

Academiejaar 2007 - 2008

Dynamische regulatie van de fysische en metabole bloed- hersenbarrière

Yuliya BABIYCHUK

Promotor: Prof. Dr. L. Leybaert
Begeleider: M. De Bock

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Proef in het kader van de opleiding tot
ARTS

“De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.”

28 april 2008

Yuliya Babychuk

Prof. Dr. L. Leybaert

Voorwoord

Wie had er kunnen denken dat ik op deze zonnige dag de laatste pagina van mijn thesis zou afwerken. Twee jaar geleden, toen ik pas begonnen was, leek het einde nog zo ver. Die moment dacht ik nog lang niet aan het schrijven, laat staan *lay-outen* en afdrukken van mijn thesis. Zodra de dagen vorderden, begon ik meer en meer onrust op te merken in mijn jaar: vrienden weigerden het woord 'thesis' te vermelden, er kwamen minder en minder studenten naar de les; ze waren immers allemaal aan het 'thesesen'. Ook mijn eindverslag van de voorbije twee jaar labowerk was aan het openbloeien.

Het waren twee leuke jaren. Heel dankbaar ben ik aan Prof. Dr. Leybaert dat ik de kans heb gekregen om mijn thesis in zijn labo te mogen schrijven. Want de sfeer was er steeds fantastisch; je kon er altijd aan iedereen hulp vragen en er was altijd iemand bereid naar jou te luisteren. Dus uiteraard ook een grote 'dank U' aan Elke DV, Elke DC, Marijke VM, Kathleen en Nan.

Hierbij wil ik zeker mijn begeleidster Marijke speciaal vermelden. Al die uren die ze gespendeerd heeft om mij uit te leggen wat we aan het doen waren en nog belangrijker waaróm wij dat deden; al de keren dat ze mijn, vaak haast onleesbare, tekst probeerde te hervormen tot een duidelijk uitleg. Daarom een extra grote 'DANK U' aan Marijke.

Er is ook een speciale plaats in mijn hart voor alle studenten die in hetzelfde labo hun thesis schreven. En het waren er veel: Nana, Katrien, Kimberly, Kathleen, Laura en natuurlijk mijn jaargenootje Barbara. Het is een ongelooflijk geruststellende gedachte dat bij iemand anders 'de pagina-indeling ook niet klopt' of 'dat de figuren blijven verspringen'. Samen is het ons gelukt!

Tevens 'dank U' aan mijn vriendinnen, met wie ik altijd mijn spannende thesisverhalen kon delen. Nog een laatste 'dank U' heb ik voor Willem, die uren heeft geworsteld met mijn soms rampzalige zinsbouw, terwijl hij niet eens begreep waarover het allemaal ging. Maar ook voor hem is het bijna gedaan; nog alleen dit voorwoord verbeteren en ook hij kan genieten van het warme weer.

Inhoudstafel

Voorwoord	II
Lijst van afkortingen	VI
Lijst van figuren.....	VIII
Abstract.....	1
Inleiding	3
I. Fysische barrière.....	3
I.1 Bloed-hersenbarrière	3
I.1.1 Endotheelcel	4
I.1.1.1 Ticht juncties	4
a) Claudines.....	5
b) Occludines.....	5
c) Junctie adhesie moleculen (JAM).....	6
d) Cytoplasmatische accessorische eiwitten.....	6
I.1.1.2 Adherens Juncties.....	7
I.1.1.3 Gap juncties en Hemikanalen.....	7
I.1.2 Astrocyten	10
I.1.3 Pericyten.....	11
I.1.3.1 Contractiliteit.....	11
I.1.3.2 Bloedvatvorming en stabilisatie	12
I.1.3.3 Fagocyttaire functie	12
I.1.3.4 Permeabiliteit.....	12
I.1.4 Overige componenten van de neurovasculaire eenheid	12
II. Metabole barrière	14
II.1 Glucose	14
II.2 Glucose transporters (GLUTs)	15
II.2.1 GLUT1	16
II.3 Neurovasculaire koppeling	17
II.4 Neurometabole koppeling.....	17
II.5 Neurobarrière koppeling	18
II.6 GLUT1 stimuli.....	18
III. Calcium	20
III.1 Intracellulaire calcium signalisatie	20
III.1.1 Regulatie van de intracellulaire calcium concentratie.....	20

III.1.2	Temporo-spatiale organisatie van de calcium signalisatie	20
III.2	Extracellulaire calcium signalisatie	21
Materialen en methoden		24
I.	Celcultuur.....	24
I.1	Cellijn.....	24
I.1.1	Coaten van het recipiënt	24
I.2	Celcultuur opstarten.....	24
I.3	Cellen splitsen en uitzaaïen	25
I.4	Het invriezen van de cellen.....	25
II.	Radioactiviteitsmetingen	26
III.	Calciummetingen	26
IV.	ATP-release	28
V.	Propidium iodide (PI) uptake	28
VI.	Scrape Loading and Dye Transfer (SLDT).....	29
VII.	Fluorescence recovery after fotobleaching (FRAP)	30
VIII.	Immunokleuring	30
IX.	SDS-PAGE en Western blot	31
IX.1	Cellysaten.....	31
IX.2	Eiwitconcentratiebepaling.....	32
IX.3	SDS-PAGE en western blot.....	32
IX.4	Western Blot en Immunodetectie	32
Resultaten.....		34
I.	GLUT1 regulatie in RBE4.....	34
I.1	Glucose opname in RBE4	34
I.1	Acute stimulatie van het glucosetransport	34
I.2	Rol van calcium in de regulatie van GLUT1.....	35
II.	Calciumsignalisatie in de bloed-hersenbarrière.....	39
II.1	Gap junctions en hemikanalen in het barrière-endotheel	39
II.1.1	Expressie van Connexine 43 (Cx43).....	39
II.1.2	Gap junctionele koppeling in RBE4.....	40
II.1.3	Hemikanalen in RBE4	40
II.2	Calciumgolven en oscillaties in het barrière-endotheel.....	42
Bespreking.....		43
I.	GLUT1 regulatie in RBE4.....	43
I.1	Glucose opname in RBE4	43

I.1.1	Glucose opname na stimulatie met ATP en H ₂ O ₂	43
I.1.2	Glucose opname en calcium.....	44
I.1.3	ATP en H ₂ O ₂ werken via [Ca ²⁺] _i stijging.....	45
II.	Calciumsignalisatie in de bloed-hersenbarrière.....	47
II.1	Gap junctions en hemikanalen in het barrière-endotheel.....	47
II.1.1	Expressie van connexine 43.....	47
II.1.2	Gap junctionele koppeling in RBE4.....	48
II.1.3	Hemikanalen in RBE4.....	48
II.2	Calciumgolven en oscillaties in het barrière-endotheel.....	49
III.	Conclusie.....	49
	Referenties.....	50
	Bijlagen.....	i

Lijst van afkortingen

$[Ca^{2+}]_e$	Extracellulaire calcium concentratie
$[Ca^{2+}]_i$	Intracellulaire calcium concentratie
$[Ca^{2+}]_{vrij}$	Vrije calcium concentratie
$[IP_3]_i$	Intracellulair concentratie van Inositol 1;4;5-trisphosfaa
5-CFDM-AM	5-carboxyfluoresceïn diacetaat-acetoxymethyl ester;
AJ	Adherens Junctions
AMPK	AMP-activated Kinase
AP	Alkalisch Fosfatase
ATP	Adenosine trifosfaat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt
bFGF	B Fibroblast Groei Factor
BHB	Bloed-hersenbarrière
Ca^{2+}	Calcium
CaM	Calmoduline
cAMP	Cyclisch Adenosine Monofosfaat
CICR	Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release
Cx	connexine
CZS	Centrale zenuwstelsel
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DRM	Detergent-resistant Membrane
EC	Endotheelcel
ER	Endoplasmatisch Reticulum
FAD	Flavine Adenine Dinucleotide
$FADH_2$	Gereduceerde vorm van Flavine Adenine Dinucleotide
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
GDNF	Glial Cell-derived Neurotropic Growth Factor
GTP	Guanine trifosfaat
GUK	Guanyl Kinase-like
ICAM-1	Intercellulaire Adhesie Molecule-1
IP_3	Inositol 1;4;5-trisphosfaat
JAM	Junctie Adhesie Moleculen
kDa	kiloDalton

K_t	Concentratie van glucose bij welke een halfmaximale snelheid van glucosetransport bereikt wordt over de BHB
MAGUK	Membrane-associated Guanylate Kinase-like Proteïns
mM	milliMolair
NAD ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	Gereduceerde vorm van Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
nm	nanometer
NO	Stikstof Oxide
PDZ	Postsynaptic density protein-95/discs-large/ZO-1
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PI	Propidium Iodide
PIP ₂	Fosfatidylinositol 4,5-difosfaat
PKC	Proteïne Kinase C
PLC	Fosfolipase C
PTZ	Pentyleentetrazole
RBE4	Rat Brain Endothelial Cells
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfaat - Polyacrylamide Gel Electroforese
SERCA	Sarco-endoplasmatisch Reticulum Calcium ATPase
SLC2A1	Soluyte Carrier Family 2A1
SLTD	Scrape Loading and Dye Transfer
SOC	Store-operated Ca ²⁺ channels
TEER	Transendothelial Electrical Resistance
TGF β	Tissue Growth Factor β
TJ	Tight Junctions
T _{max}	Maximale snelheid van glucoseopname over de BHB
VE-cadherine	Vascular Endothelial-cadherin
VEGF	Vascular Tissue Growth Factor
ZO	Zonula Occludens
γ GTP	γ -glutamyl Transpeptidase

Lijst van figuren

FIGUUR 1: NEUROVASCULAIRE EENHEID.	3
FIGUUR 2: MOLECULAIRE ORGANISATIE VAN TIGHT JUNCTIES VAN DE BHB.....	4
FIGUUR 3: GAP JUNCTIES EN HEMIKANALEN.....	8
FIGUUR 4: VOORSTELLINGEN VAN MOGELIJKE MECHANISMEN VAN Ca^{2+} SIGNALISATIE.	22
FIGUUR 5: CALCIUMSIGNALEN IN RBE4.	27
FIGUUR 6: VOORBEELD VAN PI OPNAME.....	29
FIGUUR 7: VOORBEELD VAN SLDT.....	29
FIGUUR 8: VOORBEELD VAN FRAP.	30
FIGUUR 9: GLUCOSEOPNAME EN EXPRESSIE VAN GLUT1 IN RBE4.....	34
FIGUUR 10: ATP EN H_2O_2 REGULEREN DE OPNAME VAN 3H -2DG VIA GLUT1.....	35
FIGUUR 11: OPNAME VAN 3H -2DG IN AANWEZIGHEID VAN DE CALCIUMIONOFOOR A23187	36
FIGUUR 12: $[Ca^{2+}]_i$ NEEMT TOE NA STIMULATIE MET ATP, H_2O_2 EN A23187.	37
FIGUUR 13: EFFECT VAN BAPTA-AM OP DE ATP EN H_2O_2 GESTIMULEERDE OPNAME VAN 3H -2DG.....	38
FIGUUR 14: EFFECT VAN W7 OP DE ATP EN H_2O_2 GESTIMULEERDE OPNAME VAN 3H -2DG.....	38
FIGUUR 15: EXPRESSIE VAN Cx43 IN RBE4.	39
FIGUUR 16: IMMUNOKLEURING Cx43.....	39
FIGUUR 17: FRAP EN SLDT IN RBE4.....	40
FIGUUR 18: PI UPTAKE EN ATP RELEASE IN RBE4 GETRIGGERD DOOR LAAG $[Ca^{2+}]_E$	41
FIGUUR 19: ATP RELEASE, GETRIGGERD DOOR DV-VRIJ EN NOMINAL, WORDT GEÏNHIBEERD DOOR GAP27	41
FIGUUR 20: LAAG $[Ca^{2+}]_E$ INDUCEERT CALCIUMGOLVEN EN OSCILLATIES IN RBE4.....	42

Abstract

De bloed-hersenbarrière (BHB) is van vitaal belang voor het normaal functioneren van het centraal zenuwstelsel (CZS). In verscheidene aandoeningen zoals bij CVA, trauma, multiple sclerose, HIV dementie, de ziekten van Parkinson of Alzheimer en hersentumoren, is deze barrière verbroken. De hoofdfunctie van de BHB is de hersenen afschermen van mogelijke schadelijke stoffen in de bloedcirculatie. Dit wordt verzekerd door de verschillende onderdelen van de neurovasculaire eenheid: de endotheelcellen van de hersencapillairen, de astrocyten, de pericyten, de microglia en de basale lamina. Zo wordt de passage van schadelijke stoffen tegengehouden door de aanwezigheid van de tight juncties tussen de endotheelcellen, het gebrek aan fenestraties en de lage pinocytotische activiteit.

Aangezien de hersenen bijna volledig afhankelijk zijn van glucose voor hun functioneren, bestaan er specifieke transporters in de BHB die het glucosetransport verzekeren: dit zijn de GLUT1 transporters. GLUT1 faciliteert het transport van glucose naar de hersenen volgens de concentratiegradiënt. Om het mogelijk te maken meer glucose aan te voeren naar de hersenen tijdens momenten van verhoogde activiteit, bestaan er drie verschillende en elkaar aanvullende mechanismen. Twee daarvan - de toename van de glucose aanvoer (neurovasculaire koppeling) en de toename van het glucose metabolisme (neurometabole koppeling) - werden reeds uitgebreid onderzocht. Recent werd een derde mogelijk mechanisme voorgesteld: de toename van het transport over de BHB door de verandering van het vermogen van GLUT1 om glucose te transporteren (neurobarrière koppeling). De neurobarrière koppeling vormt aldus een link tussen de neurovasculaire en de neurometabole koppeling. Om van neurobarrière koppeling te mogen spreken moet het werkzaam zijn op een tijdschaal van seconden tot tientallen seconden, analoog aan de neurovasculaire en neurometabole koppeling.

Cel-cel communicatie is een andere belangrijke voorwaarde voor een goede werking van de BHB. Voor niet-exciteerbare cellen, zoals endotheelcellen en astrocyten, is calciumcommunicatie een belangrijke – en waarschijnlijk de enige – weg waarlangs op een snelle manier informatie uitgewisseld kan worden. Deze calciumsignalen zijn transiënte wijzigingen van de intracellulaire calcium concentratie ($[Ca^{2+}]_i$) en kunnen zich voordoen als calciumoscillaties of calciumgolven. Er is reeds veel bekend over de communicatie tussen de astrocyten, maar er bestaan nog heel weinig gegevens over de communicatie tussen de endotheelcellen. Het is wel al bekend dat endotheelcellen gap juncties bevatten en ook op paracrine manier met elkaar in contact staan: de twee mechanismen die vermeld worden in verband met astrocytaire cel-cel communicatie. Calcium is een heel belangrijk signaal-ion in de cel-cel communicatie waarbij dynamische veranderingen in $[Ca^{2+}]_i$ zich kunnen voordoen onder de vorm van calciumgolven en calciumoscillaties.

Wij werkten met geïmmortaliseerde endotheelcellen (RBE4) afgeleid van de hersenen van de rat. Verder bouwend op eerder werk van onze groep deden wij verder onderzoek naar twee veel belovende stimuli

van het glucosetransport, namelijk adenosine trifosfaat (ATP) en waterstof peroxide (H_2O_2). Het blijkt dat zowel ATP als H_2O_2 het glucosetransport doen stijgen via de werking op GLUT1 en dit al na 15min. Ons onderzoek bestond erin te bestuderen hoe ATP en H_2O_2 deze stijging bewerkstelligen. Uit onze resultaten blijkt dat zowel ATP als H_2O_2 de $[Ca^{2+}]_i$ doen toenemen, elk volgens een verschillend patroon. In een volgende stap onderzochten we of deze toename van de $[Ca^{2+}]_i$ het stimulerend effect van ATP en H_2O_2 medieerde. Hiervoor gebruikten we BAPTA-AM, een intracellulaire calcium chelator, en W7, een antagonist van calmoduline; een molecule stroomafwaarts van de calcium cascade. Zowel BAPTA-AM als W7 inhibeerden het stimulerend effect van ATP en H_2O_2 op het glucose transport, maar beide agentia inhibeerden eveneens de basale opname. Daarom is de rol van de $[Ca^{2+}]_i$ in de ATP en H_2O_2 gestimuleerde glucoseopname niet duidelijk.

Ons onderzoek betreffende het glucosetransport kon het belang van calcium hierbij niet overtuigend aantonen. In tweede tijd bestudeerden we de werking van calcium in zijn rol als signaal-ion. Deze kan via intercellulaire communicatie mogelijk de BHB opening bewerkstelligen. Hierbij hebben wij ons vooral toegespitst op de rol van de hemikanalen; een weinig onderzochte speler in de calciumcommunicatie. De aanwezigheid van functionele gap juncties en hemikanalen in RBE4 cellen werd bevestigd door SLTD en FRAP, respectievelijk PI opname en *ATP release*. Omdat bekend is dat daling van de extracellulaire calcium concentratie ($[Ca^{2+}]_e$) hemikanalen kan openen, werkten wij met progressief dalende $[Ca^{2+}]_e$. Uit onze data bleek dat het aantal calcium golven en oscillaties steeg met een dalende $[Ca^{2+}]_e$. De toevoeging van de hemikanaal blokker Gap27 deed dit aantal golven en oscillerende cellen weer dalen, wat een rol voor hemikanalen in de calcium signalisatie tussen RBE4 cellen veronderstelt.

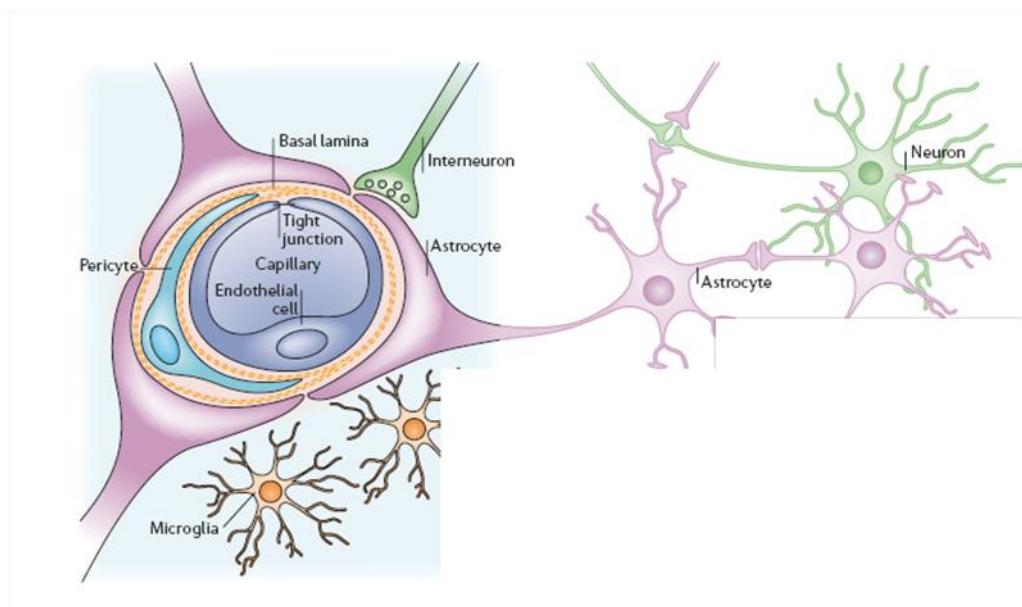
In het eerste luik van ons onderzoek toonden we aan dat ATP, een neuro -en gliotransmitter, en H_2O_2 , dat wordt geproduceerd als bijproduct van de oxidatieve fosforylatie of tijdens de hypoxie/reoxygenatie, de opname van glucose (3H -2DG) door de GLUT1 glucosetransporter konden stimuleren. Bovendien bleek ook een toename van de $[Ca^{2+}]_i$ te leiden tot een verhoogde opname van glucose. ATP en H_2O_2 gaven beiden aanleiding tot een stijging van de $[Ca^{2+}]_i$, maar we konden niet aantonen dat het effect van deze stimuli op de opname van glucose gemedieerd werd door de stijging van de $[Ca^{2+}]_i$. In het tweede luik toonden we een rol voor de hemikanalen in de calciumsignalisatie tussen barrière-endotheel aan: het blokkeren van de hemikanalen met behulp van specifieke hemikanaal inhibitoren kan het aantal calciumgolven en oscillerende cellen, veroorzaakt door een lage $[Ca^{2+}]_e$, reduceren.

Inleiding

I. Fysische barrière

I.1 Bloed-hersenbarrière

De bloed-hersenbarrière (BHB) is een selectieve barrière, opgebouwd uit het endotheel van de hersencapillairen en gesitueerd rond het centrale zenuwstelsel (CZS) met uitzondering van de exocriene organen, zoals de neurohypofyse en epifyse. De tight juncties tussen deze endotheelcellen verzekeren de selectiviteit van de BHB: ze beletten de paracellulaire doorgang van hydrofiele stoffen, enkel kleine lipofiele substanties zoals O_2 en CO_2 kunnen vrij diffunderen (Grieb, Forster *et al.* 1985). Voor stoffen zoals aminozuren en glucose bestaan er specifieke transporters, andere noodzakelijke moleculen, zoals insuline, worden door receptor gemedieerde pinocytose getransporteerd (Pardridge, Eisenberg *et al.* 1985). De BHB heeft als doel de aanvoer van de nutriënten en afvoer van verbruikte stoffen strikt te controleren en zo te zorgen dat neuronen en gliacellen in een stabiele omgeving verblijven (Begley and Brightman 2003; Hawkins and Davis 2005). De BHB schermt astrocyten en neuronen af van ionenschommelingen in het bloed en cerebrospinale vocht, vb. na het eten of sporten. Daardoor blijft de samenstelling van het cerebrospinale vocht stabiel en optimaal voor een goede werking van de neuronen. Samen met het microvasculair endotheel maken astrocyten, pericyten, neuronen en de basale lamina deel uit van de neurovasculaire eenheid (Hawkins and Davis 2005). Hieronder gaan wij dieper in op al deze componenten.



Figuur 1: Neurovasculaire eenheid. De BHB is opgebouwd uit de capillaire endotheelcellen van de hersenen die omgeven zijn door de basale lamina en astrocytaire eindvoetjes. In deze basale lamina zijn ook de pericyten ingebed. Aan de andere kant staan astrocyten ook in contact met neuronen. Overgenomen uit (Abbott, Ronnback *et al.* 2006).

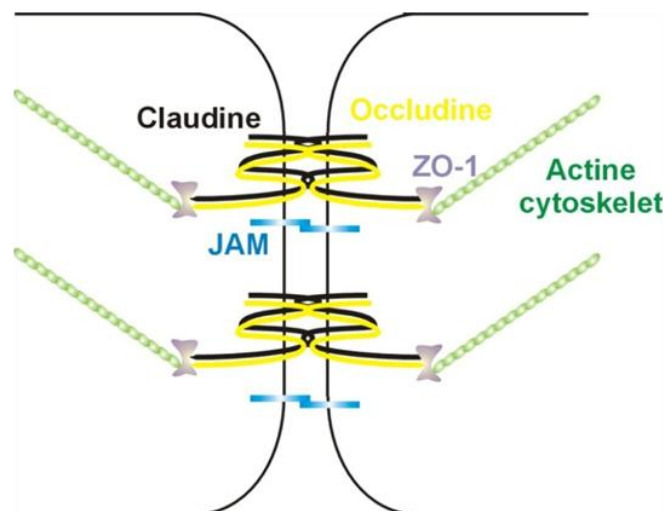
I.1.1 Endotheelcel

Endotheelcellen van de BHB verschillen van andere endotheelcellen in het lichaam door de aanwezigheid van een hoger aantal mitochondriën (Oldendorf, Cornford *et al.* 1977) noodzakelijk voor het actieve transport van de nutriënten naar de hersenen (Persidsky, Ramirez *et al.* 2006), uitgebreide tight junctions (Kniesel and Wolburg 2000), afwezigheid van fenestraties (Fenstermacher, Gross *et al.* 1988) en een kleine hoeveelheid pinocytotische vesikels (Sedlakova, Shivers *et al.* 1999).

Het junctiecomplex dat BHB endotheelcellen met elkaar verbindt bestaat uit tight junctions (Kniesel and Wolburg 2000; Vorbrodt and Dobrogowska 2003), adherens junctions (Ballabh, Braun *et al.* 2004) en mogelijk ook gap junctions (Simard, Arcuino *et al.* 2003b). Dit complex verzorgt een extra goede aansluiting van de endotheelcellen, waardoor het paracellulair transport sterk verminderd is in vergelijking met andere endotheelcellen.

I.1.1.1 Tight junctions

Tight junctions bestaan uit drie membraaneiwitten: claudines, occludines en junctie adhesie moleculen. Met deze membraaneiwitten zijn cytosolische eiwitten zoals zonula occludens (ZO) eiwitten: ZO-1, ZO-2, ZO-3 en cinguline geassocieerd. Deze cytoplasmatische eiwitten verzorgen de verbinding tussen de membraaneiwitten en het cytoskelet (Ballabh, Braun *et al.* 2004).



Figuur 2: Moleculaire organisatie van tight junctions van de BHB. Occludines en claudines vormen samen tight junctions tussen de cellen. Ze staan via de ZO eiwitten in contact met de cytoskelet.

De functie van tight junctions is enerzijds de paracellulaire permeabiliteit beperken (*gate function*) en anderzijds het apicale en het basolaterale endotheliale membraan van elkaar onderscheiden (*fence function*) (Abbott, Ronnback *et al.* 2006). Deze *fence function* zorgt er ook voor dat de verscheidene

transporters niet ongecontroleerd kunnen diffunderen in de plasmamembraan en daarom niet met elkaar kunnen interfereren.

a) Claudines

Claudines zijn fosfoproteïnen met een moleculair gewicht van 22kDa welke vier transmembranaire domeinen bezitten (Ramsauer, Krause *et al.* 2002) en via de intracellulaire carboxyterminus verbonden zijn met de cytoplasmatische eiwitten (Furuse, Sasaki *et al.* 1999). Claudines zijn exclusief aanwezig in tight juncties (Ballabh, Braun *et al.* 2004) en binden claudines van de naburige endotheelcellen om zo tight juncties te vormen. Claudines zouden de eiwitten zijn die primair het afsluitvermogen van de tight juncties vormen, occludines (zie verder) komen enkel voor wanneer claudines al aanwezig zijn en versterken enkel de afsluiting (Kubota, Furuse *et al.* 1999). Daarenboven werd aangetoond dat claudine-1/3¹ en claudine-5 verantwoordelijk zijn voor de hoge transendotheliale elektrische weerstand (TEER) die waarden van meer dan 1000 ohm per cm² in het hersenendotheel kan bereiken (Butt, Jones *et al.* 1990; Dominguez, Song *et al.* 1996; Wolburg and Lippoldt 2002). Claudine-1/3 en claudine-5 zijn aanwezig in de tight juncties van de BHB en het is specifiek type 1/3 - niet type 5 - dat verloren gaat bij pathologische processen in de hersenen zoals een tumor, inflammatie of beroerte (Liebner, Kniessel *et al.* 2000; Lippoldt, Kniessel *et al.* 2000).

b) Occludines

Occludine (65 kDa) is eveneens een fosfoproteïne en bevat vier transmembranaire domeinen, een lange carboxyterminus en een korte aminotermus, beiden cytoplasmatisch gelokaliseerd (Furuse, Hirase *et al.* 1993). Aan cytoplasmatische kant is occludine via de ZO moleculen verbonden met het cytoskelet (Furuse, Itoh *et al.* 1994; Ballabh, Braun *et al.* 2004). Occludine wordt frequent teruggevonden in de cellen van het cerebrale endotheel (Lippoldt, Kniessel *et al.* 2000; Hawkins, Abbruscato *et al.* 2004), maar is daarentegen meer zeldzaam in endotheliale cellen die voorkomen buiten het zenuwstelsel (Hirase, Staddon *et al.* 1997). Occludine is niet noodzakelijk voor de vorming van de tight juncties, eerder voor het versterken van de paracellulaire barriere door een verbinding tussen de twee extracellulaire loops. Toch leidt het verlies ervan in pathologische situaties zoals bijvoorbeeld na een beroerte tot een stijging van de BHB permeabiliteit (Brown and Davis 2005).

¹ Claudin-3, ook claudin-1/3 genoemd was oorspronkelijk verkeerd geïdentificeerd als claudin-1 (Abbot, N. J., L. Ronnback, *et al.* (2006).

c) Junctie adhesie moleculen (JAM)

JAM zijn moleculen die behoren tot de immunoglobuline superfamilie en hebben een moleculair gewicht van ongeveer 40 kDa. Er bestaan 3 JAM eiwitten: JAM1, JAM2 en JAM3. Structureel bestaat het JAM-1 eiwit uit een transmembranair complex met twee immunoglobuline lussen extracellulair gelokaliseerd (Martin-Padura, Lostaglio *et al.* 1998). JAM-1 zou de aanhechting aan de naburige celmembranen mediëren in het vroege stadium van de ontwikkeling van de BHB (Dejana, Lampugnani *et al.* 2000) en heeft mogelijk ook een rol bij de regulatie van de transendotheliale migratie van leukocyten (Del Maschio, De Luigi *et al.* 1999). De hersenen van knaagdieren zijn onderzocht op de aanwezigheid van JAM-1, JAM-2 en JAM-3: JAM-2 werd niet gedetecteerd in de capillairen van de hersenen, de andere twee wel. JAM-2 is wel aanwezig in tight juncties van andere weefsels waar daarentegen een hoge permeabiliteit nodig is bv. in de glomeruli van de nier (Aurrand-Lions, Johnson-Leger *et al.* 2001). Dit wijst op tegenovergestelde functie van JAM-1 en JAM-2 in de intercellulaire tight juncties (Aurrand-Lions, Johnson-Leger *et al.* 2001). Hetzelfde onderzoek in humane hersenbloedvaten dient nog uitgevoerd te worden.

d) Cytoplasmatische accessorische eiwitten

Cytoplasmatische accessorische eiwitten is een verzamelnaam voor alle cytosolische eiwitten die gelinkt zijn aan de tight juncties, onder andere de ZO eiwitten, cinguline en 7H6 (Ballabh, Braun *et al.* 2004). ZO-1 (220 kDa), ZO-2 (160 kDa) en ZO-3 (130 kDa) behoren tot de familie van de *membrane-associated guanylate kinase-like proteins (MAGUKs)* en bezitten heel wat structurele elementen om andere moleculen te binden en zo de moleculen in tight juncties te organiseren (Ballabh, Braun *et al.* 2004). Zo hebben ze drie PDZ (*postsynaptic density protein-95/discs-large/ZO-1*) domeinen, waarvan PDZ1 het carboxyterminale domein van claudine kan binden (Itoh, Furuse *et al.* 1999). Ook andere moleculen die de tight junctie opbouwen hebben interactieplaatsen op de ZO moleculen: occludine interageert met een *guanyl kinase-like (GUK)* domein (Mitic, Van Itallie *et al.* 2000) en JAM kan ZO-1 en andere eiwitten via PDZ domeinen binden (Ebnet, Schulz *et al.* 2000). ZO interageert ook met actine en zou de structurele stevigheid van de endotheelcellen verhogen (Haskins, Gu *et al.* 1998). ZO-1 is niet alleen in tight juncties gelokaliseerd, maar ook in adherens (Itoh, Nagafuchi *et al.* 1993) en gap juncties (Toyofuku, Yabuki *et al.* 1998).

I.1.1.2 Adherens Junctionies

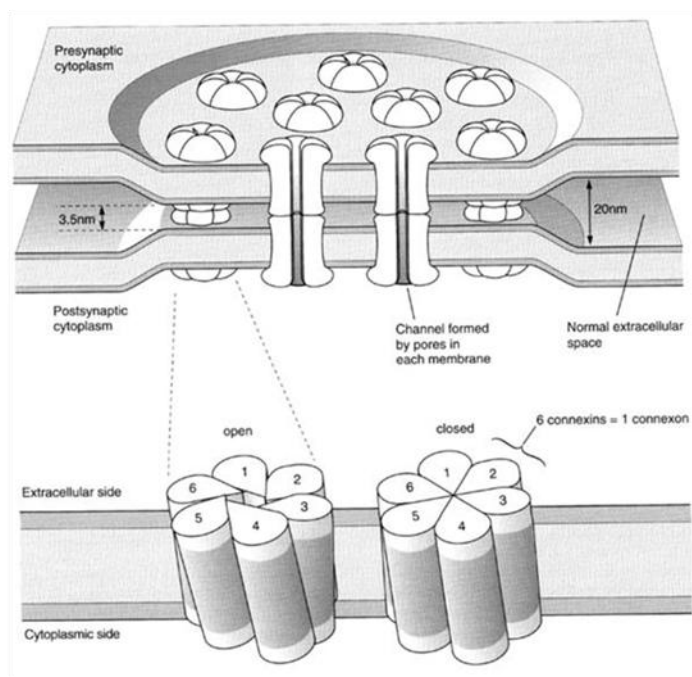
Adherens junctionies (AJ) zijn ook aanwezig in de BHB. Hun functie houdt in: adhesie van de endotheelcellen aan elkaar, contactinhibitie en, samen met de tight junctionies, ook regulatie van de paracellulaire permeabiliteit (Bazzoni and Dejana 2004). AJ ontstaan uit de interactie tussen actine en het membraanair cadherine, welke via catenine eiwitten verloopt: cadherine bindt β - en γ - catenine, die op hun beurt via α -catenine actine binden (Knudsen, Soler *et al.* 1995; Ballabh, Braun *et al.* 2004). De AJ van de BHB worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van *vascular endothelial-cadherin* (VE-cadherine) (Schulze and Firth 1993; Vorbrott and Dobrogowska 2003). De componenten van TJ en AJ kunnen verder ook met elkaar interageren en elkaar beïnvloeden. Zo zouden het tight junctionie eiwit ZO-1 en het adherens junctionie eiwit α -catenine elkaar kunnen beïnvloeden (Matter and Balda 2003).

I.1.1.3 Gap junctionies en Hemikanalen

Er is nog niet veel bekend over het aandeel van gap junctionies in het functioneren van de BHB en de neurovasculaire eenheid. Aangezien endotheelcellen en de astrocytaire eindvoetjes van elkaar gescheiden zijn door de basale lamina (zie I.1.4), is de aanwezigheid van gap junctionies tussen deze celtypen onwaarschijnlijk (Simard, Arcuino *et al.* 2003b). De aanwezigheid van functionerende gap junctionies tussen de eindvoetjes van astrocyten werd reeds vastgesteld in de hersenen van de rat (Simard, Arcuino *et al.* 2003b; Abbott, Ronnback *et al.* 2006; Haydon and Carmignoto 2006).

Gap junctionies vormen kanalen tussen het cytosol van twee naburige cellen waarlangs moleculen tot 1200Da uitgewisseld kunnen worden door middel van passieve diffusie (Kumar and Gilula 1996; Alexander and Goldberg 2003).

Gap junctionies worden gevormd door de interactie tussen twee hemikanalen (connexonen) van naburige cellen. Elk hemikanaal bestaat op zijn buurt uit zes connexine (Cx) eiwitten (Sohl and Willecke 2004). Cx eiwitten bevatten vier transmembranaire domeinen met twee extracellulaire lussen en één cytosolische lus. De carboxy- en aminoterminus zijn beiden cytoplasmatisch gelokaliseerd (Sohl and Willecke 2004). De aminozuren van de twee extracellulaire lussen zijn sterk bewaard. Deze twee lussen vormen een covalente binding met elkaar door middel van drie disulfide bruggen (Evans, De Vuyst *et al.* 2006). Bij mensen zijn er tot nu toe al meer dan 20 Cx eiwitten beschreven (Sohl and Willecke 2004).



Figuur 3: Gap juncties en hemikanalen. Schematische voorstelling van gap juncties. Twee naburige cellen bezorgen elk één hemikanaal om een gap junctie te vormen. Elk hemikanaal bestaat op zijn beurt uit zes connexine eiwitten. Overgenomen van (Sohl and Willecke 2004).

In cellen van zoogdieren komen meerdere connexine eiwitten tot expressie en daardoor kunnen homomere (bestaande uit dezelfde soort connexines) en heteromere (bevatten verschillende connexines) hemikanalen gevormd worden. Twee dezelfde hemikanalen (homomere of heteromere) vormen samen een homotypische gap junctie, terwijl twee verschillende hemikanalen samen een heterotypische gap junctie vormen (Kumar and Gilula 1996). Dit zou een mechanisme kunnen zijn dat de gap junctionele selectiviteit voor verschillende signaalmoleculen verzekert (Goldberg, Moreno *et al.* 2002; Weber, Chang *et al.* 2004). Gap juncties zijn geconcentreerd in een bepaald deel van de celmembraan die gap junctionele plaques worden genoemd (Kumar and Gilula 1996). Een gap junctionele plaque kan voorkomen in drie verschillende vormen. Een eerste vorm is deze waarin de plaques homomere en heteromere hemikanalen in een willekeurige volgorde bevatten (Nicholson, Dermietzel *et al.* 1987; Traub, Look *et al.* 1989). Een tweede vorm beschrijft gegroepeerde homomere, respectievelijk heteromere hemikanalen die in een bepaald deel van de gap junctionele plaque voorkomen (Risek, Klier *et al.* 1994). Als derde vorm kennen we gap junctionele plaques waarin uitsluitend homomere, of uitsluitend heteromere hemikanalen voorkomen. (Spray, Moreno *et al.* 1991; Laird, Yancey *et al.* 1992; Guerrier, Fonlupt *et al.* 1995). Elk van deze drie vormen werd *in vivo* geobserveerd (Kumar and Gilula 1996). Om deel uit te maken van een gap junctionele plaque, dienen connexines gefosforyleerd te worden (P_2 vorm). P_0 - de niet gefosforyleerde vorm - en P_1 komen niet voor in gap junctionele plaques, maar kunnen wel hemikanalen vormen (Musil and Goodenough 1991; Lampe and Lau 2000). De connexines worden

gefosforyleerd ter hoogte van de carboxyterminus en de intracellulaire lus. Fosforylatie van de aminoterminus werd nog niet gerapporteerd (Lampe and Lau 2000).

Gap junctionele plaques zijn geassocieerd met tight juncties van endotheelcellen zoals aangetoond met de *freeze-fracture electron microscopy* (Schneeberger and Lynch C. M. Anderson JM2001). Lum *et al.* toonden aan dat er in de endotheelcellen van porciene hersenen eveneens een verbinding bestaat tussen enerzijds connexines (namelijk connexine 40 en 43) en anderzijds occludine en claudine-5 eiwitten, mogelijk door middel van ZO-1 (Lum, Jaffe *et al.* 1999). Het blokkeren van de gap junctionele communicatie door middel van 18 β -glycyrrhetine zuur en oleamide, beïnvloedde de expressie of de lokalisatie van de tight junctie eiwitten niet, maar het inhibeerde wel de barrièrefunctie zoals blijkt uit metingen van de TEER en de paracellulaire flux van mannitol en inuline (Nagasawa, Chiba *et al.* 2006). Dit is analoog zoals beschreven voor epiteelcellen (Kojima, Sawada *et al.* 1999; Kojima, Kokai *et al.* 2001; Morita, Katsuno *et al.* 2004). Dus, gap juncties zouden een rol kunnen spelen in de barrièrefunctie van het hersenendotheel, maar het exacte mechanisme is voorlopig onduidelijk.

Intracellulair gelokaliseerde hemikanalen bevinden zich in de meerderheid van de gevallen in gesloten toestand (Rahman, Carlile *et al.* 1993). Hieruit wordt afgeleid dat hemikanalen ook na insertie in de plasma membraan gesloten zijn, terwijl gap juncties meestal aangetroffen worden in open configuratie (Saez, Retamal *et al.* 2005). Een hoge open probabilliteit van hemikanalen zou immers kunnen leiden tot een verstoorde membraanpotentiaal door een veranderde ionenflux met uiteindelijk celdood tot gevolg. Onder andere onder invloed van een dalende concentratie van de extracellulaire calcium ($[Ca^{2+}]_e$) verandert de toestand van de hemikanalen van gesloten naar open (Hofer and Dermietzel 1998; Stout, Costantin *et al.* 2002). De hemikanalen in de plasmamembraan zijn minder goed georganiseerd dan de gap juncties en bevinden zich voornamelijk in de *lipid rafts* (Verselis, Trexler *et al.* 2000; Harris 2001), welke een rol zouden spelen in de cel-celsignalisatie (Simons and Vaz 2004). Een andere belangrijke stimulus van de hemikanaalopening is stijging van intracellulaire calcium concentratie ($[Ca^{2+}]_i$) (De Vuyst, Decrock *et al.* 2006). Naast een lage $[Ca^{2+}]_e$ en hoge $[Ca^{2+}]_i$, kunnen ook andere stimuli zoals een positieve membraanpotentiaal en defosforylatie, de opening van hemikanalen veroorzaken. Een hoge $[Ca^{2+}]_e$, lage pH en $[Mg^{2+}]_e$ hebben daarentegen juist een sluiting tot gevolg (Saez, Contreras *et al.* 2003). Wanneer hemikanalen openen kunnen ze ATP vrijstellen (Cotrina, Lin *et al.* 1998; Stout, Costantin *et al.* 2002; Goodenough and Paul 2003), maar eveneens andere moleculen zoals bv. glutamaat (Ye, Wyeth *et al.* 2003; Parpura, Scemes *et al.* 2004), NAD⁺ (Bruzzone, Guida *et al.* 2001) en prostaglandinen (Cherian, Siller-Jackson *et al.* 2005).

Voor het onderzoek van gap juncties en hemikanalen kunnen Gap peptiden, of connexine mimetische peptiden, gebruikt worden. Deze peptiden zijn identiek zijn aan een korte aminozuursequentie van een

gekozen *subunit* van het connexine (Evans, De Vuyst *et al.* 2006). Ze werden oorspronkelijk ontwikkeld om gap juncties selectief te blokkeren op basis van hun connexine-samenstelling (Dahl, Nonner *et al.* 1994; Warner, Clements *et al.* 1995), maar ze bleken bovendien ook hemikanalen te kunnen inhiberen (Braet, Aspeslagh *et al.* 2003; Braet, Vandamme *et al.* 2003). Om selectief hemikanalen te blokkeren, is een korte incubatie met een Gap peptide nodig (10-30min), terwijl incubatie gedurende 24uur of meer nodig is om inhibitie van gap juncties te bekomen (Evans, De Vuyst *et al.* 2006).

I.1.2 Astrocyten

Astrocyten zijn de steuncellen van het CZS en zijn evenredig verspreid in de hersenen. Hun cellichamen en grotere uitlopers komen niet in contact met elkaar en aldus wordt een apart anatomisch domein van elke astrocyt gedefinieerd (Chang Ling and Stone 1991; Nedergaard, Ransom *et al.* 2003). De kleinere uitlopers van de verschillende astrocyten vormen de interactieplaatsen tussen de verschillende astrocyten, waardoor ze kunnen functioneren als een syncytium. Deze astrocytaire eindvoetjes zijn typisch terug te vinden rond het barrière-endotheel (Nedergaard, Ransom *et al.* 2003) en vormen een verbinding tussen de neuronen en endotheelcellen in de volwassen hersenen (Haseloff, Blasig *et al.* 2005).

Astrocyten zijn noodzakelijk voor de regulatie van vele functies van de BHB. Ze versterken de tight juncties (fysische barrière) (Dehouck, Meresse *et al.* 1990), leiden tot expressie en polarisatie van transporters zoals bv. GLUT1 (McAllister, Krizanac-Bengez *et al.* 2001) alsook de expressie en polarisatie van gespecialiseerde enzymen (metabolische barrière) zoals γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), alkalisch fosfatase (AP), en *aromatic acid decarboxylase* (Abbott 2002; Haseloff, Blasig *et al.* 2005; Persidsky, Ramirez *et al.* 2006). *Glial cell-derived neurotropic growth factor* (GDNF), vrijgesteld uit astrocyten, is betrokken bij de postnatale inductie en maturatie van de BHB (Igarashi, Utsumi *et al.* 1999; Utsumi, Chiba *et al.* 2000). Astrocyten zouden wel minder belangrijk zijn in de initiële inductie van de BHB, want - zoals volgt uit het onderzoek op muizen - zijn de tight juncties al gevormd vóór de differentiatie van de astrocytaire eindvoetjes (Bauer, Bauer *et al.* 1993). Ze zijn daarentegen wel noodzakelijk voor de inductie van de *capillary-like structure* in de pas naar de hersenen gemigreerde endotheelcellen (Ramsauer, Krause *et al.* 2002). Het is verder aangetoond dat astrocyten of factoren vrijgesteld door astrocyten, de expressie van antioxidatieve eiwitten zoals mangaan superoxide dismutase in endotheelcellen induceren. Deze antioxidatieve eiwitten kunnen de schadelijke invloed van de vrije radicalen op de hersenen neutraliseren en zo worden de hersenen ook beschermd door de astrocyten (Schroeter, Mertsch *et al.* 1999; Schroeter, Muller *et al.* 2001).

I.1.3 Pericyten

Pericyten zijn multifunctionele cellen geassocieerd met de capillairen en postcapillaire venulen, en ze bevinden zich binnen de basale lamina van de bloedvaten (Allt and Lawrenson 2001). Pericyten hebben uitgebreide cytoplasmatische uitstulpingen, die meer dan één bloedvat kunnen omvatten (Allt and Lawrenson 2001). Contacten tussen pericyt en endotheelcel worden gevormd door een cytoplasmatische uitloper van de pericyt die een indeuking maakt in het membraan van de endotheelcel. Dit is gekend als een “*peg and socket*” contact (Matsusaka 1975; Leeson 1979; Tilton, Kilo and Williamson 1979; Tilton, Kilo, Williamson *et al.* 1979; Wakui, Furusato *et al.* 1989). Het is aangetoond dat de epidermale groeifactoren zoals *tissue growth factor* β (TGF β), *vascular tissue growth factor* (VEGF) en *fibroblast growth factor* (bFGF) - sterke endotheelcel mitogenese en angiogenese promotoren - zich ter hoogte van deze interdigities bevinden (Wakui, Furusato *et al.* 1990).

Tussen pericyten en endotheelcellen zijn reeds gap juncties (Cuevas, Gutierrez-Diaz *et al.* 1984) en tight juncties (Tilton, Kilo and Williamson 1979; Sims and Westfall 1983) beschreven. Ook het glycoproteïne fibronectine werd teruggevonden in de nabijheid van de *adhesion plaques* (Courtoy and Boyles 1983). Door de aanwezigheid van deze plaques zou er een mechanische verbinding kunnen bestaan tussen een pericyt en een endotheelcel.

I.1.3.1 Contractiliteit

Pericyten zouden in de microbloedvaten van de hersenen de functie van de gladde spiercellen uitvoeren, namelijk vasoconstrictie van het bloedvat. Dezelfde vorm van actine als in gladde spiercellen - α -actine - is uitvoerig aangetoond in pericyten uit verschillende weefsels (Herman and D'Amore 1985; DeNofrio, Hock *et al.* 1989; Skalli, Pelte *et al.* 1989; Nehls and Drenckhahn 1991; Orte, Lawrenson *et al.* 1999). Ook bij *in vitro* onderzoek van hersenweefsel (Boado and Pardridge 1994) werd in de pericyten van zowel pre- (Nehls and Drenckhahn 1991) als midcapillairen (Allt and Lawrenson 2001) α -actine teruggevonden. Myosine isovormen en tropomyosine werden eveneens geobserveerd in pericyten (Joyce, Haire *et al.* 1985a; Joyce, Haire *et al.* 1985b), echter niet in de pericyten van het hersenweefsel (Allt and Lawrenson 2001). Vasoactieve stoffen zoals histamine en serotonine veroorzaken contracties *in vitro*, terwijl isoproterenol, een β -agonist, pericyten zou relaxeren (Kelley, D'Amore *et al.* 1987; Kelley, D'Amore *et al.* 1988). NO (stikstof oxide) zou ook relaxerend werken op pericyten; analoog als in gladde spiercellen (Hirschi and D'Amore 1996). Het dient evenwel vermeld te worden dat *in vivo* de contractiliteit in antwoord op vasoactieve stoffen niet overtuigend aangetoond is, hoewel er wel onderzoeken zijn die wijzen in die richting (Tilton, Kilo, Williamson *et al.* 1979; Schonfelder, Hofer *et al.* 1998).

I.1.3.2 Bloedvatvorming en stabilisatie

Het is gekend dat de door pericyten bedekte oppervlakte van een bloedvat verschilt van weefsel tot weefsel, met in het cerebrum en de retina van de rat een bedekkingsgraad van respectievelijk 22-32% en 41% (Sims 1991). De precieze relatie tussen de bedekking enerzijds en de functies van de pericyt anderzijds is nog niet bekend, maar het is wel aangetoond dat weefsels met de traagste endotheelcellen *turnover* de hoogste bedekking hebben (Tilton, Miller *et al.* 1985; Wakui, Furusato *et al.* 1997). Er bestaat dus een omgekeerde correlatie tussen de proliferatie van endotheelcellen en de pericyt bedekking: pericyten controleren de angiogenese door contact-inhibitie (Wakui, Furusato *et al.* 1997). Deze contact-inhibitie werkt via de groeifactor TGF β , geproduceerd door pericyten (Allt and Lawrenson 2001).

I.1.3.3 Fagocytair functie

Op subcellulair niveau onderscheidt men granulaire en agranulaire pericyten, die verschillen in de hoeveelheid van hun lysosomen (Sims 1991). De pericyten van de hersenen zijn enkel granulaair (Farrell, Stewart *et al.* 1987) en tonen de aanwezigheid van zure fosfatase, wat wijst op een sterk ontwikkelde fagocytair functie. Het aantal lysosomen kan nog verhoogd worden bij verstoring van de BHB (Kondo, Inoue *et al.* 1987).

I.1.3.4 Permeabiliteit

Op hun buitenste membranen bezitten de pericyten van de hersencapillairen γ GTP (Frey, Meckelein *et al.* 1991). γ GTP katalyseert de verplaatsing van γ -glutamyl van een donoreiwit -meestal gluthathione- naar een acceptoreiwit. γ GTP blijkt verantwoordelijk te zijn voor het transport van grote, neutrale aminozuren over de BHB (Allt and Lawrenson 2001). Pericyten produceren ook prostaglandinen - 8 à 10 keer meer dan gladde spiercellen - en deze prostaglandinen zouden de permeabiliteit van de BHB moduleren (Kaley, Hintze *et al.* 1985). Het is aangetoond dat enzyme aminopeptidase N enkel gelokaliseerd is in de pericyten van de hersencapillairen (Krauze, Kunz *et al.* L. R. Drewes, A. L. Betz 1992). Dit enzyme breekt polypeptiden af (Kenney and Turner 1987), ook vasoactieve peptiden die de pericyten kunnen doen relaxeren en zo invloed hebben op de permeabiliteit van de BHB (Kelley, D'Amore *et al.* 1988).

I.1.4 Overige componenten van de neurovasculaire eenheid

Microglia zijn endogene immuuncellen van het CZS, die samen met de endotheelcellen en de pericyten naar de ontwikkelende hersenen migreren (Haseloff, Blasig *et al.* 2005). De rol van microglia is nog niet volledig gekend, maar er zijn aanwijzingen dat ze in pathologische condities betrokken zijn bij het transport van monocyt doorheen de BHB (Persidsky, Ghorpade *et al.* 1999).

Neuronen zouden een belangrijke rol spelen in de inductie van de BHB, want tijdens de vroege ontwikkeling van de hersenen zijn de astrocyten nog afwezig, waardoor de endotheelcellen op dat moment nog in rechtstreeks contact met de neuronnen staan. (Haseloff, Blasig *et al.* 2005).

De basale lamina bestaat uit collageen type IV, fibronectine en laminine en is gepositioneerd tussen de endotheelcellen en de eindvoetjes van de astrocyten. Twee membranen vormen samen de basale lamina: een dikker membraan aan de kant van de eindvoetjes van de astrocyten en een dunner membraan aan de kant van de endotheelcellen. De dunnere membraan bevat "pockets" die loodrecht op de lengte van het bloedvat staan (Simard, Arcuino *et al.* 2003b) en de pericyten bevatten (Diaz-Flores, Gutierrez *et al.* 1991; Nakano, Atobe *et al.* 2000). Simard *et al.* beschrijven dat endotheelcellen, astrocytaire eindvoetjes en pericyten als fysisch van elkaar gescheiden (Simard, Arcuino *et al.* 2003b) en dit in tegenstelling tot onderzoeken van andere groepen die tight junctions en gap junctions tussen endotheelcellen en pericyten detecteerden (zie 1.1.3). De basale membraan fungeert als een vasthechtingsplaats voor endotheelcellen via de interactie van laminine met integrine receptoren op het barrière endotheel (Hynes 1992). Eiwitten van de basale membraan kunnen de expressie van de tight junction-eiwitten beïnvloeden en ze zo in stand houden (Tilling, Korte *et al.* 1998; Savettieri, Di Liegro *et al.* 2000).

II. Metabole barrière

D-glucose is het belangrijkste energiebron van de hersenen. Gezien de minimale opslag van glucose in de vorm van glycogeen in de hersenen, moet glucose continu vanuit het bloed aangevoerd worden (Barros, Bittner et al. 2007). Het transport van glucose over de BHB wordt gemedieerd door de 55kDa vorm van GLUT1 die glucose volgens zijn concentratiegradiënt – 5mM in het bloed versus 1mM in de hersenen – transporteert. In rustomstandigheden is het glucosetransport voldoende, maar wel nauwelijks boven het verbruik van glucose. Tijdens toegenomen neuronale activiteit wordt meer energie verbruikt door de hersenen voor het herstel van de gecreëerde membraanpotentialen en iongradiënten (McCall 2004). In aanwezigheid van een externe prikkel zal het transport van glucose bijgevolg limiterend worden (Leybaert 2005). Er is reeds ruime evidentie dat neuronale activiteit gelinkt is aan de toevoer van glucose via het bloed (neurovasculaire koppeling), en er werd ook een verband tussen neuronale activiteit en metabolisme van glucose (neurometabole koppeling) aangetoond. Een toegenomen aanvoer van glucose via het bloed (neurovasculaire koppeling) is echter niet voldoende aangezien het glucosetransport gesatureerd is. Neurovasculaire koppeling is waarschijnlijk het snelste, maar op zichzelf niet voldoende om de nodige verhoging van het glucose transport te onderhouden (Leybaert, De Bock *et al.* 2007), omdat de hogere aanvoer van de glucose naar de regio van verhoogde activiteit niet automatisch meer glucose opname in deze regio betekent. Daarom moet ook het glucosetransport gemedieerd door GLUT1 gestimuleerd worden. Dit mechanisme kreeg de naam neurobarrière koppeling, en kan gezien worden als ontbrekende schakel tussen neurovasculaire en neurometabole koppeling.

II.1 Glucose

Glucose is de belangrijkste bron van energie voor de hersenen. Het metabolisme van glucose komt gecompartmentaliseerd voor in de hersenen: de glycolyse gaat door in het cytosol van astrocyten terwijl de Krebscyclus en oxidatieve fosforylatie in de neuronen doorgaan. De tijdens de glycolyse gevormde pyruvaat moleculen worden omgezet naar lactaat dat wordt getransporteerd naar de mitochondria van neuronen. Dit proces wordt *astrocyte-neuron lactate shuttle* genoemd (Chih and Roberts Jr 2003). Wanneer glucose opgenomen wordt in de astrocyten, wordt het omgezet in glucose-6-fosfaat door het hexokinase met verbruik van één ATP molecule. Glucose-6-fosfaat wordt ofwel gekataboliseerd met productie van ATP ofwel omgezet in glycogeen. In de vorm van glycogeen wordt glucose in de cellen gestapeld. In de hersenen gebeurt dit in de astrocyten, maar slechts in zeer beperkte mate. Het proces van de afbraak van glucose met productie van energie noemt glycolyse en alle reacties daarvan gaan in het cytosol door. Bij katabolisatie van glucose-6-fosfaat wordt nog één ATP molecule gebruikt met

vorming van fructose 1,6-bisfosfaat en dit is de *committed step* in de reactie van de glycolyse. Door verdere reacties ontstaan er uiteindelijk twee glyceraldehyde-3-fosfaat moleculen, die op hun beurt worden afgebroken tot twee moleculen pyruvaat met productie van vier ATP moleculen. Tijdens dit proces van glycolyse worden dus netto twee moleculen ATP per molecule glucose geproduceerd (Vandekerckhove 2004).

De nettoreactie van de glycolyse:



Voor de volledige reactie: zie bijlage.

Het verdere gebruik van pyruvaat is afhankelijk van de condities in de cel: in anaerobe condities wordt pyruvaat omgezet tot lactaat en in aerobe omstandigheden wordt pyruvaat omgezet in acetyl-CoA, de uitgangsmolecule van de Krebs cyclus (Vandekerckhove 2004).

Deze Krebs cyclus gaat door in de mitochondria. De omzetting van pyruvaat naar acetyl-CoA door pyruvaatdehydrogenase is de *committed step* van de Krebs cyclus. Hierbij wordt één NADH molecule gegenereerd. Bij de vorming van α -ketoglutaaraat, succinyl-CoA en oxaalacetaat wordt eveneens één molecule NADH gevormd. Bij omvorming van succinaat naar fumaraat ontstaat er één molecule FADH₂ en bij het ontstaan van succinaat uit succinyl-CoA wordt GTP gegenereerd. Deze omzetting van succinyl-CoA naar succinaat is de enige stap in de Krebs cyclus waarbij een hoog energetische fosfaatverbinding wordt gecreëerd (Vandekerckhove 2004).

De nettoreactie van de Krebs cyclus:



Voor de volledige reactie: zie bijlage.

Door de oxidatieve fosforylatie in de mitochondria worden uit elke NADH-molecule drie en uit elke FADH₂ twee ATP-moleculen bekomen (Vandekerckhove 2004). Zo bekomt men uiteindelijk een totaal van 36 moleculen ATP per glucose molecule.

II.2 Glucose transporters (GLUTs)

Door de aanwezigheid van de BHB kan het in het bloed aanwezige glucose de hersenen niet bereiken via gewone diffusie. Daarom bestaan er specifieke glucose transporters om deze weefsels alsnog van

glucose te voorzien. Dit transport gebeurt door middel van gefaciliteerde diffusie volgens de concentratie gradiënt. Het transport van glucose in de cel is de snelheidsbepalende stap.

Voorlopig zijn 9 GLUT eiwitten bekend (Hruz and Mueckler 2001), allen met een verschillende affiniteit voor glucose. GLUT transporters zijn integrale membraan eiwitten, die onderling een hoge homologie vertonen. Elke transporter bestaat uit 12 transmembranaire domeinen, carboxy- en aminotermus intracellulair gelokaliseerd en een glycosylatiesite op de extracellulaire lus tussen de eerste en de tweede transmembranaire helices (Vannucci, Maher *et al.* 1997). De twee meest frequent aanwezige transporters in de hersenen zijn de GLUT1 en de GLUT3 transporter (Vannucci, Maher *et al.* 1997).

II.2.1 GLUT1

GLUT1 is de primaire transporter in de BHB, de choroide plexus, ependymcellen en gliacellen (Hogan, Heyner *et al.* 1991; Guo, Geng *et al.* 2005). Het GLUT1 gen, *Solute Carrier Family 2A1* (SLC2A1), is gelegen op chromosoom 1 (1p35–31.3) en bevat 10 exonen en 9 intronen (Mueckler, Caruso *et al.* 1985; Joost, Bell *et al.* 2002). Er bestaan twee vormen van de GLUT1 transporter: de 55kDa vorm en de 45kDa vorm. Deze beide vormen zijn afkomstig van hetzelfde gen, maar verschillen in hun hoeveelheid glycosylaties (Birbaum, Haspel *et al.* 1986). De 55kDa vorm is enkel aanwezig in de endotheelcellen van de BHB, terwijl de 45kDa voornamelijk voorkomt in astrocyten, maar eveneens in andere cellen van de hersenen (Maher, Vannucci *et al.* 1994; Vannucci, Maher *et al.* 1997).

Oorspronkelijk dacht men dat GLUT1 twee glucose bindingsplaatsen bevatte: één cytoplasmatisch en één extracellulair, welke niet op hetzelfde moment bezet kunnen worden. Deze observatie bleek niet in overeenstemming met andere gegevens (Helgerson and Carruthers 1987; Hamill, Cloherty *et al.* 1999), wat heeft geleid tot de ontwikkeling van een nieuw model. Volgens dit model is GLUT1 een homotetrameer opgebouwd uit twee GLUT1 dimeren. Als in één van de dimeren een cytoplasmatische bindingsplaats beschikbaar is, is in de andere dimeer een extracellulaire plaats toegankelijk. Zo wordt ook bij verandering van de conformatie van een dimeer, de conformatie van het andere in de tegenovergestelde richting veranderd (Hamill, Cloherty *et al.* 1999).

In de BHB is GLUT1 asymmetrisch verspreid: *immunogold* elektronmicroscopie toont een verschil in spreiding tussen de luminale en de abluminale membraan dat zich verhoudt als 2:1 (Farrell and Partridge 1991; Cornford, Hyman *et al.* 1993; Cornford, Hyman *et al.* 1995). Op basis van cytochalasine B binding en *western blot* met antilichamen tegen de intracellulaire lus wordt daarentegen een 1:1 verhouding gesuggereerd (Simpson, Vannucci *et al.* 2001).

II.3 Neurovasculaire koppeling

De nauwe ruimtelijke en temporele relatie tussen de neurale activiteit en de cerebrale bloedvoorziening wordt neurovasculaire koppeling of functionele hyperemie genoemd. Dit proces houdt in dat bij verhoogde hersenactiviteit in een bepaald regio, de bloedtoevoer naar de actieve regio stijgt door een toename van de diameter van de arteriolen, die bloed aanvoeren naar het hersenweefsel (Iadecola 2004). De stijging van de bloedtoevoer door de verhoogde activiteit gebeurt heel snel en is beperkt tot het gebied van de verhoogde activiteit (Iadecola 2004). De toename van de bloedtoevoer zou veroorzaakt worden door vasoactieve stoffen zoals K^+ - en H^+ -ionen, dopamine, NO en adenosine. Het is zo dat inhibitie van één van deze stoffen de verhoogde bloedtoevoer nooit volledig ongedaan kan maken en dat ook de grootte van het effect van elke vasoactieve stof apart sterk afhankelijk is van het precieze gebied in de hersenen (Iadecola 2004). Eén dominante mediator van vasodilatatie, geïnduceerd door verhoogde hersenactiviteit, bestaat dus niet.

Niet alleen de arteriolen in de zone van activatie moeten gerelaxeerd worden, maar ook in de stroomopwaarts gelegen arteriën dient vasodilatatie op te treden om het stroomafwaarts gelegen gebied van bloed te voorzien (Duling, Hogan et al. 1987). Dit proces gebeurt via nog niet volledig opgehelderde mechanismen. Er bestaan wel een aantal theorieën hiervoor. De op dit moment meest waarschijnlijke theorie beschrijft de intramurale vasculaire signaaltransductie. Volgens deze theorie wordt het signaal tot vasodilatatie via gap junctions tussen de endotheelcellen en de gladde spiercellen doorgegeven (Dietrich, Kajita et al. 1996) en wordt aldus relaxatie van de vaatwand veroorzaakt.

Ter hoogte van de BHB kunnen vasoactieve stoffen worden losgelaten door de neuronen die in contact staan met de capillairen (Iadecola 2004). In de astrocyten zouden Ca^{2+} golven zich naar de eindvoetjes verplaatsen en daar de vrijstelling van vasoactieve stoffen bv. prostaglandine E_2 (PGE_2) veroorzaken (Zonta, Angulo et al. 2003).

II.4 Neurometabole koppeling

De relatie tussen het glucose verbruik en neuronale activiteit wordt neurometabole koppeling genoemd. De stijging van de neuronale activiteit wordt aangevoeld door astrocyten ter hoogte van de glutamaterge synaps. Glutamaat wordt hier in cotransport met drie Na^+ ionen opgenomen door de astrocyt wat de intracellulaire concentratie van Na^+ ionen doet stijgen (Chatton, Marquet et al. 2000). Om deze stijging te compenseren, wordt het Na^+/K^+ -ATPase geactiveerd, dat Na^+ weer naar buiten pompt. Na^+/K^+ -ATPase heeft ATP nodig om te functioneren en dus zal de ATP concentratie dalen. Glucose wordt gebruikt om ATP aan te maken en zo stijgt dus de omzetting van glucose naar lactaat (anaerobe glycolyse) (Pellerin and Magistretti 1994; Voutsinos-Porche, Bonvento et al. 2003). Op deze manier worden glutamaat

vrijstelling en het astrocytaire glucose metabolisme op een stoichiometrische manier met elkaar verbonden (Pellerin and Magistretti 1997) en ontstaat er metabole koppeling.

II.5 Neurobarrière koppeling

Neurobarrière koppeling beschrijft het verband tussen de neuronale activiteit en het vermogen van de glucose transporter GLUT1 om glucose over de BHB te transporteren. Dit vermogen neemt toe door een verhoogde incorporatie van GLUT1 in de celmembraan (T_{\max} stijgt) en/of door een verhoogde affiniteit van de transporter voor glucose (K_t daalt) (Leybaert 2005). Neurobarrière koppeling dient te gebeuren op een tijdschaal van seconden of tientallen seconden analoog als neurovasculaire en neurometabole koppeling (Leybaert, De Bock *et al.* 2007). Het is bekend dat N-glycosylatie van GLUT1 de affiniteit van de transporter voor glucose verhoogt (Ahmed and Berridge 1999), maar dit proces blijkt traag te zijn gezien het cotranslationeel verloop (Landolt-Marticorena and Reithmeier 1994) en kan dus moeilijk verantwoordelijk zijn voor neurobarrière koppeling.

Als mogelijke verklaring blijft dus nog de stijging van de T_{\max} over. Om het glucose transport met 25% te doen stijgen, moet de T_{\max} met dezelfde waarde omhoog gaan. Cornford *et al.* toonde reeds aan dat veranderingen in deze grootte-orde mogelijk zijn *in vivo*. Tijdens een epileptisch insult, geïnduceerd door pentyleentetrazole (PTZ), verhoogde T_{\max} 30-40% en dit binnen de 3min (Cornford, Nguyen *et al.* 2000). In astrocyten werden veranderingen van het transportvermogen na stimulatie met glutamaat binnen de 10s aangetoond (Loaiza, Porras *et al.* 2003).

De snelste manieren om T_{\max} te doen stijgen zijn translocatie van GLUT1 transporters uit de intracellulaire pool naar het membraan of *unmasking* van in het membraan aanwezige GLUT1 transporters door hun verplaatsing vanuit *detergent-resistant membrane* (DRM) waar de inhibitorisch bindingspartner stomatine zich bevindt naar de non-DRM zones. De intracellulaire pool van GLUT1 wordt geschat op 40% van het totale aantal GLUT1 transporters, terwijl de resterende 60% te vinden zijn in de celmembraan (Farrell and Pardridge 1991). Er wordt gesuggereerd dat deze pool voldoende is om de fysiologische transportstimulatie te verzekeren (Leybaert, De Bock *et al.* 2007). Proteïne kinase C (PKC) en calcium zijn gekende stimulators van de GLUT1 translocatie (Nishimura and Simpson 1994) terwijl AMPK (*AMP-activated kinase*) *unmasking* stimuleert (Barnes, Ingram *et al.* 2002).

II.6 GLUT1 stimuli

Tijdens een verhoogde neuronale activiteit treedt ook een toename in de vrijstelling van neurotransmitters op. Deze zijn dus potentiële stimuli voor neurobarrière koppeling. De BHB wordt geïnnerveerd door neuronale efferenten van de in de hersenstam gelegen *locus ceruleus* (noradrenerg), *nucleus* van Raphe

(serotonerg) en *nucleus basalis* van Meynert (cholinerg) (Kalaria 1996; Farkas and Luiten 2001). Verdere evidentie voor een directe werking van neurotransmitters op de BHB wordt geleverd door de aanwezigheid van receptoren voor deze neurotransmitters (Durieu-Trautmann, Foignant *et al.* 1991; Cohen, Bonvento *et al.* 1996; Elhusseiny, Cohen *et al.* 1999; Ballabh, Braun *et al.* 2004). Een andere belangrijke neurotransmitter die inwerkt op het BHB endotheel is histamine, welke vooral belangrijk is in de regulatie van de doorbloeding van de hersenen (Karlstedt, Sallmen *et al.* 1999). Anderzijds is het ook mogelijk dat neurotransmitters onrechtstreeks, met tussenkomst van astrocyten, hun invloed uitoefenen op het glucosetransport over de BHB. Als reactie op een stimulus kunnen astrocyten enkele neuromodulerende en vasoactieve substanties zoals glutamaat, NO en ATP vrijstellen (Abbott, Ronnback *et al.* 2006). Deze substanties worden gliotransmitters genoemd. Evidentie voor de invloed van neuro- en gliotransmitters op GLUT1 komt vooral uit experimenten uitgevoerd op non-BHB cellen. Zo toonde Shimizu *et al.* aan dat noradrenaline de affiniteit van GLUT1 voor glucose doet toenemen in adipocyten (Shimizu, Satoh *et al.* 1998). Ook voor serotonine werd dergelijk effect beschreven; in skeletspieren kan serotonine de GLUT gemedieerde glucoseopname doen toenemen door middel van translocatie (Hajdich, Rencurel *et al.* 1999). Verder kan ook ATP gezien worden als een belangrijke molecule voor stimulatie van glucosetransport via GLUT1. Enerzijds is ATP naast een belangrijke energiemolecule ook een cotransmitter voor noradrenaline en acetylcholine (van Bohlen und Halbach and Dermietzel 2002). Anderzijds wordt het vrijgesteld door astrocyten in respons op verschillende stimuli (Lazarowski, Boucher *et al.* 2003). In skeletspiercellen resulteert binding van ATP op P₂ γ receptoren in een stimulatie van het glucosetransport tengevolge van een translocatie van GLUT1 (Kim, Lee *et al.* 2002).

III. Calcium

III.1 Intracellulaire calcium signalisatie

III.1.1 Regulatie van de intracellulaire calcium concentratie

De $[Ca^{2+}]_i$ is ongeveer 100nM, terwijl extracellulaire waarden van 1.2mM bereikt worden. Daardoor is de elektrochemische gradiënt voor Ca^{2+} naar intracellulair gericht (Ganong 2003). Het intracellulaire calcium wordt echter laag gehouden door Ca^{2+} bindende eiwitten in het cytoplasma (bv. GRP94, BiP, RP60 en calreticulin) en door Ca^{2+} pompen die het ion ofwel naar buiten (Ca^{2+}/H^+ -ATPase en het Na^+/Ca^{2+} antiporter) ofwel in de celorganellen pompen (Ganong 2003). Het belangrijkste celorganel dat calcium opslaat is het endoplasmatisch reticulum (ER) dat 75% van de totale calciumreserve in de cel bevat (Wood and Gillespie 1998). De pomp die de influx van calcium in het ER bewerkstelligt is het sarco-endoplasmatisch reticulum calcium ATPase (SERCA). $[Ca^{2+}]_i$ kan stijgen door influx vanuit het extracellulair milieu of door vrijstelling uit de intracellulaire opslagplaatsen. Calcium komt de cel binnen via ligandgevoelige calciumkanalen of via *store-operated Ca^{2+} channels* (SOCs) die worden geactiveerd door de vrijstelling van Ca^{2+} uit de intracellulaire opslagplaatsen (Ganong 2003). De vrijstelling van Ca^{2+} uit deze intracellulaire opslagplaatsen gebeurt via de activatie van inositol 1;4;5-trisfosfaat (IP_3) receptoren en ryanodine receptoren door IP_3 of ryanodine (Ganong 2003). Na binding van het ligand op een G-eiwit gekoppelde receptor wordt fosfolipase C (PLC) geactiveerd. Het PLC op zijn beurt katalyseert de splitsing van fosfatidylinositol 4,5-difosfaat (PIP_2) in IP_3 en diacylglycerol (DAG). Binding van IP_3 op een receptor van het ER stelt tenslotte calcium vrij uit het ER (Ganong 2003). Calcium is een belangrijke *second messenger* in de cel. Na influx in de cel of vrijstelling uit de ER kan calcium onder andere calmoduline binden en dit complex kan dan de Ca^{2+} -calmoduline dependente kinasen activeren (Ganong 2003).

III.1.2 Temporo-spatiale organisatie van de calcium signalisatie

Calcium kan heel veel verschillende fysiologische processen in verscheidene cellen regelen, onder andere neuronale signalisatie, contractie, secretie en bevruchting (Ganong 2003; Dupont, Combettes *et al.* 2007). Dit is mogelijk dankzij de spatio-temporele organisatie van Ca^{2+} -stijgingen in de tijd en ruimte (de temporo-spatiale organisatie) (Dupont, Combettes *et al.* 2007).

Het temporele aspect betekent dat de intracellulaire calcium stijging niet continu verloopt, maar als herhalende oscillaties (Dupont, Combettes *et al.* 2007). Deze oscillaties worden veroorzaakt door vrijstelling van Ca^{2+} uit het ER, waardoor $[Ca^{2+}]_i$ stijgt. Aangezien hoge $[Ca^{2+}]_i$ toxisch zijn voor de cel is er nood aan een negatief feedback mechanisme waardoor $[Ca^{2+}]_i$ weer daalt, zo worden PLC en IP_3

receptor geïnhibieerd door calcium, terwijl het metabolisme van IP_3 door calcium wordt gestimuleerd. Eens $[Ca^{2+}]_i$ gedaald is tot een veilig niveau, valt de inhibitie van PLC en IP_3 weg en kan de $[Ca^{2+}]_i$ opnieuw beginnen stijgen (Dupont, Combettes et al. 2007). De vorm van de Ca^{2+} -oscillaties wordt bepaald door het type en de concentratie van het extracellulaire signaal, bv. hormoon of neurotransmitter (Dupont, Combettes et al. 2007). De frequentie van de Ca^{2+} -oscillatie stijgt eveneens met de stijgende concentratie van het extracellulaire signaal en dit proces is gekend als *frequency coding* (Dupont, Combettes et al. 2007).

De spatiale organisatie wijst op het feit dat de Ca^{2+} -oscillaties vaak samen voorkomen met intracellulaire Ca^{2+} -golven (Berridge 1993). Meestal gaat de lokale $[Ca^{2+}]_i$ eerst stijgen waarna deze toename zich als een golf voortplant door de cel en dit met een snelheid van 10-50 $\mu\text{m/s}$ (Berridge and Dupont 1994). De vorm van de intracellulaire Ca^{2+} -golven is afhankelijk van het celttype waarin de golf ontstaat (Dupont, Combettes et al. 2007). De exacte rol van deze intracellulaire Ca^{2+} -golf is nog niet helemaal opgehelderd (Dupont, Combettes et al. 2007).

III.2 Extracellulaire calcium signalisatie

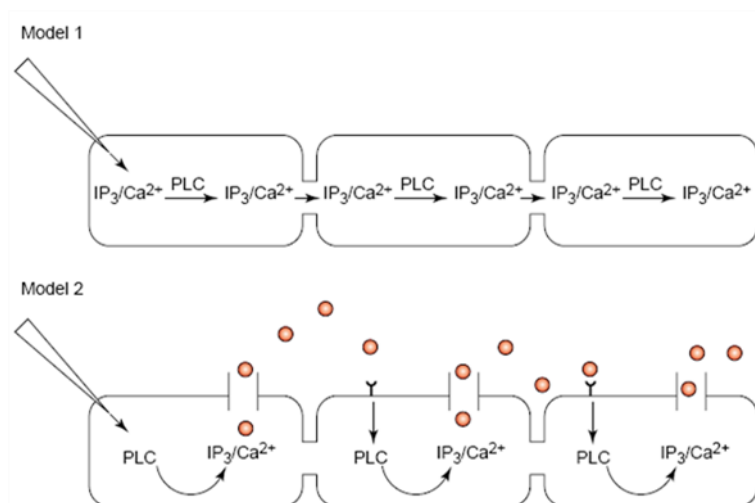
Meestal stopt de intracellulaire Ca^{2+} -golf niet aan het celmembraan, maar wordt ze doorgegeven naar naburige cellen. Intercellulaire Ca^{2+} -golven kunnen tientallen tot honderden cellen beslaan, afhankelijk van de sterkte van de stimulus en van voortplantingsmechanisme (Sanderson, Charles et al. 1994). Dergelijke golven werden in vele verschillende celtypes vastgesteld (Dupont, Combettes et al. 2007), waaronder ook endotheelcellen (Burdyga, Shmygol *et al.* 2003; Vandamme, Braet *et al.* 2004; Gomes, Srinivas *et al.* 2006). Intercellulaire Ca^{2+} -golven kunnen ofwel homotypisch (tussen dezelfde soort cellen), maar ook heterotypisch (tussen verschillende soorten cellen) zijn (Dupont, Combettes et al. 2007). Er bestaan twee verschillende mechanismen die de voortplanting van de Ca^{2+} -golven onderhouden: gap junctions en paracrine signalisatie (Dupont, Combettes et al. 2007). Meestal vindt voortplanting van de Ca^{2+} -golf plaats via beide mechanismen (Frame and de Feijter 1997; Jorgensen, Geist *et al.* 1997; Fam, Gallagher *et al.* 2000; Scemes, Suadicani *et al.* 2000; Suadicani, Flores *et al.* 2004; Henriksen, Hiken *et al.* 2006).

Gezien de gap junctie een directe verbinding vormt tussen de twee cellen, kunnen stoffen als IP_3 zo naar de naburige cellen diffunderen volgens hun concentratiegradiënt. Sanderson *et al.* tonen aan dat wanneer in een cel activatie van de PLC en de IP_3 productie plaatsvindt, het IP_3 via de gap junctions de volgende cel kan bereiken en zo de vrijstelling van Ca^{2+} uit de intracellulaire opslagplaatsen kan veroorzaken (Sanderson 1995). Golven die ontstaan via gap junctions kunnen zich maar over een beperkte afstand

voortplanten en geraken gemiddeld niet verder dan enkele opeenvolgende cellen (Braet, Paemeleire *et al.* 2001; Fry, Evans *et al.* 2001; Braet, Vandamme *et al.* 2003).

Het mechanisme van de paracriene signalisatie verloopt via de vrijstelling van Ca^{2+} -mobiliserende boodschapperstoffen in het extracellulaire compartiment. Deze signaalmoleculen kunnen vervolgens receptoren op naburige cellen binden, waardoor de signalisatie cascade op gang komt die uiteindelijk Ca^{2+} zal vrijstellen (Dupont, Combettes *et al.* 2007).

ATP komt in de meeste soorten cellen als Ca^{2+} -mobiliserende boodschapperstof voor (Dupont, Combettes *et al.* 2007). ATP wordt meestal door middel van exocytose vrijgesteld in de extracellulaire ruimte (Bodin and Burnstock 2001; Knight, Bodin *et al.* 2002; Montana, Malarkey *et al.* 2006), maar diffusie door een *pore channel* – zijnde een hemikanaal of een $\text{P}_{2\text{X}7}$ receptor kanaal (Tran Van Nhieu, Clair *et al.* 2003; Evans, De Vuyst *et al.* 2006; Suadicani, Brosnan *et al.* 2006) - is ook mogelijk. Het effect van de binding van een signaalmolecule op haar receptor kan een influx van Ca^{2+} via een aan de receptor gelinkt plasmamembraan-kanaal zijn (Cornell-Bell, Finkbeiner *et al.* 1990), maar meestal wordt via een G-eiwit gekoppelde receptor PLC geactiveerd, wat tot een $[\text{IP}_3]_i$ stijging leidt (Scemes 2000; Scemes, Suadicani *et al.* 2000; Gallagher and Salter 2003; Gomes, Srinivas, Vereecke *et al.* 2005; Piazza, Ciubotaru *et al.* 2007).



Figuur 4: Voorstellingen van mogelijke mechanismen van Ca^{2+} signalisatie. Model 1 stelt het mechanisme van golfoverdracht via de gap juncties tussen de naburige cellen voor. In model 2 wordt het mechanisme via de ATP vrijstelling extracellulair uitgelegd. Overgenomen uit (Nedergaard, Ransom *et al.* 2003).

Bovenvermelde mechanismen behoren tot de passieve mechanismen van de golf voortplanting. Er bestaat ook een actief mechanisme: regeneratie van de signaalmoleculen. Eén mechanisme voor de regeneratie is de *calcium-induced calcium release* (CICR): na diffusie door de gap juncties kan Ca^{2+} op zichzelf Ca^{2+} vrijstelling in de naburige cellen veroorzaken (Hofer, Politi *et al.* 2001). Gezien de binding

van calcium op Ca^{2+} -bindende eiwitten, is de diffusie snelheid van calcium echter veel lager dan van IP_3 (respectievelijk $\sim 20 \mu\text{m}^2/\text{s}$ en $\sim 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (Allbritton, Meyer *et al.* 1992). Een andere mogelijkheid is de Ca^{2+} -getriggerde regeneratie van IP_3 . Aangezien één isovorm van PLC (het $\text{PLC}\epsilon$) wordt geactiveerd door calcium, kan de stijging van Ca^{2+} - wat op zichzelf veroorzaakt werd door de stijging van IP_3 - een synthese van IP_3 stimuleren, waardoor de $[\text{IP}_3]_i$ stijgt (Hofer, Venance *et al.* 2002). Dit zou leiden tot een snellere voortplanting van de golf, gezien de snellere diffusie van IP_3 door grotere concentratieverschillen tussen de cellen. Anderzijds kan dit leiden tot het langer aanhouden van de golf, door regeneratie van de signaalmolecule (Dupont, Combettes *et al.* 2007). Ook de extracellulaire signaalmoleculen kunnen geregenereerd worden. Bijvoorbeeld de ATP-geïnduceerde ATP-vrijstelling: hierbij veroorzaakt extracellulair ATP, na binding op zijn receptor, een opening van de porie die de vrijstelling van ATP mogelijk maakt (Duan and Neary 2006).

Een ander aspect van de intercellulaire Ca^{2+} golven is het bestaan van *trigger cells*. Dit is een subpopulatie van de cellen in welke de loslating van ATP gebeurt door opening van hemikanalen en die 10-25% van de totale celpopulatie uitmaken (Evans, De Vuyst *et al.* 2006). Het is bekend dat het openen van de hemikanalen zowel afhankelijk is van $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (De Vuyst, Decrock *et al.* 2006) als $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (Hofer and Dermietzel 1998; Stout, Costantin *et al.* 2002). Ca^{2+} -golven kunnen zich voortplanten in de *trigger cell* vrije zone door middel van diffusie van de signaalmoleculen. Als de golf vervolgens een *trigger cell* aantreft, kan regeneratie van de signaalmolecule optreden en kan aldus een nieuwe Ca^{2+} -golf ontstaan (Dupont, Combettes *et al.* 2007).

Materialen en methoden

I. Celcultuur

I.1 Cellijn

In dit project werden RBE4 (*rat brain endothelial*) cellen gebruikt. Deze cellen zijn endotheelcellen afkomstig van de hersenen van de rat die werden geïmmortaliseerd door transductie van het adenovirus E1A gen (Roux and Couraud 2005). Bovendien vertoont deze cellijn 1) een niet getransformeerd fenotype, de morfologie van BHB endotheel is dus bewaard gebleven (Roux and Couraud 2005), 2) de aanwezigheid van endotheliale merkers zoals Factor VIII (Roux, Durieu-Trautmann et al. 1994), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Durieu-Trautmann, Chaverot et al. 1994) en de expressie van de BHB specifieke 55kDa GLUT1 isovorm (Hosoya, Takashima et al. 2000), 3) BHB specifieke eigenschappen zoals de K_m van het GLUT1 transport die gelijk zijn aan *in vivo* metingen (Regina, Roux et al. 1997b).

I.1.1 Coaten van het recipiënt

Principe: Om RBE4 cellen te kunnen groeien moeten mattees, 4-, 6-, en 24-well platen en cultuurflesjes met collageen type I gecoat worden.

Materialen: collageen type I (Roche Diagnostics GmbH); mattees (MatTek corporation); 4- well platen (Nunclon delta Si); 6- well platen (Falcon, Becton Dickinson); 24-well platen (Falcon, Becton Dickinson); cultuurflesje (TPP, Novolab); PBS⁻ (voor samenstelling zie bijlage).

Methode: Het recipiënt wordt bedekt met collageenoplossing (200 µg/mL). Dit moet ten minste 2uur blijven staan om collageen de kans te geven vast te hechten aan het recipiënt, waarna de collageenoplossing afgezogen wordt. Vervolgens wordt het recipiënt drie keer gewassen met PBS⁻.

I.2 Celcultuur opstarten

Materialen: 15ml tube (Novolab); centrifuge (Analis); 25cm² cultuurflesje; ampulles (Greiner); laminaire flow (Gelaire); medium (voor samenstelling zie bijlage); CO₂ incubator (Applitek NV).

Methode: De ampulles met de benodigde cellijn worden uit de stikstofstank gehaald en ontdooid bij 37°C. In de laminaire flow wordt de ampulle vervolgens in 10 ml medium in een 15 ml tube overgebracht. Dit alles wordt één minuut gecentrifugeerd aan 500 g. Het supernatans wordt vervolgens zorgvuldig afgezogen en aan de overgebleven celpellet wordt 5 ml vers medium toegevoegd. Deze cellen worden in de laminaire flow overgebracht in een 25 cm² cultuurflesje en bewaard in een CO₂ incubator op 37°C, 5% CO₂.

1.3 *Cellen splitsen en uitzaaien*

Materialen: Cultuurflesjes; 15 en 50 ml tubes; trypsine-EDTA (Gibco); medium; 6-well platen; mattechs; 4-well platen; 24-well platen; laminaire flow.

Methode: De cellen worden gegroeid in een cultuurflesje bij 37°C tot ze een confluente monolaag vormen. Door contact-inhibitie zullen de cellen niet meer verder delen. Om de cellen verder te groeien dienen ze verdeeld te worden over nieuwe cultuurflesjes. Dit gaat als volgt: het oude medium wordt in de laminaire flow afgezogen waarna de cellen gedurende 4min worden geïncubeerd met trypsine-EDTA bij 37°C. Trypsine is een protease dat celcontacten verbreekt. EDTA cheleert het extracellulaire calcium dat nodig is voor cadherine-afhankelijke celadhesie. Samen zorgen zij ervoor dat de cellen van elkaar en van het collageen loskomen. In de laminaire flow wordt vervolgens het trypsine-EDTA geneutraliseerd door 12 ml medium toe te voegen. Om de cellen goed te mengen wordt op en neer gepipetteerd. Vervolgens worden ze gesplitst of uitgezaaid volgens gewenste densiteit.

Het kan nodig zijn de concentratie van de cellen te bepalen. Dit gebeurt als volgt:

Materialen: 25 cm² cultuurflesje; trypsine-EDTA; trypaanblauw (Invitrogen); Burker telkamer (VWR).

Methode: 20 µl van de celsuspensie wordt gemengd met 180 µl trypaanblauw. Dit mengsel wordt in de Burker telkamer gepipetteerd en in beide velden worden de cellen in de drie, diagonaal van elkaar liggende, veldjes geteld. Het aantal cellen per 1 ml wordt bepaald volgens de formule: $x = (\text{getelde cellen} \cdot 10 \cdot 10000) / 3/2$.

1.4 *Het invriezen van de cellen*

Materialen: Cultuurflesjes; 15 ml tubes; trypsine-EDTA; celmedium; DMSO (Sigma-Aldrich); ampulles; centrifuge.

Methode: De cellen moeten in stand gehouden worden en daarom worden ze telkens na het opstarten ingevroren. Wanneer de cellen het stadium van een confluente monolaag bereiken, kunnen ze worden ingevroren. Het oude medium wordt afgezogen in een laminaire flow en de cellen worden losgemaakt door toevoeging van 3 ml trypsine-EDTA. Trypsine wordt gedeactiveerd door toevoeging van 12 ml vers medium. De cellen worden daarna overgeplaatst in een 15 ml tube en voor één minuut bij 500 g gecentrifugeerd. Het supernatans wordt vervolgens afgezogen en de overblijvende celpellet wordt opgelost in vers medium. Van deze oplossing wordt 900 µl overgebracht in een ampulle. Aan deze ampulle wordt nog 100 µl DMSO (een cryoprotectans) toegevoegd alvorens ingevroren te worden op -197°C.

II. Radioactiviteitsmetingen

Principe: Via radioactiviteitsmetingen wordt nagegaan of de opname van radioactief gemerkt 2-deoxyglucose (^3H -2DG) stijgt na de inwerking van een actieve stof in vergelijking met de controle. ^3H -2DG wordt door de cellen opgenomen via de GLUT1 transporter. Eenmaal in de cel wordt ^3H -2DG door het hexokinase gefosforyleerd tot ^3H -2DG-6-fosfaat. Dit laatste kan niet verder gemetaboliseerd worden en accumuleert in de cel. Om detectie mogelijk te maken worden de cellen gelyseerd. Het lysaat wordt gemengd met een scintillatie vloeistof die fluor moleculen bevat. ^3H -2DG is radioactief en stelt β -partikels vrij. De energie van de β -partikel wordt naar het fluor molecule getransfereerd en vervolgens terug vrijgesteld in de vorm van licht. De fotonen kunnen gedetecteerd en gekwantificeerd worden door de scintillatieteller.

Voor de radioactiviteitsmetingen worden de cellen gegroeid tot confluentie in 6-well platen.

Materialen: ^3H -2DG glucose (Perkin Elmer), HBSS-Hepes met glucose (voor samenstelling zie bijlage); HBSS-Hepes zonder glucose (voor samenstelling zie bijlage); multidish 6-wells; microtiterplaat (Nunclon delta Si); schrapers (Greiner), scintillatieteller (Perkin Elmer, Packard); scintillatiebuisjes (Perkin Elmer); scintillatie vloeistof (Perkin Elmer); floretine (Sigma); Triton X-100 (Sigma); DC protein assay (Biorad); plaatlezer (Victor3, Wallac).

Methode: De cellen worden drie maal gespoeld met HBSS-Hepes zonder glucose om het extracellulair glucose weg te wassen. Dan worden de oplossingen met ^3H -2DG ($5\mu\text{Ci}$) op de cellen gebracht en geïncubeerd gedurende 15 minuten op 37°C . De eerste well met HBSS-Hepes zonder glucose en ^3H -2DG fungeert altijd als *background*. Na de incubatie worden de cellen drie keer gewassen met floretine, om de opname van ^3H -2DG in de cel stop te zetten. Na het wassen, wordt de floretine afgezogen en wordt $150\ \mu\text{l}$ Triton X-100 op de cellen gebracht waarna de cellen van de bodem van de wells worden geschraapt. Van dit lysaat gaat $100\ \mu\text{l}$ samen met $4\ \text{ml}$ scintillatievloeistof in de scintillatieteller en wordt er $5\ \mu\text{l}$ gebruikt om de eiwitconcentratie te bepalen (zie IX.2).

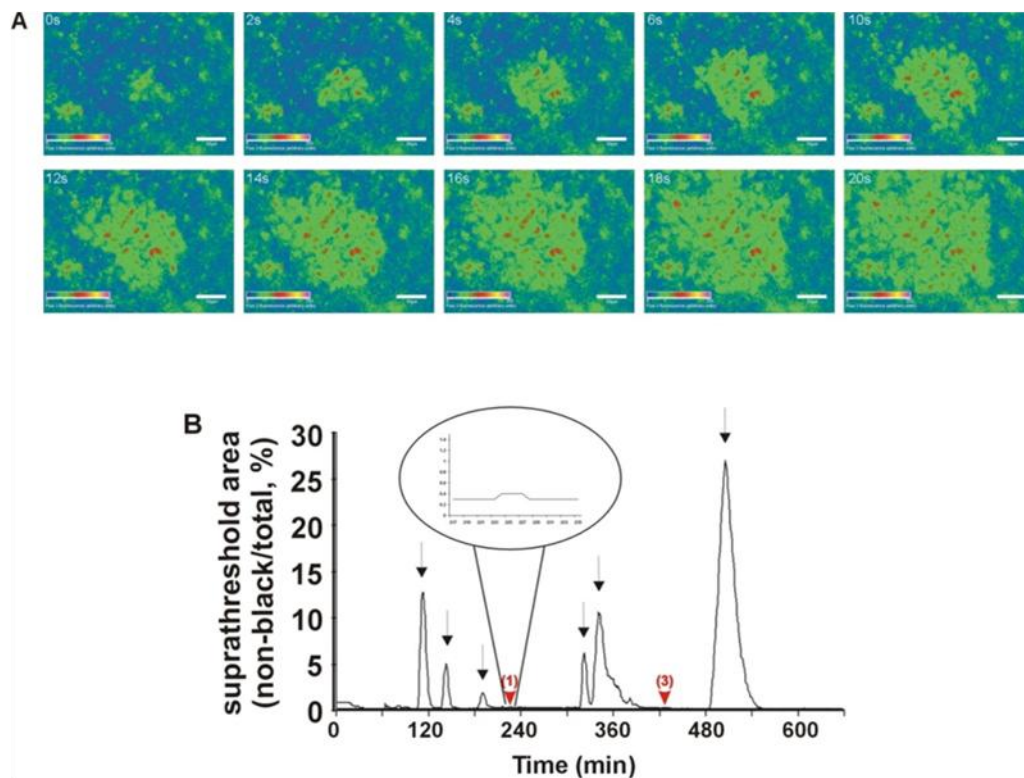
III. Calciummetingen

Principe: Meting van de verandering van de intracellulaire calciumconcentratie gebeurt met de fluorescente celpermeabele probe fluo3-AM. Door veranderingen in fluorescentieintensiteit van deze probe kunnen de relatieve veranderingen van $[\text{Ca}^{2+}]_i$; ten opzichte van de basale activiteit geregistreerd worden.

Materialen: HBSS-Hepes; fluo-3AM -absorptie maximum $506\ \text{nm}$, emissie maximum $526\ \text{nm}$ (MolecularProbes, Invitrogen); probenidol (Sigma-Aldrich); *pluronic acid* (MolecularProbes, Invitrogen);

lage $[Ca^{2+}]$ oplossingen (voor samenstelling zie bijlage): Divalent vrije oplossing (DV-vrij), nominale oplossing (nominal), $100\mu M$ en $200\mu M [Ca^{2+}]_{vrij}$; mattec; omgekeerde epifluorescentiemicroscop (Nikon Eclips TE300, Analis); x40 olie-immersie lens (CFI Plan Fluo, Nikon).

Methodes: Eerst wordt het medium gewegwassen. Dan wordt $10\mu M$ fluo3-AM in HBSS-Hepes met $1mM$ probenid en 0.01% pluronic acid op de cellen aangebracht en worden de cellen voor één uur in het donker op kamertemperatuur geladen. Om te deësterificeren worden de cellen daarna nog drie maal gewassen met HBSS-Hepes met probenid en gedurende 30 minuten in het donker op kamertemperatuur bewaard.



Figuur 5: Calciumsignalen in RBE4. A) Voorbeeld van een calciumgolf in RBE4. Scalebar is $50\mu m$, de gekleurde scalebar stelt de fluo3 fluorescentie in arbitraire eenheden, variërend van 0 tot 255, voor. De golf die hier wordt weergegeven correspondeert met de laatste golf in de grafiek in B. B) Voorbeeld van een analyse. Pijltjes wijzen op golven. Pijlpuntjes zijn oscillaties met aantal oscillaties tussen haakjes (zie ook uitvergroting grafiek).

Daarna kan de meting zelf gebeuren aan de hand van een omgekeerde epifluorescentiemicroscop met een x40 olie-immersie lens. Opnames en analyse gebeuren met het zelfgeschreven *FluoFrames* programma. Beeldjes werden elke seconde opgenomen. Eerst wordt gedurende één minuut de basale calcium activiteit in HBSS-Hepes geregistreerd, daarna wordt in 3 wasstappen HBSS-Hepes vervangen door een oplossing met lage $[Ca^{2+}]$, ATP of H_2O_2 . Vervolgens wordt nog 10min verder gemeten. Voor de controle werd hetzelfde protocol gevolgd met als verschil dat na de 3 wasstappen terug HBSS-Hepes aan

de cellen wordt toegevoegd. Voor de experimenten met Gap27, een inhibitor van connexine 43, werd na 10min de oplossing met lage $[Ca^{2+}]$ in 3 wasstappen vervangen door dezelfde oplossing met Gap27.

Het aantal calciumgolven en oscillerende cellen werd bepaald door de relatieve veranderingen in fluorescentie ($\Delta F/F$) te berekenen en vervolgens een drempelwaarde, welke 100% van de initiële fluorescentie bedraagt, op te leggen aan de beelden. Tenslotte werd dat deel van het beeld, waarin $\Delta F/F$ boven de drempelwaarde is, als % van het totaal beeld geplot versus de tijd (zie Figuur4B).

IV. ATP-release

Principe: ATP-release beschrijft de techniek die wordt gebruikt om aan de hand van de hoeveelheid ATP die de cellen verlaat, de opening van de hemikanalen na te gaan. Detectie gebeurt aan de hand van de reactie tussen luciferine met ATP die wordt gekatalyseerd door luciferase:



Materialen: Multidish 24-wells; HBSS-Hepes; ATP assay kit -emissie maximum 560 nm- bestaande uit 175 μ l van *ATP assay mix* en 700 μ l *ATP dilution buffer* (Sigma-Aldrich); plaatlezer Wallac.

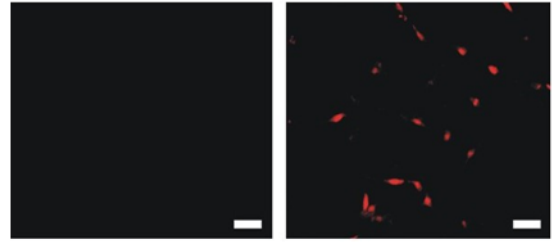
Method: De cellen worden voor *ATP-Release* gegroeid in 24-well platen. Deze cellen mogen niet volledig confluent zijn. De *ATP assay mix* wordt tijdens het uitvoeren van de experimenten bewaard op ijs en in het donker. Alle handelingen met de cellen dienen uiterst voorzichtig te gebeuren om mechanische stimulatie, dat eveneens hemikanalen opent, te vermijden.

Zes wells met controle vloeistof en zes wells met actieve stof (verschillende lage $[Ca^{2+}]$) worden gewassen met 900 μ l HBSS-Hepes met glucose om het medium weg te wassen. De zes controle wells worden nog eens gewassen met 900 μ l HBSS-Hepes met glucose en de zes actieve stof wells worden gewassen met 900 μ l HBSS-Hepes met glucose en actieve stof zelf om het aanwezige Ca^{2+} goed weg te wassen. Na 20 seconden wachten, wordt 150 μ l van het HBSS-Hepes met glucose in de zes controle wells en 150 μ l van de actieve stof in de andere zes wells gebracht. Dan wordt 2,5 minuten gewacht, waarna er 75 μ l van de op ijs gekoelde *ATP-assay mix* aan alle wells wordt toegevoegd zonder de reeds aanwezige vloeistof af te gieten. De plaat wordt in de plaatlezer Wallac gebracht en het resultaat wordt afgelezen. Luminiscentie wordt bepaald bij 560nm gedurende 10s per well.

V. Propidium iodide (PI) uptake

Principe: Deze techniek kan eveneens gebruikt worden om het openen van hemikanalen na te gaan. PI uptake is gebaseerd op de wetenschap dat hemikanalen niet alleen een *release-pathway* zijn, maar ook een weg vormen waarlangs stoffen kunnen worden opgenomen in de cel. Wanneer hemikanalen openen zal PI worden opgenomen en kleurt de celkern rood.

Materialen: Multidish 4-wells; lage $[Ca^{2+}]$ oplossingen; propidium iodide –excitatie maximum 535 nm en emissie maximum 617 nm- (MolecularProbes, Invitrogen); HBSS-Hepes; omgekeerde epifluorescentie microscoop; x10 droge lens (CFI Plan Fluo, Nikon).

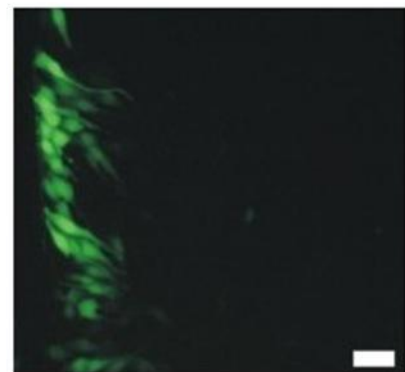


Figuur 6: Voorbeeld van PI opname. Controle (links) en DV-vrij (rechts). Scalebar is 50 μ M.

Methodes: de cellen worden gekweekt in een 4-well plaat tot de cellen subconfluent zijn. De oplossingen worden op voorhand klaargemaakt met een concentratie PI van 1mM. Alle cellen worden eerst gewassen met HBSS-Hepes met glucose. De controle wells worden nog eens gewassen met de HBSS-Hepes met glucose, de andere wells met oplossingen met lage $[Ca^{2+}]$. Vervolgens wordt 250 μ l van HBSS-Hepes met glucose en PI in de controle wells gepipetteerd en wordt er 250 μ l van lage Ca^{2+} concentraties stof met PI in de actieve stof wells gebracht. Dit alles wordt gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur in het donker gelaten. Dan worden alle wells nog 4 keer met HBSS-Hepes met glucose gewassen. De wells worden onder de omgekeerde epifluorescentie microscoop bekeken en er worden 9 foto's genomen: een foto in het midden en telkens twee foto's meer naar rechts, links, onder en boven. De bevindingen worden geanalyseerd met ImageJ met als instellingen: type: 8-bit, threshold: onderste 22, bovenste 255, en de grootte van de partikel minstens 50 pixels².

VI. Scrape Loading and Dye Transfer (SLDT)

Principe: Deze techniek wordt gebruikt om na te gaan of cellen gap junctioneel gekoppeld zijn. In dit experiment wordt in een confluente celcultuur een kras gemaakt zodat de beschadigde cellen aan de kant van de kras de gebruikte kleurstof 6-carboxyfluoresceïne (6-CF), kunnen opnemen. Daarna wordt er geobserveerd of de cellen de kleurstof doorgeven via gap juncties.



Materialen: Multidish 4-wells; HBSS-Hepes; lage $[Ca^{2+}]$ oplossingen; SLDT buffer (samenstelling zie bijlage); SLDT is 50 μ m.

solution (samenstelling zie bijlage); naald; omgekeerde epifluorescentie microscoop; x10 droge lens; 6-CF -absorptie maximum 494nm en emissie maximum 518nm- (MolecularProbes, Invitrogen).

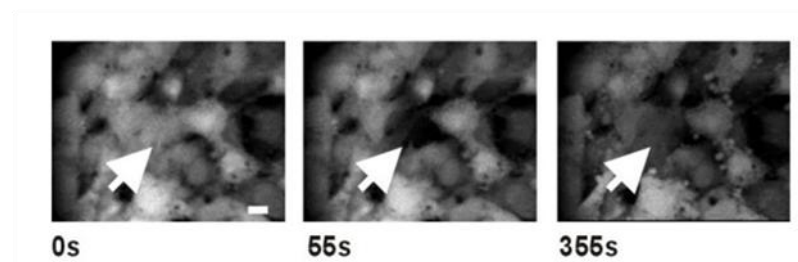
Methodes: De cellen worden drie keer gewassen met SLDT buffer, waarna gedurende één minuut SLDT oplossing op de cellen wordt aangebracht. Daarna wordt met een naald een rechte kras in een cultuur gemaakt, waarna deze voor nog één minuut geïncubeerd wordt op kamertemperatuur. Dan worden de

cellen nog gedurende 10 minuten in HBSS-Hepes geplaatst om te recupereren. Nu kunnen de opnames met de omgekeerde epifluorescentie microscoop gemaakt worden.

VII. Fluorescence recovery after fotobleaching (FRAP)

Principe: Met deze techniek kan eveneens worden nagegaan of er gap juncties bestaan tussen de cellen. Alle cellen worden eerst geïncubeerd met een fluorescente kleurstof. Met de laser wordt één van de cellen belicht waardoor de fluorescentie verdwijnt (*bleaching*). Als er gap juncties tussen de cellen bestaan zal de fluorescente kleurstof uit omliggende cellen naar de gebleachte cel diffunderen waardoor deze opnieuw fluorescent wordt (*recovery*).

Materialen: Petrischaal (TTP, Novolab); 5-CFDM-AM of 5-carboxyfluoresceïn diacetaat-acetoxymethyl ester –absorptie maximum 492nm en emissie maximum 517nm- (MolecularProbes, Invitrogen); laser; omgekeerde epifluorescentie microscoop; x10 water-immersie lens (CFI Plan Fluo, Nikon).



Figuur 8: Voorbeeld van FRAP. 0s: pre-bleach, 55s: net na de bleaching, 355s fluorescentie op het einde van de meting. Het pijtje wijst op de gebleachtecel, schaal: 10µm.

Methode: Voordat het experiment kan doorgaan worden de cellen geladen met 5-CFDA-AM. Daarvoor worden de cellen drie keer met HBSS-Hepes met glucose gewassen. Waarna wordt er 1ml van 5-CFDM-AM in een concentratie van 10µM op de cellen gebracht. De cellen worden één uur in het donker bij kamertemperatuur gezet. Voor de opname worden de cellen nog eens met HBSS-Hepes met glucose gewassen. De opnames gebeuren met fluoframes. Eerst wordt gedurende 1min de initiële fluorescentie bepaald. Vervolgens wordt de cel gebleached waarna de recovery nog gedurende 5min wordt gemeten.

VIII. Immunokleuring

Principe: Met deze techniek kan de aanwezigheid van een eiwit in de cel worden bepaald aan de hand van de specifieke binding tussen dat eiwit en een primair antilichaam gericht tegen dit eiwit. Vervolgens bindt een secundair antilichaam dat is geconjugeerd met een fluorescente molecule het primaire antilichaam waarna dit gevisualiseerd kan worden.

Materialen: multidish 4-wells; primair antilichaam (voor Cx43 Sigma-Aldrich; voor GLUT1 Calbiochem); secundair antilichaam (Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Invitrogen); PBSD⁺ (samenstelling zie bijlage); DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) -excitatie maximum 358 nm en emissie maximum 461 nm (Molecular Probes, Invitrogen); vectashield inbedmiddel (Vectashield, VWR); draagglasje (VWR); dekglasje (VWR); coverslip (VWR); paraformaldehyde 4% (Sigma-Aldrich); Triton X-100; omgekeerde epifluorescentiemicroscop; x40 olie-immersie lens (CFI Plan Fluo, Nikon); *Pig skin* gelatine (Sigma-Aldrich).

Methode: de RBE4 cellen worden gegroeid in een 4-well plaat met een coverslip er in. De antilichamen worden op voorhand verdund in 1/5 in gelatine (2%) en PBSD⁺.

De cellen worden drie keer met PBSD⁺ gewassen, gedurende 25 minuten geïncubeerd met 4% paraformaldehyde en vervolgens opnieuw drie keer gewassen met PBSD⁺. Dan worden de cellen 10 minuten in 0,2% Triton X-100 op ijs gezet en nog eens drie keer met PBSD⁺ gewassen. Nu worden de primaire antilichamen (afkomstig van een konijn) toegevoegd en worden de cellen voor één uur bij kamertemperatuur geïncubeerd. Vervolgens worden de cellen opnieuw drie keer gewassen met PBSD⁺ en worden de secundaire anti-konijn antilichamen toegevoegd waarna gedurende één uur in het donker geïncubeerd wordt op kamertemperatuur. Na één uur wordt alles nog eens gewassen met PBSD⁺ en wordt op de cellen gedurende 5 minuten DAPI (1 µg/ml) aangebracht om de kernen te kleuren, waarna ze opnieuw worden gewassen met PBSD⁺. Ten slotte worden de cellen ingebed. Daartoe worden de coverslips met cellen uit de 4-well platen gehaald en op een draagglasje gelegd. Daarna wordt een druppel viskeuze vloeistof (Vectashield) toegevoegd. Dit alles wordt bedekt met een dekglasje. Nu zijn de cellen klaar om onder de microscoop te bekijken.

IX. SDS-PAGE en Western blot

IX.1 Cellysaten

Materialen: PBSD⁺; RIPA buffer (samenstelling zie bijlage); celschrapers (Greiner, Sigma-Aldrich); Sonicator (LabsonicU, B. Braun); epjes (VWR).

Methode: Het medium wordt van de cellen afgezogen en de cellen worden drie keer met PBSD⁺ gewassen vervolgens wordt 100 µl van de RIPA buffer toegevoegd. Dan worden de cellen van de bodem van de cultuurfles losgemaakt met de celschraper en overgebracht in een epje, dat voor 30min-1uur op ijs wordt geplaatst. De inhoud van de epje wordt gesoniceerd tot het vloeibaar is (ongeveer 3x30 pulsen). Hierbij worden membranen en DNA gefragmenteerd. De bekomen lysaten worden bij -20°C bewaard.

IX.2 Eiwitconcentratiebepaling

Materialen: BSA (*bovine serum albumin* -Sigma-aldrich) eiwitlysaat; BioRad DC Protein assay kit; microtiterplaat; plaatlezer Wallac.

Methode: Eerst wordt een ijklijn opgesteld. Daarvoor worden oplossingen met verschillende gekende BSA concentraties aangemaakt en de absorbantie van deze oplossingen bepaald.

Aan elke well met 5 μ l lysaat wordt 25 μ l reagens S' (1ml reagens A+20 μ l reagens S) toegevoegd. In de volgende stap wordt 200 μ l reagens B toegevoegd aan het staal. Vervolgens worden de absorbantie waarden bepaald door de Wallac plaatlezer bij 509nm.

Elk staal wordt 2 keer gemeten: van de twee bekomen waarden per staal wordt een gemiddelde berekend en de gemiddelde van een blanco staal daarvan afgetrokken. De ijklijn zal beschreven worden door een vergelijking. Uit deze vergelijking kan met de gekende y-waarde (de absorbantie) de concentratie x (in mg/ml) worden bepaald.

IX.3 SDS-PAGE en western blot

Principe: Door gel-electroforese (SDS-PAGE) worden eiwitten, die aanwezig zijn in het lysaat, op basis van hun grootte gescheiden. De eiwitten worden gedeneureerd en negatief geladen door aanwezigheid van SDS (sodium dodecyl sulfaat) en migreren in de gel onder invloed van een elektrisch veld naar de positieve pool. Deze gel kan gezien worden als een zeef waarin de grotere eiwitten zich hoger bevinden dan kleinere eiwitten die sneller zullen migreren. Op dezelfde gel worden verschillende merkereiwitten met gekende groottes aangebracht om het moleculair gewicht te vergelijken.

Materialen: RIPA buffer; LDS (*loading solution 5x*) (Invitrogen); gel (samenstelling zie bijlage); tris-glycine buffer (*running buffer* - samenstelling zie bijlage); gelelectroforesetoestel (Biorad); glasplaten (Biorad); kammen (Biorad); gelhouder (Biorad); merker: *See Blue Plus 2* (Invitrogen); Centifuge (Eppendorf AG).

Methode: Het bekomen lysaat wordt in een mengsel van RIPA en LDS verdund, verhit tot 70°C gedurende 5 min om eiwitten te denatureren en enkele seconden gecentrifugeerd. Ondertussen wordt de gel in de gelhouder geplaatst welke wordt opgevuld met *running buffer*. In de laatste stap wordt 100 μ g van de stalen aangebracht in de slotjes van de gel waarna een spanning wordt aangelegd over de gel.

IX.4 Western Blot en Immunodetectie

Principe: Nadat de gel gelopen heeft en de eiwitten gescheiden zijn volgens hun grootte moeten eiwitten nog gedetecteerd worden. In de eerste stap worden de eiwitten toegankelijk gemaakt voor immunodetectie. Daartoe worden de eiwitten uit de gel getransfereerd naar een nitrocellulosemembraan. Vervolgens wordt dit membraan geïncubeerd met 5% melk om de aspecifieke binding van het antilichaam

te verhinderen. Daarna wordt het membraan geïncubeerd met het primaire antilichaam gericht tegen de te detecteren eiwitten. Om dit alles te visualiseren gebruikt men een secundair antilichaam dat gelinkt is aan alkalisch fosfatase dat zijn substraat omzet in een paarse kleur.

Materialen: Blotbuffer (samenstelling zie bijlage); sponzen (Invitrogen); 1mm Whatmann papier (BioRad); nitrocellulose Hybond C (Amersham Biosciences); blotapparaat; blokbuffer (samenstelling zie bijlage); NBT/BCIP -*Nitro-Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt* (Invitrogen); primair (anti-Cx: Sigma-Aldrich; anti-GLUT1: Calbiochem) en secundair antilichaam (anti-konijn-AP: Sigma-Aldrich).

Methode: Om het eiwit-bandenpatroon van de gel-electroforese te blotten op een nitrocellulosemembraan wordt de volgende opstelling gemaakt van anode (+) naar kathode (-): sponsje - 2 whatman papieren - nitrocellulosemembraan - gel - 2 whatman papieren-sponsje. Dit alles is doordrenkt met blotbuffer en wordt geklemd tussen de 2 elektroden. Een spanning van 30V wordt overnacht aangehouden, terwijl het geheel gekoeld wordt.

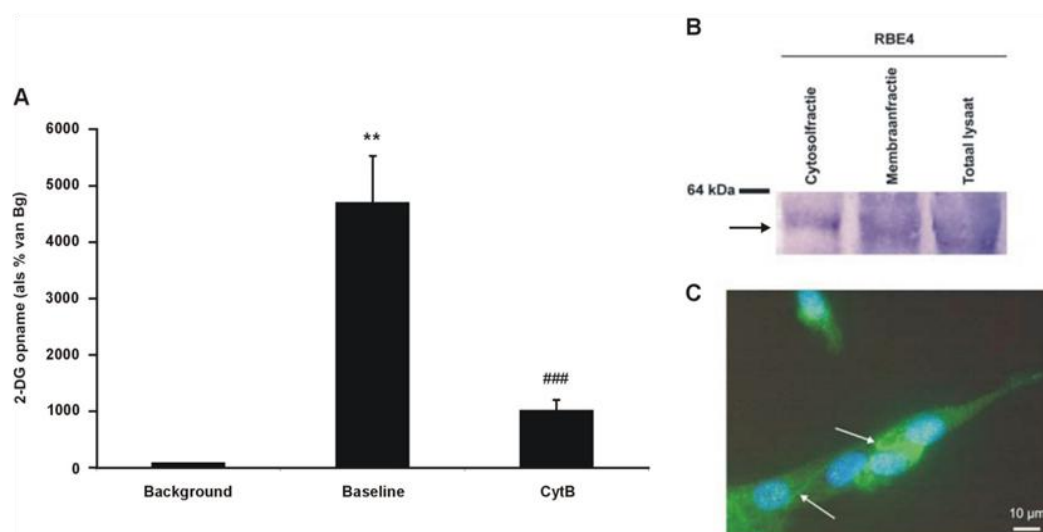
Na het blotten wordt het nitrocellulosemembraan gedurende 1uur in blokbuffer bij kamertemperatuur geïncubeerd. Daarna wordt het primaire antilichaam toegevoegd en overnacht geïncubeerd bij 4°C. Vervolgens wordt het membraan 3x gedurende 15min met blokbuffer gewassen. Het secundaire antilichaam wordt aangebracht en geïncubeerd voor 1uur bij kamertemperatuur. Het nitrocellulosemembraan wordt gewassen voor 15min, maar nu met de blokbuffer zonder melk. Vervolgens wordt het eiwit gevisualiseerd door het substraat voor alkalisch fosfatase (NBT/BCIP) toe te voegen aan het membraan.

Resultaten

I. GLUT1 regulatie in RBE4

I.1 *Glucose opname in RBE4*

Een eerste aanwijzing voor de aanwezigheid van glucosetransporters in RBE4 werd gegeven door de observatie dat deze cellen in grote mate ^3H -2DG opnemen en dat deze opname kon geïnhibeerd worden door de competitieve GLUT inhibitor Cytochalasine B (CytB). De basale opname van ^3H -2DG ten opzichte van de *background* (Bg) begraagt 4710% ($\pm 815\%$) en kon gereduceerd worden tot 1032% ($\pm 170\%$) in aanwezigheid van CytB. De aanwezigheid van GLUT1 kon aangetoond worden aan de hand van immunokleuring. Met het immunokleuring is het echter onmogelijk om de 45kDa vorm van de 55kDa vorm te onderscheiden. Om te bevestigen dat het over de 55kDa vorm van GLUT1 gaat werd *western blot* uitgevoerd. Daaruit kunnen wij waarnemen dat 55kDa GLUT1 zowel aanwezig is in het cytosol als in de membraanfractie.

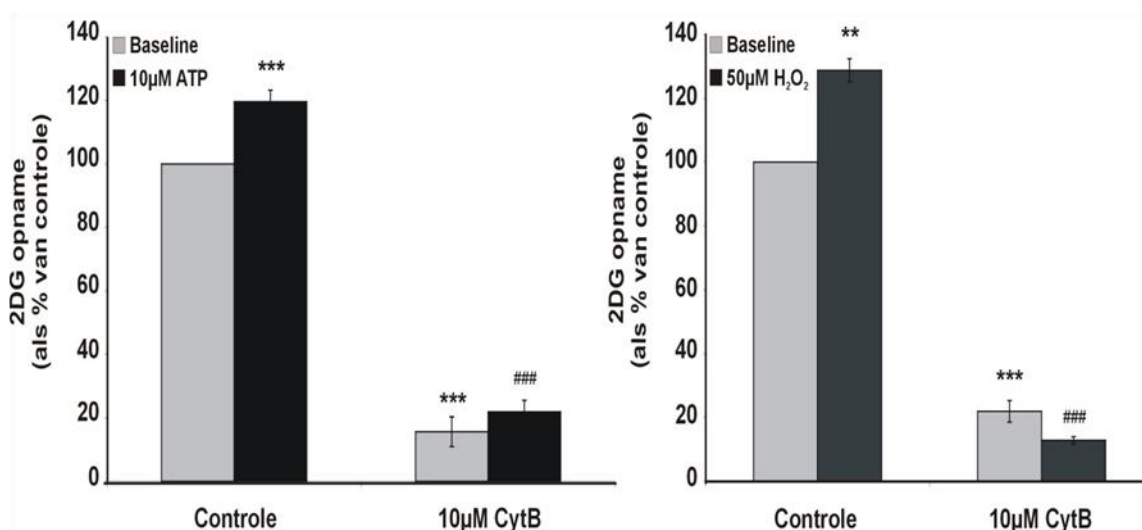


Figuur 9: Glucoseopname en expressie van GLUT1 in RBE4. A) De basale opname van ^3H -2DG (n=6) is significant verschillend van de *background* (n=3) en de opname in aanwezigheid van CytB (n=9). B) *Western blot* voor 55kDa GLUT1. Pijl wijst naar de kern. C) Immunokleuring voor GLUT1. Groene kleur is het Alexa antilichaam dat GLUT1 visualiseert, blauwe kleur is DAPI, die de kern kleurt. Pijltjes wijzen op duidelijke membraan lokaleisatie van GLUT1. Ook in cytosol is GLUT1 aanwezig.

I.1 *Acute stimulatie van het glucosetransport*

In het voorafgaand onderzoek dat plaatsvond in de vakgroep van Prof. Dr. Leybaert, werden verscheidene mogelijke stimuli van het glucosetransport uitgetest. Daaruit bleek dat ATP en H_2O_2 een belangrijke stijging van het transport veroorzaakten. Voor deze twee stimuli onderzochten we de

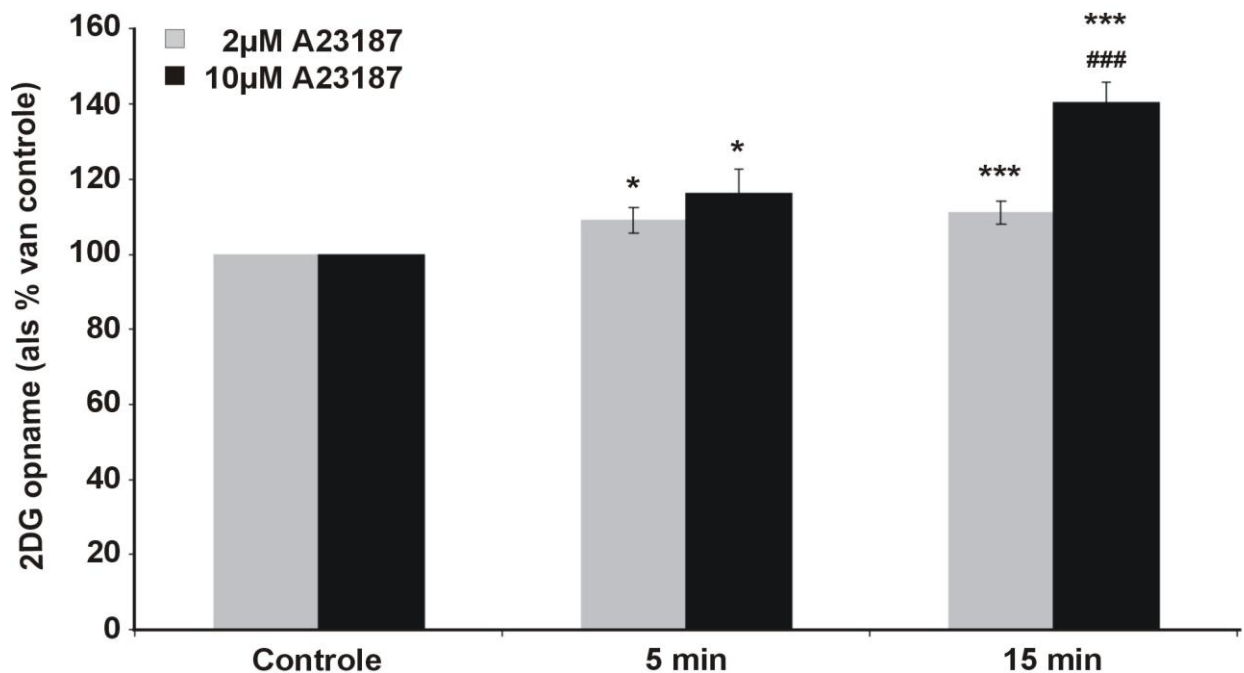
signaal cascaden waarlangs zij mogelijk het glucosetransport reguleren. Vooreerst moest nagegaan worden of voor beide stimuli de toegenomen opname van ^3H -2DG wel degelijk via GLUT1 verliep. Hiertoe werd het experiment uitgevoerd in aanwezigheid van de competitieve GLUT inhibitor CytB. CytB ($10\mu\text{M}$) inhibeerde zowel de basale (controle=100%) als de ATP gestimuleerde opname van ^3H -2DG, respectievelijk tot 15% ($\pm 0.8\%$) en 22% ($\pm 3.6\%$). Voor H_2O_2 behaalden we analoge resultaten. CytB inhibeerde hier de H_2O_2 gestimuleerde opname van 128% ($\pm 3.4\%$) tot 13% ($\pm 1.1\%$). Deze resultaten bevestigen dat het stimulerende effect van ATP en H_2O_2 op de opname van ^3H -2DG aanvangt op de GLUT1 glucosetransporter.



Figuur 10: ATP en H_2O_2 reguleren de opname van ^3H -2DG via GLUT1. Incubatie met de competitieve GLUT inhibitor CytB reduceert de ATP en H_2O_2 gestimuleerde glucoseopname op een significante manier ($n=2$ en $n=4$ respectievelijk)

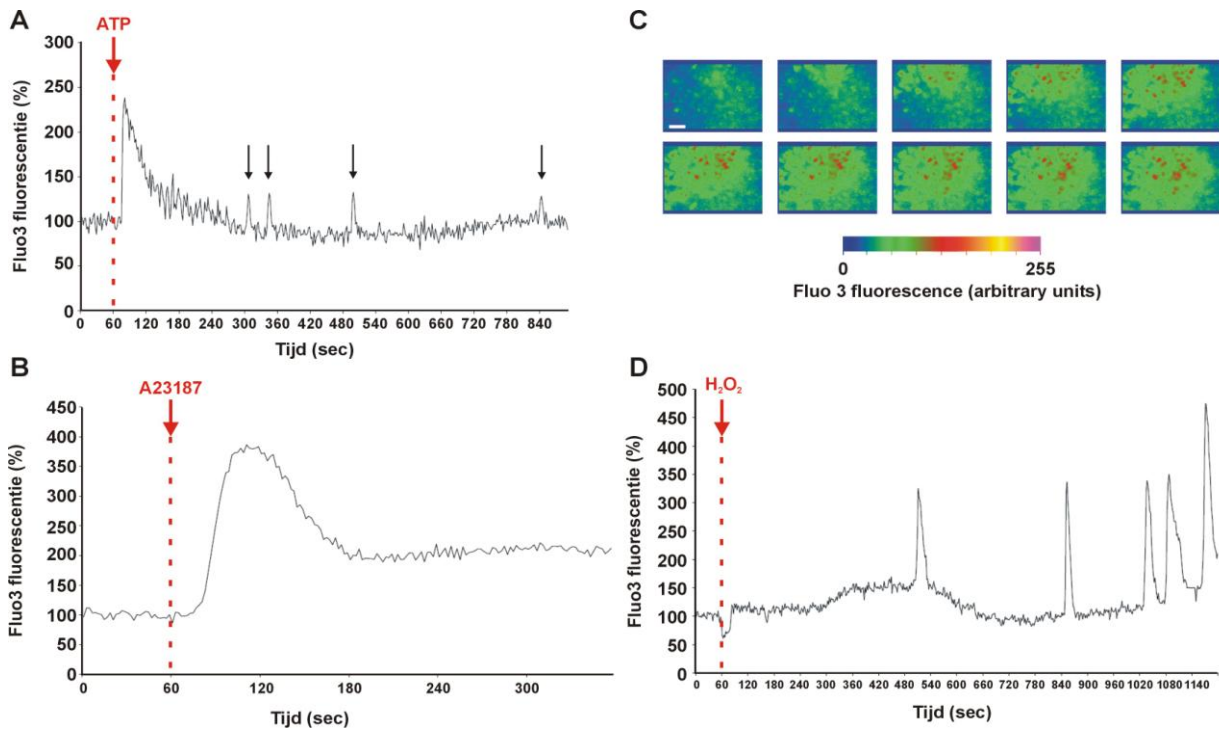
1.2 Rol van calcium in de regulatie van GLUT1

Om na te gaan of een verhoging van $[\text{Ca}^{2+}]_i$ een invloed heeft op glucoseopname maakten we gebruik van de calciumionofoor A23187. Deze molecule introduceert een hydrofiel kanaal in de plasmamembraan waarlangs calcium de cel kan binnenvloeien. Vijf min incubatie met $2\mu\text{M}$ of $10\mu\text{M}$ A23187 veroorzaakte respectievelijk 9% ($\pm 3.3\%$) en 16% ($\pm 6.5\%$) stimulatie van de opname van ^3H -2DG ten opzichte van de basale opname (of controle). 15min incubatie met deze concentraties leidde tot een stimulatie van 11% ($\pm 2.9\%$) en 41% ($\pm 5.2\%$). Deze resultaten geven weer dat een toename van $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inderdaad de basale opname van glucose kan stimuleren.



Figuur 11: Opname van ^3H -2DG in aanwezigheid van de calciumionofoor A23187. Vijf min incubatie met $2\mu\text{M}$ ($n=12$) en $10\mu\text{M}$ A23187 ($n=36$) had een significant stimulerend effect op de opname van glucose. Ook 15min incubatie met deze concentraties A23187 stimuleerden de opname significant ($n=15$ en $n=8$ voor $2\mu\text{M}$ en $10\mu\text{M}$ A23187. * significant ten opzichte van de controle, # significant ten opzichte van $2\mu\text{M}$ A23187.

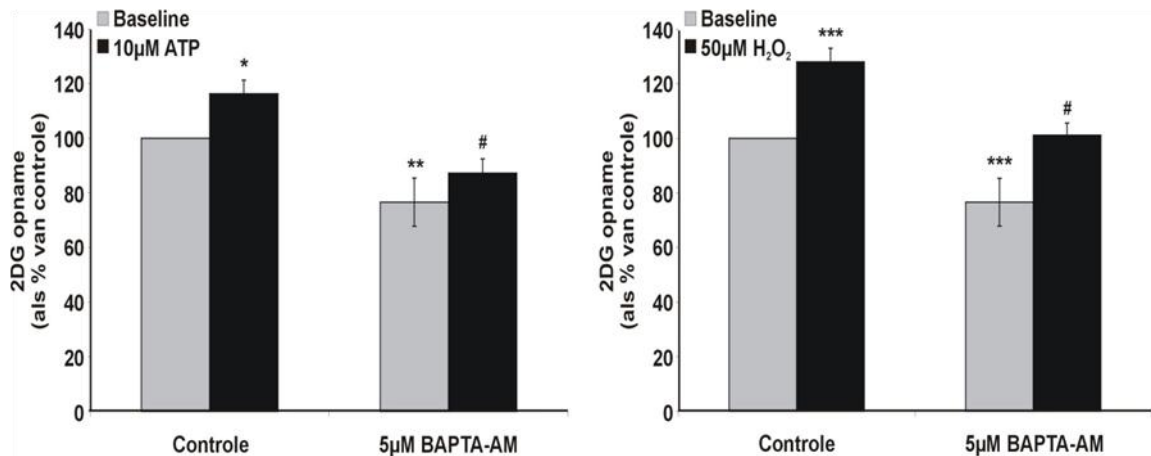
Vervolgens gingen we na of ATP en H_2O_2 de opname van glucose stimuleren via de toename van $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Zoals blijkt uit [Figuur 12](#) doen zowel ATP als H_2O_2 de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ toenemen, doch via een ander patroon. In aanwezigheid van $10\mu\text{M}$ ATP stijgt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeer snel waarna ze bijna even snel weer daalt. In het verdere verloop zien we nog enkele pieken welke calciumoscillaties weergeven. De initiële piek in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ treedt in alle cellen simultaan op terwijl de daaropvolgende oscillaties niet in alle cellen voorkomen en niet simultaan gebeuren. Wanneer H_2O_2 ($50\mu\text{M}$) wordt toegevoegd gebeurt er initieel niets, maar na een zevental minuten treden calciumgolven op in de celcultuur.



Figuur 12: $[Ca^{2+}]_i$ neemt toe na stimulatie met ATP, H_2O_2 en A23187. A) Na 1min wordt $10\mu M$ ATP toegevoegd. $[Ca^{2+}]_i$ stijgt onmiddellijk om dan snel weer te dalen. In de daaropvolgende minuten kunnen nog enkele calciumoscillaties worden waargenomen (pijljes). B) Het verloop van $[Ca^{2+}]_i$ na toediening van $2\mu M$ A23187. Hier stijgt $[Ca^{2+}]_i$ trager en daalt dan weer geleidelijk tot een plateau. C en D) Na toediening van H_2O_2 ($50\mu M$) treden calciumgolven op tussen RBE4 cellen. C is een voorbeeld van zulke golf. Deze golf treedt op tussen 1160s en 1178s (om de 2s wordt een beeldje weergegeven) en correspondeert met de laatste piek in figuur D (scalebar is $20\mu m$). D toont het verloop van $[Ca^{2+}]_i$ in één cel uit deze celcultuur.

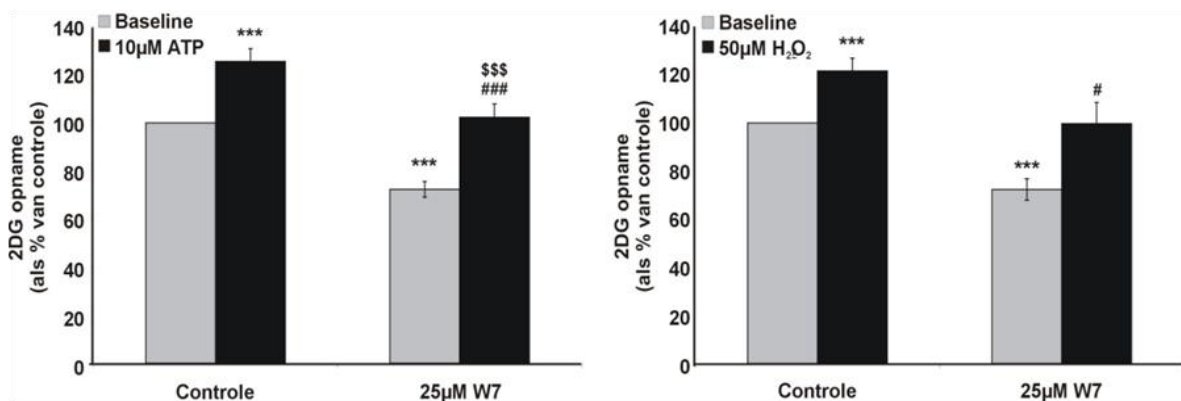
Nu we observeerden dat stimulatie van RBE4 met ATP of H_2O_2 leidt tot een toename van $[Ca^{2+}]_i$, gingen we in een volgende stap na of deze stijging van $[Ca^{2+}]_i$ ook betrokken is bij het stimulerende effect van ATP en H_2O_2 op de opname van 3H -2DG. Wanneer $[Ca^{2+}]_i$ toeneemt wordt vervolgens een brede waaier aan signaalcascades geactiveerd, waaronder calmoduline (CaM). We gingen daarom niet enkel de betrokkenheid van calcium, maar ook die van CaM na bij de ATP en H_2O_2 gemedieerde toename van het glucosetransport.

Eén uur preïncubatie met $5\mu M$ BAPTA-AM, een chelator van intracellulair calcium, reduceerde de ATP gestimuleerde 3H -2DG opname van 116% ($\pm 8.8\%$) naar 87% ($\pm 5.3\%$) ten opzichte van de basale opname (100%). Dit betekent een daling met 29% . De H_2O_2 gestimuleerde opname, welke 128% ($\pm 8.6\%$) bedraagt, werd terug verlaagd tot 101% ($\pm 4.4\%$), wat een reductie van 27% betekent. Echter, 1uur preïncubatie met $5\mu M$ BAPTA-AM reduceert ook de basale opname van 3H -2DG, en dit in dezelfde mate (-24%). Door deze invloed op de basale opname lijkt het effect van BAPTA-AM op de netto ATP en H_2O_2 gestimuleerde opname eerder nihil.



Figuur 13: Effect van BAPTA-AM op de ATP en H₂O₂ gestimuleerde opname van ³H-2DG. ATP (10µM; n=12) en H₂O₂ (50µM n=24) stimuleren de opname van ³H-2DG op significante manier. Dit stimulerend effect wordt gereduceerd na preïncubatie met BAPTA-AM (1uur; 5µM) (n=12 voor ATP en n=24 voor H₂O₂). De basale opname van ³H-2DG (controle) wordt eveneens gereduceerd na preïncubatie met BAPTA-AM. * significant ten opzichte van baseline controle, # significant ten opzichte van 10µM ATP of 50µM H₂O₂.

Om de betrokkenheid van CaM te bestuderen maakten we gebruik van W7, een antagonist van CaM welke CaM bindt en alle CaM geregeerde enzymactiviteiten inhibeert. 1uur preïncubatie met deze molecule reduceerde de ATP gestimuleerde opname van ³H-2DG (125% ± 3.3) terug naar basale opname (102% ± 5.6%). De resultaten voor H₂O₂ waren analoog met een reductie van 121% (±4.5%) naar 99% (±8.8%). Dit komt overeen met een daling van 23% en 22% voor respectievelijk ATP en H₂O₂. De basale opname werd echter opnieuw in dezelfde mate gereduceerd (-28%), wat ook voor W7 suggereert dat netto effect van de inhibitor op de ATP en H₂O₂ gestimuleerde opname eerder beperkt is.



Figuur 14: Effect van W7 op de ATP en H₂O₂ gestimuleerde opname van ³H-2DG. ATP (10µM; n=35) en H₂O₂ (50µM; n=22) stimuleren significant de opname van ³H-2DG (*) welke weer gereduceerd wordt na preïncubatie met W7 (1uur; 25µM) (n=17 voor ATP en n=4 voor H₂O₂). De basale opname van ³H-2DG wordt eveneens gereduceerd na preïncubatie met W7.

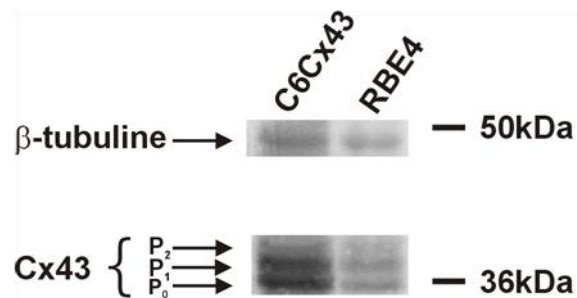
II. Calciumsignalisatie in de bloed-hersenbarrière

II.1 *Gap junctions en hemikanalen in het barrière-endotheel*

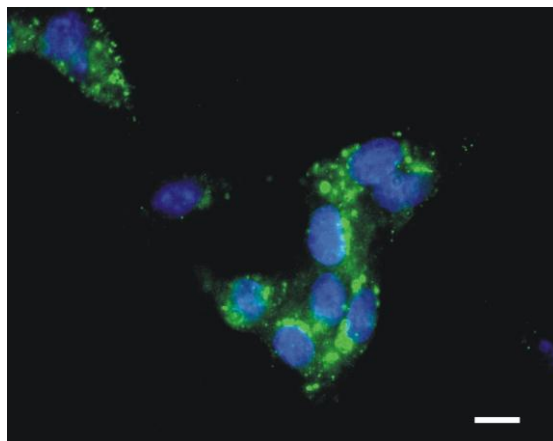
II.1.1 Expressie van Connexine 43 (Cx43)

Eerst en vooral werd de aanwezigheid van Cx43 in de RBE4 cellen onderzocht. Onze data tonen een sterke mate van expressie van Cx43. Bovendien vinden we zowel P₀, P₁, als P₂, wat suggereert dat Cx43 aanwezig is in de gap junctionele plaques en hemikanalen.

De immunokleuring bevestigt de aanwezigheid van Cx43 in de RBE4 cellen en toont aan dat Cx43 bij voorkeur in de gap junctionele plaques is gelokaliseerd.



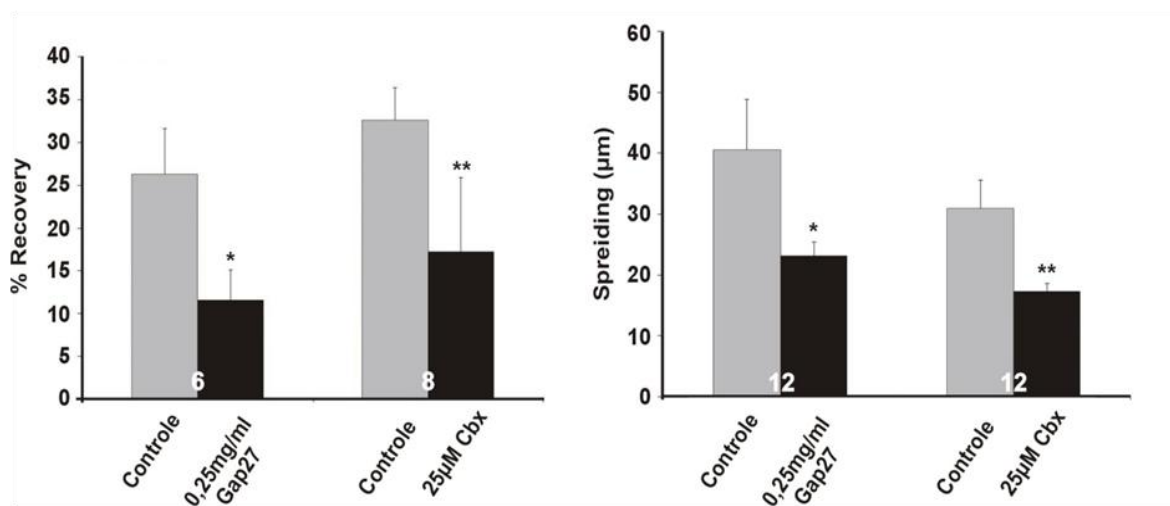
Figuur 15: Expressie van Cx43 in RBE4. Cx43 wordt in gefosforyleerde vorm teruggevonden in RBE4. B-tubuline werd gebruikt als ladingscontrole. C6Cx43 werd gebruikt als positieve controle voor de expressie van Cx43.



Figuur 16: Immunokleuring Cx43. De figuur toont de aanwezigheid van Cx43 in gap junctionele plaques. De groene kleur (Alexa 488) toont Cx43, de blauwe kleur (DAPI) geeft de celkern weer. Scalebar is 10µm.

II.1.2 Gap junctionele koppeling in RBE4

De aanwezigheid van de P₂ vorm van Cx43 suggereerde reeds dat in RBE4 Cx43 voorkomt in gap junctionele plaques waardoor gap junctionele koppeling in RBE4 zeer waarschijnlijk is. Deze koppeling werd bevestigd door FRAP en SLDT. In RBE4 bedraagt de recovery na *photobleaching* ongeveer 30% (32% ± 3.9% en 26% (±5.4%) voor de controles. Bovendien kan deze geïnhibeerd worden tot 11% (±3.5%) door Gap27, een blokker van Cx43 en tot 17% (±8.7%) door carbenoxolone (Cbx), een algemene Cx blokker. De sequentie van Gap27 peptide, dat gericht is tegen aminozuren 201-210 van de tweede extracellulaire loop van Cx43, is SRPTEKTIFII. De spreiding van 6-carboxyfluoresceïne (6-CF) in SLDT wordt in aanwezigheid van Gap27 geïnhibeerd van 92µm (±14.4µm) naar 60µm (±6.2µm). Na incubatie met Cbx wordt de spreiding gereduceerd van 80µm (±12.1µm) naar 44µm (±3.6µm).

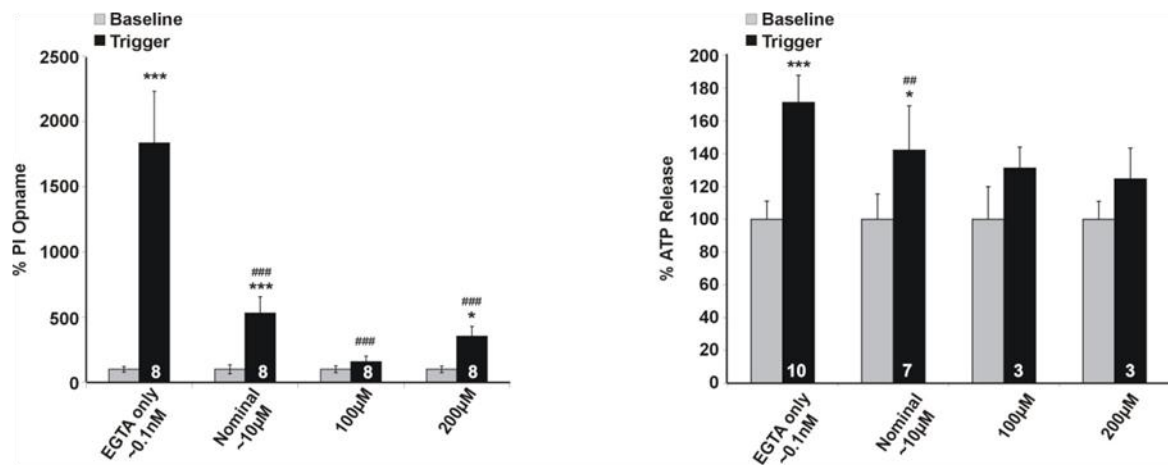


Figuur 17: FRAP en SLDT in RBE4. Links: FRAP: de *recovery* werd significant geïnhibeerd door Gap27 (0.25mg/ml; 24uur preincubatie) en Cbx (25µM; 15min preincubatie). Rechts: net als FRAP werd ook SLDT significant geïnhibeerd door Gap27 en Cbx. 'n' wordt weergegeven in de grafiek.

II.1.3 Hemikanalen in RBE4

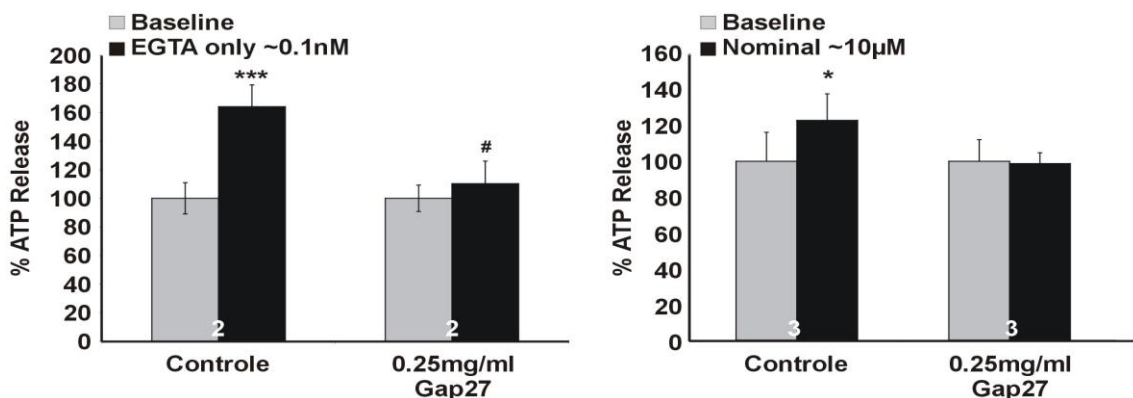
De opening van hemikanalen werd bestudeerd door middel van de opname van *Propidium iodide* (PI) *uptake* of via *ATP release*. Divalent-vrije (DV-vrije) oplossing met [Ca²⁺]_{vrij} van ~0.1nM en nominaal calciumvrije oplossing (nominal) met [Ca²⁺]_{vrij} van ~10µM stimuleerden de opname van PI respectievelijk tot 1834% (±396.9%) en 530% (±125.1%) boven de basale opname, welke gebeurt in HBSS-Hepes. De oplossingen met 100µM en 200µM [Ca²⁺]_{vrij} stimuleren de opname van PI tot 157% (±3.8%) en 353% (±75.8%). *ATP release* volgde ongeveer hetzelfde patroon: DV-vrije en nominal zijn de meest potente stimuli welke de vrijstelling van ATP triggeren tot respectievelijk 171% (±16.6%) en 142% (±27.1%).

Honderd μM en $200\mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{vrij}}$ stimuleren de vrijstelling van ATP tot $131\% (\pm 12.8\%)$ en $124\% (\pm 18.8\%)$ respectievelijk. Deze laatste werden echter niet significant bevonden.



Figuur 18: PI uptake en ATP release in RBE4 getriggerd door laag $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}}$. Links: de opname van PI werd getriggerd door een lage $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}}$ variërend tussen 0.1nM en $200\mu\text{M}$. Rechts: dezelfde oplossingen stimuleerden ook de vrijstelling van ATP.

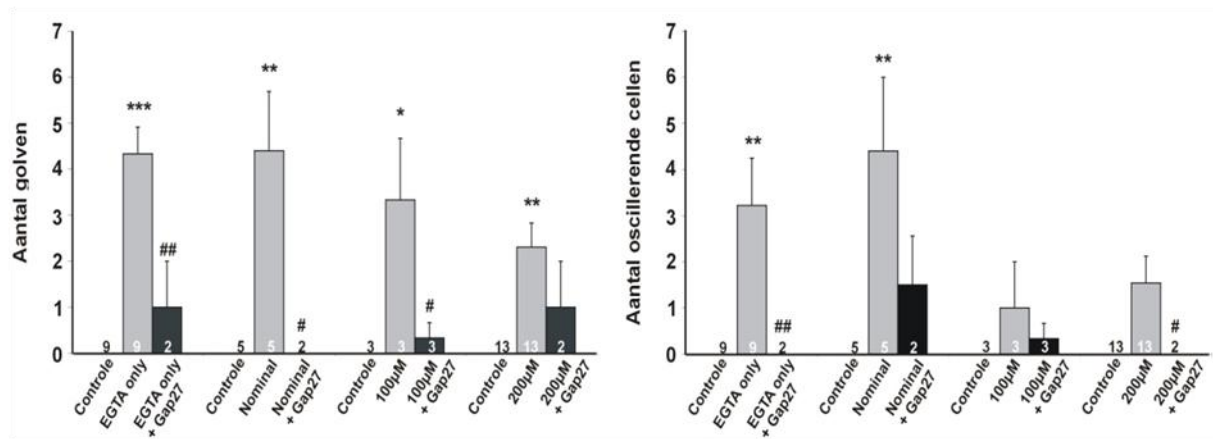
We kunnen echter pas zeker zijn van de betrokkenheid van hemikanalen wanneer we gebruik maken van specifieke inhibitoren voor hemikanalen. In aanwezigheid van Gap27 wordt de ATP vrijstelling, getriggerd door DV-vrij ($164\% \pm 15.2\%$), bijna volledig gereduceerd naar basale waarden ($110\% \pm 15.7\%$). Eenzelfde trend kan waargenomen worden voor nominal waarbij *ATP release* daalt van $122\% (\pm 14.8\%)$ naar $98\% (\pm 6.1\%)$.



Figuur 19: ATP Release, getriggerd door DV-vrij en nominal, wordt geïnhibeed door Gap27. De vrijstelling van ATP wordt significant verhoogd door DV-vrij en nominal. Dit stimulerend effect wordt bijna volledig tenietgedaan in aanwezigheid van Gap27. 'n' wordt weergegeven in de grafiek.

II.2 Calciumgolven en oscillaties in het barrière-endotheel

Voor het gemiddelde aantal golven observeerden wij een trend waarbij het aantal golven daalt met stijgende $[Ca^{2+}]_e$. DV-vrij, nominal, $100\mu M [Ca^{2+}]_{vrij}$ en $200\mu M [Ca^{2+}]_{vrij}$ gaven respectievelijk aanleiding tot gemiddeld $4.3 (\pm 0.6)$, $4.4 (\pm 1.3)$, $3.3 (\pm 1.3)$, $2.3 (\pm 0.5)$ golven gedurende een periode van 10min. Het gemiddeld aantal oscillerende cellen in deze culturen bedroeg $3.2 (\pm 1)$, $4.4 (\pm 1.5)$, $1 (\pm 1)$, en $1.5 (\pm 0.6)$. In de controle culturen konden we nooit calciumgolven en oscillaties detecteren, het aantal bedraagt hier dus 0. Toevoeging van 0.25mg/ml Gap27 reduceerde zowel het aantal golven als oscillerende cellen en dit binnen de minuut. Deze data suggereren een rol voor hemikanalen in de propagatie van calciumsignalen tussen naburige cellen in een omgeving waar $[Ca^{2+}]_e$ laag is.



Figuur 20: Laag $[Ca^{2+}]_e$ induceert calciumgolven en oscillaties in RBE4. Alle oplossingen met lage $[Ca^{2+}]_e$ gaven aanleiding tot calciumgolven en oscillaties in RBE4. Voor het gemiddelde aantal golven konden we een trend waarnemen waarbij het aantal golven daalt met toenemende $[Ca^{2+}]_e$. Deze trend was minder uitgesproken voor het gemiddelde aantal oscillaties. Bovendien konden zowel het gemiddelde aantal golven als oscillaties gereduceerd worden door Gap27. 'n' wordt weergegeven in de grafiek, * geeft significantie ten opzichte van controle (HBSS-Hepes) weer, # ten opzichte van laag $[Ca^{2+}]_e$ oplossing in afwezigheid van Gap27.

Bespreking

I. GLUT1 regulatie in RBE4

I.1 Glucose opname in RBE4

Regina *et al.* konden uit hun onderzoek concluderen dat GLUT1 isovorm verantwoordelijk is voor glucose transport in RBE4 cellen (Regina, Roux *et al.* 1997a). Het is algemeen bekend dat enkel de 55kDa vorm van de GLUT1 transporter op de endotheelcellen van de BHB aanwezig is (Maher, Vannucci *et al.* 1994; Vannucci, Maher *et al.* 1997). De aanwezigheid van deze transporter in RBE4 werd door ons bevestigd aan de hand van immunokleuring. Met zulke immunokleuring kan echter geen onderscheid gemaakt worden tussen de 45kDa en 55kDa vorm van GLUT1. Dat het inderdaad gaat over de 55kDa vorm van GLUT1 werd bevestigd via *western blot*. De opname van ^3H -2DG in de cellen geïncubeerd met Cytochalasine B (CytB), een competitieve inhibitor van GLUT's, is significant lager dan de basale opname. Dit wijst op de betrokkenheid van een GLUT transporter. Aangezien GLUT1 werd aangetoond in onze cellen en bovendien de enige transporter ter hoogte van het barrière-endotheel blijkt, kunnen we aannemen dat in RBE4 de opname enkel verloopt via GLUT1. GLUT1 kan in de celmembraan gelokaliseerd zijn of zich in het cytosol van de endotheelcellen bevinden. Uit eerdere onderzoekgegevens blijkt dat het membraan gelokaliseerde en de cytosol gelokaliseerde GLUT1 transporters respectievelijk 60% op 40% uitmaken van de totale aantal GLUT1 (Farrell and Pardridge 1991). Dit werd eveneens aangetoond in onze data, doch, we bepaalde geen kwalitatieve gegevens.

I.1.1 Glucose opname na stimulatie met ATP en H₂O₂

Kim *et al.* toonden aan dat in murine C₂C₁₂ spiercellen, NIH3T3 fibroblasten en Neuro 2a neuroblastoma cellen die GLUT1 tot expressie brengen, stimulatie met concentraties van ATP tussen 1 μM en 1mM een sterke stijging van de CytB onderdrukbare glucoseopname tot gevolg heeft (Kim, Lee *et al.* 2002). Deze stijging is al significant vanaf 1 μM ATP met ongeveer 50% toename voor 1 μM en 75% voor 10 μM en 1000 μM (Kim, Lee *et al.* 2002). Uit onze experimenten blijkt dat 10 μM ATP de glucose opname met 27% doet stijgen in vergelijking met de basale opname. Deze toename wordt ook geblokkeerd door CytB, wat bevestigt dat de stimulatie via de GLUT1 transporter gebeurt. Onze resultaten voor stimulatie met 10 μM ATP geven een wat lagere procentuele toename van de stimulatie dan 10 μM ATP bij Kim *et al.* Het verschil is mogelijks te wijten aan verschillen tussen de gebruikte cellen (bv. wat betreft de GLUT1 expressie) of tussen de gebruikte protocollen voor de ^3H -2DG opname. Kim *et al.* gebruikten 20min voor incubatie met de stimulus en 20min voor incubatie met ^3H -2DG, terwijl wij respectievelijk 15min en 5min gebruikten.

Het is gerapporteerd dat ATP concentratie in het bloedplasma van ratten en mensen in een bereik van ongeveer 0.1-10 μ M ligt (Kim, Lee *et al.* 2002), waardoor inwerking van ATP op glucoseopname ook onder fysiologische omstandigheden kan gebeuren.

Anderzijds demonstreerden Fischer *et al.* een daling van de glucoseopname met 43% na stimulatie met 30 μ M ATP in cardiomyocyten afkomstig van de rat (Fischer, Becker *et al.* 1999b). De redenen voor dit verschil zijn niet duidelijk. Het is mogelijk dat een ander soort ATP receptor subtype in de cardiomyocyten deze daling bewerkstelligt (Fischer, Becker *et al.* 1999b). In cardiomyocyten zijn zowel P_{2x} als P_{2y} receptoren gedetecteerd. Volgens Fischer *et al.* oefent ATP haar effect vooral via de P_{2y} receptoren (Fischer, Becker *et al.* 1999a). Van de familie P_{2y} receptoren zijn P_{2y1}, P_{2y2} en P_{2y6} subtypes vastgesteld op cardiomyocyten van de rat (Webb, Boluyt *et al.* 1996), terwijl de dominante purinerge receptor op RBE4 cellen P_{2y2} is (Nobles, Revest *et al.* 1995)

Kozlovsky *et al.* toonden aan dat H₂O₂ de glucose opname in L6 spiercellen doet stijgen (Kozlovsky, Rudich *et al.* 1997). Dit effect werd echter bekomen na 24 uur en kan dus niet beschouwd worden als acuut. Prasad *et al.* observeerden een acute stimulatie (8.5voudig) van het CytB inhibeerbare glucosetransport na 1 uur incubatie met 500 μ M H₂O₂ in Clone9 cellen (leverepitheel van de rat) (Prasad and Ismail-Beigi 1999). Ook NIH3T3 fibroblasten, 3T3-L1 preadipocyten en C₂C₁₂ myoblasten vertoonden na stimulatie met 400 μ M H₂O₂ respectievelijk een negen-, acht- en zes-voudige stijging van de glucoseopname (Prasad and Ismail-Beigi 1999). Vijftien min en 30min incubatie van M07_e, een humane leukemische megakaryocyten cellijn, met 50 μ M H₂O₂ resulteerde in 50% stimulatie van de glucose opname (Fiorentini, Hakim *et al.* 2001). Hakim *et al.* testten verschillende concentraties uit in deze cellijn en behaalden de beste resultaten (50%) met 50 μ M H₂O₂ (15min) (Hakim, Fiorentini *et al.* 2003). De opname van glucose in RBE4 na 15min incubatie met deze concentratie H₂O₂ werd slechts gestimuleerd tot 29% boven de basale opname. Dit ligt iets lager dan de resultaten die werden gepubliceerd voor M07_e, maar kan te wijten zijn aan de verschillende graad van GLUT1 expressie in M07_e en RBE4 of aan het feit dat het over verschillende cellijnen gaat.

I.1.2 Glucose opname en calcium

Om na te gaan of Ca²⁺ invloed had op de opname van ³H-2GD, gebruikten wij de calciumionofoor A23187 die een Ca²⁺-kanaal introduceert in de plasmamembraan. Na 5min incubatie observeerden we voor 2 μ M en 10 μ M A23187 een stijging van de glucoseopname met respectievelijk 9% en 16%. Na 15min stegen deze waarden nog tot 11% voor 2 μ M en tot 41% voor 10 μ M. We stelden dus vast dat een stijging van [Ca²⁺]_i de basale opname van glucose in de RBE4 cellijn kan stimuleren. Het onderzoek naar de invloed van calcium op de glucose opname gebeurde voornamelijk in cellen waar de insuline-gevoelige GLUT4

transporter tot expressie komt (Klip, Li *et al.* 1984; Naitoh, Kobayashi *et al.* 1991; Whitehead, Molero *et al.* 2001; Hutchinson and Bengtsson 2005). Hutchinson *et al.* toonden aan dat in GLUT4 expresserende L6 spiercellen (rat), incubatie met 100nM A23187 gedurende 2-2.5uur een stijging van de glucose opname met ongeveer 60% kan veroorzaken (Hutchinson and Bengtsson 2005). Klip *et al.* daarentegen konden in dezelfde cellen geen invloed van A23187 op de glucose opname detecteren (Klip, Li *et al.* 1984), net als Whitehead *et al.* die in 3T3-L1 adipocyten eveneens geen effect observeerden na behandeling met 0.1µM A23187 (Whitehead, Molero *et al.* 2001). Dit verschil in resultaten met ons werk kan verklaard worden door de lagere concentraties van A23187 die gebruikt werden in deze artikels en ook door een verschil in gevoeligheid voor intracellulair Ca^{2+} tussen GLUT1 en GLUT4.

Han *et al.* maakten in hun werk gebruik van embryonische stamcellen waarin GLUT1 de belangrijkste transporter is (Han, Heo *et al.* 2005). Deze groep zag bijna een verdubbeling van de glucoseopname na incubatie met 10µM A23187. Gezien het hier gaat over dezelfde transporter en dezelfde concentratie A23187 zijn deze data beter vergelijkbaar met onze resultaten. Het nog bestaande verschil met onze vaststellingen (100% ten opzichte van 41%) kan mogelijks verklaard worden door een verschil in incubatie periode (5min of 15min versus 30min). Quintanilla *et al.* onderzochten de rol van Ca^{2+} in de stimulatie van GLUT1 door metabolische stress en insuline in de epitheliale Clone9 cellen (Quintanilla, Porras *et al.* 2000). Uit hun onderzoek bleek dat daling van $[Ca^{2+}]_i$ door chelatie met 75µM BAPTA-AM de glucose opname met ongeveer 40% deed dalen. Dit resultaat veronderstelt de betrokkenheid van Ca^{2+} in het glucosetransport (Quintanilla, Porras *et al.* 2000).

I.1.3 ATP en H₂O₂ werken via $[Ca^{2+}]_i$ stijging

Om na te gaan of ATP en H₂O₂ via de stijging van $[Ca^{2+}]_i$ hun effect op de glucose-opname uitoefenen, dienden wij eerst na te gaan of ATP en H₂O₂ inderdaad de $[Ca^{2+}]_i$ doen stijgen. Dit onderzochten we met de Fluo-3AM probe. Wij zien dat zowel ATP als H₂O₂ een $[Ca^{2+}]_i$ stijging kunnen bewerkstelligen, maar het verloop van de stijging is afhankelijk van de stimulus.

Yamazaki *et al.* toonden aan dat 10µM ATP aanleiding geeft tot een stijging van $[Ca^{2+}]_i$ in BHB endotheelcellen (Yamazaki, Aoyama *et al.* 2006). Deze stijging verliep bifasisch: een initiële transiënte stijging tengevolge van Ca^{2+} vrijstelling uit de intracellulaire opslagplaatsen en een daaropvolgende plateaufase die het gevolg is van aanhoudende Ca^{2+} influx in de cel (Yamazaki, Aoyama *et al.* 2006).

Gegevens over het effect van H₂O₂ op $[Ca^{2+}]_i$ komen vooral voort uit onderzoek op non-BHB endotheel zoals humane cornea endotheelcellen (Mergler, Pleyer *et al.* 2005), coronaire endotheelcellen van het rund (Bowles, Graier *et al.* 2001) en humane endotheelcellen van de *arteria pulmonalis* (Hecquet, Ahmed *et al.* 2008). Bowles *et al.* gebruikten concentraties tussen 0 en 500µM van H₂O₂, die allen een

stijging van $[Ca^{2+}]_i$ veroorzaakten (Bowles, Graier *et al.* 2001). Deze 2.5-voudige stijging was aanwezig op 3min en bleef aanhouden tot 2x hogere waarden dan de controle, 3min na verwijdering van H_2O_2 (Bowles, Graier *et al.* 2001) Deze stijging treedt niet op in afwezigheid van extracellulair Ca^{2+} . Wanneer extracellulair Ca^{2+} opnieuw wordt toegevoegd in aanwezigheid van H_2O_2 , geeft dit opnieuw een plotse stijging van de $[Ca^{2+}]_i$ (Bowles, Graier *et al.* 2001). Dit resultaat werd bevestigd door Hecquet *et al.* (Hecquet, Ahmmed *et al.* 2008): uit de resultaten van deze groep blijkt dat concentraties van H_2O_2 onder $300\mu M$ geen loslating van Ca^{2+} uit de intracellulaire opslagplaatsen veroorzaken, maar wel de influx van extracellulair Ca^{2+} bewerkstelligen. Een concentratie van $500\mu M$ veroorzaakte wel een Ca^{2+} stijging in afwezigheid van extracellulaire Ca^{2+} , wat betekent dat H_2O_2 in hoge concentratie opgeslagen Ca^{2+} kan vrijstellen uit de intracellulaire opslagplaatsen (Hecquet, Ahmmed *et al.* 2008). Mergler *et al.* testten eveneens verschillende concentraties uit. $100\mu M$, $1000\mu M$ en $10mM$ H_2O_2 toonden na 3min allemaal een stijging van de $[Ca^{2+}]_i$. Hogere concentraties bleken toxisch te zijn voor de cellen (Mergler, Pleyer *et al.* 2005). Een andere mogelijke mechanisme door welke H_2O_2 $[Ca^{2+}]_i$ kan doen stijgen is via de activatie van de PLC, die IP_3 activeert. Deze cascade veroorzaakt Ca^{2+} vrijstelling van de intracellulaire opslagplaatsen (Maraldi, Rugolo *et al.* 2006).

Om te onderzoeken of de $[Ca^{2+}]_i$ stijging na stimulatie met ATP en H_2O_2 ook de oorzaak is van de stijging van de glucose opname gebruikten we BAPTA-AM, een chelator van intracellulair calcium en W7, een antagonist van CaM, dat stroomafwaarts van calcium geactiveerd wordt. Maraldi *et al.* toonden een significante reductie van de H_2O_2 ($50\mu M$) gestimuleerde opname na behandeling met $5\mu M$ BAPTA-AM of $25\mu M$ W7: de stijging van ongeveer 50% na stimulatie werd tot basale niveau gerebuceerd. In hun onderzoek hadden $5\mu M$ BAPTA-AM of $25\mu M$ W7 geen effect op de niet gestimuleerde opname (Maraldi, Rugolo *et al.* 2006). Dit is in tegenstelling tot onze resultaten. Na incubatie met BAPTA-AM ($5\mu M$) observeerden wij een daling van de gestimuleerde glucose opname met 27% voor $10\mu M$ ATP en met 29% voor $50\mu M$ H_2O_2 . We merkten echter op dat ook de niet gestimuleerde opname (controle) met ongeveer dezelfde waarde (24%) daalde, het effect van BAPTA-AM op de netto gestimuleerde opname lijkt dan eerder beperkt te zijn. Voor W7 verkregen we gelijkaardige resultaten. De reductie van de gestimuleerde glucose opname bedroeg 23% en 22% voor respectievelijk $10\mu M$ ATP en $50\mu M$ H_2O_2 . Maar ook hier was de reductie van de niet gestimuleerde glucose opname ongeveer even groot (28%). De totale invloed van W7 op de netto gestimuleerde opname is ook eerder nihil. Wij kunnen dus niet aantonen dat de stijging van de glucose opname na stimulatie met ATP of H_2O_2 via stijging van de $[Ca^{2+}]_i$ verloopt. De reden voor het verschil met resultaten van Maraldi *et al.* is nog niet duidelijk; het gaat wel over verschillende soorten cellen.

II. Calciumsignalisatie in de bloed-hersenbarrière

Cel-cel communicatie is uiteraard belangrijk voor het coördineren van specifieke taken. Voor endotheelcellen die elektrisch niet-exciteerbaar zijn, is calciumcommunicatie waarschijnlijk de enige weg waarlangs ze op een snelle manier informatie kunnen delen. In dit deel van het onderzoek bestudeerden we dan ook of deze calciumcommunicatie ondersteund wordt in RBE4 en of hemikanalen bij de paracrine communicatie betrokken zijn.

II.1 *Gap junctions en hemikanalen in het barrière-endotheel*

Er diende onderzocht te worden of connexines, die de bouwstenen zijn van hemikanalen en gap junctions, in RBE4 aanwezig zijn. In de volgende stap onderzochten we of de aanwezige hemikanalen kunnen openen na een bepaalde trigger en of de cellen met elkaar in verbinding staan door middel van de gap junctions.

II.1.1 **Expressie van connexine 43**

Via *western blot* toonden we aan dat Cx43 aanwezig is in RBE4 cellen. Wij observeerden bovendien dat de P₂ vorm die noodzakelijk is voor de vorming van functionele gap junctions aanwezig was, samen met P₀ en P₁, de hemikanaal geassocieerde vormen. Er is niet veel bekend over de aanwezigheid van connexines in de hersencapillairen, maar er gebeurde wel onderzoek op de endotheelcellen van andere bloedvaten in het lichaam. De in het endotheel meest voorkomende connexines zijn Cx40, Cx37 en Cx43 (Haefliger, Nicod *et al.* 2004). Het onderzoek van Yeh *et al.* toonde hoge niveaus van Cx43 in de rat aorta aan, maar niet in de coronairen (Yeh, Dupont *et al.* 1997), terwijl Bruzzone *et al.* juist geen Cx43 in het endotheel van de rat aorta konden aantonen (Bruzzone, Haefliger *et al.* 1993). Tijdens verder onderzoek werd geobserveerd dat Cx43 enkel gelokaliseerd is ter hoogte van de delen van de bloedvaten, die onderhevig zijn aan een turbulente bloedstroom (Gabriels and Paul 1998). Anderzijds werd een uitgebreide aanwezigheid van Cx43 vastgesteld in corneaal endotheel van ratten (Joyce, Harris *et al.* 1998; Laux-Fenton, Donaldson *et al.* 2003), konijnen (Williams and Watsky 2002), koeien (Mohay and McLaughlin 1995; Gomes, Srinivas *et al.* 2006) en mensen (Williams and Watsky 2002). Cx37 en Cx40 zijn ook in de endotheelcellen van de hersenen gedetecteerd (Little, Beyer *et al.* 1995; Traub, Hertlein *et al.* 1998; Nagasawa, Chiba *et al.* 2006). Er is minder zekerheid omtrent Cx43. In geïsoleerde capillaire endotheelcellen van de hersenen van de rat, rund, muis en varken was Cx43 vastgesteld (Larson, Haudenschild *et al.* 1990; Little, Beyer *et al.* 1995; Theis, de Wit *et al.* 2001; Nagasawa, Chiba *et al.* 2006), maar dit kon niet bevestigd worden door experimenten op *brain slices* (Simard, Arcuino *et al.*

2003a). Ons onderzoek toont een duidelijke aanwezigheid van Cx43 in geïmmortaliseerde endotheelcellen van de hersenen van de rat (RBE4).

II.1.2 Gap junctionele koppeling in RBE4

De aanwezigheid van functionele gap juncties tussen RBE4 cellen werd onderzocht door middel van FRAP en SLDT. De *recovery* na *photobleaching* was ongeveer 30% en de spreiding van 6-CF bedroeg ongeveer 85 μ m. Gap27 en carbenoxolone (Cbx) konden zowel de *recovery* na *photobleaching* als de spreiding van 6-CF inhiberen. Dit wijst op de betrokkenheid van functionele gap juncties in het proces. Aldus kunnen wij besluiten dat functionele gap juncties aanwezig zijn in de RBE4 cellen.

Vandamme *et al.* hebben ook aangetoond dat RBE4 functionele gap juncties bevatten (Vandamme, Braet *et al.* 2004). Ze maakten hiertoe gebruik van de SLDT techniek en konden een spreiding in RBE4 cellen van ongeveer 10 μ m aantonen. In bovine endotheelcellen van de cornea bestaan eveneens functionele gap juncties, zoals aangetoond werd door SLDT (spreiding tot 400 μ m) en FRAP (*recovery* tot 60-70% binnen 3min) (Gomes, Srinivas *et al.* 2006).

II.1.3 Hemikanalen in RBE4

De aanwezigheid van hemikanalen in RBE4 cellen werd bestudeerd door middel van PI *uptake* en ATP *release*. Het is gekend dat een lage $[Ca^{2+}]_e$ opening van hemikanalen kan veroorzaken (Hofer and Dermietzel 1998; Stout, Costantin *et al.* 2002). Divalent-vrije (DV-vrij- ~ 0.1 nM) en nominaal calcium vrije (nominal- ~ 10 μ M) oplossingen stimuleerden de opname van PI tot respectievelijk 1834% en 530% boven de basale opname. De oplossingen met 100 μ M en 200 μ M vrij Ca^{2+} stimuleerden de PI opname tot respectievelijk 157% en 353%. ATP *release* geeft een gelijkaardig beeld: DV-vrij en nominal zijn de sterkste stimuli met respectievelijk 171% en 142% stijging van de ATP vrijstelling. Daartegenover geven 100 μ M en 200 μ M $[Ca^{2+}]_{vrij}$ een niet significante stijging tot respectievelijk 131% en 124%.

Uit het werk van Vandamme *et al.* blijkt dat de ATP *release* stijgt tot ongeveer 500% na stimulatie met DV-vrij (Vandamme, Braet *et al.* 2004). Gomes *et al.* rapporteerden eveneens een stimulatie in aanwezigheid van een DV-vrij oplossing van ATP *release* in corneale endotheelcellen (Gomes, Srinivas, Van Driessche *et al.* 2005).

De toevoeging van Gap27 reduceerde de getriggerde ATP *release* terug tot basale waarden. Dit bewijst dat de ATP *release* na stimulatie met lage concentraties extracellulair Ca^{2+} werkelijk via hemikanalen verloopt. Andere mogelijke mechanismen zoals vrijstelling van ATP via hemikanaal of een P_{2x7} receptor kanaal (Tran Van Nhieu, Clair *et al.* 2003; Evans, De Vuyst *et al.* 2006; Suadicani, Brosnan *et al.* 2006), zijn dan minder belangrijk. Gomes *et al.* werkten met Gap26 - eveneens een connexine mimetisch peptide voor Cx43 - om de toename van de ATP *release* te blokkeren (Gomes, Srinivas, Van Driessche *et*

al. 2005). Uit hun resultaten blijkt dat de ATP *release* sterk gedaald was na toepassing van 300 μ M Gap26 gedurende 30min.

II.2 Calciumgolven en oscillaties in het barrière-endotheel

Tenslotte hebben wij de invloed van de Ca^{2+} concentraties op het ontstaan van calciumgolven en calciumoscillaties onderzocht. Zowel DV-vrij en nominal, als 100 μ M en 200 μ M $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{vrij}}$ resulteerden in een stijging van het aantal calciumgolven dat optrad over een periode van 10min. Nominaal was de sterkste stimulus en 200 μ M de zwakste. Ook bij meting van de calciumoscillaties zagen wij een gelijkaardig beeld. Na toediening van Gap27 daalde zowel het aantal golven als het aantal oscillerende cellen. Aangezien de incubatietijd niet lang genoeg was om de gap juncties te inhiberen, zou het hier over een blok van de hemikanalen gaan. Hieruit kunnen wij concluderen dat de hemikanalen een rol spelen in het optreden van calciumgolven in RBE4.

Gomes et al. werkten met bovine endotheelcellen van de cornea en toonden aan dat de voortplanting van de calciumgolf wordt geïnhibeerd na 30min incubatie met 300 μ M Gap26 (Gomes, Srinivas, Van Driessche *et al.* 2005). In deze experimenten gebruikten ze mechanische stimulatie om de golf uit te lokken en hebben vooral de karakteristieken van de golf bepaald zoals hoeveelheid betrokken cellen en de oppervlakte die de golf bestrijkt. Door gebruik van een andere stimulus waren we beter geplaatst om aantal golven en oscillerende cellen in een cultuur te bepalen.

III. Conclusie

In deze studie onderzochten we twee aspecten van de BHB in geïmmortaliseerde endotheliale cellijn, afgeleid van het hersenendotheel van de rat: het glucose transport via de GLUT1 transporter en de calciumsignalisatie tussen de cellen.

Voor het eerste toonden we aan dat ATP, een neuro- en gliotransmitter, en H_2O_2 dat wordt geproduceerd als bijproduct van oxidatieve fosforylatie of tijdens hypoxie/reoxygenatie, de opname van glucose (^3H -2DG) door de GLUT1 glucosetransporter konden stimuleren. Bovendien bleek ook een toename van $[\text{Ca}^{2+}]_i$ te leiden tot een verhoogde opname van glucose. ATP en H_2O_2 gaven beide aanleiding tot een stijging van $[\text{Ca}^{2+}]_i$, maar we konden niet aantonen dat het effect van deze stimuli op de opname van glucose gemedieerd werd door de stijging van $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Voor deel twee stelden we vast dat 1) Cx43 in RBE4 aanwezig is en functionele hemikanalen en gap juncties kan vormen, 2) een lage $[\text{Ca}^{2+}]_e$ de opening van deze hemikanalen veroorzaakt in RBE4 en 3) hemikanalen een rol hebben in het optreden van calciumgolven en oscillaties in RBE4.

Referenties

- Abbott N. J.: "Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability." *J Anat* (2002) **200**(6): 629-638.
- Abbott N. J., Ronnback L., Hansson E.: "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." *Nat Rev Mol Cell Biol* (2006) **7**(1): 41-53.
- Ahmed N., Berridge M. V.: "N-glycosylation of glucose transporter-1 (Glut-1) is associated with increased transporter affinity for glucose in human leukemic cells." *Leukemia research* (1999) **23**(4): 395-401.
- Alexander D. B., Goldberg G. S.: "Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels." *Curr Med Chem* (2003) **10**(19): 2045-2058.
- Allbritton N. L., Meyer T., Stryer L.: "Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate." *Science* (1992) **258**(5089): 1812-1815.
- Allt G., Lawrenson J. G.: "Pericytes: cell biology and pathology." *Cells Tissues Organs* (2001) **169**(1): 1-11.
- Aurrand-Lions M., Johnson-Leger C., Wong C., Du Pasquier L., Imhof B. A.: "Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members." *Blood* (2001) **98**(13): 3699-3707.
- Ballabh P., Braun A., Nedergaard M.: "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications." *Neurobiol Dis* (2004) **16**(1): 1-13.
- Barnes K., Ingram J. C., Porras O. H., Barros L. F., Hudson E. R., Fryer L. G., Foufelle F., Carling D., Hardie D. G., Baldwin S. A.: "Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK)." *J Cell Sci* (2002) **115**(Pt 11): 2433-2442.
- Barros L. F., Bittner C. X., Loaiza A., Porras O. H.: "A quantitative overview of glucose dynamics in the gliovascular unit." *Glia* (2007) **55**(12): 1222-1237.
- Bauer H. C., Bauer H., Lametschwandtner A., Amberger A., Ruiz P., Steiner M.: "Neovascularization and the appearance of morphological characteristics of the blood-brain barrier in the embryonic mouse central nervous system." *Brain research* (1993) **75**(2): 269-278.
- Bazzoni G., Dejana E.: "Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis." *Physiol Rev* (2004) **84**(3): 869-901.
- Begley D. J., Brightman M. W.: "Structural and functional aspects of the blood-brain barrier." *Prog Drug Res* (2003) **61**: 39-78.
- Berridge M. J.: "Inositol trisphosphate and calcium signalling." *Nature* (1993) **361**(6410): 315-325.
- Berridge M. J., Dupont G.: "Spatial and temporal signalling by calcium." *Curr Opin Cell Biol* (1994) **6**(2): 267-274.
- Birnbaum M. J., Haspel H. C., Rosen O. M.: "Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1986) **83**(16): 5784-5788.
- Boado R. J., Pardridge W. M.: "Differential expression of alpha-actin mRNA and immunoreactive protein in brain microvascular pericytes and smooth muscle cells." *J Neurosci Res* (1994) **39**(4): 430-435.
- Bodin P., Burnstock G.: "Purinergic signalling: ATP release." *Neurochemical research* (2001) **26**(8-9): 959-969.
- Bowles D. K., Graier W. F., Sturek M.: "Hydrogen Peroxide Activates Na⁺-Dependent Ca²⁺ Influx in Coronary Endothelial Cells." *Biochem Biophys Res Commun* (2001) **287**(5): 1134-1139.
- Braet K., Paemeleire K., D'Herde K., Sanderson M. J., Leybaert L.: "Astrocyte-endothelial cell calcium signals conveyed by two signalling pathways." *Eur J Neurosci* (2001) **13**(1): 79-91.
- Braet K., Aspeslagh S., Vandamme W., Willecke K., Martin P. E., Evans W. H., Leybaert L.: "Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells." *J Cell Physiol* (2003) **197**(2): 205-213.
- Braet K., Vandamme W., Martin P. E., Evans W. H., Leybaert L.: "Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers ATP release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26." *Cell Calcium* (2003) **33**(1): 37-48.
- Brown R. C., Davis T. P.: "Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **327**(4): 1114-1123.
- Bruzzone R., Haefliger J. A., Gimlich R. L., Paul D. L.: "Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins." *Mol Biol Cell* (1993) **4**(1): 7-20.
- Bruzzone S., Guida L., Zocchi E., Franco L., De Flora A.: "Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells." *Faseb J* (2001) **15**(1): 10-12.
- Burdyga T., Shmygol A., Eisner D. A., Wray S.: "A new technique for simultaneous and in situ measurements of Ca²⁺ signals in arteriolar smooth muscle and endothelial cells." *Cell Calcium* (2003) **34**(1): 27-33.
- Butt A. M., Jones H. C., Abbott N. J.: "Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study." *J Physiol* (1990) **429**: 47-62.
- Chang Ling T., Stone J.: "Factors determining the morphology and distribution of astrocytes in the cat retina: a 'contact-spacing' model of astrocyte interaction." *J Comp Neurol* (1991) **303**(3): 387-399.
- Chatton J. Y., Marquet P., Magistretti P. J.: "A quantitative analysis of L-glutamate-regulated Na⁺ dynamics in mouse cortical astrocytes: implications for cellular bioenergetics." *Eur J Neurosci* (2000) **12**(11): 3843-3853.

- Cherian P. P., Siller-Jackson A. J., Gu S., Wang X., Bonewald L. F., Sprague E., Jiang J. X.: "Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin." Mol Biol Cell (2005) **16**(7): 3100-3106.
- Chih C. P., Roberts Jr E. L.: "Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis." J Cereb Blood Flow Metab (2003) **23**(11): 1263-1281.
- Cohen Z., Bonvento G., Lacombe P., Hamel E.: "Serotonin in the regulation of brain microcirculation." Progress in neurobiology (1996) **50**(4): 335-362.
- Cornell-Bell A. H., Finkbeiner S. M., Cooper M. S., Smith S. J.: "Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling." Science (1990) **247**(4941): 470-473.
- Cornford E. M., Hyman S., Pardridge W. M.: "An electron microscopic immunogold analysis of developmental up-regulation of the blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter." J Cereb Blood Flow Metab (1993) **13**(5): 841-854.
- Cornford E. M., Hyman S., Black K. L., Cornford M. E., Vinters H. V., Pardridge W. M.: "High expression of the Glut1 glucose transporter in human brain hemangioblastoma endothelium." Journal of neuropathology and experimental neurology (1995) **54**(6): 842-851.
- Cornford E. M., Nguyen E. V., Landaw E. M.: "Acute upregulation of blood-brain barrier glucose transporter activity in seizures." Am J Physiol Heart Circ Physiol (2000) **279**(3): H1346-1354.
- Cotrina M. L., Lin J. H., Alves-Rodrigues A., Liu S., Li J., Azmi-Ghadimi H., Kang J., Naus C. C., Nedergaard M.: "Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release." Proc Natl Acad Sci U S A (1998) **95**(26): 15735-15740.
- Courtney P. J., Boyles J.: "Fibronectin in the microvasculature: Localization in the pericyte-endothelial interstitium." J Ultrastruct Res (1983) **83**: 258-273.
- Cuevas P., Gutierrez-Diaz J. A., Reimers D., Dujovny M., Diaz F. G., Ausman J. I.: "Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries." Anat Embryol (Berl) (1984) **170**(2): 155-159.
- Dahl G., Nonner W., Werner R.: "Attempts to define functional domains of gap junction proteins with synthetic peptides." Biophys J (1994) **67**(5): 1816-1822.
- De Vuyst E., Decrock E., Cabooter L., Dubyak G. R., Naus C. C., Evans W. H., Leybaert L.: "Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening." EMBO J (2006) **25**(1): 34-44.
- Dehouck M. P., Meresse S., Delorme P., Fruchart J. C., Cecchelli R.: "An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro." J Neurochem (1990) **54**(5): 1798-1801.
- Dejana E., Lampugnani M. G., Martinez-Estrada O., Bazzoni G.: "The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability." Int J Dev Biol (2000) **44**(6): 743-748.
- Del Maschio A., De Luigi A., Martin-Padura I., Brockhaus M., Bartfai T., Fruscella P., Adorini L., Martino G., Furlan R., De Simoni M. G., Dejana E.: "Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM)." J Exp Med (1999) **190**(9): 1351-1356.
- DeNofrio D., Hoock T. C., Herman I. M.: "Functional sorting of actin isoforms in microvascular pericytes." J Cell Biol (1989) **109**(1): 191-202.
- Diaz-Flores L., Gutierrez R., Varela H., Rancel N., Valladares F.: "Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics." Histol Histopathol (1991) **6**(2): 269-286.
- Dietrich H. H., Kajita Y., Dacey R. G., Jr.: "Local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral arterioles." Am J Physiol (1996) **271**(3 Pt 2): H1109-1116.
- Dominguez J. H., Song B., Liu-Chen S., Qulali M., Howard R., Lee C. H., McAteer J.: "Studies of renal injury. II. Activation of the glucose transporter 1 (GLUT1) gene and glycolysis in LLC-PK1 cells under Ca²⁺ stress." J Clin Invest (1996) **98**(2): 395-404.
- Duan S., Neary J. T.: "P2X(7) receptors: properties and relevance to CNS function." Glia (2006) **54**(7): 738-746.
- Duling B. R., Hogan R. D., Langille B. L., Lelkes P., Segal S. S., Vatner S. F., Weigelt H., Young M. A.: "Vasomotor control: functional hyperemia and beyond." Fed Proc (1987) **46**(2): 251-263.
- Dupont G., Combettes L., Leybaert L.: "Calcium dynamics: spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level." Int Rev Cytol (2007) **261**: 193-245.
- Durieu-Trautmann O., Foignant N., Strosberg A. D., Couraud P. O.: "Coexpression of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors on bovine brain capillary endothelial cells in culture." J Neurochem (1991) **56**(3): 775-781.
- Durieu-Trautmann O., Chaverot N., Cazaubon S., Strosberg A. D., Couraud P. O.: "Intercellular adhesion molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells." J Biol Chem (1994) **269**(17): 12536-12540.
- Ebnet K., Schulz C. U., Meyer Zu Brickwedde M. K., Pendl G. G., Vestweber D.: "Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1." J Biol Chem (2000) **275**(36): 27979-27988.

- Elhousseiny A., Cohen Z., Olivier A., Stanimirovic D. B., Hamel E.: "Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization." J Cereb Blood Flow Metab (1999) **19**(7): 794-802.
- Evans W. H., De Vuyst E., Leybaert L.: "The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight." The Biochemical journal (2006) **397**(1): 1-14.
- Fam S. R., Gallagher C. J., Salter M. W.: "P2Y(1) purinoceptor-mediated Ca(2+) signaling and Ca(2+) wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes." J Neurosci (2000) **20**(8): 2800-2808.
- Farkas E., Luiten P. G.: "Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease." Progress in neurobiology (2001) **64**(6): 575-611.
- Farrell C. L., Pardridge W. M.: "Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study." Proc Natl Acad Sci U S A (1991) **88**(13): 5779-5783.
- Farrell C. R., Stewart P. A., Farrell C. L., Del Maestro R. F.: "Pericytes in human cerebral microvasculature." Anat Rec (1987) **218**(4): 466-469.
- Fenstermacher J., Gross P., Sposito N., Acuff V., Pettersen S., Gruber K.: "Structural and functional variations in capillary systems within the brain." Ann N Y Acad Sci (1988) **529**: 21-30.
- Fiorentini D., Hakim G., Bonsi L., Bagnara G. P., Maraldi T., Landi L.: "Acute regulation of glucose transport in a human megakaryocytic cell line: difference between growth factors and H₂O₂." Free Radical Biology and Medicine (2001) **31**(7): 923-931.
- Fischer Y., Becker C., Loken C.: "Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes." J Biol Chem (1999a) **274**(2): 755-761.
- Fischer Y., Becker C., Loken C.: "Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes." J Biol Chem (1999b) **274**(2): 755-761.
- Frame M. K., de Feijter A. W.: "Propagation of mechanically induced intercellular calcium waves via gap junctions and ATP receptors in rat liver epithelial cells." Exp Cell Res (1997) **230**(2): 197-207.
- Frey A., Meckelein B., Weiler-Guttler H., Mockel B., Flach R., Gassen H. G.: "Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase." Eur J Biochem (1991) **202**(2): 421-429.
- Fry T., Evans J. H., Sanderson M. J.: "Propagation of intercellular calcium waves in C6 glioma cells transfected with connexins 43 or 32." Microscopy research and technique (2001) **52**(3): 289-300.
- Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S.: "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." J Cell Biol (1993) **123**(6 Pt 2): 1777-1788.
- Furuse M., Itoh M., Hirase T., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S.: "Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions." J Cell Biol (1994) **127**(6 Pt 1): 1617-1626.
- Furuse M., Sasaki H., Tsukita S.: "Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands." J Cell Biol (1999) **147**(4): 891-903.
- Gabriels J. E., Paul D. L. (1998). Connexin43 Is Highly Localized to Sites of Disturbed Flow in Rat Aortic Endothelium but Connexin37 and Connexin40 Are More Uniformly Distributed. **83**: 636-643.
- Gallagher C. J., Salter M. W.: "Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors." J Neurosci (2003) **23**(17): 6728-6739.
- Ganong W. F., Ed. (2003). Review of medical physiology, Lange Medical Books/ McGraw-Hill
- Goldberg G. S., Moreno A. P., Lampe P. D.: "Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP." J Biol Chem (2002) **277**(39): 36725-36730.
- Gomes P., Srinivas S. P., Vereecke J., Himpens B.: "ATP-dependent paracrine intercellular communication in cultured bovine corneal endothelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci (2005) **46**(1): 104-113.
- Gomes P., Srinivas S. P., Van Driessche W., Vereecke J., Himpens B.: "ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci (2005) **46**(4): 1208-1218.
- Gomes P., Srinivas S. P., Vereecke J., Himpens B.: "Gap junctional intercellular communication in bovine corneal endothelial cells." Exp Eye Res (2006) **83**(5): 1225-1237.
- Goodenough D. A., Paul D. L.: "Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels." Nat Rev Mol Cell Biol (2003) **4**(4): 285-294.
- Grieb P., Forster R. E., Strome D., Goodwin C. W., Pape P. C.: "O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator-dilution technique." J Appl Physiol (1985) **58**(6): 1929-1941.
- Guerrier A., Fonlupt P., Morand I., Rabilloud R., Audebet C., Krutovskikh V., Gros D., Rousset B., Munari-Silem Y.: "Gap junctions and cell polarity: connexin32 and connexin43 expressed in polarized thyroid epithelial cells assemble into separate gap junctions, which are located in distinct regions of the lateral plasma membrane domain." J Cell Sci (1995) **108** (Pt 7): 2609-2617.

- Guo X., Geng M., Du G.: "Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier." *Biochem Genet* (2005) **43**(3-4): 175-187.
- Haefliger J.-A., Nicod P., Meda P. (2004). Contribution of connexins to the function of the vascular wall. **62**: 345-356.
- Hajdúch E., Rencurel F., Balendran A., Batty I. H., Downes C. P., Hundal H. S.: "Serotonin (5-Hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle." *J Biol Chem* (1999) **274**(19): 13563-13568.
- Hakim G., Fiorentini D., Maraldi T., Landi L.: "Enhancement of Glucose Transport in Rat Thymocytes by Different Radical Sources." *Free Radical Research* (2003) **37**(2): 197-204.
- Hamill S., Cloherty E. K., Carruthers A.: "The human erythrocyte sugar transporter presents two sugar import sites." *Biochemistry* (1999) **38**(51): 16974-16983.
- Han H. J., Heo J. S., Lee Y. J.: "ANG II increases 2-deoxyglucose uptake in mouse embryonic stem cells." *Life Sci* (2005) **77**(15): 1916-1933.
- Harris A. L.: "Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap." *Quarterly reviews of biophysics* (2001) **34**(3): 325-472.
- 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**(1): 25-39.
- Haskins J., Gu L., Wittchen E. S., Hibbard J., Stevenson B. R.: "ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin." *J Cell Biol* (1998) **141**(1): 199-208.
- Hawkins B. T., Abbruscato T. J., Egleton R. D., Brown R. C., Huber J. D., Campos C. R., Davis T. P.: "Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution." *Brain Res* (2004) **1027**(1-2): 48-58.
- Hawkins B. T., Davis T. P.: "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease." *Pharmacol Rev* (2005) **57**(2): 173-185.
- Haydon P. G., Carmignoto G.: "Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling." *Physiol Rev* (2006) **86**(3): 1009-1031.
- Hecquet C. M., Ahmmed G. U., Vogel S. M., Malik A. B.: "Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability." *Circulation research* (2008) **102**(3): 347-355.
- Helgerson A. L., Carruthers A.: "Equilibrium ligand binding to the human erythrocyte sugar transporter. Evidence for two sugar-binding sites per carrier." *J Biol Chem* (1987) **262**(12): 5464-5475.
- Henriksen Z., Hiken J. F., Steinberg T. H., Jorgensen N. R.: "The predominant mechanism of intercellular calcium wave propagation changes during long-term culture of human osteoblast-like cells." *Cell Calcium* (2006) **39**(5): 435-444.
- Herman I. M., D'Amore P. A.: "Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins." *J Cell Biol* (1985) **101**(1): 43-52.
- Hirase T., Staddon J. M., Saitou M., Ando-Akatsuka Y., Itoh M., Furuse M., Fujimoto K., Tsukita S., Rubin L. L.: "Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells." *J Cell Sci* (1997) **110** (Pt 14): 1603-1613.
- Hirschi K. K., D'Amore P. A.: "Pericytes in the microvasculature." *Cardiovasc Res* (1996) **32**(4): 687-698.
- Hofer A., Dermietzel R.: "Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes." *Glia* (1998) **24**(1): 141-154.
- Hofer T., Politi A., Heinrich R.: "Intercellular Ca²⁺ wave propagation through gap-junctional Ca²⁺ diffusion: a theoretical study." *Biophys J* (2001) **80**(1): 75-87.
- Hofer T., Venance L., Giaume C.: "Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach." *J Neurosci* (2002) **22**(12): 4850-4859.
- Hogan A., Heyner S., Charron M. J., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Thorens B., Schultz G. A.: "Glucose transporter gene expression in early mouse embryos." *Development* (1991) **113**(1): 363-372.
- Hosoya K. I., Takashima T., Tetsuka K., Nagura T., Ohtsuki S., Takanaga H., Ueda M., Yanai N., Obinata M., Terasaki T.: "mRNA expression and transport characterization of conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines; a new in vitro BBB model for drug targeting." *J Drug Target* (2000) **8**(6): 357-370.
- Hruz P. W., Mueckler M. M.: "Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review)." *Mol Membr Biol* (2001) **18**(3): 183-193.
- Hutchinson D. S., Bengtsson T.: "alpha1A-adrenoceptors activate glucose uptake in L6 muscle cells through a phospholipase C-, phosphatidylinositol-3 kinase-, and atypical protein kinase C-dependent pathway." *Endocrinology* (2005) **146**(2): 901-912.
- Hynes R. O.: "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." *Cell* (1992) **69**(1): 11-25.
- Iadecola C.: "Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease
Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease." *Nature Reviews Neuroscience* (2004) **5**(5): 347-360.

- Igarashi Y., Utsumi H., Chiba H., Yamada-Sasamori Y., Tobioka H., Kamimura Y., Furuuchi K., Kokai Y., Nakagawa T., Mori M., Sawada N.: "Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier." *Biochem Biophys Res Commun* (1999) **261**(1): 108-112.
- Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Kitani-Yasuda T., Tsukita S., Tsukita S.: "The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy." *J Cell Biol* (1993) **121**(3): 491-502.
- Itoh M., Furuse M., Morita K., Kubota K., Saitou M., Tsukita S.: "Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins." *J Cell Biol* (1999) **147**(6): 1351-1363.
- Joost H. G., Bell G. I., Best J. D., Birnbaum M. J., Charron M. J., Chen Y. T., Doege H., James D. E., Lodish H. F., Moley K. H., Moley J. F., Mueckler M., Rogers S., Schurmann A., Seino S., Thorens B.: "Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators." *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2002) **282**(4): E974-976.
- Jorgensen N. R., Geist S. T., Civitelli R., Steinberg T. H.: "ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells." *J Cell Biol* (1997) **139**(2): 497-506.
- Joyce N. C., Haire M. F., Palade G. E.: "Contractile proteins in pericytes. II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations." *J Cell Biol* (1985a) **100**(5): 1387-1395.
- Joyce N. C., Haire M. F., Palade G. E.: "Contractile proteins in pericytes. I. Immunoperoxidase localization of tropomyosin." *J Cell Biol* (1985b) **100**(5): 1379-1386.
- Joyce N. C., Harris D. L., Zieske J. D.: "Mitotic inhibition of corneal endothelium in neonatal rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1998) **39**(13): 2572-2583.
- Kalaria R. N.: "Cerebral vessels in ageing and Alzheimer's disease." *Pharmacology & therapeutics* (1996) **72**(3): 193-214.
- Kaley G., Hintze T. H., Panzenbeck M., Messina E. J.: "Role of prostaglandins in microcirculatory function." *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* (1985) **13**: 27-35.
- Karlstedt K., Sallmen T., Eriksson K. S., Lintunen M., Couraud P. O., Joo F., Panula P.: "Lack of histamine synthesis and down-regulation of H1 and H2 receptor mRNA levels by dexamethasone in cerebral endothelial cells." *J Cereb Blood Flow Metab* (1999) **19**(3): 321-330.
- Kelley C., D'Amore P., Hechtman H. B., Shepro D.: "Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall." *J Cell Biol* (1987) **104**(3): 483-490.
- Kelley C., D'Amore P., Hechtman H. B., Shepro D.: "Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro." *Journal of muscle research and cell motility* (1988) **9**(2): 184-194.
- Kenney A. J., Turner A. J., Eds. (1987). *Mammalian Ectoenzymes*. Amsterdam, Elsevier.
- Kim M. S., Lee J., Ha J., Kim S. S., Kong Y., Cho Y. H., Baik H. H., Kang I.: "ATP stimulates glucose transport through activation of P2 purinergic receptors in C(2)C(12) skeletal muscle cells." *Arch Biochem Biophys* (2002) **401**(2): 205-214.
- Klip A., Li G., Logan W. J.: "Role of calcium ions in insulin action on hexose transport in L6 muscle cells." *Am J Physiol* (1984) **247**(3 Pt 1): E297-304.
- Kniesel U., Wolburg H.: "Tight junctions of the blood-brain barrier." *Cell Mol Neurobiol* (2000) **20**(1): 57-76.
- Knight G. E., Bodin P., De Groat W. C., Burnstock G.: "ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension." *Am J Physiol Renal Physiol* (2002) **282**(2): F281-288.
- Knudsen K. A., Soler A. P., Johnson K. R., Wheelock M. J.: "Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin." *J Cell Biol* (1995) **130**(1): 67-77.
- Kojima T., Sawada N., Chiba H., Kokai Y., Yamamoto M., Urban M., Lee G. H., Hertzberg E. L., Mochizuki Y., Spray D. C.: "Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes: connexin 32 interacts with occludin." *Biochem Biophys Res Commun* (1999) **266**(1): 222-229.
- Kojima T., Kokai Y., Chiba H., Yamamoto M., Mochizuki Y., Sawada N.: "Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes." *Exp Cell Res* (2001) **263**(2): 193-201.
- Kondo A., Inoue T., Nagara H., Tateishi J., Fukui M.: "Neurotoxicity of adriamycin passed through the transiently disrupted blood-brain barrier by mannitol in the rat brain." *Brain Res* (1987) **412**(1): 73-83.
- Kozlovsky N., Rudich A., Potashnik R., Bashan N.: "Reactive Oxygen Species Activate Glucose Transport in L6 Myotubes." *Free Radical Biology and Medicine* (1997) **23**(6): 859-869.
- Krauze D., Kunz J., Dermietzel R. Cerebral pericytes - A second line of defence in controlling blood-brain barrier peptide metabolism. In: *Frontiers in Cerebral Vascular Biology*; L. R. Drewes, A. L. Betz. Raven Press, New York, (1992).
- Kubota K., Furuse M., Sasaki H., Sonoda N., Fujita K., Nagafuchi A., Tsukita S.: "Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions." *Curr Biol* (1999) **9**(18): 1035-1038.
- Kumar N. M., Gilula N. B.: "The gap junction communication channel." *Cell* (1996) **84**(3): 381-388.

- Laird D. W., Yancey S. B., Bugga L., Revel J. P.: "Connexin expression and gap junction communication compartments in the developing mouse limb." *Dev Dyn* (1992) **195**(3): 153-161.
- Lampe P. D., Lau A. F.: "Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins." *Arch Biochem Biophys* (2000) **384**(2): 205-215.
- Landolt-Marticorena C., Reithmeier R. A.: "Asparagine-linked oligosaccharides are localized to single extracytosolic segments in multi-span membrane glycoproteins." *Biochem J* (1994) **302** (Pt 1): 253-260.
- Larson D. M., Haudenschild C. C., Beyer E. C.: "Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells." *Circ Res* (1990) **66**(4): 1074-1080.
- Laux-Fenton W. T., Donaldson P. J., Kistler J., Green C. R.: "Connexin expression patterns in the rat cornea: molecular evidence for communication compartments." *Cornea* (2003) **22**(5): 457-464.
- Lazarowski E. R., Boucher R. C., Harden T. K.: "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules." *Molecular pharmacology* (2003) **64**(4): 785-795.
- Leeson T. S.: "Rat retinal blood vessels." *Can J Ophthalmol* (1979) **14**(1): 21-28.
- Leybaert L.: "Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling?" *J Cereb Blood Flow Metab* (2005) **25**(1): 2-16.
- Leybaert L., De Bock M., Van Moorhem M., Decrock E., De Vuyst E.: "Neurobarrier coupling in the brain: Adjusting glucose entry with demand." (2007).
- Liebner S., Kniesel U., Kalbacher H., Wolburg H.: "Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells." *Eur J Cell Biol* (2000) **79**(10): 707-717.
- Lippoldt A., Kniesel U., Liebner S., Kalbacher H., Kirsch T., Wolburg H., Haller H.: "Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells." *Brain Res* (2000) **885**(2): 251-261.
- Little T. L., Beyer E. C., Duling B. R.: "Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo." *Am J Physiol* (1995) **268**(2 Pt 2): H729-739.
- Loaiza A., Porras O. H., Barros L. F.: "Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy." *J Neurosci* (2003) **23**(19): 7337-7342.
- Lum H., Jaffe H. A., Schulz I. T., Masood A., Raychaudhury A., Green R. D.: "Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction." *Am J Physiol* (1999) **277**(3 Pt 1): C580-588.
- Maher F., Vannucci S. J., Simpson I. A.: "Glucose transporter proteins in brain." *Faseb J* (1994) **8**(13): 1003-1011.
- Maraldi T., Rugolo M., Fiorentini D., Landi L., Hakim G.: "Glucose transport activation in human hematopoietic cells M07e is modulated by cytosolic calcium and calmodulin." *Cell Calcium* (2006) **40**(4): 373-381.
- Martin-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., Simmons D., Dejana E.: "Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration." *J Cell Biol* (1998) **142**(1): 117-127.
- Matsusaka T.: "Tridimensional views of the relationship of pericytes to endothelial cells of capillaries in the human choroid and retina." *J Electron Microsc (Tokyo)* (1975) **24**(1): 13-18.
- Matter K., Balda M. S.: "Signalling to and from tight junctions." *Nat Rev Mol Cell Biol* (2003) **4**(3): 225-236.
- McAllister M. S., Krizanac-Bengez L., Macchia F., Naftalin R. J., Pedley K. C., Mayberg M. R., Marroni M., Leaman S., Stanness K. A., Janigro D.: "Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study." *Brain Res* (2001) **904**(1): 20-30.
- McCall A. L.: "Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus." *European journal of pharmacology* (2004) **490**(1-3): 147-158.
- Mergler S., Pleyer U., Reinach P., Bednarz J., Dannowski H., Engelmann K., Hartmann C., Yousif T.: "EGF suppresses hydrogen peroxide induced Ca²⁺ influx by inhibiting L-type channel activity in cultured human corneal endothelial cells." *Experimental Eye Research* (2005) **80**(2): 285-293.
- Mitic L. L., Van Itallie C. M., Anderson J. M.: "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2000) **279**(2): G250-254.
- Mohay J., McLaughlin B. J.: "Corneal endothelial wound repair in normal and mitotically inhibited cultures." *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* (1995) **233**(11): 727-736.
- Montana V., Malarkey E. B., Verderio C., Matteoli M., Pappas V.: "Vesicular transmitter release from astrocytes." *Glia* (2006) **54**(7): 700-715.
- Morita H., Katsuno T., Hoshimoto A., Hirano N., Saito Y., Suzuki Y.: "Connexin 26-mediated gap junctional intercellular communication suppresses paracellular permeability of human intestinal epithelial cell monolayers." *Exp Cell Res* (2004) **298**(1): 1-8.

- Mueckler M., Caruso C., Baldwin S. A., Panico M., Blench I., Morris H. R., Allard W. J., Lienhard G. E., Lodish H. F.: "Sequence and structure of a human glucose transporter." *Science* (1985) **229**(4717): 941-945.
- Musil L. S., Goodenough D. A.: "Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques." *J Cell Biol* (1991) **115**(5): 1357-1374.
- Nagasawa K., Chiba H., Fujita H., Kojima T., Saito T., Endo T., Sawada N.: "Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells." *J Cell Physiol* (2006) **208**(1): 123-132.
- Naitoh T., Kobayashi S., Kimura I., Kimura M.: "Intracellular Ca²⁺ and Mg²⁺ regulation for insulin-stimulated glucose uptake into mouse diaphragm muscles." *Japanese journal of pharmacology* (1991) **56**(2): 241-244.
- Nakano M., Atobe Y., Goris R. C., Yazama F., Ono M., Sawada H., Kadota T., Funakoshi K., Kishida R.: "Ultrastructure of the capillary pericytes and the expression of smooth muscle alpha-actin and desmin in the snake infrared sensory organs." *Anat Rec* (2000) **260**(3): 299-307.
- Nedergaard M., Ransom B., Goldman S. A.: "New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain." *Trends Neurosci* (2003) **26**(10): 523-530.
- Nehls V., Drenckhahn D.: "Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin." *The Journal of cell biology* (1991) **113**(1): 147-154.
- Nicholson B., Dermietzel R., Teplow D., Traub O., Willecke K., Revel J. P.: "Two homologous protein components of hepatic gap junctions." *Nature* (1987) **329**(6141): 732-734.
- Nishimura H., Simpson I. A.: "Staurosporine inhibits phorbol 12-myristate 13-acetate- and insulin-stimulated translocation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in rat adipose cells." *Biochem J* (1994) **302** (Pt 1): 271-277.
- Nobles M., Revest P. A., Couraud P. O., Abbott N. J.: "Characteristics of nucleotide receptors that cause elevation of cytoplasmic calcium in immortalized rat brain endothelial cells (RBE4) and in primary cultures." *Br J Pharmacol* (1995) **115**(7): 1245-1252.
- Oldendorf W. H., Cornford M. E., Brown W. J.: "The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat." *Ann Neurol* (1977) **1**(5): 409-417.
- Orte C., Lawrenson J. G., Reid A. R., Bandopadhyay R., Allt G.: "Expression of smooth muscle proteins in microvascular pericytes in the CNS." *J Physiol* (1999) **515**: P. 12P.
- Pardridge W. M., Eisenberg J., Yang J.: "Human blood-brain barrier insulin receptor." *J Neurochem* (1985) **44**(6): 1771-1778.
- Parpura V., Scemes E., Spray D. C.: "Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release." *Neurochem Int* (2004) **45**(2-3): 259-264.
- Pellerin L., Magistretti P. J.: "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) **91**(22): 10625-10629.
- Pellerin L., Magistretti P. J.: "Glutamate uptake stimulates Na⁺, K⁺-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain." *J Neurochem* (1997) **69**(5): 2132-2137.
- Persidsky Y., Ghorpade A., Rasmussen J., Limoges J., Liu X. J., Stins M., Fiala M., Way D., Kim K. S., Witte M. H., Weinand M., Carhart L., Gendelman H. E.: "Microglial and astrocyte chemokines regulate monocyte migration through the blood-brain barrier in human immunodeficiency virus-1 encephalitis." *The American journal of pathology* (1999) **155**(5): 1599-1611.
- Persidsky Y., Ramirez S. H., Haorah J., Kanmogne G. D.: "Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions." *J Neuroimmune Pharmacol* (2006) **1**(3): 223-236.
- Piazza V., Ciubotaru C. D., Gale J. E., Mammano F.: "Purinergic signalling and intercellular Ca²⁺ wave propagation in the organ of Corti." *Cell Calcium* (2007) **41**(1): 77-86.
- Prasad R. K., Ismail-Beigi F.: "Mechanism of Stimulation of Glucose Transport by H₂O₂: Role of Phospholipase C." *Arch Biochem Biophys* (1999) **362**(1): 113-122.
- Quintanilla R. A., Porras O. H., Castro J., Barros L. F.: "Cytosolic [Ca²⁺] modulates basal GLUT1 activity and plays a permissive role in its activation by metabolic stress and insulin in rat epithelial cells." *Cell Calcium* (2000) **28**(2): 97-106.
- Rahman S., Carlile G., Evans W. H.: "Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies." *J Biol Chem* (1993) **268**(2): 1260-1265.
- Ramsauer M., Krause D., Dermietzel R.: "Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes." *Faseb J* (2002) **16**(10): 1274-1276.
- Regina A., Roux F., Revest P. A.: "Glucose transport in immortalized rat brain capillary endothelial cells in vitro: transport activity and GLUT1 expression." *Biochim Biophys Acta* (1997a) **1335**(1-2): 135-143.
- Regina A., Roux F., Revest P. A.: "Glucose transport in immortalized rat brain capillary endothelial cells in vitro: transport activity and GLUT1 expression." *Biochim Biophys Acta* (1997b) **1335**(1-2): 135-143.

- Risek B., Klier F. G., Gilula N. B.: "Developmental regulation and structural organization of connexins in epidermal gap junctions." *Developmental biology* (1994) **164**(1): 183-196.
- Roux F., Durieu-Trautmann O., Chaverot N., Claire M., Mailly P., Bourre J. M., Strosberg A. D., Couraud P. O.: "Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells." *J Cell Physiol* (1994) **159**(1): 101-113.
- Roux F., Couraud P. O.: "Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions." *Cell Mol Neurobiol* (2005) **25**(1): 41-58.
- Saez J. C., Contreras J. E., Bukauskas F. F., Retamal M. A., Bennett M. V. L. (2003). Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. **179**: 9-22.
- Saez J. C., Retamal M. A., Basilio D., Bukauskas F. F., Bennett M. V.: "Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms." *Biochim Biophys Acta* (2005) **1711**(2): 215-224.
- Sanderson M. J., Charles A. C., Boitano S., Dirksen E. R.: "Mechanisms and function of intercellular calcium signaling." *Mol Cell Endocrinol* (1994) **98**(2): 173-187.
- Sanderson M. J.: "Intercellular calcium waves mediated by inositol trisphosphate." *Ciba Found Symp* (1995) **188**: 175-189; discussion 189-194.
- Savettieri G., Di Liegro I., Catania C., Licata L., Pitarresi G. L., D'Agostino S., Schiera G., De Caro V., Giandalia G., Giannola L. I., Cestelli A.: "Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells." *Neuroreport* (2000) **11**(5): 1081-1084.
- Scemes E.: "Components of astrocytic intercellular calcium signaling." *Molecular neurobiology* (2000) **22**(1-3): 167-179.
- Scemes E., Suadicani S. O., Spray D. C.: "Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation." *J Neurosci* (2000) **20**(4): 1435-1445.
- Schneeberger E., Lynch R. Ultrastructure and immunolabeling of the tight junction. In: *Tight junctions*, C. M. Anderson JM, (2001): 19-37.
- Schonfelder U., Hofer A., Paul M., Funk R. H.: "In situ observation of living pericytes in rat retinal capillaries." *Microvasc Res* (1998) **56**(1): 22-29.
- Schroeter M. L., Mertsch K., Giese H., Muller S., Sporbert A., Hickel B., Blasig I. E.: "Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier." *FEBS letters* (1999) **449**(2-3): 241-244.
- Schroeter M. L., Muller S., Lindenau J., Wiesner B., Hanisch U. K., Wolf G., Blasig I. E.: "Astrocytes induce manganese superoxide dismutase in brain capillary endothelial cells." *Neuroreport* (2001) **12**(11): 2513-2517.
- Schulze C., Firth J. A.: "Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat." *J Cell Sci* (1993) **104** (Pt 3): 773-782.
- Sedlakova R., Shivers R. R., Del Maestro R. F.: "Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit." *J Submicrosc Cytol Pathol* (1999) **31**(1): 149-161.
- Shimizu Y., Satoh S., Yano H., Minokoshi Y., Cushman S. W., Shimazu T.: "Effects of noradrenaline on the cell-surface glucose transporters in cultured brown adipocytes: novel mechanism for selective activation of GLUT1 glucose transporters." *Biochem J* (1998) **330** (Pt 1): 397-403.
- Simard M., Arcuino G., Takano T., Liu Q. S., Nedergaard M.: "Signaling at the gliovascular interface." *J Neurosci* (2003a) **23**(27): 9254-9262.
- Simard M., Arcuino G., Takano T., Liu Q. S., Nedergaard M.: "Signaling at the gliovascular interface." *J Neurosci* (2003b) **23**(27): 9254-9262.
- Simons K., Vaz W. L.: "Model systems, lipid rafts, and cell membranes." *Annual review of biophysics and biomolecular structure* (2004) **33**: 269-295.
- Simpson I. A., Vannucci S. J., DeJoseph M. R., Hawkins R. A.: "Glucose transporter asymmetries in the bovine blood-brain barrier." *J Biol Chem* (2001) **276**(16): 12725-12729.
- Sims D. E., Westfall J. A.: "Analysis of relationships between pericytes and gas exchange capillaries in neonatal and mature bovine lungs." *Microvasc Res* (1983) **25**(3): 333-342.
- Sims D. E.: "Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease." *Can J Cardiol* (1991) **7**(10): 431-443.
- Skalli O., Pelte M. F., Pecllet M. C., Gabbiani G., Gugliotta P., Bussolati G., Ravazzola M., Orci L.: "Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes." *J Histochem Cytochem* (1989) **37**(3): 315-321.
- Sohl G., Willecke K.: "Gap junctions and the connexin protein family." *Cardiovascular research* (2004) **62**(2): 228-232.
- Spray D. C., Moreno A. P., Kessler J. A., Dermietzel R.: "Characterization of gap junctions between cultured leptomeningeal cells." *Brain Res* (1991) **568**(1-2): 1-14.
- Stout C. E., Costantin J. L., Naus C. C., Charles A. C.: "Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels." *J Biol Chem* (2002) **277**(12): 10482-10488.

- Suadicani S. O., Flores C. E., Urban-Maldonado M., Beelitz M., Scemes E.: "Gap junction channels coordinate the propagation of intercellular Ca²⁺ signals generated by P2Y receptor activation." *Glia* (2004) **48**(3): 217-229.
- Suadicani S. O., Brosnan C. F., Scemes E.: "P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling." *J Neurosci* (2006) **26**(5): 1378-1385.
- Theis M., de Wit C., Schlaeger T. M., Eckardt D., Kruger O., Doring B., Risau W., Deutsch U., Pohl U., Willecke K.: "Endothelium-specific replacement of the connexin43 coding region by a lacZ reporter gene." *Genesis* (2001) **29**(1): 1-13.
- Tilling T., Korte D., Hoheisel D., Galla H. J.: "Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro." *J Neurochem* (1998) **71**(3): 1151-1157.
- Tilton R. G., Kilo C., Williamson J. R.: "Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries." *Microvasc Res* (1979) **18**(3): 325-335.
- Tilton R. G., Kilo C., Williamson J. R., Murch D. W.: "Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures." *Microvasc Res* (1979) **18**(3): 336-352.
- Tilton R. G., Miller E. J., Kilo C., Williamson J. R.: "Pericyte form and distribution in rat retinal and uveal capillaries." *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1985) **26**(1): 68-73.
- Toyofuku T., Yabuki M., Otsu K., Kuzuya T., Hori M., Tada M.: "Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes." *J Biol Chem* (1998) **273**(21): 12725-12731.
- Tran Van Nhieu G., Clair C., Bruzzone R., Mesnil M., Sansonetti P., Combettes L.: "Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of Shigella in epithelial cells." *Nat Cell Biol* (2003) **5**(8): 720-726.
- Traub O., Look J., Dermietzel R., Brummer F., Hulser D., Willecke K.: "Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes." *J Cell Biol* (1989) **108**(3): 1039-1051.
- Traub O., Hertlein B., Kasper M., Eckert R., Krisciukaitis A., Hulser D., Willecke K.: "Characterization of the gap junction protein connexin37 in murine endothelium, respiratory epithelium, and after transfection in human HeLa cells." *Eur J Cell Biol* (1998) **77**(4): 313-322.
- Utsumi H., Chiba H., Kamimura Y., Osanai M., Igarashi Y., Tobioka H., Mori M., Sawada N.: "Expression of GFRalpha-1, receptor for GDNF, in rat brain capillary during postnatal development of the BBB." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2000) **279**(2): C361-368.
- van Bohlen and Halbach O., Dermietzel R. Neurotransmitters and Neuromodulators. In: *Handbook of receptors and biological effects*. Wiley-VCH, Weinheim, (2002).
- Vandamme W., Braet K., Cabooter L., Leybaert L.: "Tumour necrosis factor alpha inhibits purinergic calcium signalling in blood-brain barrier endothelial cells." *J Neurochem* (2004) **88**(2): 411-421.
- Vandekerckhove J. (2004). De Cel III: De informatiestroom. Gent, Universiteit Gent.
- Vannucci S. J., Maher F., Simpson I. A.: "Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia." *Glia* (1997) **21**(1): 2-21.
- Verselis V. K., Trexler E. B., Bukauskas F. F.: "Connexin hemichannels and cell-cell channels: comparison of properties." *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al]* (2000) **33**(4): 379-389.
- Vorbrodt A. W., Dobrogowska D. H.: "Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view." *Brain Res* (2003) **42**(3): 221-242.
- Voutsinos-Porche B., Bonvento G., Tanaka K., Steiner P., Welker E., Chatton J. Y., Magistretti P. J., Pellerin L.: "Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex." *Neuron* (2003) **37**(2): 275-286.
- Wakui S., Furusato M., Hasumura M., Hori M., Takahashi H., Kano Y., Ushigome S.: "Two- and three-dimensional ultrastructure of endothelium and pericyte interdigitations in capillary of human granulation tissue." *J Electron Microscop* (Tokyo) (1989) **38**(2): 136-142.
- Wakui S., Furusato M., Tanaka M., Allsbrook W. C., Jr., Kano Y., Ushigome S.: "Endothelium and pericyte interdigitation: pathway for epidermal growth factor?" *Microvasc Res* (1990) **40**(2): 285-291.
- Wakui S., Furusato M., Muto T., Ohshige H., Takahashi H., Ushigome S.: "Transforming growth factor-beta and urokinase plasminogen activator presents at endothelial cell-pericyte interdigitation in human granulation tissue." *Microvasc Res* (1997) **54**(3): 262-269.
- Warner A., Clements D. K., Parikh S., Evans W. H., DeHaan R. L.: "Specific motifs in the external loops of connexin proteins can determine gap junction formation between chick heart myocytes." *J Physiol* (1995) **488** (Pt 3): 721-728.
- Webb T. E., Boluyt M. O., Barnard E. A.: "Molecular biology of P2Y purinoceptors: expression in rat heart." *J Auton Pharmacol* (1996) **16**(6): 303-307.
- Weber P. A., Chang H. C., Spaeth K. E., Nitsche J. M., Nicholson B. J.: "The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities." *Biophys J* (2004) **87**(2): 958-973.

-
- Whitehead J. P., Molero J. C., Clark S., Martin S., Meneilly G., James D. E.: "The role of Ca²⁺ in insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 cells." J Biol Chem (2001) **276**(30): 27816-27824.
- Williams K., Watsky M.: "Gap junctional communication in the human corneal endothelium and epithelium." Current eye research (2002) **25**(1): 29-36.
- Wolburg H., Lippoldt A.: "Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation." Vascul Pharmacol (2002) **38**(6): 323-337.
- Wood P. G., Gillespie J. I.: "Evidence for Mitochondrial Ca²⁺-Induced Ca²⁺Release in Permeabilised Endothelial Cells." Biochem Biophys Res Commun (1998) **246**(2): 543-548.
- Yamazaki D., Aoyama M., Ohya S., Muraki K., Asai K., Imaizumi Y.: "Novel functions of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in enhanced cell proliferation by ATP in brain endothelial cells." J Biol Chem (2006) **281**(50): 38430-38439.
- Ye Z. C., Wyeth M. S., Baltan-Tekkok S., Ransom B. R.: "Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release." J Neurosci (2003) **23**(9): 3588-3596.
- Yeh H. I., Dupont E., Coppen S., Rothery S., Severs N. J.: "Gap junction localization and connexin expression in cytochemically identified endothelial cells of arterial tissue." J Histochem Cytochem (1997) **45**(4): 539-550.
- Zonta M., Angulo M. C., Gobbo S., Rosengarten B., Hossmann K. A., Pozzan T., Carmignoto G.: "Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation." Nat Neurosci (2003) **6**(1): 43-50.

Bijlagen

Samenstelling PBSD⁻ (Phosphate Bufferd Saline) pH is 7,4

Stof	Molariteit mM	Concentratie g/l
NaCl	137	8,0
KCl	2,68	0,2
KH ₂ PO ₄	1,47	0,2
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	6,46	1,15

Samenstelling celcultuur medium voor RBE4 (voor 1 liter)

Stof	Hoeveelheid ml	Oorsprong
alpha-MEM	500	Gibco, Invitrogen
Ham's F10	500	Gibco, Invitrogen
FBS	100	Gibco, Invitrogen
PSG	10	Gibco, Invitrogen
Geneticine 30 mg/ml	10	Gibco, Invitrogen
bFGF 1 µg/ml	1	Gibco, Invitrogen

Samenstelling HBSS-hepes met glucose (pH 7.4)

Stof	Molariteit (mM)	Concentratie (g/l)	Osmolaliteit (mOsm)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.95	0.14	2.85
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.81	0.2	1.62
NaCl	137	8.0	274
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.18	0.032	0.54
KCl	5.36	0.4	10.72
KH ₂ PO ₄	0.44	0.06	0.88
D-glucose	5.55	1.0	5.55
HEPES	25	5.95	25

Samenstelling HBSS-hepes zonder glucose (pH 7.4)

Stof	Molariteit (mM)	Concentratie (g/l)	Osmolaliteit (mOsm)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.95	0.14	2.85
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.81	0.2	1.62
NaCl	137	8.0	274
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.18	0.032	0.54
KCl	5.36	0.4	10.72
KH ₂ PO ₄	0.44	0.06	0.88
D(-)-mannitol	5.55	3,6	5.55
HEPES	25	5.95	25

Samenstelling calcium oplossingen

Oplossing	CaCl ₂ mM	MgSO ₄ mM	EGTA mM	[Ca ²⁺] _{vrij}
HBSS-Hepes (Controle)	0.95	0.81	0	950μM
200μM	4.6	0	4.4	200μM
100μM	4.5	0	4.4	100μM
Nominaal	0	0	0	~10μM
DV-vrij	0	0	4.4	~0.1nM

Samenstelling SLDT buffer (pH 7.4)

Stof	Molariteit (mM)
NaCl	137
KCl	5.36
MgCl ₂	0.81
D-glucose	5.55
HEPES	25

Samenstelling SLDT solution

Stof	Molariteit (mM)
NaCl	137
KCl	5.36
MgCl ₂	0.81
D-glucose	5.55
HEPES	25
6-CF	0.4

Samenstelling PBS^{D+} (pH 7.4)

Stof	Molariteit (mM)
NaCl	137
KCl	2.68
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.90
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.334
KH ₂ PO ₄	1.47
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	6.46

Samenstelling Blotbuffer (voor 1 liter)

Stof	Hoeveelheid	Oorsprong
Methanol	200ml	VWR international
Tris	3.03g	Sigma-aldrich
Glycine	14.4g	Sigma-aldrich
20% SDS	1.75ml	Sigma-aldrich

Samenstelling Blokbuffer pH is 7.6

Stof	Hoeveelheid	Oorsprong
BSA 5%	10g	Sigma Aldrich
Tween20 0.1%	0.2mL	Sigma-Aldrich
Tris Buffered Saline (10x)	20mL	Sigma Aldrich

Samenstelling RIPA buffer (1mL)

Stof	Hoeveelheid	Oorsprong
Tris (pH 8.2)	25mM	Sigma-Aldrich
NaCl	50mM	VWR
NP40	0.5%	Sigma-Aldrich
Deoxycholaat	0.5%	Sigma-Aldrich
SDS	0.1%	Sigma-Aldrich
mini-EDTA free protease tablet in 1.5ml dH2O	20 µl/ml	Roche diagnostics
DTT	1µl/ml	Sigma-Aldrich
Standard fosfatase inhibitor 1	10µl/ml	Sigma-Aldrich
Standard fosfatase inhibitor 2	10µl/ml	Sigma-Aldrich

Samenstelling Running Gel 10%

Stof	Hoeveelheid
dH2O	15.9ml
30% polyacrylamide	13.3ml
Tris pH 8.8	10ml
10% SDS	0.4ml
10% APS	0.4ml
TEMED	16µl

→ 30min laten stollen bij KT

Samenstelling Stacking gel

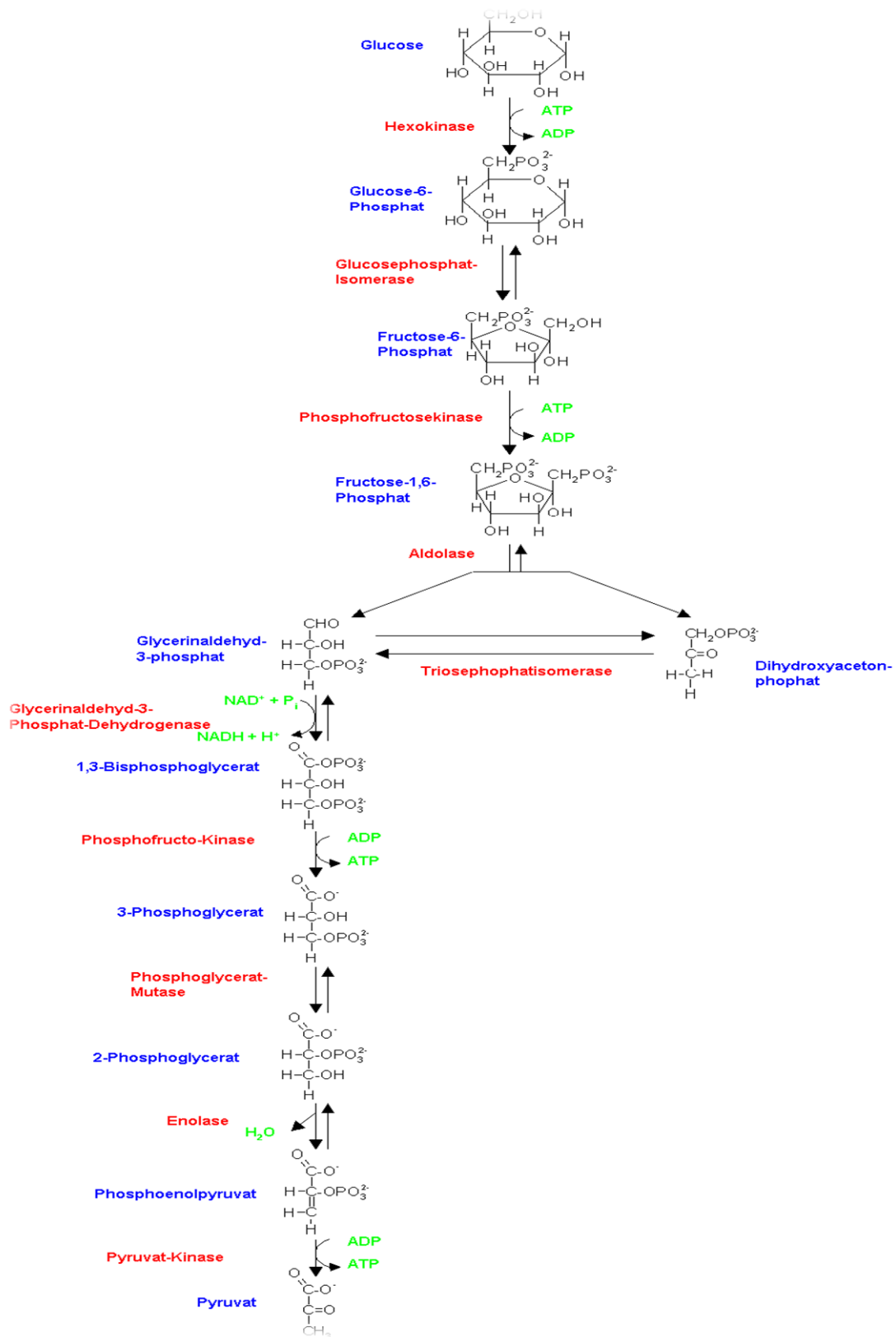
Stof	Hoeveelheid (ml)
dH ₂ O	6.8
30% polyacrylamide	1.7
Tris pH 6.8	1.25
10% SDS	0.1
10% APS	0.1
TEMED	0.01

→ 30min laten stollen bij KT

→ slotjes vullen met electroforesebuffer.

Tris-glycine running buffer (per 1 liter water)

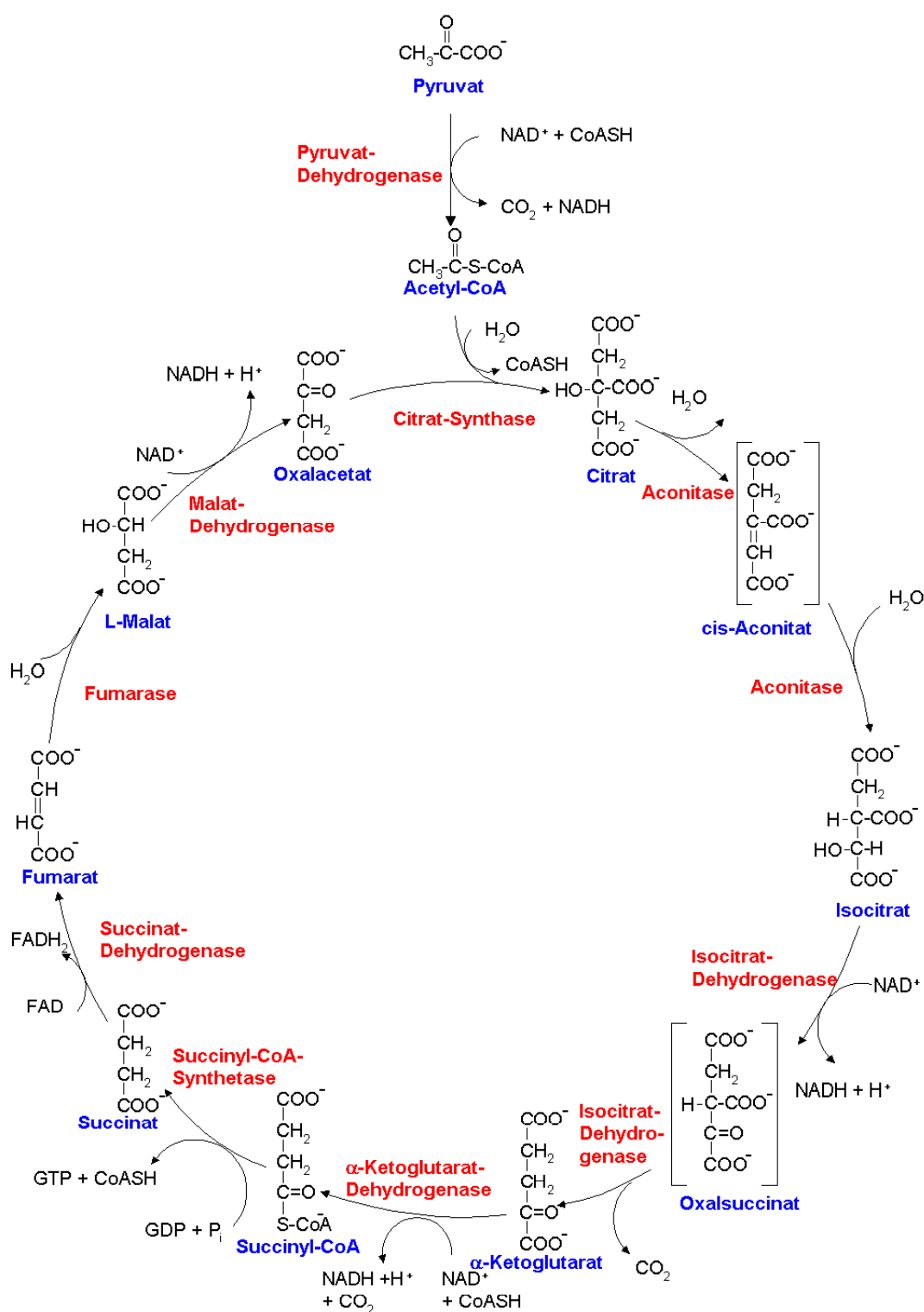
Stof	Hoeveelheid (g)
SDS	10
Tris	30.3
glycine	144.1



Overgenomen van:

<http://www.foerstner.org/konrad/bco/img/Glycolyse.png> door Konrad Förstner

Licentie: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/>



Overgenomen van:

<http://www.foerstner.org/konrad/bco/grundlagen/citratcyclus.html> door Konrad Förstner

Licentie: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/>