. Schlingemann, R.O.; Hofman, P.; Anderson, L.; Troost, D.; van der Gaag, R. Vascular expression of endothelial antigen PAL-E indicates absence of blood-ocular barriers in the normal eye. *Ophthalmic Res* **1997**, *29*, 130-138, doi:10.1159/000268007.
62. Schlingemann, R.O.; Hofman, P.; Klooster, J.; Blaauwgeers, H.G.; Van der Gaag, R.; Vrensen, G.F. Ciliary muscle capillaries have blood-tissue barrier characteristics. *Exp Eye Res* **1998**, *66*, 747-754, doi:10.1006/exer.1998.0483.
63. Schlingemann, R.O.; Rietveld, F.J.; Kwaspen, F.; van de Kerkhof, P.C.; de Waal, R.M.; Ruiter, D.J. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol* **1991**, *138*, 1335-1347.
64. Ioannidou, S.; Deinhardt, K.; Miotla, J.; Bradley, J.; Cheung, E.; Samuelsson, S.; Ng, Y.S.; Shima, D.T. An in vitro assay reveals a role for the diaphragm protein PV-1 in endothelial fenestra morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 16770-16775, doi:10.1073/pnas.0603501103.
65. Stan, R.V.; Tkachenko, E.; Niesman, I.R. PV1 is a key structural component for the formation of the stomatal and fenestral diaphragms. *Mol Biol Cell* **2004**, *15*, 3615-3630, doi:10.1091/mbc.e03-08-0593.
66. Carson-Walter, E.B.; Hampton, J.; Shue, E.; Geynisman, D.M.; Pillai, P.K.; Sathanoori, R.; Madden, S.L.; Hamilton, R.L.; Walter, K.A. Plasmalemmal vesicle associated protein-1 is a novel marker implicated in brain tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 7643-7650, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1099.
67. Liu, Y.; Carson-Walter, E.B.; Cooper, A.; Winans, B.N.; Johnson, M.D.; Walter, K.A. Vascular gene expression patterns are conserved in primary and metastatic brain tumors. *J Neurooncol* **2010**, *99*, 13-24, doi:10.1007/s11060-009-0105-0.
68. Madden, S.L.; Cook, B.P.; Nacht, M.; Weber, W.D.; Callahan, M.R.; Jiang, Y.; Dufault, M.R.; Zhang, X.; Zhang, W.; Walter-Yohrling, J., et al. Vascular gene expression in nonneoplastic and malignant brain. *Am J Pathol* **2004**, *165*, 601-608, doi:10.1016/s0002-9440(10)63324-x.
69. Minshall, R.D.; Malik, A.B. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb Exp Pharmacol* **2006**, 10.1007/3-540-32967-6_4, 107-144, doi:10.1007/3-540-32967-6_4.
70. Hofman, P.; Blaauwgeers, H.G.; Vrensen, G.F.; Schlingemann, R.O. Role of VEGF-A in endothelial phenotypic shift in human diabetic retinopathy and VEGF-A-induced retinopathy in monkeys. *Ophthalmic Res* **2001**, *33*, 156-162, doi:10.1159/000055663.
71. Leenstra, S.; Troost, D.; Das, P.K.; Claessen, N.; Becker, A.E.; Bosch, D.A. Endothelial cell marker PAL-E reactivity in brain tumor, developing brain, and brain disease. *Cancer* **1993**, *72*, 3061-3067, doi:10.1002/1097-0142(19931115)72:10<3061::aid-cncr2820721031>3.0.co;2-6.
72. Schlingemann, R.O.; Hofman, P.; Vrensen, G.F.; Blaauwgeers, H.G. Increased expression of endothelial antigen PAL-E in human diabetic retinopathy correlates with microvascular leakage. *Diabetologia* **1999**, *42*, 596-602, doi:10.1007/s001250051200.

-
73. Shue, E.H.; Carson-Walter, E.B.; Liu, Y.; Winans, B.N.; Ali, Z.S.; Chen, J.; Walter, K.A. Plasmalemmal vesicle associated protein-1 (PV-1) is a marker of blood-brain barrier disruption in rodent models. *BMC Neurosci* **2008**, *9*, 29, doi:10.1186/1471-2202-9-29.
 74. Klaassen, I.; Hughes, J.M.; Vogels, I.M.; Schalkwijk, C.G.; Van Noorden, C.J.; Schlingemann, R.O. Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Exp Eye Res* **2009**, *89*, 4-15, doi:10.1016/j.exer.2009.01.006.
 75. Mozer, A.B.; Whittemore, S.R.; Benton, R.L. Spinal microvascular expression of PV-1 is associated with inflammation, perivascular astrocyte loss, and diminished EC glucose transport potential in acute SCI. *Curr Neurovasc Res* **2010**, *7*, 238-250, doi:10.2174/156720210792231840.
 76. Schafer, N.F.; Luhmann, U.F.; Feil, S.; Berger, W. Differential gene expression in Ndph-knockout mice in retinal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2009**, *50*, 906-916, doi:10.1167/iovs.08-1731.
 77. Wang, Y.H.; Cheng, T.Y.; Chen, T.Y.; Chang, K.M.; Chuang, V.P.; Kao, K.J. Plasmalemmal Vesicle Associated Protein (PLVAP) as a therapeutic target for treatment of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 815, doi:10.1186/1471-2407-14-815.
 78. Wisniewska-Kruk, J.; Hoeben, K.A.; Vogels, I.M.; Gaillard, P.J.; Van Noorden, C.J.; Schlingemann, R.O.; Klaassen, I. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Exp Eye Res* **2012**, *96*, 181-190, doi:10.1016/j.exer.2011.12.003.
 79. Wisniewska-Kruk, J.; Klaassen, I.; Vogels, I.M.; Magno, A.L.; Lai, C.M.; Van Noorden, C.J.; Schlingemann, R.O.; Rakoczy, E.P. Molecular analysis of blood-retinal barrier loss in the Akimba mouse, a model of advanced diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* **2014**, *122*, 123-131, doi:10.1016/j.exer.2014.03.005.
 80. Yamamoto, I.; Horita, S.; Takahashi, T.; Tanabe, K.; Fuchinoue, S.; Teraoka, S.; Hattori, M.; Yamaguchi, Y. Glomerular expression of plasmalemmal vesicle-associated protein-1 in patients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* **2007**, *7*, 1954-1960, doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01876.x.
 81. Hnasko, R.; McFarland, M.; Ben-Jonathan, N. Distribution and characterization of plasmalemma vesicle protein-1 in rat endocrine glands. *J Endocrinol* **2002**, *175*, 649-661, doi:10.1677/joe.0.1750649.
 82. Stan, R.V. Multiple PV1 dimers reside in the same stomatal or fenestral diaphragm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2004**, *286*, H1347-1353, doi:10.1152/ajpheart.00909.2003.
 83. Couet, J.; Li, S.; Okamoto, T.; Ikezu, T.; Lisanti, M.P. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 6525-6533, doi:10.1074/jbc.272.10.6525.
 84. Bearer, E.L.; Orci, L. Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study. *J Cell Biol* **1985**, *100*, 418-428, doi:10.1083/jcb.100.2.418.
 85. Rantakari, P.; Auvinen, K.; Jappinen, N.; Kapraali, M.; Valtonen, J.; Karikoski, M.; Gerke, H.; Iftakhar, E.K.I.; Keuschnigg, J.; Umemoto, E., et al. The endothelial protein PLVAP in lymphatics controls the entry of lymphocytes and antigens into lymph nodes. *Nat Immunol* **2015**, *16*, 386-396, doi:10.1038/ni.3101.
 86. Risau, W.; Wolburg, H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* **1990**, *13*, 174-178, doi:10.1016/0166-2236(90)90043-a.
 87. Saunders, N.R.; Liddelow, S.A.; Dziegielewska, K.M. Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol* **2012**, *3*, 46, doi:10.3389/fphar.2012.00046.
 88. Chen, Y.A.; Scheller, R.H. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*, 98-106, doi:10.1038/35052017.
 89. Fra, A.M.; Williamson, E.; Simons, K.; Parton, R.G. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 8655-8659, doi:10.1073/pnas.92.19.8655.
 90. Praefcke, G.J.; McMahon, H.T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 133-147, doi:10.1038/nrm1313.

91. van der Wijk, A.E.; Wisniewska-Kruk, J.; Vogels, I.M.C.; van Veen, H.A.; Ip, W.F.; van der Wel, N.N.; van Noorden, C.J.F.; Schlingemann, R.O.; Klaassen, I. Expression patterns of endothelial permeability pathways in the development of the blood-retinal barrier in mice. *FASEB J* **2019**, *33*, 5320-5333, doi:10.1096/fj.201801499RRR.
92. Daneman, R.; Zhou, L.; Kebede, A.A.; Barres, B.A. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* **2010**, *468*, 562-566, doi:10.1038/nature09513.
93. Liebner, S.; Plate, K.H. Differentiation of the brain vasculature: the answer came blowing by the Wnt. *J Angiogenesis Res* **2010**, *2*, 1, doi:10.1186/2040-2384-2-1.
94. Umans, R.A.; Henson, H.E.; Mu, F.; Parupalli, C.; Ju, B.; Peters, J.L.; Lanham, K.A.; Plavicki, J.S.; Taylor, M.R. CNS angiogenesis and barrierogenesis occur simultaneously. *Dev Biol* **2017**, *425*, 101-108, doi:10.1016/j.ydbio.2017.03.017.
95. Wisniewska-Kruk, J.; van der Wijk, A.E.; van Veen, H.A.; Gorgels, T.G.; Vogels, I.M.; Versteeg, D.; Van Noorden, C.J.; Schlingemann, R.O.; Klaassen, I. Plasmalemma Vesicle-Associated Protein Has a Key Role in Blood-Retinal Barrier Loss. *Am J Pathol* **2016**, *186*, 1044-1054, doi:10.1016/j.ajpath.2015.11.019.
96. Klaassen, I.; Van Noorden, C.J.; Schlingemann, R.O. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res* **2013**, *34*, 19-48, doi:10.1016/j.preteyeres.2013.02.001.
97. Witmer, A.N.; Blaauwgeers, H.G.; Weich, H.A.; Alitalo, K.; Vrensen, G.F.; Schlingemann, R.O. Altered expression patterns of VEGF receptors in human diabetic retina and in experimental VEGF-induced retinopathy in monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2002**, *43*, 849-857.
98. Elkadri, A.; Thoeni, C.; Deharvengt, S.J.; Murchie, R.; Guo, C.; Stavropoulos, J.D.; Marshall, C.R.; Wales, P.; Bandsma, R.; Cutz, E., et al. Mutations in Plasmalemma Vesicle Associated Protein Result in Sieving Protein-Losing Enteropathy Characterized by Hypoproteinemia, Hypoalbuminemia, and Hypertriglyceridemia. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2015**, *1*, 381-394 e387, doi:10.1016/j.jcmgh.2015.05.001.
99. Bodor, C.; Nagy, J.P.; Vegh, B.; Nemeth, A.; Jenei, A.; MirzaHosseini, S.; Sebe, A.; Rosivall, L. Angiotensin II increases the permeability and PV-1 expression of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2012**, *302*, C267-276, doi:10.1152/ajpcell.00138.2011.
100. Strickland, L.A.; Jubb, A.M.; Hongo, J.A.; Zhong, F.; Burwick, J.; Fu, L.; Frantz, G.D.; Koepfen, H. Plasmalemmal vesicle-associated protein (PLVAP) is expressed by tumour endothelium and is upregulated by vascular endothelial growth factor-A (VEGF). *J Pathol* **2005**, *206*, 466-475, doi:10.1002/path.1805.
101. Chen, J.; Stahl, A.; Krah, N.M.; Seaward, M.R.; Joyal, J.S.; Juan, A.M.; Hatton, C.J.; Aderman, C.M.; Dennison, R.J.; Willett, K.L., et al. Retinal expression of Wnt-pathway mediated genes in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (Lrp5) knockout mice. *PLoS One* **2012**, *7*, e30203, doi:10.1371/journal.pone.0030203.
102. Liebner, S.; Corada, M.; Bangsow, T.; Babbage, J.; Taddei, A.; Czupalla, C.J.; Reis, M.; Felici, A.; Wolburg, H.; Fruttiger, M., et al. Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **2008**, *183*, 409-417, doi:10.1083/jcb.200806024.
103. Farber, G.; Hurtado, R.; Loh, S.; Monette, S.; Mtui, J.; Kopan, R.; Quaggin, S.; Meyer-Schwesinger, C.; Herzlinger, D.; Scott, R.P., et al. Glomerular endothelial cell maturation depends on ADAM10, a key regulator of Notch signaling. *Angiogenesis* **2018**, *21*, 335-347, doi:10.1007/s10456-018-9599-4.
104. Mintet, E.; Lavigne, J.; Paget, V.; Tarlet, G.; Buard, V.; Guipaud, O.; Sabourin, J.C.; Iruela-Arispe, M.L.; Milliat, F.; Francois, A. Endothelial Hey2 deletion reduces endothelial-to-mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice. *Sci Rep* **2017**, *7*, 4933, doi:10.1038/s41598-017-05389-8.
105. Wasserman, S.M.; Mehraban, F.; Komuves, L.G.; Yang, R.B.; Tomlinson, J.E.; Zhang, Y.; Spriggs, F.; Topper, J.N. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiol Genomics* **2002**, *12*, 13-23, doi:10.1152/physiolgenomics.00102.2002.

106. Del Maestro, R.F. Leonardo da Vinci: the search for the soul. *J Neurosurg* **1998**, *89*, 874-887, doi:10.3171/jns.1998.89.5.0874.
107. Goldmann, E. Vitalfärbung am Zentralnervensystem: Beitrag zur Physiopathologie des Plexus choriodeus und der Hirnhäute. *Abh. preuss. Akad. Wiss., phys.-math. Kl* **1913**.
108. Ellwanger, K.; Saito, H.; Clement-Lacroix, P.; Maltry, N.; Niedermeyer, J.; Lee, W.K.; Baron, R.; Rawadi, G.; Westphal, H.; Niehrs, C. Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol* **2008**, *28*, 4875-4882, doi:10.1128/MCB.00222-08.
109. Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.; Dolman, D.E.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* **2010**, *37*, 13-25, doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.
110. Daneman, R.; Prat, A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2015**, *7*, a020412, doi:10.1101/cshperspect.a020412.
111. Kim, K.S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol* **2008**, *6*, 625-634, doi:10.1038/nrmicro1952.
112. Bauer, H.C.; Krizbai, I.A.; Bauer, H.; Traweger, A. "You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier. *Front Neurosci* **2014**, *8*, 392, doi:10.3389/fnins.2014.00392.
113. Wolburg, H.; Lippoldt, A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* **2002**, *38*, 323-337, doi:10.1016/s1537-1891(02)00200-8.
114. Hawkins, R.A.; O'Kane, R.L.; Simpson, I.A.; Vina, J.R. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr* **2006**, *136*, 218S-226S, doi:10.1093/jn/136.1.218S.
115. Abbott, N.J.; Ronnback, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **2006**, *7*, 41-53, doi:10.1038/nrn1824.
116. Sweeney, M.D.; Zhao, Z.; Montagne, A.; Nelson, A.R.; Zlokovic, B.V. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev* **2019**, *99*, 21-78, doi:10.1152/physrev.00050.2017.
117. Tietz, S.; Engelhardt, B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol* **2015**, *209*, 493-506, doi:10.1083/jcb.201412147.
118. Borkowski, J.; Schrotten, H.; Schwerk, C. Interactions and Signal Transduction Pathways Involved during Central Nervous System Entry by Neisseria meningitidis across the Blood-Brain Barriers. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21228788.
119. Liddelow, S.A. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Front Neurosci* **2015**, *9*, 32, doi:10.3389/fnins.2015.00032.
120. Wolburg, H.; Paulus, W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **2010**, *119*, 75-88, doi:10.1007/s00401-009-0627-8.
121. Engelhardt, B.; Wolburg-Buchholz, K.; Wolburg, H. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc Res Tech* **2001**, *52*, 112-129, doi:10.1002/1097-0029(20010101)52:1<112::AID-JEMT13>3.0.CO;2-5.
122. Carloni, S.; Bertocchi, A.; Mancinelli, S.; Bellini, M.; Erreni, M.; Borreca, A.; Braga, D.; Giugliano, S.; Mozzarelli, A.M.; Manganaro, D., et al. Identification of a choroid plexus vascular barrier closing during intestinal inflammation. *Science* **2021**, *374*, 439-448, doi:10.1126/science.abc6108.
123. Muranyi, W.; Schwerk, C.; Herold, R.; Stump-Guthier, C.; Lampe, M.; Fallier-Becker, P.; Weiß, C.; Sticht, C.; Ishikawa, H.; Schrotten, H. Immortalized human choroid plexus endothelial cells enable an advanced endothelial-epithelial two-cell type in vitro model of the choroid plexus. *iScience* **2022**, 104383.
124. Narita, K.; Takeda, S. Cilia in the choroid plexus: their roles in hydrocephalus and beyond. *Front Cell Neurosci* **2015**, *9*, 39, doi:10.3389/fncel.2015.00039.
125. Ghersi-Egea, J.F.; Strazielle, N.; Catala, M.; Silva-Vargas, V.; Doetsch, F.; Engelhardt, B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathol* **2018**, *135*, 337-361, doi:10.1007/s00401-018-1807-1.

126. Ransohoff, R.M.; Engelhardt, B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **2012**, *12*, 623-635, doi:10.1038/nri3265.
127. Engelhardt, B.; Vajkoczy, P.; Weller, R.O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol* **2017**, *18*, 123-131, doi:10.1038/ni.3666.
128. Meeker, R.B.; Williams, K.; Killebrew, D.A.; Hudson, L.C. Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell Adh Migr* **2012**, *6*, 390-396, doi:10.4161/cam.21054.
129. Mapunda, J.A.; Tibar, H.; Regragui, W.; Engelhardt, B. How Does the Immune System Enter the Brain? *Front Immunol* **2022**, *13*, 805657, doi:10.3389/fimmu.2022.805657.
130. Lengfeld, J.E.; Lutz, S.E.; Smith, J.R.; Diaconu, C.; Scott, C.; Kofman, S.B.; Choi, C.; Walsh, C.M.; Raine, C.S.; Agalliu, I., et al. Endothelial Wnt/beta-catenin signaling reduces immune cell infiltration in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114*, E1168-E1177, doi:10.1073/pnas.1609905114.
131. Vercellino, M.; Votta, B.; Condello, C.; Piacentino, C.; Romagnolo, A.; Merola, A.; Capello, E.; Mancardi, G.L.; Mutani, R.; Giordana, M.T., et al. Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study. *J Neuroimmunol* **2008**, *199*, 133-141, doi:10.1016/j.jneuroim.2008.04.035.
132. Dando, S.J.; Mackay-Sim, A.; Norton, R.; Currie, B.J.; St John, J.A.; Ekberg, J.A.; Batzloff, M.; Ulett, G.C.; Beacham, I.R. Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clin Microbiol Rev* **2014**, *27*, 691-726, doi:10.1128/CMR.00118-13.
133. Doran, K.S.; Banerjee, A.; Disson, O.; Lecuit, M. Concepts and mechanisms: crossing host barriers. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2013**, *3*, doi:10.1101/cshperspect.a010090.
134. Herold, R.; Schroten, H.; Schwerk, C. Virulence Factors of Meningitis-Causing Bacteria: Enabling Brain Entry across the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20215393.
135. Lauer, A.N.; Tenenbaum, T.; Schroten, H.; Schwerk, C. The diverse cellular responses of the choroid plexus during infection of the central nervous system. *Am J Physiol Cell Physiol* **2018**, *314*, C152-C165, doi:10.1152/ajpcell.00137.2017.
136. Schwerk, C.; Tenenbaum, T.; Kim, K.S.; Schroten, H. The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS. *Front Cell Neurosci* **2015**, *9*, 80, doi:10.3389/fncel.2015.00080.
137. Vandenhoute, E.; Stump-Guthier, C.; Lasierra Losada, M.; Tenenbaum, T.; Rudolph, H.; Ishikawa, H.; Schwerk, C.; Schroten, H.; Durken, M.; Marz, M., et al. The choroid plexus may be an underestimated site of tumor invasion to the brain: an in vitro study using neuroblastoma cell lines. *Cancer Cell Int* **2015**, *15*, 102, doi:10.1186/s12935-015-0257-2.
138. Logan, C.Y.; Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2004**, *20*, 781-810, doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
139. MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **2009**, *17*, 9-26, doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016.
140. Dejana, E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res* **2010**, *107*, 943-952, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223750.
141. Corada, M.; Nyqvist, D.; Orsenigo, F.; Caprini, A.; Giampietro, C.; Taketo, M.M.; Iruela-Arispe, M.L.; Adams, R.H.; Dejana, E. The Wnt/ β -catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Developmental cell* **2010**, *18*, 938-949.
142. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **2006**, *127*, 469-480, doi:10.1016/j.cell.2006.10.018.
143. Oliva, C.A.; Vargas, J.Y.; Inestrosa, N.C. Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies. *Front Cell Neurosci* **2013**, *7*, 224, doi:10.3389/fncel.2013.00224.
144. Laksitorini, M.D.; Yathindranath, V.; Xiong, W.; Hombach-Klonisch, S.; Miller, D.W. Modulation of Wnt/beta-catenin signaling promotes blood-brain barrier phenotype in cultured brain endothelial cells. *Sci Rep* **2019**, *9*, 19718, doi:10.1038/s41598-019-56075-w.

-
145. Cattelino, A.; Liebner, S.; Gallini, R.; Zanetti, A.; Balconi, G.; Corsi, A.; Bianco, P.; Wolburg, H.; Moore, R.; Oreda, B., et al. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol* **2003**, *162*, 1111-1122, doi:10.1083/jcb.200212157.
 146. Daneman, R.; Agalliu, D.; Zhou, L.; Kuhnert, F.; Kuo, C.J.; Barres, B.A. Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 641-646, doi:10.1073/pnas.0805165106.
 147. Stenman, J.M.; Rajagopal, J.; Carroll, T.J.; Ishibashi, M.; McMahon, J.; McMahon, A.P. Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* **2008**, *322*, 1247-1250, doi:10.1126/science.1164594.
 148. Harati, R.; Benech, H.; Villegier, A.S.; Mabondzo, A. P-glycoprotein, breast cancer resistance protein, Organic Anion Transporter 3, and Transporting Peptide 1a4 during blood-brain barrier maturation: involvement of Wnt/beta-catenin and endothelin-1 signaling. *Mol Pharm* **2013**, *10*, 1566-1580, doi:10.1021/mp300334r.
 149. Tran, K.A.; Zhang, X.; Predescu, D.; Huang, X.; Machado, R.F.; Gothert, J.R.; Malik, A.B.; Valyi-Nagy, T.; Zhao, Y.Y. Endothelial beta-Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and Central Nervous System Homeostasis. *Circulation* **2016**, *133*, 177-186, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015982.
 150. Liu, L.; Wan, W.; Xia, S.; Kalionis, B.; Li, Y. Dysfunctional Wnt/beta-catenin signaling contributes to blood-brain barrier breakdown in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **2014**, *75*, 19-25, doi:10.1016/j.neuint.2014.05.004.
 151. Lim, R.G.; Quan, C.; Reyes-Ortiz, A.M.; Lutz, S.E.; Kedaigle, A.J.; Gipson, T.A.; Wu, J.; Vatine, G.D.; Stocksdales, J.; Casale, M.S., et al. Huntington's Disease iPSC-Derived Brain Microvascular Endothelial Cells Reveal WNT-Mediated Angiogenic and Blood-Brain Barrier Deficits. *Cell Rep* **2017**, *19*, 1365-1377, doi:10.1016/j.celrep.2017.04.021.
 152. Inestrosa, N.C.; Arenas, E. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci* **2010**, *11*, 77-86, doi:10.1038/nrn2755.
 153. Willert, K.; Brown, J.D.; Danenberg, E.; Duncan, A.W.; Weissman, I.L.; Reya, T.; Yates, J.R., 3rd; Nusse, R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **2003**, *423*, 448-452, doi:10.1038/nature01611.
 154. Goodwin, A.M.; Sullivan, K.M.; D'Amore, P.A. Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling. *Dev Dyn* **2006**, *235*, 3110-3120, doi:10.1002/dvdy.20939.
 155. Miller, J.R. The Wnts. *Genome Biol* **2002**, *3*, REVIEWS3001, doi:10.1186/gb-2001-3-1-reviews3001.
 156. Du, S.J.; Purcell, S.M.; Christian, J.L.; McGrew, L.L.; Moon, R.T. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* **1995**, *15*, 2625-2634, doi:10.1128/MCB.15.5.2625.
 157. Hoppler, S.; Brown, J.D.; Moon, R.T. Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* **1996**, *10*, 2805-2817, doi:10.1101/gad.10.21.2805.
 158. Rios-Esteves, J.; Haugen, B.; Resh, M.D. Identification of key residues and regions important for porcupine-mediated Wnt acylation. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 17009-17019, doi:10.1074/jbc.M114.561209.
 159. Rios-Esteves, J.; Resh, M.D. Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins. *Cell Rep* **2013**, *4*, 1072-1081, doi:10.1016/j.celrep.2013.08.027.
 160. Takada, R.; Satomi, Y.; Kurata, T.; Ueno, N.; Norioka, S.; Kondoh, H.; Takao, T.; Takada, S. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* **2006**, *11*, 791-801, doi:10.1016/j.devcel.2006.10.003.
 161. Janda, C.Y.; Waghray, D.; Levin, A.M.; Thomas, C.; Garcia, K.C. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* **2012**, *337*, 59-64, doi:10.1126/science.1222879.

162. Banziger, C.; Soldini, D.; Schutt, C.; Zipperlen, P.; Hausmann, G.; Basler, K. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* **2006**, *125*, 509-522, doi:10.1016/j.cell.2006.02.049.
163. Bartscherer, K.; Pelte, N.; Ingelfinger, D.; Boutros, M. Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* **2006**, *125*, 523-533, doi:10.1016/j.cell.2006.04.009.
164. Herr, P.; Basler, K. Porcupine-mediated lipidation is required for Wnt recognition by Wls. *Dev Biol* **2012**, *361*, 392-402, doi:10.1016/j.ydbio.2011.11.003.
165. Najdi, R.; Proffitt, K.; Sprowl, S.; Kaur, S.; Yu, J.; Covey, T.M.; Virshup, D.M.; Waterman, M.L. A uniform human Wnt expression library reveals a shared secretory pathway and unique signaling activities. *Differentiation* **2012**, *84*, 203-213, doi:10.1016/j.diff.2012.06.004.
166. Yu, J.; Chia, J.; Canning, C.A.; Jones, C.M.; Bard, F.A.; Virshup, D.M. WLS retrograde transport to the endoplasmic reticulum during Wnt secretion. *Dev Cell* **2014**, *29*, 277-291, doi:10.1016/j.devcel.2014.03.016.
167. Gross, J.C.; Chaudhary, V.; Bartscherer, K.; Boutros, M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* **2012**, *14*, 1036-1045, doi:10.1038/ncb2574.
168. Korkut, C.; Ataman, B.; Ramachandran, P.; Ashley, J.; Barria, R.; Gherbesi, N.; Budnik, V. Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell* **2009**, *139*, 393-404, doi:10.1016/j.cell.2009.07.051.
169. McGough, I.J.; Vincent, J.P. Exosomes in developmental signalling. *Development* **2016**, *143*, 2482-2493, doi:10.1242/dev.126516.
170. Saha, S.; Aranda, E.; Hayakawa, Y.; Bhanja, P.; Atay, S.; Brodin, N.P.; Li, J.; Asfaha, S.; Liu, L.; Taylor, Y., et al. Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat Commun* **2016**, *7*, 13096, doi:10.1038/ncomms13096.
171. Bradley, R.S.; Brown, A.M. The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *EMBO J* **1990**, *9*, 1569-1575.
172. Reichsman, F.; Smith, L.; Cumberledge, S. Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol* **1996**, *135*, 819-827, doi:10.1083/jcb.135.3.819.
173. Farin, H.F.; Jordens, I.; Mosa, M.H.; Basak, O.; Korving, J.; Tauriello, D.V.; de Punder, K.; Angers, S.; Peters, P.J.; Maurice, M.M., et al. Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature* **2016**, *530*, 340-343, doi:10.1038/nature16937.
174. Nusse, R.; Clevers, H. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **2017**, *169*, 985-999, doi:10.1016/j.cell.2017.05.016.
175. He, X.; Semenov, M.; Tamai, K.; Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* **2004**, *131*, 1663-1677, doi:10.1242/dev.01117.
176. Kuhl, M.; Sheldahl, L.C.; Malbon, C.C.; Moon, R.T. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 12701-12711, doi:10.1074/jbc.275.17.12701.
177. Liu, T.; DeCostanzo, A.J.; Liu, X.; Wang, H.; Hallagan, S.; Moon, R.T.; Malbon, C.C. G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway. *Science* **2001**, *292*, 1718-1722, doi:10.1126/science.1060100.
178. Liu, T.; Liu, X.; Wang, H.; Moon, R.T.; Malbon, C.C. Activation of rat frizzled-1 promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via pathways that require Galpha(q) and Galpha(o) function. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 33539-33544, doi:10.1074/jbc.274.47.33539.
179. Liu, X.; Liu, T.; Slusarski, D.C.; Yang-Snyder, J.; Malbon, C.C.; Moon, R.T.; Wang, H. Activation of a frizzled-2/beta-adrenergic receptor chimera promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via Galphao and Galphat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 14383-14388, doi:10.1073/pnas.96.25.14383.
180. Sheldahl, L.C.; Park, M.; Malbon, C.C.; Moon, R.T. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* **1999**, *9*, 695-698, doi:10.1016/s0960-9822(99)80310-8.

181. Dann, C.E.; Hsieh, J.C.; Rattner, A.; Sharma, D.; Nathans, J.; Leahy, D.J. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **2001**, *412*, 86-90, doi:10.1038/35083601.
182. Binnerts, M.E.; Kim, K.A.; Bright, J.M.; Patel, S.M.; Tran, K.; Zhou, M.; Leung, J.M.; Liu, Y.; Lomas, W.E., 3rd; Dixon, M., et al. R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 14700-14705, doi:10.1073/pnas.0702305104.
183. van Amerongen, R.; Mikels, A.; Nusse, R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* **2008**, *1*, re9, doi:10.1126/scisignal.135re9.
184. Bryja, V.; Andersson, E.R.; Schambony, A.; Esner, M.; Bryjova, L.; Biris, K.K.; Hall, A.C.; Kraft, B.; Cajanek, L.; Yamaguchi, T.P., et al. The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 924-936, doi:10.1091/mbc.E08-07-0711.
185. Tahinci, E.; Thorne, C.A.; Franklin, J.L.; Salic, A.; Christian, K.M.; Lee, L.A.; Coffey, R.J.; Lee, E. Lrp6 is required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Development* **2007**, *134*, 4095-4106, doi:10.1242/dev.010272.
186. Bovolenta, P.; Esteve, P.; Ruiz, J.M.; Cisneros, E.; Lopez-Rios, J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* **2008**, *121*, 737-746, doi:10.1242/jcs.026096.
187. Satoh, W.; Matsuyama, M.; Takemura, H.; Aizawa, S.; Shimono, A. Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/beta-catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse. *Genesis* **2008**, *46*, 92-103, doi:10.1002/dvg.20369.
188. Mao, B.; Wu, W.; Davidson, G.; Marhold, J.; Li, M.; Mechler, B.M.; Delius, H.; Hoppe, D.; Stannek, P.; Walter, C., et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **2002**, *417*, 664-667, doi:10.1038/nature756.
189. Semenov, M.V.; Tamai, K.; Brott, B.K.; Kuhl, M.; Sokol, S.; He, X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* **2001**, *11*, 951-961, doi:10.1016/s0960-9822(01)00290-1.
190. Wang, K.; Zhang, Y.; Li, X.; Chen, L.; Wang, H.; Wu, J.; Zheng, J.; Wu, D. Characterization of the Kremen-binding site on Dkk1 and elucidation of the role of Kremen in Dkk-mediated Wnt antagonism. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 23371-23375, doi:10.1074/jbc.M802376200.
191. Itasaki, N.; Jones, C.M.; Mercurio, S.; Rowe, A.; Domingos, P.M.; Smith, J.C.; Krumlauf, R. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* **2003**, *130*, 4295-4305, doi:10.1242/dev.00674.
192. Li, X.; Zhang, Y.; Kang, H.; Liu, W.; Liu, P.; Zhang, J.; Harris, S.E.; Wu, D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 19883-19887, doi:10.1074/jbc.M413274200.
193. Xu, Q.; Wang, Y.; Dabdoub, A.; Smallwood, P.M.; Williams, J.; Woods, C.; Kelley, M.W.; Jiang, L.; Tasman, W.; Zhang, K., et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* **2004**, *116*, 883-895, doi:10.1016/s0092-8674(04)00216-8.
194. Kim, K.A.; Kakitani, M.; Zhao, J.; Oshima, T.; Tang, T.; Binnerts, M.; Liu, Y.; Boyle, B.; Park, E.; Emtage, P., et al. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* **2005**, *309*, 1256-1259, doi:10.1126/science.1112521.
195. Nam, J.S.; Turcotte, T.J.; Smith, P.F.; Choi, S.; Yoon, J.K. Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 13247-13257, doi:10.1074/jbc.M508324200.
196. Wei, Q.; Yokota, C.; Semenov, M.V.; Doble, B.; Woodgett, J.; He, X. R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 15903-15911, doi:10.1074/jbc.M701927200.
197. Bell, S.M.; Schreiner, C.M.; Wert, S.E.; Mucenski, M.L.; Scott, W.J.; Whitsett, J.A. R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development* **2008**, *135*, 1049-1058, doi:10.1242/dev.013359.

-
198. Kazanskaya, O.; Glinka, A.; del Barco Barrantes, I.; Stannek, P.; Niehrs, C.; Wu, W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* **2004**, *7*, 525-534, doi:10.1016/j.devcel.2004.07.019.
199. Janda, C.Y.; Dang, L.T.; You, C.; Chang, J.; de Lau, W.; Zhong, Z.A.; Yan, K.S.; Marecic, O.; Siepe, D.; Li, X. Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and β -catenin signalling. *Nature* **2017**, *545*, 234-237.
200. Schihada, H.; Kowalski-Jahn, M.; Turku, A.; Schulte, G. Deconvolution of WNT-induced Frizzled conformational dynamics with fluorescent biosensors. *Biosens Bioelectron* **2021**, *177*, 112948, doi:10.1016/j.bios.2020.112948.
201. Tamai, K.; Zeng, X.; Liu, C.; Zhang, X.; Harada, Y.; Chang, Z.; He, X. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular cell* **2004**, *13*, 149-156.
202. Stamos, J.L.; Chu, M.L.; Enos, M.D.; Shah, N.; Weis, W.I. Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6. *Elife* **2014**, *3*, e01998, doi:10.7554/eLife.01998.
203. Davidson, G.; Wu, W.; Shen, J.; Bilic, J.; Fenger, U.; Stannek, P.; Glinka, A.; Niehrs, C. Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **2005**, *438*, 867-872.
204. Zeng, X.; Tamai, K.; Doble, B.; Li, S.; Huang, H.; Habas, R.; Okamura, H.; Woodgett, J.; He, X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **2005**, *438*, 873-877.
205. Mao, J.; Wang, J.; Liu, B.; Pan, W.; Farr III, G.H.; Flynn, C.; Yuan, H.; Takada, S.; Kimelman, D.; Li, L. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Molecular cell* **2001**, *7*, 801-809.
206. Fiedler, M.; Mendoza-Topaz, C.; Rutherford, T.J.; Mieszczanek, J.; Bienz, M. Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 1937-1942, doi:10.1073/pnas.1017063108.
207. Schwarz-Romond, T.; Fiedler, M.; Shibata, N.; Butler, P.J.; Kikuchi, A.; Higuchi, Y.; Bienz, M. The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* **2007**, *14*, 484-492, doi:10.1038/nsmb1247.
208. Tauriello, D.V.; Jordens, I.; Kirchner, K.; Slootstra, J.W.; Kruitwagen, T.; Bouwman, B.A.; Noutsou, M.; Rudiger, S.G.; Schwamborn, K.; Schambony, A., et al. Wnt/beta-catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, E812-820, doi:10.1073/pnas.1114802109.
209. Zeng, X.; Huang, H.; Tamai, K.; Zhang, X.; Harada, Y.; Yokota, C.; Almeida, K.; Wang, J.; Doble, B.; Woodgett, J. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. **2008**.
210. Moon, R.T. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* **2005**, *2005*, cm1, doi:10.1126/stke.2712005cm1.
211. Moro, E.; Ozhan-Kizil, G.; Mongera, A.; Beis, D.; Wierzbicki, C.; Young, R.M.; Bournele, D.; Domenichini, A.; Valdivia, L.E.; Lum, L., et al. In vivo Wnt signaling tracing through a transgenic biosensor fish reveals novel activity domains. *Dev Biol* **2012**, *366*, 327-340, doi:10.1016/j.ydbio.2012.03.023.
212. Ye, X.; Wang, Y.; Nathans, J. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends Mol Med* **2010**, *16*, 417-425, doi:10.1016/j.molmed.2010.07.003.
213. Paes, K.T.; Wang, E.; Henze, K.; Vogel, P.; Read, R.; Suwanichkul, A.; Kirkpatrick, L.L.; Potter, D.; Newhouse, M.M.; Rice, D.S. Frizzled 4 is required for retinal angiogenesis and maintenance of the blood-retina barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2011**, *52*, 6452-6461, doi:10.1167/iovs.10-7146.
214. Engelhardt, B.; Liebner, S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res* **2014**, *355*, 687-699, doi:10.1007/s00441-014-1811-2.

-
215. Chang, A.C.; Fu, Y.; Garside, V.C.; Niessen, K.; Chang, L.; Fuller, M.; Setiadi, A.; Smrz, J.; Kyle, A.; Minchinton, A., et al. Notch initiates the endothelial-to-mesenchymal transition in the atrioventricular canal through autocrine activation of soluble guanylyl cyclase. *Dev Cell* **2011**, *21*, 288-300, doi:10.1016/j.devcel.2011.06.022.
216. Covassin, L.; Amigo, J.D.; Suzuki, K.; Teplyuk, V.; Straubhaar, J.; Lawson, N.D. Global analysis of hematopoietic and vascular endothelial gene expression by tissue specific microarray profiling in zebrafish. *Dev Biol* **2006**, *299*, 551-562, doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.020.
217. Hnasko, R.; Frank, P.G.; Ben-Jonathan, N.; Lisanti, M.P. PV-1 is negatively regulated by VEGF in the lung of caveolin-1, but not caveolin-2, null mice. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 2012-2020, doi:10.4161/cc.5.17.3216.
218. Wang, Y.; Rattner, A.; Zhou, Y.; Williams, J.; Smallwood, P.M.; Nathans, J. Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell* **2012**, *151*, 1332-1344, doi:10.1016/j.cell.2012.10.042.
219. Maqsood, M.I.; Matin, M.M.; Bahrami, A.R.; Ghasroldasht, M.M. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biol Int* **2013**, *37*, 1038-1045, doi:10.1002/cbin.10137.
220. Shay, J.W.; Wright, W.E.; Werbin, H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1072*, 1-7, doi:10.1016/0304-419x(91)90003-4.
221. Deng, L.; Pollmeier, L.; Zhou, Q.; Bergemann, S.; Bode, C.; Hein, L.; Lothar, A. Gene expression in immortalized versus primary isolated cardiac endothelial cells. *Sci Rep* **2020**, *10*, 2241, doi:10.1038/s41598-020-59213-x.
222. Kaur, C.; Rathnasamy, G.; Ling, E.A. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **2016**, *75*, 198-213, doi:10.1093/jnen/nlv030.
223. Serot, J.M.; Christmann, D.; Dubost, T.; Bene, M.C.; Faure, G.C. CSF-folate levels are decreased in late-onset AD patients. *J Neural Transm (Vienna)* **2001**, *108*, 93-99, doi:10.1007/s007020170100.
224. Serot, J.M.; Foliguet, B.; Bene, M.C.; Faure, G.C. Choroid plexus and ageing in rats: a morphometric and ultrastructural study. *Eur J Neurosci* **2001**, *14*, 794-798, doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01693.x.
225. Wilson, E.H.; Weninger, W.; Hunter, C.A. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest* **2010**, *120*, 1368-1379, doi:10.1172/JCI41911.
226. Herold, R.; Scholtysik, R.; Moroniak, S.; Weiss, C.; Ishikawa, H.; Schroten, H.; Schwerk, C. Capsule-dependent impact of MAPK signalling on host cell invasion and immune response during infection of the choroid plexus epithelium by *Neisseria meningitidis*. *Fluids Barriers CNS* **2021**, *18*, 53, doi:10.1186/s12987-021-00288-7.
227. Herold, R.; Sunwoldt, G.; Stump-Guthier, C.; Weiss, C.; Ishikawa, H.; Schroten, H.; Adam, R.; Schwerk, C. Invasion of the choroid plexus epithelium by *Neisseria meningitidis* is differently mediated by Arp2/3 signaling and possibly by dynamin dependent on the presence of the capsule. *Pathog Dis* **2021**, *79*, doi:10.1093/femspd/ftab042.
228. Rotter, B.; Rodriguez, A.; Krezdorn, N.; Jost, L.; Winter, P. Massive Analysis of cDNA Ends (MACE): eine effektive RNA-Seq-Variante. *BIOspektrum Springer* **2017**, *23*, 58-60.
229. TW, H.B.; Girke, T. systemPipeR: NGS workflow and report generation environment. *BMC Bioinformatics* **2016**, *17*, 388, doi:10.1186/s12859-016-1241-0.
230. Bray, N.L.; Pimentel, H.; Melsted, P.; Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* **2016**, *34*, 525-527, doi:10.1038/nbt.3519.
231. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43*, e47, doi:10.1093/nar/gkv007.
232. Yu, G.; Wang, L.G.; Han, Y.; He, Q.Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* **2012**, *16*, 284-287, doi:10.1089/omi.2011.0118.
233. Wickham, H. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*; springer: 2016.

-
234. Gu, Z.; Eils, R.; Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 2847-2849, doi:10.1093/bioinformatics/btw313.
235. Jaffe, A.B.; Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2005**, *21*, 247-269, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
236. Aird, W.C. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med* **2001**, *29*, S28-34; discussion S34-25, doi:10.1097/00003246-200107001-00013.
237. Aird, W.C. Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease. *Circ Res* **2006**, *98*, 159-162, doi:10.1161/01.RES.0000204553.32549.a7.
238. Aurrand-Lions, M.; Johnson-Leger, C.; Imhof, B.A. The last molecular fortress in leukocyte trans-endothelial migration. *Nat Immunol* **2002**, *3*, 116-118, doi:10.1038/ni0202-116.
239. Butcher, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **1991**, *67*, 1033-1036, doi:10.1016/0092-8674(91)90279-8.
240. Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **1994**, *76*, 301-314, doi:10.1016/0092-8674(94)90337-9.
241. Majno, G.; Palade, G.E. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* **1961**, *11*, 571-605, doi:10.1083/jcb.11.3.571.
242. Majno, G.; Palade, G.E.; Schoefl, G.I. Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. *J Biophys Biochem Cytol* **1961**, *11*, 607-626, doi:10.1083/jcb.11.3.607.
243. McDonald, D.M.; Thurston, G.; Baluk, P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation* **1999**, *6*, 7-22.
244. Engler, T.A.; Henry, J.R.; Malhotra, S.; Cunningham, B.; Furness, K.; Brozinick, J.; Burkholder, T.P.; Clay, M.P.; Clayton, J.; Diefenbacher, C., et al. Substituted 3-imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl-4-(1,2,3,4-tetrahydro-[1,4]diazepino-[6,7,1-hi]indol-7-yl)pyrrole-2,5-diones as highly selective and potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *J Med Chem* **2004**, *47*, 3934-3937, doi:10.1021/jm049768a.
245. Lustig, B.; Jerchow, B.; Sachs, M.; Weiler, S.; Pietsch, T.; Karsten, U.; van de Wetering, M.; Clevers, H.; Schlag, P.M.; Birchmeier, W., et al. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* **2002**, *22*, 1184-1193, doi:10.1128/MCB.22.4.1184-1193.2002.
246. Annavarapu, S.R.; Cialfi, S.; Dominici, C.; Kokai, G.K.; Uccini, S.; Ceccarelli, S.; McDowell, H.P.; Helliwell, T.R. Characterization of Wnt/beta-catenin signaling in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest* **2013**, *93*, 1090-1099, doi:10.1038/labinvest.2013.97.
247. Li, X.Q.; Yang, X.L.; Zhang, G.; Wu, S.P.; Deng, X.B.; Xiao, S.J.; Liu, Q.Z.; Yao, K.T.; Xiao, G.H. Nuclear beta-catenin accumulation is associated with increased expression of Nanog protein and predicts poor prognosis of non-small cell lung cancer. *J Transl Med* **2013**, *11*, 114, doi:10.1186/1479-5876-11-114.
248. Kim, G.; Kurnit, K.C.; Djordjevic, B.; Singh, C.; Munsell, M.F.; Wang, W.L.; Lazar, A.J.; Zhang, W.; Broaddus, R. Nuclear beta-catenin localization and mutation of the CTNNB1 gene: a context-dependent association. *Mod Pathol* **2018**, *31*, 1553-1559, doi:10.1038/s41379-018-0080-0.
249. Li, L.; Song, H.; Zhong, L.; Yang, R.; Yang, X.Q.; Jiang, K.L.; Liu, B.Z. Lithium Chloride Promotes Apoptosis in Human Leukemia NB4 Cells by Inhibiting Glycogen Synthase Kinase-3 Beta. *Int J Med Sci* **2015**, *12*, 805-810, doi:10.7150/ijms.12429.
250. Wang, Z.; Zhang, X.; Chen, S.; Wang, D.; Wu, J.; Liang, T.; Liu, C. Lithium chloride inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration and alleviates injury-induced neointimal hyperplasia via induction of PGC-1alpha. *PLoS One* **2013**, *8*, e55471, doi:10.1371/journal.pone.0055471.
251. Yao, R.; Sun, X.; Xie, Y.; Liu, L.; Han, D.; Yao, Y.; Li, H.; Li, Z.; Xu, K. Lithium chloride inhibits cell survival, overcomes drug resistance, and triggers apoptosis in multiple myeloma via activation of the Wnt/beta-catenin pathway. *Am J Transl Res* **2018**, *10*, 2610-2618.

-
252. Jamieson, C.; Mills, K.M.; Lui, C.; Semaan, C.; Molloy, M.P.; Sharma, M.; Forwood, J.K.; Henderson, B.R. Characterization of a beta-catenin nuclear localization defect in MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res* **2016**, *341*, 196-206, doi:10.1016/j.yexcr.2016.01.020.
253. Vuong, L.T.; Mukhopadhyay, B.; Choi, K.W. Kinesin-II recruits Armadillo and Dishevelled for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* **2014**, *141*, 3222-3232, doi:10.1242/dev.106229.
254. Hao, Y.H.; Lafita-Navarro, M.C.; Zacharias, L.; Borenstein-Auerbach, N.; Kim, M.; Barnes, S.; Kim, J.; Shay, J.; DeBerardinis, R.J.; Conacci-Sorrell, M. Induction of LEF1 by MYC activates the WNT pathway and maintains cell proliferation. *Cell Commun Signal* **2019**, *17*, 129, doi:10.1186/s12964-019-0444-1.
255. Cai, Y.; Mohseny, A.B.; Karperien, M.; Hogendoorn, P.C.; Zhou, G.; Cleton-Jansen, A.M. Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *J Pathol* **2010**, *220*, 24-33, doi:10.1002/path.2628.
256. Lewalle, J.M.; Bajou, K.; Desreux, J.; Mareel, M.; Dejana, E.; Noel, A.; Foidart, J.M. Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction in vitro. *Exp Cell Res* **1997**, *237*, 347-356, doi:10.1006/excr.1997.3799.
257. Shasby, D.M.; Ries, D.R.; Shasby, S.S.; Winter, M.C. Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2002**, *282*, L1330-1338, doi:10.1152/ajplung.00329.2001.
258. Dejana, E.; Orsenigo, F.; Lampugnani, M.G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* **2008**, *121*, 2115-2122, doi:10.1242/jcs.017897.
259. Corada, M.; Liao, F.; Lindgren, M.; Lampugnani, M.G.; Breviario, F.; Frank, R.; Muller, W.A.; Hicklin, D.J.; Bohlen, P.; Dejana, E. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood* **2001**, *97*, 1679-1684, doi:10.1182/blood.v97.6.1679.
260. Corada, M.; Zanetta, L.; Orsenigo, F.; Breviario, F.; Lampugnani, M.G.; Bernasconi, S.; Liao, F.; Hicklin, D.J.; Bohlen, P.; Dejana, E. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood* **2002**, *100*, 905-911, doi:10.1182/blood.v100.3.905.
261. van der Wal, T.; van Amerongen, R. Walking the tight wire between cell adhesion and WNT signalling: a balancing act for beta-catenin. *Open Biol* **2020**, *10*, 200267, doi:10.1098/rsob.200267.
262. Heuberger, J.; Birchmeier, W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2*, a002915, doi:10.1101/cshperspect.a002915.
263. Paoluzi, O.A.; Rossi, P.; Montesano, C.; Bernardi, S.; Carnieri, E.; Marchione, O.P.; Nardi, F.; Iacopini, F.; Pica, R.; Paoluzi, P. Discrepancy between polymerase chain reaction assay and Western blot analysis in the assessment of CagA status in dyspeptic patients. *Helicobacter* **2001**, *6*, 130-135, doi:10.1046/j.1523-5378.2001.00019.x.
264. Kim, D.; Rath, O.; Kolch, W.; Cho, K.H. A hidden oncogenic positive feedback loop caused by crosstalk between Wnt and ERK pathways. *Oncogene* **2007**, *26*, 4571-4579, doi:10.1038/sj.onc.1210230.
265. Li, K.; Zhang, J.; Tian, Y.; He, Y.; Xu, X.; Pan, W.; Gao, Y.; Chen, F.; Wei, L. The Wnt/beta-catenin/VASP positive feedback loop drives cell proliferation and migration in breast cancer. *Oncogene* **2020**, *39*, 2258-2274, doi:10.1038/s41388-019-1145-3.
266. Posternak, V.; Ung, M.H.; Cheng, C.; Cole, M.D. MYC Mediates mRNA Cap Methylation of Canonical Wnt/beta-Catenin Signaling Transcripts By Recruiting CDK7 and RNA Methyltransferase. *Mol Cancer Res* **2017**, *15*, 213-224, doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0247.
267. Du, C.; Zhang, C.; Li, Z.; Biswas, M.H.; Balaji, K.C. Beta-catenin phosphorylated at threonine 120 antagonizes generation of active beta-catenin by spatial localization in trans-Golgi network. *PLoS One* **2012**, *7*, e33830, doi:10.1371/journal.pone.0033830.

-
268. Strazielle, N.; Gherzi-Egea, J.-F. In vitro models of the blood–cerebrospinal fluid barrier and their use in neurotoxicological research. In *Cell Culture Techniques*, Springer: 2011; pp. 161-184.
269. Tenenbaum, T.; Steinmann, U.; Friedrich, C.; Berger, J.; Schwerk, C.; Schrotten, H. Culture models to study leukocyte trafficking across the choroid plexus. *Fluids Barriers CNS* **2013**, *10*, 1, doi:10.1186/2045-8118-10-1.
270. Dinner, S.; Borkowski, J.; Stump-Guthier, C.; Ishikawa, H.; Tenenbaum, T.; Schrotten, H.; Schwerk, C. A Choroid Plexus Epithelial Cell-based Model of the Human Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier to Study Bacterial Infection from the Basolateral Side. *J Vis Exp* **2016**, 10.3791/54061, doi:10.3791/54061.
271. Ishiwata, I.; Ishiwata, C.; Ishiwata, E.; Sato, Y.; Kiguchi, K.; Tachibana, T.; Hashimoto, H.; Ishikawa, H. Establishment and characterization of a human malignant choroids plexus papilloma cell line (HIBCPP). *Hum Cell* **2005**, *18*, 67-72, doi:10.1111/j.1749-0774.2005.tb00059.x.
272. Schwerk, C.; Papandreou, T.; Schuhmann, D.; Nickol, L.; Borkowski, J.; Steinmann, U.; Quednau, N.; Stump, C.; Weiss, C.; Berger, J., et al. Polar invasion and translocation of *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus suis* in a novel human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *PLoS One* **2012**, *7*, e30069, doi:10.1371/journal.pone.0030069.
273. Marques, F.; Sousa, J.C. The choroid plexus is modulated by various peripheral stimuli: implications to diseases of the central nervous system. *Front Cell Neurosci* **2015**, *9*, 136, doi:10.3389/fncel.2015.00136.
274. Freshney, R.I. *Tierische zellkulturen: ein methoden-handbuch*; Walter de Gruyter GmbH & Co KG: 2015.
275. Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur*; Springer: 2011; Vol. 1.
276. Urich, E.; Lazic, S.E.; Molnos, J.; Wells, I.; Freskgard, P.O. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS One* **2012**, *7*, e38149, doi:10.1371/journal.pone.0038149.
277. Andrieux, G.; Chakraborty, S.; Das, T.; Boerries, M. Alteration of Proteotranscriptomic Landscape Reveals the Transcriptional Regulatory Circuits Controlling Key-Signaling Pathways and Metabolic Reprogramming During Tumor Evolution. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 586479, doi:10.3389/fcell.2020.586479.
278. Klaus, A.; Birchmeier, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 387-398, doi:10.1038/nrc2389.
279. Parichha, A.; Suresh, V.; Chatterjee, M.; Kshirsagar, A.; Ben-Reuven, L.; Olender, T.; Taketo, M.M.; Radosevic, V.; Bobic-Rasonja, M.; Trnski, S., et al. Constitutive activation of canonical Wnt signaling disrupts choroid plexus epithelial fate. *Nat Commun* **2022**, *13*, 633, doi:10.1038/s41467-021-27602-z.
280. Kaiser, K.; Jang, A.; Kompanikova, P.; Lun, M.P.; Prochazka, J.; Machon, O.; Dani, N.; Prochazkova, M.; Laurent, B.; Gyllborg, D., et al. MEIS-WNT5A axis regulates development of fourth ventricle choroid plexus. *Development* **2021**, *148*, doi:10.1242/dev.192054.
281. Dani, N.; Herbst, R.H.; McCabe, C.; Green, G.S.; Kaiser, K.; Head, J.P.; Cui, J.; Shipley, F.B.; Jang, A.; Dionne, D., et al. A cellular and spatial map of the choroid plexus across brain ventricles and ages. *Cell* **2021**, *184*, 3056-3074 e3021, doi:10.1016/j.cell.2021.04.003.
282. Liddelow, S.A.; Dziegielewska, K.M.; Vandenberg, J.L.; Saunders, N.R. Development of the lateral ventricular choroid plexus in a marsupial, *Monodelphis domestica*. *Cerebrospinal Fluid Res* **2010**, *7*, 16, doi:10.1186/1743-8454-7-16.
283. Nielsen, C.M.; Dymecki, S.M. Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus. *Dev Biol* **2010**, *340*, 430-437, doi:10.1016/j.ydbio.2010.01.032.
284. Wilting, J.; Christ, B. An experimental and ultrastructural study on the development of the avian choroid plexus. *Cell Tissue Res* **1989**, *255*, 487-494, doi:10.1007/BF00218783.
285. Wacker, A.; Gerhardt, H. Endothelial development taking shape. *Curr Opin Cell Biol* **2011**, *23*, 676-685, doi:10.1016/j.ceb.2011.10.002.

-
286. Abbott, N.J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* **2002**, *200*, 629-638, doi:10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x.
287. Arthur, F.E.; Shivers, R.R.; Bowman, P.D. Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Brain Res* **1987**, *433*, 155-159, doi:10.1016/0165-3806(87)90075-7.
288. Cohen-Kashi Malina, K.; Cooper, I.; Teichberg, V.I. Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness. *Brain Res* **2009**, *1284*, 12-21, doi:10.1016/j.brainres.2009.05.072.
289. Gaillard, P.J.; van der Sandt, I.C.; Voorwinden, L.H.; Vu, D.; Nielsen, J.L.; de Boer, A.G.; Breimer, D.D. Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* **2000**, *17*, 1198-1205, doi:10.1023/a:1026406528530.
290. Haseloff, R.F.; Blasig, I.E.; Bauer, H.C.; Bauer, H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* **2005**, *25*, 25-39, doi:10.1007/s10571-004-1375-x.
291. Hawkins, B.T.; Davis, T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **2005**, *57*, 173-185, doi:10.1124/pr.57.2.4.
292. Hayashi, Y.; Nomura, M.; Yamagishi, S.; Harada, S.; Yamashita, J.; Yamamoto, H. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* **1997**, *19*, 13-26.
293. Janzer, R.C.; Raff, M.C. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **1987**, *325*, 253-257, doi:10.1038/325253a0.
294. Armulik, A.; Genove, G.; Mae, M.; Nisancioglu, M.H.; Wallgard, E.; Niaudet, C.; He, L.; Norlin, J.; Lindblom, P.; Strittmatter, K., et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* **2010**, *468*, 557-561, doi:10.1038/nature09522.
295. Goodwin, A.M.; Sullivan, K.M.; D'Amore, P.A. Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling. *Developmental dynamics* **2006**, *235*, 3110-3120.
296. Ozsolak, F.; Milos, P.M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet* **2011**, *12*, 87-98, doi:10.1038/nrg2934.
297. Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **2009**, *10*, 57-63, doi:10.1038/nrg2484.
298. Hwang, Y.-S.; Chung, B.G.; Ortmann, D.; Hattori, N.; Moeller, H.-C.; Khademhosseini, A. Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 16978-16983.
299. Grove, E.A.; Tole, S.; Limon, J.; Yip, L.; Ragsdale, C.W. The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development* **1998**, *125*, 2315-2325, doi:10.1242/dev.125.12.2315.
300. Langford, M.B.; O'Leary, C.J.; Veeraval, L.; White, A.; Lanoue, V.; Cooper, H.M. WNT5a Regulates Epithelial Morphogenesis in the Developing Choroid Plexus. *Cereb Cortex* **2020**, *30*, 3617-3631, doi:10.1093/cercor/bhz330.
301. Johnson, A.T. Teaching the principle of biological optimization. *J Biol Eng* **2013**, *7*, 6, doi:10.1186/1754-1611-7-6.
302. Kemler, R.; Hierholzer, A.; Kanzler, B.; Kuppig, S.; Hansen, K.; Taketo, M.M.; de Vries, W.N.; Knowles, B.B.; Solter, D. Stabilization of beta-catenin in the mouse zygote leads to premature epithelial-mesenchymal transition in the epiblast. *Development* **2004**, *131*, 5817-5824, doi:10.1242/dev.01458.
303. Li, C.; Li, A.; Xing, Y.; Li, M.; Chan, B.; Ouyang, R.; Taketo, M.M.; Kucherlapati, R.; Borok, Z.; Minoo, P. Apc deficiency alters pulmonary epithelial cell fate and inhibits Nkx2.1 via triggering TGF-beta signaling. *Dev Biol* **2013**, *378*, 13-24, doi:10.1016/j.ydbio.2013.03.018.

-
304. Wang, Y.; Sabbagh, M.F.; Gu, X.; Rattner, A.; Williams, J.; Nathans, J. Beta-catenin signaling regulates barrier-specific gene expression in circumventricular organ and ocular vasculatures. *Elife* **2019**, *8*, doi:10.7554/eLife.43257.
305. Kaiser, K.; Gyllborg, D.; Prochazka, J.; Salasova, A.; Kompanikova, P.; Molina, F.L.; Laguna-Goya, R.; Radaszkiewicz, T.; Harnos, J.; Prochazkova, M., et al. WNT5A is transported via lipoprotein particles in the cerebrospinal fluid to regulate hindbrain morphogenesis. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1498, doi:10.1038/s41467-019-09298-4.
306. Vogel, C.; Marcotte, E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* **2012**, *13*, 227-232, doi:10.1038/nrg3185.
307. Schwanhauser, B.; Busse, D.; Li, N.; Dittmar, G.; Schuchhardt, J.; Wolf, J.; Chen, W.; Selbach, M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **2011**, *473*, 337-342, doi:10.1038/nature10098.
308. Sharova, L.V.; Sharov, A.A.; Nedorezov, T.; Piao, Y.; Shaik, N.; Ko, M.S. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA research* **2009**, *16*, 45-58.
309. Vogel, C.; de Sousa Abreu, R.; Ko, D.; Le, S.Y.; Shapiro, B.A.; Burns, S.C.; Sandhu, D.; Boutz, D.R.; Marcotte, E.M.; Penalva, L.O. Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Molecular systems biology* **2010**, *6*, 400.
310. Ding, Y.; Tang, Y.; Kwok, C.K.; Zhang, Y.; Bevilacqua, P.C.; Assmann, S.M. In vivo genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory features. *Nature* **2014**, *505*, 696-700, doi:10.1038/nature12756.
311. Wan, Y.; Qu, K.; Zhang, Q.C.; Flynn, R.A.; Manor, O.; Ouyang, Z.; Zhang, J.; Spitale, R.C.; Snyder, M.P.; Segal, E., et al. Landscape and variation of RNA secondary structure across the human transcriptome. *Nature* **2014**, *505*, 706-709, doi:10.1038/nature12946.
312. Ingolia, N.T.; Ghaemmaghami, S.; Newman, J.R.; Weissman, J.S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **2009**, *324*, 218-223, doi:10.1126/science.1168978.
313. Kristensen, A.R.; Gsponer, J.; Foster, L.J. Protein synthesis rate is the predominant regulator of protein expression during differentiation. *Mol Syst Biol* **2013**, *9*, 689, doi:10.1038/msb.2013.47.
314. Wilhelm, M.; Schlegl, J.; Hahne, H.; Gholami, A.M.; Lieberenz, M.; Savitski, M.M.; Ziegler, E.; Butzmann, L.; Gessulat, S.; Marx, H., et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* **2014**, *509*, 582-587, doi:10.1038/nature13319.
315. Jovanovic, M.; Rooney, M.S.; Mertins, P.; Przybylski, D.; Chevrier, N.; Satija, R.; Rodriguez, E.H.; Fields, A.P.; Schwartz, S.; Raychowdhury, R., et al. Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science* **2015**, *347*, 1259038, doi:10.1126/science.1259038.
316. Lin, J.; Amir, A. Homeostasis of protein and mRNA concentrations in growing cells. *Nat Commun* **2018**, *9*, 4496, doi:10.1038/s41467-018-06714-z.
317. Koussounadis, A.; Langdon, S.P.; Um, I.H.; Harrison, D.J.; Smith, V.A. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep* **2015**, *5*, 10775, doi:10.1038/srep10775.
318. Guo, Y.; Rubin, E.M.; Xie, J.; Zi, X.; Hoang, B.H. Dominant negative LRP5 decreases tumorigenicity and metastasis of osteosarcoma in an animal model. *Clin Orthop Relat Res* **2008**, *466*, 2039-2045, doi:10.1007/s11999-008-0344-y.
319. Guo, Y.; Zi, X.; Koontz, Z.; Kim, A.; Xie, J.; Gorlick, R.; Holcombe, R.F.; Hoang, B.H. Blocking Wnt/LRP5 signaling by a soluble receptor modulates the epithelial to mesenchymal transition and suppresses met and metalloproteinases in osteosarcoma Saos-2 cells. *J Orthop Res* **2007**, *25*, 964-971, doi:10.1002/jor.20356.
320. Chen, K.; Fallen, S.; Abaan, H.O.; Hayran, M.; Gonzalez, C.; Wodajo, F.; MacDonald, T.; Toretsky, J.A.; Uren, A. Wnt10b induces chemotaxis of osteosarcoma and correlates with reduced survival. *Pediatr Blood Cancer* **2008**, *51*, 349-355, doi:10.1002/pbc.21595.

-
321. Haydon, R.C.; Deyrup, A.; Ishikawa, A.; Heck, R.; Jiang, W.; Zhou, L.; Feng, T.; King, D.; Cheng, H.; Breyer, B., et al. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *Int J Cancer* **2002**, *102*, 338-342, doi:10.1002/ijc.10719.
322. Hoang, B.H.; Kubo, T.; Healey, J.H.; Sowers, R.; Mazza, B.; Yang, R.; Huvos, A.G.; Meyers, P.A.; Gorlick, R. Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer* **2004**, *109*, 106-111, doi:10.1002/ijc.11677.
323. Iwaya, K.; Ogawa, H.; Kuroda, M.; Izumi, M.; Ishida, T.; Mukai, K. Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta-catenin is associated with lung metastasis. *Clin Exp Metastasis* **2003**, *20*, 525-529, doi:10.1023/a:1025821229013.
324. Kansara, M.; Tsang, M.; Kodjabachian, L.; Sims, N.A.; Trivett, M.K.; Ehrich, M.; Dobrovic, A.; Slavin, J.; Choong, P.F.; Simmons, P.J., et al. Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J Clin Invest* **2009**, *119*, 837-851, doi:10.1172/JCI37175.
325. Jeanes, A.; Gottardi, C.J.; Yap, A.S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* **2008**, *27*, 6920-6929, doi:10.1038/onc.2008.343.
326. Hendriksen, J.; Jansen, M.; Brown, C.M.; van der Velde, H.; van Ham, M.; Galjart, N.; Offerhaus, G.J.; Fagotto, F.; Fornerod, M. Plasma membrane recruitment of dephosphorylated β -catenin upon activation of the Wnt pathway. *Journal of cell science* **2008**, *121*, 1793-1802.
327. Henderson, B.R.; Fagotto, F. The ins and outs of APC and β -catenin nuclear transport. *EMBO reports* **2002**, *3*, 834-839.
328. Cong, F.; Varmus, H. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*, 2882-2887.
329. Hendriksen, J.; Fagotto, F.; van der Velde, H.; van Schie, M.; Noordermeer, J.; Fornerod, M. RanBP3 enhances nuclear export of active β -catenin independently of CRM1. *The Journal of cell biology* **2005**, *171*, 785-797.
330. Sierra, J.; Yoshida, T.; Joazeiro, C.A.; Jones, K.A. The APC tumor suppressor counteracts β -catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes & development* **2006**, *20*, 586-600.
331. Hamada, F.; Bienz, M. The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear β -catenin from TCF. *Developmental cell* **2004**, *7*, 677-685.
332. Lauer, A.N.; Scholtysik, R.; Beineke, A.; Baums, C.G.; Klose, K.; Valentin-Weigand, P.; Ishikawa, H.; Schroten, H.; Klein-Hitpass, L.; Schwerk, C. A Comparative Transcriptome Analysis of Human and Porcine Choroid Plexus Cells in Response to Streptococcus suis Serotype 2 Infection Points to a Role of Hypoxia. *Front Cell Infect Microbiol* **2021**, *11*, 639620, doi:10.3389/fcimb.2021.639620.
333. Sharma, A.; Mir, R.; Galande, S. Epigenetic Regulation of the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway in Cancer. *Front Genet* **2021**, *12*, 681053, doi:10.3389/fgene.2021.681053.
334. Jones, P.A.; Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **2002**, *3*, 415-428, doi:10.1038/nrg816.
335. Parker, D.S.; Ni, Y.Y.; Chang, J.L.; Li, J.; Cadigan, K.M. Wingless signaling induces widespread chromatin remodeling of target loci. *Molecular and cellular biology* **2008**, *28*, 1815-1828.
336. Hoffmans, R.; Städeli, R.; Basler, K. Pygopus and legless provide essential transcriptional coactivator functions to armadillo/ β -catenin. *Current Biology* **2005**, *15*, 1207-1211.
337. Carrera, I.; Janody, F.; Leeds, N.; Duveau, F.; Treisman, J.E. Pygopus activates Wingless target gene transcription through the mediator complex subunits Med12 and Med13. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 6644-6649.
338. Brembeck, F.H.; Schwarz-Romond, T.; Bakkers, J.; Wilhelm, S.; Hammerschmidt, M.; Birchmeier, W. Essential role of BCL9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes & development* **2004**, *18*, 2225-2230.

-
339. Mosimann, C.; Hausmann, G.; Basler, K. β -catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nature reviews Molecular cell biology* **2009**, *10*, 276-286.
340. de la Roche, M.; Bienz, M. Wingless-independent association of Pygopus with dTCF target genes. *Current biology* **2007**, *17*, 556-561.
341. Fiedler, M.; Sánchez-Barrena, M.J.; Nekrasov, M.; Mieszczanek, J.; Rybin, V.; Müller, J.; Evans, P.; Bienz, M. Decoding of methylated histone H3 tail by the Pygo-BCL9 Wnt signaling complex. *Molecular cell* **2008**, *30*, 507-518.
342. Olson, L.E.; Tollkuhn, J.; Scafoglio, C.; Kronen, A.; Zhang, J.; Ohgi, K.A.; Wu, W.; Taketo, M.M.; Kemler, R.; Grosschedl, R., et al. Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell* **2006**, *125*, 593-605, doi:10.1016/j.cell.2006.02.046.
343. Arce, L.; Yokoyama, N.N.; Waterman, M.L. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **2006**, *25*, 7492-7504, doi:10.1038/sj.onc.1210056.
344. Blauwkamp, T.A.; Chang, M.V.; Cadigan, K.M. Novel TCF-binding sites specify transcriptional repression by Wnt signalling. *EMBO J* **2008**, *27*, 1436-1446, doi:10.1038/emboj.2008.80.
345. Jamora, C.; DasGupta, R.; Kocieniewski, P.; Fuchs, E. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* **2003**, *422*, 317-322, doi:10.1038/nature01458.
346. Kahler, R.A.; Westendorf, J.J. Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 11937-11944, doi:10.1074/jbc.M211443200.
347. Piepenburg, O.; Vorbruggen, G.; Jackle, H. Drosophila segment borders result from unilateral repression of hedgehog activity by wingless signaling. *Mol Cell* **2000**, *6*, 203-209.
348. Theisen, H.; Syed, A.; Nguyen, B.T.; Lukacsovich, T.; Purcell, J.; Srivastava, G.P.; Iron, D.; Gaudenz, K.; Nie, Q.; Wan, F.Y., et al. Wingless directly represses DPP morphogen expression via an armadillo/TCF/Brinker complex. *PLoS One* **2007**, *2*, e142, doi:10.1371/journal.pone.0000142.
349. Cowling, V.H.; D'Cruz, C.M.; Chodosh, L.A.; Cole, M.D. c-Myc transforms human mammary epithelial cells through repression of the Wnt inhibitors DKK1 and SFRP1. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 5135-5146, doi:10.1128/MCB.02282-06.
350. Cagnol, S.; Rivard, N. Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene* **2013**, *32*, 564-576, doi:10.1038/onc.2012.88.
351. Wu, X.; Tu, X.; Joeng, K.S.; Hilton, M.J.; Williams, D.A.; Long, F. Rac1 activation controls nuclear localization of β -catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* **2008**, *133*, 340-353.
352. Esufali, S.; Bapat, B. Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. *Oncogene* **2004**, *23*, 8260-8271, doi:10.1038/sj.onc.1208007.
353. Schlessinger, K.; Hall, A.; Tolwinski, N. Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev* **2009**, *23*, 265-277, doi:10.1101/gad.1760809.
354. Beckers, C.M.; Garcia-Vallejo, J.J.; van Hinsbergh, V.W.; van Nieuw Amerongen, G.P. Nuclear targeting of beta-catenin and p120ctn during thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. *Cardiovasc Res* **2008**, *79*, 679-688, doi:10.1093/cvr/cvn127.
355. Ilan, N.; Tucker, A.; Madri, J.A. Vascular endothelial growth factor expression, beta-catenin tyrosine phosphorylation, and endothelial proliferative behavior: a pathway for transformation? *Lab Invest* **2003**, *83*, 1105-1115, doi:10.1097/01.lab.0000083531.84403.8b.
356. Humtsoe, J.O.; Liu, M.; Malik, A.B.; Wary, K.K. Lipid phosphate phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures. *Mol Cell Biol* **2010**, *30*, 1593-1606, doi:10.1128/MCB.00038-09.

-
357. Cooper, L.C.; Prinsloo, E.; Edkins, A.L.; Blatch, G.L. Hsp90alpha/beta associates with the GSK3beta/axin1/phospho-beta-catenin complex in the human MCF-7 epithelial breast cancer model. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *413*, 550-554, doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.136.
358. Sharma, M.; Henderson, B.R. IQ-domain GTPase-activating protein 1 regulates beta-catenin at membrane ruffles and its role in macropinocytosis of N-cadherin and adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 8545-8556, doi:10.1074/jbc.M610272200.
359. Brunner, E.C.; Romeike, B.F.; Jung, M.; Comtesse, N.; Meese, E. Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* **2006**, *49*, 178-187, doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02440.x.
360. Harris, E.S.; Nelson, W.J. VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Curr Opin Cell Biol* **2010**, *22*, 651-658, doi:10.1016/j.ceb.2010.07.006.
361. Regan-Klapisz, E.; Krouwer, V.; Langelaar-Makkinje, M.; Nallan, L.; Gelb, M.; Gerritsen, H.; Verkleij, A.J.; Post, J.A. Golgi-associated cPLA2alpha regulates endothelial cell-cell junction integrity by controlling the trafficking of transmembrane junction proteins. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 4225-4234, doi:10.1091/mbc.E08-02-0210.
362. Franco, C.A.; Liebner, S.; Gerhardt, H. Vascular morphogenesis: a Wnt for every vessel? *Current opinion in genetics & development* **2009**, *19*, 476-483.
363. Polakis, P. Formation of the blood-brain barrier: Wnt signaling seals the deal. *The Journal of cell biology* **2008**, *183*, 371-373.
364. Junge, H.J.; Yang, S.; Burton, J.B.; Paes, K.; Shu, X.; French, D.M.; Costa, M.; Rice, D.S.; Ye, W. TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin-but not Wnt-induced FZD4/ β -catenin signaling. *Cell* **2009**, *139*, 299-311.
365. Hemler, M.E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature reviews Molecular cell biology* **2005**, *6*, 801-811.
366. Esser, S.; Wolburg, K.; Wolburg, H.; Breier, G.; Kurzchalia, T.; Risau, W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* **1998**, *140*, 947-959, doi:10.1083/jcb.140.4.947.
367. Parab, S.; Quick, R.E.; Matsuoka, R.L. Endothelial cell-type-specific molecular requirements for angiogenesis drive fenestrated vessel development in the brain. *Elife* **2021**, *10*, doi:10.7554/eLife.64295.
368. Margariti, A.; Zampetaki, A.; Xiao, Q.; Zhou, B.; Karamariti, E.; Martin, D.; Yin, X.; Mayr, M.; Li, H.; Zhang, Z. Histone deacetylase 7 controls endothelial cell growth through modulation of β -catenin. *Circulation research* **2010**, *106*, 1202-1211.
369. Borkowski, J.; Li, L.; Steinmann, U.; Quednau, N.; Stump-Guthier, C.; Weiss, C.; Findeisen, P.; Gretz, N.; Ishikawa, H.; Tenenbaum, T., et al. Neisseria meningitidis elicits a pro-inflammatory response involving IkappaBzeta in a human blood-cerebrospinal fluid barrier model. *J Neuroinflammation* **2014**, *11*, 163, doi:10.1186/s12974-014-0163-x.
370. Schwerk, C.; Adam, R.; Borkowski, J.; Schneider, H.; Klenk, M.; Zink, S.; Quednau, N.; Schmidt, N.; Stump, C.; Sagar, A., et al. In vitro transcriptome analysis of porcine choroid plexus epithelial cells in response to Streptococcus suis: release of pro-inflammatory cytokines and chemokines. *Microbes Infect* **2011**, *13*, 953-962, doi:10.1016/j.micinf.2011.05.012.

VII. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Schematische Gegenüberstellung der drei Endothelgrundtypen.</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 2 Schematische Darstellung von PLVAP.</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 3 Ausprägungen der Barrieren zwischen peripherem Blutkreislauf oder Gewebe und dem ZNS.</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 4 Schematische Darstellung des WNT-Signalweg.</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 5 Graphischer Vergleich der Transkriptome von HCPEnC und iHCPEnC.</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 6 Bestimmung der Ähnlichkeit der drei Zelllinien durch Gegenüberstellung der Genexpressionsdaten in Form von Scatterplots.</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 7 Übersicht der signifikanten Gene.</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 8 Vergleich der Transkriptome zwischen HCPEnC p6, iHCPEnC p20 und IHCPEnC p50.</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 9 Aufteilung der signifikanten Gene nach hoch- und herunterregulierten Genen.</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 10 Entwicklung der Genexpression von der jüngeren zur älteren Passage.</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 11 Vergleich der signifikanten Gene.</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 12 Dot Blots der GSEA ermittelten GOBP.</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 13 Dot Blots der mit Hilfe der GSEA ermittelten Reaktome.</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 14 Vergleich der Expression endothel-relevanter Gene zwischen HCPEnC p6, iHCPEnC p20 und IHCPEnC p50.</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 15 Expression des kanonischen WNT-Signalweges in HCPEnC.</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 16 Expression des kanonischen WNT-Signalweges in iHCPEnC.</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 17 Graphische Darstellung der in der qRT-PCR ermittelten CT-Werte zur Überprüfung der Expression von Wnt-Liganden, Rezeptoren & Ko-Rezeptoren, Modulatoren, Signalübermittlern und Zielgenen.</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 18 Graphische Darstellung der relativen Expression von WNT-Liganden, Rezeptoren & Ko- Rezeptoren, Modulatoren und Signalübermittlern & Zielgenen in HCPEnC und iHCPEnC.</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 19 Graphische Darstellung der Fold change der WNT-Liganden, Rezeptoren & Ko-Rezeptoren, Modulatoren und Signalübermittlern & Zielgenen.</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 20 CTNNB Translokation nach 1h Behandlung mit 10 mM LiCl.</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 21 Stimulation des WNT-Signalweges.</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 22 Nukleare Translokation von CTNNB.</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 23 CTNNB Translokation nach Behandlung mit GSK3β-Inhibitor SB 216763.</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 24 Expressionslevel ausgesuchter Zielgene nach Behandlung mit GSK3β-Inhibitor.</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 25 Ko-Lokalisation von CTNNB mit unterschiedlichen Zellorganellen.</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 26 Einfache Konzentrationsbestimmung von SB 216763.</i>	<i>117</i>
<i>Abbildung 27 Überprüfung der Konzentrationsbestimmung von SB 216763.</i>	<i>118</i>

VIII. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Reaktionsansatz einer konventionellen PCR</i>	33
<i>Tabelle 2 Reaktionsbedingungen der konventionellen PCR</i>	33
<i>Tabelle 3 Reaktionsansatz einer qRT-PCR</i>	34
<i>Tabelle 4 Reaktionsbedingungen der qRT-PCR</i>	34
<i>Tabelle 6 Quantitative PCR zur Validierung der Transkriptomdaten der MACE-Analyse</i>	40
<i>Tabelle 7 Vergleich der Fold changes der endothel relevanten Gene</i>	58
<i>Tabelle 8 Gegenüberstellung jeweiliger relativen Expression von HCPEnC und iHCPEnC sowie der Fold change</i>	65

IX. Anhang

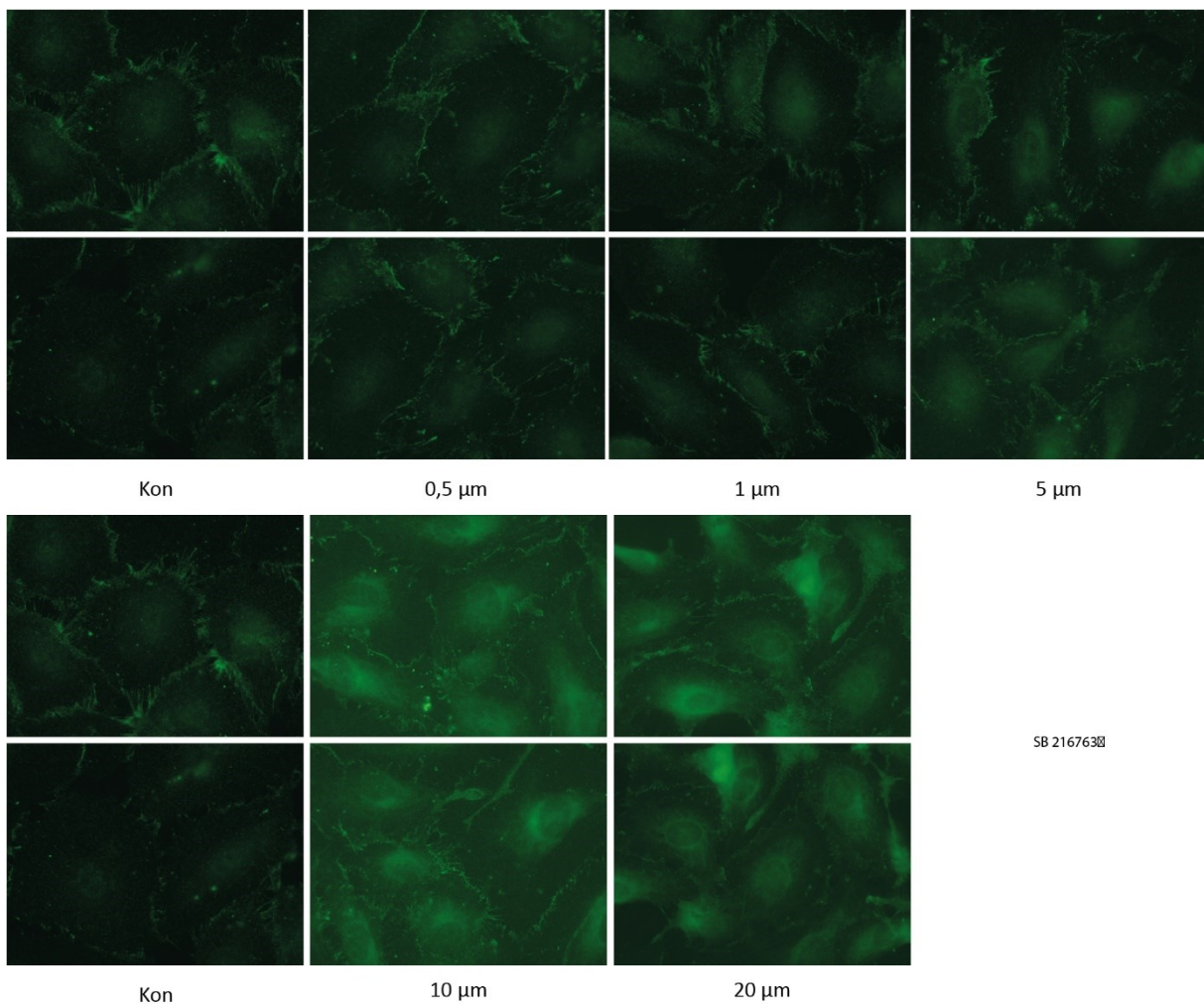


Abbildung 26 Einfache Konzentrationsbestimmung von SB 216763. Die zu verwendende Konzentration des Inhibitors wurde anhand einer Konzentrationsreihe getestet. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen CTNNB durchgeführt, um mögliche Effekte aufzudecken und ein Durchschießen des Antikörpers in einen anderen Kanal auszuschließen.

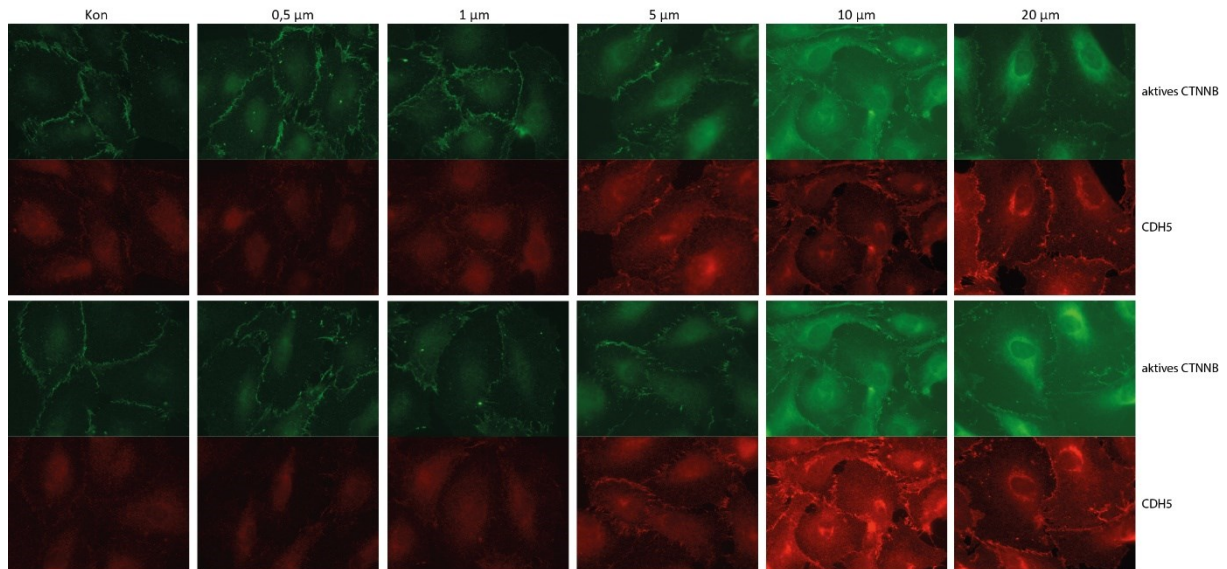


Abbildung 27 Überprüfung der Konzentrationsbestimmung von SB 216763. Die zu verwendende Konzentration des Inhibitors wurde erneut anhand einer Konzentrationsreihe getestet. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen CTNNB und CDH5 durchgeführt, um mögliche Effekte aufzudecken.

X. Publikationen

Denzer, L., Schrotten, H., Schwerk, C. (2020). **From Gene to Protein—How Bacterial Virulence Factors Manipulate Host Gene Expression During Infection** *Int. J. Mol. Sci.* 21 (10)

Denzer, L., Schrotten, H., Schwerk, C. (2022). **The role of PLVAP in endothelial cells** (*in preparation*)

XI. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Horst Schroten, Leiter der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsmedizin Mannheim für das interessante Promotionsthema und die großzügige Unterstützung während der Erarbeitung meiner Dissertation.

Ich möchte mich selbstverständlich auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Lanzer für die Betreuung der TAC-Meetings und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christian Schwerk als Laborleiter und Betreuer dieser Doktorarbeit für die Unterstützung, die konstruktiven Anregungen und der allzeit vorhandenen Bereitschaft zur Diskussion auch während der Korrektur und der Klärung auftretender Fragen oder Probleme.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinem Betreuer Walter bedanken, für seine wissenschaftliche und anhaltende methodische Hilfestellung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Ich möchte ganz besonders Selina, Carolin, Julia, Svenja und Ulrike für die große Unterstützung, die zahlreichen und unermüdlichen fachlichen Gespräche, Ratschläge und Anmerkungen, die mich auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte und Ansätze entdecken ließen, danken.

Natürlich möchte ich auch meine Doktorandenkolleginnen und -kollegen Rosanna, Alexa, Marie und Franjo für die gegenseitige Unterstützung und Erheiterung während der gemeinsam verbrachten Zeit danken. Ich bin dankbar für die unermüdliche Stärkung und Motivierung, sowie für das stets offene Ohr für meine Gedanken. Mein besonderer Dank geht an Rosanna für die vielen lustigen Stunden und die ausführlichen Analysen und Empfehlungen von Büchern, Musik, Filmen und Serien.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für die großartige Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die erheiternden Mittagspausen.

Meinem Freundeskreis möchte ich für die Ermutigungen und Zusprüche während dieser Arbeit danken, aber auch für so manch schöne gemeinsam verbrachte Stunde, um auf andere Gedanken zu kommen und mal abzuschalten.

Vor allem aber möchte ich meiner Familie für ihre Rücksichtnahme sowie ihre grenzenlose Unterstützung und Förderung danken. Vielen Dank für die Inspiration und Motivation, um immer alles zu geben und mein Bestes zu versuchen.

Ganz besonders möchte ich meinem Mann, Tommi, für seine Geduld und seinen Beistand danken. Herzlichsten Dank dafür, mich immer auf meinem Weg zu begleiten und zu ermutigen, mich immer wieder aufzuheitern und zum Lachen zu bringen