

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

**Einfluss von *Neisseria meningitidis* auf
Tight-Junctions in humanen mikrovaskulären
Hirndothelzellen (HBMEC)**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Florian Heinen
aus
Würzburg

Würzburg, Juli 2011

Referentin: Professor Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir

Korreferent: Professor Dr. Johannes G. Liese

Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2012

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Meningokokken-Meningitis - ein ernsthaftes Krankheitsbild.....	1
1.2 Klinische Präsentation der Meningokokkeninfektion.....	2
1.3 Pathogenese der Meningokokken-Meningitis.....	4
1.4 Die Blut-Hirn-Schranke.....	6
1.4.1 Struktureller Aufbau der Tight-Junctions.....	8
1.4.2 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke am Beispiel anderer Mikroorganismen.....	10
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	11
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Laborgeräte.....	13
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	14
2.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme.....	15
2.4 Oligonukleotide.....	18
2.5 Antikörper.....	18
2.6 Nährmedien für Bakterien.....	19
2.7 Nährmedien für HBMEC.....	19
2.8 Bakterienstämme und Zelllinien.....	20
2.9 Kultur von Zellen.....	20
2.9.1 Kulturbedingungen.....	20
2.9.2 Auftauen von Zellen.....	20
2.9.3 Splitten der Zellen.....	21
2.9.4 Einfrieren von Zellen.....	21
2.10 Infektionsversuche.....	21
2.10.1 Aussäen von Zellen	22
2.10.1.1 Gewinnung von DNA oder RNA.....	22
2.10.1.2 Gewinnung von Proteinen.....	22
2.10.1.3 Immunfluoreszenzversuche.....	22
2.10.1.4 Permeabilitätsversuche.....	23
2.10.2 Anzucht von Bakterien.....	23
2.10.3 Herstellung eines Infektionsmediums.....	23

2.10.4 Infektion der Zellen.....	23
2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.12 Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR).....	25
2.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	26
2.14 Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.15 Präparation von RNA aus HBMEC.....	27
2.15.1 RNA-Isolierung.....	27
2.15.2 Denaturierende Gel-Elektrophorese.....	27
2.15.3 DNA-Abbau.....	28
2.16 Reverse-Transkription.....	28
2.17 Präparation von Proteinen.....	29
2.17.1 Gewinnung von Proteinen aus HBMEC.....	29
2.17.2 Quantifizierung von Proteinen	29
2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.19 Western Blot.....	31
2.20 Immunpräzipitation.....	31
2.21 Immunfluoreszenzversuche.....	32
2.22 Permeabilitätsmessungen.....	33
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Bestimmung der Genexpression von Tight-Junction Proteinen.....	36
3.1.1 Isolation der RNA.....	36
3.1.2 Überprüfung auf verbliebene DNA und reverse Transkription.....	37
3.1.3 Mathematisches Modell zur Quantifizierung der Genexpression	38
3.1.4 Ergebnisse der QRT- PCR.....	39
3.1.5 Überprüfung der Spezifität des QRT-PCR-Produktes.....	39
3.2 Bestimmung der Proteinbildung von Occludin und ZO-1 in HBMEC mittels Western Blot.....	40
3.2.1 Nachweis von Occludin.....	41
3.2.2 Nachweis von ZO-1.....	43
3.3 Nachweis von Occludin durch Immunpräzipitation.....	43
3.4 Immunfluoreszenzversuche.....	45
3.4.1 Darstellung von ZO-1 und Occludin in uninfizierten HBMEC.....	46

3.4.2 Darstellung von ZO-1 und Occludin in infizierten HBMEC.....	46
3.4.3 Zusammenfassende Beurteilung der Immunfluoreszenzversuche...	47
3.5 Permeabilitätsmessungen.....	48
4. Diskussion.....	54
4.1 Erhöhung der Permeabilität des HBMEC-Monolayers durch eine Infektion mit <i>N. meningitidis</i>	54
4.2 Umverteilung von Occludin von den Zellgrenzen in das Zytoplasma	55
4.3 Abspaltung eines 50 kDa Fragments von Occludin durch <i>N. meningitidis</i>	56
4.4 Veränderung der Genexpression von Tight-Junction Proteinen.....	57
4.5 Permeabilitätserhöhung, Occludinspaltung- und Umverteilung sind MMP-8 abhängige Prozesse.....	58
4.6 Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke: Para- oder transzelluläre Passage?.....	60
4.7 Wie andere Mikroorganismen Endo- und Epithelbarrieren überwinden .	61
4.8 Hemmung von Matrixmetalloproteinasen: Eine Therapieoption?.....	63
5. Zusammenfassung.....	66
6. Literaturverzeichnis.....	67
7. Anhang.....	78
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	78
7.2 Tabellenverzeichnis.....	80
7.3 Abbildungsverzeichnis.....	80

1. Einleitung

1.1 Meningokokken-Meningitis - ein ernsthaftes Krankheitsbild

Neisseria meningitidis ist ein gramnegativer, häufig als Diplococcus vorliegender und ausschließlich humanpathogener Erreger einer bakteriellen Entzündung der weichen Hirnhäute. Erstmals beschrieben wurde er im Jahr 1884 durch Marchiafava und Celli [1]. Eine Isolierung aus dem Liquor gelang 1887 durch A. Weichselbaum, der ihn zunächst, aufgrund des häufigen intrazellulären Vorkommens, als *Diplococcus internus* bezeichnete [2]. Schätzungen der WHO gehen davon aus, dass es weltweit im Mittel der letzten zehn Jahre zu jährlich etwa 700.000 Erkrankungsfällen kam [3]. Eine Hospitalisierungsrate von weit über 90% und eine Mortalität von circa 7% verdeutlichen die Ernsthaftigkeit der Erkrankung. *N. meningitidis* wird anhand seiner Kapselantigene in bisher 13 bekannte Serogruppen unterteilt. Infektionen werden allerdings nur durch Stämme der Serogruppen A, B, C, W-135, Y und in letzter Zeit auch X [4] beobachtet.

Global betrachtet werden die meisten Infektionen durch die Serogruppe A, gefolgt von W-135, verursacht und ereignen sich in einem Gebiet der Subsahara, das sich vom Senegal bis nach Äthiopien erstreckt und als Meningitisgürtel bezeichnet wird. Hier kommt es in Abständen von 5 bis 10 Jahren zu großen Epidemien, während denen es zu einem starken Anstieg der Krankheitsfälle kommt [5]. Die Inzidenz der Meningokokken-Meningitis beträgt normalerweise 5-10/100.000 Einwohner und Jahr. Während einer Epidemie kann dieser Wert auf bis zu 1000 Erkrankungsfälle je 100.000 Einwohner ansteigen [6]. So erkrankten allein beispielsweise in den 1990er Jahren über 150.000 Menschen während einer ausgedehnten Epidemie [7]. Weitere Ausbrüche epidemischen Ausmaßes wurden aus Russland, China [8] sowie wiederkehrend während der Hajj in Saudi-Arabien [9] berichtet. In den entwickelten Ländern werden die meisten Erkrankungen durch die Serogruppen B und C verursacht. Epidemien ähnlicherer im Meningitisgürtel durch Serogruppe A waren bis vor dem Zweiten Welt-

krieg allerdings auch in Europa zu beobachten [10]. In Deutschland ist die Meningokokken-Meningitis seit dem Jahr 2001 meldepflichtig. Im Jahr 2008 wurden 452 Erkrankungsfälle an das Robert-Koch-Institut (RKI) gemeldet. Dies entspricht einer Inzidenz von 0,53/100.000 Einwohner. Vorwiegend betroffen sind dabei Kinder unter 5 Jahren. Mit einem Anteil von etwa 70% sind Erreger der Serogruppe B der häufigste Auslöser, gefolgt von denen der Serogruppe C mit 20-30% [11]. In Deutschland ist seit 2006 ein konjugierter Impfstoff gegen Serogruppe C Meningokokken Bestandteil der durch die ständige Impfkommission am RKI (STIKO) empfohlenen Impfungen für Säuglinge ab dem 1. Lebensjahr. Durch den zuvor bereits in anderen europäischen Ländern eingeführten Impfstoff konnte die Zahl der Serogruppe C Infektionen deutlich gesenkt werden, ohne dass es zu einem kompensatorischen Anstieg der Infektionen durch andere Serogruppen kam [12]. Es ist daher damit zu rechnen, dass dieser Trend zukünftig auch in Deutschland zu beobachten sein wird. Aufgrund der ausgesprochen niedrigen Antigenität der Kapselpolysaccharide der Serogruppe B ist es bisher nicht gelungen, gegen diesen Kapseltyp einen Impfstoff zu entwickeln. In der westlichen Bevölkerung sind annähernd 10% der Bevölkerung im Nasopharynx durch Neisserien besiedelt [13]. Eine besonders hohe Trägerschaft lässt sich dabei in der Gruppe der 15 bis 24 Jährigen (24-37%) [13] und unter kasernierten Soldaten (36-71%) finden [14]. Auch Faktoren wie eine Koinfektionen des Respirationstraktes mit anderen Erregern wie Mykoplasmen oder Influenzaviren, Rauchen, trockene und staubige Luft prädisponieren für eine Besiedelung [14] [15] [16]. Die Gründe, warum nur bei einem kleinen Teil der Träger die Krankheit zum Ausbruch kommt, sind weitestgehend unbekannt.

1.2 Klinische Präsentation der Meningokokkeninfektion

N. meningitidis wird per Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 1 und 14 Tagen [17]. Aufgrund der Fortschritte in der Behandlung durch Verwendung moderner Antibiotika konnte die Letalität von 75-90% im Jahr 1945 [18] auf etwa 7% [19] gesenkt werden. Deutlich höher liegt jedoch die Zahl derer, die nach einer überstandenen Infektion

ein neurologisches Defizit zurück behalten. So zeigten in einer Studie nur 53% der Kinder nach Meningokokkeninfektion eine Restitutio an integrum, während 16% ein leichtes, wie eine Hörminderung, und über 30% sogar eine erhebliches neurologisches Defizit, wie schwere Intelligenzminderung, zurück behielten [20]. Abhängig vom Erkrankungsalter kann das Bild der akuten Infektion mit *N. meningitidis* erheblich variieren. Als klassische Meningitis-Trias wird ein Symptomkomplex aus Fieber, Nackensteife und Bewusstseinstörung bezeichnet, der jedoch bei nur circa 27% der betroffenen Patienten beobachtet wird. Nimmt man jedoch das ebenfalls häufige Symptom Kopfschmerz hinzu, so zeigen Patienten in circa 95% zwei der vier Symptome [21]. Als diagnostisches bedeutsames Zeichen finden sich häufig Petechien, die am gesamten Körper und auch auf Schleimhäuten auftreten können. Systematische Analysen ergaben, dass 28-77% der Patienten bei Diagnosestellung Petechien aufweisen [22] [23]. Gefürchtet ist das Auftreten weiterer Komplikation wie die Ausbildung einer Hirnödems oder einer Vaskulitis mit nachfolgenden Infarzierungen. Diese zeigen sich neben einer Bewusstseinsminderung durch Symptome wie Krampfanfälle (8%) oder die Ausbildung eines fokal-neurologischen Defizits (33%) [19]. Bei etwa einem Drittel der Erkrankten beobachtet man einen septischen Verlauf der Erkrankung. Dieser wird häufiger durch Erreger der Serogruppe C verursacht und kann unbehandelt innerhalb weniger Stunden zum Tod führen. Auslöser ist die massive Freisetzung von Endotoxin und die damit verbundene Aktivierung des Komplementsystems mit der Ausbildung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC). Als Folge können sich Einblutungen in die Haut, Nebenniere, den Herzbeutel und andere Organe entwickeln (Waterhouse-Friedrichsen-Syndrom) [18]. Bei Säuglingen verläuft die Krankheit häufiger wenig typisch. So stehen Berührungsempfindlichkeit, Temperaturinstabilität, Störungen der Nahrungsaufnahme und Krampfanfälle im Vordergrund [24]. Hier treten Komplikationen wie Hydrocephalus, Taubheit, geistige Retardierung und Krampfanfälle besonders häufig auf und verlangen nach einer raschen Diagnosestellung und Therapie.

1.3 Pathogenese der Meningokokken-Meningitis

N. meningitidis ist ein ausschließlich für Menschen pathogener Keim. Dies erschwert es, die genauen pathogenetischen Vorgänge an einem Tiermodell zu untersuchen. Studien stützen sich daher auf Zellkulturmodelle sowie teilweise auch auf pathologische Untersuchungen von menschlichen Gewebeproben. Zunächst besiedelt *N. meningitidis* den Nasopharynx, überwindet dann die Schleimhautbarriere und gelangt auf diese Weise in den Blutstrom. Hier können sich Meningokokken vermehren, eine Sepsis auslösen oder die Blut-Hirn-Schranke überwinden und eine Meningitis verursachen.

Der erste Schritt in der Pathogenese ist die Adhäsion an Schleimhautzellen des Nasopharynx. Diese wird durch einen Kontakt des Typ IV Pilus mit dem CD46-Rezeptor vermittelt, wobei hierzu widersprüchliche Studienergebnisse vorliegen [25] [26]. Für ein Eindringen in menschliche Schleimhautzellen ist die Herunterregulierung der Polysaccharidkapsel ein nächster wichtiger Schritt. Es wird postuliert, dass durch die Präsenz der Kapsel wichtige für die Adhäsion und Invasion nötige Faktoren „maskiert“ werden, sodass dieser Schritt für bekapselte Erreger nahezu unmöglich ist [27] [28]. *N. meningitidis* verfügt hierfür über verschiedene Mechanismen. So unterliegt die Kapselexpression, wie auch andere Pathogenitätsfaktoren, der Phasenvariation. Durch „slipped-strand mispairing“ im *siaD*-Gen [29] oder Inaktivierung des *siaA*-Genes durch Insertion des Insertionselement IS1301 [29] kommt es zum Verlust der Kapselexpression. Auch eine Hochregulierung von *crgA* nach dem initialen Kontakt führt auf transkriptioneller Ebene zu einer Hemmung der Kapselbildung [30]. Nach Transzytose durch das Epithel gelangt der Erreger in die Blutzirkulation. Für das Überleben und die Replikation im Blut verfügen Meningokokken über verschiedene Schutzmaßnahmen. So ist die Reexpression einer Kapsel zum Schutz vor Phagozytose und Aktivierung des Komplementsystems von hoher Bedeutung [31]. Auch das bakterielle Endotoxin besitzt eine hemmende Wirkung auf Neutrophile und verringert die Wirkung des Komplementsystems [32] [33]. Zudem wird die alternative Aktivierung des Komplementsystems durch Expression des

Faktor-H Bindeproteins effektiv verhindert [34]. Zur Versorgung mit dem für den Erreger wichtigem Eisen sind Neisserien zudem mit eisenbindenden Proteinen ausgestattet, wodurch die Eisentransportproteine Transferrin und Lactoferrin aus dem Serum gebunden werden können [35].

Der für die Auslösung einer Meningitis entscheidende Schritt ist die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, welche von zerebralen Endothelzellen gebildet wird. Histologische Untersuchung an einem an einer Meningokokkeninfektion verstorbenem Säugling zeigten adhärenente Erreger sowohl an Endothelzellen der Meningen als auch an Zellen des Plexusendothels [36].

Auch für die Adhärenz an und Invasion in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke sind zahlreiche Faktoren bekannt. Im Gegensatz zu Epithelzellen können in Endothelzellen sowohl unbekapselte als auch bekapselte Erreger eindringen [37]. Auch hier findet der erste Kontakt zwischen Typ IV Pili und dem CD46 Rezeptor der Endothelzelle statt [38]. Der weitere Adhäsionsprozess wurde überwiegend an Endothel- aber auch an Epithelzellen untersucht. Neben den Pili sind die Außenmembranproteine Opa und Opc wichtige Interaktionspartner mit zellulären Strukturen des Empfängers. So binden sowohl Opa als auch Opc an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), welche mit Strukturen der extrazellulären Matrix interagieren, wodurch eine Internalisierung in Epithelzellen erreicht wird [39] [40]. Bei der Internalisierung in Endothelzellen kommt es zu einer Interaktion von Opc mit den Serumfaktoren Vitronectin und Fibronectin. Diese wiederum fungieren als eine Art Brücke, durch die eine Bindung an zelluläre Integrine ermöglicht wird. So konnten der $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor für die Bindung von Vitronectin über Opc und der $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor für die Bindung von Fibronectin über Opc identifiziert werden. Über Opa kommt es zu einer Interaktion mit CEACAM-1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1), welches zur Immunglobulinsupergruppe gehört [41]. Es konnte demonstriert werden, dass dieser Mechanismus für Adhäsion an und Invasion in Endothelzellen ein wichtiger Bestandteil ist [42]. Weitere Adhäsine, deren Interaktionspartner und Bedeutung noch weitestgehend unklar sind, sind NadA [43], MspA [44], NhhA [45], App [46] und das HrpA-HrpB System [47]. Getriggert

durch die Adhärenz werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die zunächst eine lokale Verlängerung der Mikrovilli der Endothelzelle bewirken. Anschließend kommt es zur Remodellierung des Zytoskeletts und einer Ausstülpung der Zellmembran, die die Erreger umschließt und schließlich internalisiert [48] [49] [50] [51]. Daher wurde überwiegend die These vertreten, dass *N. meningitidis* die Blut-Hirn-Schranke auf einem transzellulären Weg überwindet. Belegt wurde diese Annahme durch Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Meningokokken Epithelbarrieren ohne eine Veränderung der Zellkontinuität durchwandern und sich außerdem in humanen Hirnendothelzellen vermehren können [50] [52]. Andererseits wurden Meningokokken in einem anderen Zellkulturmodell auch zwischen den Zellen elektronenmikroskopisch nachgewiesen [53]. Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigte zudem, dass der initiale Typ IV Pilus-Kontakt zu einem Umbau des Zytoskeletts führt, wodurch der Erreger durch eine Art Filopodien umschlossen wird. Hierdurch kommt es zu einer Umverteilung von Tight- und Adherens-Junction Proteinen und schließlich zur Ausbildung von interzellulären Lücken mit konsekutivem Anstieg der Permeabilität des Endothelzellmonolayers [54].

Ob der entscheidende Schritt bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke die transzelluläre Passage oder ein parazellulärer Weg ist, ist weiterhin nicht völlig geklärt. Mangels Tiermodell ist zum besseren Verständnis der Interaktion von *N. meningitidis* und der menschlichen Blut-Hirn-Schranke die Zuhilfenahme von Zellkulturmodellen nötig. Das für diese Arbeit verwendete Modell besteht aus mikrovaskulären Endothelzellen, gewonnen und aufgereinigt aus dem menschlichen Cortex und mittels Simian Virus 40 large T-Antigen immortalisiert. Sie weisen für Hirnendothelzellen spezifische Eigenschaften hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Zelladhäsionsproteinen und Stoffwechseleigenschaften auf [55].

1.4 Die Blut-Hirn-Schranke

Bereits um 1880 entdeckte Paul Ehrlich, dass ein in die Blutzirkulation gegebener Farbstoff anschließend in allen Organen außer dem ZNS nachzuweisen ist [56]. Wenig später zeigte Edwin E. Goldman umgekehrt, dass in den Liquor ge-

gebene Farbstoffe ausschließlich das ZNS anfärben [57]. Somit war bewiesen, dass das zentrale Nervensystem vom Blutkreislauf durch eine im Organismus einmalige Barriere getrennt ist – die Blut-Hirn-Schranke. Erst in den 1960er Jahren zeigten verschiedene Arbeitsgruppen durch elektronenmikroskopische Studien, dass dem morphologischen Korrelat dieser Barriere das Endothel der Hirnkapillaren entspricht [58]. Diese Endothelzellen unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch in ihren biochemischen Eigenschaften von gewöhnlichen Endothelzellen, wodurch eine starke Abschirmung des ZNS von der Blutzirkulation erreicht wird. Dies dient einerseits dem Aufrechterhalten eines konstanten Milieus im ZNS, unabhängig von den wechselhaften Bedingungen des Blutes, und andererseits dem Schutz vor Übertritt von potenziell schädlichen Noxen aus dem Blut in das ZNS [59]. Den Endothelzellen nach abluminal angeschlossen ist, wie bei anderen Endothelien auch, eine Basalmembran, in die zahlreiche Perizyten eingebettet sind. Hieran schließt sich eine weitere Basalmembran an, welche je nach Abschnitt des Gefäßbaumes aus einer einzelnen Membran oder zwei Membranen (astrogliale und leptomeningeale Membran) und den Endfortsätzen umgebener Astrozyten gebildet wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Astrozyten dabei eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Endothelzellen hin zum spezialisierten Phänotyp der Hirnendothelzellen einnehmen [60]. Ob sie auch an der Aufrechterhaltung der eigentlichen Barrierefunktion beteiligt sind, ist bislang unklar. Die für die Barrierefunktion entscheidenden Endothelzellen zeichnen sich im Vergleich zu Endothelzellen von Gefäßen der übrigen Organe vor allem durch ihre hohe Anzahl an Zell-Zell-Verbindungen aus, welche sich aus Tight- und Adherens-Junctions zusammensetzen. Hierbei sorgen die Tight-Junctions für eine außergewöhnliche Abdichtung des Endothels gegenüber dem Gefäßlumen und die Adherens-Junctions für eine Verbindung der Zellen untereinander [61] [62]. Verglichen mit Endothelzellen anderer Gewebe weisen Hirnendothelzellen daher eine niedrigeren parazellulären Permeabilität auf, die sich auch in einem deutlich höheren elektrischen Widerstand von 1500–2000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ verglichen mit 3–33 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ in anderen Gewebetypen ausdrückt [63]. Zudem ist die pinozytische Aktivität und damit die transzel-

luläre Permeabilität, die sich in einer verminderten Zahl von intrazellulären Vesikeln zeigt, deutlich gemindert [64]. Aufgrund der mechanischen Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke ist eine freie Diffusion über die Barriere nur sehr eingeschränkt möglich. So können beispielsweise hydrophile Moleküle und korpuskuläre Blutbestandteile unter physiologischen Bedingungen kaum vom Blut in das ZNS übertreten. Zum Austausch von Ionen und Molekülen zwischen ZNS und Blutzirkulation sind Hirnendothelzellen daher mit einer Reihe von spezifischen Transportern, Kanälen und Enzymen ausgestattet, welche einen Austausch in beide Richtungen erlauben. So weisen diese Zellen zur Versorgung des ZNS eine besonders hohe Expression des Glukosetransporters GLUT1 und des Aminosäuretransporters LAT1 auf [65]. Auch existieren zahlreiche Transporter zur Abgabe von Stoffwechselprodukten – und damit auch potentiell neurotoxischen Substanzen aus dem ZNS, wie beispielsweise der organische Anionentransporter oder P-Glykoprotein [66].

1.4.1 Struktureller Aufbau der Tight-Junctions

Tight-Junctions bilden morphologisch gesehen den wichtigsten Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke und kommen in praktisch allen Endothelien vor, jedoch in deutlich höher Anzahl in Hirnendothelzellen. Bisher beschrieben sind die Proteine Occludin, die Gruppe der Claudine, das Junctional adhesion molecule JAM und das endothelial cell-selective adhesion molecule ESAM-1. Sie alle durchspannen die Endothelzellmembranen und verbinden sich extrazellulär mit dem entsprechenden Gegenpart der Nachbarzelle. Occludin war das erste beschriebene Tight-Junction Protein [67]. Es besitzt 4 Transmembrandomänen, die 2 extrazelluläre Loops bilden, wobei sich sowohl N- als auch C-Terminus intrazellulär befinden. Im Falle seiner Überexpression konnte ein erhöhter trans-epithelialer Widerstand (TEER) in Säugerzellen gemessen werden [68]. Interessanterweise führt das Fehlen nicht zu einer signifikanten Abnahme des TEER [69], wohl aber bei Occludin defizienten Mäusen zu zahlreichen morphologischen Veränderungen wie beispielsweise chronischen Darmentzündungen und Verkalkungen im Gehirn [70]. Occludin werden daher regulatorische Eigen-

schaften für die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zugeschrieben. So konnte auch gezeigt werden, dass bei Phosphorylierung von Occludin die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zunimmt und umgekehrt [71]. Über den C-Terminus interagiert Occludin entweder direkt oder über einen Zwischenweg über die Zona-occludens Proteine ZO-(1-3) mit Aktinfilamenten des Zytoskelettes [72]. ZO Proteine sind intrazellulär gelegene Interaktionspartner von Occludin aber auch von den Claudinen sowie Proteinen der Adherens-Junctions, zum Beispiel VE-

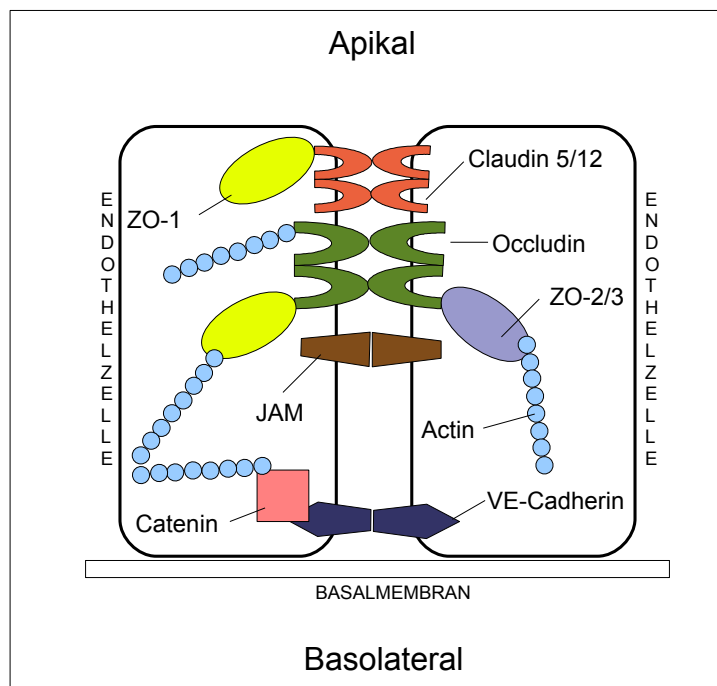


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Tight- und Adherens-Junctions

Cadherin. Sie besitzen wichtige regulatorische Eigenschaften mit signaltransduktiven Fähigkeiten, steuern den korrekten Aufbau der Tight-Junctions und verankern Tight- und Adherens-Junction Proteine mit dem Zytoskelett, wodurch eine höhere Stabilität erlangt wird [73] [74]. Zur Gruppe der Claudine gehören nach derzeitigem Stand 24 Mitglieder, wobei die Verteilung der einzelnen Claudine gewebespezifisch ist. So exprimieren Hirnendothelzellen beispielsweise Claudin-5 und Claudin-12 [75] [76]. Ihnen wird die Hauptfunktion der „Abdichtung“ des Endothels gegenüber dem Gefäßlumen zugeschrieben. Im Gegensatz zu Occludin führt ein Fehlen von Claudinen zwar zur Bildung von Tight-

Junctions, diese weisen jedoch einen erheblich niedrigeren TEER auf [77]. Im strukturellen Aufbau ähneln sich Occludin und die Claudine. Auch sie besitzen 4 Transmembrandomänen und gehen mit ihrem Gegenüber der Nachbarzelle eine feste Bindung ein. Über den C-Terminus gehen sie eine Bindung mit ZO-(1-3) ein, worüber eine Verbindung mit dem Zytoskelett besteht [78]. Junctional adhesion molecules (JAM a-c) besitzen eine Transmembrandomäne und kommen sowohl in Endothel- wie auch in Epithelzellen vor. Sie können sowohl homophile Bindungen als auch heterophile Verbindungen, zum Beispiel zu Integrinen der Nachbarzelle, eingehen. Die genaue Funktion der JAMs ist bislang nur wenig bekannt, sie scheinen aber eine Rolle bei der Lymphozytentransmigration über Endothelgrenzen zu spielen [79]. VE-Cadherin ist neben der Gruppe der Catenine das wichtigste Transmembranprotein der Adherens-Junctions. Es ist kalziumabhängig einerseits über eine Verbindung zum Zytoskelett für die Stabilität des Endothels mitverantwortlich und andererseits auch an der Regulation der vaskulären Permeabilität beteiligt [80]. In Abbildung 1 ist der Aufbau der Tight- und Adherens-Junctions und deren Interaktionspartner schematisch dargestellt.

1.4.2 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke am Beispiel anderer Mikroorganismen

Nur wenige Pathogene sind in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und somit eine Meningitis oder auch Enzephalitis auszulösen. Um dies zu erreichen, haben die Erreger unterschiedliche Methoden entwickelt: Die transzelluläre Passage durch Endothelzellen hindurch, die parazelluläre Passage durch Lösung der Zell-Zell-Verbindungen, oder als „Trojanisches Pferd“ innerhalb von Leukozyten. Eine transzelluläre Passage wird angenommen bei *Escherichia coli* K1 und *Streptococcus agalactiae*. Beide sind in der Lage, in HBMEC zu invadieren. Intrazellulär liegen sie in Vakuolen vor und verhindern eine lysosomale Prozessierung [81] [82]. Auch für *Candida albicans* [83] und *Cryptococcus neoformans* [84] wird die transzelluläre Passage postuliert. Eine parazelluläre Passage wird für Trypanosomen und Borrelien vorgeschlagen [85]. Im Falle der

Borrelien scheint die Aktivierung des fibrinolytischen Systems sowie Matrixmetalloproteinasen zur Degradierung der Zell-Zell-Verbindungen zu führen, wodurch der Erreger durch die entstanden parazellulären Lücken das ZNS erreichen kann [86]. Eine ähnliche Fähigkeit wird auch *Streptococcus pneumoniae* zugesprochen [87]. *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium tuberculosis* scheinen als „Trojanische Pferde“ innerhalb von Leukozyten die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wobei bei beiden Erregern auch eine transzelluläre Passage möglich erscheint [88] [89].

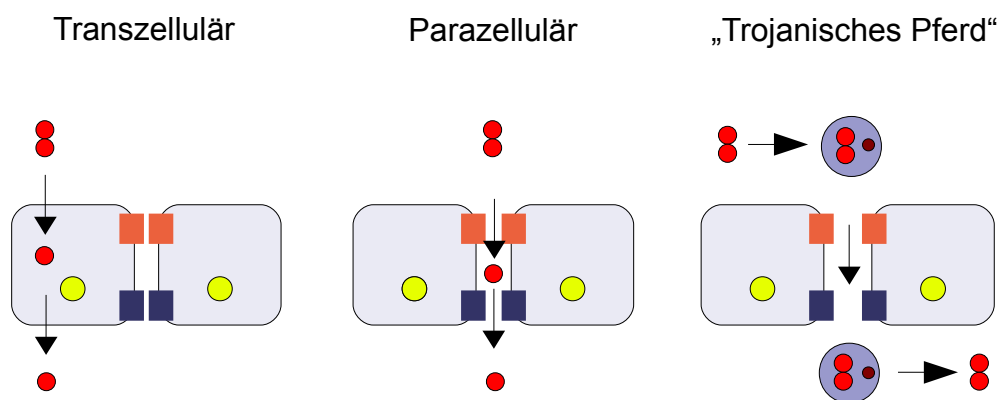


Abbildung 2: Mechanismen der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

In vorangegangenen Micorarray-Analysen am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg zeigte sich, dass die Infektion von humanen Endothelzellen mit *N. meningitidis* zahlreiche Änderungen der Genexpression in diesen Zellen hervorruft. Unter anderen wurden die Tight-Junction Proteine Claudin-12 und 14 nach vierstündiger Infektion in HBMEC vermindert exprimiert, ebenso wie das Adherens-Juction Protein Protocadherin-17 [90]. Hierdurch ergaben sich erste Hinweise, dass *N. meningitidis* im Stande ist, durch eine Alternierung der Zell-Zell-Verbindungen die Blut-Hirn-Schranke auf einem parazellulären Weg zu überwinden.

Zunächst sollten in dieser Arbeit die Ergebnisse der Microarray-Studie durch

quantitative Real-Time-PCR (QRT-PCR) als unabhängige Methode überprüft werden. Zusätzlich sollte die Regulation wichtiger am Aufbau der Tight- und Adherens-Junction beteiligten Proteine wie Claudin-5, Occludin, ZO-1 und Protocadherin-17 mittels QRT-PCR überprüft werden. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die auf transkriptioneller Ebene beobachteten Effekte auch ein Auswirkung auf die quantitative Proteinbildung haben. Dies sollte mittels Western Blot Analyse geschehen. Immunfluoreszenz-Untersuchungen sollten außerdem zeigen, ob eine Infektion von Endothelzellen mit Meningokokken Auswirkungen auf die Lokalisation von Tight-Junction Proteinen in der Zelle hat. Abschließend sollte geklärt werden, ob die beobachteten Veränderungen auch eine tatsächliche Auswirkung auf die Intaktheit der Blut-Hirn-Schranke zeigen. Hierfür wurde als vereinfachtes Modell für die Blut-Hirn-Schranke ein Permeabilitätsassay etabliert.

2. Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

Brutschränke	B 5060 EC-CO ₂ (Heraeus, Hanau) B 6200 (Heraeus, Hanau)
Elektrophoresekammern	Mini / Maxi Elektrophoresekammer (Roth, Karlsruhe) Sub-Cell® GT (Bio-Rad, München)
ELISA-Reader	Titertek Multiskan® MCC/340 (Labsystems, Vantaa, Finnland)
Filmentwickler	Curix 60 (Agfa, Mortsel, Belgien)
Filmkassette	Kodak X-Omatic regular (Kodak, Rochester, NY, USA)
Gel-Dokumentationssystem	CDM-1002 Monacor (Inter-Mercador, Bremen) Herolab E.A.S.Y 429 K / ICU-1 / UVT-28 MP / RH-5 (Herolab GmbH, Wiesloch) P93E (Mitsubishi, Kyoto, Japan)
Gelkammer (SDS-PAGE)	Minigel-Twin (Biometra, Göttingen)
Heizblöcke	2099-DA (Liebisch, Bielefeld) BT3 (Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK)
Koloniezähler	Colony Counter (Bio, Kobe, Japan)
Magnetrührer	MR 3001 (Heidolph, Schwabach)
Mikroskope / Software	Axio Imager.Z1 mit ApoTome / AxioVision (Carl Zeiss, Göttingen) Photoshop Version 7.0 (Adobe, Dublin, Irland) DM 6000 B / FW 4000 (Leica, Bensheim) TCS-4D / Scanware (Leica, Bensheim) Wilover® (Will-Wetzlar GmbH, Wetzlar)
PCR-Geräte	T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim)
pH-Meter	pH 530 (WTW, Weilheim i. OB)
Photometer	RNA/DNA Calculator GeneQuant pro (Biochrom, Cambridge, UK) U-2000 Spectrophotometer (Hitachi, San Jose, CA, USA)
Pipettierhilfe	Pipetus®-Akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
Schüttelinkubatoren	Certomat® H / R / U (B. Braun Biotech, Melsungen) G25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)

	Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Spannungsgeräte	Power Supply 1000/500 (Bio-Rad, München) Power Supply 3000Xi (Bio-Rad, München) PowerPac 300 (Bio-Rad, München)
Vakuumzentrifuge	Speed Vac® Plus SC 110 A (Savant, Holbrook, NY, USA)
Vortexer	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)
Waagen	P-1200 (Mettler, Gießen) Sartorius portable (Sartorius, Göttingen)
Wasserbäder	GFL 1003 (Gesellschaft für Labortechnik, Hannover) WB 22 (Memmert, Schwabach)
Werkbänke	Gelaire® BSB 6A (Flow Laboratories, Meckenheim) HERA safe (Heraeus, Hanau)
Western Blot Kammer	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München)
Zählkammer	Neubauer (Brand, Wertheim)
Zellaufschlussgerät	Fast Prep® FP120 (Savant, Holbrook, NY, USA)
Zentrifugen	Biofuge fresco (Heraeus, Hanau) Biofuge 15 (Heraeus, Hanau) Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau) Megafuge 1.0 R (Heraeus, Hanau) Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau)

Tabelle 1: Laborgeräte

2.2 Verbrauchsmaterialien

Ambion® Inc. RNA Company (Austin, TX, USA)	RNase-Free 1,5 ml Microfuge Tubes
Amersham Biosciences (Freiburg)	Hyperfilm® MP Röntgenfilm Quarzküvette GeneQuant (70 µl / 10 mm)
B. Braun Melsungen AG (Melsungen)	Einmalspritzen und Kanülen
Corning Life-Science (Amsterdam, Niederlande)	Transwell® 24 Well Multischalen
Eppendorf (Hamburg)	0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml Reaktionsgefäße
Greiner (Frickenhäusen)	1 ml / 2 ml / 5 ml / 10 ml / 50 ml Pipetten 15 ml / 50 ml Zentrifugenröhrchen
Knittel Gläser (Braunschweig)	Objektträger und Deckgläser
Nunc (Wiesbaden)	Immunoplate Maxisorp U 96 Well Platten Nunclon® 24 Well Multischalen
Pechiney Plastic Packaging (Darmstadt)	Parafilm "M"
Sarstedt (Nümbrecht)	Halbmikroküvetten

	S- Monovetten Blutentnahmekanülen Safety-Multifly Zellkulturflaschen 75 cm ²
Schleicher & Schuell (Dassel)	Faltenfilter Ø185 mm Gebrauchsfertige Sterilfiltereinheiten Gel-Blotting-Papier Protran® Nitrocellulose Transfer Membrane

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

2.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

AppliChem (Darmstadt)	Dimethylsulfoxid (DMSO)
Becton Dickinson (Heidelberg)	Bacto® Proteose Peptone
BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA)	Matrigel®
Biochrom AG (Berlin)	Instamed PBS Dulbecco (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺) Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺) FCS (fätales Kälberserum) RPMI 1640 (mit 2,0 g/l NaHCO ₃ und L-Glutamin) L-Glutamin Heparin Na-Pyruvat MEM-Vitamine PAO (Phenylarsenoxid)
bioMérieux (Marcy l'Etoile, Frankreich)	Fluoprep Polyvitex
Bio-Rad (München)	Magermilchpulver SDS-PAGE Standard, BroadRange
CellSystems® Biotechnologie Vertrieb, St. Katharinen	ECGS (Endothelzellwachstumsfaktor)
Eurogentec (Seraing, Belgien)	SmartLadder
ICN Biochemicals (Cleveland, OH, USA)	2-Mercaptoethanol
Invitrogen (Groningen, Niederlande)	dNTP für cDNA Synthese (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) Alexa Flour 488 Goat Anti-Mouse Alexa Flour 546 Goat Anti-Rabbit 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI
Merck (Darmstadt)	Ethidiumbromid Paraformaldehyd
Merck-Schuchhardt (Hohenbrunn)	Tween® 20
MP Biomedicals (Eschwege)	Sodium Dodecyl Sulfate, Ultra Pure (SDS)

New England Biolabs (Frankfurt/Main)	Bovines Serumalbumin (BSA) Taq DNA Polymerase ThermoPol Puffer 10x
Pierce Protein Research (Rockford, IL, USA)	Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit Pierce ECL Western Blotting Substrate
Promega (Madison, WI, USA)	dNTP für PCR (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
QIAGEN (Hilden)	Omniscript RT QIAquick® PCR Purification Kit RNeasy® Mini/Midi Kit QuantiTect SYBR Green PCR Kit
Riedel-de Haën (Seelze)	Triton® X-100
Roche Diagnostics (Mannheim)	DNase I, RNase-free Complete mini EDTA- free protease inhibitor
Roth, Carl GmbH (Karlsruhe)	Agarose NEEO Ultra-Qualität Ammoniumperoxodisulfat (APS) Glycerin Glycin Polyacrylamid 30% TEMED
Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)	Protein A/G PLUS-Agarose
SERVA (Heidelberg)	Gelatine
Sigma, St. Louis, MO, USA	FITC- Dextran (4 kDa, 40 kDa)

Tabelle 3: Von Herstellern bezogene Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

DEPC-H ₂ O (RNase-freies Wasser)	250 ml H ₂ O 250 µl DEPC Inkubation über Nacht bei 37°C 2x autoklavieren
Elektrophoresepuffer (SDS-Acrylamidgel-Elektrophorese)	4,8 g Tris 11,6 g Glycin 8 ml 10% SDS 800 ml H ₂ O
10 x Gelladungspuffer (Agarosegel-Elektrophorese)	50 % Glycerin 1 mM EDTA 0,4 % Bromphenolblau
10 x MOPS	0,4 M MOPS 0,1 M Natriumacetat 10 mM EDTA (pH 8,0) pH 7,0

	Lagerung lichtgeschützt		
Lysepuffer	1	%	Triton-X100,
	20	mM	Tris-HCl
	150	mM	NaCl
	0,1	%	SDS
	1	%	DCA (deoxycholic acid)
	5	mM	EDTA
	1	mM	Na ₃ VO ₄
	2	mM	PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride)
	50	µg/ml	Pepstatin
	50	µg/ml	Chymostatin
	50	µg/ml	Antipain
P-Puffer	10	mM	HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid)
	1	mM	Natrium-Pyruvat
	10	mM	Glukose
	3	mM	CaCl ₂
	145	mM	NaCl
	pH 7,4		
RIPA-2 Puffer	2,5	ml	Tris/ HCL 1 M (pH 7)
	1,5	ml	NaCl 5M
	1,25	ml	EDTA 0,2M (pH 8)
	0,5	ml	Triton X-100 1%
	0,5	g	Natriumdesoxychololat
	0,5	ml	SDS 10%
	0,105	g	NaF
	ad 50 ml H ₂ O, sterilfiltriert. Am Versuchstag in 10 ml Lösung von einer Tablette Complete mini EDTA-free protease inhibitor (Roche) und Zugabe von:		
	0,05	ml	Na ₃ VO ₄ 0,2 M (pH 10)
	0,05	ml	1,10-Phenanthroline-Monohydrat 1 M
5 x RNA Gelladungspuffer	5	ml	50% Formamid
	1,65	ml	2,2 M Formaldehyd
	500	µl	1 x MOPS
	1	ml	1/10 Volumen Ficoll 1-10%
	2	ml	0,02% Bromphenolblau
3 x SDS-Stopp-Puffer	200	mM	Tris-HCl (pH 6,7)
	15	%	Glycerin
	6	%	SDS

	0,03	%	Bromphenolblau
	10	%	2-Mercaptoethanol
10 x TAE	400	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	200	mM	Natriumacetat
	20	mM	EDTA (pH 8,0)
Western Blot Puffer	9,1	g	Tris
	43,5	g	Glycin
	2400	ml	H ₂ O
	600	ml	Methanol

Tabelle 4: Lösungen aus Eigenherstellung

2.4 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Beta-Actin	Sense	5'- GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG -3'
	Antisense	5'- AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG -3'
Occludin	Sense	5'- TAC ACA ACT GGC GGC GAG TCC -3'
	Antisense	5'- AAT CTG CAG ATC CCT TCA CTT GC -3'
Claudin-12	Sense	5'- ACC CCT CAG CAT GCT GAT CG -3'
	Antisense	5'- GAA GTC ATA AAC AGG CCC CCA -3'
Claudin-5	Sense	5'- GAC TAC GAC AAG AAG AAC TAC-3'
	Antisense	5'- GAA GCG AAA TCC TCA GTC TG -3'
Protocadherin-17	Sense	5'- GCA AGC AGA CAT TTC ACG GTG -3'
	Antisense	5'- TCA GTA GGT TTT CCT CGC TCC -3'
ZO-1	Sense	5'- GCT AAG AGC ACA GCA ATG GA -3'
	Antisense	5'- GCA TGT TCA ACG TTA TCC AT -3'

Tabelle 5: Oligonukleotide

2.5 Antikörper

Occludin	Mouse Anti-Occludin Klon 19 (BD Transduction Laboratories; San Jose, CA, USA) Rabbit polyclonal IgG, sc-5562 (Santa Cruz, CA, USA)
ZO-1	Rabbit Anti-ZO-1 Klon I19 (Santa Cruz, CA, USA)
Claudin-5	Rabbit Anti-Claudin 5, C15 (Santa Cruz, CA, USA)
Goat Anti-Mouse	Alexa Flour 488 Goat Anti-Mouse (Invitrogen,

	Groningen, Niederlande)
Goat Anti-Rabbit	Alexa Flour 546 Goat Anti-Rabbit (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Tabelle 6: Antikörper

2.6 Nährmedien für Bakterien

PPM-Medium (pH 7,8)	1,5	%	Proteose-Pepton
	0,5	%	NaCl
	0,05	%	Stärke
	0,4	%	KH ₂ PO ₄
	0,1	%	K ₂ HPO ₄
PPM+ (supplementiert)	0,01	M	MgCl ₂
	0,042	%	NaHCO ₃
	1	%	Polyvitex (v/v)
GC-Agar (pH 7,2)	1,5	%	Proteose-Pepton
	0,1	%	Stärke
	0,4	%	KPO ₄
	0,5	%	NaCl
	1,0	%	Bacto-Agar

Tabelle 7: Zusammensetzung der Nährmedien für Bakterien

2.7 Nährmedien für HBMEC

HBMEC Medium	RPMI 1640 (mit 2,0 g/l NaHCO ₃ und L-Glutamin)		
	10	%	FCS
	10	%	Nu-Serum
	2	mM	L-Glutamin
	5	U/ml	Heparin
	1	mM	Na-Pyruvat
	1	%	MEM-Vitamine
	30	µg/ml	ECGS
Einfriermedium (2x)	RPMI 1640 (mit 2,0 g/l NaHCO ₃ und L-Glutamin)		
	30	%	FCS
	20	%	DMSO

Tabelle 8: Zusammensetzung der Nährmedien für HBMEC

2.8 Bakterienstämme und Zelllinien

Neisseria meningitidis MC58

MC58 ist ein klinisches Isolat des ST-32 Komplexes aus Großbritannien (1983), klassifiziert B : 15 : P1.7,16 und zur Verfügung gestellt von E. R. Moxon.

Neisseria meningitidis MC58 siaD

Konstitutiv unbekapselte Mutante des klinischen Serogruppe B-Isolats MC58. Die Inaktivierung des für die α -2,8 Polysialyltransferase kodierenden *siaD* Gens erfolgte durch Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette mit Verlust der Fähigkeit zur Kapselexpression [37].

Human brain microvascular endothelial cells (HBMEC)

Mikrovaskulären Endothelzellen, gewonnen und aufgereinigt aus dem menschlichen Cortex und mittels Simian Virus 40 large T-Antigen immortalisiert [55]. Zur Verfügung gestellt von KS Kim.

2.9 Kultur von Zellen

2.9.1 Kulturbedingungen

HBMEC wurden in HBMEC Medium in 75cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Der Boden der Zellkulturflaschen wurde zur besseren Adhärenz der Zellen mit 0,2% Gelatine beschichtet. Der Zustand der Zellen wurde täglich lichtmikroskopisch kontrolliert.

2.9.2 Auftauen von Zellen

Die im Stickstofftank gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Nach Zugabe von 6 ml vorgewärmten FCS wurde die Suspension bei 1300 rpm 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 ml Nährmedium resuspendiert und eine mit Gelatine beschichtete 75 cm² Zellkulturflasche mit 15 ml HBMEC Medium gegeben.

2.9.3 Splitten der Zellen

Im Zwei- beziehungsweise Dreitagesrhythmus wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 auf neue 75 cm² Zellkulturflaschen aufgeteilt. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin/EDTA gelöst und anschließend in eine neue mit Gelatine beschichtete 75 cm² Kulturflasche mit Nährmedium überführt. Für die Versuche dieser Arbeit wurden Zellen zwischen der 10. und 25. Passage verwendet.

2.9.4 Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Zellen wurden diese bei -168°C gelagert. Nach Absaugen des Nährmediums und Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche mit 3 ml Trypsin/EDTA gelöst, bei 1300 rpm 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in vorgekühlten Einfriermedium resuspendiert. Die Lagerung erfolgte in Kryoröhrchen für einen Tag bei -80°C und anschließend bei -168°C im Stickstofftank.

2.10 Infektionsversuche

Allen Ergebnissen dieser Arbeit liegen Versuche zugrunde, denen das gemeinsame Prinzip der Infektion von HBMEC mit zwei verschiedenen Stämmen von *N. meningitidis* zugrunde liegt. Zur Untersuchung des Einflusses auf Tight-Junction Proteine und die Permeabilität des HBMEC-Monolayers wurden zunächst HBMEC in verschiedene Zellkultursysteme in definierten Konzentrationen ausgesät und anschließend für 2 bis 5 Tage kultiviert. Einen Tag vor dem Versuch wurden Meningokokken auf GC-Agarplatten kultiviert und aus diesen am Infektionstag eine Infektionslösung so hergestellt, dass auf eine Zelle des Zellkultursystems 10 Bakterien kamen (MOI 10). Für den Versuch wurden das Nährmedium von HBMEC abgesaugt, die Zellen 3 Mal in vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend die Infektionslösung auf das Zellkultursystem gegeben und im Brutschrank gelagert. Infektionen fanden in allen Versuchen für 4 und 8 Stunden statt, teilweise auch für 24 h. Nach der Infektionszeit wurde die

Infektionslösung entfernt und die Zellen vorsichtig 3 Mal mit PBS gewaschen, um alle überschüssigen, nicht adhärenen Bakterien zu entfernen. Um auszuschließen, dass das Infektionsmedium alleine einen Einfluss auf HBMEC hat, wurden zur Kontrolle bei allen Versuchen auch Zellen mit der Infektionsnährlösung ohne Zugabe von Bakterien versehen. Mit diesen Kontrollen wurde jeweils analog zu den infizierten Zellen verfahren. Abhängig von der Zielsetzung des Versuches wurde ab diesem Zeitpunkt unterschiedlich verfahren. Die einzelnen Schritte der Infektionsversuche sind im Folgenden beschrieben.

2.10.1 Aussäen von Zellen

Nach 2 Tagen Wachstum in 75 cm² Zellkulturflaschen wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst. Die Zellen wurden bei 1300 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Nährmedium resuspendiert. Abhängig von der Zielsetzung wurden die Zellen in verschiedene Zellkultursysteme überführt:

2.10.1.1 Gewinnung von DNA oder RNA

Hierfür wurden die Zellen aus einer 75 cm² Zellkulturflasche auf 3 neue, gelatinebeschichtete 75 cm² Zellkulturflaschen aufgeteilt und 10 ml HBMEC-Nährmedium hinzugefügt.

2.10.1.2 Gewinnung von Proteinen

Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde eine Zellzahl von 5×10^4 Zellen je ml Nährmedium hergestellt und jeweils 1 ml in jede Vertiefung einer mit Gelatine beschichteten 24-Well-Multischale gegeben.

2.10.1.3 Immunfluoreszenzversuche

Dies geschah analog des Protokolls für die Gewinnung von Proteinen, nur wurde in jede Vertiefung der 24-Well-Multischale ein mit Gelatine beschichtetes Glasdeckglas eingelegt und die Zellen hierauf gegeben.

2.10.1.4 Permeabilitätsversuche

Diese Versuche wurden mit einem Transwell-System mit einer Porengröße von 3 µm durchgeführt. Der Transwell-Filter wurde hierbei mit Gelatine, Kollagen oder Matrigel beschichtet. Anschließend wurde die untere Kammer mit 800 µl und die obere Kammer mit 200 µl Nährmedium befüllt. Nach 1 h wurde das Medium in beiden Kammern abgesaugt und 5×10^4 Zellen gelöst in 200 µl Nährmedium auf den Filter gegeben. Die untere Kammer wurde mit 800 µl Nährmedium befüllt.

2.10.2 Anzucht von Bakterien

Bei -80°C gelagerte Meningokokken wurden auf GC-Agar fraktioniert ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37° und 5% CO₂ inkubiert. Am Versuchstag wurde die 3. Fraktion mit einem sterilen Wattetupfer in 10 ml supplementiertes PPM-Medium überführt. Mittels photometrischer Bestimmung wurde eine Bakterienkonzentration von $0,1 \times 10^9$ je ml eingestellt, wobei einer optische Dichte (OD) von 1,0 bei 600 nm 10^9 Bakterien entsprechen. Nach 90 Minuten im Schüttelinkubator (37°C) wurde die Konzentration erneut überprüft, um sicherzustellen, dass sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase befinden.

2.10.3 Herstellung eines Infektionsmediums

Meningokokken in der logarithmischen Wachstumsphase wurden so in Infektionsmedium gelöst, dass die Anzahl der Bakterien die der HBMEC um den Faktor 10 überstieg (multiplicity of infection 10). Das Infektionsmedium bestand dabei aus RPMI 1640 und 10% humanem Serum, welches zuvor für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert wurde.

2.10.4 Infektion der Zellen

Nach 2 bis 5 Tagen Wachstum im Brutschrank wurde das Nährmedium von HBMEC entfernt und die Zellen 3 Mal mit vorgewärmten PBS gewaschen. Da-

nach wurde die Infektionslösung auf die Zellen gegeben und diese wieder im Brutschrank gelagert. Am Ende der Infektionszeit wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je nach Versuchsziel RNA, DNA beziehungsweise Proteine isoliert, Permeabilitätsmessungen durchgeführt oder mittels Immunfluoreszenz Zellstrukturen dargestellt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden alle Versuche dieser Arbeit mindestens 3 Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction) können gezielt einzelne Nukleinsäureabschnitte amplifiziert werden. Hierfür werden die Einzelstränge der DNA zunächst durch Hitze (95°C) voneinander getrennt (Denaturierung). Anschließend wird die Temperatur gesenkt, so dass sich Oligonukleotide von circa 20 Nukleotiden Länge, genannt Primer, komplementär an den zu vervielfältigenden Abschnitt der DNA anlagern (Annealing). Die hitzestabile *Taq* DNA-Polymerase kann nun bei 72°C die gebundenen Primer komplementär zur Matrize verlängern (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte lässt sich eine exponentielle Vervielfältigung des Ausgangsproduktes erreichen. Die Wahl der Primersequenz bestimmt dabei die Spezifität der Reaktion. Die Annealing-Temperatur eines Primers ergibt sich aus der Summe seiner Adenin- und Thyrosinbasen mal 2, plus die Summe seiner Cytosin- und Guaninbasen mal 4, abzüglich 4°C (Wallace-Regel).

Ansatz 50 µl

5 µl	ThermoPol Puffer 10x
2,5 µl	dNTP 4 mM
0,5 µl	Primer forward 100 pmol
0,5 µl	Primer reverse 100 pmol
0,25 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
40,75 µl	Wasser

Reaktionsablauf

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	5 Min	
Denaturierung	94°C	45 Sek	
Annealing	$T_m - 4^\circ\text{C}$	60 Sek	30 Zyklen
Elongation	72°C	60 Sek	
Finale Elongation	72°C	5 Min	
Kühlung	4°C	-	

2.12 Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR)

Ihr liegt das Prinzip der PCR zugrunde, wobei als Matrize (Template) aus mRNA synthetisierte cDNA dient. Hierdurch kann das Transkriptom einer Zelle auf vorhandene Gene überprüft werden. Zusätzlich wird der Reaktion der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green zugefügt, der in dsDNA interkaliert. Ist der Farbstoff in DNA eingelagert, ändert er sein Exzitations/Emissionsverhalten und kann somit photometrisch erfasst werden. Mit Fortschreiten der PCR erhöht sich die Menge dsDNA und damit die Intensität der Fluoreszenz, die am Ende jedes PCR-Zyklus gemessen wird. Somit ist über die Bestimmung der Fluoreszenz eine Aussage über die Menge des ursprünglich in der Probe befindlichen Ausgangsmaterials möglich, wodurch beispielsweise Aussagen über die Expression eines bestimmten Gens getroffen werden können.

Ansatz

10 µl	<i>Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR MasterMix 2x</i>
1 µl	Primer forward 100 pmol
1 µl	Primer reverse 100 pmol
6 µl	Wasser
2 µl	Template

Reaktionsablauf

Schritt	Temperatur	Zeit	Ramp	
Initiale Denaturierung	95°C	15 Min	20°C/s	
Denaturierung	94°C	15 Sek	20°C/s	
Annealing	50°C - 60°C	30 Sek	20°C/s	55 Zyklen
Extension	72°C	30 Sek	2°C/s	
Kühlung	20°C	-	-	

Nach Abschluss der Reaktion werden durch sukzessive Temperaturerhöhung alle entstandenen PCR-Produkte denaturiert und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Fällt die Fluoreszenz bei einem Temperaturpunkt in allen Proben rapide ab, ist in allen Proben ein Produkt mit derselben Basenpaarlänge entstanden, wodurch sichergestellt ist, dass es nur zur Bildung eines hochspezifischen Produktes kam. Die Reaktionsbedingungen und Primer wurden so angepasst, dass jeweils nur ein hochspezifisches Produkt entstanden ist.

2.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Dies geschah durch die photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Durch die Multiplikation der OD mit dem Verdünnungsgrad und einem für RNA beziehungsweise DNA spezifischem Faktor lässt sich die Konzentration errechnen. Zusätzlich wird die OD bei 280 nm bestimmt, da der Quotient $OD_{260/280}$ Aussagen über die Reinheit der Probe zulässt. Ein Quotient $> 1,7$ entspricht einem hohen Reinheitsgrad.

2.14 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Auftrennen von DNA Fragmenten anhand ihrer Größe wurde eine horizontale Gelelektrophoresekammer mit einem Agarosegel genutzt, wobei Agarosekonzentrationen von 0,8% bis 1% verwendet wurden. Die jeweilige Agarosemenge wurde in 1x TAE in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und nach Abkühlung auf ca. 60°C in einen Gelschlitten gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurden die zu untersuchenden Proben in Gelladungspuffer gelöst und ne-

ben der Smartladder, die als Größenmarker zum Vergleich diente, in die Taschen des Gels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei Spannungen zwischen 100 und 200 Volt bei Raumtemperatur. Zur Färbung der Fragmente wurde das Gel für 15 Minuten in ein Ethidiumbromidbad (350 µl / l H₂O) gelegt, unter UV-Licht betrachtet und fotografisch dokumentiert.

2.15 Präparation von RNA aus HBMEC

2.15.1 RNA-Isolierung

Hierfür wurde das *RNeasy Mini-Kit* von Qiagen verwendet. Es basiert auf einer Silikagel-Membran Säule, die RNA spezifisch zu binden vermag. Zunächst wurde nach der Infektion 10 ml Trypsin/EDTA für 10 Minuten auf die Zellen gegeben, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Nach Zentrifugation bei 1300 rpm, 5 Min wurde der Überstand verworfen und der Lysepuffer RLT auf die Zellen gegeben, der RNase deaktivierende Substanzen enthält. Das Lysat wurde in *FastRNA blue* Röhrchen überführt und für 45 s im *FastPrep* Zellaufschlussgerät homogenisiert. Nach kurzer Zentrifugation bei 5000 rpm wurde das Homogenisat auf die Säule aufgetragen und diese für 1 Min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde durch Zugabe der Puffer RPE und RW, welche zur Lösung von Kontaminationen mit beispielsweise Proteinen dienen, und anschließender Zentrifugation gewaschen und durch einen weiteren Zentrifugationsschritt getrocknet. Die Eluierung der RNA von der Säule erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt.

2.15.2 Denaturierende Gel-Elektrophorese

Zur Kontrolle der Qualität der gewonnenen RNA wurde diese unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die RNA in Ladungspuffer im Verhältnis 1:5 gelöst und für 15 Minuten auf 65°C erhitzt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografisch dokumentiert.

Zusammensetzung des Gels

1 g Agarose

5 ml MOPS 10x

72 ml DEPC H₂O

Aufkochen und auf 60°C abkühlen lassen. Danach Zugabe von

40 µl GITC 1 M

18,7 µl DEPC-H₂O

7,5 µl Ethidiumbromid

2.15.3 DNA-Abbau

Möglicherweise noch vorhandene DNA in der RNA-Probe wurde durch eine Behandlung mit DNase abgebaut.

Ansatz:

39 µl RNA-Lösung

5 µl Na-Acetat 1 M (DEPC behandelt)

5 µl MgSO₄ 50 mM (DEPC behandelt)

1 µl Roche DNase 1

Nach 60 Minuten bei 37°C wurden die Proben erneut wie in 2.15.1 beschrieben mit dem *Qiagen RNeasy Mini Kit* aufgereinigt. Mittels einer PCR (Primer β-Aktin) wurde die Abwesenheit von DNA gesichert.

2.16 Reverse-Transkription

Das Enzym Reverse Transkriptase ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase und ermöglicht die Synthese von cDNA ausgehend von einem RNA Template. Zunächst wurden 2 µg RNA in 12 µl DEPC-H₂O gelöst und zur Aufhebung von Sekundärstrukturen für 10 Minuten bei 65°C inkubiert.

Mastermix:

2 µl Buffert RT 10x

2 µl dNTPs

0,5 µl Random Nona-Primer

1 µl RNase Inhibitor

1,5 µl DEPC-H₂O

Ansatz:

12 µl RNA-Lösung
7 µl Master-Mix
1 µl *Omniscript RT*

Der Ansatz wurde bei 37°C für 90 Minuten inkubiert und anschließend zur Unterbrechung der Reaktion auf -20°C gekühlt. Die gewonnene cDNA wurde mit dem *DNA Purification Kit* von Qiagen aufgereinigt. Dieses Reaktionskit besitzt eine ähnliche Funktionsweise wie das in 2.15.1 beschriebene *RNeasy Mini Kit*, mit dem Unterschied, dass eine Säule verwendet wird, die spezifisch DNA bindet. Die Konzentration der cDNA wurde anschließend photometrisch bestimmt.

2.17 Präparation von Proteinen

2.17.1 Gewinnung von Proteinen aus HBMEC

Nach dem Waschen den Zellen wurden diese mit 100 µl gekühltem Lysepuffer versehen, welcher neben denaturierendem SDS auch mehrere Breitbandproteinaseninhibitoren zur Verhinderung eines weiteren Proteinabbaus enthält, und mit einem Zellschaber vom Boden der Wellplatte gelöst. Das Lysat wurde mehrfach auf- und abpipettiert, um die Lyse der Zellen zu unterstützen.

2.17.2 Quantifizierung von Proteinen

Ein modifizierter Bradford-Assay diente zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen des Lysats. Er basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine, wodurch es zu einer Verschiebung des Extinktionsmaximums von 465 nm nach 595 nm kommt.

Versuchsansatz:

1 µl Proteinlösung
49 µl Wasser
200 µl Bradfordreagenz (Pierce Coomassie Protein Assay)

Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden in einem ELISA-Reader die OD bei 590 nm und 450 nm gemessen, der Quotient $OD_{590/450}$ bestimmt, mit dem einer Eichlösung verglichen und daraus die Konzentration errechnet.

2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im Polyacrylamidgel lassen sich Proteine anhand ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld auftrennen. Um eine Trennung alleine anhand der Größe zu gewährleisten, werden die Proben, das Gel und der Laufpuffer mit SDS versehen, das an Proteine bindet und mit seinen stark negativen Ladungseigenschaften die Eigenladung der Proteine zu maskieren vermag. Zur Verbesserung der Auftrennung der Proteine wurden zweischichtige Gele mit einem Sammel- und einem Trennbereich hergestellt. Die Polyacrylamidkonzentration des Trennbereichs variierte je nach aufzutrennendem Bereich von 9 bis 15%.

Zwischen 2 Glasplatten wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit Propanol beschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Propanol mit fließendem Wasser entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm versehen. Die Proben wurden neben einem Größenmarker nach kurzen Aufkochen aufgetragen und mit 80 V für das Sammelgel und 130 V für das Trenngel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Sammelgel vom Trenngel getrennt.

Zusammensetzung der Gele:

<u>Trenngel 9%</u>		<u>Sammelgel 3%</u>	
12,6 ml	H ₂ O	8,16 ml	H ₂ O
6,75 ml	Polyacrylamid 30%	1,13 ml	Polyacrylamid 30%
2,82 ml	Tris/HCl (pH 8,9) 3 M	1,41 ml	Tris/HCl (pH 8,9) 3 M
225 µl	10% SDS	112,5 µl	10% SDS
11,25 µl	TEMED	5,63 µl	TEMED
225 µl	APS 10%	225 µl	APS 10%

2.19 Western Blot

Durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern ist es möglich, gezielt einzelne Proteine darzustellen. Hierzu werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, mit einem Antikörper inkubiert und mit einem weiteren Antikörper detektiert. Zur Detektion des zweiten Antikörpers dient die an ihn gekoppelte Peroxidase (HRP), die unter alkalischen Bedingungen das Chemolumineszent Substrat Luminol oxidiert, wodurch es zu einer Lichtemission bei 428 nm kommt. Mithilfe eines Röntgenfilms kann diese Emission erfasst werden. Umhüllt mit Filterpapier wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und unter einer Spannung von 15 V für 20 Minuten in einer Blottingkammer auf diese übertragen. Die Membran wurde mehrfach mit PBS/0,05% Tween20 gewaschen und anschließend mit PBS/5% Magermilchpulver für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in PBS/3% Magermilchpulver mit einer Verdünnung der Antikörpers von 1:50 (Occludin, Claudin-5), 1:80 (ZO-1) und 1:100 (Actin). Die Membran wurde erneut 3 Mal mit PBS/0,05% Tween20 gewaschen und mit dem 2. Antikörper, der gegen den 1. Antikörper gerichtet und mit HRP konjugiert ist, in PBS/3% Magermilchpulver mit einer Verdünnung von 1:2000 für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach erneuten Waschen wurde die Membran für 1 Minute mit *ECL Western Blotting Substrate* versehen, welches Luminol enthält. Die Membran wurde mit Klarsichtfolie umhüllt und in der Dunkelkammer in einer Röntgenfilmkassette auf einen Röntgenfilm gelegt. Anschließend wurde der Film entwickelt und am Computer gescannt.

2.20 Immunpräzipitation

Durch diese Methode ist es möglich unter Verwendung spezifischer Antikörper ein einzelnes Protein aus einer Lösung, in diesem Falle eines Zelllysates aus HBMEC, aufzureinigen und anschließend im Western Blot darzustellen. HBMEC wurden hierfür, wie in 2.10.1.2 beschrieben, ausgesät, für 4 Tage im

Brutschrank inkubiert und danach infiziert. Nach Absaugen des Infektionsmediums wurden die Zellen 3 Mal mit PBS 4°C gewaschen und mit RIPA-2 Puffer, welcher neben Proteaseinhibitoren Triton-X 100 und SDS enthält, lysiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von Boden gelöst, mehrmals auf- und abpipettiert und danach für 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C, 13000 rpm, 30 Minuten, wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und 1 µg Anti-Occludin Antikörper hinzugegeben. Zusätzlich wurde 20 µl Protein A/G Plus Agarose hinzugefügt. Durch die in dieser Lösung vorhandenen Proteine A und G, welche an Agarosepartikel gebunden sind und spezifisch an die Fc-Region von Säugetier-Antikörper binden, findet über den zuvor hinzugegebenen Anti-Occludin Antikörper die Bildung eines Komplexes aus Occludin, welches über den Anti-Occludin Antikörper an Protein G und A gebunden ist, und den Agarosepartikel statt. Dieser Komplex lässt sich anschließend über Wasch- und Zentrifugationsschritte aus dem Zelllysat aufreinigen und so deutlich konzentrieren. Zunächst wurde der Komplex über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurde für 5 Minuten und 3000 rpm zentrifugiert und das Pellet, in welchem sich der Agarose-Occludinkomplex befindet, mit PBS und Proteaseinhibitoren gewaschen und erneut auf gleiche Weise zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Proteinprobenpuffer (2X) aufgenommen, die Proteinmenge bestimmt (2.17.2), kurz aufgeköcht und Occludin im Western Blot wie in 2.19 beschrieben dargestellt.

2.21 Immunfluoreszenzversuche

Um die Tight-Junction Proteine Occludin und ZO-1 unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurden entsprechende Antikörper verwendet und diese mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern detektiert.

5x10⁴ HBMEC wurden entsprechend 2.10.1.3 kultiviert und für 4 und 8 Stunden infiziert. Nach dem Waschen der Zellen wurde diese durch die Zugabe von 300 µl PBS/3,7% Paraformaldehyd für 20 Minuten auf dem eingelegten Glasplättchen fixiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung mit 300 µl PBS/0,5% Triton-X 100 für 10 Minuten bei RT. Nach einem erneuten

Waschvorgang wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe eines Blocking-Puffers (BB), bestehend aus PBS/1% BSA/2% FCS, gesättigt. Nach 20 Minuten wurde der Blocking-Puffer entfernt und die Proben mit rabbit Anti-ZO-1 Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 in Blocking-Puffer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und mit mouse Anti-Occludin, 1:150 in Blocking-Puffer, über 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Dieser wurde mittels PBS Waschschriffe abgewaschen und die Zellen mit Alexa-Fluor 546 anti-rabbit, 1:200 in BB, 20 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation unter gleichen Bedingungen mit Alexa-Fluor 488 anti-mouse. Zur Darstellung der Zellkerne wurde dem letzten Waschschriff DAPI in einer Konzentration von 1:50.000 zugesetzt. Die Glasdeckgläser wurden aus den Vertiefungen genommen, an der Luft bei RT getrocknet und mit Floupprep auf einen Objektträger fixiert. Die Präparate wurden unter dem Mikroskop unter Verwendung entsprechender Filter betrachtet, mit Zeis AxioVison fotografiert und die Bilddateien anschließend mittels Adobe Photoshop bearbeitet.

2.22 Permeabilitätsmessungen

Um zu untersuchen, ob sich eine Infektion mit *N. meningitidis* auf die Permeabilität des HBMEC-Monolayers auswirkt, wurde ein Permeabilitätsassay etabliert. Hierzu wurde das Transwell-System mit einer Porengröße von 3 µm verwendet. Wie in Abbildung 3 gezeigt, ist es durch dieses System möglich, die Vertiefung einer Multischale in ein apikales und eine basales Kompartiment zu trennen. Dabei dient der Transwell-Filter mit den auf ihm wachsenden HBMEC als Barriere zwischen den beiden Kammern. Als Indikator für die Permeabilität wurde der Durchtritt von FITC-Dextran von der oberen in die untere Kammer gemessen.

Da bislang noch keine Versuchsanordnung zur Messung der Permeabilität eines HBMEC-Monolayers in Reaktion auf *N. meningitidis* etabliert war, mussten zunächst geeignete Versuchsbedingungen entwickelt und getestet werden. Das Aussäen der Zellen geschah wie in 2.10.1.4 beschrieben. Neben der in den übrigen Versuchen verwendeten Gelatine zur Adhärenz der Zellen wurden auch

eine Kollagenmischung sowie Matrigel in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. HBMEC wurden anschließend für verschieden lange Zeiten im Brutschrank inkubiert, um den optimalen Versuchszeitpunkt zu ermitteln. Nach dem Wachstum wurde das HBMEC-Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10^6 (MOI 10) Meningokokken in 200 μ l Infektionsmedium infiziert. Die untere Kammer wurde mit 800 μ l RPMI 1640 und 10% humanem Serum befüllt. In die obere Kammer wurde zusätzlich FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 40 kDa und 4 kDa gegeben, so dass die Konzentration in der oberen Kammer 1 mg/ml betrug. Nach definierten Zeitabständen wurden aus der unteren Kammer 50 μ l entnommen, in 950 μ l PBS gelöst, und 100 μ l in die Vertiefung einer 96 Well-Platte gegeben. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem automatischen ELISA-Reader mit einer Exzitation von 485 nm und Emission von 535 nm.

Alternativ wurden die Zellen durch Zugabe von 200 μ l Infektionsmedium infiziert und nach Ablauf der Infektionszeit der Transwell-Einsatz aus der Vertiefung ge-

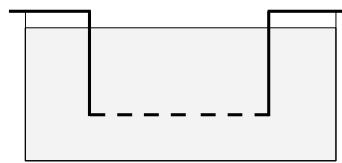
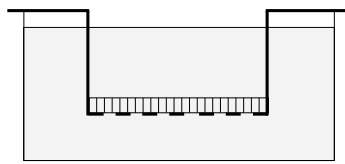
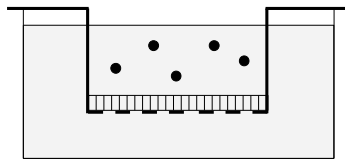


Abbildung 3: Versuchsaufbau der Permeabilitätsmessungen. Ein Transwell-Filter wird in die Vertiefung einer Multischale gegeben. Es entsteht ein apikales und ein basolaterales Kompartiment. Ein Austausch ist nur durch Passage des Filters möglich.

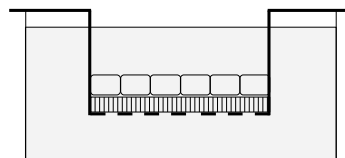
nommen. Anschließend wurden der Einsatz in eine mit P-Puffer gefüllte Vertiefung überführt und weitere 200 μ l P-Puffer auf die Zellen gegeben. Nach 20 Minuten wurde in die oberer Kammer FITC-Dextran 4 oder 40 kDa mit einer Endkonzentration mit 1 mg/ml in der oberen Kammer gegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde aus der unteren Kammer 50 μ l entnommen und die Messung im ELISA-Reader wie oben beschrieben vorgenommen. Abbildung 4 zeigt den Versuchsaufbau schematisch.



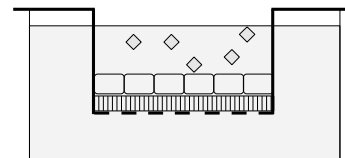
Zur verbesserten Adhärenz wird der Filter mit Matrigel, Kollagen oder Gelatine beschichtet



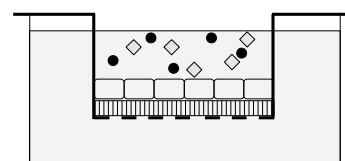
Durch Bestimmung der Transmigrationsrate wurde die Beschichtung so angepasst, dass eine Passage von Meningokokken durch den Filter möglich ist



Auf dem Filter werden HBMEC ausgesät. Der Austausch zwischen den Kompartimenten ist nur durch Passage von HBMEC und Filter möglich



Zur Überprüfung der Barrierefunktion wurde der FITC-Dextran Fluss vom apikalen in das basolaterale Kompartiment nach verschiedenen langen HBMEC-Wachstumsphasen bestimmt



Nach Etablierung der Versuchsbedingungen wurden Meningokokken in die apikale Kammer gegeben und der Durchfluss von FITC-Dextran vom apikalen in das basolaterale Kompartiment bestimmt

Abbildung 4: Versuchsaufbau zur Etablierung des Permeabilitätsassays

- Meningokokken ◇ FITC-Dextran 4, bzw. 40 kDa
- HBMEC □ Beschichtung des Filters (Gelatine, Kollagen oder Matrigel)

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Genexpression von Tight-Junction Proteinen

3.1.1 Isolation der RNA

Um die Genexpression von Tight- und Adherens-Junction Proteinen zu untersuchen wurden HBMEC mit den Meningokokkenstämmen MC58 oder MC58 *siaD* für 4 und 8 Stunden infiziert. Um auszuschließen, dass das Infektionsmedium bereits einen Einfluss auf die Genexpression hat, wurden zur Kontrolle HBMEC ohne die Zugabe von Bakterien mit Infektionsmedium für 4 und 8 Stunden versehen. Nach der Infektion wurde aus den infizierten Zellen und den Kontrollen die RNA isoliert und ihre Qualität mittels denaturierender Gelelektrophorese überprüft. Abbildung 5 zeigt exemplarisch aus HBMEC gewonnene und aufgereinigte RNA in einer Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Dabei bildet die RNA zwei prominente Banden mit einer Länge von 1250 Bp und 3500 Bp, entsprechend der 18 und 28 S rRNA.

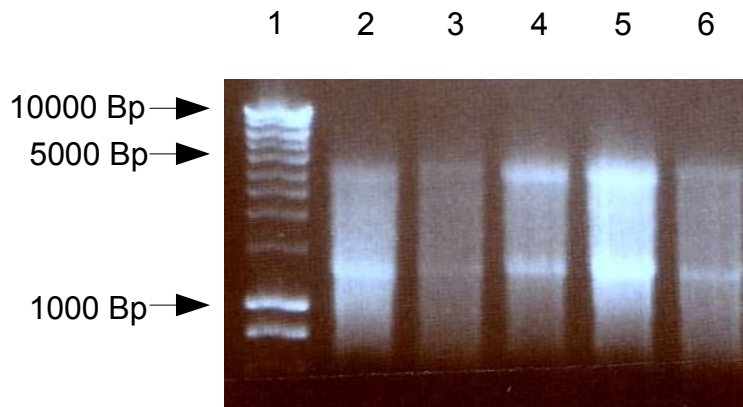


Abbildung 5: Denaturierende Gelelektrophorese von RNA Proben aus HBMEC. Spur 1: Smartladder; Spur 2: Uninfizierte HBMEC; Spur 3: Infektion MC58 4h; Spur 4: Infektion MC58 8h; Spur 5: Infektion MC58 *siaD* 4h; Spur 6: Infektion MC58 *siaD* 8h

3.1.2 Überprüfung auf verbliebene DNA und reverse Transkription

Durch die anschließende Inkubation mit DNase wurde mögliche verbleibende DNA abgebaut. Die Abwesenheit von DNA wurde durch eine PCR überprüft.

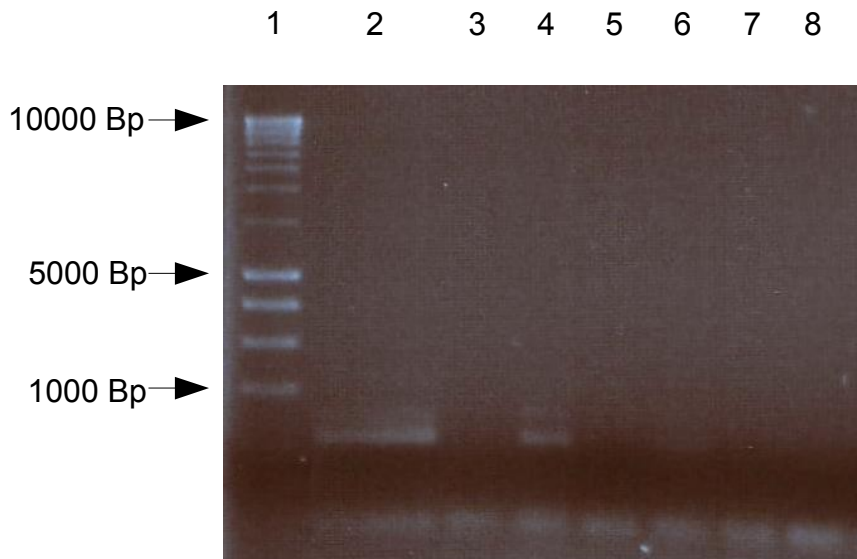


Abbildung 6: Test auf DNA durch Gelelektrophorese nach erfolgter PCR. Spur 1: Smartladder; Spur 2: HBMEC-DNA; Spur 3: Wasser; Spur 4: RNA vor DNase-Behandlung; Spur 5: Infektion mit MC58 4h; Spur 6: Infektion mit MC58 8h; Spur 7: Infektion MC58 *siaD* 4h; Spur 8: Infektion mit MC58 *siaD* 8h

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis einer PCR mit Primern für das Houskeeping-Gen beta-Aktin, bei der 1 µg RNA als Template verwendet wurde. Da bei diesem Versuch weder beim Einsatz von Wasser als Template, noch bei den mit DNase behandelten Proben ein PCR-Produkt entstand, gleichzeitig aber bei einem DNA-Template und bei nicht DNase behandelten Proben ein Produkt nachzuweisen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die behandelten Proben frei von DNA, bei korrekt funktionierender PCR, sind.

Im nächsten Schritt wurde die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die aufgereinigte cDNA diente nach Bestimmung der Konzentration als Template für die QRT-PCR.

3.1.3 Mathematisches Modell zur Quantifizierung der Genexpression

Für die Quantifizierung einer veränderten Genexpression wurde das Protokoll nach Pfaffl genutzt [91]. Hierbei wird die Intensität der Fluoreszenz, die das Hintergrundrauschen signifikant übersteigt, als Crossing-Point (CP) bezeichnet. Über die Angabe des Zeitpunktes während der PCR, zu dem eine Probe den Crossing-Point erreicht, ist eine Aussage über die Menge des in dieser Probe vorhandenen Templates möglich. Zur Errechnung der Veränderung der Genexpression eines untersuchten Genes (target) wird die Differenz der Crossing-Points zwischen einer Kontrolle (control), in diesem Fall cDNA aus uninfizierten Zellen, mit einer Probe (sample), hier cDNA aus infizierten Zellen, gebildet ($\Delta CP_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})$). Zur Berechnung der Effizienz (E_{target}) der PCR wurden von jeder Probe mindestens 4 Verdünnungsstufen des Templates, beispielsweise 1, 10, 50 und 100 ng, gebildet. Aus Verhältnis der Menge des cDNA-Templates und den jeweiligen CPs der Proben ergibt sich eine lineare Korrelation, welche sich grafisch als Steigung (slope) darstellen lässt. Es ergibt sich nach dem Protokoll $E_{\text{target}} = 10^{(-1/\text{slope})}$. Die Genexpression des untersuchten Genes wird als relative Expression im Verhältnis mit einem Referenzgen (ref) ausgedrückt. Verwendet hierfür wurde beta-Aktin, welches als Housekeeping-Gen auch nach einer Infektion keiner veränderten Expression unterliegt, was zuvor mit einer unabhängigen Methode bestätigt wurde. Auch für das Referenzgen wurden Verdünnungsstufen zur Bestimmung von E_{ref} , sowie ein Vergleich der CP in uninfizierten und infizierten Proben $\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})$ angestellt. Für der Errechnung der Regulierung der Genexpression des untersuchtes Genes (ratio) ergibt sich somit:

$$\text{ratio} = \frac{E_{\text{target}}^{(\Delta CP_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample}))}}{E_{\text{ref}}^{(\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample}))}}$$

Als signifikant wurde dabei ein Wert von ratio > 1,5 gewertet.

3.1.4 Ergebnisse der QRT-PCR

	MC58		MC58 <i>siaD</i>	
	4h	8h	4h	8h
Claudin-5	0,61 ± 0,21	0,66 ± 0,24	0,3 ± 0,12	0,73 ± 0,13
Claudin-12	2,01 ± 0,09	3,67 ± 0,56	2,19 ± 0,27	4,28 ± 1,42
Protocadherin-17	0 ± 0,65	1,74 ± 0,38	0,4 ± 0,10	1,01 ± 0,06
Occludin	1,65 ± 0,33	3,3 ± 0,34	3,1 ± 0,74	7,1 ± 2,57
ZO-1	0,9 ± 0,05	1,0 ± 0,03	0,99 ± 0,16	0,89 ± 0,02

Tabelle 9: Ergebnisse der QRT-PCR. Veränderung der Genexpression wichtiger am Aufbau der Tight-Junctions beteiligter Proteine nach Infektion von HBMEC durch die Neisserienstämme MC58 sowie MC58 *siaD* nach 4 und 8 Stunden. Werte >1,5 werden dabei als differentiell reguliert angesehen

Claudin-5 stellte sich zu keinem Zeitpunkt durch eine Infektion als differentiell reguliert heraus. Claudin-12 erwies sich nach 4 Stunden Infektionszeit leicht und nach 8 Stunden in höherem Maße als reguliert. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Bakterienstämmen konnten nicht ermittelt werden. Eine Veränderung der Expression von Protocadherin-17 konnte nach 8 h Infektionszeit mit MC58, nicht aber mit seiner unbekapselten Mutante festgestellt werden. Occludin wurde nach 4 Stunden und stärker nach 8 Stunden in seiner Expression verändert. Dies geschah beim Stamm MC58 *siaD* in circa zweifach so hoher Ausprägung im Vergleich zu MC58. Die Expression von ZO-1 wurde durch eine Neisserieninfektion nicht beeinflusst.

3.1.5 Überprüfung der Spezifität des QRT-PCR-Produktes

Um sicherzustellen, dass bei jeder PCR nur ein spezifisches Produkt entstanden ist, wurden von jedem Produkt Schmelzkurven wie in 2.12 beschrieben erstellt. Exemplarisch ist in Abbildung 7 die Schmelzkurve des PCR-Produkts von Claudin-12 gezeigt.

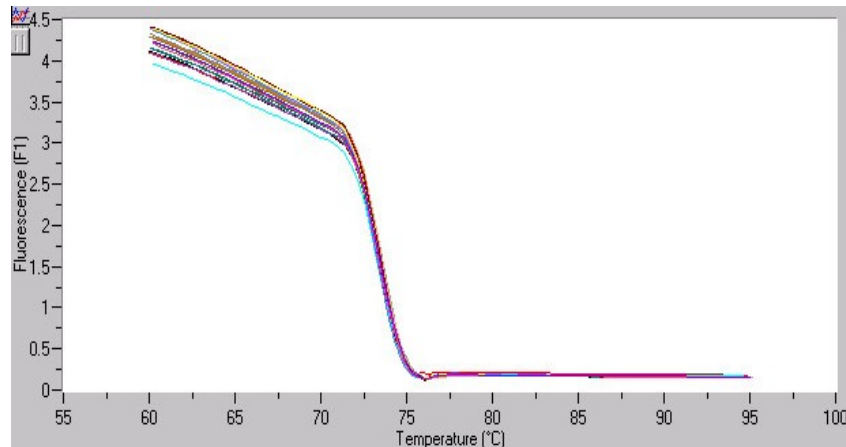


Abbildung 7: Schmelzkurve des PCR-Produkts von Claudin 12. Jede der Linien steht für eine PCR-Probe. Bei etwa 72°C kommt es in allen Proben zu einem deutlichen Abfall der Fluoreszenz. Es muss daher in allen Proben ein Produkt mit einer ähnlichen Basenpaarlänge amplifiziert worden sein

3.2 Bestimmung der Proteinbildung von Occludin und ZO-1 in HBMEC mittels Western Blot

Die Untersuchungen, ob die mittels QRT-PCR entdeckten veränderten Expressionsmuster mit einer veränderten Bildung der entsprechenden Proteine einhergehen, wurden mittels Western Blot Analysen geführt. Aufgrund der Verfügbarkeit kommerziell gefertigter Antikörper beschränkten sich die Versuche auf die Proteine Occludin und ZO-1. HBMEC wurden für 4, 8 und zusätzlich 24 Stunden mit MC58 oder MC58 *siaD* infiziert und anschließend mit einem Lysepuffer lysiert. Um eine möglichst genaue quantitative Aussage über eine veränderte Proteinbildung treffen zu können, wurde mittels eines modifizierten Bradford-Assays die Proteinkonzentration jeder Probe bestimmt und jeweils 20 µg Protein für den Western Blot verwendet. Als Kontrollen dienten uninfizierte HBMEC, inkubiert für die selbe Zeit mit dem Infektionsmedium.

3.2.1 Nachweis von Occludin

Zum Nachweis von Occludin in infizierten und nicht infizierten HBMEC musste zunächst ein geeigneter Antikörper gefunden werden. Der verwendete polyklonale rabbit sc-5562 Antikörper von Santa Cruz band in den folgenden Immunfluoreszenzversuchen nicht nur an Occludin, sondern auch an Meningokokken direkt. Zur Verwendung kam daher ein mouse Anti-Occludin Antikörper (Klon 19) von BD, welcher zuverlässig ausschließlich Occludin darstellte.

Occludin lässt sich als Protein mit einer Molekülgröße von 62-65 kDa im Western Blot nachweisen. Daneben finden sich häufig ebenfalls Banden mit einem höherem Molekulargewicht von bis zu 330 kDa. Diese entsprechen phosphorylierten Formen von Occludin [92].

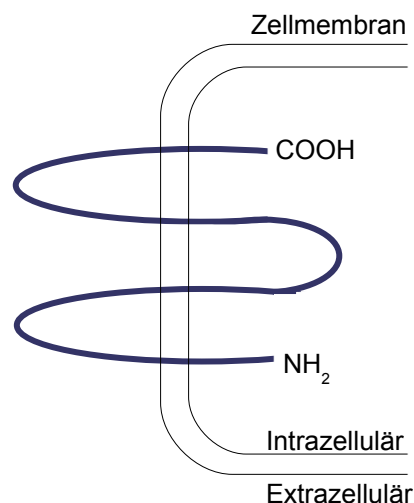


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Occludin. C- und N-Terminus liegen intrazellulär. Vier Transmembrandomänen durchspannen die Zellmembran und bilden extrazellulär 2 Loops, über die ein homophile Bindung zur benachbarten Zelle erfolgt

In uninfizierten HBMEC stellt sich Occludin als Protein bei 62 und 83 kDa dar (Abbildung 9). Der Bande bei 62 kDa entspricht der unphosphorylierten des Proteins, während sich bei 83 kDa eine phosphorylierte Form nachweisen lässt.

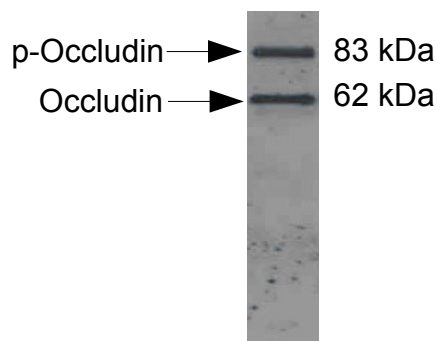


Abbildung 9: Nachweis von Occludin in nicht infizierten HBMEC

Nach 4 Stunden Infektionszeit fällt auf, dass im Vergleich zu uninfizierten Zellen 3 zusätzliche Banden mit einem Molekulargröße von 50, 33 und 25 kD detektiert werden (Abbildung 10). Die Bande bei 50 kDa bleibt im Zeitverlauf nahezu unverändert, während die Bande bei 33 kDa zu und jene bei 25 kDa abnimmt. Die phosphorylierte Form bei 83 kDa wird durch die Infektion zu keinem Zeit-

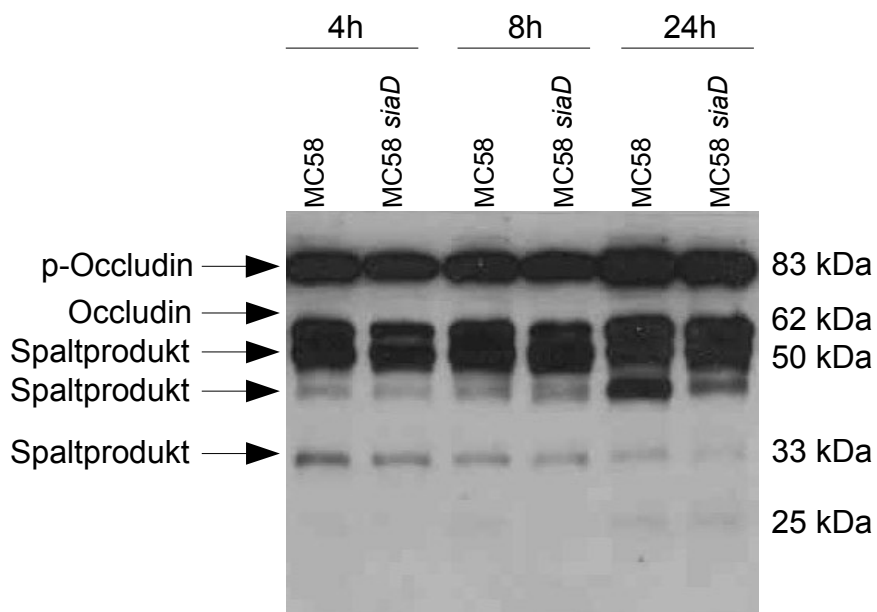


Abbildung 10: Nachweis von Occludin in infizierten HBMEC nach 4, 8 und 24 Stunden im Western Blot

punkt verändert. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es durch die Infektion durch Meningokokken zu einer Spaltung von Occludin in mehrere Frag-

mente, mit deutlicher Betonung eines 50 kDa Fragmentes kommt, was auf eine Spaltung des Proteins im ersten extrazellulären Loops hinweist. Signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Bakterienstämmen ließen sich nicht beobachten.

3.2.2 Nachweis von ZO-1

ZO-1 stellt sich im Western Blot (Abbildung 11) als Bande bei 250 kDa dar. Zu keiner Zeit konnte eine Veränderung der Bildung von ZO-1 nach Infektion beobachtet werden.

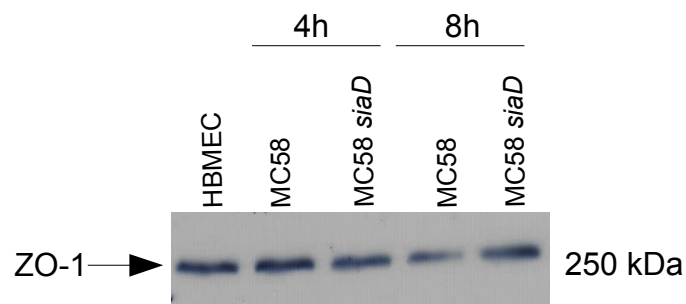


Abbildung 11: Nachweis von ZO-1 in infizierten und uninfizierten HBMEC nach 4 und 8 Stunden im Western Blot

3.3 Nachweis von Occludin durch Immunpräzipitation

Zur Bestätigung der beobachteten Spaltung von Occludin und genaueren Bestimmung der Spaltprodukte wurden HBMEC infiziert und anschließend Occludin mittels Antikörper und eines Proteine-A/G Agarosekomplexes immunpräzipitiert wie in 2.20 beschrieben. Das Präzipitat wurde im Western Blot durch Darstellung von Occludin detektiert.

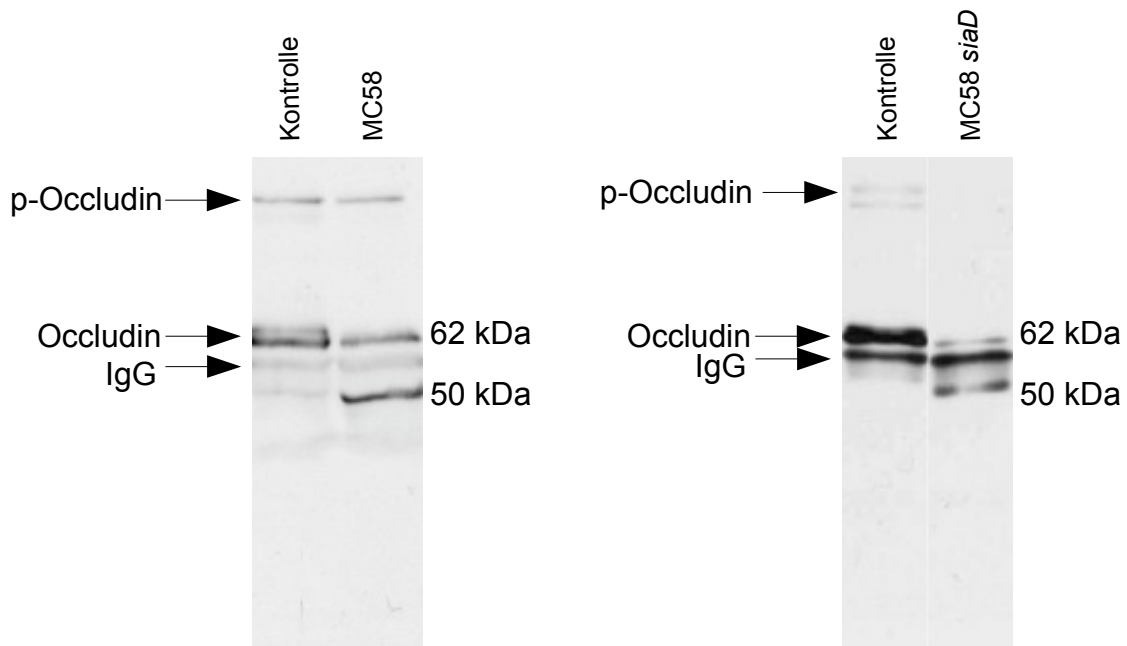


Abbildung 12: Western Blot nach Immunpräzipitation von Occludin. HBMEC wurden für 24 h mit MC58 (links) und MC58 *siaD* (rechts) infiziert, mit einem Anti-Occludin Antikörper immunpräzipitiert und Occludin im Western Blot dargestellt

Wie exemplarisch in Abbildung 12 für 24 Stunden Infektionszeit gezeigt, kommt es zu einer Abspaltung eines 50 kDa großen Fragments von Occludin, welches bei uninfizierten HBMEC nicht zu beobachten ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Western Blot Analyse lassen sich keine weiteren Spaltprodukte kleiner als 50 kDa nachweisen. Zu einer signifikanten Änderung in der Phosphorylierung kam es nicht. Da es durch die Infektion von *N. meningitidis* auch zu einer mikroskopisch sichtbaren Abrundung von HBMEC kam, wurde mittels Zugabe von Cytochalasin D überprüft, ob die Occludinspaltung lediglich durch eine Änderung der Zellmorphologie hervorgerufen wird. Cytochalasin D ist ein potenter Inhibitor der Aktin- und Tubulinfilamentbildung und führt zu einer ähnlichen Änderung der Zellmorphologie wie bei einer Infektion durch Meningokokken. Da es, wie in Abbildung 13 dargestellt, zu keiner Occludinspaltung nach Behandlung mit Cytochalasin D kommt, beruht die Spaltung folglich nicht auf den morphologischen Änderungen, sondern wird durch andere Faktoren der Infektion bedingt.

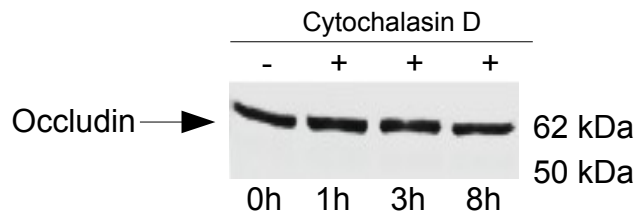


Abbildung 13: Immunpräzipitation von HBMEC nach Behandlung mit Cytochalasin D

3.4 Immunfluoreszenzversuche

Ziel dieser Versuche war es, zu untersuchen, ob die auf den Ebenen der Genexpression und Proteinsynthese beobachteten Veränderungen zu quantitativen oder qualitativen Änderungen auf mikroskopischer Ebene führen. HBMEC wurden hierfür entsprechend 2.10.1.3 auf Glasplättchen ausgesät, infiziert, permea-

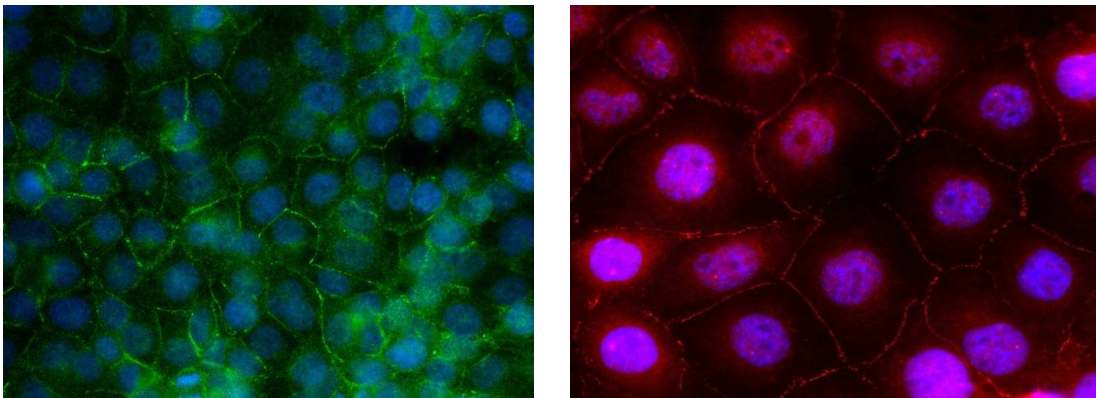


Abbildung 14: Immunfluoreszenzdarstellung von Occludin (links) und ZO-1 (rechts) in nicht infizierten HBMEC. Occludin wurde mit einem mouse Anti-Occludin Antikörper markiert und mit dem fluoreszierenden anti-mouse Zweitantikörper Alexa-Fluor 488 (dargestellt in grün) sichtbar gemacht. ZO-1 wurde durch einen rabbit Anti-ZO-1 Antikörper markiert und mittels anti-rabbit Alexa-Fluor 546 markiert (dargestellt in rot). Bei beiden Darstellungen wurden die Zellkerne mittels DAPI gefärbt (blau)

bilisiert und gefärbt. ZO-1 wurde dabei mit einem Alexa-Fluor 546 konjugiertem Zweitantikörper markiert, Occludin mit einem Alexa-Fluor 488 konjugierten. Zur verbesserten Übersicht wurden die Zellkerne mittels DAPI angefärbt.

3.4.1 Darstellung von ZO-1 und Occludin in uninfizierten HBMEC

Zur Darstellung von ZO-1 und Occludin im nicht infizierten Zustand wurden HBMEC auf Glasplättchen ausgesät und nach zwei Tagen Wachstum ohne die Zugabe einer Infektionslösung gemäß 2.21 gefärbt.

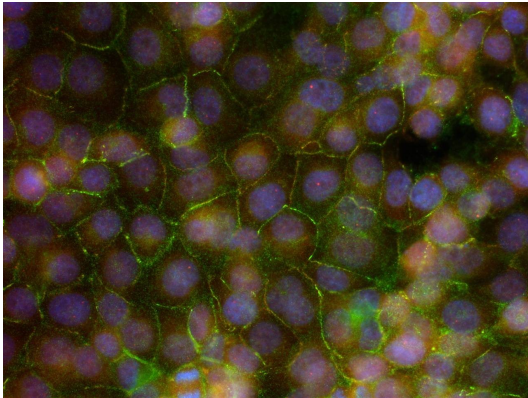


Abbildung 15: Immunfluoreszenzdarstellung von Occludin und ZO-1 in nicht infizierten HBMEC. Gleichzeitige Darstellung von Occludin (grün) und ZO-1 (rot) durch Mehrfachbelichtung. Dadurch erscheinen beide Proteine zusammen in orange. Darstellung der Zellkerne mittels DAPI (blau)

Wie in Abbildung 14 und Abbildung 15 zu sehen, sind Occludin und ZO-1 überwiegend entlang der Zell-Zell-Grenzen lokalisiert. Die Zell-Zell-Grenzen erscheinen bei Überlagerung durch Mehrfachbelichtung der beiden Filter (Abbildung 15) orange, wodurch eine Kolokalisation von Occludin und ZO-1 entlang der Zellmembran dokumentiert wird.

3.4.2 Darstellung von ZO-1 und Occludin in infizierten HBMEC

Wie in 2.10.1.3 beschrieben, wurden HBMEC auf Glasplättchen ausgesät, für zwei Tage im Brutschrank inkubiert, infiziert und Occludin, ZO-1 sowie die Zellkerne dargestellt.

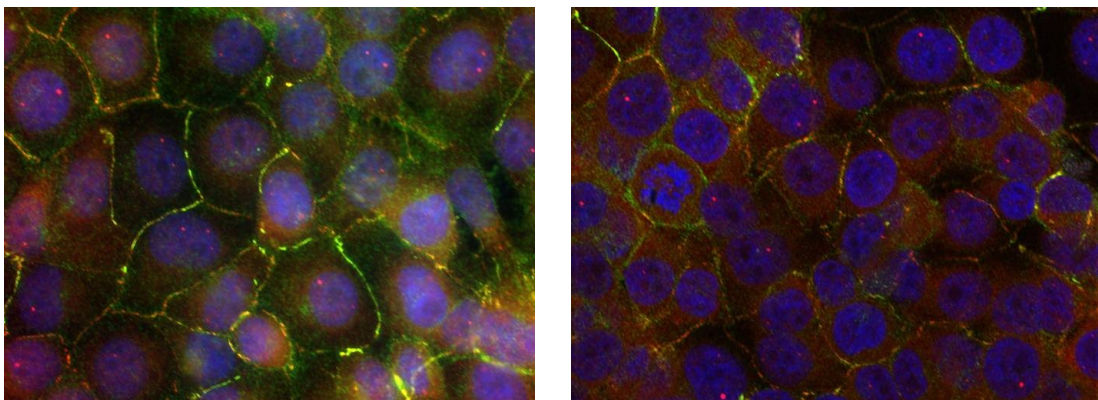


Abbildung 16: Immunfluoreszenzdarstellung von Occludin (grün) und ZO-1 (rot) in HBMEC nach 4 h Infektionszeit mit MC58 (links) und MC58 *siaD* (rechts). Zellkerne mit DAPI angefärbt

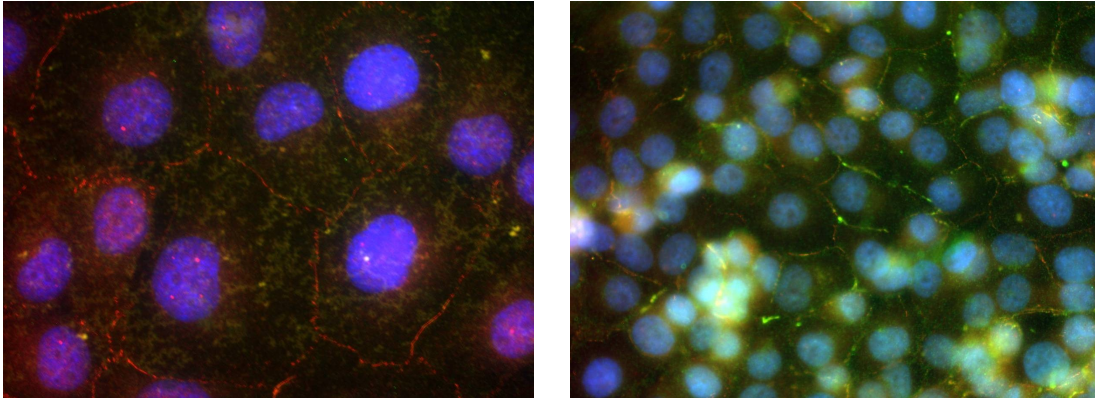


Abbildung 17: Immunfluoreszenzdarstellung von Occludin (grün) und ZO-1 (rot) in HBMEC nach 8 h Infektionszeit mit MC58 (links) und MC58 *siaD* (rechts). Zellkerne mit DAPI angefärbt

Wie in Abbildung 16 und Abbildung 17 zu erkennen, führt die Infektion von HBMEC mit dem Neissererienstamm MC58 zu Veränderungen in der Verteilung des Occludins. Nach 4 Stunden erscheinen bereits mehr Zell-Zell-Grenzen überwiegend rötlich statt orange, was eine reduzierte Anwesenheit von Occludin entlang der Zellmembranen bedeutet. Nach 8 Stunden ist dieser Effekt noch ausgeprägter zu beobachten. Occludin ist zu diesem Zeitpunkt in deutlich vermindertem Maß entlang der Zellgrenzen, dafür vermehrt im Zytoplasma, nachweisbar. Auch für die unbekapselte Mutante MC58 *siaD* konnte eine Dislokation von Occludin von den Zellgrenzen in das Zytoplasma gezeigt werden. Dieser Effekt war jedoch im Gegensatz zu MC58 nach 4 Stunden bereits maximal ausgeprägt, ohne dass es zu einer weiteren Veränderung nach 8 Stunden kam.

3.4.3 Zusammenfassende Beurteilung der Immunfluoreszenzversuche

In uninfizierten HBMEC sind Occludin und ZO-1 in HBMEC entlang der Zell-Zell-Grenzen kolokalisiert. Durch die Infektion von HBMEC mit *N. meningitidis* MC58 und MC58 *siaD* kommt es zu einer Umverteilung von Occludin von den Zellgrenzen in das Zytoplasma, wobei dieser Effekt bei MC58 stärker ausgeprägt ist als bei seiner unbekapselten Mutante. Eine Veränderung ZO-1 betreffend konnte nicht beobachtet werden. Claudin-5 konnte trotz Erprobung verschiedener Versuchsbedingungen nicht reproduzierbar dargestellt werden.

3.5 Permeabilitätsmessungen

Da bislang kein etabliertes System zur Erfassung einer Permeabilitätsänderung des HBMEC-Monolayers durch *N. meningitidis* existiert, mussten zunächst ideale Versuchsbedingungen geschaffen werden. Zunächst wurden 5×10^4 HBMEC gelöst in 200 μ l Nährmedium auf Gelatine beschichtete Transwell-Filter ausgesät und für 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Nachdem ein kontinuierlicher Zellrasen erreicht war, wurde ein Medium aus RPMI 1640 mit 10% humanem Serum in die untere Kammer sowie auf die Zellen gegeben. Der oberen Kammer wurde zudem FITC-Dextran in einer Konzentration von 1 mg/ml zugefügt. Nach verschiedenen Zeiten wurde eine Probe aus der unteren Kammer entnommen und die Konzentration mittels ELISA bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass HBMEC auf gelatinebeschichteten Filtern insbesondere für 4 kDa FITC-Dextran keine ausreichende Barrierefunktion ausbildeten. Alternativ wurde daher eine Kollagenmischung sowie Matrigel, welches neben Kollagen weiterer Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Laminin und Proteoglykane enthält, getestet.

Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen den Durchfluss von FITC-Dextran 4 kDa und 40 kDa durch Transwell-Filter unter Verwendung verschiedener Beschichtungen. Hierzu wurden HBMEC auf einer porösen Transwell-Membran mit einer Porengröße von 3 μ m in einer Dichte von 5×10^4 Zellen je Membran ausgesät und der Durchfluss von FITC-Dextran 4 kDa (Abbildung 18) und 40 kDa (Abbildung 19) nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt.

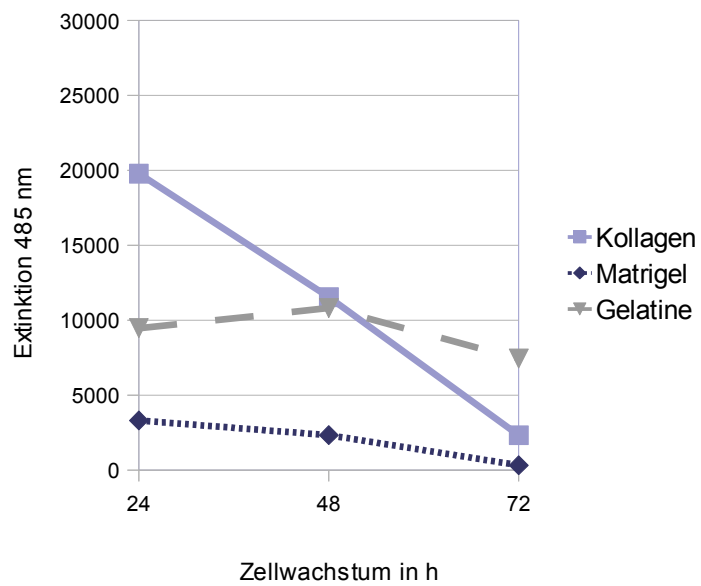


Abbildung 18: Permeabilität verschieden beschichteter Transwell-Membranen für FITC-Dextran 4 kDa

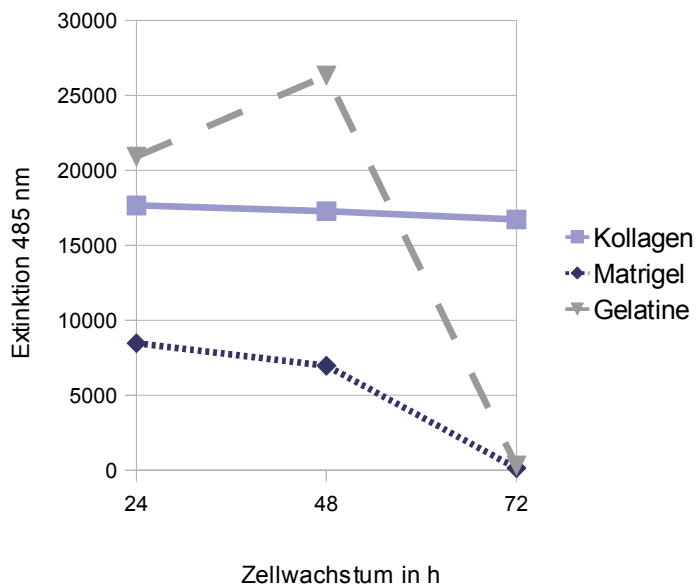


Abbildung 19: Permeabilität verschieden beschichteter Transwell-Membranen für FITC-Dextran 40 kDa

Dabei zeigte sich, dass durch die Verwendung von Matrigel für beide Molekülgrößen eine erheblich stärkere Barrierefunktion im Vergleich zu Gelatine und Kollagen etabliert werden konnte. Um auszuschließen, dass die Verwendung von Matrigel alleine bereits eine Barriere darstellt, wurden Transwell-Filter mit verschiedenen Mengen Matrigel beschichtet und der Durchtritt von Meningokokken von der oberen in die untere Kammer gemessen (Abbildung 20). Hierbei zeigte sich, dass bei sich bei Verwendung von 5-10 µg Matrigel je Filtereinsatz

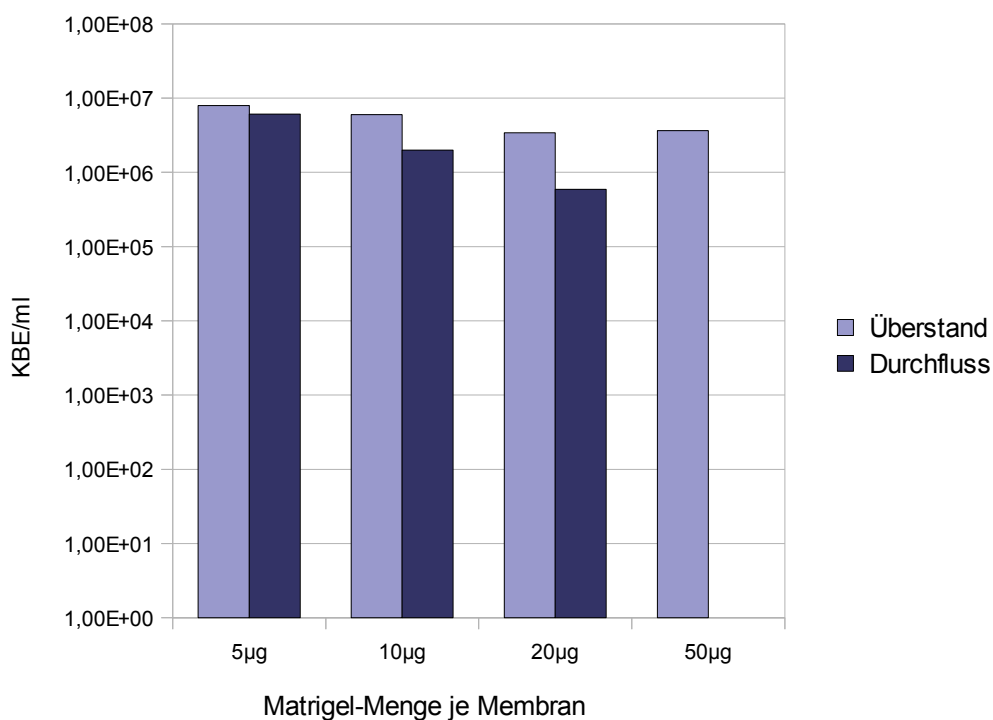


Abbildung 20: Transmigration von *N. meningitidis* durch einen Transwell-Filter. Zur Ermittlung einer geeigneten Menge Matrigel zur Beschichtung der Transwell-Filter wurde der Filter mit der angegebenen Menge Matrigel beschichtet und beide Kammern mit HBMEC Medium befüllt. In die obere Kammer wurden 10^6 *N. meningitidis* gegeben. Nach 8 Stunden wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) der oberen (Überstand) und der unteren Kammer (Durchfluss) durch Plattieren von Verdünnungen auf GC-Agar bestimmt

nur geringe Unterschiede in der Anzahl der Bakterien in beiden Kammern festzustellen waren. Bei Einsatz von 50 µg Matrigel konnte kein Fluss von *N. meningitidis* durch die Membran gemessen werden. Verwendet wurde daher

eine Menge 10 µg Matrigel je Transwell-Einsatz. Zusätzlich wurde getestet, ob bei der verwendeten Menge Matrigel eine frei Diffusion von FITC-Dextran durch einen matrigelbeschichteten Transwell-Filter möglich ist.

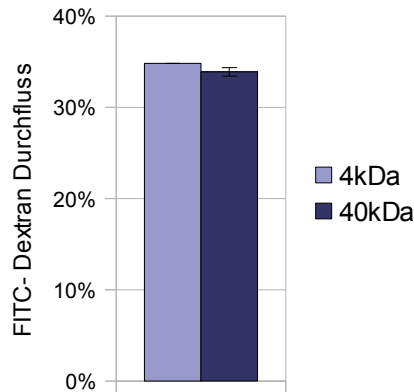


Abbildung 21: FITC-Dextran Durchfluss durch einen mit Matrigel beschichteten Transwell-Filter

Hierbei zeigte sich, dass circa 33% des FITC-Dextran von der oberen in die untere Kammer durch den beschichteten Transwell-Filter diffundieren (Abbildung 21). Signifikante Unterschiede zwischen 4 kDa und 40 kDa FITC-Dextran konnten hierbei nicht beobachtet werden. Da in den oben genannten Vorversuchen eine höhere Barrierefunktion nach 72 Stunden Wachstum von HBMEC auf dem Transwell-Filter erreicht werden konnte, wurde der ideale Versuchszeitpunkt für die Infektion der Zellen ermittelt. Hierfür wurden HBMEC auf Transwell-Filter für 3-8 Tage inkubiert und anschließend der FITC-Dextran Durchfluss bestimmt. Da die Permeabilität durch den HBMEC-Monolayer nach 5 Tagen Wachstum den niedrigsten Wert erreicht hatte und danach wieder anstieg (Abbildung 22), wurden für die Permeabilitätsmessungen die Inkubationsdauer nach Aussäen auf 5 Tage verlängert.

Nachdem für Art und Menge der Beschichtung sowie die Wachstumsphase ideale Versuchsbedingungen etabliert waren, wurden Infektionsversuche vorgenommen. Hierfür war jedoch eine weitere Modifikation des Protokolls nötig.

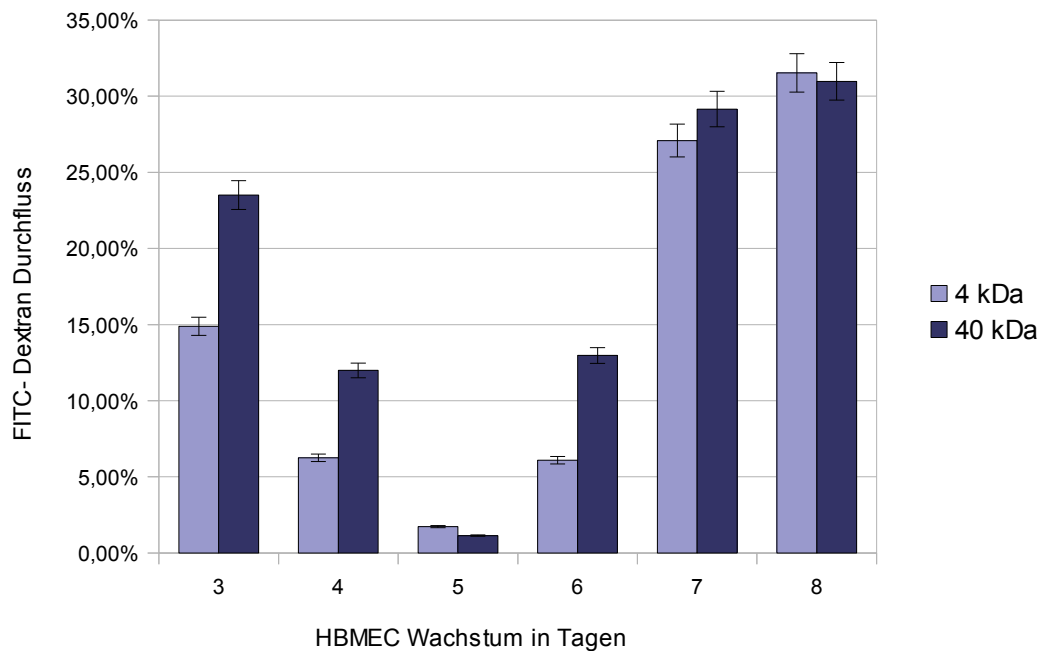


Abbildung 22: FITC-Dextran Durchfluss nach HBMEC-Wachstum zwischen 3 und 8 Tagen

Es zeigte sich, dass FITC-Dextran Konzentration in der basalen Kammer besonders bei langer Infektionsdauer abnahm, was auf eine Instabilität des Moleküls unter den Infektionsbedingungen hinwies. Daher wurde ein Ansatz gewählt, bei dem FITC-Dextran erst nach Ablauf der Infektionszeit in die obere Kammer gegeben wurde. Nach Infektion wurde zunächst das Infektionsmedium entfernt und die Zellen 20 Minuten in P-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde in die obere Kammer FITC-Dextran gegeben und nach weiteren 30 Minuten die Konzentration in der unteren Kammer bestimmt. Hierdurch wurde erreicht, dass zu allen Versuchszeitpunkten FITC-Dextran für die gleiche Zeit Versuchsbedingungen ausgesetzt war, wodurch eine Verfälschung der Werte bei längerer Versuchsdauer ausgeschlossen werden konnte. Hiermit konnten durch diese Protokollanpassungen eine reproduzierbare Versuchsanordnung zur Bestimmung der Permeabilität eines HBMEC-Monolayers geschaffen werden.

Es zeigte sich, dass die Infektion mit zunehmender Infektionsdauer zu einer erhöhten Diffusion von FITC-Dextran von der oberen in die untere Kammer führte. Zeigte sich in uninfizierten Zellen eine Fluss von der oberen in die untere Kam-

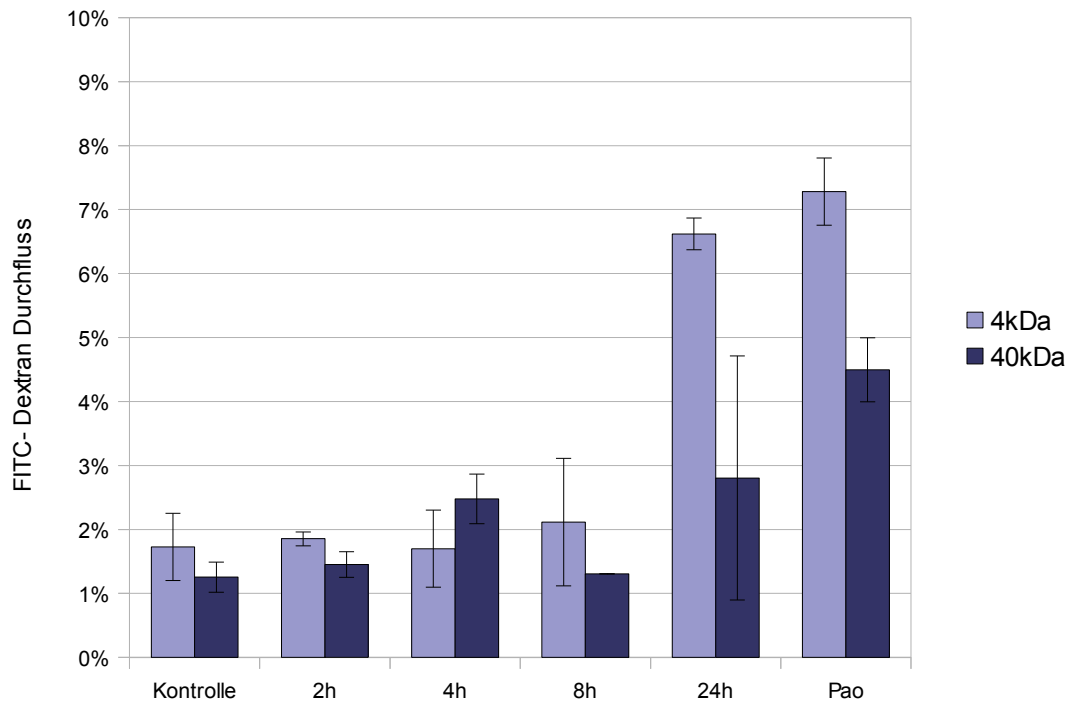


Abbildung 23: Ergebnisse des Permeabilitätsassays

mer von $1,73 \pm 0,53\%$ für 4 kDa FITC-Dextran und $1,25 \pm 0,24\%$ für 40 kDa, stieg dieser Wert nach eine Infektionszeit von 24 Stunden auf $6,62 \pm 0,25\%$ (4 kDa), beziehungsweise $2,8 \pm 0,18\%$ (40 kDa). Das Ausmaß des Anstieges war dabei nach 24 Stunden signifikant ($p < 0,05$). Als Positivkontrolle wurde Phenylarsenoxid (PAO) verwendet, welches bei Zugabe zu einer Auflösung von Tight-Junctions führt. Eine weitere Erhöhung der Permeabilität ließ sich hierdurch jedoch nicht erzielen (Abbildung 23).

4. Diskussion

4.1 Erhöhung der Permeabilität des HBMEC-Monolayers durch eine Infektion mit *N. meningitidis*

Der entscheidende Schritt bei der Auslösung einer Meningitis durch *N. meningitidis* ist die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, deren zentraler Bestandteil die Endothelzellen der zerebralen Blutgefäße sind. Als *in-vitro* Modell des Endothels der menschlichen Blut-Hirn-Schranke wurde das HBMEC Modell genutzt [55]. Um zu überprüfen, ob eine Infektion von HBMEC durch *N. meningitidis* die Barrierefunktion und somit die Permeabilität der Endothelzellbarriere beeinflusst, wurde in dieser Arbeit ein Modell zur Permeabilitätsmessung etabliert. Verwendet wurde hierfür das Transwell-System, welches eine Bildung eines Zweikammersystems ermöglicht, wobei HBMEC die trennende Barriere zwischen den Kammern bilden. Hierbei zeigte sich in der Etablierungsphase, dass HBMEC auf mit gelatine-, ebenso wie auf kollagenbeschichteten Transwell-Filtern, keine ausreichende Barrierefunktion bilden. Erst durch die Verwendung von Matrigel, welches neben Kollagen IV auch Laminin und Proteoglykane enthält, konnte eine ausreichende Barrierefunktion aufrecht erhalten werden. Matrigel alleine beeinflusste die Permeabilität des Systems jedoch nicht. Dies deutet darauf hin, dass für die Ausbildung der Barrierefunktion von HBMEC der Kontakt mit Bestandteilen der ECM über Kollagen hinausgehend von essentieller Bedeutung ist. Möglicherweise kommt es hierdurch zu einer Induktion von Faktoren, die zu einem festeren Endothelzusammenhalt führen, was die Wichtigkeit des Zusammenspiels der einzelnen Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke unterstreicht. Zur Bestimmung der Permeabilität wurde die Messung der FITC-Dextran Durchflusses von der oberen in die untere Kammer durch den HBMEC-Monolayer als bereits etablierte Messmethode genutzt [93]. Durch den Einsatz unterschiedlich komplexer Dextrane, in dieser Arbeit 4 und 40 kDa, ist es zudem möglich, die Permeabilität für unterschiedlich große Moleküle zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die Infektion von HBMEC durch *N.*

meningitidis zu einer Erhöhung der Permeabilität der Endothelzellbarriere führt. Dabei zeigte sich, dass auch nach 8 Stunden Infektionszeit nur eine leichte und nicht signifikante Permeabilitätszunahme zu verzeichnen ist. Es wurden daher zusätzliche Messungen nach 24 Stunden vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine signifikant erhöhte Permeabilität. Eine weitere Steigerung der Permeabilität ließ sich auch durch Zugabe von PAO, welches zu einer vollständigen Auflösung der Tight-Junctions führt, nicht erreichen, was darauf hin deutet, dass es zu einem vollständigen Verlust der Barrierefunktion der Tight-Junctions kommt. Interessanterweise lässt sich dennoch ein Unterschied zwischen unterschiedlich großen Molekülen (4 und 40 kDa) feststellen, für die möglicherweise andere Teile der Endothelbarriere, wie Adherens-Junctions verantwortlich sind. Ob die Zunahme der Permeabilität für Makromoleküle wie FITC-Dextran auch zu einer Zunahme der Transmigrationsrate von *N. meningitidis* führt, wird in künftigen Studien untersucht werden müssen.

4.2 Umverteilung von Occludin von den Zellgrenzen in das Zytoplasma

Auf welchen molekularen Prozessen die Erhöhung der Permeabilität der Endothelzellbarriere beruht, wurde zunächst durch eine Immunfluoreszenzdarstellung von Occludin und ZO-1 als wichtige Bestandteile der Tight-Junctions untersucht. Wie erwartet, ließen sich Occludin und auch ZO-1 in HBMEC als membranständige Protein nachweisen. Die Infektion durch *N. meningitidis* führte zu einer deutlichen Umverteilung von Occludin von den Zellgrenzen in das Zytoplasma. Nach 8 Stunden Infektionszeit ließ sich Occludin nur noch als schwaches Signal an den Zellgrenzen darstellen, wohingegen sich jetzt auch Occludin innerhalb der Zelle anfärbte. ZO-1 hingegen blieb von der Infektion unbeeinflusst und war auch nach 8 Stunden Infektionszeit weiterhin nur an den Zellgrenzen lokalisiert. Die fehlende Umverteilung von ZO-1, obwohl es ein direkter Interaktionspartner von Occludin ist, lässt sich durch zwei verschiedene Ansätze erklären. Möglicherweise verbleibt das C-terminale Spaltprodukt membran-

ständig und kann somit weiter an ZO-1 gebunden bleiben. Alternativ ist auch denkbar, dass ZO-1 über die frei gewordene Bindungsstelle an andere Tight- oder Adherens-Junction Proteine wie Claudine, JAM oder Cadherine bindet und diese Proteine nicht umverteilt werden [74].

4.3 Abspaltung eines 50 kDa Fragments von Occludin durch *N. meningitidis*

In dieser Arbeit konnte neben der Occludinumverteilung erstmals gezeigt werden, dass *N. meningitidis* in der Lage ist, in HBMEC eine Spaltung von Occludin in ein 50 kDa großes Fragment herbeizuführen. In Kontrollversuchen mit Cytochalasin D konnte demonstriert werden, dass diese Spaltung nicht durch eine Änderung der Zellmorphologie sondern durch andere Faktoren der Infektion bedingt sind.

Diese Ergebnisse belegen, dass Meningokokken beim Überwinden der Blut-Hirn Schranke, am Beispiel von Occludin, Tight-Junction Proteine degradieren und auf diese Weise möglicherweise zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität der Endothelbarriere führen. Da keine signifikanten Unterschiede dieses Effektes bei MC58 und der isogenen unbekapselten Mutante MC58 *siaD* beobachtet werden konnten, scheint für diesen Prozess die Kapsel keine Bedeutung zu haben. Neben der Spaltung von Occludin ist die Phosphorylierung ein weiterer wichtiger regulativer Mechanismus. Occludin kann durch Proteinkinase C an Serin- und Threoninresten phosphoryliert werden. Hiermit verbunden konnte eine Erhöhung des TEER festgestellt werden [94] [92]. Tyrosinphosphorylierung hingegen geht mit einem verminderten TEER einher [95]. Allerdings basierten alle diese Arbeiten auf epithelialen Zellkulturmodellen. In Hirnendothelzellen wurde ein Einfluss der Occludinphosphorylierung bislang nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte eine Änderung der Phosphorylierung von Occludin nicht beobachtet werden. Dieser Effekt spielt demnach für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch *N. meningitidis* keine Rolle.

In dieser Arbeit gelang es nicht, für Claudin-5 reproduzierbare Western Blot

Analysen zu etablieren. Daher bleibt unklar, ob auch dieses Tight-Junction Protein von der Infektion beeinflusst wird.

4.4 Veränderung der Genexpression von Tight-Junction Proteinen

Um zu verstehen, welche Vorgänge durch eine Infektion von HBMEC durch *N. meningitidis* ausgelöst werden, wurde in einer vorangegangenen Studie das Transkriptom von HBMEC nach 4 und 8 Stunden Infektionszeit mit Hilfe einer cDNA Microarrayanalyse untersucht. Von den getesteten nahezu 12.000 Genen erwiesen sich abhängig von Infektionsdauer und dem Vorhandensein einer Kapsel 7-12% der Gene entweder als hoch- oder herunterreguliert. Neben einer großen Zahl von Genen, die an Translation, Transkription, RNA-Transport und Prozessierung beteiligt sind, zeigten sich auch Gene, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind, als differentiell reguliert. Auffällig und bislang unbekannt war, dass auch die Gene für die Tight-Junction Proteine Claudin-12 und 14, sowie die Gene für die Protocadherine 8 und 17 als Vertreter der Adhärenz-Junctions nach einer Infektion vermindert exprimiert wurden [90]. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse und Untersuchung der Genexpression von Occludin und ZO-1 wurde eine QRT-PCR genutzt. Hier zeigte sich eine verminderte Expression von Occludin, welches nicht im Rahmen der Microarrayanalyse getestet wurde, nach 4 und stärker nach 8 Stunden Infektionszeit. Eine Veränderung in der Genexpression von ZO-1 und Claudin-5, welches speziell in Endothelzellen exprimiert wird [75], konnte mit keiner der beiden Methoden beobachtet werden. Claudin-12 zeigte sich in beiden Methoden gleichermaßen nach 4 Stunden vermindert exprimiert. Für Protocadherin-17 konnte eine veränderte Expression nur nach 8 Stunden Infektionszeit beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Erhöhung der Permeabilität nicht nur die Spaltung von Tight-Junction Proteinen, in dieser Arbeit am Beispiel von Occludin belegt, sondern auch eine Veränderung auf der Ebene der Genexpression eine entscheidende Rolle spielt. Auch die Gruppe der Claudine, am Beispiel von Claudin-12

gezeigt, unterliegt einer Regulierung durch veränderte Genexpression. Betreffend die Adherens-Junctions konnte nur eine gering veränderte Expression von Protocadherin-17 nachgewiesen werden. Hinweise für eine Regulation der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke über eine veränderte Genexpression von Adherens-Junction Proteinen ergaben sich in dieser Arbeit nicht, wobei VE-Cadherin und die Gruppe der Catenine in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

4.5 Permeabilitätserhöhung, Occludinspaltung- und Umverteilung sind MMP-8 abhängige Prozesse

Wodurch es in HBMEC nach Infektion mit *N. meningitidis* zu einer Spaltung und Umverteilung von Occludin kommt und ob hierdurch auch der beobachtete Permeabilitätsanstieg zu erklären ist, wurde in weiteren Studien untersucht. Auch wurde der Frage nachgegangen, ob es sich um voneinander getrennte Prozesse handelt, oder ob diesen ein gemeinsamer molekularer Mechanismus zugrunde liegt. Ein Mechanismus zur Degradierung von Occludin führt über eine Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP). So konnte gezeigt werden, dass Occludin im Bereich des ersten extrazellulären Loops ein Spaltmotiv für MMP besitzt und eine Spaltung an dieser Stelle zu einem 50 kDa großen Fragment führt [96]. In weiteren Arbeiten konnte belegt werden, dass MMP-9 sowohl Occludin als auch Claudin-5 in der Lage ist zu spalten [97]. Auch für MMP-2 konnte eine Spaltung von Occludin gezeigt werden [98]. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten belegten die Spaltung von Occludin in mehrere Fragmente mit Betonung eines Hauptfragmentes bei 50 kDa in einer HBMEC ähnlichen Hirnendothelzelllinie durch MMP-2 [99], sowie durch MMP-9 [100].

In dieser Arbeit folgenden Untersuchungen konnte belegt werden, dass die Abspaltung des 50 kDa großen Fragmentes von Occludin durch Matrixmetalloproteinasen verursacht wird. So konnte die Occludinspaltung durch den MMP-Inhibitor GM6001 vollständig verhindert werden. Mittels Transfektion von HBMEC durch siRNA und den Einsatz eines spezifischen Inhibitors konnte zudem gezeigt werden, dass dieser Effekt durch MMP-8 hervorgerufen wird, von der bis-

lang nicht bekannt war, dass sie im Stande ist Occludin zu spalten [101]. Die Spaltung im ersten extrazellulären Loop ist auch eine mögliche Erklärung für den in den Immunfluoreszenzversuchen beobachteten Verbleib von ZO-1 entlang der Zellgrenzen, da in diesem Fall der C-Terminus, über den eine Bindung zu ZO-1 hergestellt wird, membranständig verbleiben würde. Neben Tight-Junctions dienen MMP auch Proteine der Adherens-Junctions sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix als Substrat, wodurch eine Minderung der Integrität der Zell-Zell-Kontakte der Blut-Hirn-Schranke auf vielfältige Weise erreicht wird [102] [97].

In einem weiteren Schritt konnte auch belegt werden, dass Umverteilung des Proteins und die Permeabilitätszunahme keine unabhängigen Effekte sind, sondern auf der durch MMP-8 verursachten Beeinflussung der Tight-Junction Proteine beruhen. So konnten durch den Einsatz eines spezifischen MMP-8 Inhibitors sowohl die Umverteilung von Occludin weg von den Zellgrenzen als auch die Aufhebung der Barrierefunktion verhindert werden [101]. Occludinspaltung- und Umverteilung konnten bereits nach 4 und stärker nach 8 Stunden nachgewiesen werden, allerdings noch keine Änderung der Permeabilität, welche erst nach 24 Stunden zu beobachten war. Erklärend sind hier mehrere Ansätze denkbar. Möglicherweise ist das zu diesem Zeitpunkt noch verbleibende und nicht gespaltene Occludin ausreichend, um eine signifikante Schwächung der Barriere zu verursachen. Da Occludin auch regulative Eigenschaften besitzt, ist es auch denkbar, dass durch Spaltung und Umverteilung erst weitere, bislang noch nicht bekannte Schritte ausgelöst werden, die zu einer Erhöhung der Permeabilität führen. Da Matrixmetalloproteinasen auch in der Lage sind, andere Tight-Junction Proteine, wie beispielsweise Claudine zu spalten, könnte auch die Beeinflussung dieser Proteine die entscheidende Rolle spielen, und bedarf weiterer Untersuchungen [97].

4.6 Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke: Para- oder transzelluläre Passage?

Bislang wurde überwiegend die Hypothese vertreten, dass *N. meningitidis* die Blut-Hirn-Schranke auf einem transzellulären Weg überwindet. So konnte gezeigt werden, dass Meningokokken an Endothelzellen adhären, in sie invadieren und sich in ihnen replizieren können [50] [52]. In dieser und folgenden Arbeiten konnte demonstriert werden, dass *N. meningitidis* eine MMP-8 abhängige Spaltung des Tight-Junction Proteins Occludin auslöst und somit die Permeabilität der Endothelzellbarriere erhöht. Noch ist unklar, ob der gezeigte Mechanismus auch zu einer parazellulären Passage von Meningokokken über die Blut-Hirn-Schranke führt. Diese Arbeit liefert jedoch einen entscheidenden Hinweis, der diesen Weg der Passage prinzipiell möglich erscheinen lässt. Auch konnte erst kürzlich demonstriert werden, dass sich bei der Interaktion von *N. meningitidis* mit Hirnendothelzellen unterhalb der sich an den Endothelzellen in Form von Mikrokolonien adhären Erreger sowohl Tight- als auch Adhärens-Junction Proteine durch Aktivierung des Par3/Par6/PKC ζ -Komplexes sammeln. Es konnte belegt werden, dass es dadurch nach zweistündiger Infektionszeit zur Bildung von Lücken in der Verteilung von Ve-Cadherin als zentraler Bestandteil der Adhärens-Junctions und zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität kommt [54]. Da auch Tight-Junction Proteine wie Claudine und ZO-1 in der Zellmembran unterhalb der Erreger rekrutiert wurden, spielt dieser Mechanismus auch bei der Umverteilung von Occludin möglicherweise eine wichtige Rolle, welche allerdings von den Autoren nicht explizit untersucht wurde. Eine Lokalisierung von Occludin und ZO-1 speziell in der Zellmembran unterhalb adhärenter Erreger konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist dieser Effekt nach 4 Stunden Infektionszeit, und somit dem ersten in dieser Arbeit beobachteten Zeitpunkt, nicht mehr nachweisbar. Es ist denkbar, dass es in einem frühen Infektionsstadium zunächst zur Rekrutierung von Zell-Zell-Kontakt Proteinen kommt, womit ein Abzug von Zellgrenzen verbunden ist, und anschließend eine MMP-8 abhängige Degradierung stattfindet.

Da sich die Occludinumverteilung jedoch durch einen MMP-8 Inhibitor verhindern ließ, muss auch der Umverteilungsprozess selbst bereits MMP-8 abhängig sein. Zur Entschlüsselung des genauen Mechanismus sind daher noch weitere Forschungsarbeiten nötig. Einschränkend ist anzumerken, dass es sich bei allen vorliegenden Studien um Ergebnissen ausschließlich aus *in-vitro* Untersuchungen handelt und das Modell zur Messung der Permeabilität der Endothelzellbarriere nur einen Teil der tatsächlichen Blut-Hirn-Schranke widerspiegelt. Zur Untersuchung des Einflusses weiterer Bestandteile wäre die Etablierung eines weitaus komplexeren, aus mehreren Zelllinien, wie ECM produzierenden Fibroblasten und auch Astrozyten, nötig. Ein erstes aus Epi- wie Endothelzellen bestehendes System zur Untersuchung der Passage von Meningokokken von Nasopharynx in die Blutzirkulation wurde bereits erfolgreich etabliert [53].

Inwieweit auch Claudine und insbesondere Claudin-5 von der Infektion beeinflusst werden, ließ sich in der vorliegenden Arbeit leider nicht eruieren, da sich mit den verfügbaren Antikörpern trotz intensiver Erprobung geeigneter Bedingungen bezüglich Inkubationsdauer der Antikörper und Reaktionstemperatur in der Immunfluoreszenzdarstellung wie auch im Western Blot keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen ließen.

4.7 Wie andere Mikroorganismen Endo- und Epithelbarrieren überwinden

Die Überwindung von Endothel- und Epithelbarrieren ist für viele bakterielle wie auch virale oder parasitäre Erreger ein entscheidender Schritt in der Pathogenese. An zahlreichen Beispielen konnte belegt werden, dass die in dieser Arbeit beobachteten Mechanismen aus verminderter Genexpression, Degradierung und Umverteilung von Tight-Junction Proteinen zu einer Erhöhung der Permeabilität der jeweiligen Barriere führen.

Chlamydia trachomatis beispielsweise verursacht in Endothelzellen eine verminderte Expression von Occludin, was zu einer Erhöhung der Permeabilität führt [103]. Auch Das HI-Virus führt in bei der Überwindung der Blut-Hirn-

Schranke zur verminderten Expression von Occludin, Claudin-1 und 5 sowie von ZO-2 [104]. Am Beispiel von *Eimeria vermiformis*, dessen Infektion von Darmepithelzellen zu einer reduzierten Expression von Occludin, JAM und Cateninen führt, konnte gezeigt werden, dass parasitäre Erreger einen ähnlichen Mechanismus zur Überwindung, in diesem Falle einer Epithelbarriere, entwickelt haben [105]. Auch bei nicht-erregerassoziierten Erkrankungen kommt es zur verminderten Expression von Tight-Junction Proteinen. Endothelzellen von Gefäßen in Astrozytomen exprimieren deutlich weniger Occludin, was eine mögliche Erklärung für die Entstehung des begleitenden Hirnödems, welches auch bei der Meningokokkenmeningitis eine gefürchtete Komplikation ist, darstellt [106]. Auch Hypoxie, beispielsweise im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls, führt zur verminderten Occludinexpression und Zunahme der Permeabilität des Endothels [107].

In dieser und folgenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Occludinspaltung- und Umverteilung ebenso wie die Erhöhung der Permeabilität MMP-8 abhängig sind [101]. Ein ähnlicher Effekt konnte kürzlich für MMP-2 gezeigt werden, welche in Hirnendothelzellen nach Exposition mit Wasserstoffperoxid, welches als Vertreter der ROS in einer Vielzahl von erregerassoziierten wie auch nicht-erregerassoziierten Krankheiten eine wichtige Rolle spielt, induziert wird und so zu einer Spaltung von Occludin führt. Auch kam es hierbei zu einer Umverteilung von Occludin und der Bildung von parazellulären Lücken. Hiermit einher ging ebenfalls eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität [99]. *Acanthamoeba* führt in HBMEC wie auch *N. meningitidis* zur Degradation von Occludin. Jedoch kommt es hierbei zusätzlich zu einem Abbau von ZO-1, der in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Auch kam es nicht zur Bildung von Spaltprodukten, sondern nur zu einer deutlichen Abnahme der Bande bei 65 kDa. Als Auslöser wurde die Aktivierung der Rho-Kinase postuliert [108]. Einen weiteren Weg zur Degradierung von Occludin zeigte die Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* auf. Sie sezerniert über ihren Kot das Allergen *Der P1*, welches als Cystein-Proteinase fungiert. Es spaltet Occludin direkt in mehrere Fragmente mit einer Größe von 53, 31 und 22 kDa und gelangt auf

diese Weise parazellulär durch das Atemwegsepithel. Interessanterweise kam es auch hier zu einer Umverteilung von Occludin von den Zellgrenzen in das Zytoplasma [109]. Allerdings geht eine Spaltung von Occludin offenbar nicht zwangsläufig mit einer Umverteilung einher. So kommt es bei der Interaktion von *Vibrio cholerae* und Mardin Darby canine kidney epithelial cell line I (MDCK-I) Zellen zu einer Spaltung, nicht aber zu einer Umverteilung von Occludin. Stattdessen wurde jedoch eine Umverteilung von ZO-1 beobachtet [110]. Neben der Spaltung von Occludin kann auch eine Änderung der Phosphorylierung zur Umverteilung führen, wie am Beispiel der Interaktion von *Burkholderia cenocepacia* Zellen des respiratorischen Epithels gezeigt [111]. Die genannten Beispiele sprechen dafür, dass die Occludinumverteilung weder ein spezifischer Effekt von MMP noch eine Folge der Spaltung alleine sind.

4.8 Hemmung von Matrixmetalloproteinasen:

Eine Therapieoption?

Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ist ein zentraler Schritt bei der Auslösung einer durch *N. meningitidis* verursachten Meningitis. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass es unter *in-vitro* Bedingungen zu einer erhöhten Permeabilität der von Hirnendothelzellen gebildeten Barriere nach Meningokokkeninfektion kommt. Dies könnte dem Erreger einerseits den Übertritt von der Blut-zirkulation in den Subarachnoidalraum ermöglichen, andererseits auch eine Erklärung für das als Komplikation auftretende Hirnödem bedeuten. Es konnte weiter gezeigt werden, dass durch eine Hemmung von MMP eine Permeabilitätszunahme der Hirnendothelzellbarriere verhindert werden kann. Eine Hemmung von MMP könnte somit ein vielversprechender Schritt bei der Behandlung der Meningokokkenmeningitis sein. Studien ergaben zudem, dass sich bei bakteriellen und auch viralen Meningitiden Matrixmetalloproteinasen im Liquor in einer höheren Konzentration im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachweisen lassen [112]. Nach Gabe von abgetöteten Meningokokken in den Liquor bei Ratten konnte einerseits eine vermehrte Bildung von MMP nachgewiesen

werden und andererseits eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke [113] [114]. Die Erkenntnis, dass MMP an durch Meningitiden verursachten Schäden mitbeteiligt sind, führte zu Studien, die den Einfluss einer Hemmung von MMP auf den klinischen Verlauf untersuchten. Hier zeigte sich bei einer in Ratten durch Pneumokokken ausgelösten Meningitis eine verminderte Mortalität sowie ein selteneres Auftreten von Komplikationen wie Krampfanfällen bei Tieren, die zusätzlich zur antibiotischen Therapie einen Inhibitor für Matrixmetalloproteinasen erhielten [115]. Am Menschen sind diese Inhibitoren bislang nicht erprobt, weshalb ein Rückschluss auf die therapeutische Wirkung, insbesondere auch bei der Meningokokkenmeningitis, bislang nicht möglich ist.

Es ist bekannt, dass MMP ein wichtiger Bestandteil in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen sind. So wurde ihre Rolle in entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis [116], Morbus Crohn [117] oder der Multiplen Sklerose [113] ebenso wie bei Tumorerkrankungen [118] und nach myokardialen [119] wie cerebralen Ischämien [120] belegt. Therapeutische Anwendungen ergaben sich hieraus bislang jedoch nicht.

Im Gegensatz zu MMP-Inhibitoren hat sich die Verwendung von Glukokortikoiden bei der Behandlung der bakteriellen Meningitis etabliert. Sie führen zu einer verminderten Permeabilität von Hirnendothelzellen, was zum Einen über eine vermehrte Synthese des MMP-Inhibitor TIMP-1 [121] und zum Anderen über eine vermehrte Expression von Occludin [122] erklärt werden kann. Therapeutisch werden Glukokortikoide bereits erfolgreich zur Behandlung von Tumorödem eingesetzt. Auch bei der Behandlung der Multiplen Sklerose haben sie sich fest etabliert. Neben dem entzündungshemmenden Effekt üben sie auch stabilisierende Wirkung auf die Blut-Hirn-Schranke über eine Hemmung von MMP aus [123]. Bei der Behandlung der bakteriellen Meningitis haben sie bisher nur bei *S. pneumoniae* und *H. Influenzae* b einen positiven Effekt gezeigt [124], wobei eine kürzlich erschienene Metaanalyse auch hieran Zweifel weckte [125]. Bei der Meningokokkeninfektion haben sie trotz der stabilisierenden Wirkung auf die Blut-Hirn-Schranke keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf, wobei die Gründe hierfür bislang nicht verstanden sind [126] [127].

Durch Einsatz des entwickelten Permeabilitätsassays ist es möglich, den Einfluss von verschiedenen Stoffen auf die Permeabilität der Endothelbarriere für Moleküle verschiedener Größe, wie schon für MMP-Inhibitoren geschehen, zu überprüfen. In einem nächsten Schritt ist es möglich, auch den direkten Übertritt von *N. meningitidis* durch den HBMEC-Monolayer unter dem Einfluss verschiedener Effektoren, wie zum Beispiel MMP-Inhibitoren oder Kortikosteroiden zu bestimmen. Dies wird zu einem deutlich besseren Verständnis der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke als entscheidenden Schritt bei der Auslösung einer Meningokokkenmeningitis führen.

5. Zusammenfassung

Neisseria meningitidis ist mit jährlich etwa 700.000 Erkrankungsfällen weltweit und einer Mortalität von circa 7% ein gefürchteter Auslöser der bakteriellen Hirnhautentzündung. Der entscheidende Schritt zur Auslösung einer Meningitis ist die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Diese im menschlichen Körper einmalig dichte Barriere wird maßgeblich durch Tight-Junctions spezialisierter Endothelzellen der Hirnkapillaren aufrecht erhalten. Wie genau *N. meningitidis* diese Barriere überwindet, ist, obwohl überwiegend eine transzelluläre Passage postuliert wird, nicht vollständig geklärt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von *N. meningitidis* auf Proteine der Tight-Junctions, und hier besonders auf Occludin und ZO-1, unter Nutzung eines aus menschlichen Hirnendothelzellen (HBMEC) bestehenden Zellkulturmodells, untersucht. Neben Veränderung in der Genexpression zeigte sich dabei eine Abspaltung eines 50 kDa Fragmentes von Occludin. Gleichzeitig konnte eine Umverteilung von Occludin von den Zellgrenzen in das Zytoplasma beobachtet werden. ZO-1 hingegen wurde weder in seiner Expression, noch in seiner intrazellulären Verteilung beeinflusst. Mittels eines in dieser Arbeit etablierten Assays zur Bestimmung der Permeabilität eines HBMEC-Monolayer als vereinfachtes *in-vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke konnte bestätigt werden, dass durch die Beeinflussung von Tight-Junction Proteinen die parazelluläre Permeabilität steigt. In weiteren Analysen konnten diese Prozesse auf eine gesteigerte Aktivität von Matrixmetalloproteinase 8 zurückgeführt werden. Durch Einsatz eines Inhibitors ließ sich auch die Zunahme der Permeabilität verhindern. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen neuen Mechanismus auf, über den es *N. meningitidis* gelingt, durch eine Aktivierung von MMP-8 Tight-Junction Proteine in ihrer Konstitution und Lokalisation zu beeinflussen, wodurch es folgend zu einer Erhöhung der Permeabilität der Hirnendothelbarriere kommt. Ob der Erreger auf diese Weise auf parazellulärem Weg die Blut-Hirn-Schranke passiert, bedarf jedoch der weiteren Untersuchung.

6. Literaturverzeichnis

- 1 *Marchiafava E, Celli A* (1884), *Spra i micrococchi della meningite cerebrospinale epidemica*, Gazz degli Ospedali.5:59
- 2 *Weichselbaum, A* (1887) *Über die Ätiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis*, Fortschr Med 5:620-626
- 3 *World Health Organization* (2010) *Global Alert and Response (GAR)*, <http://www.who.int/csr/disease/meningococcal/epidemiological/en/index.html>
- 4 *Djibo S, Nicolas P, Alonso JM, Djibo A, Couret D, Riou YJ, Chippaux JP* (2003) *Outbreaks of serogroup X meningococcal meningitis in Niger 1995-2000*, Trop Med Int Health 8(12):1118-1123
- 5 *Greenwood B* (1999) *Manson Lecture. Meningococcal meningitis in Africa*, Trans R Soc Trop Med Hyg 93(4):341-353
- 6 *Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P* (2007) *Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis.*, Lancet 369(9580):2196-2210
- 7 *Tzeng YL, Stephens DS* (2000) *Epidemiology and pathogenesis of Neisseria meningitidis*, Microbes Infect 2(6):687-700
- 8 *Wang JF, Caugant DA, Li X, Hu X, Poolman JT, Crowe BA, Achtman M* (1992) *Clonal and antigenic analysis of serogroup A Neisseria meningitidis with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the People's Republic of China*, Infect Immun 60(12):5267-5282
- 9 *Aguilera JF, Perrocheau A, Meffre C, Hahné S, W135 Working Group* (2002) *Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000*, Emerg Infect Dis 8(8):761-767
- 10 *Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME* (2009) *Global epidemiology of meningococcal disease*, Vaccine 27 Suppl 2:B51-B63
- 11 *RKI* (2008) *Epidemiologisches Bulletin*, http://www.rki.de/clin_169/nn_494546/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/45__09,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/45_09.pdf
- 12 *Trotter CL, Ramsay ME* (2007) *Vaccination against meningococcal disease in Europe: review and recommendations for the use of conjugate vaccines*, FEMS Microbiol Rev 31(1):101-107
- 13 *Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, Noah ND* (1987) *The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and Neisseria lactamica*, Epidemiol Infect 99(3):591-601

- 14 *Blackwell CC, Tzanakaki G, Kremastinou J, Weir DM, Vakalis N, Elton RA, Mentis A, Fatouros N* (1992) Factors affecting carriage of *Neisseria meningitidis* among Greek military recruits, *Epidemiol Infect* 108(3):441-448
- 15 *Moore PS, Hierholzer S, DeWitt W, Gouan K, Djoré D, Lippeveld T, Plikaytis B, Broome CV* (1990) Respiratory viruses and mycoplasma as cofactors for epidemic group A meningococcal meningitis, *JAMA* 264(10):1271-1275
- 16 *Young LS, LaForce FM, Head JJ, Feeley JC, Bennett JV* (1972) A simultaneous outbreak of meningococcal and influenza infections, *N Engl J Med* 287(1):5-9
- 17 *Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM* (2001) Meningococcal disease, *N Engl J Med* 344(18):1378-1388
- 18 *Banks HS* (1948) Meningococcosis; a protean disease, *Lancet* 2(6531):677-681
- 19 *Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M* (2004) Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis, *N Engl J Med* 351(18):1849-1859
- 20 *Grimwood K, Anderson P, Anderson V, Tan L, Nolan T* (2000) Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects, *Arch Dis Child* 83(2):111-116
- 21 *Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M* (2004) Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis, *N Engl J Med* 351(18):1849-1859
- 22 *Brandtzaeg P, Dahle JS, Høiby EA* (1983) The occurrence and features of hemorrhagic skin lesions in 115 cases of systemic meningococcal disease, *NIPH Ann* 6(2):183-90, 202-3
- 23 *Lodder MC, Schildkamp RL, Bijlmer HA, Dankert J, Kuik DJ, Scholten RJ* (1996) Prognostic indicators of the outcome of meningococcal disease: a study of 562 patients, *J Med Microbiol* 45(1):16-20
- 24 *Gorringe AR, van Alphen L* (2009) 16th International Pathogenic *Neisseria* Conference: recent progress towards effective meningococcal disease vaccines., *Hum Vaccin* 5(2):53-56
- 25 *Källström H, Gill DB, Albiger B, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB* (2001) Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence, *Cell Microbiol* 3(3) 133-143
- 26 *Kirchner M, Meyer TF* (2005) The PilC adhesin of the *Neisseria* type IV pilus-binding specificities and new insights into the nature of the host cell receptor, *Mol Microbiol* 56(4):945-957

- 27 *Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Achtman M, Sarkari J, Moxon ER* (1992) Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*, *Mol Microbiol* 6(19):2785-2795
- 28 *Virji M, Makepeace K, Peak IR, Ferguson DJ, Jennings MP, Moxon ER* (1995) Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol* 18(4):741-754
- 29 *Hammerschmidt S, Müller A, Sillmann H, Mühlhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M* (1996) Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease, *Mol Microbiol* 20(6):1211-1220
- 30 *Deghmane AE, Giorgini D, Larribe M, Alonso JM, Taha MK* (2002) Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein, *Mol Microbiol* 43(6):1555-1564
- 31 *Stephens DS, Spellman PA, Swartley JS* (1993) Effect of the (α 2->8)-I inked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells, *J Infect Dis* 167(2):475-479
- 32 *Gilbert M, Watson DC, Cunningham AM, Jennings MP, Young NM, Wakarchuk WW* (1996) Cloning of the lipooligosaccharide α -2,3-sialyltransferase from the bacterial pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*, *J Biol Chem* 271(45):28271-28276
- 33 *Vogel U, Hammerschmidt S, Frosch M* (1996) Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat, *Med Microbiol Immunol* 185(2):81-87
- 34 *Seib KL, Serruto D, Oriente F, Delany I, Adu-Bobie J, Veggi D, Aricò B, Rappuoli R, Pizza M* (2009) Factor H-binding protein is important for meningococcal survival in human whole blood and serum and in the presence of the antimicrobial peptide LL-37, *Infect Immun* 77(1):292-299
- 35 *Schryvers AB, Stojiljkovic I* (1999) Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*, *Mol Microbiol* 32(6):1117-1123
- 36 *Pron B, Taha MK, Rambaud C, Fournet JC, Pattey N, Monnet JP, Musilek M, Beretti JL, Nassif X* (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PilC, *J Infect Dis* 176(5):1285-1292

- 37 *Unkmeir A, Latsch K, Dietrich G, Wintermeyer E, Schinke B, Schwender S, Kim KS, Eigenthaler M, Frosch M* (2002) Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells, *Mol Microbiol* 46(4):933-946
- 38 *Hardy SJ, Christodoulides M, Weller RO, Heckels JE* (2000) Interactions of *Neisseria meningitidis* with cells of the human meninges, *Mol Microbiol* 36(4):817-829
- 39 *de Vries FP, Cole R, Dankert J, Frosch M, van Putten JP* (1998) *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors, *Mol Microbiol* 27(6):1203-1212
- 40 *Moore J, Bailey ES, Benmechernene Z, Tzitzilonis C, Griffiths NJA, Virji M, Derrick JP* (2005) Recognition of saccharides by the OpcA, OpaD, and OpaB outer membrane proteins from *Neisseria meningitidis*, *J Biol Chem* 280(36):31489-31497
- 41 *Virji M; Watt SM, Barker S, Makepeace K, Doyonnas R* (1996) The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*, *Mol Microbiol* 22(5):929-939
- 42 *Muenzner P, Dehio C, Fujiwara T, Achtman M, Meyer TF, Gray-Owen SD* (2000) Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of *Neisseria meningitidis* Opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells, *Infect Immun* 68(6):3601-3607
- 43 *Capecchi B, Adu-Bobie J, Di Marcello F, Ciocchi L, Massignani V, Taddei M, Rappuoli R, Pizza M, Aricò B* (2005) *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells, *Mol Microbiol* 55(3):687-698
- 44 *Turner DPJ, Marietou AG, Johnston L, Ho KKL, Rogers AJ, Wooldridge KG, Ala'Aldeen DAA* (2006) Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*, *Infect Immun* 74(5):2957-2964
- 45 *Scarselli M, Serruto D, Montanari P, Capecchi B, Adu-Bobie J, Veggi D, Rappuoli R, Pizza M, Aricò B* (2006) *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin, *Mol Microbiol* 61(3):631-644
- 46 *Serruto D, Adu-Bobie J, Scarselli M, Veggi D, Pizza M, Rappuoli R, Aricò B* (2003) *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity, *Mol Microbiol* 48(2):323-334
- 47 *Schmitt C, Turner D, Boesl M, Abele M, Frosch M, Kurzai O* (2007) A functional two-partner secretion system contributes to adhesion of *Neisseria meningitidis* to epithelial cells, *J Bacteriol* 189(22):7968-7976

- 48 Merz AJ, So M (1997) Attachment of piliated, Opa- and Opc- gonococci and meningococci to epithelial cells elicits cortical actin rearrangements and clustering of tyrosine-phosphorylated proteins, *Infect Immun* 65(10):4341-4349
- 49 Merz AJ, Enns CA, So M (1999) Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells, *Mol Microbiol* 32(6):1316-1332
- 50 Pujol C, Eugène E, de Saint LM, Nassif X (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with a polarized monolayer of epithelial cells, *Infect Immun* 65(11):4836-4842
- 51 Eugène E, Hoffmann I, Pujol C, Couraud PO, Bourdoulous S, Nassif X (2002) Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells, *J Cell Sci* 115(Pt 6):1231-1241
- 52 Nikulin J, Panzner U, Frosch M, Schubert-Unkmeir A (2006) Intracellular survival and replication of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells, *Int J Med Microbiol* 296(8):553-558
- 53 Birkness KA, Swisher BL, White EH, Long EG, Ewing EP, Quinn FD (1995) A tissue culture bilayer model to study the passage of *Neisseria meningitidis*, *Infect Immun* 63(2):402-409
- 54 Coureuil M, Mikaty G, Miller F, Lécuyer H, Bernard C, Bourdoulous S, Duménil G, Mège RM, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Nassif X (2009) Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium, *Science* 325(5936):83-87
- 55 Stins MF, Gilles F, Kim KS (1997) Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells, *J Neuroimmunol* 76(1-2):81-90
- 55 Ehrlich P, (1904) Über die Beziehung chemischer Konstitution, Verteilung, und pharmakologischer Wirkung; *Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung*, Hirschwald, Berlin ():574
- 57 Goldmann EE (1913) Vitalfärbung am Zentralnervensystem, *Abh Preuss Wissensch Phys-Math* 1():1-60
- 58 Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase, *J Cell Biol* 34(1):207-217
- 59 Engelhardt B, Sorokin L (2009) The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction, *Semin Immunopathol* 31(4):497-511
- 60 Janzer RC, Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells, *Nature* 325(6101):253-257
- 61 Rubin LL, Staddon JM (1999) The cell biology of the blood-brain barrier, *Annu Rev Neurosci* 22():11-28

- 62 *González-Mariscal L., Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE* (2003) Tight junction proteins, *Prog Biophys Mol Biol* 81(1):1-44
- 63 *Crone C, Christensen O* (1981) Electrical resistance of a capillary endothelium, *J Gen Physiol* 77(4):349-371
- 64 *Lossinsky AS, Vorbrodt AW, Wisniewski HM* (1983) Ultracytochemical studies of vesicular and canalicular transport structures in the injured mammalian blood-brain barrier, *Acta Neuropathol* 61(3-4):239-245
- 65 *Boado RJ, Li YJ, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM* (1999) Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21):12079-12084
- 66 *Demeule M, Régina M, Jodoin J, Laplante A, Dagenais C, Berthelet F, Moghrabi A, Béliveau R* (2002) Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier, *Vascul Pharmacol* 38(6):339-348
- 67 *Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S* (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions, *J Cell Biol* 123(6 Pt 2):1777-1788
- 68 *Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K* (1996) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein, *J Cell Biol* 134(4):1031-1049
- 69 *Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S* (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions, *J Cell Biol* 141(2):397-408
- 70 *Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S* (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Mol Biol Cell* 11(12):4131-4142
- 71 *Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM* (2001) Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms, *J Biol Chem* 276(13):10423-10431
- 72 *Peng BH, Lee JC, Campbell GA* (2003) In vitro protein complex formation with cytoskeleton-anchoring domain of occludin identified by limited proteolysis, *J Biol Chem* 278(49):49644-49651
- 73 *Fanning AS, Little BP, Rahner C, Utepbergenov D, Walther Z, Anderson JM* (2007) The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties, *Mol Biol Cell* 18(3):721-731

- 74 *González-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A* (2000) MAGUK proteins: structure and role in the tight junction, *Semin Cell Dev Biol* 11(4):315-324
- 75 *Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S* (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells, *J Cell Biol* 147(1):185-194
- 76 *Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, Sawada N* (2004) Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP, *Exp Cell Res* 300(1):202-212
- 77 *Heiskala M, Peterson PA, Yang Y* (2001) The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport, *Traffic* 2(2):93-98
- 78 *Furuse M, Sasaki H, Tsukita S* (1999) Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands, *J Cell Biol* 147(4):891-903
- 79 *Aurrand-Lions M, Lamagna C, Dangerfield JP, Wang S, Herrera P, Nourshargh S, Imhof BA* (2005) Junctional adhesion molecule-C regulates the early influx of leukocytes into tissues during inflammation, *J Immunol* 174(10):6406-6415
- 80 *Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Mueller F, Nelboeck P, Schmid G, Bartfai T, Dejana E, Brockhaus M* (2000) Homophilic interaction of junctional adhesion molecule, *J Biol Chem* 275(40):30970-30976
- 81 *Kim KS* (2000) *E. coli* invasion of brain microvascular endothelial cells as a pathogenetic basis of meningitis, *Subcell Biochem* 33():47-59
- 82 *Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, Rubens CE* (1997) Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci, *Infect Immun* 65(12):5074-5081
- 83 *Jong AY, Stins M, Huang SH, Chen H, Kim KS* (2001) Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro, *Infect Immun* 69(7):4536-4544
- 84 *Chang YC, Stins M, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, Paul-Satyaseela M, Kim KS, Kwon-Chung KJ, Paul-Satyasee M* (2004) Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier, *Infect Immun* 72(9):4985-4995
- 85 *Masocha W, Rottenberg ME, Kristensson K* (2007) Migration of African trypanosomes across the blood-brain barrier, *Physiol Behav* 92(1-2):110-114
- 86 *Grab DJ, Perides G, Dumler JS, Kim KJ, Park J, Kim YV, Nikolskaia O, Choi KS, Stins MF, Kim KS* (2005) *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier, *Infect Immun* 73(2):1014-1022

- 87 *Attali C, Durmort C, Vernet T, Di Guilmi AM* (2008) The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage, *Infect Immun* 76(11):5350-5356
- 88 *Greiffenberg L, Goebel W, Kim KS, Weiglein I, Bubert A, Engelbrecht F, Stins M, Kuhn M* (1998) Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells, *Infect Immun* 66(11):5260-5267
- 89 *Jain SK, Paul-Satyaseela M, Lamichhane G, Kim KS, Bishai WR* (2006) *Mycobacterium tuberculosis* invasion and traversal across an in vitro human blood-brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis, *J Infect Dis* 193(9):1287-1295
- 90 *Schubert-Unkmeir A, Sokolova O, Panzner U, Eigenthaler M, Frosch M* (2007) Gene expression pattern in human brain endothelial cells in response to *Neisseria meningitidis*, *Infect Immun* 75(2):899-914
- 91 *Pfaffl MW* (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res* 29(9):e45
- 92 *Stuart RO, Nigam SK* (1995) Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C, *Proc Natl Acad Sci USA* 92(13):6072-6076
- 93 *Kanmogne GD, Primeaux C, Grammas P* (2005) HIV-1 gp120 proteins alter tight junction protein expression and brain endothelial cell permeability: implications for the pathogenesis of HIV-associated dementia, *J Neuropathol Exp Neurol* 64(6):498-505
- 94 *Tai YH, Flick J, Levine SA, Madara SL, Sharp GW, Donowitz M* (1996) Regulation of tight junction resistance in T84 monolayers by elevation in intracellular Ca^{2+} : a protein kinase C effect, *J Membr Biol* 149(1):71-79
- 95 *Staddon JM, Herrenknecht K, Smales C, Rubin LL* (1995) Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *J Cell Sci* 108 (Pt2):609-619
- 96 *Bojarski C, Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Mankertz J, Schulzke D, Fromm P, Tauber R, Huber O* (2004) The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells, *J Cell Sci* 117(Pt 10):2097-2107
- 97 *Gurney KJ, Estrada EY, Rosenberg GA* (2006) Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation, *Neurobiol Dis* 23(1):87-96
- 98 *Giebel SJ, Menicucci G, McGuire MG, Das A* (2005) Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy their role in alteration of the blood-retinal barrier, *Lab Invest* 85(5):597-607

- 99 *Lischper M, Beuck S, Thanabalasundaram G, Pieper C, Galla HJ* (2010) Metalloproteinase mediated occludin cleavage in the cerebral microcapillary endothelium under pathological conditions, *Brain Res* 1326():114-127
- 100 *Liu W, Hendren J, Qin XU, Shen J, Liu KJ* (2009) Normobaric hyperoxia attenuates early blood-brain barrier disruption by inhibiting MMP-9-mediated occludin degradation in focal cerebral ischemia, *J Neurochem* 108(3):811-820
- 101 *Schubert-Unkmeir A, Konrad C, Slanina H, Czapek F, Hebling S, Frosch M* (2010) *Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8, *PLoS Pathog* 6(4):e1000874
- 102 *Ichikawa Y, Ishikawa T, Momiyama N; Kamiyama M, Sakurada H, Matsuyama R, Hasegawa S, Chishima T, Hamaguchi Y, Fujii S, Saito S, Kubota K, Hasegawa S, Ike H, Oki S, Shimada H* (2006) Matrilysin (MMP-7) degrades VE-cadherin and accelerates accumulation of beta-catenin in the nucleus of human umbilical vein endothelial cells, *Oncol Rep* 15(2):311-315
- 103 *MacIntyre A, Hammond CJ, Little SC, Appelt DM, Balin BJ* (2002) *Chlamydia pneumoniae* infection alters the junctional complex proteins of human brain microvascular endothelial cells, *FEMS Microbiol Lett* 217(2):167-172
- 104 *András IE, Pu H, Deli MA, Nath A, Hennig B, Toborek M* (2003) HIV-1 Tat protein alters tight junction protein expression and distribution in cultured brain endothelial cells, *J Neurosci Res* 74(2):255-265
- 105 *Inagaki-Ohara K, Dewi FN, Hisaeda H, Smith AL, Jimi F, Miyahira M, Samir A, Abdel-Aleem A, Horii Y, Nawa Y* (2006) Intestinal intraepithelial lymphocytes sustain the epithelial barrier function against *Eimeria vermiformis* infection, *Infect Immun* 74(9):5292-5301
- 106 *Papadopoulos MC, Saadoun S, Woodrow CJ, Davies DC, Costa-Martins P, Moss RF, Krishna S, Bell BA* (2001) Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain, *Neuropathol Appl Neurobiol* 27(5):384-395
- 107 *Brown RC, Davis TP* (2005) Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun* 327(4):1114-1123
- 108 *Khan NA, Siddiqui R* (2009) *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins, *Int J Parasitol* 39(14):1611-1616
- 109 *Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, Stewart GA, Taylor GW, Garrod DR, Cannell MB, Robinson C* (1999) Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions, *J Clin Invest* 104(1):123-133

- 110 Wu Z, Nybom P, Magnusson KE (2000) Distinct effects of *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1, *Cell Microbiol* 2(1):11-17
- 111 Kim JY, Sajjan US, Krasan GP, LiPuma JL (2005) Disruption of tight junctions during traversal of the respiratory epithelium by *Burkholderia cenocepacia*, *Infect Immun* 73(11):7107-7112
- 112 Sulik A, Chyczewski L (2008) Immunohistochemical analysis of MMP-9, MMP-2 and TIMP-1, TIMP-2 expression in the central nervous system following infection with viral and bacterial meningitis, *Folia Histochem Cytobiol* 46(4):437-442
- 113 Leppert D, Lindberg RL, Kappos L, Leib SL (2001) Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis, *Brain Res Rev* 36(2-3):249-257
- 114 Paul R, Lorenzi S, Koedel U, Sporer B, Vogel U, Frosch M, Pfister MW (1998) Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis, *Ann Neurol* 44(4):592-600
- 115 Leib SL, Clements JL, Lindberg RL, Heimgartner C, Loeffler JM, Pfister LA, Täuber MG, Leppert D (2001) Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis, *Brain* 124(Pt 9):1734-1742
- 116 Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S (2005) Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis, *Nat Clin Pract Rheumatol* 1(2):102-110
- 117 Mäkitalo L, Sipponen T, Kärkkäinen P, Kolho KL, Saarialho-Kere U (2009) Changes in matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) expression profile in Crohn's disease after immunosuppressive treatment correlate with histological score and calprotectin values, *Int J Colorectal Dis* 24(10):1157-1167
- 118 Overall CM, López-Otín C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era, *Nat Rev Cancer* 2(9):657-672
- 119 Lindsey ML (2004) MMP induction and inhibition in myocardial infarction, *Heart Fail Rev* 9(1):719
- 120 Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J (2001) Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke, *Stroke* 32(12):2762-2767
- 121 Förster C, Kahles T, Kietz S, Drenckhahn D (2007) Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND, *J Physiol* 580(Pt.3):937-949

- 122 *Förster C, Silwedel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, Drenckhahn D* (2005) Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system, *J Physiol* 565(Pt 2):475-486
- 123 *Rosenberg GA, Dencoff JE; Correa N, Reiners M; Ford CC* (1996) Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood- brain barrier injury, *Neurology* 46(6):1626-1632
- 124 *Van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K* (2007) Corticosteroids for acute bacterial meningitis, *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD004405
- 125 *Van de Beek D; Farrar JJ; de Gans J, Mai NTH, Molyneux EM, Peltola H, Peto TE, Roine I, Scarborough M, Schultz C; Thwaites GE, Tuan PQ, Zwinderman AH* (2010) Adjunctive dexamethasone in bacterial meningitis: a meta-analysis of individual patient data, *Lancet Neurol* 9(3):254-263
- 126 *Gupta S, Tuladhar AB* (2004) Does early administration of dexamethasone improve neurological outcome in children with meningococcal meningitis?, *Arch Dis Child* 89(1):82-83
- 127 *Molyneux EM, Walsh AL, Forsyth H, Tembo M, Mwenechanya J, Kayira K, Bwanaisa L, Njobvu A, Rogerson S, Malenga G* (2002) Dexamethasone treatment in childhood bacterial meningitis in Malawi: a randomised controlled trial, *Lancet* 360(9328):211-21Z

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Deoxyguanidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix
ECGS	<i>endothelial cell growth supplement</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbant assay</i>
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
G	Guanin
GC-Agar	Gonokokken-Agar (<i>gonococcal complex agar</i>)
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cell</i>
HS	humanes Serum

KBE	koloniebildende Einheit
mA	Milli-Ampere
MC	Meningokokken
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAO	Phenylarsenoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPM	Proteose-Pepton-Medium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
T	Thymin
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEER	elektrischer Widerstand von Epi- oder Endothel (<i>trans epithelial/endothelial electric resistance</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte.....	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 3: Von Herstellern bezogene Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme.....	16
Tabelle 4: Lösungen aus Eigenherstellung.....	18
Tabelle 5: Oligonukleotide.....	18
Tabelle 6: Antikörper.....	19
Tabelle 7: Zusammensetzung der Nährmedien für Bakterien.....	19
Tabelle 8: Zusammensetzung der Nährmedien für HBMEC.....	19
Tabelle 9: Ergebnisse der QRT-PCR.....	39

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Tight- und Adherens-Junctions.....	9
Abbildung 2: Mechanismen der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke.....	11
Abbildung 3: Versuchsaufbau der Permeabilitätsmessungen.....	34
Abbildung 4: Versuchsaufbau zur Etablierung des Permeabilitätsassays.....	35
Abbildung 5: Denaturierende Gelelektrophorese von RNA Proben aus HBMEC.....	36
Abbildung 6: Test auf DNA durch Gelelektrophorese nach erfolgter PCR.....	37
Abbildung 7: Schmelzkurve des PCR-Produktes von Claudin 12.....	40
Abbildung 8: Schematische Darstellung von Occludin.....	41
Abbildung 9: Nachweis von Occludin in nicht infizierten HBMEC.....	42
Abbildung 10: Nachweis von Occludin in infizierten HBMEC	42
Abbildung 11: Nachweis von ZO-1 in infizierten und uninfizierten HBMEC	43
Abbildung 12: Western Blot nach Immunpräzipitation von Occludin.....	44
Abbildung 13: Immunpräzipitation von HBMEC nach Behandlung mit Cytochalasin D.....	45
Abbildung 14: Immunfluoreszenzdarstellung von Occludin und ZO-1.....	45
Abbildung 15: Immunfluoreszenzdarstellung von Occludin und ZO-1.....	46
Abbildung 16: Immunfluoreszenzdarstellung von Occludin und ZO-1.....	46
Abbildung 17: Immunfluoreszenzdarstellung von Occludin und ZO-1.....	47
Abbildung 18: Permeabilität verschieden beschichteter Transwell-Membranen	49
Abbildung 19: Permeabilität verschieden beschichteter Transwell-Membranen	49
Abbildung 20: Transmigration von <i>N. meningitidis</i> durch einen Transwell-Filter.....	50
Abbildung 21: FITC-Dextran Durchfluss durch matrigelbeschichteten Transwell-Filter.....	51
Abbildung 22: FITC-Dextran Durchfluss nach HBMEC-Wachstum zwischen 3 und 8 Tagen.....	52
Abbildung 23: Ergebnisse des Permeabilitätsassays.....	53

Danksagung

Viele Menschen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen von Ihnen besonders bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Matthias Frosch, welcher im Hintergrund für ein exzellentes Umfeld zum Forschen und wissenschaftlichem Arbeiten geschaffen hat, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Betreuerin Professor Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir möchte ich ganz herzlich für die enge Begleitung, ihre stetige Motivation, die vielen kreativen Inspirationen und die unendliche Geduld mit mir danken.

Ursula Panzner und Christian Konrad möchte ich als zwei Personen, welche mir im Laboralltag stets mit Rat und Tat zur Seite standen, ebenfalls ein großes Dankeschön aussprechen. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Reidl danke ich sowohl für die fachliche Unterstützung als auch für die wirklich tolle Arbeitsatmosphäre in unseren Laborräumen.

Meiner Ehefrau Marieke danke ich ganz herzlich für das Aufbauen in schweren Phasen und das unnachgiebige Antreiben zum Abschluss dieser Arbeit. Meiner Mutter danke ich ganz herzlich für die wertvollen Korrekturhinweise. Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Tochter Antonia bedanken, die - ohne es zu wissen - einen nicht unerheblichen Beitrag zur Vollendung dieser Arbeit geleistet hat.