

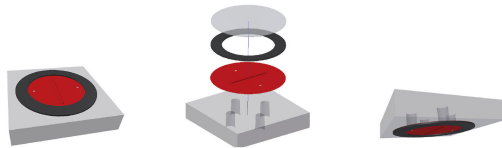


Darja Ivannikov (Autor)

In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren

Darja Ivannikov

***In vitro* Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7192>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



2. Einleitung

Die Aufklärung des Penetrationsverhaltens von Chemikalien, aber auch von Kosmetika oder möglichen pharmakologisch aktiven Wirkstoffen zur Entwicklung und Erprobung neuer Therapiemöglichkeiten in der Medizin, stellt einen wichtigen Bereich in der Medikamentenentwicklung und in der Grundlagenforschung dar. Heutzutage wird die Arzneimittelsicherheit für gewöhnlich an Tieren überprüft und die erzielten Daten auf Menschen übertragen. Obwohl die Übertragung dieser Daten durch die Einführung der Untersuchungspflicht der Toxizität an Nichtnagern erheblich verbessert wurde, reflektieren die in Hunden und Ratten erzielten Ergebnisse nur bedingt den Reaktionsablauf eines Wirkstoffs im Menschen.^[1-3] Die Erfahrungen der letzten Jahre lehrten, dass Erkenntnisse aus Tierversuchen aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden nur begrenzt auf den Menschen übertragbar sind, was eine große Diskussion über die Einführung von Alternativmethoden entfachte. Zudem sind Tierversuche ethisch fraglich sowie kosten- und zeitaufwendig. Vor allem Tierschützer fordern deshalb Alternativmethoden, die einen Großteil der Tierversuche ersetzen.

2.1 Alternativmethoden zum Tierversuch

Zurzeit steht bei vielen Forschungsgruppen das Tissue Engineering als Ersatzverfahren für Tierversuche im Fokus. Ziel des Tissue Engineerings ist es, biologische Ersatzgewebe zu entwickeln, um organospezifische Experimente *in vitro* durchzuführen. Diese *in vitro* Systeme sind zumeist billiger, schneller und besser sowohl für das Hochdurchsatz-Screening (engl. High Throughput Screening (HTS)) von Substanzen, als auch für die Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene geeignet. Des Weiteren erlauben diese Systeme eine genaue Kontrolle der eingesetzten Parameter, während im Tiermodell eine exakte Modulation von z.B. Blutfaktoren oder die Analyse von Aufnahmeprozessen verschiedener Wirkstoffe nicht möglich ist.^[4] Organotypische Gewebekulturen haben in einigen wenigen Bereichen der regenerativen Medizin bereits Anwendung gefunden. Insbesondere auf menschlichem Material basierende *in vitro* Systeme haben großen Anklang in Wissenschaftskreisen erlangt. Im Vergleich zu Tierversuchen reflektieren diese Systeme die Physiologie des menschlichen Körpers besser und können demzufolge verlässlichere Vorhersagen über die Toxizität eines Medikaments liefern. Aufgrund einer einfacheren und schnelleren Bedienung können diese Systeme in den Anfangsphasen der Medikamentenentwicklung eingesetzt werden und somit die pharmazeutische Wirkstoffgenerierung erheblich beschleunigen.^[5] Daher wurden die ersten konventionellen zweidimensionalen (2D) *in vitro* Modelle bereits im letzten Jahrhundert entwickelt.^[6] Das Grundprinzip für die Generierung eines derartigen Gewebes ist dabei die Entnahme einer Biopsie. In der Regel werden hierfür zunächst kleine Proben des entsprechenden Gewebes entnommen und primäre Zellen isoliert. Diese sogenannten Vorläuferzellen werden dann *in vitro* durch bekannte Zellkulturtechniken vermehrt bis genügend vermehrungsfähige Zellen zur Verfügung stehen. Dabei stellt sich das Problem, dass viele Zellen zwar im Körper hochregenerativ sind, sich *in vitro* jedoch kaum noch teilen. Zudem kommt es in einer Monolayer-Kultur meist bereits nach wenigen Tagen während der Vermehrungsphase zu einer Dedifferenzierung, d.h. zu einer Veränderung der Morphologie und des Stoffwechsels. Die Zellen verlieren dabei einen Teil ihrer gewebetypischen Eigenschaften. Für den Erhalt der *in vitro* Zellfunktionalität ist deshalb die Nachbildung einer möglichst gewebeähnlichen Mikroumgebung wichtig.^[7] Denn Organe bestehen aus einer Vielzahl verschiedener Zellen in einer dreidimensionalen (3D) Anordnung und sind durch eine kontinuierliche Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktion



gekennzeichnet. Somit sind die 2D-Modelle, trotz ihres erheblichen Beitrags in der Biomedizin, zur Rekonstruktion von organspezifischen und ausdifferenzierten Zellkulturen sowie zur akkuraten Vorhersage der *in vivo* Funktion ungeeignet.^[8] Diese Limitierung führte vor 50 Jahren zur Etablierung neuer, auf 3D-Architektur basierender Modelle, der sogenannten Organoiden, bestehend aus Hydrogelen aus einer natürlichen Extrazellulärmatrix (EZM) oder synthetischen Polymeren und darin wachsenden Zellen.^[9] Zahlreiche Publikationen belegen den Nutzen dieser Systeme in der Aufklärung molekularer Vorgänge, Signalkaskaden und Arzneimittelwirkung.^[10-12] Allerdings variieren die Organoiden sehr stark in ihrer Form und Größe.^[13] Auch die oft unzureichende Versorgung der Zellen im Inneren der 3D-Modelle stellt eine große Herausforderung dar und führt häufig zum Absterben dieser Zellen. Demzufolge sind diese *in vitro* Modelle auch mit einer Vielzahl von Limitierungen verbunden. Denn neben dem Aufbau der Mikroumgebung tragen ebenfalls mechanische Stimuli, wie z.B. Erzeugung von Scherkräften durch den kontinuierlichen Blutfluss sowie Dehnungen, wie etwa in der Lunge durch Atembewegungen oder im Darm durch die Verdauung, zur korrekten Ausbildung eines Organs bei. Das Vorhandensein chemischer Gradienten und deren zeitliche und räumliche Trennung sind gleichermaßen wichtige Komponenten in der Aufrechterhaltung einer physiologischen Organfunktion.^[14] Aus diesen Überlegungen heraus, wird der Fokus der heutigen Wissenschaft auf Mikrosysteme namens „Organs-on-Chips“ verlagert. Das zugrunde liegende Konzept wurde aus der Mikrochipindustrie entnommen und mit weiteren Bausteinen, wie z.B. einer Mikrofluidik, verknüpft. So wachsen die Zellen in kleinen Chips, hergestellt mit Hilfe von Mikrofabrikationstechnik, oft unter Anwendung von Pumpensystemen zur Erzeugung von Scherkräften und artifiziellen Blutströmen. Dieses Design gewährleistet eine genaue Kontrolle der Mikroumgebung sowie deren gezielte Manipulation. In den letzten Jahren wurden viele Fortschritte auf diesem Gebiet gemacht. Es wurden Chips entwickelt, die künstlich hergestellte Organe darstellen, wie z.B. Lunge, Niere oder Leber.^[15-17] Zudem wurden Versuche unternommen, die einzelnen Modelle untereinander zu verknüpfen.^[18] Der Vorteil an diesem Konzept liegt in der Möglichkeit, nicht nur die Interaktionen zwischen verschiedenen Geweben eines einzigen Organs, sondern die Interaktionen der Organe untereinander zu untersuchen. Die Nachbildung verschiedener Krankheitsbilder in solchen Systemen würde einen Fortschritt für die Entwicklung neuer Medikamente und Behandlungsmethoden bedeuten.^[19]

2.2 Biologische Barrieren

Der menschliche Körper kann als eine Ansammlung verschiedener, mit Gas und Flüssigkeiten gefüllter Kompartimente betrachtet werden. Dazu zählen z.B. Lunge, Magen, Darm, Schilddrüse und Brustdrüsen. Für eine physiologisch korrekte Funktion dieser Organe ist eine gegenseitige Abgrenzung durch biologische Barrieren von enormer Bedeutung. Diese biologischen Barrieren, wie z.B. Blutgefäße, Blut-Hirn-Schranke (BBB, engl. Blood-Brain-Barrier), Epidermis und Darmschleimhaut, trennen die einzelnen Organe voneinander und sorgen für einen gegenseitigen, kontrollierten Austausch von Substanzen.^[20] Je nach Organ kann der Stofftransport zwischen Blut und Gewebe unterschiedlich stark eingeschränkt sein. Dieser kontrollierte Stofftransport erfolgt dank vieler Zell-Zell-Kontakte, die je nach Organ unterschiedlich stark ausgeprägt sind und eine unterschiedlich starke Durchlässigkeit für die im Blut transportierten Stoffe bewirken (Abbildung 1). Zum Beispiel besitzen Leber, Milz und Knochenmark sehr durchlässige Blutgefäße mit einem sogenannten diskontinuierlichen Endothel. Sein Zelllayer ist durch viele Öffnungen gekennzeichnet und für polare Substanzen permeabel. Andere Organe, wie z.B. Hormondrüsen, Gastrointestinaltrakt oder Niere, verfügen dagegen über fenestrierte Endothelien, die kleine Löcher aufweisen und nur für einige wenige lipophile Substanzen durchlässig sind. Noch weniger durchlässige Barrieren sind in unserem Zentralnervensystem (ZNS), Lymphknoten oder Muskeln vorzufinden. Ihr sogenanntes kontinuierliches Endothel wird nur durch lipophile Stoffe penetriert. Das kontinuierliche Endothel der BBB wird zusätzlich durch Perizyten und Gliazellen unterstützt und stellt somit die dichteste Barriere des menschlichen Körpers dar (Abbildung 2).^[21-23]

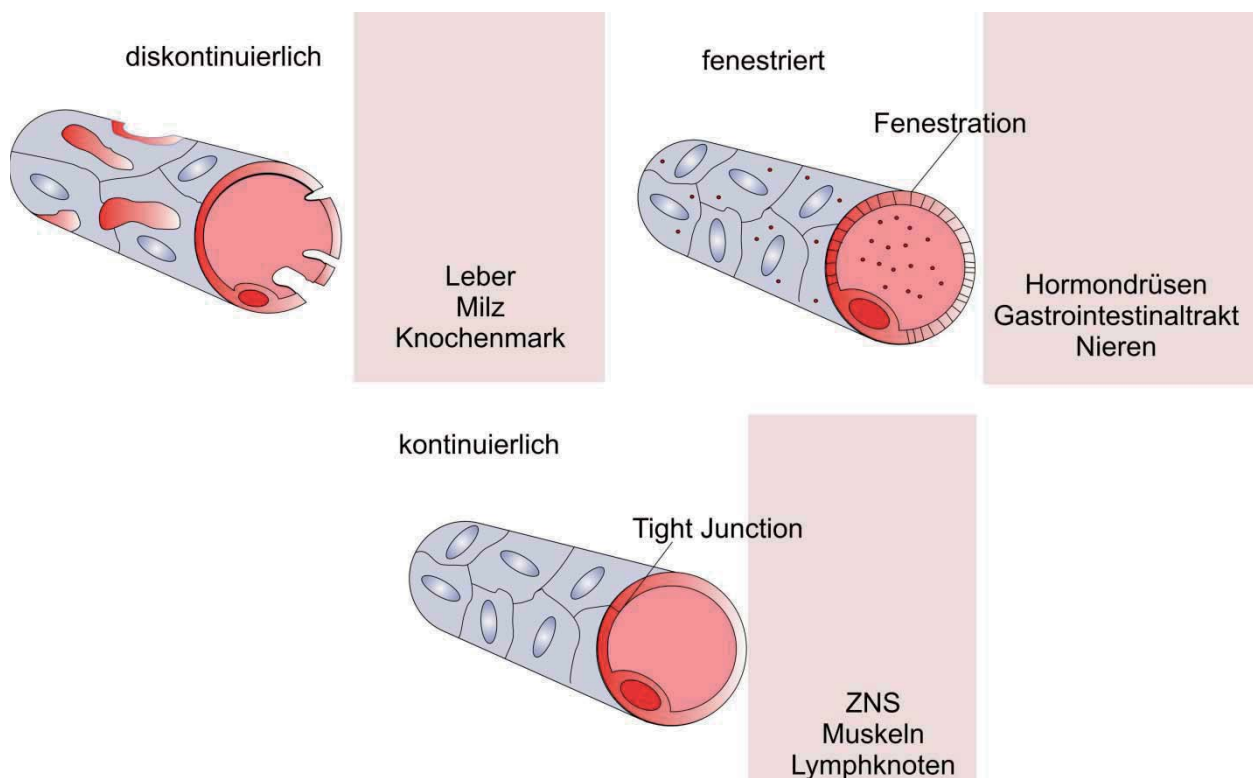


Abbildung 1: Die Blutgefäße unterscheiden sich je nach der Lokalisation im Körper in ihrer Permeabilität und Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase. Es wird zwischen (a) diskontinuierlichen, (b) fenestrierten und (c) kontinuierlichen Blutgefäßen unterschieden (modifiziert nach Hoffmann et al., 2014).^[21]



2.2.1 Blut-Hirn-Schranke

2.2.1.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn ist das zentrale Organ des ZNS und dient als Hauptintegrationsort für alle Prozesse, die in einem Organismus stattfinden. Etwa 20% aller metabolischen Vorgänge erfolgen im Gehirn.^[24] Folglich sind die Aufrechterhaltung der Gehirn-Homöostase sowie dessen Schutz vor Toxinen und Entzündungen von enormer Bedeutung. Die BBB stellt eine dichte metabolische und biochemische Barriere des Gehirns dar, deren Aufgabe im selektiven Stofftransport zwischen der Blutzirkulation und dem umgebenden Nervengewebe besteht. Zum einen versorgt sie das Gehirn mit den wichtigen Nährstoffen und ist gleichzeitig für den Rücktransport von Abfallprodukten in das Blut zuständig. Zum anderen schützt sie das Gehirn vor Schwankungen der Ionenkonzentrationen, die z.B. infolge von Mahlzeiten oder körperlichen Anstrengungen zustande kommen und in der Lage sind, synaptische und axonale Wechselwirkungen zu stören.^[25] Des Weiteren grenzt sie die Neurotransmitter und neuroaktiven Moleküle des ZNS von denen der peripheren Organe und Blutströme ab, so dass gleiche Moleküle innerhalb eines Organismus in unterschiedlichen Konzentrationen und ohne Interaktion wirken können. Die BBB ist aus Endothelzellen und einer darunter liegenden, neurovaskulären Einheit aufgebaut. Die Letztere besteht aus Perizyten, Astrozyten, Neuronen, Oligodendroglia und Mikrogliazellen (Abbildung 2).^[26] Während die Neuronen an der Synapsen-Ausbildung und demzufolge an der Signalübertragung beteiligt sind, liegt die Hauptaufgabe der Gefäß- und Gliazellen in der Angiogenese, Remodellierung, Immunfunktion und Zwischenspeicherung von Ionen.^[27]

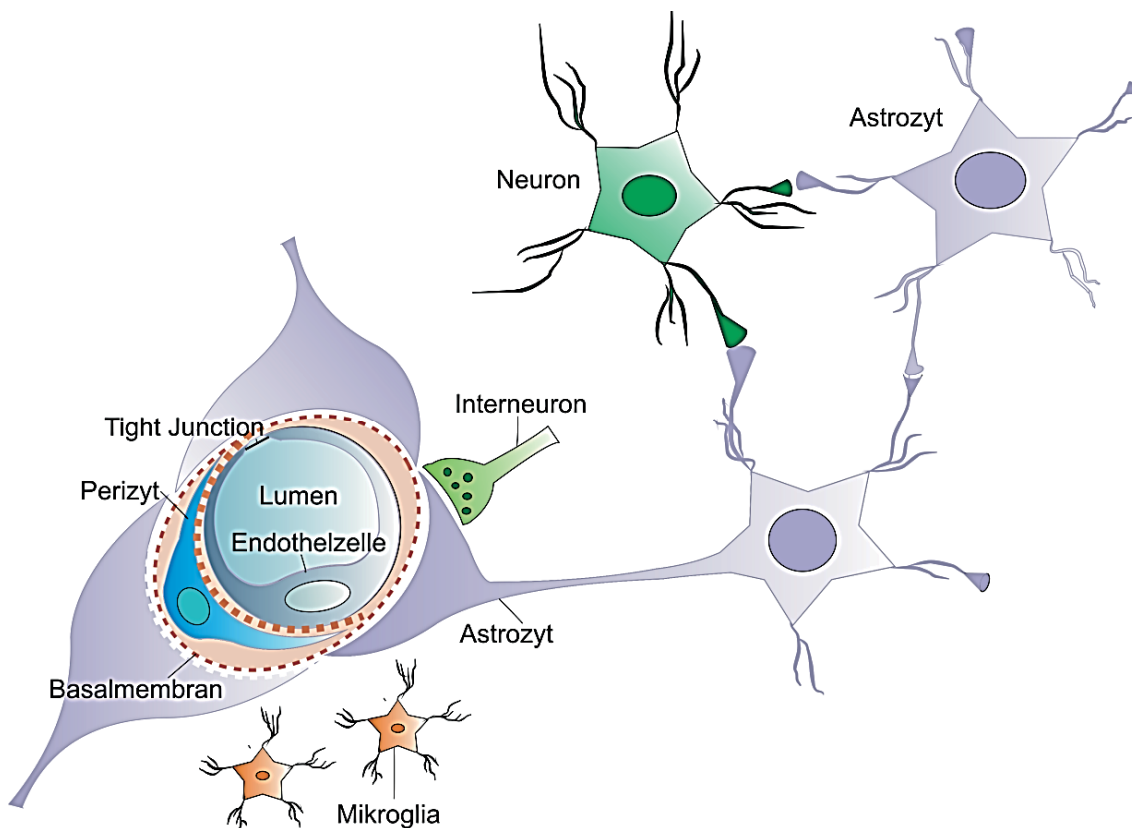


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der BBB. Die BBB besteht aus den Endothelzellen und der umgebenden neurovaskulären Einheit, die sich aus Perizyten, Astrozyten und Neuronen zusammensetzt (modifiziert nach Abbott et al., 2006).^[26]

2.2.1.2 Hirnendothel

Aufgrund der großen Oberfläche (ca. 20 m² pro 1,3 kg Gehirn) und einer kleinen Diffusionsstrecke zwischen den Neuronen und Kapillaren, repräsentiert das Hirnendothel eine sehr wichtige Komponente der BBB.^[26] Im Vergleich zu den peripheren Blutgefäßen sind die Hirnkapillaren durch eine geringe Pinozytose, Abwesenheit der Fenestration und asymmetrische Expression der Membrantransporter charakterisiert.^[28] Außerdem sind die Hirnkapillaren dank einem eng ineinander verflochtenen Netzwerk aus Tight Junctions und Adherens Junctions 50- bis 100-fach undurchlässiger im Vergleich zu peripheren Mikrogefäßen, in denen die Endothelzellen durch 50 nm große Gap Junctions voneinander getrennt werden (Abbildung 3).^[29, 30]

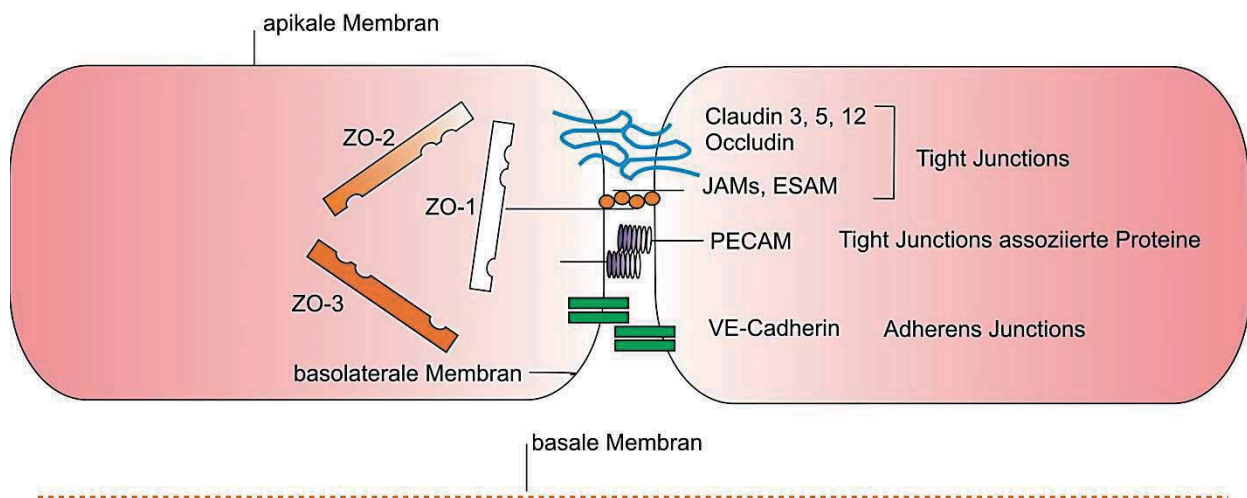


Abbildung 3: Molekulare Zusammensetzung endothelialer Tight Junctions: Zu den wichtigsten Komponenten der Tight Junctions gehören die Transmembranproteine Occludin und Claudin (-3, -5, -12). Weitere Transmembranproteine, die für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Tight Junctions verantwortlich sind, sind die junctionalen Adhäsionsmoleküle JAM (engl. junctional adhesion molecule) und die endothelialen selektiven Adhäsionsmoleküle ESAM (engl. endothelial selective adhesion molecule). Die Transmembranproteine bilden Kontakte zu den peripheren Proteinen, welche ihrerseits große Proteinkomplexe bilden. Die wichtigsten Bestandteile dieser Proteinkomplexe sind ZO-Proteine (engl. zonula occludens), die mit ihren zahlreichen Protein-Protein-Domänen als Adapterproteine dienen. VE-Cadherin (vaskulär-endotheliales Cadherin) gehört zu den bedeutendsten endothelialen Adhäsionsproteinen. PECAM-1 (engl. platelet/endothelial cell adhesion molecule) vermittelt die homophile Adhäsion zwischen den Zellen (modifiziert nach Abbott et al., 2006).^[26]

Auf diesem Weg kontrolliert das Hirnendothel die Permeabilität und reguliert den Transport durch die BBB. Nur manche kleinen lipophilen Moleküle, wie z.B. der medikamentös eingesetzte Stoff Barbiturat (Abbildung 5), und manche polaren Verbindungen, wie z.B. Ethanol, sind in der Lage die BBB passiv zu überwinden. Der Transport der restlichen Moleküle wird durch zahlreiche Rezeptoren gewährleistet. Beispielweise werden Insulin und Transferrin aktiv ins Hirngewebe aufgenommen. Aber auch essentielle Moleküle, wie z.B. Glukose und Aminosäuren, unterliegen dem aktiven Transport. Die Aufnahme von Peptiden und Lipoproteinen findet über adsorptive Transzytose statt (Abbildung 4).

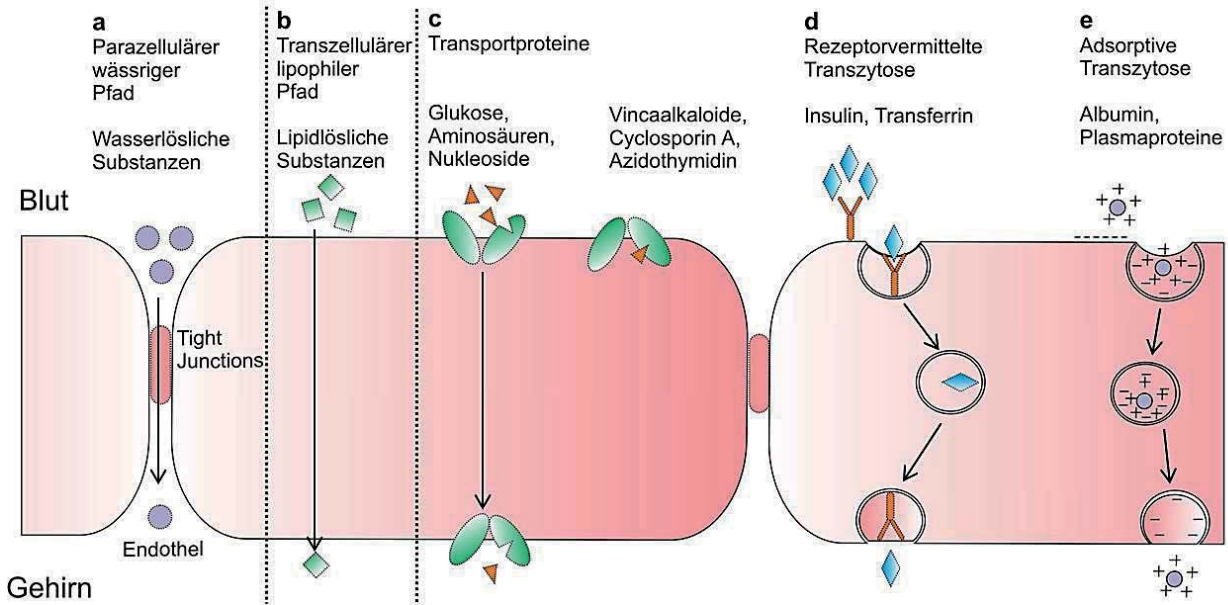


Abbildung 4: Molekültransport entlang der Endothelzellen der BBB. (a) Die Tight Junctions verhindern den Transport von wasserlöslichen Substanzen und polaren Medikamenten. (b) Lipidlösliche Substanzen können hingegen aufgrund der großen aktiven endothelialen Oberfläche die Zellmembran passieren. (c) Die Transportproteine können Moleküle wie Glukose, Aminosäuren, Nukleinbasen, Nukleoside und Cholin durch die Zellmembran befördern. Einige solcher Transportproteine sind energieabhängig und fungieren als Efflux-Pumpen, wie z.B. das P-Glykoprotein (P-gp). (d) Spezifische Proteine, wie z.B. Insulin und Transferrin, werden mit Hilfe von Rezeptorvermittelter Transzytose oder Endozytose transportiert. (e) Große Plasmaproteine werden in der Regel nicht durch die Membranen transportiert. Allerdings kann die Kationisierung dieser Moleküle zur einer adsorptionsvermittelten Transzytose oder Endozytose führen (modifiziert nach Abbott et al., 1996).^[31]

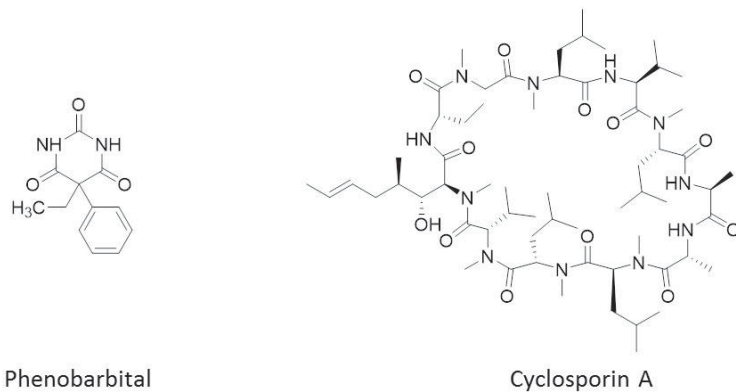


Abbildung 5: Beispiel der Substanzen, welche die BBB passiv überwinden (Phenobarbital) und nicht kreuzen (Cyclosporin A).

Bemerkenswert ist ebenfalls, dass manche aufgenommenen Moleküle durch eine spezielle Rezeptorklasse namens ABC Transporter (engl. adenosine triphosphate-binding cassette transporter), auch Efflux-Pumpen genannten, zurück in den Blutkreislauf ausgeschleust werden können (Abbildung 7).^[32] In Kombination mit den Phase II Enzymen und Cytochrom P450 schützen diese Efflux-Pumpen das ZNS vor dem Einfluss schädlicher wasser- und fettlöslicher Substanzen. Gleichzeitig ist diese starke Barriereintegrität eine Ursache für die Resistenz gegen Wirkstoffe. Folglich stellt die BBB ein großes Hindernis für die medikamentöse Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer, Epilepsie und Hirntumoren, dar.^[33]



In der Literatur wird die Barriereintegrität des Endothels oft als TEER (engl. transendothelial electrical resistance) Wert angegeben, welcher den elektrischen Widerstand des Zelllayers beschreibt. Der TEER Wert der BBB beträgt *in vivo* ca. $1800 \Omega \text{ cm}^2$.^[34, 35]

2.2.1.3 Astrozyten

Es gibt viele *in vitro* und *in vivo* Indizien, dass Astrozyten eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Barriere-Funktion innerhalb des Hirnendothels spielen.^[36, 37] Astrozyten sind für die Aufrechterhaltung der Homöostase von Ionen, Aminosäuren, Neurotransmittern und Wasser verantwortlich.^[26] Die Morphologie der Astrozyten umfasst elf verschiedene Typen, abhängig von der Lokalisation im Körper und der Interaktionen mit anderen Zellen. Dabei bilden acht Astrozyten-Typen einen direkten Kontakt zu Blutgefäßen.^[38] Die Kommunikation zwischen BBB und Astrozyten erfolgt über einen langen Fortsatz des Astrozyten-Zellkörpers, das Astrozyten-Endfüßchen. Zahlreiche *in vitro* Experimente zeigten, dass diese Zellen einen Einfluss auf verstärkte Ausbildung von Tight Junctions sowie die Expression und Lokalisation von Membrantransportern (P-gp und Glut1 (engl. Glucose transporter 1)) und Enzymsystemen haben.^[39-42] Die Kokultur von Endothelzellen und Astrozyten führte zu einem höheren TEER Wert und zu einer verringerten Barriere-Permeabilität.^[43-45] Außerdem sind sie für eine richtige Anordnung der Endothelzellen und Perizyten in röhrenförmige Strukturen *in vitro* verantwortlich, was auf ein Zusammenspiel dieser drei Zelltypen hindeutet.^[46] Des Weiteren bilden diese Zellen einen Verknüpfungspunkt zwischen der BBB und den Neuronen. Umgekehrt üben Endothelzellen ebenfalls eine Wirkung auf das Wachstum und die Differenzierung der Astrozyten aus. Die Untersuchungen an der BBB beweisen, dass Endothelzellen Mediatoren, wie z.B. den Leukämieinhibitionsfaktor (LIF), sekretieren, die die Ausdifferenzierung der Astrozyten induzieren.^[47] Die Kokultur dieser Zellen führt zur Hochregulierung von antioxidativen Enzymen in beiden Zelltypen.^[48]

2.2.1.4 Perizyten

Perizyten sind murale Zellen und sitzen direkt neben den Endothelzellen.^[49] Die beiden Zelltypen teilen sich eine gemeinsame Basalmembran, wobei die Interaktionen zwischen Endothelzellen und Perizyten über Tight Junctions, Gap Junctions und Adhäsionskontakte an basalmembran-freien Stellen stattfindet. Diese Stellen werden als „peg-socket“ Kontakte bezeichnet und sind durch die Membraneinstülpung der beiden Zellen charakterisiert.^[50-52] Perizyten des ZNS sind flach, langgestreckt und haben dank multipler zytoplasmatischer Ausstülpungen eine sternartige Morphologie. Auf diese Art schließen sie Blutgefäße ein und bedecken eine große abluminale Fläche.^[49] Das quantitative Verhältnis zwischen den Endothelzellen und Perizyten variiert sehr stark innerhalb des Körpers: es beträgt 1:100 in Skelettmuskeln und kann 1:1 in der Retina sein.^[53] Ein Perizyt innerhalb der BBB umgibt zwischen drei bis vier Endothelzellen und kann demzufolge der Informationsübertragung zwischen diesen Zellen dienen.^[49, 54]

Obwohl zahlreiche Publikationen belegen, dass Astrozyten eine große Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Barriere-Funktion der BBB spielen, konnten *in vitro* Kokultur-Modelle aus Endothelzellen und Astrozyten bisher keine physiologischen TEER Werte reproduzieren.^[55-58] Die BBB ist ein komplexes System und besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen, die miteinander über verschiedene Wege interagieren. Dazu zählen sowohl direkte Zell-Zell-Kontakte als auch Interaktion über andere Zellen, elektrische Signalübertragung, mechanische Kräfte oder parakrine Stoffsekretion.^[59]



Laut Literatur können Perizyten ebenfalls einen Einfluss auf die korrekte Ausbildung und Aufrechterhaltung der BBB haben.^[44, 49, 56, 60, 61]

2.2.1.5 Efflux-Pumpen

Die Aufrechterhaltung der Gehirn-Homöostase, eine der wichtigsten Aufgaben der BBB, wird unter anderem durch bestimmte Efflux-Pumpen kontrolliert. Zu den bedeutendsten dieser Efflux-Pumpen gehört die Gruppe der ABC Transporter. Sie schützen das Gehirn vor den eingedrungen lipophilen Substanzen, toxischen Metaboliten, Bakterien und Xenobiotika, indem sie sie aus dem Gehirn zurück in den Blutkreislauf transportieren.^[61] Die ABC Transporter sind aus mehreren Domänen bestehende, integrale Proteine und werden hauptsächlich auf der luminalen Membranseite der Endothelzellen exprimiert. Sie nutzen die Energie der ATP-Hydrolyse, um eine Konformationsänderung zu durchlaufen und auf diese Weise den Stofftransport durchzuführen.^[62] Sie stellen eine hochkonservierte Super-Proteinfamilie dar und werden in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren exprimiert. Weiterhin sind sie für viele bekannte biomedizinische Phänomene verantwortlich, wie etwa die Resistenz von Krebszellen oder krankheitserregenden Bakterien gegen medikamentöse Behandlung.^[63] Bisher konnten über 200 verschiedene Proteine innerhalb der ABC Superfamilie identifiziert werden, davon wurden 48 im Menschen nachgewiesen.^[64]

Momentan gehört das P-gp, auch ABCB1 (engl. ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1) genannt, zu den am besten charakterisierten Proteinen dieser Gruppe. Es handelt sich um eine 170 kDa große, membrangebundene Efflux-Pumpe und eine wichtige selektive Komponente der BBB.^[65, 66] Es wird vom Gen MDR1 kodiert.^[67, 68] Die Entdeckung von P-gp geht auf die Untersuchung von Krebszellen Anfang der 60er Jahre zurück, wo die Überexpression dieses Proteins zu einer Multiresistenz der Zellen führte.^[69] Eine beachtliche Anzahl an Stoffen gehört zu den von P-gp transportierten Substraten, wie z.B. organische Kationen, schwache organische Basen, einige organische Anionen und ungeladene Moleküle. Des Weiteren werden auch einige Medikamente von P-gp aus dem Gehirn zurück ins Blut befördert, wie z.B. Chemotherapeutika, Immunsuppressiva, Antibiotika, anti-HIV-Medikamente, Opioide und Kalzium-Kanal-Blocker (Abbildung 6).^[30] Daher repräsentiert diese Efflux-Pumpe ein großes Hindernis in der Behandlung von ZNS Krankheiten, wie etwa Gehirntumoren.^[70, 71]

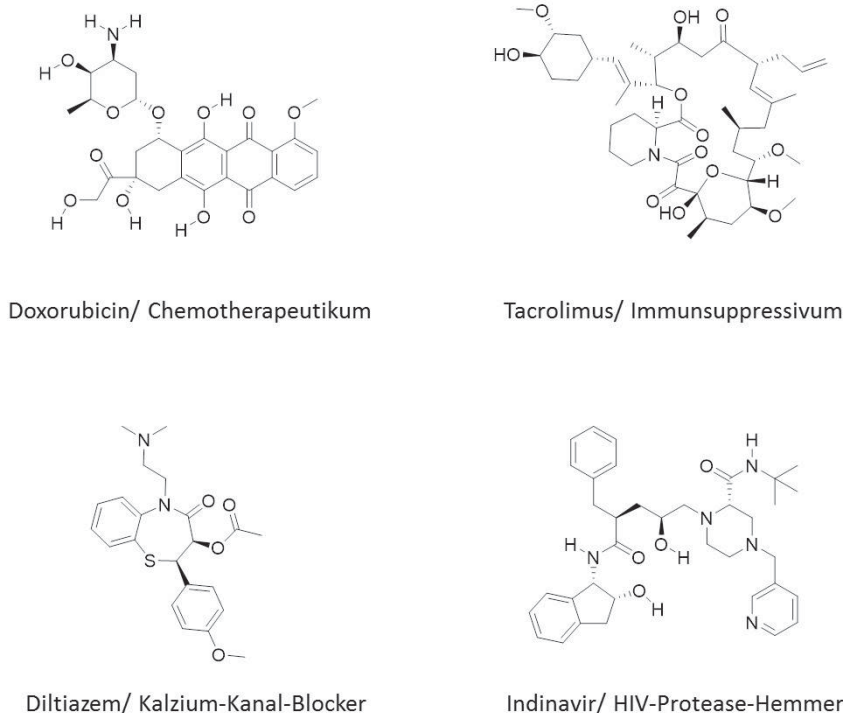


Abbildung 6: Medikamentös eingesetzte Substrate von P-gp.

Folglich ist das P-gp von großem Interesse als ein potenzielles Ziel für den Medikamententransport ins ZNS. Die Verabreichung von Wirkstoffen in Kombination mit P-gp-Inhibitoren wird als eine neuartige Methode in der Forschung eingesetzt und kann zu einer erhöhten Penetration der BBB und somit zu einer höheren Anreicherung des Wirkstoffs im Hirngewebe führen. Weitere Mitglieder der ABC Transporter sind die MRPs (engl. multidrug resistance proteins) und das BCRP (engl. breast cancer resistance protein) (Abbildung 7).^[30] Während BCRP ebenfalls auf der luminalen Seite der mikrovaskulären Endothelzellen vorzufinden ist, bleiben die Lokalisation und Funktion von MRPs unbestimmt.^[72] Dies liegt zum größten Teil an der Abwesenheit spezifischer Antikörper zum Nachweis dieser Proteine aber auch an den zahlreichen Spezies-spezifischen Unterschieden.^[73] Bisher konnten im Menschen nur drei Isoformen, MRP1, MRP4 und MRP5, nachgewiesen werden.^[74, 75]

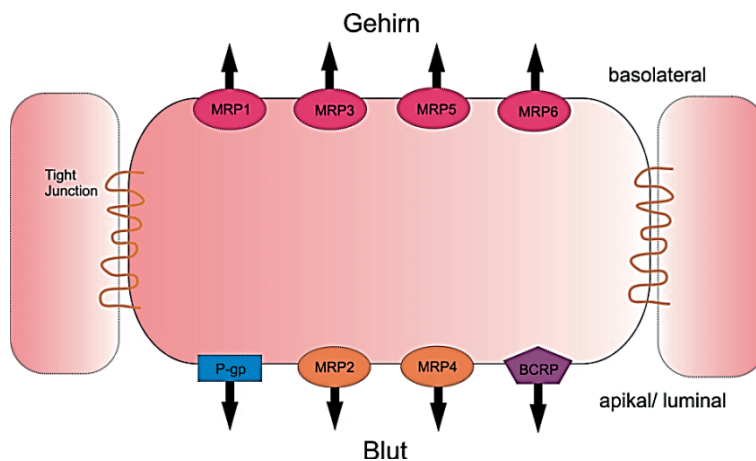


Abbildung 7: Lokalisation und Funktion von ABC Transportern (modifiziert nach Loscher et al., 2005).^[62]



2.2.1.6 Scherkräfte

Zahlreiche Studien belegen die Bedeutung verschiedener Faktoren der Mikroumgebung auf die Ausbildung und die Aufrechterhaltung des korrekten Phänotyps des Hirnendothels.^[4] Neben den oben beschriebenen Einflüssen, wie Zell-Zell-Interaktionen mit den Gliazellen und Perizyten, spielt der Scherstress eine bedeutende Rolle.^[28, 76, 77] Der Scherstress wird aufgrund des in den Blutgefäßen strömenden Bluts erzeugt und wirkt konstant auf das Endothel.^[78] Dabei beeinflusst er unter anderem die Zellmorphologie: die unter mikrofluidischen Bedingungen kultivierten Zellen weisen im Vergleich zu statisch kultivierten Zellen ein höheres Zellvolumen auf, haben eine flachere Form, richten sich in Richtung des angelegten Flusses aus und sind durch eine erhöhte Anzahl an Mikrofilamenten sowie Clathrin umhüllten und endozytotischen Vesikeln gekennzeichnet.^[79-81] Außerdem wurden viele Unterschiede in Funktion und Physiologie der Zellen berichtet.^[82-84] Aufgrund der vielen Mechanosensoren auf der Oberfläche von Endothelzellen, wie z.B. Ionenkanälen, Integrinen, G-Proteinen oder Caveolae, können die vom Scherstress erzeugten, physikalischen Signale in biochemische Signale umgewandelt werden.^[85-88] Diese Signale führen zur Aktivierung von Signalwegen, wie etwa dem MAP-Kinase-Weg (engl. mitogen-activated protein) oder PKB/Akt (engl. protein kinase B), die ihrerseits zelluläre Vorgänge, wie z.B. Apoptose, Proliferation, Inflammation, Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts und Energiestoffwechsel, regulieren.^[89-93] Des Weiteren wird hiervon die Expression von Tight Junctions (ZO-1, Occludin) und von Efflux-Pumpen (P-gp) angeregt, was eine wichtige Rolle beim Erhalt der Barriereintegrität der BBB spielt (Abbildung 8).^[92, 94, 95] Gemäß der Literatur findet außerdem der Influx von Ca^{2+} Ionen aus dem extrazellulären Raum oder aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) statt.^[96, 97]

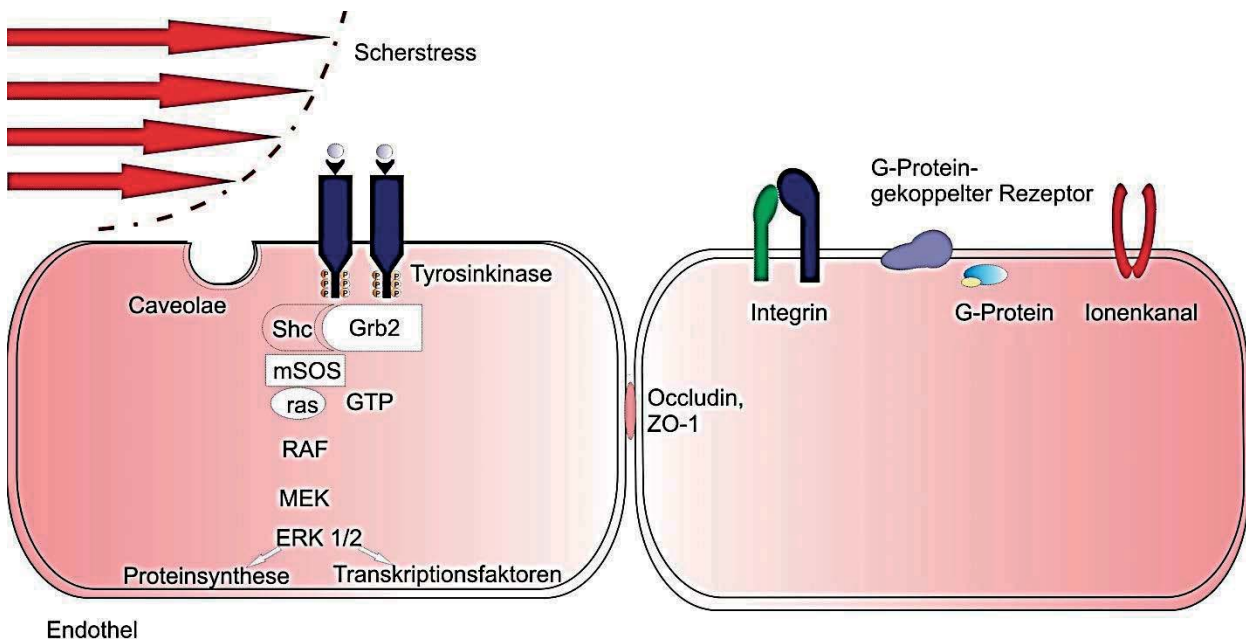


Abbildung 8: Schematische Übersicht der Scherstress-induzierten, funktionalen und physiologischen Änderungen im Endothel. Endothelzellen verfügen über eine Vielzahl an Sensoren (G-Proteine, Integrine, Ionenkanäle), welche in der Lage sind, die vom Scherstress erzeugten, physikalischen Signale in biochemische Signale umzuwandeln. Letztere führen zur Aktivierung von Signalkaskaden wie z.B. MAP-Kinase-Weg: Grb2 (engl. growth factor receptor-bound protein 2)/mSOS (engl. son of sevenless) → ras plus GTP (Guanosintriphosphat) → RAF → MEK → ERK1/2 (engl. extracellular-signal regulated kinases). Dieser Vorgang kann zu Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung durch die Aktivierung von Proteinsynthesen und bestimmter Transkriptionsfaktoren führen (modifiziert nach Palmiotti et al., 2014).^[4]